HAL
open science

Modélisation des phases précoces de la maladie d'Alzheimer par transfert de gènes

Mickaël Audrain

To cite this version:

Mickaël Audrain. Modélisation des phases précoces de la maladie d'Alzheimer par transfert de gènes. Neurosciences. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB010 . tel-01584477

HAL Id: tel-01584477

https://theses.hal.science/tel-01584477v1

Submitted on 8 Sep 2017

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.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Descartes
Sciences de la Vie et de la Santé
Ecole Doctorale : Bio Sorbonne Paris Cité
Discipline : Neurobiologie

Modélisation des phases précoces de la maladie d'Alzheimer par transfert de gènes

Présentée et soutenue publiquement par

Mickaël Audrain

le 25 mars 2016

Composition du jury :

Pr Bruno DUBOIS	Président
Dr Hélène MARIE	Rapporteuse
Pr Jean MARIANI	Rapporteur
Dr Bernadette ALLINQUANT	Examinatrice
Dr Jean-Charles LAMBERT	Examinateur
Dr Nathalie CARTIER	Directrice de thèse

"si l'on choisit de faire des plaques séniles l'élément le plus caractéristique de la maladie d'Alzheimer, cette dernière pourrait être baptisée maladie de Fischer"

Laëtitia Ngatcha-Ribert

"Make your mark in New York and you are a made man"

Mark Twain

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse et pour leur participation à ma soutenance. C'est un véritable plaisir pour moi de soutenir ma thèse devant un jury de cette qualité. Je remercie plus particulièrement le Docteur Hélène Marie et le Professeur Jean Mariani pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Un très grand merci au Professeur Bruno Dubois, président de ce jury, ainsi qu'aux Docteurs Bernadette Allinquant et Jean-Charles Lambert pour l'évaluation de ce travail comme examinateurs.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse le Docteur Nathalie Cartier pour m'avoir proposé cette thèse à un moment où j'en avais grandement besoin. Un grand merci pour l'opportunité de venir travailler à MIRCen et pour cette liberté de travail dont j'ai pu bénéficier.

Mes remerciements vont bien évidemment ensuite aux mecs du bureau sans qui cette thèse n'aurait pas été la même (et c'est peu de le dire !). Tout d'abord, un grand merci à Jérôme pour avoir initié ce projet "modèle" et pour m'avoir beaucoup appris à mon arrivée. Elle commence à dater cette période où on dépensait je ne sais combien de temps et d'énergie à convaincre certaines personnes du potentiel et de l'intérêt de ce travail ! J'espère que les papiers, brevet, collaborations que l'on a réussi à mettre en place serviront de tremplin à ton nouveau projet. Je te souhaite vraiment le meilleur à toi et à AgenT pour la suite ! Un grand merci à Romain également qui a été d'une grande aide dans l'ensemble de cette thèse et avec qui on s'est bien marré entre volley, Aberlour, andouillette et garderie pour post-docs de plus de 37 ans ! Je suis sur et certain que le marketing t'offrira plus de réussite qu'ApoE2 (je rage encore !!!). Obrigado à Sandrito pour tout ce qu'il a apporté à cette AD team. Merci de m'avoir laissé participer à tes différents projets et pour nous avoir permis de bien rigoler sur tout ce que tu as pu nous raconter entre mur blanc et deuxième thèse ! Ah vous allez me manquer les mecs... que de bons souvenirs que ce soit à Paris, Toulouse, Montpellier, Copenhague, Washington, NYC ou j'espère d'ailleurs que vous reviendrez (réservez Fly Emirates maintenant qu'on y a des contacts !). Un grand merci également à Benoit (le DYRK addict !) qui reprend dorénavant le flambeau. Entre Kub or et KFC (!) t'es un acharné de boulot et on n'aurait pas pu rêver mieux pour continuer tous ces projets. Je remercie également Satoru ainsi que MAB

et Fathia, anciennes membres du fameux bureau, avec qui j'ai passé également beaucoup de temps. Que de très bons souvenirs là aussi. Un très grand merci à Gaëlle et Françoise (je n'ai pas de place pour la friteuse dans la valise !) pour toute l'aide apportée que ce soit en bioch, bio mol, histo et tout le reste. Bon sang on l'a fait tourner cette boutique !

Un très gros merci à Christine qui m'a pendant très longtemps prêté son badge pour la cantine du CEA. Merci à toi d'avoir permis à un pauvre thésard comme moi d'éviter de perdre beaucoup d'argent dans ces repas, tu m'as ôté une très grande épine de pied ! Un grand merci également à Cyndie, Morgane, Caroline S, Benoit G, Vanja, Yassemine, Laetitia, Sylvie sans oublier notre fameuse Léa qui viennent compléter l'unité.

Je remercie énormément nos collaborateurs les plus proches que ce soit à Ste Anne avec Brigitte, Patrick, Jean-Marie, Alexis, Bernadette, Lucille, Cécile, ou encore à Pincus et Roscoff avec Yvette et Laurent. Vous faites sans hésitation partie des quelques personnes qui me donnent envie de continuer dans ce domaine. Ça a a été un énorme plaisir pour moi que d'intéragir avec vous.

MIRCen est incontestablement l'institut idéal pour y effectuer une thèse, et ce grâce aux nombreuses personnes qui le composent. Il est impossible pour moi de citer tout le monde mais il est évident que je remercie l'ensemble du bâtiment. Tout d'abord un gros merci aux anciens avec qui j'ai débuté et qui ont tous migré vers de nouveaux horizons : merci +++ à Juliette, Laetitia, Lucille, Matthias, Emilie, Fabien, Michel. Un très très gros merci aux personnes avec qui il est plus qu'agréable d'interagir et qui participent au fait qu'on a envie de venir bosser le matin : merci à Charlène (José), Noëlle, Gwen, Aurélie, Marie-Claude, Karine, Maria, Mylène (& co !), Dimitri, Julien F, Charlotte, Noémie, Marie, Yael, Kelly, Sandrine, Brice, Clémence, Caroline, Fanny, Pauline, Camille, Didier, Aude, Laurent V, Sylvie, Cécile, Martine, Diane, Léopold, Che, Laurent W, Lev, Claire-Maëlle, Joanna, Elsa, Sonia, Nadjia, Yann, Anne-Sophie, Marie-Christine, Marie-Laure, sans oublier une charnière de chefs toujours à l'écoute : Philippe, Emmanuel, Marc, Alexis, Carole, Gilles, Julien V, Frédéric, Thierry. Un gros merci également à toute l'équipe indispensable au bien être de nos animaux : Julien M, Lambert, David, Jean-Marie.

Merci aussi à toute l'équipe de volley du CEA FAR. Que de bons souvenirs des jeudis soir !

Merci également à Laetitia et Yannick pour toutes les bouffes et qui savent bien ce que représente la thèse. On se voit à Liverpool ou NY !

Enfin merci à ma famille et en particulier à ma mère, toujours présente et aidante quelles que soient les difficultés. Du chemin a été parcouru depuis 2012 et je n'oublierai pas à qui je le dois. Quel exemple, merci pour tout. Merci à ma soeur et à mon frère qui ont également une place plus qu'importante dans mon parcours. Je vous souhaite à vous deux la meilleure réussite possible à tous les niveaux. Merci à mon père.

Enfin Claire, le dernier paragraphe est évidemment pour toi. Merci pour ta présence quotidienne depuis maintenant 8 ans. On en a fait du chemin entre les amphis de Nantes, Paris et maintenant New York. Je te dois énormément et je n'aurai pas pu imaginer meilleure partenaire pour toute cette aventure. Merci pour tout et let's go to Manhattan ;-)

Résumé

L'évaluation de biomarqueurs et de thérapies innovantes pour la maladie d'Alzheimer (MA) souffre de la mauvaise compréhension des phases initiales de la maladie mais également du manque de modèles animaux pertinents et proches de la physiopathologie humaine. La majorité des modèles rongeurs disponibles reproduisent en seulement quelques mois les lésions classiques de la MA telles que les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), alors que leur apparition prend des années chez l'Homme.

L'objectif de mon travail de doctorat a été de développer une nouvelle stratégie de modélisation des phases précoces de la MA sans surexpression majeure de transgène. Pour cela, nous avons utilisé le co-transfert des gènes humains APP_{SL} et $PS1_{M146L}$ à l'aide de vecteurs viraux dans l'hippocampe de souris et de rats de 8 semaines. Nous avons caractérisé ces modèles et montré une production de peptides, comme le βCTF ou l'Aβ42 issus du clivage de l'APP, similaire à ce que l'on observe dans l'hippocampe de patients atteints de la MA. Nous avons également montré une hyperphosphorylation de Tau et une défaillance synaptique caractérisée par une diminution des niveaux de PSD-95 et GLT-1 ainsi que par une augmentation du courant tonique glutamatergique. Ces modifications ont enfin été associées à des défauts comportementaux.

Mes résultats suggèrent que de nombreux évènements apparaissent bien avant la formation des plaques amyloïdes ou des DNFs et conduisent à une perturbation de la synapse et à l'apparition précoce de défauts comportementaux. Nous disposons donc d'outils relevants quant à la compréhension des premiers stades de la MA qui permettront à la fois de tester de nouveaux composés médicaments sur ces modèles à large fenêtre thérapeutique, et de découvrir de nouveaux biomarqueurs précoces dans le plasma et le liquide cérébro-spinal.

Mots-clés : maladie d'Alzheimer, modèles animaux, prodromal, défaillance synaptique, courant glutamatergique tonique, ratio Aβ

Abstract

Evaluation of biomarkers and new innovative therapies for Alzheimer's disease (AD) suffers from a misunderstanding of early phases and lack of appropriate animal models close to the human physiopathology. Most available rodent models reproduce hallmarks of AD such as amyloid plaques and neurofibrillary tangles in a few months, while it takes many years to be achieved in human.

My PhD work consisted to develop a new modelling strategy of AD early phases without major overexpression of transgenes. To do so, we used gene transfer of human APP_{SL} and $PS1_{M146L}$ using viral vectors injection in the hippocampus of 8 weeks old mice and rats. We characterized these models and showed peptides production, such as βCTF and Aβ42 from APP processing, similar to what is observed in AD patients hippocampi. We also highlighted a hyperphosphorylation of Tau followed by a synaptic failure characterized by a decrease of PSD-95 and GLT-1 levels and by an increase of the tonic current mediated by glutamate. These changes have been finally associated with behavioral deficits.

My results suggest that many events appear well before the formation of amyloid plaques or tangles and lead to the disruption of the synapse and the early onset of behavioral defects. Thus, we now have relevant tools to understand the early stages of AD, which will allow us to test new drug compounds on these models with a wide therapeutic window and discover new early biomarkers in plasma and cerebrospinal fluid.

Key words: Alzheimer's disease, animal models, prodromal, synaptic failure, tonic glutamatergic current, Aβ ratio

SOMMAIRE

ABREVIATIONS **10**

LISTE DES FIGURES **11**

LISTE DES TABLEAUX **12**

INTRODUCTION **13**

1. LA MALADIE D'ALZHEIMER 13

1.1. Définition et contexte *13*

1.1.1. Troubles cognitifs et diagnostic de la MA 13

1.1.2. La MA, un vieillissement pathologique ? 15

1.1.3. Impacts sociaux et économiques 16

1.2. Historique *17*

1.2.1. Début du XXème siècle : la découverte 17

1.2.2. Fin du XXème siècle : des avancées majeures 18

1.3. Neuropathologie *19*

1.3.1. L'atrophie cérébrale 19

1.3.2. Les plaques amyloïdes 20

1.3.3. Les dégénérescences neurofibrillaires 22

1.3.4. Autres lésions 24

1.3.4.1. L'angiopathie amyloïde cérébrale 24

1.3.4.2. La perte neuronale 25

1.3.4.3. La perte de l'intégrité synaptique 25

1.4. Etiologie *26*

1.4.1. Les Formes familiales de la MA 27

1.4.1.1. Le gène *APP* 27

1.4.1.2. Les gènes *PS1* et *PS2* 28

1.4.2. Les Formes sporadiques de la MA 28

1.4.2.1. Facteurs de risque génétiques 29

1.4.2.1.1. Le gène *APOE* 29

1.4.2.1.2. Les GWAS 29

1.4.2.2. Autres facteurs de risques 31

1.5. Clinique *32*

1.5.1. Diagnostic 32

1.5.2. Biomarqueurs 33

1.5.3. Les essais cliniques 36

1.5.3.1. Les grandes lignes 36

1.5.3.2. AAIC Washington 2015 37

1.5.3.2.1. Emergent BioSolutions et le 5E3 37

1.5.3.2.2. Eli Lilly et le N3pG 38

1.5.3.2.3. Affiris et l'ADO2 39

1.5.3.2.4. Biogen et l'Aducanumab 39

1.5.3.2.5. Anavex Life Sciences et l'A2-73 40

1.5.3.3. Traitements symptomatiques disponibles 41

2. LA CASCADE AMYLOÏDE 42

2.1. L'hypothèse d'Hardy et Higgins de 1992 ..... *42*

2.2. Les voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique *43*

2.3. Conséquences de l'accumulation d'Aβ *44*

2.4. La voie Tau *46*

2.5. Faut-il rejeter l'hypothèse de la cascade amyloïde ? *47*

3. LES MODELES D'ETUDES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 50

3.1. Modèles souris *50*

3.1.1. Modèles APP 51

3.1.1.1. Le modèle PDAPP 51

3.1.1.2. Le modèle Tg2576 52

3.1.1.3. Le modèle APP23 52

3.1.1.4. Le modèle J20 52

3.1.1.5. Le modèle TgCRND8 53

3.1.1.6. Les modèles APP NL-F et NL-G-F 53
3.1.2. Modèles PS1 54
3.1.2.1. Les modèles PS1(M146L) et PS1(M146V) 54
3.1.2.2. Les modèles PS1 KO et KI 55
3.1.3. Modèles APP+PS1 55
3.1.3.1. Le modèle APPswe/PS1dE9 (ou « APP/PS1ΔE9 ») 56
3.1.3.2. Le modèle 5xFAD 56
3.1.3.3. Le modèle APP751SL/PS1 KI (ou « APP/PS1 Ki ») 56
3.1.4. Modèles TAU et APP+PS1+TAU 56
3.1.5. Modèles Aβ 57
3.1.5.1. Le modèle BRI-Aβ42 58
3.1.5.2. Le modèle par injection d'Aβ de synthèse 58
3.2. Modèles rats 58
3.2.1. Les modèles UKUR28, 19 et 25 59
3.2.2. Le modèle TgAPPswe 59
3.2.3. Le modèle Tg6590 59
3.2.4. Le modèle Tg478/Tg1116/Tg11587 60
3.2.5. Le modèle McGill-R-Thy1-APP 60
3.3. Autres modèles d'étude 60
4. LE TRANSFERT DE GENES 63
4.1. Les vecteurs AAVs 63
4.2. Injection stéréotaxique des AAVs 64
4.3. Exemples d'utilisation dans le cadre de la MA 65
4.3.1. Développement de stratégies thérapeutiques 65
4.3.2. Développement de stratégies de modélisation 65

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE 67

RESULTATS 69
ARTICLE 1 69
RESULTATS PRELIMINAIRES DE L'ARTICLE 2 EN PREPARATION 112

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 132
DISCUSSION DES RESULTATS 132
L'expression des transgènes 132
Métabolisme de l'APP 133
Hypothèse formulée 134
L'implication de Tau 137
Des modèles à progression lente 139
La question du sérotype viral utilisé 140
PERSPECTIVES ET AUTRES PROJETS LIES AU MODELE 141
Etude de protéomique comparative 141
Construction d'une protéine de fusion 142
Projet TRIAD 143
Co-injection d'Aftin-5 144
Injection d'homogénats de cerveaux humains 144
Injection dans le bulbe olfactif 145
Développement d'un modèle primate 146
Développement de la société AgenT 146

ANNEXES 148
BREVET 148
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 180

BIBLIOGRAPHIE 181

Abréviations

AAC : Angiopathie amyloïde cérébrale
AAV : Virus adéno-associé, de l'anglais « Adeno-Associated Virus »
Aß : Peptide amyloïde bêta
ACh : Acétylcholine
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
APOE : Apolipoprotéine E
APP : Protéine précurseur du peptide Aβ, de l'anglais « Amyloid β Precursor Protein »
ARNm : Acide ribonucléique messager
BACE1 : β-sécrétase, de l'anglais « β site APP Cleaving Enzyme 1 »
BHE : Barrière hémato-encéphalique
CA : Corne d'Ammon
CDK : Kinase cycline dépendante, de l'anglais « Cyclin-Dependent Kinase »
DNF : Dégénérescence neurofibrillaire
FAD : Forme familiale de la MA, de l'anglais « Familial Alzheimer's Disease »
FDG : FluoroDeoxyGlucose (radio traceur pour TEP)
GABA : Acide γ aminobutyrique
GWAS : Etude d'association pangénomique, de l'anglais « Genome-Wide Association Study »
iPSC : Cellule Pluripotente Induite, de l'anglais « Induced Pluripotent Stem Cell »
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ITR : Séquences inversées répétées, de l'anglais « Inverted Terminal Repeat »
KI : de l'anglais « knock-in »
KPI : de l'anglais « Kunitz Protease Inhibitory »
LCR : Liquide céphalo-rachidien (ou cérébrospinal dans la nouvelle nomenclature)
LTD : Dépression à long terme, de l'anglais « Long Terme Depression »
LTP : Potentialisation à long terme, de l'anglais « Long Terme Potentiation »
MA : Maladie d'Alzheimer
MAP : Protéine associée aux microtubules, de l'anglais « Microtubule Associated Protein »
MAPT : Gène de la protéine tau, de l'anglais « Microtubule-Associated Protein Tau »
MCI : Déclin cognitif léger, de l'anglais « Mild Cognitive Impairment »
MCT : Mémoire à court terme
MLT : Mémoire à long terme
MMSE : Mini Mental State Examination
NeuN : Antigène nucléaire neuronal, de l'anglais « Neuronal Nuclear antigen »
NFT : Neurofibrillary tangles (=DNF en français)
NHP : Primate Non-Humain, de l'anglais « Non-Human Primate »
NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique
OMS : Organisation mondiale de la santé
PHF : Filaments appariés en hélice, de l'anglais « Paired Helical Filaments »
PIB : Composé B de Pittsburgh, de l'anglais « Pittsburgh compound B »
PS1 ou PSEN1 : Préséniline 1
PS2 ou PSEN2 : Préséniline 2
RMN : Résonance magnétique nucléaire
ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène, de l'anglais « Reactive Oxygen Species »
SNC : Système nerveux central
SNP : Polymorphisme nucléotidique simple, de l'anglais « Single Nucleotide Polymorphism »
Tau : « Tubulin Associated Unit »
TEP : Tomographie à émission de positrons
WT : Souris sauvage, de l'anglais « Wild-Type »

Liste des figures

Figure 1 : Prévalence de la MA en fonction de l'âge de la population (Qiu et al. 2009) 16
Figure 2 : Atrophie cérébrale d'un patient atteint de la MA à droite et comparaison à un patient sain à gauche (Ellison et al. 1998) 20
Figure 3 : Immunomarquage 4G8 de plaques amyloïdes (Audrain et al. en préparation) 21
Figure 4 : Phases de propagation amyloïde chez l'Homme (Thal et al. 2002) 21
Figure 5 : Représentation schématique de Tau assurant la cohésion des microtubules du cytosquelette des neurones (Wikipedia) 22
Figure 6 : Exemples de trois stades de DNFs marqués par l'anticorps TG3 (Augustinack et al. 2002) 23
Figure 7 : Progression spatio-temporelle de la DNF (Braak et al. 1991) 24
Figure 8 : Artère avec dépôt d'Aß dans la paroi, i.e. AAC (Thal et al. 2015) 25
Figure 9 : Effets de l'injection d'Aß (graphiques noirs) en intracérébroventriculaire (ICV) sur des synapses glutamatergiques du CA1 de l'hippocampe, mesure de la LTP et LTD (Ondrejcak et al. 2010) 26
Figure 10 : Localisation des gènes APP, PS1 et PS2 sur les chromosomes 21, 14 et 1 respectivement (http://ghr.nlm.nih.gov) 28
Figure 11 : Extrait d'une fiche de suivi du test MMSE 33
Figure 12 : Nouveaux critères de diagnostic pour la MA (Dubois et al. 2014) 35
Figure 13 : Modèle hypothétique du décours de la MA et des biomarqueurs associés (Blennow et al. 2012) 35
Figure 14 : Répartition du nombre d'essais cliniques "en cours" sur la MA (https://clinicaltrials.gov) 37
Figure 15 : Cotations d'Anavex Life Sciences Corp. sur les 5 derniers mois de 2015 (www.nasdaq.com) 41
Figure 16 : Hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy et al. 2002) 43
Figure 17 : Métabolisme de l'APP suivant la voie non-amyloïdogénique et amyloïdogénique (LaFerla et al. 2007) 44
Figure 18 : Etats d'assemblage de l'Aβ (LaFerla et al. 2007) 44
Figure 19 : Représentation schématique décrivant les dysfonctions synaptiques dues aux oligomères d'Aβ (Tu et al. 2014) 46
Figure 20 : Age d'apparition des caractéristiques phénotypiques des modèles APP précédemment cités (adapté d'Alzforum) 54
Figure 21 : Comparaison de l'Aβ humain et murin qui diffèrent en position 5, 10 et 13 (Hall et al. 2012) 55
Figure 22 : Age d'apparition des caractéristiques phénotypiques des modèles APP/PS1 précédemment cités (adapté d'Alzforum) 57
Figure 23 : Représentation d'une coupe coronale d'un cerveau de souris et des coordonnées stéréotaxiques par rapport au Bregma (Allen Brain Atlas) 64
Figure 24 : Ratio sAPPa / sAPPβ dans l'hippocampe de souris injectées à 3 mois post-injection 134
Figure 25 : Hypothèse formulée 136
Figure 26 : Hyperphosphorylation de Tau dans les souris AAV-APP/PS1 138
Figure 27 : Pas de formation de plaque amyloïde, de gliose, de mort neuronale et d'atrophie dans les souris AAV-APP/PS1 139
Figure 28 : Arrêt de la production de l'APP humaine 1 mois après l'injection d'AAV9 141
Figure 29 : Principe de fonctionnement de la technologie iTRAQ (https://www.broadinstitute.org) 142
Figure 30 : Clivage de la protéine de fusion APP-T2A-PS1 dans des HEK (NT = non transfecté) 143
Figure 31 : Acteurs du consortium du projet FUI TRIAD 144
Figure 32 : L'injection d'homogénats de cerveaux de patients atteints de la MA entraine la formation de plaques chez les souris AAV-APP/PS1 145
Figure 33 : Logo de la société AgenT 146

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de gènes identifiés par GWAS en dehors d'APOE (Tosto et al. 2013) 30
Tableau 2 : Liste des biomarqueurs validés pour la MA 34
Tableau 3 : Caractéristiques des principaux promoteurs utilisés dans les modèles de la MA (Hall et al. 2012) ... 51

Introduction

1. La maladie d'Alzheimer

Mon travail de thèse consiste à développer de nouveaux modèles animaux des phases précoces de la maladie d'Alzheimer (MA) par transfert de gènes. Pour introduire mes travaux, je commencerai par présenter la maladie d'un point de vue médical et social, pour la simple raison qu'avant d'être un sujet de recherche parmi d'autres, la MA est un véritable enjeu de santé publique. Après un historique bref mais essentiel, je décrirai les lésions anatomiques « classiques » de la maladie qui font encore l'objet de nombreuses recherches. Je m'attarderai ensuite sur les parties « étiologie » et « clinique » qui selon moi introduisent très bien deux notions clés à garder à l'esprit pour comprendre l'intérêt de mes travaux : la première est que la maladie que l'on étudie au laboratoire ne correspond finalement qu'à un faible pourcentage des cas cliniques d'Alzheimer, la deuxième est que sur la période 2002-2012, 99,6% des essais cliniques réalisés sont considérés comme des échecs[1].

1.1. Définition et contexte

1.1.1. Troubles cognitifs et diagnostic de la MA

La démence est un syndrome soit un ensemble de signes cliniques et de symptômes que le patient va présenter et qui va conduire à une altération de ses fonctions cognitives. Il existe de nombreuses formes de démence comme la démence fronto-temporale ou la démence à corps de Lewy mais **60 à 70% des cas** d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) correspondraient à la MA. Même si la totalité des signes ci-dessous puissent être retrouvés chez des personnes atteintes d'une autre démence ou d'autres troubles affectant divers régions cérébrales, il s'agit des **signes et symptômes les plus souvent retrouvés chez les patients atteints de la MA** :

- Pertes de mémoires

Symptôme clé de la MA, la perte de mémoire reste encore aujourd'hui un trouble cognitif très étudié et non traité. Pour une question de simplicité nous allons considérer qu'il existe deux grands types de mémoire qui sont la mémoire à court (**MCT**) et la mémoire à long terme (**MLT**). La MCT correspond à une rétention que l'on va qualifier de temporaire, i.e. une

mémoire à capacité de stockage limitée mais avec une vitesse de stockage et de lecture extrêmement rapide. Cette mémoire peut être grossièrement, mais très justement, comparée à la mémoire vive (RAM) des ordinateurs. Deux types de mémoires constituent cette MCT : la mémoire sensorielle et la mémoire de travail. La mémoire sensorielle est par exemple utilisée lors de la conduite sur route avec une mémoire visuelle (durée approximative de 500 ms) et auditive (durée approximative de 10 sec) qui sont mobilisées en permanence. La mémoire de travail quant à elle est indispensable à l'accomplissement de tâches quotidiennes et permet par exemple de réaliser des calculs rapides ou de retenir un numéro de téléphone. Mon expérience d'aide-soignant dans différents services de gériatrie m'a confirmé qu'il existe une altération plus qu'importante de cette mémoire chez les patients atteints de la MA. Il suffit d'un simple jeu de société ou d'une absence de quelques secondes dans la salle de bain d'un patient pour que ce dernier ne vous reconnaisse plus et vous confirme par la même occasion une mémoire de travail et donc une MCT très altérée. La MLT est également atteinte dans la MA. Cette dernière est constituée d'une mémoire déclarative (explicite) elle-même constituée d'une **mémoire épisodique** qui permet la rétention d'évènements de la vie personnelle comme une naissance ou un examen réussi, et d'une **mémoire sémantique** plus concrète qui retient les connaissances apprises tels que les noms des pays. La deuxième mémoire composant la MLT est la mémoire non déclarative (implicite). Celle-ci est elle-même complexifiée par de nombreux sous-types suivant les publications. Je ne citerai parmi elles que la mémoire procédurale qui permet l'acquisition d'habiletés et donc du savoir-faire. Dans les premiers stades de la maladie les personnes ont des difficultés à assimiler de nouvelles informations, synonyme d'une MCT altérée. Au stade évolué, la mémoire de nombreux faits anciens se perd également signe d'une MLT défaillante. L'étude du patient Henry Gustav Molaison (ou patient HM) que je ne détaillerai pas dans ce manuscrit, a permis de rendre compte de l'implication de nombreuses aires cérébrales dans les différents types de mémoire précédemment cités. La mémoire de travail ferait par exemple appel au cortex préfrontal. L'hippocampe quant à lui permettrait la conversion des souvenirs à court terme en souvenirs à long terme.

Cette brève analyse des sous-types de mémoires rend compte de la complexité que représente une perte de mémoire et donne ainsi un premier aperçu de la **complexité de la MA**.

En plus des pertes de mémoires, les autres signes d'alerte et de diagnostic définis par "l'Alzheimer's Association" sont les suivants :

- Difficulté à résoudre des problèmes
- Difficulté à exécuter des tâches familières et des mouvements (apraxie)
- Désorientation dans le temps et l'espace
- Difficultés à comprendre les images et relations spatiales
- Problèmes d'expression orale et écrite
- Perte de la capacité à reconstituer un parcours
- Jugement amoindri
- Retrait du travail ou des activités sociales
- Changement d'humeur et de la personnalité

Il ne s'agit très certainement pas d'une liste exhaustive, mais l'ensemble de ces altérations cognitives conduisent à une **perte progressive de l'autonomie**, que l'on retrouve chez l'ensemble des patients Alzheimer.

1.1.2. La MA, un vieillissement pathologique ?

Si l'on excepte les formes familiales que nous expliciterons plus loin dans ce manuscrit, la MA est **une maladie du vieillissement**. Autrement dit, le vieillissement est le premier facteur de risque de la MA. Certaines questions interpellent pourtant bon nombre de personnes travaillant de près comme de loin dans le domaine : la MA existe-t-elle vraiment ? Ou n'est-elle que l'expression « normale » du vieillissement ? Les médicaments actuellement disponibles sont-ils efficaces ? Ces questions restent pertinentes lorsque l'on sait que l'espérance de vie moyenne augmente au fil des ans et ce de la même façon que la prévalence des cas d'Alzheimer recensés. Cette réflexion a notamment été exposée au grand public dans l'ouvrage intitulé « Le mythe de la maladie d'Alzheimer » par Peter Whitehouse. L'auteur parle de la MA comme un concept dépassé, d'une entité qui n'existe pas de façon homogène. Il remet en question la catégorisation des patients (ex : pré-MCI, MCI, etc.) et prône une vision pas vraiment biologique de la MA. Bien qu'en désaccord avec l'auteur, je trouve qu'il s'agit d'un ouvrage volontairement polémique qui tente de proposer au lecteur une vision non traditionnelle de la MA tout en exposant les nombreux enjeux sociaux, politiques et économiques qui font aujourd'hui partie intégrante du problème. Chacun vieillissant différemment, de nombreuses altérations cérébrales peuvent effectivement être retrouvées chez des personnes atteintes de la MA comme chez des personnes âgées sans aucun trouble

cognitif apparent. La différence entre un vieillissement pathologique et un vieillissement physiologique n'est donc pas si simple. C'est pourquoi dans les différentes parties du manuscrit où je décrirai les caractéristiques classiques de la MA (en anglais « hallmarks »), j'essaierai d'apporter des arguments reflétant cette complexité.

1.1.3. Impacts sociaux et économiques

860 000 patients en France étaient atteints de la MA en 2007. On estime aujourd'hui ce chiffre à 900 000 (Inserm). La prévalence serait d'environ 3% après 65 ans et de 15% après 85 ans (**Figure 1**).

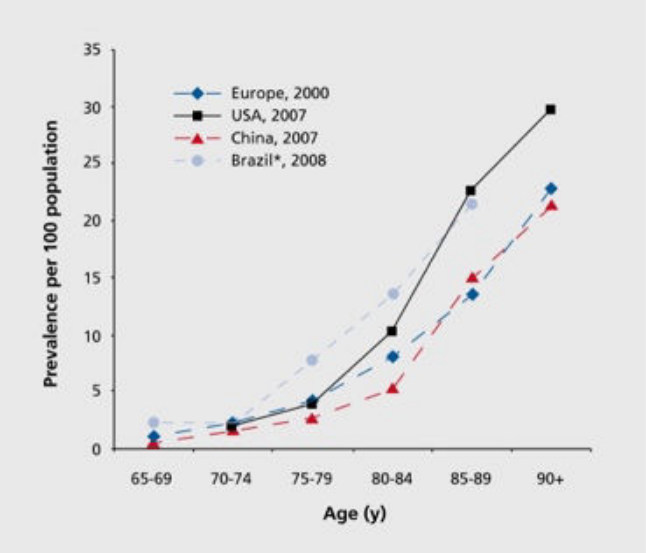


Figure 1 : Prévalence de la MA en fonction de l'âge de la population (Qiu et al. 2009)

On estime ainsi à 1,3 million le nombre de patients en 2020. L'organisation mondiale de la santé a évalué à 35,6 millions le nombre de cas de démence en 2012 dans le monde. Elle estime une augmentation à 65,7 puis à 115,4 millions pour 2030 et 2050 respectivement, c'est à dire **un doublement tous les 20 ans**. Si l'on considère que 70% des cas de démences sont des MA, on peut imaginer qu'**une personne sur 85 aura une MA en 2050**. Il faut cependant rester prudent vis à vis de ces estimations. Un article récent regroupant cinq différentes études a ainsi montré que la prévalence en Europe stagnait depuis ces vingt dernières années[2]. Une étude de France Alzheimer avait estimé à plus de 1000€/mois le coût estimé pour une famille française (France Alzheimer). Un rapport scientifique a quant à lui évalué un coût mondial des dépenses liées aux démences dans le monde (comprenant les soins, la recherche, etc.) à plus de 600 milliards de dollars, soit environ 1% du PIB mondial (World Alzheimer Report 2010). De façon intéressante, un journaliste d'Euronews expliqua un jour que si ce coût

estimé représentait un pays, il s'agirait de la 18ème économie mondiale. S'il s'agissait d'une compagnie, ce serait la deuxième plus riche (Apple Inc. restant 1ère du haut de ses 700 milliards de dollars de capitalisation boursière…). Ces coûts pharaoniques sont divisés de façon disparate entre les pays : 89% de ces 600 milliards seraient assurés par les pays les plus riches avec en tête l'Europe et l'Amérique du nord, et ce pour 46% de prévalence. A l'inverse, les pays à faible revenus n'assureraient que 1% du coût global pour 14% de prévalence. L'ensemble de ces chiffres et estimations reflète bien les **enjeux humains**, **économiques** et **politiques** que représente la MA dans les sociétés actuelles et à venir.

La MA est donc extrêmement complexe, que ce soit sur le plan médical avec des symptômes difficiles à identifier et à traiter, mais également sur le plan sociétal puisqu'il s'agit avant tout aujourd'hui d'un problème humain et financier, et donc politique. Le dernier exemple en date remonte à fin 2015 avec l'annonce d'une augmentation record de 350 millions de dollars pour le budget 2016 sur la recherche contre la MA aux Etats-Unis, approuvée et signée par Barack Obama.

1.2. Historique

1.2.1. Début du XXème siècle : la découverte

La première description de la maladie remonte au 25 novembre 1901 à l'hôpital de Francfort où Auguste Deter, une femme de 51 ans, est examinée par le Dr **Aloïs Alzheimer**.
Aloïs Alzheimer est né le 14 juin 1864 à Marktbreit en Allemagne. Il étudia la médecine à l'université de Berlin et commença sa carrière à l'hôpital de Francfort en décembre 1888. En plus des maladies neurodégénératives, il s'intéressait aux psychoses et à l'épilepsie. Son intérêt pour la neuropathologie s'est renforcé lors de l'arrivée de Franz Nissl à Francfort qui lui apporta de nouvelles techniques d'analyses histologiques pour l'étude des maladies neurologiques.
Lorsqu'Auguste Deter arriva à l'hôpital de Francfort, elle souffrait de troubles de la mémoire et du langage mais aussi de désorientations et d'hallucinations. Au vu de son jeune âge et de ses symptômes, on lui diagnostiqua une démence présénile. En 1903, Aloïs Alzheimer quitta Francfort pour Heidelberg, puis rejoignit la clinique psychiatrique de Munich et son directeur Emil Kraepelin. Il continua de suivre le cas « Auguste D » jusqu'au 8 avril 1906 où cette

dernière décéda. Aloïs Alzheimer obtint alors le consentement de la famille pour réaliser une autopsie. Après avoir constaté une **atrophie cérébrale**, il observa deux dépôts anormaux à l'intérieur et à l'extérieur des neurones via la technique d'imprégnation argentique mise au point quelques années auparavant par Max Bielschowsky : il s'agit des **plaques amyloïdes** et des **dégénérescences neurofibrillaires**. Ces dépôts n'étaient pas vraiment inconnus à l'époque mais c'était la première fois qu'Aloïs Alzheimer les observait chez quelqu'un d'aussi jeune. Il présenta ses travaux le 4 novembre 1906 à la conférence des psychiatres allemands de Tübingen en Allemagne puis publia ensuite ses travaux en 1907 dans un article qui sera traduit en anglais en 1995[3,4] et ré-étudié à de nombreuses reprises[5]. Sur les suggestions d'Aloïs Alzheimer, Perusini un médecin italien étudia 4 autres cas semblables sur le plan clinique et histopathologique et publia un article dans lequel le cas Auguste D fut ré-étudié[6]. En 1910, Emil Kraepelin publia la huitième édition de son livre « Psychiatrie » dans lequel il discuta du cas d'Auguste Deter, et dans lequel il mentionna pour la première fois la « maladie d'Alzheimer ». En 1911, Aloïs Alzheimer publia un article plus détaillé sur un autre patient atteint de démence qui décéda en 1910 à l'âge de 57 ans : Johann F[7]. Ce deuxième cas fut alors qualifié de « plaque-only type » du fait que ce patient ne présentait pas de dégénérescence neurofibrillaire, rendant d'ores et déjà compte à l'époque de la complexité de cette maladie. Klünemann et al en 2002 analysèrent les archives de la ville de Munich et de l'église de Passau en Allemagne. Ils retrouvèrent des informations sur la généalogie de Johann F remontant en 1670 et notèrent des causes de décès plus ou moins semblables à partir de 1830, concluant ainsi à une **prédisposition familiale**[8]. Auguste D et Johann F sont les deux seuls patients sur cinq à avoir été examinés cliniquement par Aloïs Alzheimer, les trois autres ayant été étudiés uniquement de façon post-mortem.

1.2.2. Fin du XXème siècle : des avancées majeures

Après la « découverte » de 1906, un très vif intérêt s'est développé à l'égard de la MA avec notamment la description et la publication de multiples autres cas semblables dans les cinq années qui suivirent. En parallèle, de nombreuses avancées scientifiques et méthodologiques ont émergé. Sans chercher à développer une liste exhaustive, voici quelques découvertes majeures de la fin du XXème siècle qui ont façonné notre vision actuelle de la maladie.

En 1927, un psychiatre belge nommé Paul Divry constate que le **rouge Congo** (congo red), un colorant développé au départ pour l'industrie textile en 1883, colore les plaques amyloïdes

découvertes 20 ans plus tôt[9]. En 1963, Kidd observe au microscope électronique des structures neuronales de type **Paired Helical Filaments** (PHF) qui forment les **tangles**[10]. En 1984, Glenner et ses collaborateurs montrent que le composant principal des dépôts amyloïdes est un petit peptide. Puisque ce dernier n'avait pas encore été identifié jusque là, on le nomma **peptide A bêta** (**Aß**), A correspondant au terme Amyloïd et bêta faisant référence aux feuillets bêta plissé observés dans les plaques[11,12]. En 1985, Jean-Pierre Brion et ses collaborateurs montrent que des anticorps spécifiques de la **protéine Tau** permettent de mettre en évidence les PHFs[13]. D'autres études l'année suivante confirment Tau comme composant majeur des tangles[14,15]. En 1987, différentes équipes comme celle de Robakis découvrent **le gène de l'APP** codant pour la protéine précurseur du peptide Aß[16]. En 1991, plusieurs équipes montrent alors que des mutations sur le gène de l'APP sont associées aux **formes précoces**, i.e. **familiales**, de la MA[17-20]. C'est alors en 1992 qu'émerge l'**hypothèse de la cascade amyloïde** proposant une cascade de signalisation pour expliquer et hiérarchiser les différents processus impliqués dans la MA[21]. Cinq ans après, des mutations sur le gène de la **Préséniline 1** (PS1) également responsables de formes précoces de la MA sont découvertes[22,23]. En 1999 est découverte la **ß-sécrétase** (BACE1 qui permet le 1er clivage de l'APP dans la voie amyloïdogénique que nous expliquerons plus loin dans ce manuscrit (voir §2.2.)[24].

1.3. Neuropathologie

1.3.1. L'atrophie cérébrale

L'atrophie cérébrale est encore aujourd'hui considérée comme une altération macroscopique majeure dans la MA (**Figure 2**). Elle induit une dilatation des ventricules cérébraux, un élargissement des sillons corticaux, ainsi qu'un rétrécissement des circonvolutions. Elle peut être évaluée par la mesure du poids et du volume cérébral à l'examen post-mortem mais également par des techniques d'imagerie (voir §1.5.2.). Sur un cerveau de poids moyen d'environ 1,3 kg, la perte varierait entre 200 et 500g.

Figure 2 : Atrophie cérébrale d'un patient atteint de la MA à droite et comparaison à un patient sain à gauche. L'hippocampe indiqué par la flèche noire est également atrophié chez le patient Alzheimer (Ellison et al. 1998)

Comme nous l'avons énoncé précédemment, les symptômes caractéristiques de la MA ne le sont jamais de façon spécifique. Dans le cas de l'atrophie cérébrale, elle ne touche effectivement pas que les maladies neurodégénératives, elle peut également être présente en cas d'ischémie touchant un territoire cérébral donné. De même, des personnes saines perdent également de la matière cérébrale avec le temps. Concernant la MA, plusieurs études illustrent ainsi la complexité d'utiliser ce paramètre comme un marqueur de neurodégénérescence. Fjell et al. ont notamment montré qu'une diminution évolutive du volume de certaines régions cérébrales pouvaient être détectées par IRM sur une seule année, et ce chez des personnes âgées jugées peu susceptibles de déclencher une MA[25]. Erten-Lyons et al. ont quant à eux montré que l'expansion des ventricules corrélait bien mieux avec la pathologie que le volume hippocampique lui même[26]. Cet exemple est intéressant puisque deux ans auparavant, en octobre 2011, l'agence européenne de médecine (European Medicines Agency) proposait d'utiliser l'atrophie hippocampique comme marqueur acceptable d'entrée en essais cliniques.

1.3.2. Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes sont **issues du clivage de l'APP** et de **l'agrégation des peptides Aß42 et Aß40** (pour 42 et 40 acides aminées) dont on détaillera le développement un peu plus loin dans la présentation de la cascade amyloïde (voir §2.1.). Elles sont **extracellulaires** et ont un aspect fibrillaire en microscopie électronique. Elles peuvent être marquées par des colorations de type rouge Congo et thioflavine S qui reconnaissent les structures de type feuillets β plissés. Cette conformation est majoritairement retrouvée dans les noyaux denses de certaines plaques. D'autres plaques sont plus diffuses et donc non détectable par ces

colorations. Des immunomarquages avec des anticorps détectant l'Aβ (ex : 4G8, 6E10, BAM10, etc.) peuvent cependant les mettre en évidence (**Figure 3**).

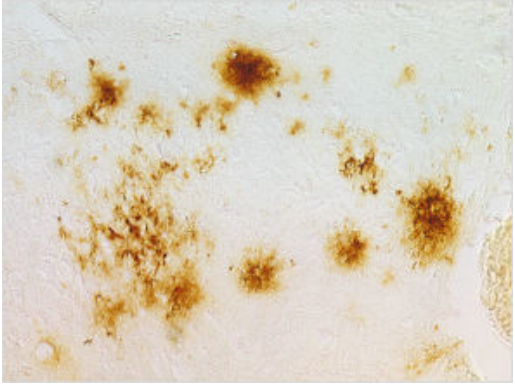


Figure 3 : Immunomarquage 4G8 de plaques amyloïdes (Audrain et al. en préparation)

Des études ont permis de définir une séquence spatiale distincte dans laquelle certaines régions cérébrales sont hiérarchiquement impliquées dans le développement des plaques amyloïdes[27]. Le néocortex avec ses 4 lobes (frontal, pariétal, temporal et occipital) est ainsi la première région touchée par les dépôts amyloïdes (Phase 1 de Thal, **Figure 4**). Il s'ensuit alors une **propagation centripète** vers le cortex entorhinal et la corne d'Ammon 1 (CA1) de l'hippocampe (Phase 2). D'autres structures telles que l'amygdale, le thalamus ou encore le striatum présentent des plaques amyloïdes un peu plus tardivement dans le décours de la pathologie (Phase 3). Le cervelet, et notamment sa couche moléculaire, semble être une des dernières régions touchées dans ce processus (Phase 5).

Figure 4 : Phases de propagation amyloïde chez l'Homme (Thal et al. 2002)

Si les plaques amyloïdes sont majeures dans le diagnostic de la MA, leurs rôles et implications dans l'évolution de la maladie restent débattus[28], certains suggérant même une fonction protectrice[29]. De plus, l'absence de plaque amyloïde a été rapportée chez des patients atteints d'une forme familiale de la MA[30] alors que de nombreuses plaques peuvent être observées chez des patients non déments[31-34]. D'autres études ont également montré que les

plaques amyloïdes ne corrèlent pas avec la sévérité de la maladie[35,36]. Le rôle des plaques amyloïdes, encore aujourd'hui considérées comme éléments-clés de la MA, n'est donc toujours pas compris.

1.3.3. Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF ou NFT en anglais) sont présentes à **l'intérieur des neurones** et sont constituées de PHFs[10,37]. Ces derniers sont constitués de filaments de 10 nm de diamètre disposés en hélice. Le constituant majeur de ces enchevêtrements est la **protéine Tau**[13] (pour Tubulin associated unit) qui est une protéine associée aux microtubules (MAP). Elle joue un rôle clé dans le maintien de ces microtubules, fibrilles impliquées dans le transport des vésicules au sein des neurones. Ce maintien se fait notamment par des interactions avec la tubuline. Les protéines Tau retrouvées chez les patients Alzheimer sont hyperphosphorylées i.e. surchargées en groupements phosphate[38]. De façon normale une protéine Tau compte entre 2 et 3 groupements phosphate, contre 5 à 9 pour les patients atteints de la MA. Cette hyperphosphorylation génère alors la formation d'amas entre les microtubules, ce qui conduit à leurs séparations (**Figure 5**).

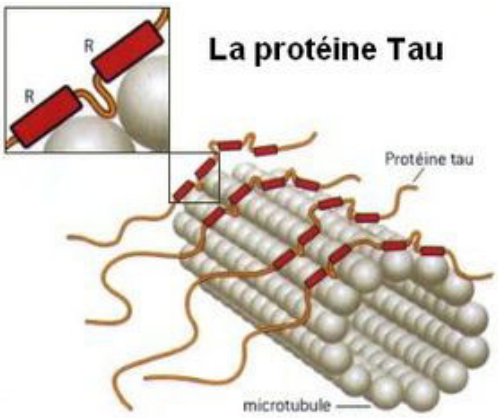


Figure 5 : Représentation schématique de Tau assurant la cohésion des microtubules du cytosquelette des neurones (Wikipedia)

Il s'ensuit alors une désintégration des microtubules et une mort du neurone. Ces DNFs peuvent être mis en évidence de la même façon que les plaques amyloïdes par le rouge Congo ou la thioflavine S qui vont marquer les PHFs avec leur structure en feuillets ß plissés. On peut également les visualiser à l'aide d'imprégnation argentique ou bien à l'aide d'immunomarquages ciblant la protéine Tau. Comme pour les plaques amyloïdes, différents anticorps marquent également Tau en fonction des sites de phosphorylation, qu'ils soient plus

ou moins physiologiques (ex : AT8, AD2) ou pathologiques (ex : AT100, PHF-27, AP422). Trois grands types majeurs de DNFs peuvent être définis (**Figure 6**)[39] :

- le stade pre-tangle (ou pré-DNF) qui correspond à un stade de pré-dégénérescence avec un signal Tau assez diffus et parfois ponctiforme. La morphologie du neurone est encore épargnée.
- le stade iNFT (ou intra-DNF) est caractérisé par des agrégats de protéines Tau dans le cytoplasme conduisant à un déplacement du noyau en périphérie et à la perte d'une partie des dendrites.
- le stade eNFT (ou extra-DNF) correspond à un neurone atrophique, sans noyau et sans réelle limite cytoplasmique.

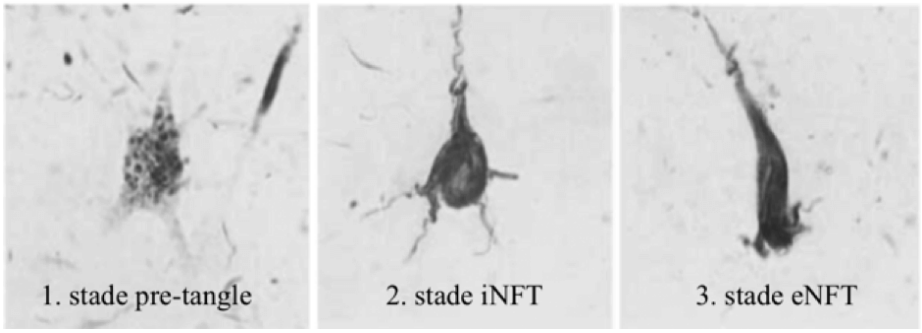


Figure 6 : Exemples de trois stades de DNFs marqués par l'anticorps TG3 (Augustinack et al. 2002)

De la même façon que pour les plaques amyloïdes, il a été possible d'identifier une progression spatio-temporelle de la DNF[40]. Six stades résumés en trois principaux peuvent êtres distingués (**Figure 7**) :

- le stade transentorhinal où la DNF va émerger dans la région transentorhinale du cortex périrhinal[41]
- le stade limbique correspondant à un stade où le cortex entorhinal est également touché tout comme la région CA1 et le subiculum de l'hippocampe. L'amygdale et le thalamus vont également présenter des DNFs.
- le stade néocortex (ou isocortical) qui lui correspond au stade terminal où l'ensemble du néocortex est touché en plus des précédentes structures.

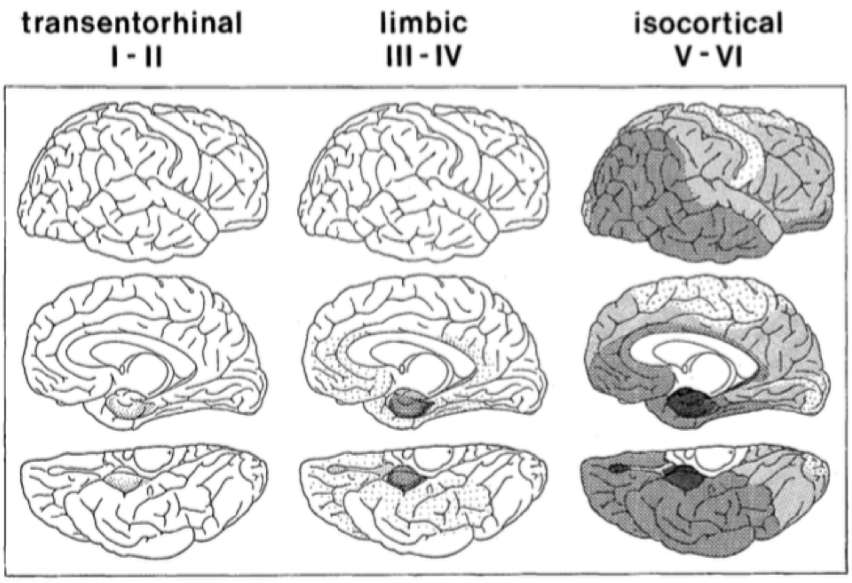


Figure 7 : Progression spatio-temporelle de la DNF (Braak et al. 1991)

La répartition spatiale et temporelle des DNFs au cours du temps, où le néocortex est touché tardivement (centrifuge), est donc différente de celle des plaques amyloïdes où le néocortex est cette fois-ci touché précocement (centripète). Des études ont par ailleurs montré que **la progression des DNFs corrèle avec la progression et la sévérité de la maladie**, et ce à la différence de la charge amyloïde comme nous l'avons précisé précédemment[35,36,39].

1.3.4. Autres lésions

1.3.4.1. L'angiopathie amyloïde cérébrale

Les plaques amyloïdes comme les DNFs forment des dépôts parenchymateux. Le peptide Aß peut également se déposer dans les **vaisseaux sanguins** causant un dépôt vasculaire à l'origine d'une angiopathie amyloïde cérébrale (**AAC**). Le peptide Aß va se déposer de façon progressive autour des cellules musculaires lisses de la média et de l'adventice entraînant ainsi une destruction de la couche musculaire et donc une fragilisation de la paroi vasculaire (**Figure 8**). Les conséquences sont des micro-anévrismes ainsi que des hémorragies cérébrales. Tout comme pour les plaques amyloïdes, les AACs se développent préalablement dans le néocortex et sont également retrouvées chez des patients asymptomatiques[35,42].

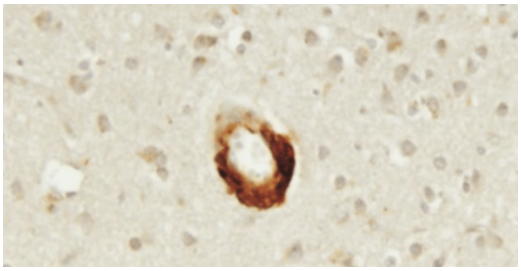


Figure 8 : Artère avec dépôt d'Aß dans la paroi, i.e. AAC (Thal et al. 2015)

1.3.4.2. La perte neuronale

La MA étant une maladie neurodégénérative, la mort neuronale a longtemps été considérée comme un des signes principaux et explique en grande partie l'atrophie cérébrale. Elle est majoritairement due à la DNF et à son stade eNFT et serait d'autant plus visible dans les couches cérébrales où les DNFs sont abondantes[43]. Une fois le neurone mort, la DNF demeure comme un fantôme, d'ou l'expression « ghost tangle ». L'apoptose, qui implique des mécanismes de mort cellulaire programmée, pourrait également être impliquée. Il a en effet été montré que l'ADN pouvait être fragmenté dans certains neurones au cours de la MA[44,45].

1.3.4.3. La perte de l'intégrité synaptique

Il a été montré par microscopie électronique au début des années 1990 une baisse du nombre de synapse dans les cerveaux de patients Alzheimer[46,47]. On peut en effet imaginer qu'une mort neuronale entraîne de fait une perte synaptique. Il semble au contraire que cette dernière **précède** la mort neuronale. De façon intéressante, il a été montré qu'en parallèle d'une perte synaptique, une augmentation de la surface d'apposition des synapses, i.e. de leur taille, était détectable. Il s'agit probablement d'un phénomène de compensation pour contrebalancer cette perte de contacts[46]. En plus de ces observations morphologiques il est dorénavant admis qu'un déficit de neurotransmetteurs (acétylcholine, somatostatine, GABA, sérotonine, etc.) s'accroit avec la progression de la maladie. C'est pourquoi depuis plusieurs années maintenant, la MA est considérée comme **une maladie synaptique**, du moins dans ses premiers stades[48]. Cette perturbation synaptique est par ailleurs bien illustrée par la mesure de déficits électrophysiologiques tels que la potentiation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD), qui sont détectables dans un très grand nombre de modèles animaux de la MA comme nous le verrons un peu plus loin dans ce manuscrit (**Figure 9**).

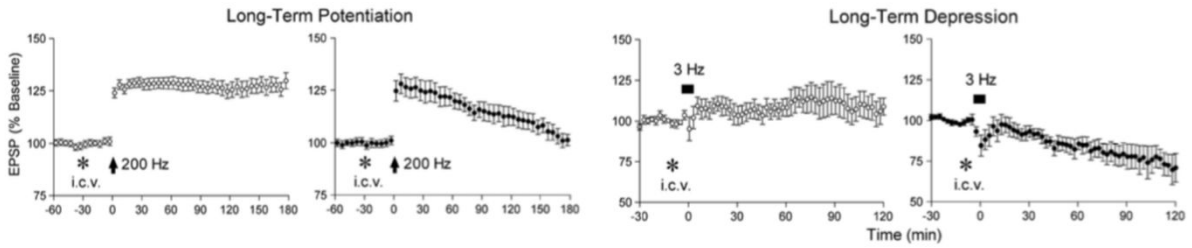


Figure 9 : Effets de l'injection d'Aß (graphiques noirs) en intracérébroventriculaire (ICV) sur des synapses glutamatergiques du CA1 de l'hippocampe, mesure de la LTP et LTD (Ondrejcak et al. 2010)

Les lésions que nous venons de décrire sont classiques et acceptées de tous depuis des années. Elles sont d'ailleurs pour la plupart citées dans les premières lignes de chaque abstract de publication traitant de près comme de loin de la MA et sont souvent les seuls « readout » dans le développement de nouveaux modèles animaux, comme nous le verrons dans ce manuscrit. Cependant, de nouveaux éléments comme par exemple le métabolisme énergétique ou la transmission synaptique deviennent des paramètres d'analyse majeurs dans le domaine. De plus en plus d'études cherchent à mettre en avant de nouveaux évènements plus subtils, impliqués dans les premières phases de la maladie et qui sont la preuve que beaucoup d'évènements critiques se passent bien avant la formation d'une plaque ou la mort d'un neurone.

1.4. Etiologie

Comme nous l'avons discuté précédemment, la MA toucherait approximativement 25 millions de personnes dans le monde (voir §1.1.3.). Parmi l'ensemble de ces cas et malgré le fait que la MA soit **multifactorielle**, deux grands types de patients peuvent être distingués, en fonction que leur MA soit d'origine **familiale**, i.e. héréditaire, ou **sporadique**. Nous allons dans cette partie présenter les différentes mutations géniques impliquées dans les formes familiales et ainsi introduire les outils de travail qui sont à la base de mes projets de thèse. Nous discuterons également d'autres variants identifiés comme **facteurs de risques** dans les formes sporadiques. Cet exposé d'épidémiologie génétique permettra également d'illustrer notre faible connaissance des formes sporadiques, qui représentent pourtant la très grande majorité des cas de MA.

1.4.1. Les Formes familiales de la MA

Les formes familiales de la MA (**FAD**) se caractérisent par le fait qu'elles sont **héréditaires** et que les symptômes apparaissent de façon **prématurée** chez le sujet jeune, i.e. entre 30 et 50 ans. Des études génétiques ont montrées que les mutations responsables de ces FAD apparaissent sur trois gènes particuliers : ***APP***, ***PS1*** et ***PS2***[18,49-52]. Les mutations sur le gène de la PS1 comptent pour une grande partie de ces FAD. Celles intervenant sur les gènes de l'APP et de la PS2 sont plus rares. Les FADs ne représentent qu'entre 1 et 5% des MA mais sont encore aujourd'hui une des seules sources d'études possibles pour comprendre les 95 à 99% des cas restants dont on ne connaît toujours pas l'origine.

1.4.1.1. Le gène *APP*

Le gène *APP* est situé sur le chromosome 21 (**Figure 10**) et a été le premier des trois gènes précédemment cités à être identifié en 1987. Deux éléments ont notamment permis sa détection et caractérisation[16,53-55] :

- La découverte du peptide Aß en 1984 et sa séquence d'acides aminés. Des sondes d'oligonucléotides spécifiques du gène encodant ce peptide ont ainsi pu être générées et un clone fut trouvé après comparaison à une banque d'ADNc du cerveau humain.
- L'étude de nombreux patients atteints de Trisomie 21 (Down's syndrome). Avec une triple copie de ce chromosome les patients atteints de cette trisomie présentent autour de 40 ans les symptômes de la MA.

Le gène *APP* a été identifié comme un gène important pour les FADs à partir de la première mutation découverte en 1991 par l'équipe de John Hardy[18] : une mutation faux sens appelée mutation londonienne (V717I). Depuis, environ **50 mutations** ont été mises en évidence (Alzforum). Peu de temps après 1991, différentes équipes ont montré un lien de causalité entre ces mutations et l'augmentation de la production du peptide Aß[56-58]. Il fut alors publié en 1992 **l'hypothèse de la cascade amyloïde** par Hardy et Higgins, une cascade de signalisation qui propose l'APP, son clivage en Aß et la formation des plaques amyloïdes au centre de l'explication « Alzheimer »[21]. Puisqu'à la base de mes travaux et parce que souvent remise en question, nous consacrerons une partie entière à la cascade amyloïde et à ses acteurs protéiques un peu plus loin dans ce manuscrit (voir §2.).

1.4.1.2. Les gènes *PS1* et *PS2*

Le gène *PS1* est situé sur le chromosome 14 (**Figure 10**). Les premières mutations corrélées aux FADs ont été identifiées en 1995[49] et on estime aujourd'hui ce nombre à **plus de 230**. Les mutations de ce gène représentent jusqu'à **70% des causes de FAD**. Ces mutations entrainent la production d'une protéine PS1 anormale. Le gène *PS2* est quant à lui situé sur le chromosome 1 (**Figure 10**) et on compte environ **40 mutations détectées** sur ce gène en lien avec les FADs. Les Présénilines font partie d'un complexe oligomérique appelé **γ-sécrétase**. Elles constituent les sites catalytiques de cette protéase qui est impliquée dans le clivage de l'APP et du récepteur Notch. On a longtemps pensé que les mutations retrouvées sur la PS1 notamment étaient de type gain de fonction, ce qui laisse penser à une augmentation de son activité protéolytique et donc une augmentation de la production du peptide Aß, pouvant expliquer le développement très précoce de la MA[59]. Xia et al. ont récemment généré deux souris knock-in (KI) exprimant deux mutations retrouvées chez certains patients atteints de FADs (L435F et C410Y). De façon intéressante, les souris homozygotes ont récapitulé un phénotype de type $PS1^{-/-}$ avec un arrêt de l'activité γ-sécrétase sans altérer l'expression de son ARNm. Ces mutations ont pourtant entraîné une augmentation du ratio Aß42/Aß40, des dépôts amyloïdes, ainsi que des défauts synaptiques et de la neurodégénérescence, ceci suggérant la possibilité d'un mécanisme de type **perte de fonction**[60].

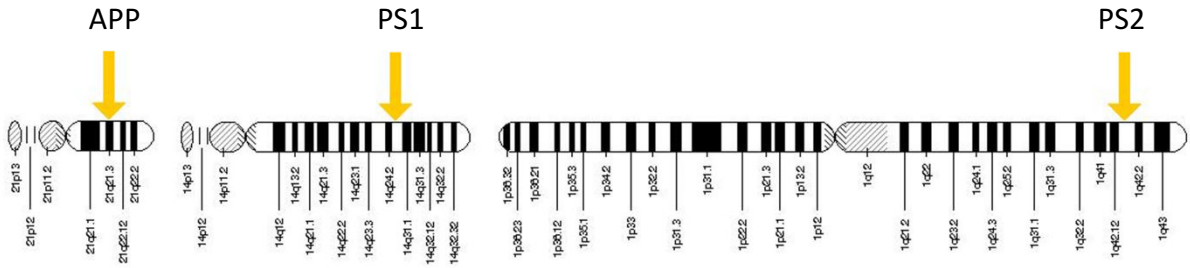


Figure 10 : Localisation des gènes APP, PS1 et PS2 sur les chromosomes 21, 14 et 1 respectivement (http://ghr.nlm.nih.gov)

1.4.2. Les Formes sporadiques de la MA

Les formes sporadiques de la MA sont **les plus communes** et interviennent généralement **après 65 ans**. La différence majeure avec les formes familiales est l'absence de facteur héréditaire identifié. Ce serait un abus de langage de parler de formes non-génétiques mais aucune mutation sur les trois gènes précédemment cités n'est retrouvée chez ces patients. On peut cependant distinguer deux types de formes sporadiques en fonction de l'âge d'apparition

des symptômes : **les formes précoces** (ou Early-onset Alzheimer's) pour lesquelles les troubles mnésiques et majoritairement les troubles de type apraxie ou repérage dans l'espace[61] apparaissent généralement avant 60-65 ans, et **les formes tardives** (ou Late-onset Alzheimer's) qui apparaissent après 60-65 ans. Les formes précoces sont plutôt rares (environ 10%) et comprennent notamment les patients atteints de Trisomie 21. Pour les formes tardives, très représentatives de la MA comme on l'entend au quotidien, la complexité est telle qu'il existe un effet de l'âge et un déterminisme multifactoriel. La part génétique de ce déterminisme est notamment représentée par plusieurs **facteurs de risque** identifiés ces dernières années.

1.4.2.1. Facteurs de risque génétiques

1.4.2.1.1. Le gène *APOE*

Le premier facteur de risque à avoir été identifié est le gène ***APOE*** codant pour l'apolipoprotéine E (ApoE)[62]. Il s'agit d'une protéine essentielle au catabolisme des lipoprotéines et qui est donc impliquée dans le **métabolisme du cholestérol**. Il existe trois allèles du gène *APOE* : ***APOE* ε2** (7-8% de la population), ***APOE* ε3** (75-80% de la population) et ***APOE* ε4** (15% de la population). Le seul variant génétique parmi ces trois précédents à être considéré comme un facteur de risque est l'allèle **ε4**[63-66]. Les porteurs hétérozygotes des formes ε3/ε4 auraient entre 3 et 4 fois plus de risques de développer la maladie que les homozygotes ε3/ε3. De la même façon, les homozygotes ε4/ε4 auraient entre 10 et 12 fois plus de risques de la développer par rapport aux porteurs ε3/ε3. Il a également été montré que 62% des patients atteints d'une forme sporadique de la MA possèdent l'allèle ε4 et ce en comparaison avec des individus sains. De plus, les patients homozygotes pour ε4 présentent plus de dépôts amyloïdes que les patients homozygotes pour ε3[66].

1.4.2.1.2. Les GWAS

Suite à la mise en évidence de ce facteur de risque, de grandes études d'associations pangénomiques, ou **GWAS**, ont été réalisées. Ces études consistent à examiner de nombreuses variantes génétiques communes à certains individus et à les corréler avec certaines maladies comme la MA. Il s'agit d'une approche basée dans un premier temps sur le phénotype des personnes avec un regroupement des patients en fonction de leurs manifestations cliniques et en comparaison avec des individus sains. L'ADN de chaque

individu est analysé à l'aide de puces à ADN (microarray) afin de détecter des polymorphismes nucléotidiques simples (ou SNPs). Les SNPs sont des variations génétiques où une seule paire de bases diffère sur un segment donné entre deux chromosomes. Ils représenteraient entre 0,05 et 0,1% du génome et sont donc associés à la diversité des individus. Les méta-analyses de type GWAS permettent donc la mise en place de corrélations entre ces variations et la prédisposition à la MA. En plus d'*APOE* ε4, de nouveaux gènes candidats ont été indentifiés ces dernières années (**Tableau 1**).

Study	Ethnic group	Sample size	Genes identified outside *APOE* region
Lambert et al. [34]	Caucasian	Stage 1: 2,032 AD cases; 5,328 controls Stage 2: 3,978 AD cases; 3,297 controls	*CLU*, *CR1*
Harold et al. [33]	Caucasian	Stage 1: 3,941 AD cases; 7,848 controls Stage 2: 2,023 AD cases; 2,340 controls	*CLU*, *PICALM*
Seshadri et al. [35]	Caucasian	Stage 1: 3,006 AD cases; 4,642 controls Stage 2: 2,032 AD cases; 5,328 controls Stage 3: 3,333 AD cases; 6,995 controls	*BIN1*, *XOC3L2/BLOC1S3/MARK4*, *CLU*, *PICALM*
Naj et al. [44••]	Caucasian	Stage 1: 8,309 AD cases; 7,366 controls Stage 2: 3,531 AD cases; 3,565 controls	*MS4A4A*, *CD2AP*, *CD33*, *EPHA1*, *CR1*, *CLU*, *BIN1*, *PICALM*
Hollingworth et al. [43••]	Caucasian	Stage 1: 6,688 AD cases; 13,685 controls Stage 2: 4,896 AD cases; 4,903 controls Stage 3: 8,286 AD cases; 21,258 controls	*ABCA7*, *MS4A6A/MS4A4E*, *EPHA1*, *CD33*, *CD2AP*
Lee et al. [58]	Caribbean Hispanic	549 AD cases; 544 controls	*CLU*, *PICALM*, *BIN1*, *CUGBP2*, loci on 2p25.1; 3q25.2; 7p21.1; 10q23.1
Reitz et al. [59••]	African American	1,968 AD cases; 3,928 controls	*ABCA7*, intergenic locus on 5q35.2

Tableau 1 : Exemples de gènes identifiés par GWAS en dehors d'APOE (Tosto et al. 2013)

Sans développer une liste exhaustive, on peut notamment citer ***CLU*** codant pour la clustérine (ou apolipoprotéine J) qui en plus d'être impliquée dans le transport de lipides, semble également réguler l'accumulation de l'Aß[67]. ***PICALM*** modulerait également la production, le transport et la clairance de l'Aß[68]. ***BIN1*** appartient à une famille de gène impliquée dans divers mécanismes cellulaires comme l'endocytose clathrine dépendante qui va affecter le métabolisme de l'APP et donc la production ou la clairance de l'Aß. ***CR1*** code un récepteur faisant partie du système du complément avec des sites de liaison pour le C3b, une molécule inflammatoire. L'Aß pouvant se lier au C3b, *CR1* semble aussi impliqué dans la clairance de l'Aß[69] et dans l'inflammation[70]. Plusieurs gènes impliqués dans l'immunité innée et l'inflammation sont en effet ressortis de ces études GWAS. En plus de CR1, nous pouvons citer ***CD33*** détecté en 2008 par des études GWAS[71] qui code pour une protéine transmembranaire du même nom. Il s'agit d'un récepteur de surface sur les monocytes et les cellules microgliales dans le cerveau. De façon intéressante, CD33 a été montré comme faisant partie intégrante d'un module de régulation immunitaire avec d'autres protéines telles

que **TREM2**, elle aussi considérée depuis 2013 comme facteur de risque pour les formes sporadiques de la MA[72-74]. D'autres gènes impliqués dans la signalisation cellulaire tels que ***ABCA7***, ***CD2AP***, ***EPHA1*** ou encore ***MS4A6A*** ont été identifiés. On peut donc grossièrement considérer trois grandes catégories de gènes identifiées par ces GWAS : ceux associés au métabolisme de l'APP et à la production/clairance d'Aß, ceux associés à l'immunité innée et à l'inflammation, et ceux associés à la signalisation cellulaire. Une base de données a par ailleurs été créée (Alzgene) afin de regrouper une grande partie des informations issues de ces études génétiques[75]. Ces études d'association permettent donc d'identifier, sans a priori, des variations génétiques associées à la MA. Bien que ces gènes mis en avant soient très importants pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie, ils n'expliquent qu'une infime partie de la variabilité génétique associée à la MA.

1.4.2.2. Autres facteurs de risques

Au delà de ces mutations génétiques, d'autres facteurs de risque peuvent être distingués. Comme nous l'avons déjà précisé, l'**âge** est le plus important avec une prévalence accrue chez les individus de plus de 65 ans. Le **sexe** est également considéré comme tel puisque les femmes sont plus touchées que les hommes. La première raison à cela est l'espérance de vie qui est supérieure chez les femmes. La seconde est très probablement hormonale. La ménopause entraînant l'arrêt de la production de certaines hormones comme l'œstrogène, cela aurait des conséquences sur la vulnérabilité vis à vis de la MA[76]. Des études sur des cas de ménopauses chirurgicales vont également dans cette direction[77]. Le **diabète** de type 2, qui représente la très grande majorité des diabètes est également corrélé à une augmentation de la probabilité de déclarer une MA[78]. Des similarités ont par ailleurs été détectées au niveau des dommages microvasculaires ou du stress oxydatif retrouvés dans les deux maladies. D'autres facteurs de risques tels que le **tabac** ou encore les **traumatismes cérébraux** ont été proposés mais la bibliographie sur ces paramètres reste contradictoire.

1.5. Clinique

Sans revenir sur les symptômes que nous avons déjà cités précédemment (voir §1.1.1.), je parlerai rapidement du diagnostic des patients et j'introduirai la notion clé de biomarqueur. Je m'attarderai plus longuement sur les différents essais cliniques passés et en cours avec une vision volontairement critique des stratégies employées.

1.5.1. Diagnostic

Bien qu'il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement curatif de la MA, poser un diagnostic est essentiel pour les patients afin de proposer une aide et un accompagnement adaptés, qu'il s'agisse de soutiens médical, social ou financier. Comme nous l'avons présenté au début de ce manuscrit (voir §1.1.1), une liste de signes d'alerte de la MA a été établie avec la perte de fonctions cognitives et une altération de la mémoire épisodique en première ligne. Selon la Haute Autorité de Santé :

« une démarche diagnostique doit être proposée, et notamment
en cas de troubles de la mémoire :

- aux personnes se plaignant de ressentir une modification récente de leur cognition ou de leur état psychique
- aux personnes chez lesquelles l'entourage remarque l'apparition ou l'aggravation de troubles cognitifs ou un changement psycho-comportemental non expliqué par une pathologie psychiatrique identifiée
- aux patients venant consulter ou étant hospitalisés pour un symptôme pouvant accompagner, révéler ou provoquer un déclin cognitif : chute, syndrome confusionnel, accident vasculaire cérébral, etc.
- à l'entrée et en cours de séjour en structure d'hébergement »

Une évaluation fonctionnelle est dans un premier temps réalisée. Il s'agit d'évaluer de potentiels troubles cognitifs sur les activités de la vie quotidienne comme utiliser un téléphone, faire la cuisine, utiliser les transports, gérer ses finances, etc. L'évaluation peut se faire à partir d'échelles qui servent de référence aux médecins : IADL (de l'anglais Instrumental Activities of Daily Living), IAD (de l'anglais Activities of Daily Living) ou encore DAD (de l'anglais Disability Assessment for Dementia).

Une évaluation cognitive globale est également effectuée à l'aide du test MMSE[79] (de

l'anglais Mini Mental State Examination). Ce test va permettre d'évaluer les capacités mnésiques du patient (**Figure 11**). Il est principalement utilisé dans le cadre d'un dépistage de démence comme la MA. L'âge, le niveau socio-culturel, l'activité professionnelle et sociale, ainsi que l'état affectif du patient sont des paramètres pris en considération dans l'interprétation du résultat.

MINI MENTAL STATE EXAMINATION (M.M.S.E)

Date :.....

Evalué(e) par : .....

Niveau socio-culturel .....

Etiquette du patient

ORIENTATION

Je vais vous poser quelques questions pour apprécier comment fonctionne votre mémoire. Les unes sont très simples, les autres un peu moins. Vous devez répondre du mieux que vous pouvez.

Quelle est la date complète d'aujourd'hui ? .....

☞ *Si la réponse est incorrecte ou incomplète, posez les questions restées sans réponse, dans l'ordre suivant :*

	!0ou1!		!0ou1!
1. en quelle année sommes-nous ?	!____!	4. Quel jour du mois ?	!____!
2. en quelle saison ?	!____!	5. Quel jour de la semaine ?	!____!
3. en quel mois ?	!____!		

☞ *Je vais vous poser maintenant quelques questions sur l'endroit où nous nous trouvons.*

6. Quel est le nom de l'Hôpital où nous sommes ? !____!
7. Dans quelle ville se trouve-t-il ? !____!
8. Quel est le nom du département dans lequel est située cette ville ? !____!
9. Dans quelle province ou région est situé ce département ? !____!
10. A quel étage sommes-nous ici ? !____!

APPRENTISSAGE

☞ *Je vais vous dire 3 mots ; je voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir car je vous les demanderai tout à l'heure.*

11. Cigare		[citron		[fauteuil	!____!
12. fleur	ou	[clé	ou	[tulipe	!____!
13. porte		[ballon		[canard	!____!

Répéter les 3 mots.

Figure 11 : Extrait d'une fiche de suivi du test MMSE

Si le diagnostic de la démence semble se confirmer, divers examens paracliniques sont alors proposés. Ils permettent de mettre en évidence des indicateurs biologiques de la MA qui vont compléter les analyses psycho-sociales que l'on vient de décrire. Il s'agit des **biomarqueurs**.

1.5.2. Biomarqueurs

Un biomarqueur est un marqueur biologique qui va être mesuré/évalué et être un **indicateur** d'un processus biologique normal, anormal ou encore d'une réponse à une intervention thérapeutique. Il s'agit donc d'un indicateur de bonne santé ou au contraire de maladie. La recherche sur les biomarqueurs est actuellement, et à juste titre, une priorité. Il est indispensable de bénéficier d'outils permettant de détecter précocement les patients mais également d'outils permettant de dire si oui ou non une thérapeutique fonctionne. En ce sens, cinq différents biomarqueurs pour la MA ont été suffisamment validés pour être considérés dans les essais cliniques, que ce soit pour le recrutement ou le suivi des patients :

Type d'analyse	Elément analysé
Prélèvement du LCR	Aβ42
Prélèvement du LCR	Protéine Tau (totale + phosphorylée)
Imagerie cérébrale	Plaques amyloïdes
Imagerie cérébrale	Hypométabolisme cérébral
Imagerie cérébrale	Atrophie hippocampique

Tableau 2 : Liste des biomarqueurs validés pour la MA

Du fait du contact direct entre le liquide céphalo-rachidien (LCR) et l'espace extracellulaire du cerveau, les changements biochimiques ayant lieu dans le cerveau peuvent se refléter dans le LCR. L'Aβ42 et la protéine Tau peuvent ainsi y être quantifiées par des techniques d'Elisa. Il est aujourd'hui admis que l'Aβ42 diminue en regard de l'augmentation des plaques amyloïdes dans le cerveau[80,81]. La protéine Tau, que ce soit sous sa forme phosphorylée ou non, augmente (d'un facteur 3 environ) quand à elle dans le LCR des patients avec la progression de la pathologie[82,83]. Les plaques amyloïdes dans le cerveau sont également détectables par Tomographie à Emission de Positrons (**TEP**) à l'aide du marqueur PIB notamment[32,84]. La TEP, à l'aide du radio traceur fluorodeoxyglucose (FDG), permet aussi d'évaluer le métabolisme cérébral qui diminue avec la maladie. L'**IRM** est également utilisée et permet notamment d'observer et évaluer l'atrophie hippocampique[85].

Ces différents biomarqueurs ont été en 2007 ajoutés aux critères diagnostic de la MA par un consortium de chercheurs-cliniciens[86]. Le premier critère étant l'atteinte mnésique, la détection d'un deuxième paramètre altéré parmi ceux précédemment cités a permis une meilleure catégorisation des patients. La validation de nouvelles études et l'examen de nouvelles cohortes ont permis en 2014 de simplifier cette liste[87] (**Figure 12**).

Panel 1: IWG-2 criteria for typical AD (A plus B at any stage)

A Specific clinical phenotype

- Presence of an early and significant episodic memory impairment (isolated or associated with other cognitive or behavioural changes that are suggestive of a mild cognitive impairment or of a dementia syndrome) that includes the following features:
  - Gradual and progressive change in memory function reported by patient or informant over more than 6 months
  - Objective evidence of an amnestic syndrome of the hippocampal type,* based on significantly impaired performance on an episodic memory test with established specificity for AD, such as cued recall with control of encoding test

B In-vivo evidence of Alzheimer's pathology (one of the following)

- Decreased $A\beta_{1-42}$ together with increased T-tau or P-tau in CSF
- Increased tracer retention on amyloid PET
- AD autosomal dominant mutation present (in *PSEN1*, *PSEN2*, or *APP*)

Figure 12 : Nouveaux critères de diagnostic pour la MA (Dubois et al. 2014)

Bien que le diagnostic de certitude demande toujours une analyse histopathologique post-mortem du cerveau des patients, ces biomarqueurs associés à une évaluation clinique du patient permettent de s'en rapprocher. Ces outils sont également utilisés comme marqueur de progression de la maladie. Des modèles hypothétiques de l'évolution temporelle de ces biomarqueurs associés aux différents stades cliniques ont ainsi été proposés (**Figure 13**). Il a été observé que l'agrégation de l'Aβ corrélée à la baisse de l'Aβ42 dans le LCR est associée à l'atrophie du cerveau dans les phases précliniques de la maladie. Les changements de Tau (quantité totale et formes phosphorylées) dans le LCR et une atrophie accélérée seraient des événements plus tardifs, qui interviendraient en même temps (ou un peu avant) que le déclin cognitif.

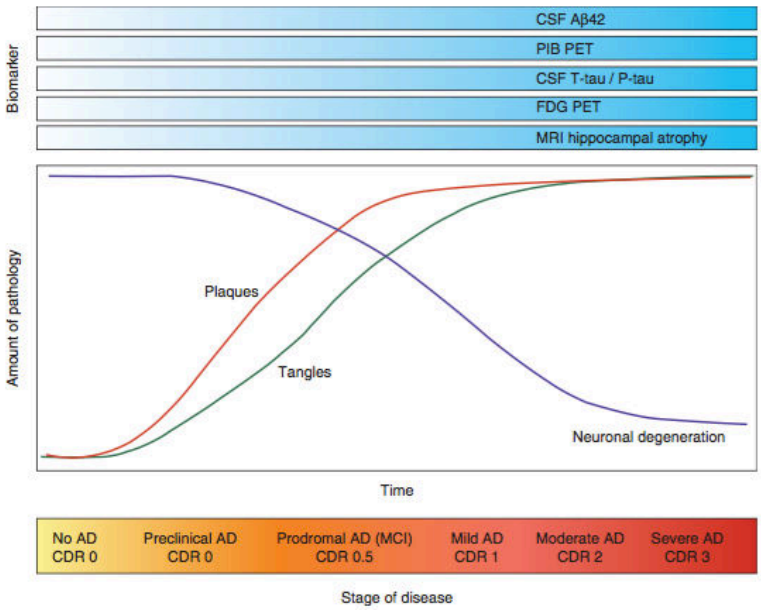


Figure 13 : Modèle hypothétique du décours de la MA et des biomarqueurs associés (Blennow et al. 2012)

1.5.3. Les essais cliniques

1.5.3.1. Les grandes lignes

Fin 2015, environ 1715 essais cliniques sur la MA ont été dénombrés. Parmi ceux-ci, 515 (dont 405 spécifiquement pour la MA) sont en cours ou avec un statut non connus. Ces derniers sont majoritairement recensés aux Etats-Unis et en Europe (**Figure 14**). La très grande majorité des essais cliniques de ces 30 dernières années ont ciblé deux voies majeures dans la MA. La première est le **système cholinergique**. En effet, il fut suggéré en 1974 que la mémoire est liée au système cholinergique[88]. Deux années plus tard, la MA fut associée à une perte sévère de neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert[89]. C'est pourquoi la MA a longtemps été considérée comme une maladie cholinergique, un peu à l'image de la maladie de Parkinson, maladie dopaminergique. Plusieurs drogues ont été développées notamment entre les années 80 et 90 avec comme objectif de moduler les récepteurs nicotiniques et muscariniques via des activateurs de ces récepteurs ou d'inhiber l'acétylcholinestérase, l'idée étant de **contrer la baisse d'Acétylcholine (ACh)**. La deuxième voie ciblée est la cascade amyloïde et la **production d'Aβ42**. Des drogues ont ainsi été développées pour **inhiber les sécrétases** (β et ɣ) responsables du clivage de l'APP et donc de la production d'Aβ. Bace1 (la β-sécrétase) est en effet une cible potentielle dans une stratégie thérapeutique contre la MA. Différents essais ont d'ores et déjà été réalisés ou sont toujours en cours. Le composé MK8931-019 (Merck + Dohme Corp) est par exemple en phase 3 avec 1500 patients en recrutement. Cependant, comme pour beaucoup de stratégies thérapeutiques testées, l'effet dose et les effets secondaires sont des éléments majeurs à considérer. Il a récemment été montré que l'utilisation de deux types d'inhibiteurs de Bace1 (SCH1682496 et LY2811376) entrainait des altérations synaptiques structurales et fonctionnelles chez la souris, associées à des défauts mnésiques[90]. Des résultats décevants concernant certains inhibiteurs de ɣ-sécrétase ont également été montrés comme avec l'Avagacestat (Bristol-Myers Squib). **L'immunothérapie**, très utilisée dans la recherche sur le cancer, a également été développée pour la MA. Des stratégies d'immunothérapies actives comme avec les vaccins CAD106 (Novartis) ou ACC001 (Pfizer) ont été testées. Il s'agit ici d'injecter des vaccins composés de fragments peptidiques similaires à l'Aβ. Les résultats n'ont semble-t-il pas été convaincants, sans compter des effets délétères de certains vaccins comme le AN1792 (Janssen) qui provoqua des méningo-encéphalites chez certains patients. De nombreuses stratégies d'immunothérapies passives basées sur l'injection d'anticorps anti-Aβ ont aussi été testées (et

certaines sont toujours en cours). Là encore, des résultats décevants en phase 3 ont récemment été très médiatisés comme avec le Bapineuzumab[91] (Janssen + Pfizer) et le Solanezumab[92] (Eli Lilly). Suite à ces deux études, il a été admis que l'utilisation de ces anticorps était trop tardive, ou qu'ils avaient été utilisés chez des patients à des stades trop avancés de la maladie. Il semblerait en effet que l'utilisation de ce type de stratégie chez des patients atteints d'une MA moins avancée donne des résultats plus intéressants[93], d'où l'intérêt grandissant pour des biomarqueurs précoces qui permettraient de détecter les patients plus tôt et donc de tester ces thérapeutiques plus tôt également.

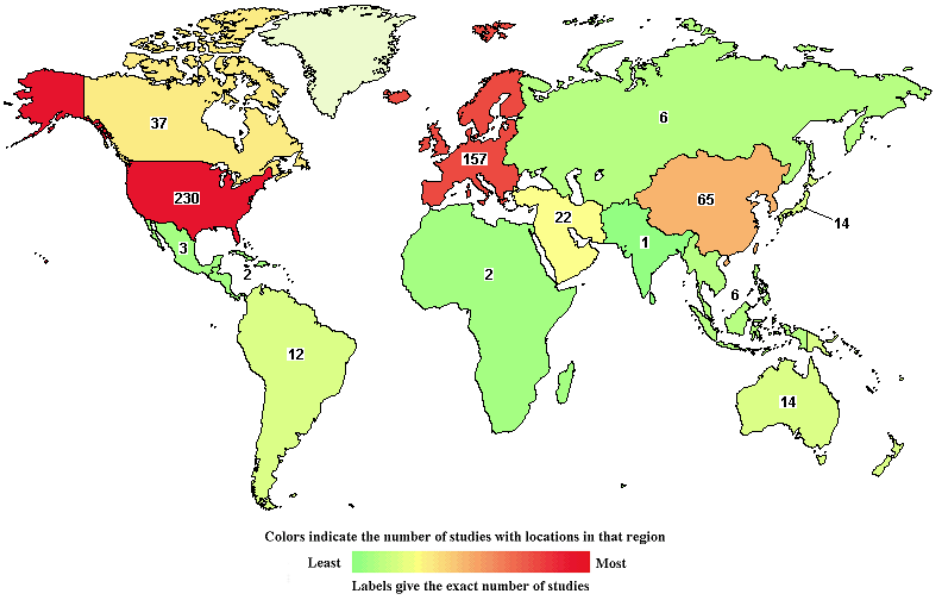


Figure 14 : Répartition du nombre d'essais cliniques "en cours" sur la MA (https://clinicaltrials.gov)

1.5.3.2. AAIC Washington 2015

Je vais présenter ici un bref résumé des derniers essais précliniques et cliniques sur la MA qui ont été principalement présentés lors de la conférence internationale AAIC 15 de Washington en juillet dernier, ceci permettant d'avoir une idée actualisée des stratégies d'aujourd'hui.

1.5.3.2.1. Emergent BioSolutions et le 5E3

La société Emergent BioSolutions dont le siège social est situé dans le Maryland aux Etats-Unis, et représenté par le Dr Laura Saward à l'AAIC 15, a présenté les premiers résultats d'une étude préclinique sur l'anticorps monoclonal **5E3**. La société avait déjà

présenté un poster sur le développement de cet anticorps dont l'affinité est spécifique d'un épitope conformationnel particulier (cSNK). Ils ont démontré une spécificité pour les oligomères d'Aß que ce soit dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou dans le broyat de cerveaux de patients Alzheimer avec une réactivité négligeable chez les individus contrôles. De façon intéressante, cet anticorps ne se lie ni aux monomères ou fibrilles d'Aß, ni à l'APP. Après une humanisation et des tests *in-vitro*, des souris Tg2576 de 12 mois ont été injectées en intra-péritonéal avec une dose de 25 mg/kg, une fois par semaine pendant six semaines. Les auteurs ont mesuré une baisse significative du nombre d'oligomères d'Aß dans le cerveau et le LCR sans impacter les plaques amyloïdes. Des tests sont également en cours sur un autre modèle de souris : les APP/PS1ΔE9 (voir §3.1.3.1.). Aucun résultat d'études comportementale ou électrophysiologique pour ne citer que ces exemples, n'a été présenté. L'anticorps n'est toujours pas en phase 1.

1.5.3.2.2. Eli Lilly et le N3pG

La société Eli Lilly dont le siège social est situé à Indianapolis aux Etats-Unis a présenté, par l'intermédiaire du Dr Ronald DeMattos, une thérapie **combinatoire** qui consiste à utiliser à la fois un anticorps spécifique de l'Aß et un inhibiteur de Bace1, la ß-sécrétase impliquée dans le métabolisme de l'APP dont j'expliquerai la fonction un peu plus loin dans ce manuscrit (voir §2.2.). Dans un premier temps, une monothérapie a été testée avec l'anticorps N3pG que la société avait déjà présenté dans une publication en 2012[94]. Cet anticorps est, à la différence du 5E3 cité précédemment, spécifique des plaques amyloïdes et montre une forte clairance de ces dernières. La deuxième monothérapie testée est celle d'un inhibiteur de Bace1. Différentes doses de chaque composé ont été testées allant de 0,3 à 30 mg/kg/jour pour l'inhibiteur de Bace1, et aux alentours de 12,5 mg/kg pour le N3pG. La présentation du Dr DeMattos consistait à promouvoir l'intérêt d'une thérapie combinatoire à l'aide des de ces deux stratégies. Différentes doses (allant de forte, moyenne à faible) ont été testées chez des souris modèles de la MA de type PDAPP (voir §3.1.1.1.). Ils ont mesuré une efficacité plus importante dans le cas de la combinaison des deux stratégies avec un nombre de plaques amyloïdes divisé par deux (400 000 pg/mg à 200 000 pg/mg) en 16 semaines. Là encore, aucune donnée de comportement n'a pour l'instant été générée et aucune donnée sur l'Aß dans les vaisseaux ou le plasma n'a été présentée.

1.5.3.2.3. Affiris et l'ADO2

La société Affiris basée en Autriche est spécialisée dans le développement de vaccins avec quelques essais cliniques recensés sur la MA et sur Parkinson. Par le biais du Dr Suzanne Hendrix, présidente de Pentara Corporation (changement d'orateur au dernier moment), les résultats du composé Affitope ADO2 ont été présentés. Le composé ADO4 a été utilisé comme traitement placebo. Aucun des groupes traités avec le composé ADO2 n'a montré d'amélioration et de bénéfice thérapeutique. De façon surprenante, 47,5% des patients traités avec le placebo ADOE4 ont montré une amélioration. Selon l'oratrice, l'explication du non-effet d'ADO2 n'est toujours pas comprise (du moins au moment de l'exposé). Concernant l'effet d'ADO4, il semble être selon elle le parfait exemple d'un « coup de chance ». Une phase d'étude de tolérance et de sécurité a donc déjà été réalisée sur 23 patients. Aucune information sur une suite potentielle n'a été délivrée.

1.5.3.2.4. Biogen et l'Aducanumab

Biogen dont le siège social est situé à Weston aux Etats-Unis utilise l'Aducanumab (ou BIIB037) qui est un anticorps anti-Aß humain produit à l'origine par la société Neuroimmune en Suisse. Cet anticorps présente une haute affinité pour un épitope conformationnel sur l'Aß agrégé comme les formes oligomériques, mais absent des formes monomériques. D'après Roger Nitsch, fondateur de Neuroimmune, l'Aducanumab est intéressant de part sa longue demi-vie, ce qui lui permet de s'accumuler de façon conséquente dans le cerveau. Une première présentation par le Dr Jeff Sevigny de Biogen avait été faite à Nice en Mars 2015 à la conférence internationale AD/PD à laquelle je m'étais également rendu. Très médiatisé, des résultats préliminaires d'un essai clinique de phase 1b montraient des résultats sur une étude de 166 patients au stade prodromal. Le choix des patients s'est fait suivant une liste de critères classiques pour ce type d'essai clinique : MMSE >20, PET scan positif avec le radiotraceur florbetapir, allèle APOE ε4 (pour 2/3 des patients), etc. Sur les 166 patients, 40 reçurent le placebo, 31 une dose d'Aducanumab de 1mg/kg, 33 une dose de 3mg/kg, 30 une dose de 6mg/kg et enfin 32 patients avec 10 mg/kg. Plusieurs critiques ont été faites à la suite de cette présentation sur le nombre de patients relativement faible, cela n'ayant pas empêché des analystes de publier sur Twitter dès le 24 mars une valeur potentielle de l'Aducanumab estimée à 90 milliards de dollars. La conférence du Dr Jeff Sevigny à l'AAIC 15 de Washington au mois de juillet a confirmé des résultats prometteurs avec une baisse du nombre

de plaques amyloïdes détectée chez les patients traités à 26 et 54 semaines après le début du traitement. Des résultats prometteurs ont également été présentés sur les tests MMSE avec des différences entre les patients traités versus le groupe placebo. Un effet dose a également été observé avec de bons résultats à 3 mg/kg et encore meilleurs à 10 mg/kg. De façon surprenante, les résultats n'ont pas été concluants avec la dose intermédiaire de 6 mg/kg. La grande annonce de cette conférence était sans nul doute l'ouverture d'une phase 3 aux Etats-Unis avec 1350 patients recrutés. A l'heure de l'écriture de ce manuscrit, le statut est toujours « en recrutement ».

1.5.3.2.5. Anavex Life Sciences et l'A2-73

Anavex est une compagnie biopharmaceutique basée à New York et engagée dans le développement de médicaments pour des maladies du système nerveux central et certains cancers. La société fait depuis le mois de novembre la une de certains sites spécialisés. De façon intéressante, ces sites ne sont pas scientifiques ou médicaux, mais économiques. La société enregistrée sous le matricule AVXL au Nasdaq a vu la valeur de ses actions doubler en l'espace de quelques jours à la fin novembre 2015. Depuis, le volume d'échanges a augmenté, signe d'un intérêt croissant pour la compagnie (**Figure 15**). Un essai de phase 1 a déjà été réalisé sur 22 personnes pour évaluer la sécurité/toxicité du composé ainsi que la dose maximale tolérée. Un essai de phase 2a est actuellement en cours de recrutement. Un article de Cory Renauer (analyste spécialisé dans l'industrie pharmacologique) publié le 7 décembre 2015 sous l'intitulé : « Do Eli Lilly and Biogen Have Alzheimer's All Wrong? » résume assez bien la stratégie choisie par la société. En effet, l'Anavex 2-73 est une petite molécule qui cible les récepteurs Sigma-1 et muscariniques. Il s'agit donc d'une stratégie thérapeutique différente de ce qui s'est fait et de ce qui continue à être fait par la Big Pharma : l'immunothérapie anti-Aβ (et bientôt anti-Tau). Le récepteur Sigma-1 est une protéine chaperonne impliquée dans la survie neuronale. Il a récemment été montré qu'elle régulerait notamment la phosphorylation de Tau en jouant sur la régulation de P35[95]. L'A2-73 stimulerait cette protéine afin de replier correctement des protéines mal repliées. La molécule se fixerait également sur les récepteurs muscariniques et entrainerait une augmentation de la plasticité cellulaire, une réduction du stress oxydatif, une baisse de l'inflammation, de la quantité d'Aβ et de l'hyperphosphorylation de Tau. La façon dont agirait le composé semble donc multiple et pas encore bien identifiée. Une deuxième stratégie est également testée (l'essai de phase 2a ne se fera que sur l'A2-73 seul) avec la combinaison du Donepezil

(ANAVEX PLUS) qui pourrait être utilisé en complément. Les résultats de la phase 2a devraient être connus courant 2016-2017.

Figure 15 : Cotations d'Anavex Life Sciences Corp. sur les 5 derniers mois de 2015 (www.nasdaq.com)

1.5.3.3. Traitements symptomatiques disponibles

Comme nous l'avons déjà précisé, **aucun traitement curatif** pour la MA n'est disponible. Il existe cependant quelques médicaments disposants d'une autorisation de mise sur le marché et préconisé par la Haute Autorité de Santé : l'Aricept® (donépézil), le Reminyl® (galantamine) et l'Exelon® (rivastigmine) sont des anticholinestérasiques qui vont donc contrer la baisse d'ACh diminuée chez les patients. L'Ebixa® (mémantine) est un médicament également disponible qui va jouer le rôle d'antagoniste des récepteurs NMDA pour le glutamate. L'efficacité de ces médicaments est plus que limitée et de nombreux effets indésirables ont été reportés.

Deux commentaires peuvent être faits quant à ces essais cliniques et aux futurs qui seront réalisés. On peut dans un premier temps imaginer que les stratégies thérapeutiques qui ont été utilisées pourraient fonctionner si les patients étaient inclus à des stades moins avancés de la maladie. En ce sens, le développement de nouveaux biomarqueurs précoces ainsi que le travail conjoint de nombreux instituts hospitaliers qui a permis la mise en place de nouveaux critères diagnostiques plus simples et plus efficaces, ont été et seront déterminants. Dans un deuxième temps, on peut imaginer qu'avec des stratégies d'immunothérapies anti-Aβ ou anti-plaques, nous faisons complètement fausse route. Ainsi, une meilleure compréhension de la MA et de ses phases initiales ainsi que des essais cliniques probablement « moins classiques » comme avec l'A2-73 seront également décisifs.

2. La cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde[21] a été pendant plus de 20 ans extrêmement influente pour la recherche sur la MA, que ce soit dans le monde académique ou de l'industrie pharmaceutique. Elle est d'ailleurs, comme nous venons de le voir, à la base d'une très grande majorité des stratégies thérapeutiques proposées et testées. Il aurait été probablement judicieux de la décrire et de la commenter plus tôt dans ce manuscrit. Cependant, l'influence de cette hypothèse aujourd'hui est telle que sa discussion justifie une partie à part entière. Elle est d'autant plus intéressante qu'elle fait débat depuis des années dans la communauté scientifique et qu'elle est également, et à juste titre, de plus en plus remise en question sur différents points ce qui en fait un sujet d'actualité majeur dans le monde de la MA. Elle par ailleurs à la base de la quasi-totalité des modèles animaux utilisés et que nous détaillerons dans la partie suivante (voir §3.).

2.1. L'hypothèse d'Hardy et Higgins de 1992

En 1992, les deux auteurs proposent que « **le dépôt du peptide Aβ, le composant principal des plaques amyloïdes, est l'élément causal de la pathologie Alzheimer et que les tangles, la perte cellulaire, les dommages vasculaires et la démence suivent comme le résultat direct de la déposition** »[21]. Leur hypothèse résume finalement les données génétiques et histologiques connues de l'époque et place l'APP, sa protéolyse en Aβ et la formation des plaques au centre de la MA[96]. Bien qu'aujourd'hui une minorité de personnes continuent de croire au rôle central des plaques amyloïdes dans la MA, il est évident que cette phrase est aujourd'hui fausse. C'est probablement pourquoi Hardy et Selkoe publièrent 10 ans plus tard une version plus tempérée de cette hypothèse (**Figure 16**) où la protéolyse amyloïdogénique de l'APP reste centrale, mais où la formation des plaques devient secondaire dans l'explication des premières déficiences mnésiques[48,59].

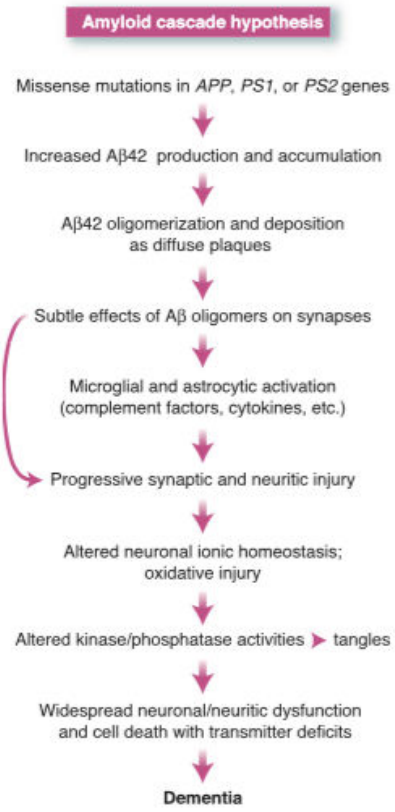


Figure 16 : Hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy et al. 2002)

2.2. Les voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique

Le premier élément de la cascade amyloïde est le métabolisme de l'APP et la production d'Aβ. Dans des conditions physiologiques, l'APP est majoritairement clivée suivant la **voie non-amyloïdogénique** avec un clivage par l'α-sécrétase. Trois membres de la famille protéique ADAM ont été proposées comme α-sécrétases[97] : **ADAM-9**, **ADAM-10** et **ADAM-17** (**Figure 17**). Ce clivage libère deux fragments : l'**α-CTF** (ou C83) membranaire et le **sAPPα** aux propriétés protectrices. Nous avons par ailleurs récemment publié une étude montrant que la surexpression du sAPPα par transfert de gène était bénéfique chez un modèle murin de la MA[98]. En condition pathologique, la protéolyse de l'APP suivant la voie amyloïdogénique est majoritaire. L'APP est alors clivée par la **β-sécrétase** (Bace1) avec la formation de deux fragments : le **β-CTF** (ou C99) et le **sAPPβ**. Dans un second temps, le β-CTF est clivé par la **ɣ-sécrétase** (complexe composé de la PS1 ou PS2, PEN2, Nicastrine et APH1) libérant alors l'**AICD** et l'**Aβ**. La ɣ-sécrétase coupe le β-CTF à différents niveaux expliquant ainsi la production de différents types d'Aβ comme l'Aβ42 ou l'Aβ40 majoritaire.

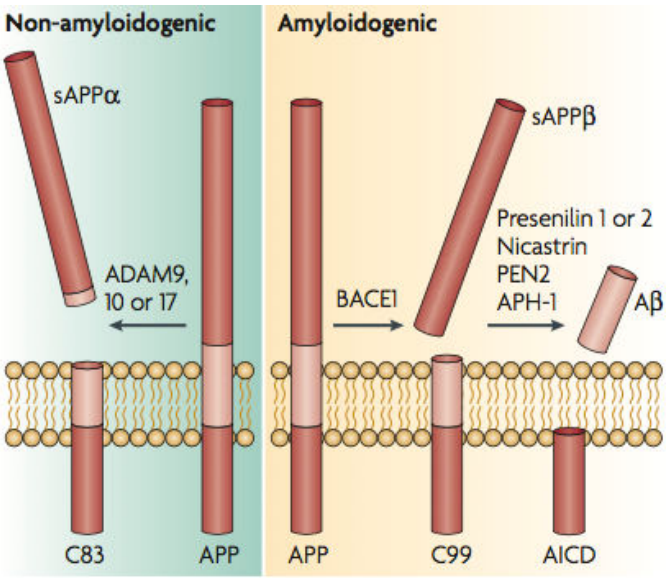


Figure 17 : Métabolisme de l'APP suivant la voie non-amyloïdogénique et amyloïdogénique (LaFerla et al. 2007)

2.3. Conséquences de l'accumulation d'Aβ

L'Aβ est un petit peptide d'une quarantaine d'acides aminés (la taille dépendant du site de clivage par les sécrétases). Il est produit à l'intérieur du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi et est ensuite sécrété[99]. Les fonctions physiologiques de l'Aβ sont mal connues. Certaines études ont montré que l'absence d'Aβ n'induisait pas de perte de fonctions physiologique ou vitale[100]. Cependant, il a été montré que l'Aβ pouvait de façon directe ou indirecte activer certaines enzymes[101], réguler le métabolisme et le transport du cholestérol[102], agir comme un facteur de transcription[103] ou encore avoir une activité antimicrobienne[104]. L'Aβ peut exister sous l'état de monomères, oligomères, protofibrilles et fibrilles (**Figure 18**), les fibrilles insolubles s'agglomérant en plaques séniles.

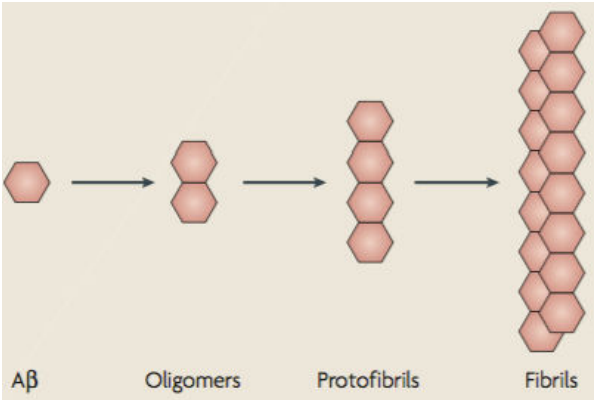


Figure 18 : Etats d'assemblage de l'Aβ (LaFerla et al. 2007)

Dans les années 1990, deux études ont révélé que la charge amyloïde de type fibrilles ne corrélait que très peu avec les déficits cognitifs[105,106]. En 1999, deux autres études ont indiqué que la charge amyloïde soluble de type oligomérique corrélait de façon importante avec la sévérité de la maladie et la perte synaptique, suggérant ainsi que **les formes solubles de l'Aβ pourraient jouer un rôle plus important** que les formes non solubles dans la physiopathologie de la MA[107,108]. Dans le cas de la MA, l'Aβ va donc diffuser et s'accumuler au niveau des synapses tripartites notamment sous la forme oligomérique/protofibrille, et être responsable de leurs dysfonctions en diminuant notamment la densité des épines dendritiques et en abrogant la plasticité synaptique[109]. Le lien entre Aβ et perte de mémoire a été décrit pour la première fois en 1996 chez les souris Tg2576[110] puis chez les 3XTg-AD[111,112] que nous décrirons dans la prochaine partie de ce manuscrit (voir §3.1.1.2. et §3.1.4. respectivement). De plus, ces études ont également permis de se rendre compte que les défauts cognitifs pouvaient apparaître avant la formation des plaques et des tangles. La LTP dans l'hippocampe, qui représente une mesure électrophysiologique de la force et de la plasticité synaptique et qui requiert l'activation des récepteurs NMDA, est diminuée dans ces modèles. A l'inverse, il a été montré que l'Aβ augmentait la LTD et donc la dépression synaptique[113-115]. **La synapse dans son ensemble est donc perturbée** en présence de cette charge amyloïde. Les récepteurs NMDA et AMPA interagissent d'ailleurs étroitement avec des protéines comme **PSD-95** au niveau de l'élément post-synaptique. Cette protéine d'échafaudage est essentielle dans l'architecture de la synapse et donc dans son fonctionnement. Elle a d'ailleurs été rapportée comme diminuée dans le cerveau de patients Alzheimer et a été corrélée avec la baisse du nombre d'épines dans des modèles murins[116,117]. De multiples évènements que je ne détaillerai pas dans ce manuscrit sont aussi perturbés dans l'élément postsynaptique comme l'élévation du Ca^{2+} cytosolique ou encore la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Il a également été rapporté qu'à des concentrations pathologiques, l'Aβ perturbe l'absorption du glutamate par les cellules gliales[115] ce qui augmenterait les niveaux de glutamate et ainsi perturberait la LTP[118] et la LTD. Il a ainsi été décrit une baisse du nombre des transporteurs au glutamate : **Glast** (ou EAAT1) et **Glt-1** (ou EAAT2) dans l'hippocampe des patients atteints de la MA[119]. Ces deux transporteurs sont par ailleurs responsables de la recapture du glutamate en grande majorité par les cellules gliales. Ceci a pour conséquence un **débordement** du glutamate dans l'espace **extra-synaptique** et de ce fait une activation des récepteurs glutamatergiques positionnés en extra-synaptique[118]. L'ensemble de ces éléments n'est pas exhaustif mais représente bien les interactions multiples de l'Aβ sur l'ensemble de la synapse (**Figure 19**).

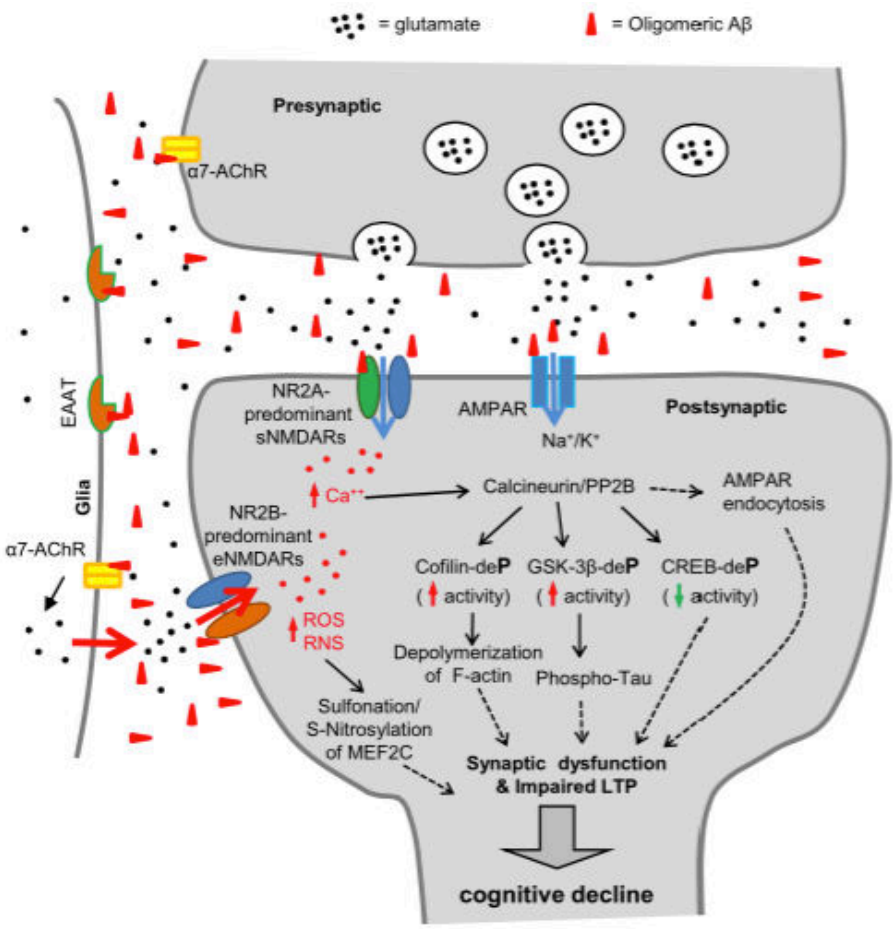


Figure 19 : Représentation schématique décrivant les dysfonctions synaptiques dues aux oligomères d'Aβ (Tu et al. 2014)

2.4. La voie Tau

La protéine Tau est une protéine associée aux microtubules (MAP) par son extrémité C-terminale qui interagit avec la tubuline afin de moduler la **stabilité des microtubules** et donc des axones. Les microtubules sont par ailleurs impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la croissance et le transport cellulaire. Comme nous l'avons précisé précédemment (voir §1.2.2.), sa découverte dans les PHFs et donc dans la MA a motivé la recherche autour de cette protéine. Le gène *MAPT* de Tau est situé sur le chromosome 17 et suivant l'épissage alternatif, six isoformes sont retrouvées chez l'Homme. Tau est une protéine **phosphorylée** qui dans un cerveau sain contient 2 à 3 moles de phosphate par mole de protéines Tau. Elle contient 80 sérine/thréonine et 5 tyrosines susceptibles d'être phosphorylées. Dans le cerveau d'un patient Alzheimer, Tau est anormalement phosphorylée jusqu'à trois fois plus que chez le sujet normal, et cet état conduit à une agrégation en PHFs

formant les « tangles », deuxième signe caractéristique de la MA après les plaques amyloïdes. Il existe donc une grande quantité de kinases et phosphatases capables de réguler l'état de phosphorylation de Tau et dans certaines conditions induire une hyperphosphorylation anormale conduisant à de la neurodégénérescence et à la démence[120]. On peut citer parmi les kinases les plus connues **GSK3β**, **CDK5** ou encore **DYRK**. Parmi les phosphatases, **PP2A** serait responsable de 71% des déphosphorylations de Tau dans le cerveau humain[121]. Il est globalement admis aujourd'hui qu'une augmentation de la phosphorylation de Tau diminue son affinité pour la tubuline, entraînant ainsi une diminution de la stabilité des microtubules et donc des neurones. L'hyperphosphorylation anormale de Tau est également une caractéristique de nombreuses autres maladies neurodégénératives appelées **Tauopathies**. Les tauopathies sont caractérisées par des agrégats de protéines Tau hyperphosphorylées et sont rencontrées dans de nombreuses maladies neurodégénératives mais également avec le vieillissement. On ne connaît cependant pas avec certitude sous quelle forme Tau exerce sa toxicité. On a longtemps pensé que les DNFs étaient les constituants toxiques de la pathologie Tau. Certaines études ont cependant montré que ce serait probablement les oligomères de Tau qui seraient neurotoxiques[122]. Il a même été proposé que les DNFs soient neuroprotectrices[123]. L'ensemble reste encore controversé mais il est intéressant de noter que **les mêmes questions posées pour l'Aβ et les plaques se posent pour Tau et les DNFs**.

2.5. Faut-il rejeter l'hypothèse de la cascade amyloïde ?

Il s'agit d'une question intéressante qui anime bon nombre de débats dans le monde de la recherche sur la MA, et ce depuis des années. D'une certaine façon, deux points majeurs sont discutés : **le rôle des plaques amyloïdes et la place de Tau dans la progression de la maladie**. Pour illustrer ce paragraphe, je prendrai l'exemple d'une conférence donnée à la **SFN de 2015** à Chicago. Je n'y ai pas assisté mais une retransmission vidéo de plusieurs conférences concernant la MA ont été publiées par Tim Spencer, Senior Editor de Nature Neuroscience. Plusieurs personnalités reconnues dans le domaine comme Karen Duff (Columbia University Medical Center), Inna Slutsky (Tel Aviv University), David Holtzman (Washington University in St Louis School of Medicine), Scott Small (Columbia University Medical Center) et Karl Herrup (Hong Kong University of Science and Technology) ont abordé le sujet. A la question « Faut-il rejeter l'hypothèse de la cascade amyloïde ? », la réponse de Karl Herrup est sans appel : « oui ! ». Il ajoute même qu' « Aloïs Alzheimer a probablement eu tort ! ». Ces propos ne sont pas une surprise dans le sens ou Karl Herrup

venait de publier quatre mois avant cette conférence une perspective dans Nature Neuroscience intitulée : « The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis » [124]. Selon lui, deux types d'expériences permettent de tester la validité de cette hypothèse. La première consiste à prendre des Hommes « sains » et d'ajouter de l'amyloïde dans leurs cerveaux. Si l'on s'en tient à l'hypothèse de la cascade amyloïde, ils devraient déclarer une MA. A l'inverse, si l'on prend des personnes atteintes de la MA et qu'on leur enlève l'Aβ, ces personnes devraient aller mieux, toujours en accord avec l'hypothèse de la cascade amyloïde[124]. La première hypothèse a déjà été plus ou moins testée dans le sens où des plaques amyloïdes ont déjà été retrouvées chez des patients sains sans démence avérée[31-34]. L'existence de cette population en bonne santé mais « amyloide positive » représente effectivement un défi important pour l'hypothèse de la cascade amyloïde. De la même façon, les essais cliniques dont l'objectif principal étaient de réduire la charge amyloïde dans sa globalité ont jusqu'à présent tous échoué pour stopper l'évolution de la maladie[91,92,125]. Karl Herrup insiste évidemment sur le fait qu'aucune donnée qu'il présente ne discute l'implication de l'Aβ dans la MA bien au contraire. L'hypothèse de la cascade amyloïde aurait selon lui autant de forces que de faiblesses dans son interprétation. Sa conclusion est de considérer que pour une pathologie avec une prévalence et une complexité comme la MA, il serait très surprenant de voir qu'une seule voie de signalisation puisse conduire un cerveau âgé sain à un cerveau atteint de la MA. Selon David Holtzman, l'hypothèse de la cascade mériterait également quelques reconsidérations du fait que la maladie ne commence pas quand la démence commence, mais 20 ans plus tôt quand l'Aβ commence à exercer sa toxicité dans le cerveau. Il serait donc d'avis de la modifier tout en laissant l'Aβ et ses conséquences en son centre. Selon Scott Small, ce sont les fragments intracellulaires de l'APP qui sont les vrais neurotoxiques, et non pas les fragments extracellulaires comme les plaques. Le problème de cette hypothèse est le développement des plaques qui selon lui qui ne corrèle pas avec les symptômes mnésiques de la maladie. Il rajoute même que si les stratégies d'immunothérapie ont échoué pour l'instant c'est que les principales cibles de ces dernières étaient les plaques amyloïdes. Karen Duff considère qu'il y a une phase Aβ-dépendante et une phase Aβ-indépendante dans le décours de la pathologie et qu'il faudrait ainsi recadrer l'hypothèse en gardant à l'esprit que l'Aβ n'est très probablement pas le responsable de la mort cellulaire, à l'inverse de Tau. Elle revient sur les modèles APP et Aβ disponibles qui ont finalement selon elle de faibles défauts cognitifs et insiste sur Tau et son impact dans la MA.

L'hypothèse de la cascade amyloïde est donc évidemment critiquable et devrait certainement être remaniée. Ce qui semble aujourd'hui le moins correspondre à la réalité est le rôle des plaques amyloïdes. Le second point discuté est Tau et sa place dans la cascade. Je présenterai mon opinion personnelle sur le sujet dans la partie « Résultats » et « Discussion » de ce manuscrit, puisque tirée de l'interprétation de mes propres résultats.

3. Les modèles d'études de la maladie d'Alzheimer

Les modèles d'études de la MA sont nombreux et variés, bien que la majorité de ceux utilisés dans les publications soit des **modèles animaux**. La plupart d'entre-eux ont été développés par **transgénèse** : des gènes retrouvés chez des patients atteints de FAD ont été insérés dans le génome des animaux modèles. D'autres modèles ont par exemple été développés par administration de peptides **Aβ de synthèse**. Il est important de garder à l'esprit qu'il y a environ un nouveau modèle de la MA publié chaque semaine et qu'il est impossible de les décrire tous. Il est également important de comprendre que pour un même modèle, les résultats varient en fonction des équipes de recherche, pour des raisons évidentes que sont les protocoles expérimentaux qui diffèrent ou les souches génétiques qui dérivent. Pour ces raisons, j'ai délibérément choisi de décrire dans cette partie une liste non exhaustive de modèles, qui à ma connaissance sont les plus utilisés, cela ne signifiant évidemment pas qu'il s'agit des meilleurs. J'ai également compris pendant ma thèse que quel que soit le projet de recherche (et pas forcément en neurosciences), le choix du modèle est important et sans cesse remis en cause. Gardons donc à l'esprit qu'il n'existe aucun vrai modèle de la MA, que chaque modèle est critiquable et par définition imparfait, et que le problème ne vient pas forcément de ces outils mais plutôt des conclusions qu'on en tire. Enfin, pour ne pas surcharger ce manuscrit, je ne ferai volontairement aucun commentaire d'éthique sur la recherche animale même si cela aurait été parfaitement justifié.

3.1. Modèles souris

La très grande majorité des modèles souris de la MA sont référencés sur la banque de données de Alzforum qui est régulièrement actualisée. Non exhaustive mais bien plus complète que la majorité des revues sur le sujet, elle permet d'avoir les caractéristiques principales de chaque modèle ainsi que les références des papiers originaux. Il faut toutefois garder à l'esprit que pour chaque modèle, une grande variabilité sur l'âge d'apparition de certaines caractéristiques (comme les plaques ou les défauts mnésiques) est à considérer en fonction des laboratoires et donc en fonction de ce qui est référencé dans les revues ou sur Alzforum.

3.1.1. Modèles APP

Les modèles APP sont majoritairement basés sur la surexpression du gène *APP* humain muté sous le contrôle de promoteurs forts (**Tableau 3**). 39 sont aujourd'hui référencés et globalement, l'APP humaine est **surexprimée entre 5 et 7 fois** par rapport à l'APP endogène. Il existe trois formes d'APP exprimées chez l'Homme : la forme 695 qui ne possède pas de domaine KPI (de l'anglais Kunitz Protease Inhibitory) et les formes 751 et 770 qui l'expriment. La forme 695 est majoritaire chez l'Homme et les niveaux des formes 751 et 770 sont augmentés chez les patients Alzheimer. Il a ainsi été rapporté que le domaine KPI corrèle avec une augmentation de l'Aβ. Les mutations utilisées sont variées mais favorisent classiquement le métabolisme de l'APP en Aβ. Une accumulation importante d'Aβ, de plaques et de défauts cognitifs sont donc retrouvés dans ces modèles, sans formation de tangle et sans perte neuronale.

Promoter	Brain expression		Extraneural expression	Timing
	Regions	Cell types		
PDGF-B	Widespread [143]	Neurons [143]	Heart, lung (low) [143]	Begins by E15 [143]
Thy-1	Widespread [23,56]	Neurons [23]	None, with ΔIVS3 modification of promoter [174]	Begins P7 [23]
Prp	Widespread [16,169]	Neurons, astrocytes, oligodendroyctes, microglia [16]	Liver > kidney, spleen, and other organs [7]	Begins E12.5 [7]

Tableau 3 : Caractéristiques des principaux promoteurs utilisés dans les modèles de la MA (Hall et al. 2012)

3.1.1.1. Le modèle PDAPP

Ce modèle a été décrit pour la première fois en 1995 et fait partie des premiers modèles du genre à avoir été développés[126]. Son développement a été motivé à l'époque par le manque de modèles présentant une vaste neuropathologie, comprenez beaucoup de plaques amyloïdes[127-129]. Cette souris comprend une APP humaine (695, 751 et 770) mutée en position 717 avec une phénylalanine à la place d'une valine (mutation Indiana : V717F) et sous le contrôle du promoteur PDGFβ. Cette mutation fut découverte 4 ans plus tôt chez des patients atteints d'une FAD[17]. Cette souris présente des déficits mnésiques dans le labyrinthe radial à 3 mois et un défaut dans le test de reconnaissance d'objet qui commence aux alentours de 6-9 mois, âge d'apparition des premières plaques amyloïdes dans l'hippocampe et le cortex[130]. Des déficits électrophysiologiques ont été mis en évidence des 4-5 mois d'âge, i.e. avant l'apparition des plaques amyloïdes[131].

3.1.1.2. Le modèle Tg2576

Cette souris qui surexprime une APP humaine (695) porteuse de la double mutation Swedish (K670N/M671L) sous le contrôle du promoteur de la protéine PrP du hamster, a été décrite un an après la précédente[110]. Des défauts comportementaux (mémoire spatiale et mémoire de travail) ont été décrits aux alentours de 6 mois d'âge avec l'apparition de plaques entre 9 et 11 mois[110,132,133]. Une diminution de la LTP a également été mesurée à 5 mois dans le gyrus dentelé de l'hippocampe, tout comme une diminution de la densité des épines dendritiques[134]. Ce modèle est particulièrement utilisé grâce à la générosité du Dr Hsiao et par sa vente commerciale via Taconic Inc et Charles River entre autres.

3.1.1.3. Le modèle APP23

Cette souris surexprime une APP humaine (751) porteuse comme pour le précédent modèle de la double mutation Swedish (K670N/M671L) sous contrôle du promoteur de souris Thy-1[135]. Elle a été développée par Novartis et l'université de Bâle et publiée en 1997. Les plaques amyloïdes apparaissent à 6 mois dans le cortex et l'hippocampe avec comme pour les précédents modèles une augmentation de cette charge amyloïde avec le temps. Une hyperphosphorylation de Tau a également été montrée (AT8) tout comme une réaction inflammatoire par les cellules gliales autour des plaques[136]. Des défauts cognitifs ont été montrés aux alentours de 10 mois[137]. Des changements sur les quantités d'Aβ et de Tau ont également été rapportés dans le LCR[138].

3.1.1.4. Le modèle J20

Ce modèle comprend une APP humaine (695, 751 et 770) contenant les deux mutations précédemment décrites : Swedish (K670N/M671L) et Indiana (V717F) sous contrôle du promoteur PDGFβ. La mutation Swedish est située sur le site de clivage par Bace1 alors que la mutation Indiana est située sur au niveau du site de clivage de la ɣ-sécrétase. Des plaques apparaissent autour de 5-7 mois et des défauts cognitifs autours de 4-7 mois[139]. Le papier original est intéressant puisque les auteurs y ont également développé une souris transgénique exprimant l'APP humaine mais wild-type (WT), i.e. non mutée. Cette souris présente une augmentation de l'Aβ avec l'âge, mais sans formation de plaques amyloïdes. De façon intéressante, cette souris présente des défauts synaptiques, preuve que les plaques amyloïdes

ne sont pas nécessaires pour entrainer une synaptotoxicité[139].

3.1.1.5. Le modèle TgCRND8

Cette souris a les mêmes mutations que pour la souris J20 (Swedish et Indiana) mais uniquement sur une APP de type 695 et sous contrôle du promoteur PrP. Des plaques, de la gliose et des défauts comportementaux apparaissent à 3 mois[140,141]. Des plaques très denses apparaissent dès 5 mois d'âge. Cette souris est disponible via le Tanz Centre for Research in Neurodegenerative Diseases à l'université de Toronto.

3.1.1.6. Les modèles APP NL-F et NL-G-F

Il s'agit des derniers modèles APP médiatisés qui ont été publiés en 2014[142]. La différence avec les précédents modèles décrits est qu'il n'y a **pas de surexpression d'APP** puisque la technologie knock-in a été utilisée. Autrement dit, l'APP murine a été remplacée par une APP humanisée au niveau de sa région codant l'Aβ et contenant les mutations Swedish + Beyreuther/Iberian pour le premier modèle (APP NL-F) et Swedish + Beyreuther/Iberian + Arctic pour le deuxième (APP NL-G-F). La première souris développe des plaques aux environs de 6 mois avec une astrogliose et microgliose autour des plaques ainsi qu'une diminution de la synaptophysine et de PSD-95. Le deuxième modèle est plus agressif et développe des plaques dès 2 mois. Aucun tangle ou mort neuronale n'a été détecté. Au delà du modèle en lui-même, la publication de Saito et al est intéressante dans le sens où elle a permis d'insister sur un des écueils majeurs des modèles actuels : la surexpression des transgènes.

Figure 20 : Age d'apparition des caractéristiques phénotypiques des modèles APP précédemment cités (adapté d'Alzforum)

3.1.2. Modèles PS1

Une quinzaine de modèles PS1 sont actuellement référencés. Il est intéressant de remarquer qu'ils sont moins nombreux et moins utilisés que les modèles APP quand on sait que les mutations de la PS1 représentent 70% des FAD (voir § 1.4.1.2.).

3.1.2.1. Les modèles PS1(M146L) et PS1(M146V)

Ces deux souris publiées en 1996 surexpriment une PS1 humaine porteuse de la mutation M146L ou M146V sous contrôle du promoteur PDGFβ[143]. Ces modèles ont été développés dans l'objectif de vérifier si des mutations comme celles retrouvées dans les FADs entraînent une augmentation d'Aβ. Une augmentation spécifique d'Aβ42 a été mesurée. Aucune plaque amyloïde, ni de défaut mnésique n'ont été mis en évidence. Des modifications électrophysiologiques et d'activité mitochondriale ont cependant été mesurées[144]. Ces modèles vont dans le sens d'un **gain de fonction de la PS1** dans la MA.

3.1.2.2. Les modèles PS1 KO et KI

La première souris PS1 KO a été publiée en 1997 et a permis de comprendre certains le rôle vital de la PS1 puisque les souris $PS1^{-/-}$ meurent rapidement après la naissance. Il a notamment été rapporté que la PS1 est requise dans la formation du squelette, de la neurogénèse et de la survie neuronale[145]. Jie Shen, 1ère auteur du papier de 1997 publia ensuite en 2001 une nouvelle souris PS1 KO mais cette fois conditionnelle afin de pouvoir contrer cette mortalité rapide et étudier les conséquences sur le métabolisme de l'APP[146]. Une réduction de l'Aβ40 et 42, ainsi qu'une accumulation des fragments C-terminaux de l'APP ont été détectés, preuve que la PS1 est nécessaire dans le métabolisme normal de l'APP. Comme nous l'avons déjà précisé précédemment (voir § 1.4.1.2.), la même équipe a récemment généré deux souris KI qui ont, contre toute attente, mimé un phénotype équivalent aux souris $PS1^{-/-}$, suggérant alors la possibilité d'un mécanisme de type perte de fonction[60].
Malgré le fait que certains modèles PS1 présentent des défauts électrophysiologiques et comportementaux[147], ils sont de façon générale moins utilisé que les autres s'explique par deux raisons principales liées aux différences entre les formes humaine et murine de l'APP et de l'Aβ. En effet, l'APP murine diffère de l'APP humaine par 17 acides aminés dont 3 à l'intérieur de la région Aβ (**Figure 21**). Ces différences font que l'Aβ murin s'agrège bien moins que l'Aβ humain. De plus, la β-sécrétase murine a une préférence de clivage au site β' et non β, entrainant la production de fragments $A\beta_{11-x}$ au lieu des fragments $A\beta_{1-x}$ (qui après clivage par la PS1 et le complexe ɣ-sécrétase donne l'$A\beta_{1-42}$ par exemple, i.e. l'Aβ42 comme écrit dans ce manuscrit).

Figure 21 : Comparaison de l'Aβ humain et murin qui diffèrent en position 5, 10 et 13 (Hall et al. 2012)

3.1.3. Modèles APP+PS1

Les modèles APP+PS1 sont couramment utilisés puisque de façon générale, l'apport des deux transgènes humains et mutés permet une augmentation plus importante de l'Aβ42 et de la formation des plaques amyloïdes. Une vingtaine de modèles est actuellement référencée

avec, comme pour les modèles précédents, certains plus utilisés que d'autres.

3.1.3.1. Le modèle APPswe/PS1dE9 (ou « APP/PS1ΔE9 »)

Il s'agit très probablement du modèle le plus populaire et qui est disponible auprès du Jackson Laboratory. Les souris expriment la mutation Swedish pour l'APP 695 et la mutation dE9 pour la PS1 ce qui résulte en la formation de plaques dès le 6ème mois[148,149]. De façon intéressante, l'âge d'apparition des défauts cognitifs est plus tardif (et diffère en fonction des publications) avec des déficits évalués dans le test de la piscine de Morris aux alentours de 14[98] et 18 mois[150]. Comme pour les modèles précédents, on ne détecte aucun tangle ou mort neuronale dans ces souris.

3.1.3.2. Le modèle 5xFAD

Egalement très utilisée, cette souris exprime cinq mutations liées aux FAD : APP K670N/M671L (Swedish), APP I716V (Florida), APP London V717I (London), PS1 M146L et PS1 L286V, sous contrôle du promoteur Thy-1. Ces souris développent des plaques très précocement aux alentours de 2 mois d'âge et des déficits cognitifs autours de 4 et 6 mois[151]. La gliose commence également à 2 mois en parallèle de l'apparition des plaques amyloïdes. Des déficits électrophysiologiques ont été mis en évidence à 6 mois[152]. Ce modèle est également disponible sur le site du Jackson Laboratory.

3.1.3.3. Le modèle APP751SL/PS1 KI (ou « APP/PS1 Ki »)

Ce modèle a été développé par Sanofi il y a plus de 10 ans avec le croisement de deux lignées transgéniques afin d'apporter une APP humaine porteuse des mutations London et Swedish et une PS1 humaine avec les deux mutations suivantes : M233T et L235P[153]. Là encore, il s'agit d'un modèle extrêmement sévère qui développe des plaques amyloïdes entre 2 et 3 mois , des défauts cognitifs vers 6 mois et une perte neuronale vers 1 an[154].

3.1.4. Modèles TAU et APP+PS1+TAU

Il existe également différents modèles Tau utilisés à la fois dans l'étude des tauopathies mais également pour la MA. Je ne les détaillerai pas dans ce manuscrit mais on peut citer pour

les plus connus les modèles JNPL3[155] et TauV337M[156]. Nous avons également utilisé dans le laboratoire le modèle THY-Tau22 développé par l'équipe de Luc Buée[157,158].

Aucune mutation génétique du gène *MAPT* n'a été détectée chez des patients atteints de FAD. Les mutations utilisées pour les modèles Tau sont donc généralement des mutations localisées au niveau des sites de liaison aux microtubules et décrites dans certaines démences fronto-temporales. Le modèle **3xTg-AD** publié en 2003 expriment le gène *APP* humain (695) porteur de la mutation Swedish ainsi que le gène *PS1* humain porteur de la mutation M146V et le gène *MAPT* humain porteur de la mutation P301L[111]. D'après l'article original, des plaques amyloïdes se forment aux alentours de 6 mois et des tangles vers 12 mois. La colonie présente à MIRCen et entretenue par l'équipe de Gilles Bonvento semble présenter ces marqueurs bien plus tardivement. Des défauts cognitifs, là encore non retrouvés dans la colonie de MIRCen, ont été retrouvés chez ces souris[112].

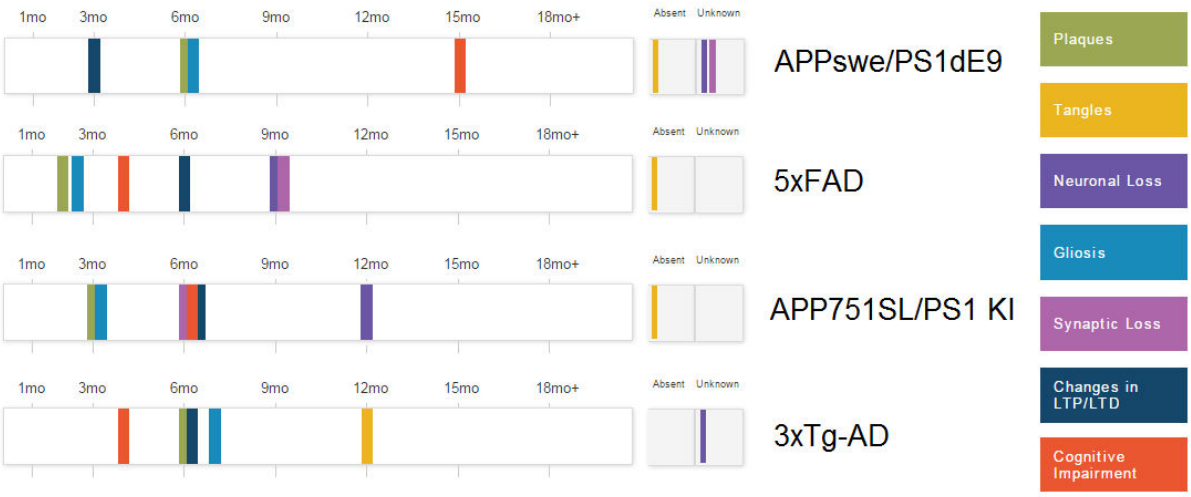


Figure 22 : Age d'apparition des caractéristiques phénotypiques des modèles APP/PS1 précédemment cités (adapté d'Alzforum)

3.1.5. Modèles Aβ

Certains modèles permettent de passer outre le métabolisme de l'APP en ne ciblant directement que la production d'Aβ42, soit par transgénèse comme pour les modèles précédents, soit directement par injection d'Aβ42 dans la zone cible.

3.1.5.1. Le modèle BRI-Aβ42

10 ans avant la publication du modèle BRI-Aβ42, Frank LaFerla publiait le développement d'une souris dans laquelle le transgène introduit permet l'expression directe du peptide Aβ[159]. Malgré une forte expression d'Aβ42 dans les neurones et une mort neuronale par apoptose, très peu d'Aβ sécrété a été détecté. John Hardy et Todd Golde ont alors développé une souris transgénique exprimant une protéine de fusion entre la protéine BRI (qui est une protéine impliquée dans certaines démences familiales) et le peptide Aβ42 (ou Aβ40), sous promoteur PrP[160]. Les souris développent des plaques amyloïdes dès 3 mois. Cette étude a également permis de mettre en évidence, *in vivo*, le rôle critique de l'Aβ42 dans la formation des dépôts amyloïdes, que ce soit au niveau du parenchyme ou des vaisseaux. En effet, la même stratégie a été employée avec la protéine de fusion BRI-Aβ40 : les souris n'ont développé aucune pathologie amyloïde.

3.1.5.2. Le modèle par injection d'Aβ de synthèse

Il est également possible d'injecter de l'Aβ de synthèse directement dans la zone cible par chirurgie stéréotaxique. De nombreuses formes d'Aβ comme l'Aβ40[161,162], l'Aβ42[163,164], l'Aβ43[162] ou encore l'Aβ 25-35[165] ont déjà été injectés soit par perfusion (via une pompe), soit par injection intracérébroventriculaire ou intrahippocampique. L'intérêt majeur dans l'utilisation de ce type de stratégie est sa rapidité : les oligomères diffusant dès la première heure suivant l'injection/perfusion. Cependant, un des principaux écueils est sa faible durée d'action, estimée à environ 7 jours. Il faut également tenir compte, comme l'écrivait Denis Selkoe en 2002, que les quantités d'Aβ de synthèse généralement injectées sont souvent de l'ordre du micromolaire, là où celles du cerveau ou du LCR d'un patient sont de l'ordre du nanomolaire[48].

3.2. Modèles rats

Bien que moins nombreux que les modèles souris, les modèles rats de la MA se développent et s'utilisent de plus en plus, offrant effectivement des avantages certains sur la souris. Le rat est tout d'abord sur les plans physiologique, génétique et morphologique plus proche de l'Homme que la souris. Ainsi, le comportement des rats est plus sophistiqué et donc plus pertinent à étudier. Il est également plus gros, ce qui le rend plus intéressant dans l'utilisation de techniques translationnelles comme l'IRM ou la TEP. L'accès aux fluides

biologiques comme le sang et le LCR est également plus facile. Le premier modèle rat transgénique a été publié en 2004 et depuis, une dizaine (en comprenant des modèles Tau) est référencée[166].

3.2.1. Les modèles UKUR28, 19 et 25

Il s'agit de différentes lignées développées et caractérisées en 2004. Ces rats Wistar expriment soit une APP humaine mutée avec les mutations Swedish et Indiana (UKUR28), soit une PS1 humaine mutée avec la mutation Finn (UKUR19), soit les deux transgènes (UKUR25) [167]. L'expression des transgènes est principalement localisée dans l'hippocampe et le néocortex. Dans les rats UKUR28 et UKUR25, de l'Aβ intra-neuronale est détectée mais sans aucune formation de plaque amyloïde, et ce jusqu'à au moins 24 mois.

3.2.2. Le modèle TgAPPswe

Ce modèle a été publié la même année que les trois précédents. Il s'agit ici de rats Fischer exprimant une APP humaine (751) porteuse de la mutation Swedish et sous promoteur PDGF[168]. Cette étude est intéressante dans le sens ou non seulement ces rats ne présentent pas de dépôts amyloïdes, mais surtout parce que dans certaines tâches comportementales, comme la piscine de Morris, ils sont meilleurs que les rats contrôles, que ce soit à 6 ou 12 mois d'âge. D'après les auteurs, cela s'expliquerait par une faible augmentation de l'ARNm codant l'APP (56,8% là ou la plupart des autres modèles souris par exemple multiplie par 5 ou 7 cette quantité) et donc une faible production d'Aβ (21% pour l'Aβ42 et 6% pour l'Aβ40) par rapport aux autres modèles transgéniques.

3.2.3. Le modèle Tg6590

Ce modèle de rat Sprague-Dawley surexprime là encore une APP humaine (695) avec la mutation Swedish sous le promoteur de l'ubiquitine C. Des dépôts amyloïdes vasculaires sont détectables à 15 mois, suivi d'un nombre de plaques diffuses très limité et d'une hyperphosphorylation de Tau [169]. Les auteurs ont également mis en évidence des déficits comportementaux dès 9 mois dans la piscine de Morris et l'open-field, i.e. bien avant l'apparition des dépôts amyloïdes[170].

3.2.4. Le modèle Tg478/Tg1116/Tg11587

Comme je le discute dans l'introduction du manuscrit n°2 en cours d'écriture, il est intéressant de remarquer que le développement des modèles rats a suivi le même décours que celui des modèles souris auparavant, i.e. avec la formation des plaques amyloïdes comme objectif à atteindre. Aucune ou très peu de plaques ne se forment dans les modèles rats précédemment cités. Il faut attendre 2009 pour que Flood et al publient un modèle issu d'un triple croisement pour obtenir des plaques dès 7 mois d'âge[171]. Des défauts comportementaux associés à des déficits électrophysiologiques ont également été observés[172].

3.2.5. Le modèle McGill-R-Thy1-APP

Il s'agit très certainement du modèle rat le plus utilisé de ces dernières années. Publié en 2010, il s'agit d'un rat Wistar avec une APP humaine Swedish sous promoteur Thy-1[173]. Il présente des plaques amyloïdes dès 6 mois ainsi que l'ensemble des caractéristiques classiques qui s'accentuent avec l'âge comme les défauts mnésiques ou la gliose périplaque. De façon intéressante, des différences sur le profil neurochimique ont également été mis en évidence[174].

3.3. Autres modèles d'étude

Les modèles souris et rats sont les plus usuels en laboratoire. Il existe évidemment d'autres modèles, *vivo* comme *vitro*, qui peuvent être utilisés dans le cadre de la MA. Le **primate non-humain** (NHP) est l'espèce la plus proche de l'Homme sur le plan phylogénétique et est particulièrement intéressant dans le sens où le cerveau d'un NHP est, comme celui de l'Homme, permissif à la formation des plaques et tangles, ce qui n'est absolument pas le cas du cerveau d'une souris ou d'un rat. Le **microcèbe** est d'ailleurs un modèle intéressant puisqu'il s'agit d'un NHP avec une durée de vie relativement courte (8-12 ans) dont la petite taille facilite l'hébergement[175,176]. Certains microcèbes âgés développent même des dépôts amyloïdes de façon naturelle[177]. Un modèle **macaque** a également été développé récemment par injection d'oligomères d'Aβ dans les ventricules latéraux entrainant une perte synaptique, une hyperphosphorylation de Tau ainsi qu'une activation astrocytaire et microgliale[178]. L'inconvénient majeur de ces modèles, en dehors du côté éthique, concerne principalement les infrastructures et commodités qu'ils requièrent et qui ne sont que peu ou pas disponible

dans la majorité des laboratoires de recherche. Décrit pour la première fois en 2012, le rongeur **Octodon degus** semble également très intéressant à étudier puisqu'il développe naturellement un « Alzheimer like » avec l'âge. En effet, cet animal présente une augmentation d'Aβ et une hyperphosphorylation de Tau naturelles qui augmentent avec l'âge. De plus, une diminution des marqueurs synaptiques tels que PSD-95, GluR2 ou NR2b, associée à une baisse des capacités cognitives, a également été montrée[179,180]. D'autres modèles plus simples, mais mieux connus génétiquement, sont également utilisés. On peut citer le nématode **Caenorhabditis elegans**[181-183] ou encore la **drosophile**[184-186]. Souvent moins considérés dans les études de ces dernières années sur la MA par rapport aux modèles *vivo*, les **modèles cellulaires** sont également très intéressants et utiles et prennent de plus en plus d'ampleur. Il s'agit de **cultures primaires** provenant soit de modèles animaux, soit de biopsies humaines. Ils sont souvent utilisés pour tester rapidement l'efficacité d'une drogue ou d'un composé[187]. Il est certain que depuis 2006[188], l'engouement pour la reprogrammation cellulaire a beaucoup augmenté. Le domaine de l'Alzheimer n'est pas en reste avec de nombreux répertoires de **cellules souches pluripotentes induites** (iPSCs) provenant de patients Alzheimer[189]. De plus, un système de culture cellulaire en 3 dimensions à partir d'iPSCs provenant de patients Alzheimer a récemment été développé et présente la particularité de permettre la formation de plaques et tangles[190]. L'engouement est donc croissant pour ce type de modèle, mais comme le disait Scott Small à la SFN de Chicago : il faut faire très attention à ne pas avoir trop d'attentes vis à vis de ces modèles cellulaires humains, i.e. ne pas commettre les mêmes erreurs précédemment faites sur les modèles animaux.

Cette description très sommaire des modèles animaux utilisables permet, entre autre chose, de soulever deux questions. La première consiste à se demander comment et pourquoi certains modèles vont développer des perturbations cognitives avant l'apparition des plaques (ex : PDAPP, Tg2576, TgCRND8, Tg6590, etc.), et d'autres après (APP/PS1ΔE9, 5xFAD, APP/PS1 Ki, etc.). Il semble assez évident que globalement, les modèles qui développent des plaques de façon très précoce sont des animaux porteurs de plusieurs mutations. Malheureusement ces modèles font partie des plus utilisés et ont donc, à mon avis, participé à laisser croire au rôle central des plaques amyloïdes comme décrit dans l'hypothèse de la cascade amyloïde version 1992. La deuxième question qui me vient à l'esprit est le rôle de l'APP et les conséquences de sa surexpression. Il est par exemple intéressant de voir que le modèle rat TgAPPswe, qui

d'après les auteurs ne surexprime que très peu d'APP par rapport à un modèle classique et qui ne présente pas de plaque, est meilleur que le rat contrôle dans certaines tâches comportementales. Il y a donc probablement dans les modèles transgéniques usuels une compétition qui s'installe entre une surexpression d'APP et des fonctions physiologiques importantes, et une accumulation d'Aβ toxique, ce qui pourrait expliquer l'apparition de défauts mnésiques « tardifs » dans ces modèles, là ou je les observe précocement dans celui que l'on a développé (voir manuscrit n°1).

4. Le transfert de gènes

Le transfert de gènes consiste à insérer une copie d'un gène choisi dans des cellules vivantes afin d'induire la synthèse du produit de ce gène, i.e. de la protéine d'intérêt. Le gène en question peut être directement micro-injecté dans la cellule (technique habituelle de réalisation des lignées transgéniques), mais il est généralement inséré dans un **vecteur** qui va permettre son entrée dans les cellules ciblées. On peut considérer deux grandes familles de vecteurs que sont les vecteurs non viraux et les vecteurs viraux. Concernant les vecteurs non viraux, ils représentent approximativement ¼ des utilisations du transfert de gènes dans les essais cliniques actuels. Les liposomes, certains polymères ou encore certains peptides sont utilisés comme vecteur mais des problèmes de biodisponibilité, d'efficacité de transfection ou encore de durée d'expression des transgènes sont récurrents. Les vecteurs viraux sont les plus usuels et l'on peut distinguer les vecteurs réplicatifs, qui vont se répliquer de manière autonome, et les vecteurs non réplicatifs qui vont se répliquer dans les cellules exprimant les gènes essentiels à la réplication et qui ont été délétés dans la construction du vecteur. Les **lentivirus** et les virus adéno-associés (**AAV**) sont les deux types classiquement utilisés dans mon institut, je n'ai cependant utilisé que des AAVs durant mon travail de thèse.

4.1. Les vecteurs AAVs

Les virus AAVs sont des petits virus (25 nm) non-enveloppés qui appartiennent à la famille des *Parvoviridae*. Leur manque de pathogénécité et le nombre important de sérotype disponible font partie des critères qui ont permis l'augmentation de leur utilisation ces dernières années en génie génétique[191]. Il s'agit d'un vecteur très intéressant pour le système nerveux central (SNC) puisqu'une simple injection est suffisante pour une expression sur le long terme et qu'il est aussi bien capable d'infecter des cellules quiescentes que des cellules en division[192,193]. Les AAVs sont d'ailleurs actuellement les vecteurs les plus utilisés dans les essais cliniques pour les maladies neurologiques (Abedia). La forme WT de l'AAV contient un ADN simple brin de 5 kb entouré d'une capside. La particularité de ces virus est qu'ils ont besoin d'un autre virus (ex : les adénovirus ou les herpès virus) pour se répliquer. Le premier AAV recombinant (rAAV2) a été généré en 1982 après qu'on ait enlevé 96% du génome viral pour ne garder que les deux séquences inversées répétées (ITRs), rendant ces virus non réplicatifs et donc plus sécurisants[194]. Les ITRs contiennent l'origine de réplication et le signal d'encapsidation et sont donc les seules parties restantes du virus d'origine. Il existe

différents sérotypes d'AAV qui diffèrent par leurs capsides et qui influencent ainsi leur tropisme cellulaire. De plus, l'utilisation de promoteurs permet également d'ajouter une spécificité dans le choix du type cellulaire ciblé. Dans le cadre de mon travail, j'ai utilisé les sérotypes 9 et 10 ainsi que les promoteurs PGK et CAG.

4.2. Injection stéréotaxique des AAVs

Dans le cadre des maladies du SNC, différentes stratégies permettent d'injecter des AAVs. Une injection intraveineuse (IV) fonctionne par exemple très bien avec le sérotype 9 mais uniquement en période néonatale, quand la barrière hémato-encéphalique (BHE) n'est pas encore formée. Dans des souris adultes, le passage de la BHE peut être réalisé à l'aide d'ultrasons. Les injections intrathécales avec les sérotypes 9 et 10 sont quant à elles particulièrement intéressantes pour faire exprimer des protéines sécrétées. La majorité des injections de vecteurs viraux se fait cependant par chirurgie stéréotaxique dans une région cible. Différents sérotypes fonctionnent très bien dans le SNC comme les AAVs de type 2, 5, 9 ou encore 10. Nos vecteurs ont tous été produits à MIRCen par la plateforme dirigée par Alexis Bemelmans et les injections se sont déroulées en confinement de type A2 selon les procédés expérimentaux (anesthésie, titres viraux, etc.) que je détaille dans l'article (voir manuscrit n°1). Les coordonnées stéréotaxiques obtenues à l'aide d'un atlas pour l'hippocampe sont les suivantes (**Figure 23**) :

- antéro-postérieure : -2 mm (souris) / -3,6 mm (rat)
- medio-latérales : ± 1mm (souris) / ± 2,5 mm (rat)
- dorso-ventrale : -2 mm (souris) / -3,3 mm (rat)

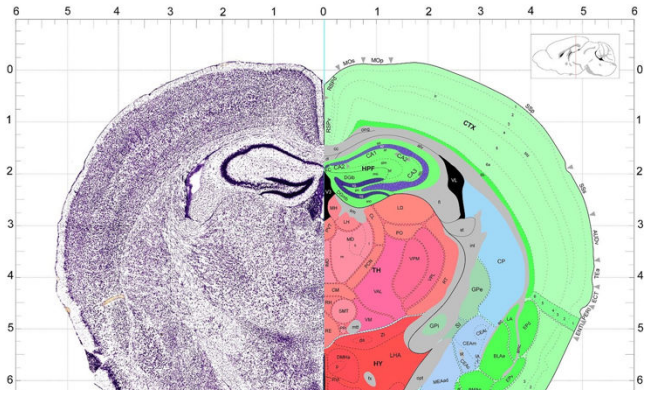


Figure 23 : Représentation d'une coupe coronale d'un cerveau de souris et des coordonnées stéréotaxiques par rapport au Bregma (Allen Brain Atlas)

4.3. Exemples d'utilisation dans le cadre de la MA

4.3.1. Développement de stratégies thérapeutiques

Les deux grands types d'utilisation du transfert de gènes dans la MA concernent le développement de stratégies thérapeutiques et la création de modèles. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé ces deux types d'approches, ce qui est intéressant dans le sens où j'ai finalement utilisé les mêmes outils pour d'un côté « soigner » la maladie, et de l'autre la « recréer ». Je me baserai donc sur l'expérience et les travaux de notre propre équipe pour étayer cette partie. Dans la mise en place de thérapeutiques innovantes sur la MA, trois publications de l'équipe peuvent servir d'exemples. Le travail d'**Eloïse Hudry** a consisté à injecter dans un modèle souris de la MA (APP23) un vecteur viral de type AAV5 codant pour une enzyme, CYP46A1, nécessaire à la transformation du cholestérol cérébral en 24S-hydroxycholestérol et donc à sa dégradation. De nombreux liens existent entre le métabolisme du cholestérol et la MA comme nous l'avons discuté précédemment avec *APOE*. Le transfert du gène *CYP46A1* a ainsi permis d'augmenter le niveau de 24S-hydroxycholestérol et entraîner, par exemple, une baisse du nombre de plaques amyloïdes dans le modèle utilisé[195]. Le même type de stratégie a été utilisée par **Marie-Anne Burlot** mais dans un modèle de tauopathie associée à la MA (THY-Tau22), étude pour laquelle je suis co-auteur de la publication. Ce modèle présente une baisse de CYP46A1 et du 24S-hydroxycholestérol dans l'hippocampe par rapport aux souris contrôles. Leur rétablissement à un niveau normal par injection intrahippocampique du vecteur AAV-CYP46A1 a notamment permis un rétablissement des déficits cognitifs et électrophysiologiques qui caractérisent ce modèle[158]. Un autre exemple pour lequel je suis également co-auteur et qui a été cette fois-ci dirigé par **Romain Fol** est l'utilisation du sAPPα comme stratégie thérapeutique chez un autre modèle de la MA (APPswe/PS1dE9). Nous avons ainsi montré que la surexpression de ce fragment (voir Figure 16) dans un modèle avancé de la MA (étudié à l'âge de 14 mois) permet une diminution de la charge amyloïde et un rétablissement de la plasticité synaptique et des déficits comportementaux[98].

4.3.2. Développement de stratégies de modélisation

Le transfert de gènes à l'aide de vecteurs viraux peut également être utilisé pour modéliser certaines caractéristiques de la MA. Toujours dans le contexte du cholestérol et de l'enzyme CYP46A1, **Fathia Djelti** a par exemple utilisé un AAV codant un ARN interférent

(shCYP46A1) afin d'inhiber la traduction de cette enzyme dans des souris WT. Ceci a pour conséquences une augmentation du cholestérol, ainsi que l'apparition de défauts cognitifs et d'une atrophie hippocampique[196]. Quelques équipes peu nombreuses ont également utilisé les AAVs pour développer de nouveaux modèles de la MA que ce soit chez la souris ou chez le rat en utilisant des vecteurs codant l'APP, la protéine Tau ou encore les protéines de fusion BRI-Aβ que nous avons déjà discutées dans le paragraphe sur les modèles transgéniques[197-199]. Bien que ces modèles n'aient pas été réutilisés par la suite, ils ont tout de même permis de démontrer l'efficacité de ce type de stratégie.

Concernant le côté modélisation, l'intérêt majeur du transfert de gène est selon moi sa flexibilité, que l'on peut grossièrement comparer à la cuisine. On peut en effet modifier à sa guise les vecteurs et transgènes, les injecter dans des régions multiples et choisies et également dans une multitude d'espèces, là où la transgénèse mettrait des années pour être fonctionnelle. Sur le plan thérapeutique maintenant, l'injection de « vecteurs médicaments » a déjà été démontrée et reste pertinente. Pour autant, le transfert de gène sous une autre forme moins invasive qui ne nécessiterait pas d'anesthésie et de chirurgie lourde reste un défi majeur.

Objectifs des travaux de thèse

Mon équipe d'accueil ainsi que l'institut MIRCen au CEA dans lequel j'ai effectué ma thèse utilisent le transfert de gènes pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ainsi que de nouveaux modèles animaux pour des maladies neurodégénératives.
J'ai pendant ma thèse développé et caractérisé une nouvelle stratégie de modélisation basée sur le double transfert des gènes humains mutés APP et PS1 dans l'hippocampe de rongeurs. Nous ne souhaitions pas dupliquer les modèles transgéniques préexistants, mais plutôt utiliser les avantages qu'offre la technologie du transfert de gènes et des vecteurs viraux pour essayer de répondre à différentes demandes de la communauté scientifique :

- développer un modèle *in vivo* exempt des caractéristiques classiques de la MA installée, mais ciblé sur les premières phases qui succèdent au métabolisme de l'APP
- développer un modèle sans surexpression massive de transgènes, i.e. un modèle où l'expression des transgènes est réduite à son minimum et uniquement dans l'hippocampe
- mettre en évidence différents évènements succeptibles de déclencher une perturbation synaptique en l'absence de dépôts amyloïdes
- découvrir de nouveaux biomarqueurs précoces
- utiliser cette stratégie chez d'autres espèces

Nous avons développé une stratégie de modélisation flexible que l'on peut aisément modifier, que ce soit dans l'injection ou dans l'espèce utilisée. Nous souhaitions également nous positionner sur les premières phases de développement de la maladie et donc **venir en complément** des modèles transgéniques, que nous utilisons en routine au laboratoire. Les preuves de concept et de faisabilité de cette stratégie ont été démontrées durant ma première année de thèse chez la souris et ont permis un dépôt de brevet le 5 novembre 2013 sur la stratégie comme sur le modèle (voir Brevet en Annexes). Un premier article a récemment été accepté le 6 janvier 2016 sur notre modèle souris. Nous avons choisi de ne pas rédiger une publication centrée sur le modèle, mais plutôt un article ou ce dernier est utilisé comme un outil pour déterminer les conséquences *in vivo* d'un métabolisme de l'APP proche de la physiopathologie humaine. Pour cela, nous avons effectué une série d'études biochimiques, histologiques, électrophysiologiques, comportementales ainsi que de l'imagerie sur notre modèle souris à 3 mois post-injection. Le deuxième article actuellement en préparation

portera sur le modèle rat où nous proposerons cette fois-ci ce modèle comme un outil d'étude pertinent et caractérisé sur du plus long terme. Nous y ajouterons des arguments en faveur de son utilisation comme avec l'étude du LCR et du plasma. Une des figures présentera également les résultats de différents composés sur ce modèle comme un inhibiteur de Bace1, de ɣ-sécrétase ainsi que la mémantine qui sont actuellement en cours de réalisation. L'ensemble de l'étude est déjà programmée et nous devrions obtenir tous les résultats désirés à la fin du mois d'Avril 2016. Pour ces raisons, le manuscrit n°2 n'est qu'une ébauche non terminée qui me sert à présenter nos premiers résultats et qui sera bien évidemment modifié en totalité. Puisque n'ayant pas encore accès à l'ensemble des données, je ne présenterai pas dans ce manuscrit de discussion des résultats.

Résultats

Article 1

MOLECULAR NEURODEGENERATION

Alzheimer's disease-like APP processing in wild-type mice identifies synaptic defects as initial steps of disease progression

Mickael Audrain[1,2,3], Romain Fol[1,2,3], Patrick Dutar[4,Δ], Brigitte Potier[4,Δ], Jean-Marie Billard[4,Δ], Julien Flament[3,5], Sandro Alves[1,3], Marie-Anne Burlot[1,2,3], Gaelle Dufayet-Chaffaud[1,3], Alexis-Pierre Bemelmans[3,6], Julien Valette[3,6], Philippe Hantraye[3,5,6], Nicole Déglon[7,8], Nathalie Cartier[1,3,*,#], Jérome Braudeau[1,3,*]

Affiliations:

[1]INSERM UMR1169, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay 94100, France

[2]Université Paris Descartes, Paris, France

[3]CEA, DSV, I²BM, MIRCen, Fontenay-aux-Roses 92265, France

[4]INSERM UMR894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[5]INSERM UMS27, Fontenay-aux-Roses 92265, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay 94100, France

[6]CNRS UMR9199, Fontenay-aux-Roses 92265, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay 94100, France

[7]Department of Clinical Neurosciences, Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland

[8]Neuroscience Research Center, Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland

[Δ] These authors contributed equally to this work

* Indicates joint last authors

[#] Corresponding author: nathalie.cartier@inserm.fr

Running title: Early effects of Alzheimer-like APP processing

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) is the most frequent form of dementia in the elderly and no effective treatment is currently available. The mechanisms triggering AD onset and progression are still imperfectly dissected. We aimed at deciphering the modifications occurring in vivo during the very early stages of AD, before the development of amyloid deposits, neurofibrillary tangles, neuronal death and inflammation. Most current AD models based on Amyloid Precursor Protein (APP) overproduction beginning from in utero, to rapidly reproduce the histological and behavioral features of the disease within a few months, are not appropriate to study the early steps of AD development. As a means to mimic in vivo amyloid APP processing closer to the human situation in AD, we used an adeno-associated virus (AAV)-based transfer of human mutant APP and Presenilin 1 (PS1) genes to the hippocampi of two-month-old C57Bl/6J mice to express human APP, without significant overexpression and to specifically induce its amyloid processing.

Results: The human APP, βCTF and Aβ42/40 ratio were similar to those in hippocampal tissues from AD patients. Three months after injection the murine Tau protein was hyperphosphorylated and rapid synaptic failure occurred characterized by decreased levels of both PSD-95 and metabolites related to neuromodulation, on proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS). Astrocytic GLT-1 transporter levels were lower and the tonic glutamatergic current was stronger on electrophysiological recordings of CA1 hippocampal region, revealing the overstimulation of extrasynaptic N-methyl D-aspartate receptor (NMDAR) which precedes the loss of long-term potentiation (LTP). These modifications were associated with early behavioral impairments in the Open-field, Y-maze and Morris Mater Maze tasks.

Conclusions: Altogether, this demonstrates that an AD-like APP processing, yielding to levels of APP, βCTF and Aβ42/Aβ40 ratio similar to those observed in AD patients, are sufficient to rapidly trigger early steps of the amyloidogenic and Tau pathways in vivo. With this strategy, we identified a sequence of early events likely to account for disease onset and described a model that may facilitate efforts to decipher the factors triggering AD and to evaluate early neuroprotective strategies.

Keywords

Alzheimer's disease early stages; Aβ ratio; human samples; animal model; extrasynaptic NMDAR; synaptic failure

Background

Alzheimer's disease (AD) is characterized by amyloid deposits, intracellular neurofibrillary tangles, neuronal loss and a progressive decline in cognitive function [1, 2]. Much progress has been made towards understanding the physiopathology of the disease, mostly through studies of transgenic mice designed to reproduce, as closely as possible, the histological and behavioral features of AD [3, 4].

AD is multifactorial, but the abnormal processing of Amyloid Precursor Protein (APP) is a key element in its development [5]. The physiological functions of APP are unclear, but it has been shown to play crucial roles in spine density, morphology and plasticity [6]. The injection of anti-APP antibodies into the rat brain is known to induce behavioral impairments [7, 8]. Furthermore, APP knockout mice have very low levels of dendritic complexity [9]. Altogether, this suggests that APP has an important physiological role associated with synaptic plasticity as well as trophic properties. Overexpression of wild-type (WT) APP and various mutant forms has been used as a means to model AD in many transgenic mouse lines [10, 11]. In most of these transgenic strains, the significant increase in APP production beginning in utero may trigger consequences that are not likely mimicking the biochemical deficit observed in AD. Interestingly, Saito and coworkers recently described a new APP knock-in model without APP overproduction [12]. This model reproduces the cognitive deficits and amyloid plaques of AD, but unfortunately does not provide information about changes occurring early in the development of the pathology.

If the role of amyloid component is crucial, the role of amyloid plaque deposition in disease development is currently a matter of debate [13]. The presence of plaques is a diagnostic criterion for AD, but several studies have suggested that the accumulation of amyloid deposits may have a protective function [14]. Moreover, an absence of plaque has been reported in patients with familial AD and mutant forms of APP [15], whereas abundant Aβ plaques have been found in brain samples from elderly patients without clinical dementia [16-19]. Plaques appear many years after disease onset and they cannot, therefore, be responsible for the early events in AD development [20]. By contrast, soluble Aβ may play an important role in the synaptic and cognitive impairments observed in the early stages of AD [21]. The use of transgenic models displaying higher levels of APP and cleavage products compared to the human situation and inducing artificial phenotypes in few months is therefore likely to be inappropriate for studies of the initial phases of AD. The levels of Aβ produced in these models are much higher than those observed in patients and may have toxic effects unrelated

to the early phases of AD. In addition, the negative outcomes of recent clinical trials have fueled debate about the validity of overexpression models. Indeed, most of the therapeutic strategies previously tried and largely unsuccessful, have been tested in such transgenic models. There is a growing body of evidence suggesting that amyloid plaques and tangles occur late in disease progression. Therefore, the development of pertinent protective or disease-modifying therapeutic strategies based on the decrease of these markers does not seem to fit well [22, 23]. These compelling observations demonstrate the need to develop new alternative models of AD more closely mimicking the human disease and in particular the early events in its development.

The present study is an attempt at developing such an alternative model involving the production, in vivo, in the mouse hippocampus, of moderate levels of amyloid derivatives, resembling as closely as possible the pattern of expression observed in the hippocampus of human AD patients to study the consequences of initial amyloid pathway engagement. We used this modelling strategy to analyze the events potentially contributing to AD development before the appearance of late hallmarks of the disease, such as amyloid deposits, neurofibrillary tangles and neuronal death. The injection of AAV vectors carrying mutated forms of human APP and PS1 into the mouse hippocampus led to the stable production [24, 25] of APP, βCTF and Aβ peptides, at levels similar to those observed in the hippocampus from AD patients and significantly lower than those present in the hippocampus of APP/PS1ΔE9 transgenic mice. The data generated demonstrate the importance of the Aβ42/Aβ40 ratio, which has already been identified as a relevant biomarker in AD patients [26], together with early changes in synaptic functions, Tau phosphorylation and cognitive deficits. These modifications were observed in the absence of plaque formation, or any sign of inflammation, atrophy and/or neuronal death. They were nevertheless capable of inducing cellular changes, such as the abnormal activation of extrasynaptic NMDARs and a decrease in the levels of neuromodulation-associated metabolites, causing memory impairment. These results suggest that APP processing in a limited number of neurons, as recently observed in sporadic forms of AD [27], may be sufficient to trigger an impairment of hippocampal-dependent behavior.

Results

Injections of the AAV-APP and AAV-PS1 vectors lead to APP and PS1 transgenes expression in the hippocampus of wild-type mice, from one month after injection

We generated AAV vectors encoding human mutant full-length PS1M146L and human mutant APPSL. These vectors were injected bilaterally into the stratum lacunosum of the hippocampus of eight-week-old C57BL/6J mice. We used the AAVrh.10 capsid, which is known to transduce the central nervous system and the hippocampus efficiently [28]. We studied four groups of animals: non-injected wild-type mice (non-injected WT mice), mice receiving the AAV-CAG-PS1M146L vector (AAV-PS1 mice), mice receiving the AAV-CAG-APPSL vector (AAV-APP mice) and mice receiving a co-injection of both vectors (AAV-APP/PS1 mice, Fig. 1A). To monitor vector-mediated APP and PS1 expression, mice were killed one month after injection. Western blot analysis of whole hippocampus revealed comparable full-length PS1 (PS1 FL) expression in the four groups, despite a trend to increase in AAV-PS1 and AVV-APP/PS1 mice (Fig. 1B,C). Interestingly, 30kDa PS1 N-terminal fragment (PS1 NTF) was mainly detectable in AAV-PS1 and AAV-APP/PS1 hippocampi (Fig. 1B,D). This PS1 NTF production confirms the endoproteolysis of exogenous PS1 FL which is essential for the formation of the PS1 active site responsible for the formation the Aβ species [29]. AAV-APP and AAV-APP/PS1 mice showed exogenous human APP expression with higher amount in the AAV-APP mice hippocampi (6E10 antibody, Fig. 1B,E). By contrast, the total amount of APP (exogenous human + endogenous murine forms, APP C-ter antibody) did not differ significantly between non-injected WT, AAV-PS1 and AAV-APP/PS1 mice (Fig. 1B,F). Immunohistochemical analyses of hippocampal sections using an APP C-ter antibody revealed a noticeable overexpression of APP only in the AAV-APP mice and observed in the CA2 layer and in the subiculum subfield of the hippocampus (Fig. 1G). Consistent with the result on total APP expression (see Fig. 1F), the human APP expression in the AAV-APP/PS1 group (see Fig. 1E) was not sufficient to be detected by immunohistochemistry. Double-immunostaining with the NeuN antibody confirmed that essentially neurons were transduced by the vectors. No transduction of astrocytes or microglia was observed (data not shown). Analysis of serial anteroposterior coronal sections demonstrated widespread APP C-ter immunoreactivity in the hippocampus from -0.94 mm to -2.46 mm from the Bregma (Fig. 1H-L). Subcellular clustering of human APP was observed in transduced neurons (Fig. 1M). By contrast, staining with the 4G8 antibody, which detects

both APP full length and Aβ, yielded a diffuse signal from the intracellular compartment and extracellular medium, suggesting that APP or its cleavage products like Aβ species, may diffuse out of the transduced cells into the adjacent parenchymal space (Fig. 1M).

Amyloidogenic processing of human APP in AAV-APP/PS1 mice promotes Tau phosphorylation, 3 months after injection

To confirm the production of human Aβ, we evaluated the processing of human APP in non-injected WT, AAV-PS1, AAV-APP and AAV-APP/PS1 mice three months after vector injection. βCTF, the first cleavage product of the amyloidogenic pathway [30] was quantified by ELISA (Fig. 2A). AAV-APP mice produced larger amounts of human βCTF than non-injected WT, AAV-PS1 and also AAV-APP/PS1 mice ($p=0.045$). We then quantified the production of the sAPPβ fragment, which is also produced by Bace1 activity, and found a linear relationship between the levels of this fragment and βCTF production (Fig. 2B; Spearman correlation test, $r^2=0.85$, $p=0.0034$). Next, we evaluated Bace1 levels and activity. We did not observe any modification between the four groups (data not shown). As observed for the human βCTF, no human Aβ42 was detected in non-injected WT and AAV-PS1 mice. Interestingly, larger amounts of Aβ42 were detected in AAV-APP/PS1 mice than in AAV-APP mice (Fig. 2C), and there was an inverse correlation between βCTF and Aβ42 levels between AAV-APP and AAV-APP/PS1 mice (Fig. 2D; Spearman correlation test, $r^2=0.65$, $p=0.03$). These results suggest that, in AAV-APP/PS1 mice, human βCTF is cleaved by the exogenous PS1 to produce larger amounts of Aβ42 peptide. This production/diffusion was restricted to the hippocampus and was not observe in cortical areas (data not shown). We then investigated the ratios of the amounts of the various Aβ species. Aβ42/Aβ40 and Aβ42/Aβ38 ratios were significantly higher in AAV-APP/PS1 compared to AAV-APP mice (Fig. 2E,F; $p<0.001$). Despite production of both Aβ42 and Aβ40, no amyloid deposit was detected in the cortex and hippocampus of AAV-PS1, AAV-APP or AAV-APP/PS1 mice by staining with either Thioflavin S, Congo red or other amyloid antibodies (data not shown). We also carried out immunostaining for GFAP and Iba1 to analyze the potential astrocytic (GFAP) and microglial (Iba1) responses induced by amyloid APP processing. No recruitment of astrocytes or microglia, or change in cellular morphology suggestive of activation process was observed three months after injection (data not shown). We then investigated the potential impact of the amyloidogenic pathway on phosphorylation of the endogenous Tau protein. ELISA (AT270, Thr181) demonstrated significant increase in Tau phosphorylation in AAV-APP/PS1 mice

three months after injection compared to non-injected WT, AAV-PS1 and AAV-APP mice (Fig. 2G; p=0.04). By contrast, no modification of total Tau amount was observed in these four groups suggesting a modification of Tau kinase/phosphatase balance in AAV-APP/PS1 mice (Fig. 2H).

Similar levels of human APP and amyloid derivatives are observed in the hippocampus of AAV-APP/PS1 mice and AD patients

We compared the levels of APP and amyloid derivatives in non-injected WT, AAV-PS1, AAV-APP and AAV-APP/PS1 mice (3 months after injection i.e. in five-month-old mice) with those present in the hippocampus of human controls and AD patients (five age-matched controls + five AD Braak 6 / Thal 5 patients) and in APP/PS1ΔE9 transgenic mice [31]. Human APP content was found to be lower in AD cases than in age-matched controls, even after normalization for neuronal NeuN marker expression (p=0.03), suggesting a higher rate of APP processing in sporadic forms of AD (Fig. 3A,B; Supplementary Fig. 1). The amount of human APP present in the hippocampus of AAV-APP/PS1 mice was similar to that observed in the hippocampus of AD patients. By contrast, much larger amounts of human APP were found in five-month-old APP/PS1ΔE9 mice (Fig. 3A,B, p<0.0001). Interestingly, total amount of APP was not significantly modified by virus injection compared to non-injected WT mice and in contrast to 5 months old APP/PS1ΔE9 who displayed a two-fold accumulation (p=0.0011, Fig. 3C,D). We then evaluated metabolites released by the amyloidogenic pathway into the hippocampus of mice receiving AAV injections and compared it to those found in APP/PS1ΔE9 transgenic mice at different ages and human AD patients. We used 14 and 16-month-old APP/PS1ΔE9 mice because we detected behavioral deficits in these mice from 14-month-old of age (internal data). βCTF levels which tend to increase in AD patients compared to human controls, were similar in AAV-APP/PS1 mice and in AD patients. Interestingly, these levels were significantly lower compared to both 14 and 16-month-old APP/PS1ΔE9 mice (Fig. 4A; p<0.0001). In AAV-APP/PS1 injected mice, a tendency towards larger amounts of Aβ42 than in human controls was observed, but Aβ42 levels were lower than those in patients with advanced AD and APP/PS1ΔE9 mice at 5 months of age (Fig. 4B). Furthermore, Aβ40 levels were significantly higher in APP/PS1ΔE9 mice compared to other groups and increased with aging in these animals (Fig. 4C). Numerous studies have established the ratio of Aß42 to Aß40 as an important factor in determining the toxicity of Aβ in vivo [32]. We confirmed that Aβ42/Aβ40 ratios were

significantly different between human controls and AD patients (Fig. 4D). Interestingly, these ratios were similar between AD patients and AAV-APP/PS1 mice, but significantly different in APP/PS1ΔE9 mice, which had a particularly low Aβ42/Aβ40 ratio. Together, these results indicate that co- injection of the AAV-APP and AAV-PS1 vectors into the hippocampus of normal mice leads to an overall pattern of amyloid processing close to that observed in the hippocampus of AD patients and contrasts to that of APP/PS1ΔE9 mice. Based on results obtained during analysis of APP processing and because AAV-PS1 mice and non-injected WT mice appeared similar in all analyses (see Fig. 1-4), we decided to use AAV-PS1 mice as an injected control group for further characterizations.

NMR spectroscopy shows changes to the neurochemical profile of the hippocampus in AAV-APP/PS1 mice

Proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) has been shown to detect modifications in AD patients [33]. Using a 11.7 T scanner, we acquired 1H-MRS spectra in vivo from the right and left hippocampi of AAV-PS1 and AAV-APP/PS1 mice, three months after injection, to evaluate the early consequences of APP processing on hippocampal metabolites. We determined the concentrations of seven metabolites from spectra: GABA, glutamine (Gln), glutamate (Glu), taurine (T), N-acetyl-aspartate + N-acetyl-aspartyl-glutamate (tNAA), myo-inositol (Ins) and glycerophosphocholine + phosphocholine + choline (tCho). Macromolecules and lipids were not included in the study and the values obtained were expressed as ratios relative to creatine + phosphocreatine (tCr) (Fig. 5A). A two-way Anova with repeated measure revealed a group effect ($p=0.04$). The concentration values obtained were generally lower in AAV-APP/PS1 than in AAV-PS1 mice, in absence of significant individual difference for each metabolite (Group x Metabolite interaction effect ($p=0.13$)). Among studied metabolites, levels of metabolites related to neuromodulation (GABA, Gln, Glu, T and tNAA) were globally lower in AAV-APP-PS1 mice (Fig. 5B, group effect: $p=0.002$). By contrast, metabolites not associated with neuromodulation (Ins, tCho) were not affected by co-injection of the AAV-APP and AAV-PS1 vectors. These results suggest that there is a decrease in the global pool of metabolites involved in neurotransmission processes in AAV-APP-PS1 mice. They also rule out the possibility of a single metabolite being entirely responsible for changes, at this stage and in this model. In this way, the absence of increased concentration of glutamate excluded glutamate induced excitotoxicity.

AAV-APP/PS1 mice present early extrasynaptic deficits

A loss of synaptic contacts in the hippocampus is one of the major early neuropathological findings in AD patients [34]. Moreover, deficiencies in glutamate transport have been shown to be associated with AD [35]. We assessed the functionality of glutamatergic synapses by electrophysiological analyses on hippocampal slices. The long-term potentiation (LTP) of glutamate synaptic transmission was first evaluated in mice three months after injection. A trend towards a decrease in LTP expression following high-frequency stimulation but not theta burst stimulation was found to be linked to the co-expression of APPSL and PS1M146L (Fig. 5C; p=0.11). Beside, we recorded the tonic current generated in CA1 pyramidal cells by the ambient levels of glutamate acting on extrasynaptic NMDA receptors (NMDAR). The amplitude of the tonic current was significantly greater in the AAV-APP/PS1 mice and characterized by a significant dispersion of current amplitude suggesting greater disorganization of the synapse in this population than in the more homogeneous AAV-PS1 or AAV-APP mouse groups (Fig. 5D). Indeed, no difference was observed between the AAV-PS1 and AAV-APP groups (Supplementary Fig. 2). Synaptic dysfunction occurs early in AD [34] and brains of AD patients have been shown to contain abnormally low levels of synaptic proteins [36]. We compared the levels of the PSD-95 and synaptophysin synaptic markers in the hippocampus of AAV-PS1 and AAV-APP/PS1 mice. PSD-95 levels were significantly lower in AAV-APP/PS1 than AAV-PS1 mice (p=0.007), while synaptophysin was not modified (Fig. 5E,F). Next we investigated the contribution of extrasynaptic glutamate receptor uptake further, by assessing the expression of two astrocytic glutamate transporters, GLT-1 and GLAST. AAV-APP/PS1 mice were found to have significantly lower levels of GLT-1 (p=0.003), with no difference in GLAST levels (Fig. 5G,H).

AAV-APP/PS1 mice develop early cognitive deficits

Most transgenic mouse models of AD reproduce cognitive impairments relevant to the human disease. In most of these models, progressive deficits are associated with excessive Aβ production at an advanced age [3]. We evaluated weather moderate amyloid production in AAV-APP-PS1 mice could be associated with early cognitive dysfunctions. We used AAV-PS1 as control group since previous studies demonstrated that mutant PS1 overexpression in mouse hippocampus did not induce cognitive abnormalities in Morris Water Maze [37] nor in

Y-Maze tasks [38], and APP processing profile was similar in WT animals and AAV-PS1 animals (see Fig. 1-4).

In the Open-field task a decreased distance travelled across time suggests habituation to the novel environment as classically described [39]. Distance travelled during task was similar between AAV-PS1 and AAV-APP/PS1 mice confirming no motor abnormality in our experimental AD mouse model (Fig. 6A). Interestingly, AAV-APP/PS1 mice displayed a much higher periphery/center ratio than AAV-PS1 mice. This difference in behavior may either reflect changes in emotional behavior when faced to a new environment or an increase in anxiety (Fig. 6B; p=0.02). Similarly to Open-field, both groups showed habituation during the Ymaze task, confirmed by a decrease of distance travelled across time (Fig. 6C). No motor impairment was observed in AAV-PS1 and AAV-APP/PS1 mice. Furthermore, a trend towards short term memory impairment was observed in AAV-APP/PS1 mice that spent less time than AAV-PS1 mice exploring the new arm of the maze (Fig. 6D; p=0.08). Finally, we assessed spatial learning and memory, using the Morris Water Maze task. The travelled distance to find the hidden platform was not different between both groups over time (Fig. 6E) with no difference during this learning phase (data not shown). Interestingly, AAV-PS1 mice spent longer in the target quadrant than AAV-APP/PS1 mice (Fig. 5F,G) in both the four-hour (p=0.054) and the 72-hour (p=0.0085) probe tests indicating an alteration in memory retention in AAV-APP/PS1 mice. Thus, AAV-PS1 mice displayed a spatial bias in the target quadrant during both the 4-hour (target quadrant TQ vs. mean of other quadrants OQ; p=0.031) and 72-hour (TQ vs. OQ; p=0.023) probe tests, confirming their preserved spatial memory. By contrast, AAV-APP/PS1 mice did not spend more time in the target quadrant in either the four-hour (TQ vs. OQ; p=0.06) or the 72-hour (TQ vs. OQ; p=0.69) probe trial, confirming an absence of efficient memorization of platform position. These data suggest that co-injection of both vectors triggers detectable memory impairment as soon as three months after injection.

Discussion

Alzheimer's disease (AD) is a complex condition. To improve our understanding of the physiopathology of the disease and design new therapeutic strategies, it is crucial to get access to the initial phases of its development. We aimed at recapitulating in vivo key features that are suspected to account for triggering AD, more specifically an increased Aβ42/Aβ40 ratio, while avoiding major APP overexpression. The importance of the Aβ ratio in the disease onset above their absolute levels has been already proposed [40] and the absence of APP overproduction is increasingly being recognized as an important factor to take into account when modeling AD [12]. Towards this goal, we developed an alternative approach to existing models, involving a single co-administration of two AAV vectors encoding human mutated APP (APPsl) and PS1 (PS1M146L) in adult wild-type mice hippocampi.

Transgenic mice expressing WT form of the 695-amino acid isoform of APP do not develop AD-like phenotype nor behavioral impairment [41, 42] in contrast to APP751 transgenic mice which have strong learning deficits at 12 months of age [11]. Therefore, the APP751 isoform seems more interesting to trigger an AD-like phenotype. In order to specifically enhance amyloidogenic APP processing, we decided to express the APP751 isoform including the Swedish and London mutations [43]. We simultaneously expressed PS1 with the M146L mutation to increase the specificity of the 42-specific γ-secretase cleavage [44]. Thus, the co-expression of PS1 (PS1M146L) with APP751SL resulted in an increased production of Aβ with an Aβ42/Aβ40 ratio similar to the one observed in AD patients. Interestingly, increase of APP cleavage products was not associated with amyloid deposition, neurofibrillary tangles and neuronal loss.

AAV-APP/PS1 mice display cognitive impairment as early as three months post-injection. These memory deficiencies reflect a global impairment of neuronal activity, as suggested by 1H-MRS, showing the levels of metabolites related to neurotransmission expressed in the hippocampus globally reduced. These result highlights that there is an early response of neurons to the APP processing affecting their functionality.

To get further insight in the understanding of this neuronal dysfunction, we used electrophysiological recordings on the CA1 layer to characterize synaptic consequences of moderate soluble Aβ42 production. We observed an enhancement of the tonic glutamatergic current generated in CA1 pyramidal cells of AAV-APP/PS1 mice. Two types of N-methyl D-aspartate receptors (NMDARs) have been described (synaptic and extrasynaptic), the tonic current resulting mostly from the activation of the extrasynaptic subgroup, stimulated by

ambient glutamate present outside the synaptic cleft [45, 46]. As we did not observe an increase of glutamate synthesis by 1H-MRS, the higher tonic current observed in AAV-APP/PS1 mice may reflect the accumulation of glutamate in the extrasynaptic space. There are two possible explanations for this possible accumulation. First, lower levels of glutamate transporters, such as GLT-1, may result in weaker levels of glutamate uptake by astrocytes [35]. Second, lower levels of scaffolding proteins, such as PSD-95, may lead to the internalization of synaptic NMDARs, resulting in the preferential activation of extrasynaptic ones [47]. AAV-APP/PS1 mice display these features since they express significantly lower levels of GLT-1 and PSD-95. No decrease of GLAST, the second most important glutamate transporter, was observed which might suggest that GLAST expression could be decreased later in the course of the disease [48]. This hypothesis is not surprising, in light of published data about GLT-1 and PSD-95 dysfunctions, which may play an important role in synaptic dysfunction and, thus, in the pathogenesis of AD [49, 50]. To our knowledge, we show for the first time that an impairment of the extrasynaptic compartment could precede sustained alterations of the synaptic compartment associated with LTP deficits, during the early stage of AD progression. We also showed that a subtle loss of neuronal integrity in the hippocampus is sufficient to trigger deleterious effects before actual neuronal death occurs. Despite diffusion properties of Aβ42 [51], no amyloid peptide have been detected outside the hippocampus excluding an Aβ42 direct effect far from its hippocampal production area. By contrast, Aβ altered hippocampus functions could lead to a less efficient communication between hippocampal neurons and connected structures especially cortex and amygdala. This network dysfunction could be responsible of cognitive modifications especially during memory formation [52, 53] or emotional behaviors [54].

In addition to these consequences, AAV-APP/PS1 mice displayed higher levels of Tau phosphorylation (thr181, AT270 antibody) compared to the other groups. It has been reported that soluble Aβ and extrasynaptic NMDAR activation contribute to Tau protein phosphorylation [55, 56]. Our results are consistent with these previous reports. The pattern of Tau phosphorylation was shown to be correlated with the multiple steps of neurofibrillary tangle development [57]. Thr181 immunoreactivity is detected earlier than thr212/Ser214 (AT100 antibody) or ser199/ser202/thr205 (AT8 antibody) immunoreactivity. We could not detect some AT8 or AT100 positive cells (data not shown), suggesting that the modifications observed in AAV-APP/PS1 mice might be compared to early phases of AD in humans. These data suggest that the moderate AD-like APP processing engagement observed in AAV-APP/PS1 mice is sufficient to trigger the Tau pathway engagement.

A particular feature in our experimental strategy is the localized production of human APP and its cleavage products. Contrasting with the ubiquitous overproduction of human APP in mouse transgenic lines, injection of AAV-APP and AAV-PS1 vectors in the stratum lacunosum moleculare region, leads to the transduction of neurons in restricted regions of the hippocampus (CA2 and the subiculum). Interestingly, this pattern of expression may mimic the genomic mosaicism recently described in AD, in which an increase in copy number was observed for the APP gene in a limited number of neurons, in sporadic forms of AD [27]. The presence of rare neurons with APP amplification may be sufficient to trigger a dysregulation of APP processing with aging. Our findings also point to this direction. The second particular feature in our experimental design is the co-injection of the PS1 vector. Indeed, we demonstrated that AAV-APP injection alone was not sufficient to induce hippocampal alteration. Thus, despite the production of βCTF, Aβ40 and Aβ42 in AAV-APP mouse hippocampus, no change in the levels of phosphorylated Tau, PSD-95, GLT-1 or tonic current were observed, compared to the AAV-APP/PS1 group. There are two possible reasons for this difference between the AAV-APP and AAV-APP/PS1 groups. First, APP acts as a trophic factor [58] and an increase in the levels of this molecule may increase neuron viability [59], countering Aβ toxicity. Second, the Aβ42/Aβ40 ratios in the AAV-APP/PS1 group were highly similar to those found in AD patients and different from those of the AAV-APP group or human controls.

Our data raise several questions. This configuration, with no plaque nor tangle and with levels of APP cleavage products close to the human hippocampal condition, is sufficient to induce cognitive impairment three months after injection. It takes about 13 months to obtain an equivalent defect in APP/PS1ΔE9 mice [60]. This delayed cognitive impairment may result from the trophic roles of APP and the low Aβ42/Aβ40 ratio observed in 5- to 16-month-old APP/PS1ΔE9 mice. These findings confirm the greater importance of the Aβ ratio rather than the absolute amounts of Aβ42 and Aβ40 [40] to induce synaptic and extrasynaptic impairments. Finally, neurons may become brittle, leading to cognitive impairments, with defects in emotional behavior and long-term memory.

Conclusions

This study reports the development of a novel mouse model focusing on the early consequences of the amyloid processing of APP with similarities to human AD cases. Our results support the importance of the Aβ42/Aβ40 ratio to trigger initial neuronal dysfunctions in vivo. All mechanisms described here are consistent with memory impairments in the earliest stages of the clinical disease beginning with subtle changes in the efficacy of hippocampal synapses, before amyloid deposition and neuronal loss. It appears that minimal dysregulation of amyloidogenic pathway is sufficient to set up synaptic, and notably extrasynaptic dysfunctions, potential first step towards the full AD phenotype. Using animal models closely mimicking the human disease in terms of APP and APP cleavage products and focusing on early stages of AD development may increase our understanding of disease onset. This model may ultimately make it possible to identify early biomarkers of AD while evaluating relevant neuroprotective therapeutic strategies.

Materials & Methods

Plasmid design and vector production

We used a double-mutant human APP751 cDNA containing the Swedish and London mutations (codon optimized and containing a Kozak sequence; GeneArt, Life Technologies, Saint Aubin, France), and a human PS1 cDNA containing the M146L mutation (pENTR4-PS1-S182M146L). The APPSL and PS1M146L sequences were cloned in an AAV2 plasmid with CAG promoter to generate the AAV2-CAG-APPSL or -CAG-PS1M146L. AAV vectors were produced as previously described [61], except that the AAV packaging plasmid was replaced with a plasmid construct containing the rep gene of AAV2 and the cap gene of AAVrh10.

Human brain samples

Postmortem samples were obtained from brains collected as part of the Brain Donation Program of the GIE-Neuro-CEB Brain Bank. Autopsies were carried out by accredited pathologists, after informed consent had been obtained from the relatives, in accordance with French Bioethics laws. Five hippocampal samples from five patients with sporadic forms of AD (male and female; Braak 6 Thal 5; aged between 69 and 89 years, with a postmortem interval (PMI) of 30 to 59 hours) and five hippocampus samples from five age-matched control subjects (male and female, aged between 69 and 92 years, PMI of 6 to 63 hours) were used in this study.

Animals

We used 90 male C57Bl/6j mice (eight-week-old; SARL JanvierLabs, Le Genest Saint Isle, France) and 19 male APP/PS1ΔE9 mice [31]. All experiments were conducted in accordance with ethical standards and French and European regulations (Directive 2010/63/EU).

Stereotactic injections of AAVs

Mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (0.1/0.05 g/kg body weight) and placed in a stereotactic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Stereotactic intracerebral injections of AAVs into the hippocampi of both hemispheres were performed, using the following coordinates: antero-posterior: -2 mm, lateral: ± 1 mm, ventral: -2 mm

relative to bregma. We injected 2 µl of viral preparation into each site (5 x 108 vg/site and 109 vg/site for AAV-PS1 and AAV-APP vectors, respectively) at a rate of 0.2 µl/minute. Four groups were designed, a non-injected wild-type (non-injected WT mice) and three injected groups: AAV-CAG-PS1M146L (AAV-PS1 mice), AAV-CAG-APPSL (AAV-APP mice), AVV-CAG-APPSL + AAV10-CAG-PS1M146L (AAV-APP/PS1 mice).

Tissue collection and sample preparation

Mice were anesthetized with ketamine/xylazine and transcardially perfused with 20 ml ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). One hemisphere was post-fixed by incubation for 48 h in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose in PBS and cut into 40 µm sections with a freezing microtome (Leica) for histological analyses. The contralateral hemisphere was dissected for isolation of the hippocampus and cortex. Samples were homogenized in a lysis buffer (150 mM NaCl and 1% Triton in Tris-buffered saline, referenced as TBS-Tx) containing phosphatase (Pierce) and protease (Roche) inhibitors and centrifuged for 20 minutes at 15000 g. The same procedure was applied to human samples (GIE NeuroCEB Brain Bank).

ELISA

The Aβ extracted was quantified with the MSD Human Aβ42 V-PLEX Kit and the triplex Aβ Peptide Panel 1 (6E10) V-PLEX Kit (Meso Scale Diagnostics, Rockville, USA). βCTF was determined with the IBL Human APP βCTF Assay Kit (IBL International GmbH, Hamburg, Germany). Hyperphosphorylated Tau was determined with the Innogenetics Phospho-Tau 181P kit (Fujirebio Europe, Ghent, Belgium). sAPPβ was determined with the MSD sAPPalpha/sAPPbeta Kit. ELISA was performed according to the kit manufacturer's instructions in each case.

Western blotting

Equal amounts of protein (30 µg) were separated by electrophoresis in NuPAGE Bis-Tris Gels (Life Technologies) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were hybridized with various primary antibodies (APP 6E10, 1/500, Covance; PS1, 1/1000, Millipore; APP C-ter, 1/500, Millipore; Actin, 1/2000, Abcam; GAPDH, 1/1000 Abcam; Total Tau, 1/1000, Santa Cruz; PSD-95, Invitrogen, 1/2000; Synaptophysin, Santa Cruz,

1/200; GAD65, Abcam, 1/2000; GLT-1, 1/1000, Frontier Science; GLAST, 1/1000, Frontier Science; NeuN, Millipore, 1/1000). Various secondary antibodies was also used (ECL Anti-rabbit Horseradish Peroxidase linked, 1/2000, GE Healthcare; ECL Anti-mouse Horseradish Peroxidase linked, 1/2000, GE Healthcare; ECL Anti-rat Horseradish Peroxidase linked, 1/2000, GE Healthcare).

Immunohistochemistry and image acquisition

Cryosections were washed with 0.25% Triton in PBS and saturated by incubation (0.25% Triton in PBS / 5% goat serum). They were then incubated with primary antibodies (APP C-ter, 1/500, Millipore; NeuN-Biotin, 1/1000, Millipore; 4G8-Biotin, 1/1000, Covance). Images were taken with a Nikon Eclipse Ti Microscope or a Leica TCS SP8 confocal microscope and analyzed with ImageJ software (NIH).

Behavioral assessment

Open-field. The apparatus consisted of an open-topped, clear Plexiglas box measuring 50 x 50 x 38 cm placed in a room with controlled dim lighting (25 lux) and constant white noise at 60 dB. The mice were placed in the center of the arena and a video recording was made over a period of five minutes. The behavior of the animals was analyzed from this video. The arena was divided into a central region (20 x 20 cm) and a peripheral region, and the time spent in the center and periphery of the open field was measured. The ratio of time spent in the periphery to that spent in the center was calculated as an index of emotional behavior.

Ymaze. The apparatus consisted of three identical arms separated by 120°. Each arm of the Y maze was 37 cm long, and 8 cm wide, with 12.5 cm-high opaque walls. Various extra maze cues were placed on the surrounding walls. One arm of the Y-maze was blocked and the subject was allowed to explore the other two arms for 10 minutes. The starting position was varied pseudorandomly, between the three arms. The animal was then returned to its home cage. Fifteen minutes later, the mouse was placed in the maze again, this time with all three arms open, and allowed to explore for an additional five minutes. The distance traveled and the number of times the mouse entered each arm were measured both during initial exposure to the maze and during testing.

Morris Water Maze. Experiments were performed in a tank 120 cm in diameter and 50 cm deep, filled with opacified water kept at 21°C and equipped with a platform 10 cm in

diameter, kept submerged 1 cm below the surface of the water. Visual clues were positioned around the pool, to provide the mouse with spatial landmarks, and luminosity was maintained at 350 lux. The mice were initially exposed to a learning phase, which consisted of daily sessions (three trials per session) on five consecutive days. The starting position was varied pseudorandomly, between the four cardinal points. A mean interval of 15 minutes was left between trials. The trial was considered to have ended when the animal reached the platform. A 60-second cutoff was used, after which the mice were gently guided to the platform. Once on the platform, the animals were allowed to rest for 30 seconds before being returned to their cage. Long-term spatial memory was assessed 72 hours after the last training trial (fifth day), in a probe trial in which the platform was no longer available. Animals were monitored with ANY-maze video tracking software (Stoelting Co, Wood Dale, USA).

Ex vivo electrophysiology

Mice were anesthetized with halothane and decapitated. The brain was rapidly removed from the skull and placed in chilled (0-3°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing 124 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.5 mM MgSO4, 2.5 mM CaCl2, 26.2 mM NaHCO3, 1.2 mM NaH2PO4, 11 mM glucose. Transverse slices (300-400 µm thick) were cut with a vibratome and placed in ACSF in a holding chamber, at 27°C, for at least one hour before recording. Each slice was individually transferred to a submersion-type recording chamber and submerged in ACSF continuously superfused and equilibrated with 95% O2, 5% CO2.
The biophysical properties of the tonic current generated by the activation of extrasynaptic NMDA receptors with ambient glutamate were evaluated. Whole-cell patch-clamp recordings of CA1 pyramidal cells were performed at room temperature, with borosilicate patch pipettes (5 MΩ) filled with 140 mM CsCH4O3S, 6 mM CsCl, 2 mM MgCl2, 10 mM HEPES, 1.1 mM EGTA, 5 mM QX-314 5, 4 mM ATP, (pH 7.3; 290 mosm). Transmembrane currents were acquired and filtered through an amplifier (AxoPatch 1-D, Axon Instruments), stored on a computer and digitized with WinLTP software for analysis [62]. The tonic current was recorded at a holding potential of +40 mV, in the presence of TTX (1 µM), NBQX (10 µM), and bicuculline (10 µM), to isolate the NMDA component of the holding current (hc). After the recording of a stable control hc for three to five minutes, APV (50 µM) was added to the superfusion medium. The hc fell to a new stable value under the effect of APV, and the difference between the control hc and that recorded in the presence of APV determined the amplitude of the tonic current.

Two kinds of electrically induced long-term potentiation (LTP) were studied: a strong, saturating LTP consisting of 3x100 Hz (3x 100 pulses, 1 s, with 20 s between pulses), and a weaker stimulation, theta-burst stimulation (TBS), mimicking the natural stimulation at the theta frequency from the medial septum to the hippocampus, consisting of five trains of four 100 Hz pulses each, separated by 200 ms and delivered at the test intensity. The sequence was repeated three times, with an interburst interval of 10s. Testing with a single pulse was resumed for 60 min (TBS) or 75 min (3x100 Hz), to determine the level of LTP.

Proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS)

Magnetic Resonance Imaging and Magnetic Resonance Spectroscopy were performed with a horizontal 11.7 T scanner (Bruker, Ettlingen, Germany) and a quadrature cryoprobe was used for radiofrequency transmission and reception. A 37.4 µl voxel (7.2 × 2 × 2.6 mm3) was placed over both hemispheres, such that it contained essentially hippocampal tissue (Fig. 5), and the signal of this voxel was then averaged over 10 minutes. T2-weighted images were acquired with a 2D TurboRARE sequence (80 × 80 µm² in-plane resolution, and 300 µm slice thickness) and manually segmented to measure hippocampal volume. 1H-MRS acquisitions were performed with a LASER sequence, with echo time (TE)/repetition time (TR) = 20/5000 ms and a 10 kHz bandwidth for the hyperbolic secant pulses. LCModel was used to determine metabolite concentrations. The macromolecule (MM) spectrum of a control mouse was determined by metabolite nulling and included in the base set for LCModel. The following metabolites were systematically quantified (Cramér-Rao lower limits <5% in all experiments): total choline (glycerophosphocholine + phosphocholine + choline, tCho), total creatine (creatine + phosphocreatine, tCr), glutamate (Glu), glutamine (Gln), myo-inositol (Ins), N-acetyl-aspartate + N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAA+NAAG, tNAA), taurine (T) and γ-aminobutyric acid (GABA). Metabolite concentrations were normalized with respect to 8 mM tCr.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) or Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) software. One-way ANOVA and Tukey's post-hoc test were used to determine the significance of differences between groups. Student's t test was used when only two groups

were analyzed (AAV-PS1 vs AAV-APP/PS1), except for tonic glutamatergic current recording, for which Chi^2 tests were used. Two-way ANOVA with repeated measure using Group and Metabolite as effect factors, was used for NMR spectroscopy analysis.

Abbreviations

AAV=Adeno-associated virus; Aβ=β-amyloid peptide; AD=Alzheimer's disease; APP=amyloid precurosor protein; βCTF=β-carboxy-terminal fragment; ELISA= Enzyme-linked immunosorbent assay; NMDAR= N-methyl-D-aspartate receptor; PS1=presenilin 1

Authors' contributions

MA, NC and JB carried out the design of the study and wrote the manuscript. MA and JB performed biochemical, behavioral, histological and statistical analyses. RF, SA, MAB and GDC participated in the biochemical analyses and helped to draft the manuscript. PD, BP and JMB performed the electrophysiological recording and helped to design the study and draft the manuscript. JF and JV performed the MRI analyses. APB helped with the viral production. PH and ND helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments & funding

We thank Charlène Joséphine, Noëlle Dufour and Gwenaëlle Auregan for viral vector production, Françoise Fouquet for ThioS staining and Karine Cambon for advice concerning animal behavior. This work was supported by DIM Biotherapies, région Ile-de-France, IDEX Paris Saclay, INSERM Transfert and by a grant from "Investissement d'Avenir - ANR-11-INBS-0011" - NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences. Human postmortem samples were obtained from the GIE-Neuro-CEB brain bank, which is run by a consortium of patients' associations.

References

1. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiological reviews. 2001;81(2):741-66.

2. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends in pharmacological sciences. 1991;12(10):383-8.

3. Lee JE, Han PL. An update of animal models of Alzheimer disease with a reevaluation of plaque depositions. Experimental neurobiology. 2013;22(2):84-95. doi:10.5607/en.2013.22.2.84.

4. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. Neuron. 2003;39(3):409-21. doi:10.1016/s0896-6273(03)00434-3.

5. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. Nature. 2012;488(7409):96-9. doi:10.1038/nature11283.

6. Hick M, Herrmann U, Weyer SW, Mallm JP, Tschape JA, Borgers M et al. Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APPsalpha in synaptic plasticity. Acta neuropathologica. 2015;129(1):21-37. doi:10.1007/s00401-014-1368-x.

7. Doyle E, Bruce MT, Breen KC, Smith DC, Anderton B, Regan CM. Intraventricular infusions of antibodies to amyloid-beta-protein precursor impair the acquisition of a passive avoidance response in the rat. Neuroscience letters. 1990;115(1):97-102.

8. Huber G, Martin JR, Loffler J, Moreau JL. Involvement of amyloid precursor protein in memory formation in the rat: an indirect antibody approach. Brain research. 1993;603(2):348-52.

9. Weyer SW, Zagrebelsky M, Herrmann U, Hick M, Ganss L, Gobbert J et al. Comparative analysis of single and combined APP/APLP knockouts reveals reduced spine density in APP-KO mice that is prevented by APPsalpha expression. Acta neuropathologica communications. 2014;2:36. doi:10.1186/2051-5960-2-36.

10. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science. 1996;274(5284):99-102.

11. Moran PM, Higgins LS, Cordell B, Moser PC. Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995;92(12):5341-5.

12. Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itohara S et al. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. Nature neuroscience. 2014;17(5):661-3. doi:10.1038/nn.3697.

13. DaRocha-Souto B, Scotton TC, Coma M, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Sereno L et al. Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. Journal of neuropathology and experimental neurology. 2011;70(5):360-76. doi:10.1097/NEN.0b013e318217a118.

14. Cheng IH, Scearce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N et al. Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. The Journal of biological chemistry. 2007;282(33):23818-28. doi:10.1074/jbc.M701078200.

15. Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H et al. A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. Annals of neurology. 2008;63(3):377-87. doi:10.1002/ana.21321.

16. Storandt M, Mintun MA, Head D, Morris JC. Cognitive decline and brain volume loss as signatures of cerebral amyloid-beta peptide deposition identified with Pittsburgh compound B: cognitive decline associated with Abeta deposition. Archives of neurology. 2009;66(12):1476-81. doi:10.1001/archneurol.2009.272.

17. Morris JC, Roe CM, Grant EA, Head D, Storandt M, Goate AM et al. Pittsburgh compound B imaging and prediction of progression from cognitive normality to symptomatic Alzheimer disease. Archives of neurology. 2009;66(12):1469-75. doi:10.1001/archneurol.2009.269.

18. Gibson PH. Form and distribution of senile plaques seen in silver impregnated sections in the brains of intellectually normal elderly people and people with Alzheimer-type dementia. Neuropathology and applied neurobiology. 1983;9(5):379-89.

19. Mackenzie IR, McLachlan RS, Kubu CS, Miller LA. Prospective neuropsychological assessment of nondemented patients with biopsy proven senile plaques. Neurology. 1996;46(2):425-9.

20. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science. 2002;298(5594):789-91. doi:10.1126/science.1074069.

21. Klein WL, Krafft GA, Finch CE. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? Trends in neurosciences. 2001;24(4):219-24.

22. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. The New England journal of medicine. 2014;370(4):322-33. doi:10.1056/NEJMoa1304839.

23. Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. Alzheimer's research & therapy. 2014;6(4):37. doi:10.1186/alzrt269.

24. During MJ, Young D, Baer K, Lawlor P, Klugmann M. Development and optimization of adeno-associated virus vector transfer into the central nervous system. Methods in molecular medicine. 2003;76:221-36.

25. Tenenbaum L, Chtarto A, Lehtonen E, Velu T, Brotchi J, Levivier M. Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. The journal of gene medicine. 2004;6 Suppl 1:S212-22. doi:10.1002/jgm.506.

26. Sauvee M, DidierLaurent G, Latarche C, Escanye MC, Olivier JL, Malaplate-Armand C. Additional use of Abeta(4)(2)/Abeta(4)(0) ratio with cerebrospinal fluid biomarkers P-tau and Abeta(4)(2) increases the level of evidence of Alzheimer's disease pathophysiological process in routine practice. Journal of Alzheimer's disease : JAD. 2014;41(2):377-86. doi:10.3233/JAD-131838.

27. Bushman DM, Kaeser GE, Siddoway B, Westra JW, Rivera RR, Rehen SK et al. Genomic mosaicism with increased amyloid precursor protein (APP) gene copy number in single neurons from sporadic Alzheimer's disease brains. eLife. 2015;4. doi:10.7554/eLife.05116.

28. Zerah M, Piguet F, Colle MA, Raoul S, Deschamps JY, Deniaud J et al. Intracerebral gene therapy using AAVrh.10-hARSA recombinant vector to treat patients with early-onset forms of metachromatic leukodystrophy: preclinical feasibility and safety assessments in non-human primates. Human gene therapy Clinical development. 2015. doi:10.1089/humc.2014.139.

29. Wanngren J, Franberg J, Svensson AI, Laudon H, Olsson F, Winblad B et al. The large hydrophilic loop of presenilin 1 is important for regulating gamma-secretase complex assembly and dictating the amyloid beta peptide (Abeta) Profile without affecting Notch processing. The Journal of biological chemistry. 2010;285(12):8527-36. doi:10.1074/jbc.M109.055590.

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

31. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. Human molecular genetics. 2004;13(2):159-70. doi:10.1093/hmg/ddh019.

32. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurovascular dysfunction in mild dementia and Alzheimer's disease. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2015;35(7):1055-68. doi:10.1038/jcbfm.2015.76.

33. Murray ME, Przybelski SA, Lesnick TG, Liesinger AM, Spychalla A, Zhang B et al. Early Alzheimer's Disease Neuropathology Detected by Proton MR Spectroscopy. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2014;34(49):16247-55. doi:10.1523/JNEUROSCI.2027-14.2014.

34. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. Neurology. 2007;68(18):1501-8. doi:10.1212/01.wnl.0000260698.46517.8f.

35. Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. Annals of neurology. 1996;40(5):759-66. doi:10.1002/ana.410400512.

36. Proctor DT, Coulson EJ, Dodd PR. Reduction in post-synaptic scaffolding PSD-95 and SAP-102 protein levels in the Alzheimer inferior temporal cortex is correlated with disease pathology. Journal of Alzheimer's disease : JAD. 2010;21(3):795-811. doi:10.3233/JAD-2010-100090.

37. Schneider I, Reverse D, Dewachter I, Ris L, Caluwaerts N, Kuiperi C et al. Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation. The Journal of biological chemistry. 2001;276(15):11539-44. doi:10.1074/jbc.M010977200.

38. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J et al. Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. Nature. 1996;383(6602):710-3. doi:10.1038/383710a0.

39. Walker JM, Fowler SW, Miller DK, Sun AY, Weisman GA, Wood WG et al. Spatial learning and memory impairment and increased locomotion in a transgenic amyloid precursor protein mouse model of Alzheimer's disease. Behavioural brain research. 2011;222(1):169-75. doi:10.1016/j.bbr.2011.03.049.

40. Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. Nature reviews Drug discovery. 2011;10(9):698-712. doi:10.1038/nrd3505.

41. Quon D, Wang Y, Catalano R, Scardina JM, Murakami K, Cordell B. Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. Nature. 1991;352(6332):239-41. doi:10.1038/352239a0.

42. Higgins LS, Catalano R, Quon D, Cordell B. Transgenic mice expressing human beta-APP751, but not mice expressing beta-APP695, display early Alzheimer's disease-like histopathology. Annals of the New York Academy of Sciences. 1993;695:224-7.

43. Sinha S, Lieberburg I. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999;96(20):11049-53.

44. Sudoh S, Kawamura Y, Sato S, Wang R, Saido TC, Oyama F et al. Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid beta-protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites. Journal of neurochemistry. 1998;71(4):1535-43.

45. Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999;96(15):8733-8.

46. Le Meur K, Galante M, Angulo MC, Audinat E. Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate of non-synaptic origin in the rat hippocampus. The Journal of physiology. 2007;580(Pt. 2):373-83. doi:10.1113/jphysiol.2006.123570.

47. Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2011;31(18):6627-38. doi:10.1523/JNEUROSCI.0203-11.2011.

48. Schallier A, Smolders I, Van Dam D, Loyens E, De Deyn PP, Michotte A et al. Region- and age-specific changes in glutamate transport in the AbetaPP23 mouse model for Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease : JAD. 2011;24(2):287-300. doi:10.3233/JAD-2011-101005.

49. Scimemi A, Meabon JS, Woltjer RL, Sullivan JM, Diamond JS, Cook DG. Amyloid-beta1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2013;33(12):5312-8. doi:10.1523/JNEUROSCI.5274-12.2013.

50. Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S et al. Abeta induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110(27):E2518-27. doi:10.1073/pnas.1306832110.

51. Epelbaum S, Youssef I, Lacor PN, Chaurand P, Duplus E, Brugg B et al. Acute amnestic encephalopathy in amyloid-beta oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion in vivo. Neurobiology of aging. 2015;36(6):2043-52. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.005.

52. Czajkowski R, Jayaprakash B, Wiltgen B, Rogerson T, Guzman-Karlsson MC, Barth AL et al. Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(23):8661-6. doi:10.1073/pnas.1313222111.

53. Radwanska K, Schenatto-Pereira G, Ziolkowska M, Lukasiewicz K, Giese KP. Mapping fear memory consolidation and extinction-specific expression of JunB. Neurobiology of learning and memory. 2015;125:106-12. doi:10.1016/j.nlm.2015.08.007.

54. Dejean C, Courtin J, Rozeske RR, Bonnet MC, Dousset V, Michelet T et al. Neuronal Circuits for Fear Expression and Recovery: Recent Advances and Potential Therapeutic Strategies. Biological psychiatry. 2015;78(5):298-306. doi:10.1016/j.biopsych.2015.03.017.

55. Tackenberg C, Grinschgl S, Trutzel A, Santuccione AC, Frey MC, Konietzko U et al. NMDA receptor subunit composition determines beta-amyloid-induced neurodegeneration and synaptic loss. Cell death & disease. 2013;4:e608. doi:10.1038/cddis.2013.129.

56. Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Sekine Y, Tezuka T, Nishizawa M et al. Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid-beta at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3beta signaling pathway. The Journal of biological chemistry. 2012;287(42):35222-33. doi:10.1074/jbc.M112.348300.

57. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow E-M, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. Acta neuropathologica. 2001;103(1):26-35. doi:10.1007/s004010100423.

58. Caldwell JH, Klevanski M, Saar M, Muller UC. Roles of the amyloid precursor protein family in the peripheral nervous system. Mechanisms of development. 2013;130(6-8):433-46. doi:10.1016/j.mod.2012.11.001.

59. Kogel D, Deller T, Behl C. Roles of amyloid precursor protein family members in neuroprotection, stress signaling and aging. Experimental brain research. 2012;217(3-4):471-9. doi:10.1007/s00221-011-2932-4.

60. Volianskis A, Kostner R, Molgaard M, Hass S, Jensen MS. Episodic memory deficits are not related to altered glutamatergic synaptic transmission and plasticity in the CA1 hippocampus of the APPswe/PS1deltaE9-deleted transgenic mice model of ss-amyloidosis. Neurobiology of aging. 2010;31(7):1173-87. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.005.

61. Berger A, Lorain S, Josephine C, Desrosiers M, Peccate C, Voit T et al. Repair of Rhodopsin mRNA by Spliceosome-Mediated RNA Trans-Splicing: A New Approach for Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2015. doi:10.1038/mt.2015.11.

62. Anderson WW, Collingridge GL. The LTP Program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. Journal of neuroscience methods. 2001;108(1):71-83.

Figure legends

Figure 1: Stereotactic injection of AAV vectors induces the neuronal expression of human APP and PS1 in the hippocampus of C57BL/6J mice, 1 month after injection

C57Bl/6J mice (all males) were injected at 8 weeks of age either with AAV-CAG-PS1$_{M146L}$ (AAV-PS1 mice, n=4), AAV-CAG-APP$_{SL}$ (AAV-APP mice, n=4) or both vectors at the same doses as for the other two groups (AAV-APP/PS1 mice, n=4). Non-injected WT mice (n=4) were also analyzed. Mice were killed one month later for analyses.

(**A**) Upper panel: schematic representation of the four groups used. Bottom panel: coronal diagram showing the injection site and the architecture of the mouse hippocampus.

(**B**) Representative western blots showing the expression of PS1 (full length: PS1 FL and N-terminal fragment: PS1 NTF), human APP (6E10 antibody) and total APP (murine + human forms; APP C-ter antibody) confirming transgene expression 1 month after injection. All western blots were performed on the whole hippocampus (TBS-Tx soluble fraction).

(**C-F**) Densitometric analyses of western blots showing the expression of PS1 FL (**C**), PS1 NTF (**D**), human APP (**E**) and total APP (**F**) in the four groups hippocampi 1 month after injection. Note that despite the expression of human APP in the AAV-APP/PS1 group, no significant difference in total APP levels was found between non-injected, AAV-PS1 and AAV-APP/PS1 groups. Bars represent means ± SEM and data were normalized with respect to GAPDH. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test where ###, *** and $$$ denote $p<0.001$ versus non-injected WT mice, AAV-PS1 mice and AAV-APP mice respectively. ##, ** and $$ denote $p<0.01$; # and * denote $p<0.05$.

(**G**) High magnification of a hippocampal coronal section of each group showing neuronal layers (NeuN antibody, red) and the APP expression (APP C-ter antibody, green). Note that the human APP expression in the AAV-APP/PS1 group (see Figure **1E**) is not sufficient to exceed a threshold detectable by immunohistochemistry. The exogenous APP is essentially detected into two areas: the CA2 and subiculum. Scale bar represents 500 µm.

(**H**) Scheme representing antero-posterior coordinates of coronal sections depicted in **I-L**.

(**I-L**) Immunostaining of APP (APP C-ter antibody, green) and NeuN (red) at different antero-posterior coordinates in AAV-APP mice coronal sections.

(**M**) Magnified confocal images of an AAV-APP mouse section with double immunofluorescence staining showing the location of APP (APP C-ter antibody, green) and the diffusion of Aβ indicated by arrow heads (4G8 antibody, red) in the CA2 layer. Blue: DAPI. Scale bar represents 10 µm.

Figure 2: Exogenous human APP is processed following the amyloidogenic pathway, 3 months after injection

C57Bl/6J mice (all males) were injected at 8 weeks of age either with AAV-CAG-PS1$_{M146L}$ (AAV-PS1 mice), AAV-CAG-APP$_{SL}$ (AAV-APP mice) or both vectors at the same doses as for the other two groups (AAV-APP/PS1 mice, n=7-8 mice per group). Non-injected WT mice (n=4) were also analyzed. Mice were killed three months later for analyses of whole hippocampi.

(**A**) Comparative analysis of TBS-Tx soluble human βCTF levels by ELISA. Note that βCTF levels follow the same pattern of expression than for the human APP in the four different groups (see Figure **1E**). Bars represent means ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test where ###, *** denote p<0.001 versus non-injected WT and AAV-PS1 mice. #, * and $ denote p<0.05.

(**B**) Correlation between TBS-Tx soluble human βCTF and sAPPβ levels between AAV-APP and AAV-APP/PS1 mice (n=7). Linear regression analysis confirms the engagement in the amyloidogenic pathway. Correlation analysis was performed with Pearson's parametric correlation test: **p<0.01.

(**C**) Comparative analysis of TBS-Tx soluble human Aβ42 levels by MSD immunoassay showing higher levels in AAV-APP/PS1 mice (n=6-8 mice per group). Bars indicate means ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test where ###, *** denote p<0.001 versus non-injected WT mice and AAV-PS1 mice. ## and ** denote p<0.01.

(**D**) Correlation between TBS-Tx soluble human Aβ42 and βCTF levels between AAV-APP and AAV-APP/PS1 (n=13). Correlation analysis was performed with Pearson's parametric correlation test: *p<0.05.

(**E-F**) Representation of Aβ42/40 (**E**) and Aβ42/38 (**F**) ratios determined by multiplex MSD immunoassay (n=4 mice per group). Bars indicate means ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test where $$$ denotes p<0.001 versus AAV-APP mice. na = not applicable.

(**G**) Comparative analysis of TBS-Tx soluble murine phosphorylated Tau protein (AT270, Thr181) by ELISA. Bars indicate means ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test where #, * and $ denote p<0.05 versus non-injected WT mice, AAV-PS1 mice and AAV-APP mice respectively.

(**H**) Densitometric analyses of western blots showing the expression of the total Tau protein in each group (n=4 mice per group). Bars represent means ± SEM and data were normalized with respect to GAPDH.

Figure 3: AAV-APP/PS1 mice show a production of human APP similar to AD patients, 3 months after injection

C57Bl/6J mice (all males) were injected at 8 weeks of age either with AAV-CAG-PS1$_{M146L}$ (AAV-PS1 mice, n=4), AAV-CAG-APP$_{SL}$ (AAV-APP mice, n=4) or both vectors at the same doses as for the other two groups (AAV-APP/PS1 mice, n=4). Non-injected WT mice (n=4) and transgenic APP/PS1ΔE9 mice were also used and all animals were killed at 5 months of age. Human samples were obtained from late-onset AD cases (Braak 6, Thal 5) and age-matched controls. The hippocampus was the structure analyzed for all samples.

(**A**) Representative western blot of human APP (6E10 antibody) between AAV injected mice (n=3 per group), human samples (n=5 per group) and transgenic APP/PS1ΔE9 mice (n=3).

(**B**) Densitometric analyses of the antibody immunoreactivity shown in panel **A**. Bars represent means ± SEM and data were normalized with respect to GAPDH. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test: ***p<0.001. Note that AAV-APP/PS1 mice and human AD cases have similar levels.

(**C**) Representative western blot of total APP (APP C-ter antibody) between non-injected WT, AAV injected and APP/PS1ΔE9 mice.

(**D**) Densitometric analyses of the antibody immunoreactivity shown in panel **C**. Bars represent means ± SEM and data were normalized with respect to GAPDH. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test: **p<0.01.

Figure 4: AAV-APP/PS1 mice show a production of amyloid derivatives similar to AD patients, 3 months after injection

C57Bl/6J mice (all males) were injected at 8 weeks of age either with AAV-CAG-PS1$_{M146L}$ (AAV-PS1 mice, n=4), AAV-CAG-APP$_{SL}$ (AAV-APP mice, n=4) or both vectors at the same doses as for the other two groups (AAV-APP/PS1 mice, n=4). Non-injected WT mice (n=4) and transgenic APP/PS1ΔE9 mice at 5 (n=3), 14 (n=8) and 16 (n=8) months of age were also used. Human samples were obtained from late-onset AD cases (Braak 6, Thal 5) and age-matched controls. The hippocampus was the structure analyzed for all samples.

(**A**) Comparative analysis of TBS-Tx soluble human βCTF levels by ELISA. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test: ***$p<0.001$. A logarithmic scale was used. Note that AAV-APP/PS1 mice and human AD cases have similar levels.

(**B-C**) Quantification (6E10 based MSD immunoassay detecting human Aβ species) of TBS-Tx soluble human Aβ42 (**B**) and Aβ40 (**C**). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test: ***$p<0.001$, **$p<0.01$. Note that AAV-APP/PS1 injected mice show higher levels of Aβ42 compared to human controls and reduced levels compared to late stage human cases.

(**D**) Representation of the Aβ42/40 ratio. Note that no significant difference was detectable between AAV-APP/PS1 mice and human AD cases.

Figure 5: AAV-APP/PS1 mice present synaptic defects, 3 months after injection

C57Bl/6J mice (all males) were injected at 8 weeks of age either with AAV-CAG-PS1M146L (AAV-PS1 mice used as an injected control group, n=10) or AAV-CAG-APPSL + AAV-CAG-PS1M146L (AAV-APP/PS1 mice, n=10). Mice were used for *in-vivo* (**A-B**) and *ex-vivo* (**C-D**) recording three months later.

(**A**) Top panel: localization of the spectroscopic volume of 7.2 mm x 2 mm x 2.6 mm encompassing both

Hippocampi of each mouse. Bottom panel: representative ^{1}H-MR spectrum acquired from the hippocampus of a mouse 3 months after injection.

(**B**) Concentrations of seven metabolites were determined from spectra: GABA, Gln, Glu, T, tNAA, Ins and tCho. Macromolecules and lipids were not included in the study and the values obtained were expressed as ratios relative to tCr (n=10-11 per group). Bars represent means ± SEM. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA with experimental group and metabolites as effects. Note that metabolite levels were significantly lower in AAV-APP/PS1 mice (experimental group effect: p=0.04). A selective analysis of metabolites linked to neuromodulation and precursors (GABA, Gln, Glu, T, tNAA) increased the significance of the difference between both groups (experimental group effect: p=0.002).

(**C**) Long-term potentiation (LTP) over 75 minutes induced by high-frequency stimulation. The inset graphs represent for each group an example of unit field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) before (black line) and after (gray line) LTP induction. The inset histogram shows average potentiation. Bars represent means ± SEM (n=15-16 slices from n=10 mice per group). Statistical analysis was performed with Student's t-test.

(**D**) Scatter diagram showing the tonic glutamatergic current recorded at a holding potential of +40 mV (whole cell patch-clamp of CA1 pyramidal cells, n=11-19/group from n=10 mice per group). Normal response was characterized in a range comprised between AAV-PS1 mean +/- 2SD. Analysis of AAV-APP/PS1 profile revealed a decrease of number of neurons with normal response (Chi² test: p=0.003) in association with an increase of neurons with an high level of Tonic glutamatergic current (Chi² test: p=0.011) suggesting this current was stronger in the AAV-APP/PS1 group.

(**E-H**) Western blot analysis of PSD-95, Synaptophysin, GLT-1 and GLAST. Bars represent means ± SEM and data were normalized with respect to GAPDH. Student's t-test was used for statistical analysis: *p<0.05.

Figure 6: AAV-APP/PS1 mice present memory impairments, 3 months after injection

C57Bl/6J mice (all males) were injected at 8 weeks of age either with AAV-CAG-PS1M146L (AAV-PS1 mice used as an injected control group, n=8) or AAV-CAG-APPSL + AAV-CAG-PS1M146L (AAV-APP/PS1 mice, n=8) and behavioral analyses were performed three months later.

(**A**) Open-field assay. Travelled distance during the Open-field task showing no significant difference between both groups.

(**B**) Left panel: time in periphery/time in center ratio showing a change in emotional behavior when faced to a new environment in the AAV-APP/PS1 group (n=7-8 mice per group). Bars represent means ± SEM. Statistical analysis was performed with Student's t-test: $*p<0.05$. Right panel: group occupancy plots for visualizing the areas in which the animals spent the most time during the test.

(**C**) Y-maze assay. Travelled distance during the Y-Maze task showing no significant difference between both groups during the test session.

(**D**) Left panel: percentage of distance in the new arm showing that AAV-APP/PS1 mice spent less time in the new arm than the other groups ($p=0.08$; n=7-8 mice per groups). Bars represent means ± SEM. Statistical analysis was performed with Student's t-test. Right panel: group occupancy plots for visualizing the areas in which the animals spent the most time during the test. The arm circled in red is the new arm.

(**E**) Morris Water Maze assay. Travelled distance during the Morris Water Maze task showing no significant difference between both groups during the five training days.

(**F-G**) Probe trial performance at 4h (**F**) and 72h (**G**) after the last training session. TQ=target quadrant that housed the platform during the training sessions. OQ=mean of distance covered in the other three quadrants. Note that AAV-APP/PS1 mice were impaired in comparison to AAV-PS1 mice confirmed by no preference for the trained target quadrant. Bars represent means ± SEM. A two way ANOVA was used with experimental group and quadrant as main effects: $*p<0.05$, $**p<0.01$.

Supplementary Figure 1: APP is processed in sporadic AD cases

Human samples were obtained from late-onset AD cases (Braak 6, Thal 5) and age-matched controls (n=5 per group). The hippocampus was the studied structure.

(**A**) Western blot analysis of NeuN.

(**B**) Densitometric analyses of western blots showing the expression of human APP in the hippocampus of human controls and AD cases (n=5 per group). Bars represent means ± SEM, and data were normalized with respect to GAPDH. Statistical analyses were performed with Student's t-test: $**p<0.01$.

(**C**) Densitometric analyses of **A**, showing the expression of NeuN in the hippocampus of human controls and AD cases (n=5 per group). Bars represent means ± SEM, and data were normalized with respect to GAPDH. Statistical analyses were performed with Student's t-test: $*p<0.05$.

(**D**) Representation of the APP/NeuN ratio following densitometric analyses of the corresponding western blots (n=5 per group). Note that APP seems to be processed in sporadic AD cases. Bars represent means ± SEM and data were normalized with respect to GAPDH. Statistical analyses were performed with Student's t-test: $*p<0.05$.

Supplementary Figure 2: AAV-PS1 and AAV-APP mice do not exhibit neuronal defects in terms of PSD-95, GLT-1 and tonic glutamatergic current

C57Bl/6J mice (all males) were injected at 8 weeks of age either with AAV-CAG-PS1M146L (AAV-PS1 mice) or AAV-CAG-APPSL (AAV-APP mice). Mice were killed three months later for analyses.

(**A**) Western blot of PSD-95 and GLT-1 (n=3-4 per group).

(**B**) Densitometric analyses of the antibody immunoreactivities shown in panel **A**.

(**C**) Tonic glutamatergic current recorded at a holding potential of +40 mV by the whole-cell patch-clamping of CA1 pyramidal cells. No significant difference in tonic glutamatergic current intensity was observed between the AAV-PS1 and AAV-APP groups (whole cell patch-clamp of CA1 pyramidal cells, n=11/group from n=10 mice per group).

Figures

Figure 1

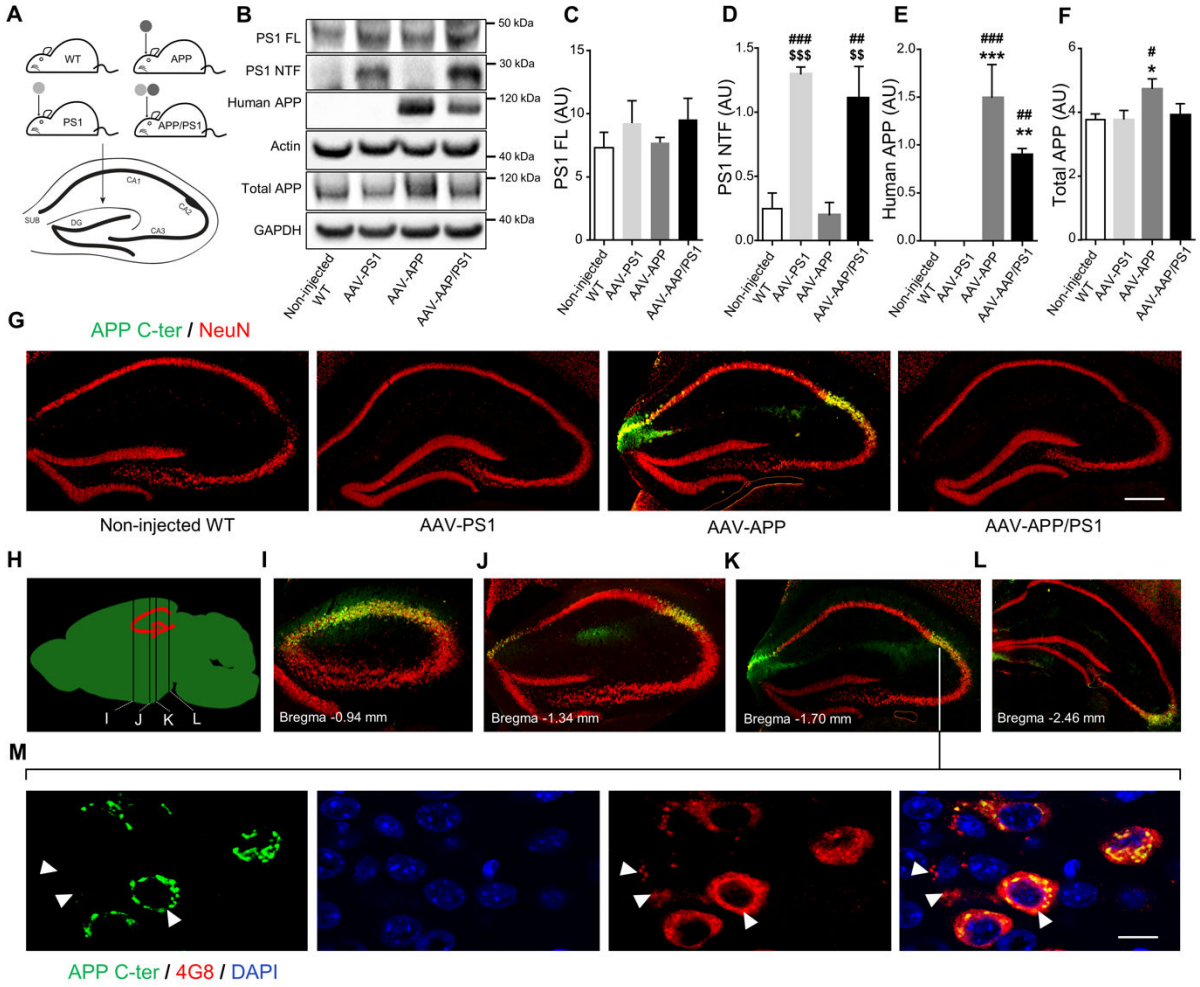


Figure 2

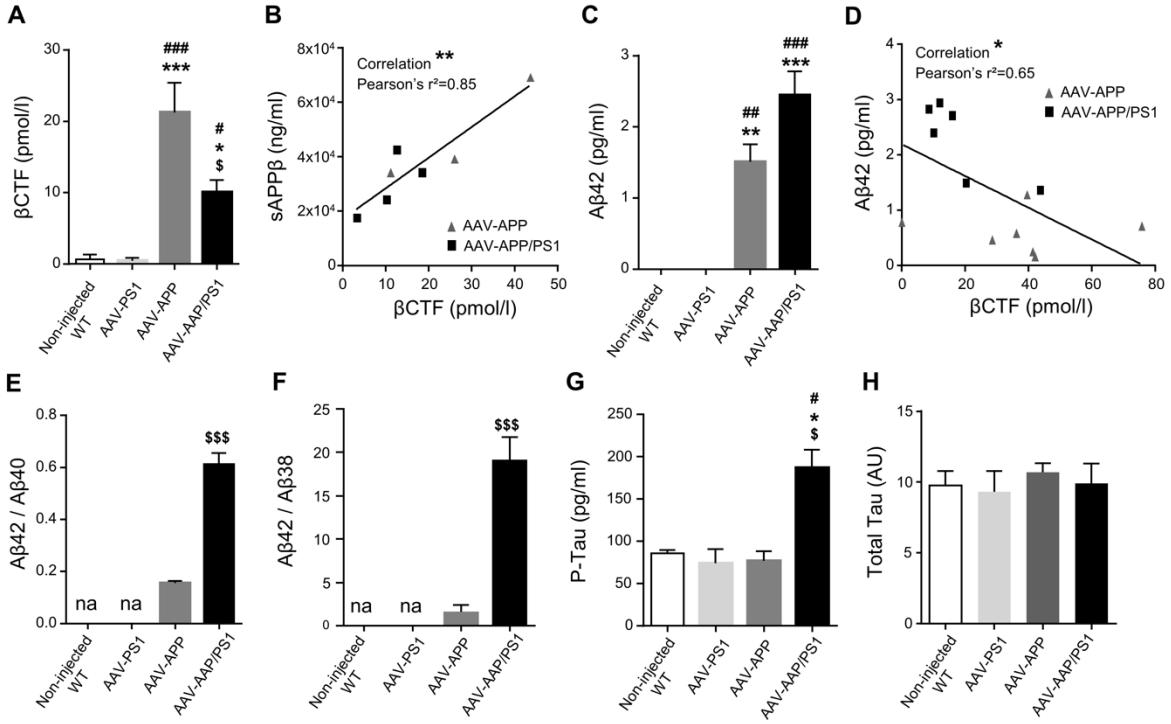

A
βCTF (pmol/l)
###
***
#
*
$
Non-injected WT
AAV-PS1
AAV-APP
AAV-AAP/PS1
B
sAPPβ (ng/ml)
Correlation **
Pearson's r²=0.85
AAV-APP
AAV-APP/PS1
βCTF (pmol/l)
C
Aβ42 (pg/ml)
##
**
###
***
D
Aβ42 (pg/ml)
Correlation *
Pearson's r²=0.65
AAV-APP
AAV-APP/PS1
βCTF (pmol/l)
E
Aβ42 / Aβ40
$$$
na
na
F
Aβ42 / Aβ38
$$$
na
na
G
P-Tau (pg/ml)
#
*
$
H
Total Tau (AU)

Figure 3

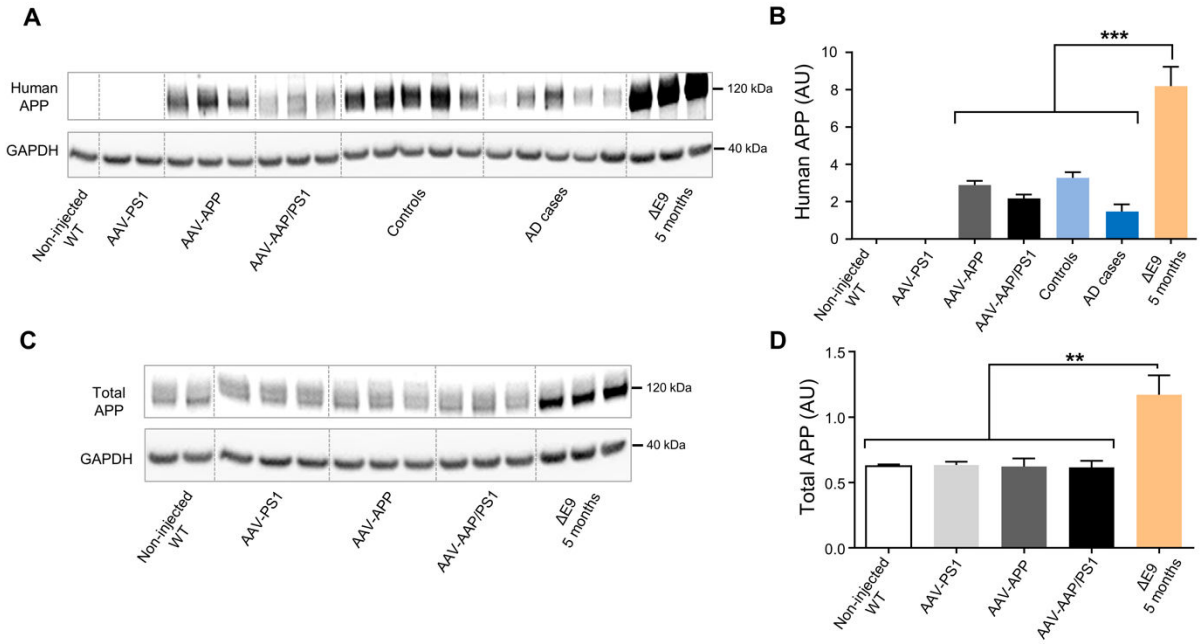

A
Human APP
GAPDH
120 kDa
40 kDa
Non-injected WT
AAV-PS1
AAV-APP
AAV-AAP/PS1
Controls
AD cases
ΔE9 5 months
B
Human APP (AU)
***
C
Total APP
GAPDH
120 kDa
40 kDa
D
Total APP (AU)
**

Figure 4

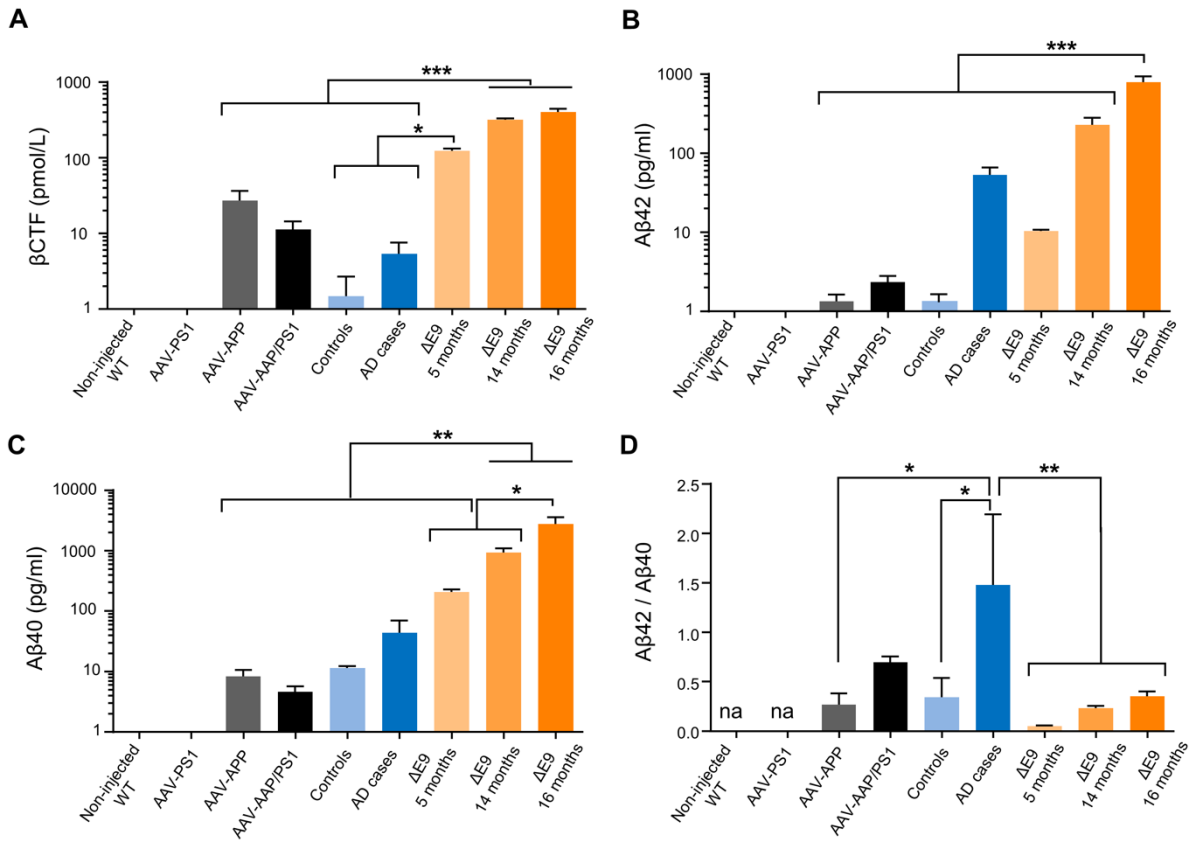

A
βCTF (pmol/L)
1000
100
10
1
***
*
Non-injected WT
AAV-PS1
AAV-APP
AAV-AAP/PS1
Controls
AD cases
ΔE9 5 months
ΔE9 14 months
ΔE9 16 months
B
Aβ42 (pg/ml)
1000
100
10
1
***
C
Aβ40 (pg/ml)
10000
1000
100
10
1
**
*
D
Aβ42 / Aβ40
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
na
na
*
*
**

Figure 5

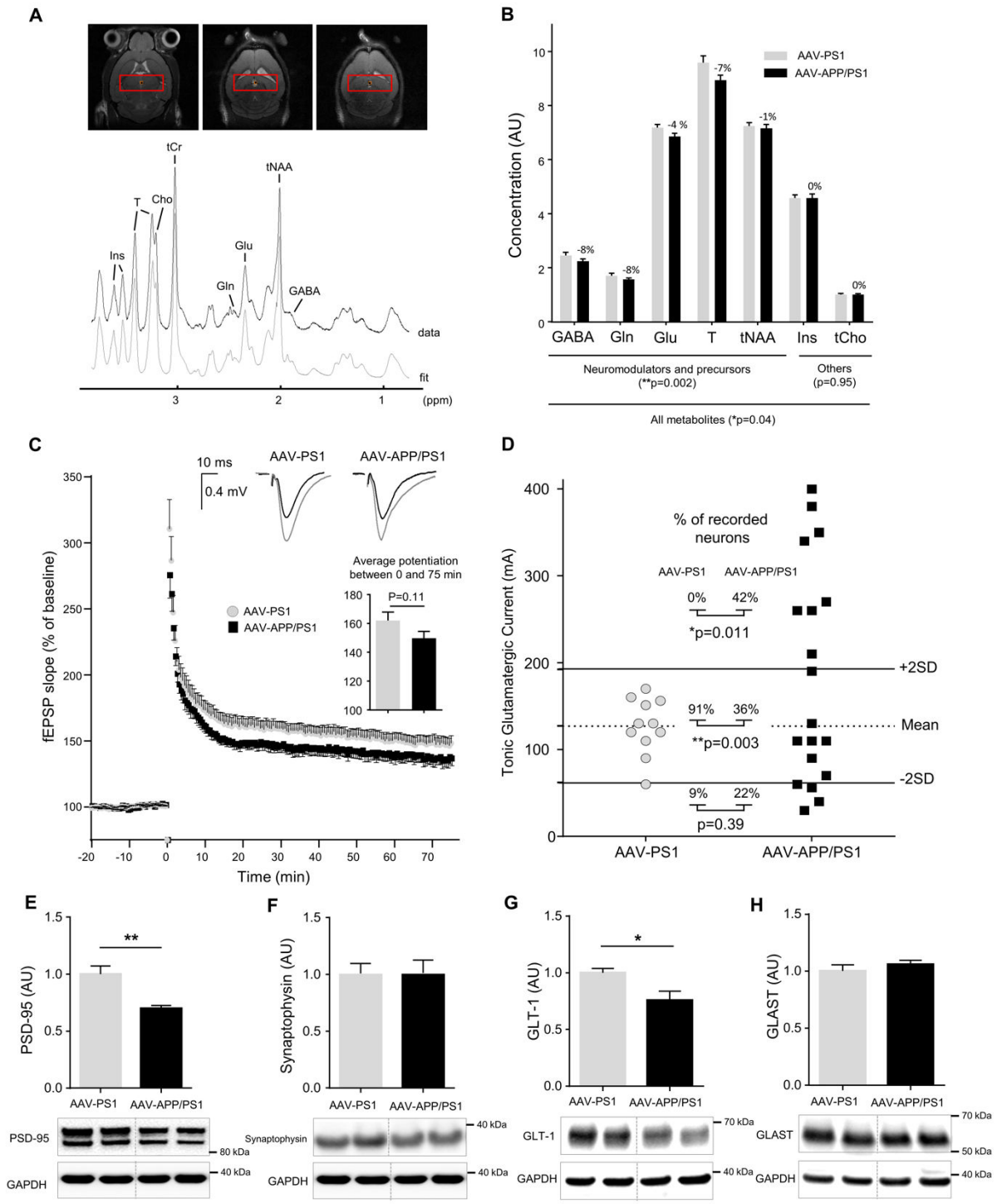
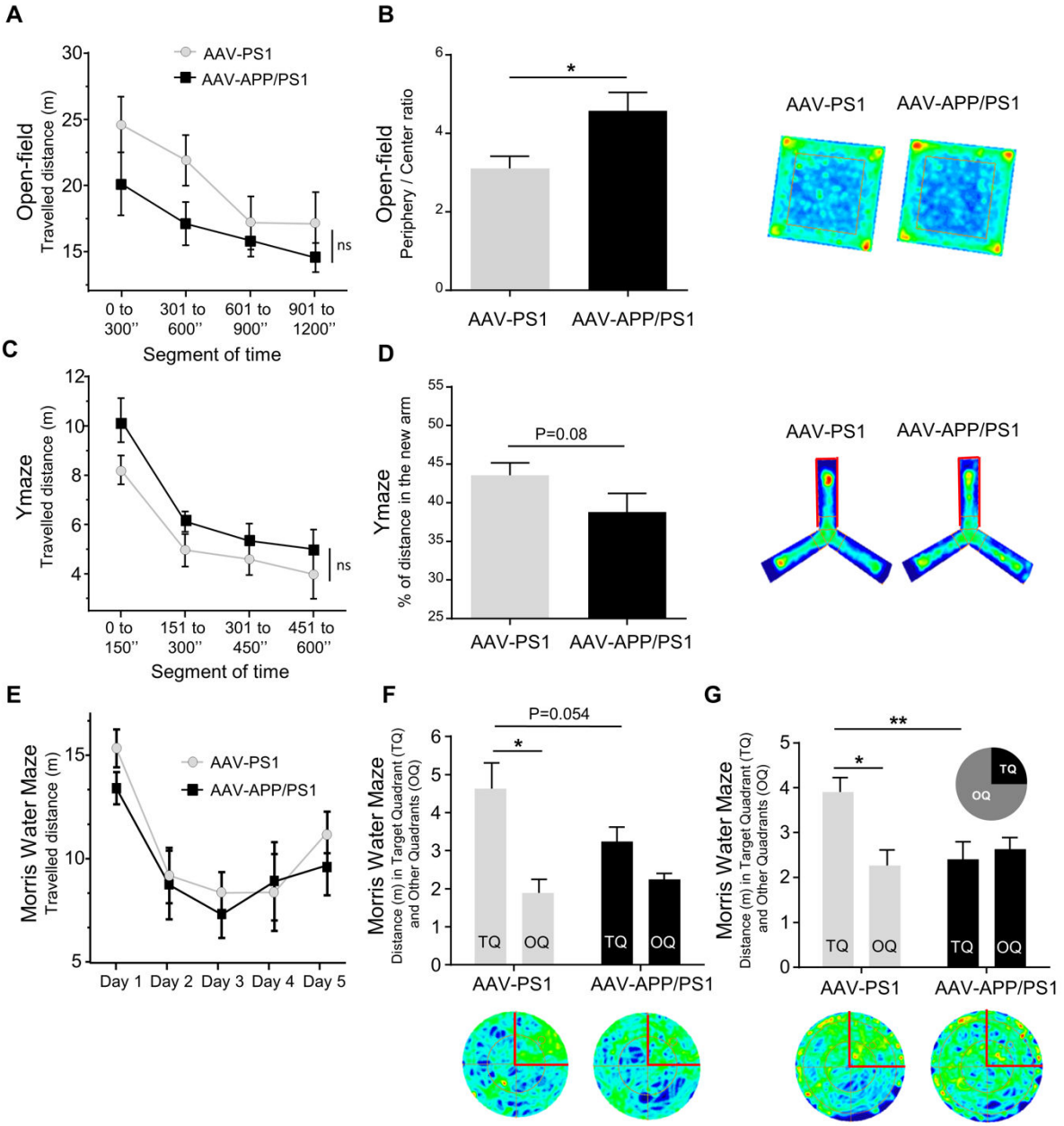
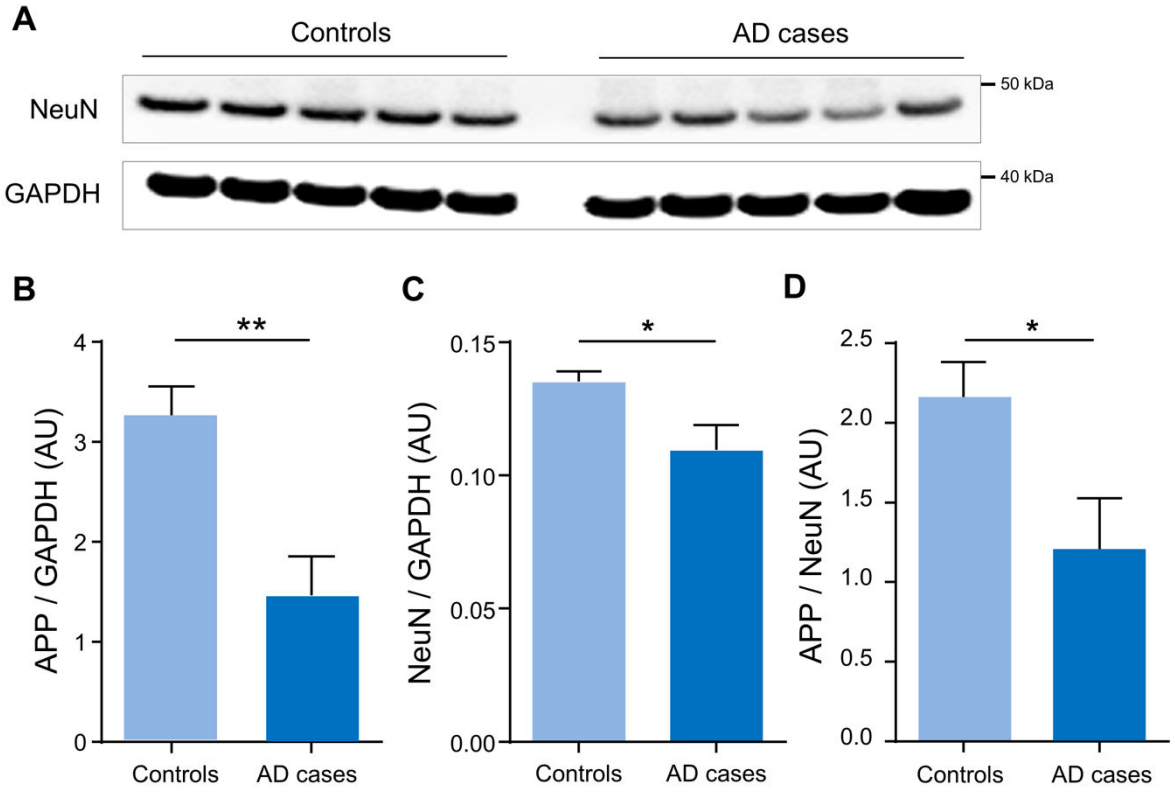

A
tCr
tNAA
T
Cho
Ins
Glu
Gln
GABA
data
fit
3
2
1
(ppm)
B
Concentration (AU)
AAV-PS1
AAV-APP/PS1
-8%
-8%
-4 %
-7%
-1%
0%
0%
GABA
Gln
Glu
T
tNAA
Ins
tCho
Neuromodulators and precursors
(**p=0.002)
Others
(p=0.95)
All metabolites (*p=0.04)
C
10 ms
0.4 mV
AAV-PS1
AAV-APP/PS1
Average potentiation
between 0 and 75 min
P=0.11
fEPSP slope (% of baseline)
Time (min)
D
% of recorded
neurons
AAV-PS1
AAV-APP/PS1
0%
42%
*p=0.011
91%
36%
**p=0.003
9%
22%
p=0.39
+2SD
Mean
-2SD
Tonic Glutamatergic Current (mA)
E
PSD-95 (AU)
**
PSD-95
80 kDa
GAPDH
40 kDa
F
Synaptophysin (AU)
Synaptophysin
40 kDa
GAPDH
G
GLT-1 (AU)
*
GLT-1
70 kDa
GAPDH
H
GLAST (AU)
GLAST
70 kDa
50 kDa
GAPDH

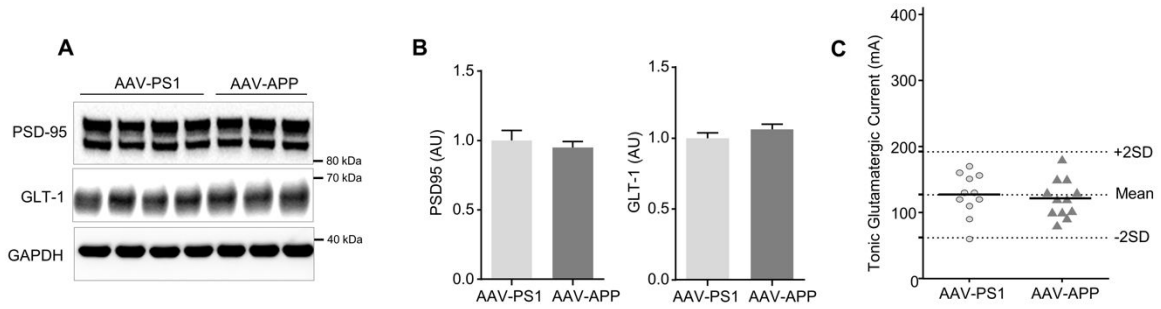
Figure 6


A
AAV-PS1
AAV-APP/PS1
Open-field
Travelled distance (m)
ns
0 to 300''
301 to 600''
601 to 900''
901 to 1200''
Segment of time
B
Open-field
Periphery / Center ratio
*
AAV-PS1
AAV-APP/PS1
C
Ymaze
Travelled distance (m)
ns
0 to 150''
151 to 300''
301 to 450''
451 to 600''
Segment of time
D
Ymaze
% of distance in the new arm
P=0.08
AAV-PS1
AAV-APP/PS1
E
Morris Water Maze
Travelled distance (m)
AAV-PS1
AAV-APP/PS1
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
F
Morris Water Maze
Distance (m) in Target Quadrant (TQ) and Other Quadrants (OQ)
P=0.054
*
TQ
OQ
AAV-PS1
AAV-APP/PS1
G
Morris Water Maze
Distance (m) in Target Quadrant (TQ) and Other Quadrants (OQ)
**
*
TQ
OQ
AAV-PS1
AAV-APP/PS1

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Résultats préliminaires de l'article 2 en préparation

Temporary results for a manuscript in preparation : confidential

Early-onset Alzheimer's disease and its progression explored in a novel rat model based on gene transfer

Authors: Mickael Audrain*, Benoit Souchet*, Alexis Haddjeri, Sandro Alves, Romain Fol, Alexis-Pierre Bemelmans, Nicole Déglon, Philippe Hantraye, Yvette Akwa, Jean-Marie Billard, Brigitte Potier, Patrick Dutar, Nathalie Cartier, Jérome Braudeau

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible brain disorder characterized by a decline in cognitive function and belated hallmarks such as amyloid deposits and neurofibrillary tangles. There is increasing evidences that these markers appear late in the disease progression and thereby are not responsible of the triggering of AD. To investigate early stages of AD without transgenesis pitfall, we developed a novel AD rat model based on co-injection of two AAV vectors coding for the human mutated APP and PS1 proteins, in the hippocampus of 2 months old Wistar rats. This strategy allowed a stable and moderate expression of transgenes with equivalent levels of APP compared to human patient's hippocampi. We observed a very slow progressive AD like neuropathology where amyloid deposits and AT8 positive neurons appear only around 2.5 years old. We thereby used this model at 3 and 8 months post-injection, as an AD early-phases model, to decipher first consequences of a human-like APP processing and its consequences in the onset of memory troubles.

Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most common cause of dementia, is characterized by a progressive accumulation of β-amyloid peptide (Aβ) and forms of hyperphosphorylated Tau, as well as neuronal loss and a decline in cognitive functions.

A number of transgenic mice have been generated for twenty years (Lee and Han, 2013) and more recently some transgenic rats have been also described. The comparison between these both species suggests that rat behavior is less dependent upon elementary actions and thereby less simpler. Besides the fact that rat is a specie widely used in toxicity studies, their larger brain size allow translational procedures such as surgical processes, magnetic resonance imaging (MRI) or positron emission tomography (PET) easier to perform. Moreover, access to fluid samples such as plasma and CSF is easier to perform, reflecting also the growing interest of such models.

Interestingly, the gradual emergence of AD rat models followed the same pattern than for transgenic mice development some years ago, with the amyloid plaque formation in sight. Indeed, the first generated rats failed to reproduce the full AD phenotype without amyloid deposition in particular (Echeverria et al., 2004, Ruiz-Opazo et al., 2004, Folkesson et al., 2007). Sometime later, a new model have been developed by the cross of two and three lines of transgenic Sprague Dawley rats to trigger amyloid plaque deposition at 17 and 7 months of age respectively (Flood et al., 2009). More recently, the McGill-R-Thy1-APP line have been developed with extracellular Aβ deposition as soon as 6 months of age (Leon et al., 2010).

Some concepts are to keep in mind to develop useful models more relevant in terms of human physiopathology. First, the full AD-like pathology is essential but the delay to reach it is also important. Indeed, AD is an aging disease and models mimicking amyloid plaques too early seems not relevant in terms of disease progression compared to human cases. Secondly, most current AD models are transgenic and thus based on protein overproduction, which is not the case in humans; this overexpression being precisely responsible of the early apparition of hallmarks. Finally, a large body of evidence suggest that there is a pre-clinical phase of AD where pathological changes begin decades before classical hallmarks, like plaques mentioned above. These early phases are little known, mainly due to actual models not suitable to analyze early or preclinical mechanisms of AD. Early stages models or models with a wide window without amyloid or Tau deposition are thus increasingly requested.

Here we developed an alternative rat model by gene transfer to induce a production of amyloid derivatives resembling as closely as possible the pattern of expression observed in the hippocampus of human AD patients. As we recently described in mice (Audrain et al., 2016), the co-injection of AAVs vectors carrying mutated forms of human APP and PS1 into the rat hippocampus without significant overexpression led to the production of human APP, βCTF and Aβ peptides and trigger in these rats an AD-like phenotype only at 2.5 years old, i.e. at very advanced age. Based on this observation, we used our AAV-based model at 3 and 8 months post-injection as an early-phases model of AD. Using biochemical, histological, behavioural and electrophysiological assays, we characterized several aspects implicated in the onset of the disease. We also followed the evolution of several parameters at different time points and in different sample types such as hippocampi, plasma and CSF.

Preliminary material & methods

Plasmid design and vector production

We used a double-mutant human APP751 cDNA containing the Swedish and London mutations (codon optimized and containing a Kozak sequence; GeneArt, Life Technologies, Saint Aubin, France), and a human PS1 cDNA containing the M146L mutation (pENTR4-PS1-S182M146L). The APPSL and PS1M146L sequences were cloned in an AAV2 plasmid with CAG promoter to generate the AAV2-CAG-APPSL or -CAG-PS1M146L. AAV vectors were produced as previously described (Berger et al., 2015), except that the AAV packaging plasmid was replaced with a plasmid construct containing the rep gene of AAV2 and the cap gene of AAV9 and AAVrh10.

Human brain samples

Postmortem samples were obtained from brains collected as part of the Brain Donation Program of the GIE-Neuro-CEB Brain Bank. Autopsies were carried out by accredited pathologists, after informed consent had been obtained from the relatives, in accordance with French Bioethics laws. Five hippocampal samples from five patients with sporadic forms of AD (male and female; Braak 6 Thal 5; aged between 69 and 89 years, with a postmortem interval (PMI) of 30 to 59 hours) and five hippocampus samples from five age-matched control subjects (male and female, aged between 69 and 92 years, PMI of 6 to 63 hours) were used in this study.

Animals

We used 130 male Wistar rats (eight-week-old; SARL JanvierLabs, Le Genest Saint Isle, France) in this study. All experiments were conducted in accordance with ethical standards and French and European regulations (Directive 2010/63/EU).

Stereotactic injections of AAVs

Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine and placed in a stereotactic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Stereotactic intracerebral injections of AAVs into the hippocampi of both hemispheres were performed, using the following coordinates: antero-posterior: -3.6 mm, lateral: ± 2.5 mm, ventral: -3.3 mm relative to bregma. We injected 4 µl of viral preparation into each site ($2.5x10^{10}$ vg/site and $5x10^{10}$

vg/site for PS1 and APP, respectively) at a rate of 0.25 µl/minute. Three groups of animals were constituted, according to the viral vectors injected or co-injected: AAV-CAG-$PS1_{M146L}$ (AAV-PS1 rats), AAV-CAG-APP_{SL} (AAV-APP rats), AVV-CAG-APP_{SL} + AAV10-CAG-$PS1_{M146L}$ (AAV-APP/PS1 rats).

Tissue collection and sample preparation

Rats were anesthetized with ketamine/xylazine and were firstly placed in a stereotactic frame to collect CSF by puncturing the cisterna magna with a low dead space syringue. Blood was then collected in the cardiac cavity and rats were transcardially perfused with 50 ml ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). One hemisphere was post-fixed by incubation for 72 h in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose in PBS and cut into 40 µm sections with a freezing microtome (Leica) for histological analyses. The contralateral hemisphere was dissected for isolation of the hippocampus and cortex. Samples were homogenized in a lysis buffer (150 mM NaCl and 1% Triton in Tris-buffered saline) containing phosphatase (Pierce) and protease (Roche) inhibitors and centrifuged for 20 minutes at 15000 g. The same procedure was applied to human samples (GIE NeuroCEB Brain Bank).

ELISA

The Aβ extracted was quantified with the MSD Human Aβ42 V-PLEX Kit and the triplex Aβ Peptide Panel 1 (6E10) V-PLEX Kit (Meso Scale Diagnostics, Rockville, USA). βCTF was determined with the IBL Human APP βCTF Assay Kit (IBL International GmbH, Hamburg, Germany). Hyperphosphorylated Tau was determined with the Innogenetics Phospho-Tau 181P kit (Fujirebio Europe, Ghent, Belgium). ELISA was performed according to the kit manufacturer's instructions in each case.

Western blotting

Equal amounts of protein (30 µg) were separated by electrophoresis in NuPAGE Bis-Tris Gels (Life Technologies) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were hybridized with various primary antibodies.

Immunohistochemistry and image acquisition

Cryosections were washed with 0.25% Triton in PBS and saturated by incubation (0.25% Triton in PBS / 5% goat serum). They were then incubated with primary antibodies (APP C-

ter, 1/500, Millipore; 4G8-Biotin, 1/1000, Covance; 6E10, 1/500, Covance; BAM10, 1/500, ThermoFisher). Images were taken with a Nikon Eclipse Ti Microscope or a Leica TCS SP8 confocal microscope and analyzed with ImageJ software (NIH).

Behavioral assessment

Open-field. The apparatus consisted of an open-topped, clear plexiglas box measuring 90 x 90 x 70 cm placed in a room with controlled dim lighting (40 lux) and constant white noise at 40 dB. The rats were placed in the center of the arena and a video recording was made over a period of ten minutes. The behavior of the animals was analyzed from this video. The arena was divided into a central region and a peripheral region, and the time spent in the center and periphery of the open-field was measured.

Novel Object Recognition. The apparatus consisted of a square open-field (90 × 90 × 70 cm) placed in a room with weak controlled luminosity (40 lux) and constant 40 dB white noise. Two identical objects were placed symmetrically 25 cm away from the arena corners. Rats were free to explore the objects for 10 min. Rats then returned to their home cage for 24h retention interval. To test short-term recognition memory, one familiar object and one novel object were placed in the apparatus, and rats were free to explore for a 10-min period.

Ymaze. The apparatus consisted of three identical arms separated by 120°. Various extra maze cues were placed on the surrounding walls. One arm of the Y-maze was blocked and the rat was allowed to explore the other two arms for five minutes. Visual clues were positioned around the maze. The starting position was varied pseudorandomly, between the three arms. The animal was then returned to its home cage. Sixty minutes later, the rat was placed in the maze again, this time with all three arms open, and allowed to explore for an additional five minutes. The distance travelled and the number of times where rat entered in each arm were measured both during initial exposure to the maze and during testing.

Morris Water Maze. Experiments were performed in a tank 180 cm in diameter and 50 cm deep, filled with opacified water kept at 21°C and equipped with a platform of 18 cm in diameter, kept submerged 1 cm below the surface of the water. Visual clues were positioned around the pool, to provide the mouse with spatial landmarks, and luminosity was maintained at 350 lux. The rats were initially exposed to a learning phase, which consisted of daily

sessions (three trials per session) on five consecutive days. The starting position was varied pseudorandomly, between the four cardinal points. A mean interval of 20 minutes was left between trials. The trial was considered to have ended when the animal reached the platform. Long-term spatial memory was assessed 72 and 120 hours after the last training trial in a probe trial in which the platform was no longer available. Animals were monitored with the EthoVision software.

Ex vivo electrophysiology

Material and methods on going

Preliminary results

Co-injection of AAV-PS1 and AAV-APP vectors leads to transgenes expression in the hippocampus of wild-type rats, from one month after injection

To trigger an Alzheimer-like APP processing in the hippocampus of WT rats, we generated AAV vectors encoding human mutant $PS1_{M146L}$ and human mutant APP_{SL} that we injected bilaterally into the stratum lacunosum of the hippocampus of eight-weeks-old WISTAR rats (**Fig. 1A**). We used the AAVrh.10 capsid, that we showed as efficient in mice (Audrain et al., 2016) and the AAV9 also known to transduce the hippocampus efficiently (Fol et al., 2015). To monitor vector-mediated APP and PS1 expression, rats were killed one month after injection. Western blots analyses of whole hippocampus from AAV9 injected rats revealed comparable human PS1 expression in AAV-PS1 and AAV-APP/PS1 rats. The human APP level is also less in the co-injected group compared to the AAV-APP one. With AAV10, transgenes expression was detectable in some rats but considerably lower (**Fig. 1B**). Therefore, only AAV9 is used for the rest of the study. Immunohistochemical analyses of hippocampal sections using an APP C-ter antibody revealed a noticeable overexpression of APP easily detectable in the AAV-APP rats and observed in different subfields of the hippocampus such as the CA2, CA3, subiculum and dentate gyrus. No signal was detected in the CA1 layer (**Fig. 1C**). Consistent with the result on the mouse model (Audrain *et al.,* 2016), the human APP expression in the AAV-APP/PS1 group was not sufficient to be detected by immunohistochemistry (data not shown).

Similar levels of human APP, βCTF and Aβ ratios are observed in the hippocampus of AAV-APP/PS1 rats and AD patients, from one month after injection

To assess the amyloidogenic processing of the exogenous APP, we evaluated the human APP, βCTF (C99) and Aβ levels and compared it to hippocampi samples from human AD cases and age match controls. Human APP and βCTF levels were similar between AAV-APP/PS1 rats and AD cases. They were also different from human controls and AAV-APP rats (**Fig. 1D-E**). We confirmed a different Aβ ratio between human controls and AD patients and then observed a similar ratio between AD patients and AAV-APP/PS1 rats (**Fig. 1F**). Together, these results confirm that co-injection of both vectors into the hippocampus of WT rats leads

to an APP processing similar to that observed in the hippocampus of AD patients.

Aβ42 and Aβ40 levels differs between hippocampal and CSF samples and change with aging

Using a multiplex ELISA, we compared the levels of human Aβ42 and Aβ40 at 1, 3, 8 and 30 months post-injection, in the hippocampus and in the CSF (3 months analyses are on going). The amount of Aβ42 increase with aging in the hippocampus while Aβ40 trends to decrease at 30 months (**Fig. 2A**). We quantified an increase of both peptides during the first 8 months in the CSF, which then decrease in 30 months samples (**Fig. 2B**). It appear that these analyses show a difference during the early stages where Aβ42 levels are higher in the CSF compared to the hippocampus, and conversely at 30 months (**Fig. 2C**). Interestingly, this Aβ42 decrease in the CSF at later stages is something knew in patients (Sunderland et al., 2003).

AAV-APP/PS1 rats present a strong increase of tonic glutamatergic current at 3 months post-injection followed by a downward trend of LTP and LTD

As we previously done in mice, we firstly assessed the functionality of glutamatergic synapses by electrophysiological analyses on hippocampal slices. We evaluated the long-term potentiation (LTP) of glutamate synaptic transmission in rats, three months after injection. A trend towards a decrease in LTP expression following high-frequency stimulation (**Fig. 3A**) and theta burst stimulation (**Fig. 3B**) was found to be linked to the co-expression of both vectors. Despite a decrease during the first twenty minutes with the 3x100 Hz stimulation, the global LTP decrease is not a significant effect at this age. Beside, we evaluated the long-term depression and despite a good downward trend, the effect is also non significant (**Fig. 3C**). We then recorded the tonic glutamatergic current whose amplitude was significantly greater in the AAV-APP/PS1 rats (**Fig. 3D**). Interestingly and desptite a non significant effect, we also measured an increase of the gabaergic tonic current (**Fig. 3D**). Several new cohorts at 3 and 8 months post-injection are currently awaiting to firstly increase the number of animals and secondly see how it evolves.

AAV-APP/PS1 rats present subtle behavioral impairments at 8 months post-injection

We evaluated weather human APP processing in AAV-APP/PS1 rats could be associated with cognitive and behavioral dysfunctions. We used, as for previous experiments, AAV-PS1 rats as the control group. In the open-fied task, the total distance travelled during the session as well as the time spend in the center of the area seems to decrease in AAV-APP/PS1 rats compared to AAV-PS1 rats. Despite a significant group effect with a two-way anova, there is no interaction (**Fig. 4A-B**). The number of animals will be increased in a few months with new cohorts generated. We then performed the novel object recognition task and no change in behavior face to a new object has been displayed (**Fig. 4C**). Beside, we detected in the Y-maze task a significant decrease of time spent in the new arm but only 8 months after the injection (**Fig. 4D**). Finally, we assessed the Morris water maze task. During the five training days, the travelled distance to find the hidden platform as well as the time spend in the target quadrant, where there is the platform, was not different between both groups over time (**Fig. 4E-F**). We then performed two probe trials at 4h (**Fig. 4G**) and 120h (**Fig. 4H**) after the last training session. No significant difference was detected in the 4h probe test compared to the 120h one where a group effect was confirmed ($p=0.02$) meaning than AAV-APP/PS1 rats spend generally less time in the target quadrant compared to the AAV-PS1 rats.

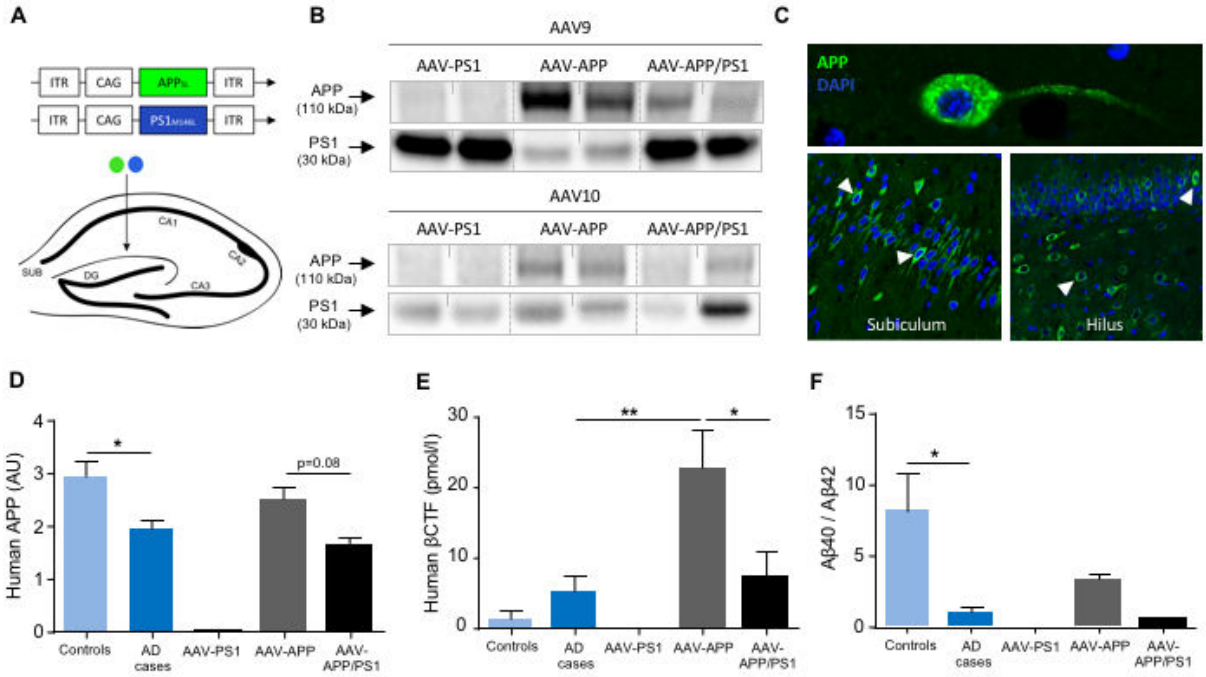
AAV-APP/PS1 rats present amyloid plaques and AT8 positive cells at 30 monts post-injection

Most AD animal models accumulate amyloïd plaques due to an overexpression of transgenes and an accumulation of Aβ over time. Here, we evaluated the amyloid deposition in AAV-APP/PS1 model with several antibodies. While no amyloid deposition was detected at 15 months post-injection (data not shown), immunostaining with 4G8, 6E10 and BAM10 antibodies revealed amyloïd plaques at 30 months post-injection and compared to WT and AAV-PS1 rats at the same age (**Fig. 5A**). Interestingly, the plaques were mainly located in the subiculum of the hippocampus (**Fig. 5B**) and also accumulated between different tissue layers (**Fig. 5C**). Consistent with these results, we performed other stainings such as congo red or thioflavine S but no deposit was detected meaning that most of them are soluble plaques (data not shown). Despite this, we have been able to detect plaques at different formation stages (**Fig. 5D**). We then highlight AT8 positive cells in the hylus and subiculum of AAV-APP/PS1

rats still at 30 months post-injection. We didn't observe any AT100 positive cells (data not shown).

Preliminary figures and legends

Figure 1: Stereotactic injection of AAV vectors induces, 1 month after injection in Wistar rats, the neuronal expression and processing of human APP with similar levels of amyloid derivatives compared to AD patients



WISTAR rats (all males) were injected at 8 weeks of age either with AAV-CAG-$PS1_{M146L}$ (AAV-PS1 rats, n=4), AAV-CAG-APP_{SL} (AAV-APP rats, n=4) or both vectors at the same doses as for the other two groups (AAV-APP/PS1 rats, n=4). All rats were killed 1 month later for analyses.

(**A**) Upper panel: schematic representation of AAV constructs enabling the expression of human APP_{SL} and $PS1_{M146L}$. Bottom panel: coronal diagram showing the injection site and the architecture of the rat hippocampus.

(**B**) Representative western blots of whole hippocampi showing the transgenes expression in the three groups of rats. For each construction, AAV9 and AAV10 capsids were tested. Because AAV9 appears more efficient to trigger transgenes expression in the hippocampus, this serotype will be used for the rest of the study.

(**C**) Magnified confocal images showing the APP overexpression in an AAV-APP injected rat one month after injection. The APP is detected in some neurons of the subiculum and dentate

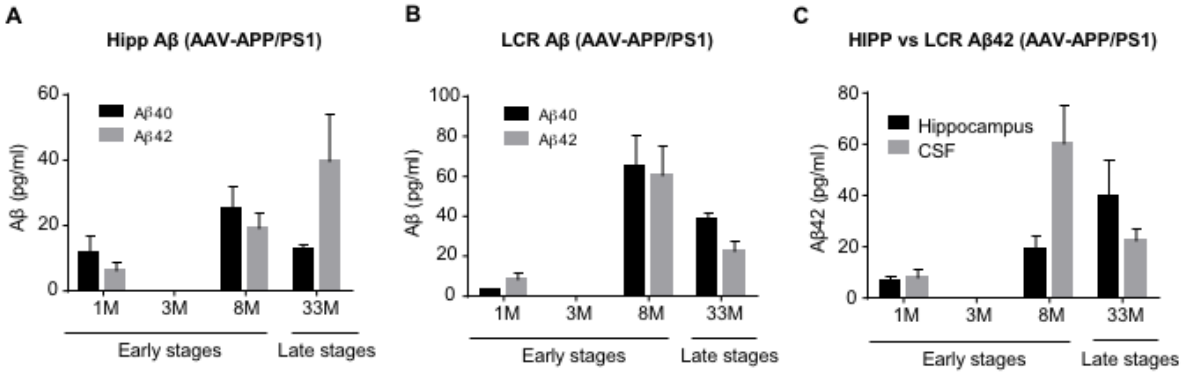
gyrus hilus but also in the CA3 and CA2 of the hippocampus (not shown).

(**D**) Densitometric analyses for human APP in the hippocampus, showing a comparison between human controls and AD cases (n=5 per group), AAV-PS1 rats (n=4), AAV-APP rats (n=4) and AAV-APP/PS1 rats (n=4). For quantification, signal intensities were normalized to GAPDH used as a loading control. Bars represent means ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test where * denotes $p<0.05$.

(**E**) Comparative analysis of human βCTF by ELISA between the same groups previously described in **D**. Bars represent means ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test where * and ** denotes $p<0.05$ and $p<0.01$ respectively.

(**F**) Comparative analysis of human Aβ40/Aβ42 ratio by ELISA between the same groups previously described in **D**. Bars represent means ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test where * denotes $p<0.05$.

Figure 2: Aβ42 and Aβ40 levels differ between hippocampal and CSF samples and are modified with aging



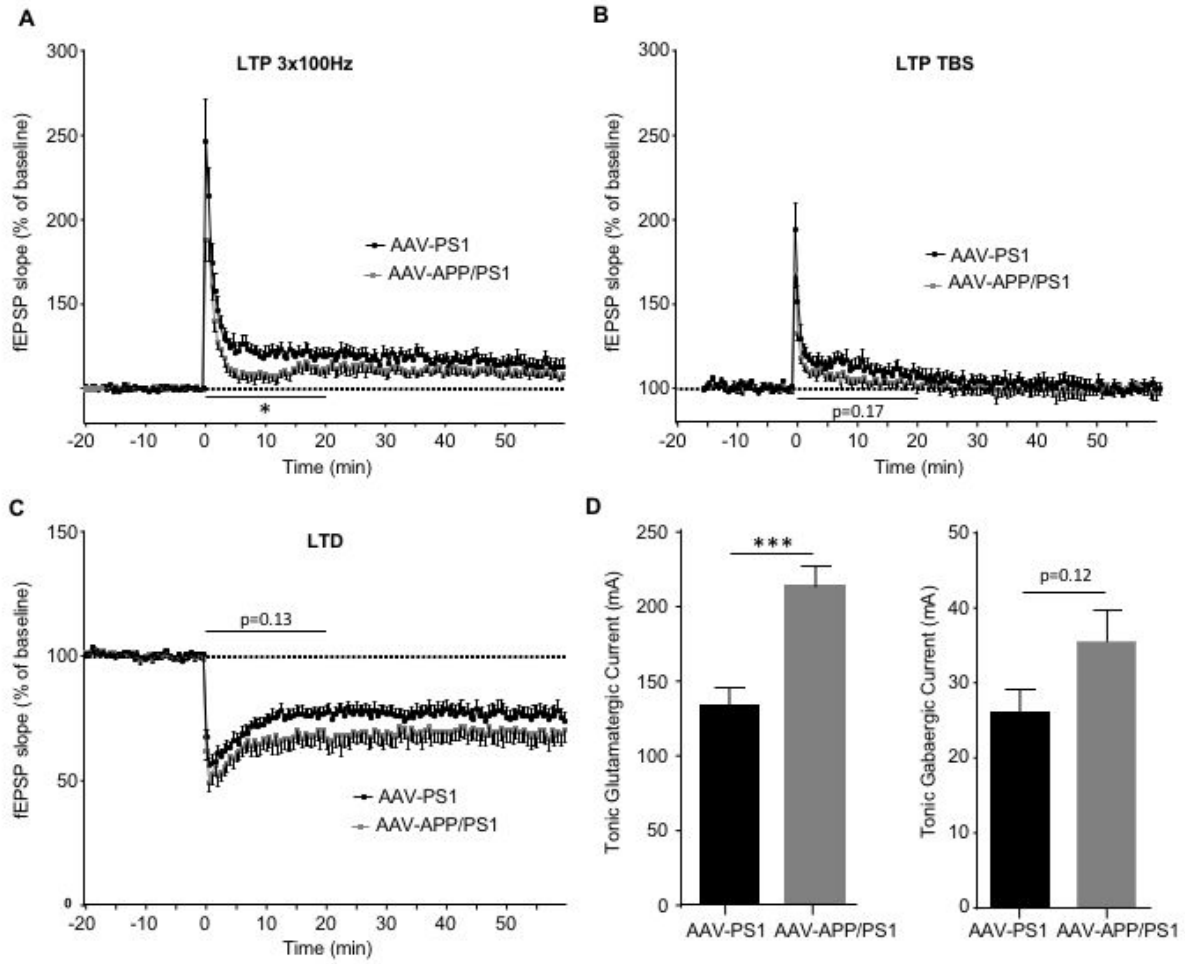
WISTAR rats (all males) were injected at 8 weeks of age either with AAV-CAG-PS1$_{M146L}$ and AAV-CAG-APP$_{SL}$ (n=19). All rats were killed at 1 month, 8 months or 30 months later for analyses. Data at 3 months post-injection are on going.

(**A**) Comparative analyses by multiplex ELISA of human Aβ42 and Aβ40 in the hippocampus of AAV-APP/PS1 rats at different ages.

(**B**) Comparative analyses by multiplex ELISA of human Aβ42 and Aβ40 in the CSF of AAV-APP/PS1 rats at different ages.

(**C**) Comparative representation of Aβ42 levels between hippocampus and CSF samples of AAV-APP/PS1 rats at the same ages than previously described.

Figure 3: AAV-APP/PS1 rats present an increase of tonic glutamatergic current at 3 months post-injection before strong impairments of LTP and LTD



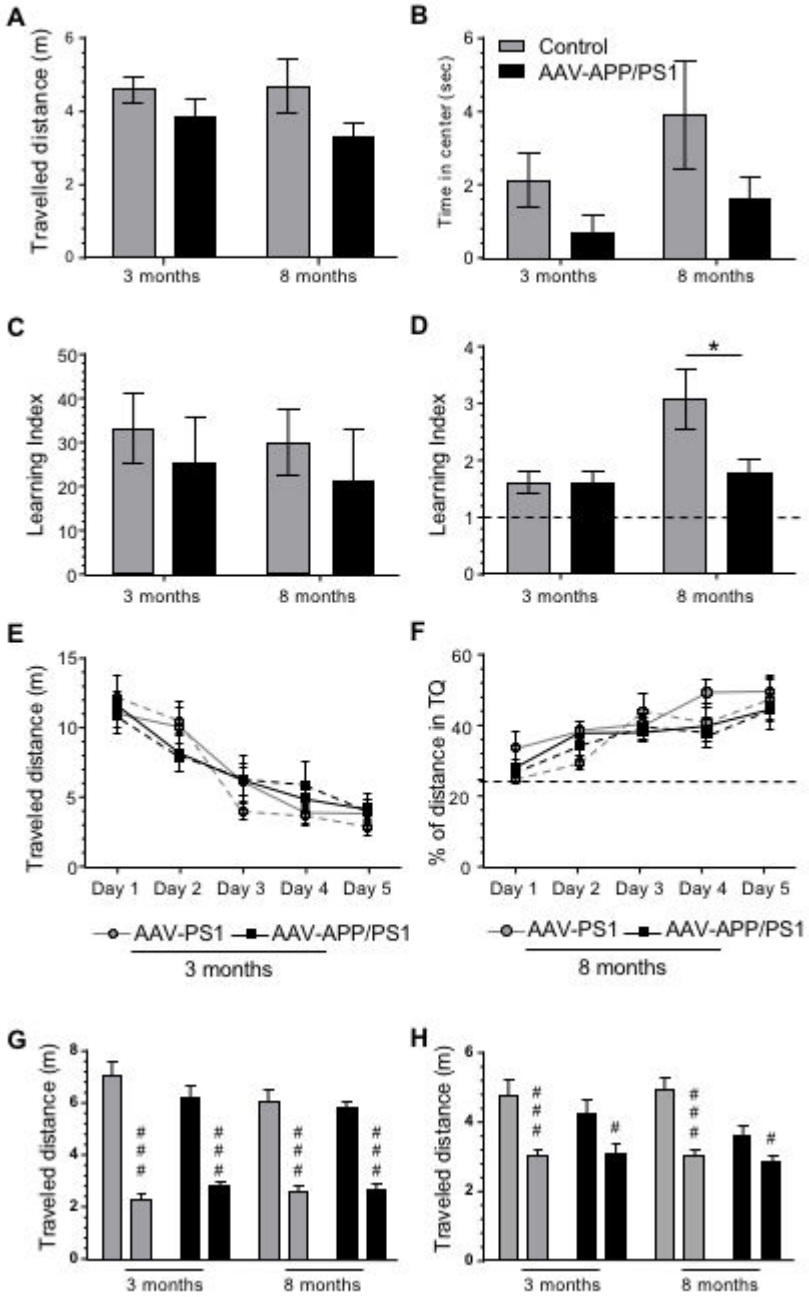
(**A**) Strong saturating long-term potentiation (LTP) over 75 min induced by high-frequency stimulation showing a lower LTP in the AAV-APP/PS1 slices (grey, n=10) during the first 20 minutes compared to the AAV-PS1 slices (black, n=10).

(**B**) Summary data for LTP induced by a weaker stimulation (theta-burst stimulation) between AAV-PS1 slices (black, n=10) and AAV-APP/PS1 slices (grey, n=10).

(**C**) Summary long-term depression (LTD) data for slices from AAV-PS1 rats (black, n=10) and AAV-APP/PS1 rats (grey, n=10).

(**D**) Diagrams showing the tonic glutamatergic current (left, n=10) and the tonic gabaergic current (right, n=5) recorded by whole cell patch-clamp. Bars represent means ± SEM. Statistical analysis was performed with Student's t-test where *** denotes $p<0.001$.

Figure 4: AAV-APP/PS1 rats presents subtle behavioral impairments, 8 months after injection



WISTAR rats were injected at 8 weeks of age (all males) either with AAV-CAG-PS1M146L (AAV-PS1 rats used as an injected control group, n=9) or AAV-CAG-APPSL + AAV-CAG-PS1M146L (AAV-APP/PS1 rats, n=9) and behavioral analyses were performed three or eight months later.

(**A-B**) Open-field assay. Traveled distance (A) and time in center (B) during the open-field task show a difference between both groups (group effect = 0.0058 (A) and 0.0074 (B)) but

without interaction.

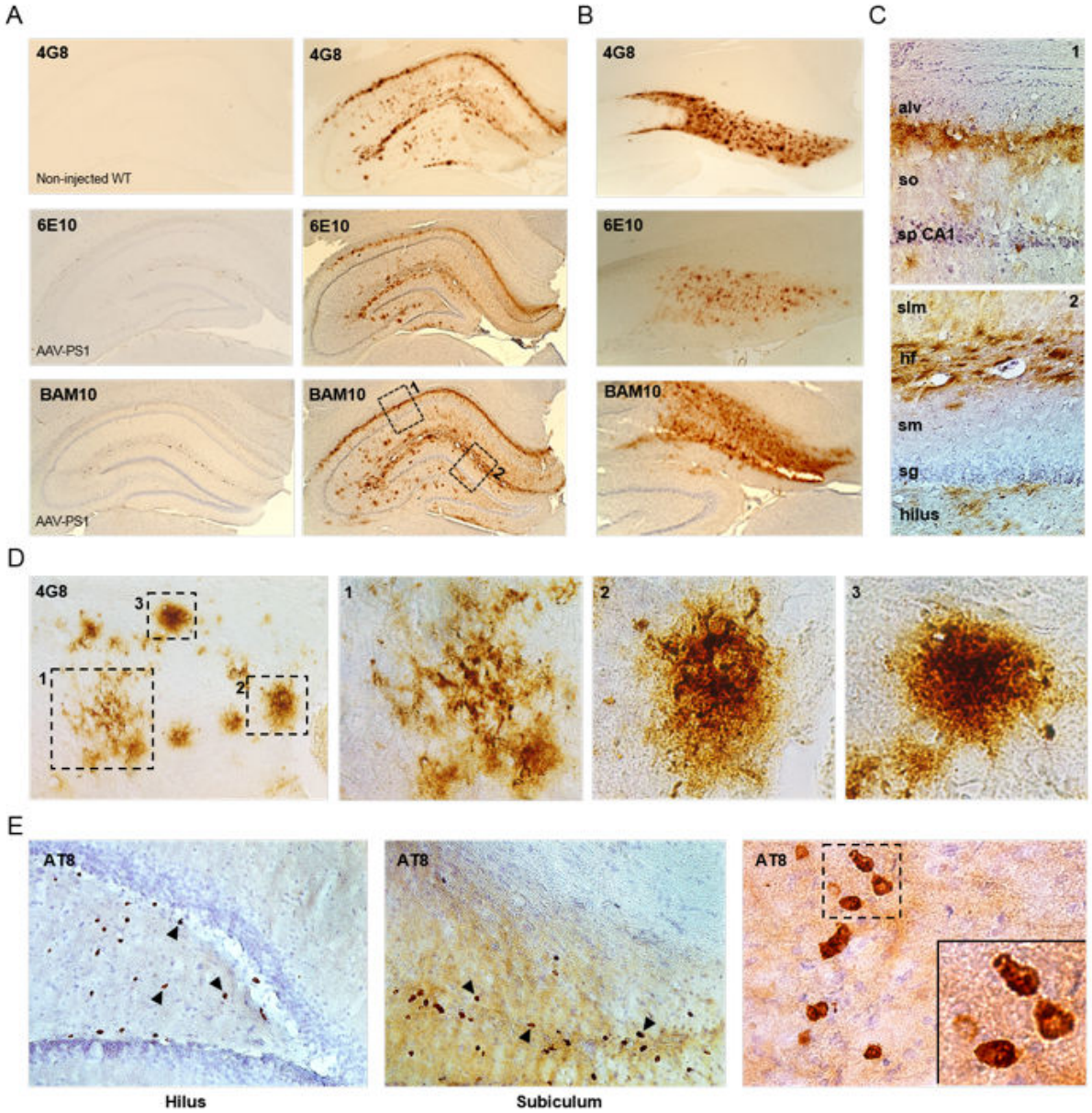
(**C**) Novel object recognition assay. The learning index correspond to (exploration time (new object – familiar object) /(new object + familiar object)*100 and show no significant difference between both groups.

(**D**) Y-maze assay. The learning index correspond to (exploration time in new arm / exploration time in familiar arm) and show a significant difference only at 8 months post-injection (p=0.045).

(**E-H**) Morris Water Maze assay. (E) Travelled distance to find the platform during the five training days showing no significant difference between both groups at 3 months post-injection. (F) Percentage of distance in the target quadrant during the five training days showing no significant difference between both groups. (G-H) Travel distance in the target quadrant (right bar) versus the three other quandrants (left bar) during the probe test at 4h (G) and 120h (H) after the last training session.

Bars represent means ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test when interaction. * correspond to AAV-PS1 versus AAV-APP/PS1 while # correspond to target quadrant versus the mean of other quadrants.

Figure 5: AAV-APP/PS1 rats reveal an AD-like pathology at 30 months post-injection



WISTAR rats were injected at 8 weeks of age (all males) either with AAV-CAG-PS1M146L (AAV-PS1 rats used as an injected control group, n=9) or AAV-CAG-APPSL + AAV-CAG-PS1M146L (AAV-APP/PS1 rats, n=6). Non-injected WISTAR rats (n=2) have been also used. All rats were killed 30 months later for analyses.

(**A**) Immunohistochemistry with 4G8, 6E10 and BAM10 antibodies showing amyloid deposition in coronal sections of non-injected WT, AAV-PS1 and AAV-APP/PS1 hippocampi. Hematein staining was performed in addition to the 6E10 and BAM10 staining.

(**B**) Plaque pathology in the subiculum of AAV-APP/PS1 rats with the same three staining than previously described. Subiculum appear as the area where most of plaques are observed.
(**C**) Higher magnification of amyloid deposition at the junction of tissue layers. alv: alveus; so: stratum oriens; sp CA1: stratum pyramidale of the CA1 region; slm: stratum lacunosum-moleculare; hf: hippocampal fissure; sm: stratum moleculare; sg: stratum granulosum.
(**D**) Examples of amyloid plaques at different stages of formation (4G8 antibody) from a beginning state (box 1) to a more dense state (box 3).
(**E**) Immunohistochemistry with an AT8 antibody showing hyperphosphorylated neurons at both serine 202 and threonine 205 in the hilus and subiculum of the hippocampus of AAV-APP/PS1 rats. Note a diffuse positive signal in the subiculum.

Discussion et perspectives

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à créer de nouveaux modèles animaux afin de disposer et de proposer des outils pertinents pour la compréhension des événements initiaux de la MA. Je discuterai dans cette partie de nos principales conclusions déjà énoncées pour la plupart dans la discussion de l'article 1, ainsi que des perspectives et projets parallèles rattachés à ce projet.

Discussion des résultats

L'expression des transgènes

Nous avons utilisé une APP humaine de type 751 car il a été montré que la forme 695 était moins permissive à la formation d'Aβ et donc à développer les marqueurs de la MA chez la souris[200]. L'utilisation d'une forme doublement mutée puis la co-injection d'un vecteur codant la PS1 nous a permis d'augmenter la spécificité du clivage de l'APP en Aβ42. Notre objectif était donc d'**avoir un système efficace sans pour autant l'exprimer dans l'organisme entier**. Nous avons ciblé l'hippocampe puisqu'il s'agit d'une des premières régions cérébrales touchées dans la MA et parce qu'indispensable à la transformation de la MCT en MLT. Nous avons choisi de ne faire qu'une simple injection (à 1 mois d'âge) avec un titre viral loin du maximum injectable. L'idée étant de montrer *in vivo* qu'**un métabolisme amyloïde limité de l'APP est suffisant pour déclencher une cascade de processus délétères**. Nous avons également montré que les niveaux d'APP surexprimés sont moins élevés dans le groupe doublement injecté que dans le groupe AAV-APP, ce qui est intéressant pour nous puisque désirant limiter au minimum cette surexpression. La première hypothèse pour expliquer cette différence d'expression de l'APP humaine est qu'un équilibre plus favorable au clivage amyloïdogénique de l'APP dans le groupe AAV-APP/PS1 se créer. Nous avons d'ailleurs quantifié plus d'Aβ dans ce groupe. La deuxième hypothèse pourrait être qu'une injection de deux vecteurs conduit à une expression moindre de chaque transgène. Cette explication semble moins plausible puisque la protéine PS1 est exprimée de la même façon dans les groupes AAV-PS1 et AAV-APP/PS1. L'expression de nos transgènes est également restreinte à quelques cellules de l'hippocampe. Nous avons ainsi montré une surexpression d'APP uniquement dans les cellules du CA2 et du subiculum chez la souris, et de façon plus dispersée chez le rat. Nous devrions cependant réaliser une analyse plus fine sur les

différentes régions de l'hippocampe (via des punchs ou de la microdissection laser puis une analyse par qPCR) afin de vérifier plus en détail l'expression de nos transgènes.
Cette observation est particulièrement intéressante dans le contexte de l'article récemment publié par Bushman et al qui démontre un mosaïcisme génétique pour le gène *APP* dans les neurones de patients atteints de MA sporadique. Ce travail montre que les neurones des patients atteints de la MA sont quatre fois plus susceptibles de contenir plus que les deux copies normales de ce gène, certains contenant jusqu'à 12 copies[201]. On pourrait ainsi imaginer que quelques neurones, avec un nombre de copies plus élevé du gène *APP*, pourrait rendre compte des formes sporadiques de la MA ainsi que de la présence de plaques chez des personnes non démentes. Mon travail semble également aller dans ce sens puisque dans les modèles que nous avons développés, seules quelques cellules surexpriment l'APP humaine et cela est suffisant pour déclencher différents processus ainsi que la formation de plaques comme je l'ai décrit chez le rat.

Métabolisme de l'APP

L'équilibre entre les niveaux d'APP taille entière et ses fragments de clivage est important. Il semble ainsi qu'une surexpression « légère » d'APP mutée soit bénéfique[168]. Il semble également que surexprimer de l'Aβ42 sans métabolisme préalable de l'APP n'entraîne aucun trouble mnésique[202]. De plus, un métabolisme très important de l'APP, comme dans la majorité des modèles de surexpression, entraine des troubles mnésiques assez tardivement. La stratégie que nous avons employée est intermédiaire puisque nous produisons de l'Aβ42, tout en favorisant un métabolisme complet de l'APP avec l'ensemble de ces fragments, mais dans des quantités moindres que dans les autres modèles de surexpression. Ceci pourrait être une des raisons expliquant les défauts cognitifs que nous observons précocement à 3 mois post-injection. Une deuxième explication pourrait être les niveaux d'APP et d'Aβ très proches de ce que l'on a quantifié dans l'hippocampe des patients et ce, à la différence des souris APP/PS1ΔE9. Plus que le niveau réel d'Aβ42, nous pensons que le ratio Aβ42/Aβ40 est plus pertinent. Non seulement ce ratio est semblable entre l'hippocampe des patients et ceux de nos modèles, mais il a en plus été montré que l'Aβ40 altère la stabilité, la solubilité ainsi que les propriétés d'agrégation de l'Aβ42[203]. Il a également été proposé que les monomères d'Aβ40 peuvent inhiber l'agrégation des monomères d'Aβ42 et ce de façon ratio dépendante[204]. De plus, la quantité d'Aβ40 dans les souris APP/PS1ΔE9 est plus bien plus élevée que l'Aβ42, d'ou un ratio plus faible. Ceci pourrait également expliquer que

l'apparition des défauts mnésiques dans ce modèle est tardive (autours de 12-14 mois), alors que des quantités bien supérieures d'Aβ et de plaques sont détectées.
Un autre argument en faveur de l'importance de ce ratio est le groupe AAV-APP qui exprime de l'APP humaine et qui produit également de l'Aβ42 et de l'Aβ40. Pour autant, nous n'observons pas dans ce groupe d'altérations de certains paramètres comme une hyperphosphorylation de Tau, une baisse de PSD-95 et GLT-1 ou encore une baisse du courant tonique glutamatergique. Le niveau de surexpression d'APP (plus élevé dans ce groupe) ainsi que le ratio Aβ42/Aβ40 (moins proche de ce que l'on observe chez les patients) pourraient là encore expliquer cette différence.
Nous avons également mis en évidence dans notre modèle une production du fragment humain sAPPα bien plus importante que celle du sAPPβ (**Figure 24**). Il semble donc que la majorité de l'APP que nous surexprimons soit clivée selon la voie non-amyloïdogénique. Nous prévoyons donc d'autres expériences pour préciser ce métabolisme de l'APP qui est encore mal compris et qui s'est d'ailleurs vu très récemment agrémenté d'une nouvelle voie de clivage par la η-sécrétase[205].

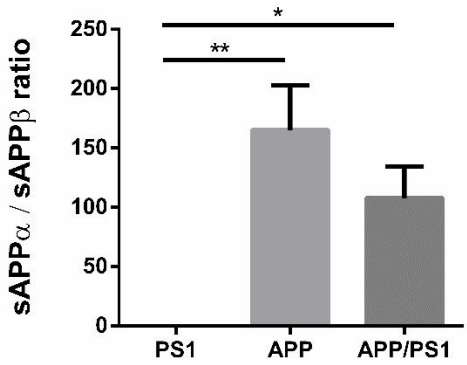


Figure 24 : Ratio sAPPα / sAPPβ dans l'hippocampe de souris injectées à 3 mois post-injection

Hypothèse formulée

En tenant compte uniquement de nos résultats, nous avons proposé une explication quant au décours des évènements. Il semble dans un premier temps que le métabolisme de l'APP, la production d'Aβ et son ratio adéquate ne déclenchent une série d'événements qu'à partir d'un **seuil critique**. Les niveaux d'Aβ42 dans l'hippocampe de notre souris AAV-APP/PS1 sont bien inférieurs à ce que l'on mesure dans l'hippocampe des patients atteints de la MA. Cependant, ces patients sont décédés de la maladie et ont été catégorisés au moment du

prélèvement au stade le plus avancé : Braak 6 et Thal 5. En revanche, les niveaux d'Aβ42 des souris AAV-APP/PS1 sont plus élevés que ceux mesurés dans les hippocampes des patients contrôles, tout comme le ratio Aβ42/Aβ40. Ainsi notre souris AAV-APP/PS1 pourrait représenter un stade précoce ou prodromal de la maladie chez nos modèles. Nous devrions toutefois nous procurer des échantillons de patients à différents stades de la maladie pour confirmer cette hypothèse. Une fois ce seuil critique dépassé, comme dans nos groupes AAV-APP/PS1, on observe une diminution de GLT-1 qui est impliqué dans la recapture du glutamate par les astrocytes. Sa diminution pourrait entraîner une augmentation du glutamate dans l'espace synaptique. La diminution de PSD-95 que l'on observe pourrait également entrainer une internalisation de récepteurs NMDA synaptiques (sNMDAR) et donc entrainer une augmentation supplémentaire de glutamate dans l'espace synaptique. Ceci aurait pour conséquence un débordement du glutamate dans l'espace extrasynaptique avec une activation préférentielle des récepteurs NMDA extrasynaptiques (eNMDAR), ce que l'on mesure avec l'enregistrement du courant tonique (**Figure 25**). Plusieurs études ont déjà discuté l'implication des eNMDARs dans les maladies neurodégénératives[206-208]. De plus, il a été montré chez des vieux rats une activation préférentielle des eNMDARs, probablement due à la distribution altérée du glutamate dans l'espace extrasynaptique[209]. Etant donné que nos modèles souris et rats présentent cette augmentation du courant tonique, nous disposons d'outils relevants pour identifier plus en détails ces mécanismes. Nous sommes d'ailleurs en train de mettre en place une étude sur des rats AAV-APP/PS1 traités à la mémantine qui a été montré comme efficace dans l'inhibition des eNMDARs[210]. Une autre hypothèse complémentaire serait que le débordement du glutamate ne soient pas uniquement lié à cette baisse de GLT-1 et PSD-95, mais également à une augmentation du relargage de glutamate par les astrocytes[211]. Les auteurs de cette étude ont mis en évidence que la libération glutamatergique astrocytaire par l'Aβ est Ca^{2+} dépendante et en partie due à l'activation des récepteurs α7 nicotiniques. Nous envisageons de tester cela sur nos modèles et de regarder plus en détails d'autres paramètres tels que NR2B qui est une sous-unité majoritairement exprimée par les eNMDARs.

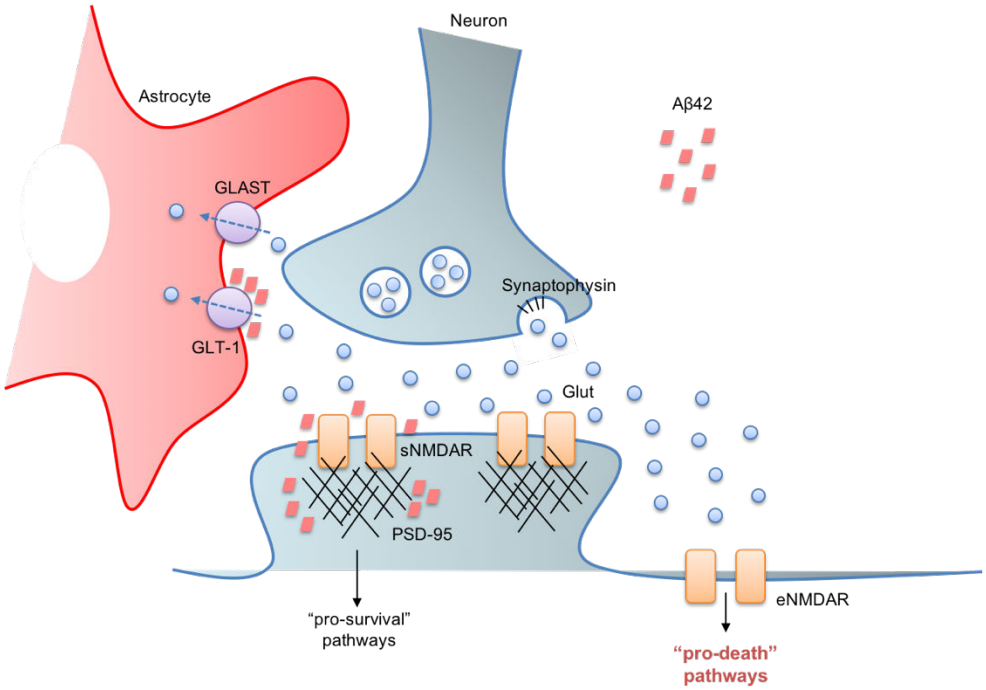


Figure 25 : Hypothèse formulée

Des travaux de l'équipe d'Alain Buisson en 2010 ont montré que l'activation de ces récepteurs (contrairement aux sNMDARs) modifie le pattern d'expression de l'APP et augmente ainsi l'Aβ[212]. Cet effet serait précédé par un changement d'isoformes de l'APP avec un passage d'une forme 695 sans domaine KPI, a une APP contenant un domaine KPI (ex : APP 751 ou 770), résultant en l'augmentation d'Aβ. Nous pourrions imaginer que ce système puisse constituer une boucle autoalimentée ou l'Aβ, comme nous l'avons démontré, entrainerait une activation des eNMDARs qui de ce fait permettrait une élévation des niveaux d'Aβ. Ceci s'amplifierait avec l'âge jusqu'à entrainer des défauts plus prononcés et la formation de plaques amyloïdes. L'Aβ augmentant chez l'Homme avec l'âge, il n'est pas absurde d'imaginer qu'à partir d'un certain seuil, cette hypothétique boucle puisse s'enclencher et ainsi accélérer le développement de la maladie. D'autres études ont par ailleurs montré que l'Aβ soluble pouvait induire sa propre production en augmentant l'expression de Bace1[101].

Notre stratégie nous permet également de proposer une suite ordonnée de certains évènements. Il semble par exemple qu'une altération du courant tonique glutamatergique intervienne avant une altération significative de la LTP. Une baisse de GLT-1 semble également apparaitre avant une baisse de GLAST, de même pour PSD-95 par rapport à la synaptophysine. Cette dernière observation est d'autant plus intéressante que beaucoup d'études, dont celles de Thomas Südhof, discutent de l'implication précoce de perturbations

sur l'élément présynaptique dans les maladies neurodégénératives avec, par exemple, des déficits dans la formation des complexes SNAREs et dans le relargage des neurotransmetteurs[213-215]. Avec ces résultats sur les eNMDARs et sur PSD-95, nous montrons que l'élément post-synaptique est très certainement touché dans les premiers stades. Il serait pour autant très intéressant pour nous d'étudier en plus les différentes composantes du compartiment présynaptique.

L'implication de Tau

Nous avons mis en évidence une hyperphosphorylation de la protéine Tau endogène dans nos groupes AAV-APP/PS1 et ce dès le premier mois qui suit l'injection (**Figure 26**). Bien qu'à 1 mois post-injection l'hyperphosphorylation ne soit pas significative, elle l'est à 3 mois. Ceci peut s'expliquer par la chirurgie et la diffusion virale (qui dure approximativement 6 semaines avec l'AAV10 et 2 semaines avec l'AAV9) qui entraine une inflammation et qui peut elle-même induire une hyperphosphorylation de Tau. Nous avons également corrélé cette hyperphosphorylation à une augmentation de la protéine GSK-3β. Il s'agit d'une augmentation de la quantité totale de la kinase et non de son activité. Nous n'avons détecté aucune modification de GSK-3β phosphorylée sur son site inhibiteur (Ser9) mais nous ne savons pas ce qu'il en est pour son site activateur. Nous sommes actuellement en train de planifier des tests d'activités enzymatiques sur différentes enzymes telles que GSK-3β, CDK5 ou encore DYRK.

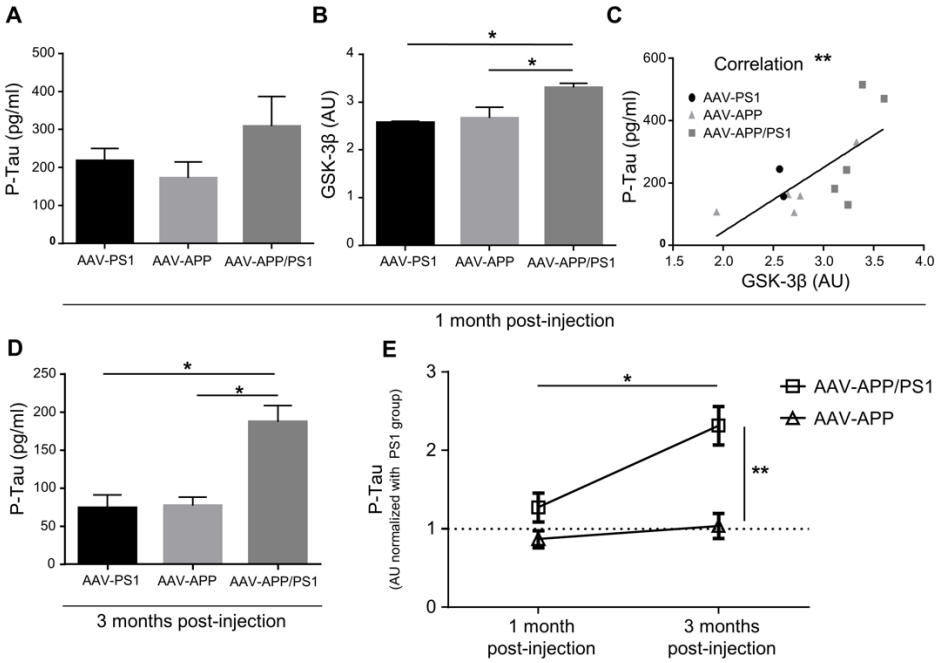


Figure 26 : Hyperphosphorylation de Tau dans les souris AAV-APP/PS1

(A) Hyperphosphorylation de Tau (AT270, Thr181) mesurée par ELISA à 1 mois post-injection dans l'hippocampe des souris injectées (n=3-5 souris par groupe). (B) Niveau de GSK-3β mesurée par ELISA dans les mêmes hippocampes que pour A (n=3-5 souris par groupe). (C) Corrélation entre les niveaux de phosphorylation de Tau et la quantité de GSK-3β (n=13 souris). (D) Hyperphosphorylation de Tau (AT270, Thr181) mesurée par ELISA à 3 mois post-injection dans l'hippocampe des souris injectées (n=3-5 souris par groupe). (E) Analyse de l'hyperphosphorylation de Tau en fonction du temps avec une normalisation par le groupe AAV-PS1 et l'utilisation de 4 cohortes indépendantes (n=17-21 souris par groupe).

A 3 mois post-injection, nous n'avons détecté aucune réaction astrocytaire et microgliale qui aurait été synonyme d'une inflammation (**Figure 27**). On peut donc supposer une action directe de l'Aβ ainsi que l'activation des eNMDARs[211] pour hyperphosphoryler Tau. Ces résultats démontrent également que le lien qui existe entre la voie amyloïde et la voie Tau est probablement plus proche et plus précoce que ce qui a longtemps été suggéré.

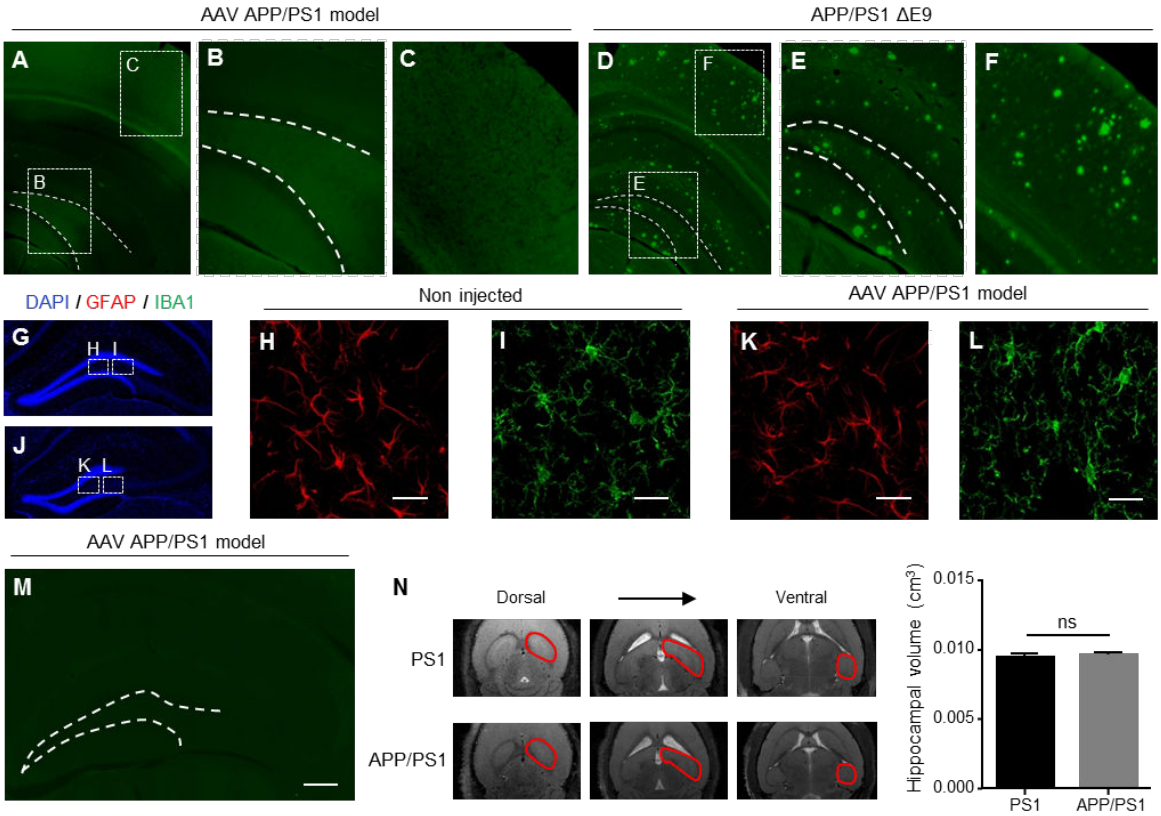


Figure 27 : Pas de formation de plaque amyloïde, de gliose, de mort neuronale et d'atrophie dans les souris AAV-APP/PS1

(A-F) Traitement à la Thioflavine S de coupes coronales de souris AAV-APP/PS1 de 12 mois (A-C) versus des souris APP/PS1ΔE9 du même âge (D-F). (G-L) Immunohistochimies anti GFAP (H,K) et Iba1 (I,J). Bleu = DAPI, échelle représente 50 µm. (M) Immunohistochimie utilisant un kit de mort cellulaire pour détecter l'ADN fragmenté et l'apoptose, l'échelle représente 200 µm. (N) Mesures de l'atrophie hippocampique à 3 mois post-injection. 7 images par souris ont été utilisées (seulement 3 sont montrées ici) et la région d'intérêt a été sélectionnée sur l'hémisphère droit. Le volume hippocampique de chaque coupe a été ajouté pour estimer le volume hippocampique global (graphique de droite).

Des modèles à progression lente

Une différence de notre stratégie par rapport à la transgénèse est la stabilité d'expression de nos transgènes. Nous n'avons par exemple observé aucune différence significative dans la quantité d'Aβ produite entre des souris de 3 et 12 mois. Pour autant, nous avons mis en évidence des plaques amyloïdes ainsi que des cellules AT8 positives chez des rats de 33 mois post-injection, signe d'une progression de la pathologie. Aucun de ces signes n'est par ailleurs observable chez des rats 15 mois après injection. Nous disposons également de souris injectées qui ont aujourd'hui 19 mois et qu'il sera intéressant d'étudier dans quelques mois. Au moment de l'écriture de ce manuscrit, nous n'avons pas encore analysé biochimiquement l'ensemble des échantillons de rats aux différents âges mais il semble assez évident qu'il n'y ait pas d'augmentation exponentielle comme on l'a montré chez les souris APP/PS1ΔE9 (voir article 1). Ainsi, une quantité relativement faible d'Aβ (sous entendu par rapport aux modèles

transgéniques et non par rapport à l'Homme) semble suffisante pour développer la formation de plaques amyloïdes. De plus, il semble que ces plaques se forment en premier lieu dans le subiculum ainsi qu'à la jonction de couches tissulaires distinctes de l'hippocampe (voir brouillon article 2). L'apparition précoce des plaques dans le subiculum est également retrouvée dans d'autres modèles transgéniques qui expriment par ailleurs les transgènes dans l'ensemble des cellules[216]. De plus, il a récemment été montré qu'une lésion du subiculum dans un modèle de souris transgénique réduisait la propagation des plaques aux autres régions cérébrales interconnectées[217]. Bien que nos modèles ne soient évidemment pas pertinents dans l'étude des plaques amyloïdes, ils semblent là encore mimer les premiers stades de la pathologie amyloïde. Avec cette progression lente, on dispose donc d'une très large fenêtre thérapeutique qui permettrait de tester des drogues ou composés médicaments sur une longue durée.

La question du sérotype viral utilisé

Nous avons testé et utilisé deux sérotypes viraux différents dans nos modèles. D'après notre propre expérience, l'AAV9 fonctionne aussi bien voir mieux que l'AAV10 dans l'hippocampe, tout en étant moins inflammatoire. C'est d'ailleurs la raison de son utilisation chez le modèle rat. Chez la souris, j'ai pendant les premiers mois de ma thèse testé l'AAV9 comme l'AAV10 et je n'ai étrangement détecté aucune modification comportementale chez celles injectées avec de l'AAV9. J'ai réalisé différentes expériences et me suis rendu compte d'une « extinction » des transgènes au bout d'un mois (**Figure 28**). De façon étrange, cela ne concerne que l'APP et en aucun cas l'expression de la PS1 ou encore de la GFP que nous avons même pu observer deux ans après injection. Une des raisons qui pourrait expliquer ce résultat est un production trop importante et trop rapide de l'APP par l'AAV9 qui induirait la mise en place par les cellules réceptrices de mécanismes de protection. J'avais notamment mis en évidence par western-blot une augmentation de l'ubiquitine qui corrélait avec la diminution de l'APP chez les souris injectées avec l'AAV9. Je ne suis pour l'instant pas allé plus loin dans la compréhension de ce phénomène.

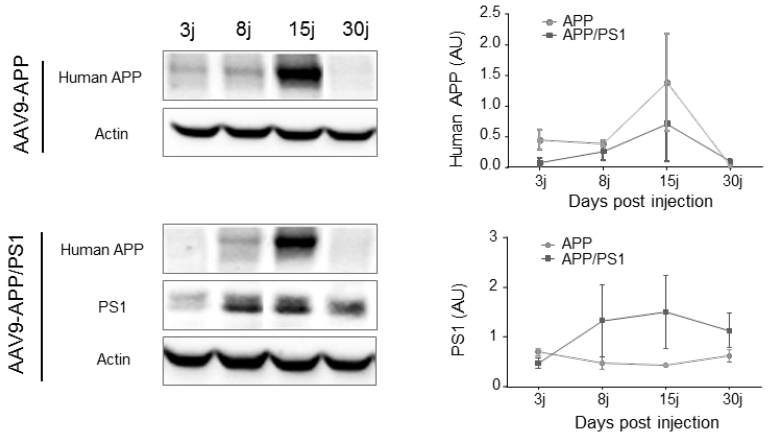


Figure 28 : Arrêt de la production de l'APP humaine 1 mois après l'injection d'AAV9

Perspectives et autres projets liés au modèle

Etude de protéomique comparative

Nous avons mis en place une collaboration avec la plateforme Prométhée de Grenoble afin de réaliser une analyse de protéomique comparative sur le plasma et le LCR de nos rats à deux âges différents. L'idée étant de réaliser une analyse à l'aveugle, sans a priori, de ces échantillons afin d'évaluer de potentiels biomarqueurs. Nous avons d'ores et déjà envoyé les échantillons de plasma pour analyses et attendons les résultats courant mars-avril 2016. Les échantillons de LCR seront envoyés dans les semaines qui viennent. L'analyse est effectuée sur un pool d'échantillons pour chaque groupe et pour chaque âge :

AAV-PS1 8 mois post-injection **vs** AAV-APP/PS1 8 mois post-injection
AAV-PS1 30 mois post-injection **vs** AAV-APP/PS1 30 mois post-injection

Le projet consiste à réaliser une étude différentielle des peptides et protéines par le système iTRAQ (pour isobarique Tag for Relative and Absolute Quantification). Le principe consiste dans un premier temps à digérer les protéines et peptides d'un échantillon par une enzyme comme la trypsine pour générer de petits peptides. Chaque peptide est alors étiqueté avec un tag différent. L'ensemble est mélangé et analysé par une méthode combinant chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse. Les protéines et peptides sont ensuite quantifiés et identifiés par comparaison à des banques de données (**Figure 29**). Ceux qui seront significativement différents (augmentés ou diminués) par rapport aux autres groupes (versus le groupe AAV-PS1 du même âge mais également versus le groupe AAV-APP/PS1 de l'autre

âge) seront de nouveau analysés mais cette fois sur chaque échantillon et non plus sur le pool. Nous prévoyons de faire une demande de LCR et de plasma humains afin d'y comparer les résultats que nous obtiendrons.

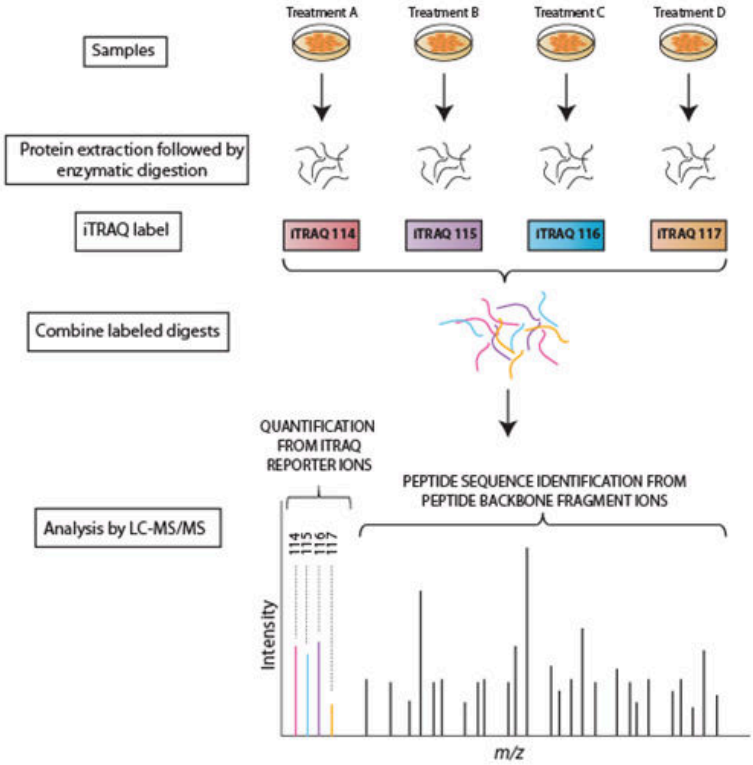


Figure 29 : Principe de fonctionnement de la technologie iTRAQ (https://www.broadinstitute.org)

Construction d'une protéine de fusion

J'ai récemment développé une protéine de fusion entre nos deux transgènes afin d'avoir une seule et même construction, et donc un seul vecteur à injecter, pour à la fois exprimer l'APP et la PS1. Le principal intérêt de ce type de construction est, à mon avis, la certitude d'avoir une co-expression des deux protéines d'intérêt dans les mêmes cellules, ce qui n'est pas le cas avec le système à deux vecteurs. J'ai réalisé une construction comprenant un petit peptide T2A entre la séquence de l'APP et de la PS1 qui va être naturellement clivée après la traduction. J'ai réalisé 4 constructions comprenant soit les ITRs pour AAV9 et AAV10 ainsi que les promoteurs CAG ou PGK. Nous avons testé et validé les plasmides *in vitro* sur des cellules HEK (**Figure 30**). J'ai également injecté des souris avec la construction AAV10-CAG-APP-T2A-PS1 et analysé les hippocampes un mois après injection. Le système fonctionne puisque nous sommes en mesure de détecter l'APP et la PS1 mais il semble que

les productions des deux protéines ainsi que de l'Aβ soient bien inférieures à la double injection et pour une quantité de virus équivalente. Ceci pourrait s'expliquer par un transgène très long à produire par la cellule ainsi que par un clivage au niveau du T2A moins efficace *in vivo* par rapport aux HEK. Il nous reste à analyser plus en détail ces données et à tester les trois autres constructions.

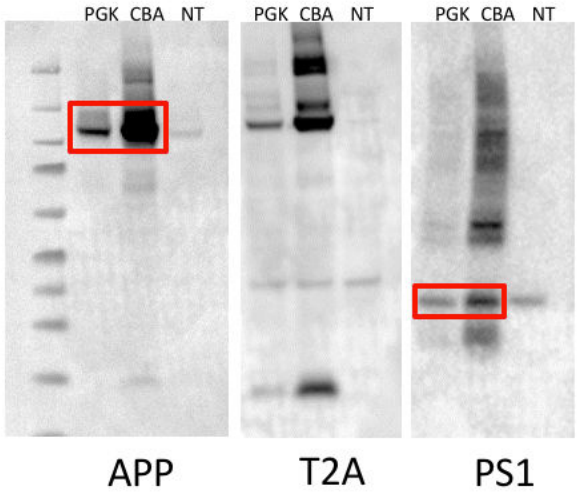


Figure 30 : Clivage de la protéine de fusion APP-T2A-PS1 dans des HEK (NT = non transfecté)

Projet TRIAD

Nous faisons depuis ma première année de thèse partie d'un consortium comprenant différents acteurs de l'académique et du secteur privé et qui est dirigé par la société ManRos Therapeutics à Roscoff (**Figure 31**). Nous avons obtenu un fond unique interministériel (ou FUI) pour le développement et le test de composés chimiques provenant d'éponges marines dans la trisomie 21 et la MA. Ces composés visent à réguler les effets néfastes de DYRK1A. Il s'agit d'une kinase très impliquée dans les phénomènes de neurodégénérescence et dans des pathologies tel que la trisomie 21 et la MA. Le gène codant pour DYRK1A se trouve dans une région critique du chromosome 21, surnuméraire dans la trisomie 21. Une corrélation a été proposée entre une expression anormale et une activité élevée de DYRK1A d'une part, et les problèmes cognitifs associés à la maladie d'autre part. Un meilleur contrôle de l'expression de l'enzyme, au travers d'une inhibition maîtrisée, devrait permettre de restaurer notamment les capacités fonctionnelles et d'apprentissage des patients, facilitant ainsi leur intégration sociale. DYRK1A est également impliquée dans la MA puisqu'il s'agit notamment d'une des kinases phosphorylant la protéine Tau.

Figure 31 : Acteurs du consortium du projet FUI TRIAD

Nous sommes dans ce consortium chargé d'évaluer différents composés-médicaments dérivés de la famille des leucéttines (découverte dans l'éponge marine *Leucetta microraphis*) sur deux modèles souris de la MA. **Benoît Souchet**, thésard dans l'équipe, est actuellement en charge de ces études. Nous avons d'ores et déjà évaluée l'efficacité de deux leucettines, la L41 et la Leu1, dans le modèle de souris APP/PS1ΔE9. Une publication est actuellement en cours de rédaction (Souchet el al. 2016 *in preparation*). L'étape suivante consistera à tester ces composés dans notre modèle AAV-APP/PS1.

Co-injection d'Aftin-5

En collaboration avec le Dr Laurent Meijer de la société ManRos Therapeutics, nous avons utilisé l'Aftin-5 (pour Amyloid-Forty-Two Inducers 5) sur notre modèle souris. Il s'agit d'une molécule de faible poids moléculaire qui affecte la production et la sécrétion des peptides Aβ et qui a été proposée comme outil pharmacologique pour l'étude de la MA *in vitro*[218]. Nous avons dans un premier temps injecté nos souris avec nos constructions virales puis avec l'Aftin-5, en intra-péritonéal, chaque jour pendant 1 mois. Nous avons obtenus des résultats intéressants avec une augmentation du βCTF et de l'hyperphosphorylation de Tau par rapport aux souris AAV-APP/PS1 sans Aftin-5. Nous avons re-testé cette stratégie chez des souris à 3 mois post-injection sans obtenir de résultats positifs. De plus, nous avons montré une augmentation générale de l'inflammation due à l'injection journalière d'Aftin-5 qui pouvait par ailleurs expliquer l'hyperphosphorylation de Tau supplémentaire que l'on observait. Nous avons pour l'instant arrêté cette étude.

Injection d'homogénats de cerveaux humains

Je participe également à un projet dirigé par **Marc Dhenain** et **Charlotte Gary** à MIRCen où nous testons l'injection d'homogénats provenant de patients humains chez notre propre modèle. Il a déjà été montré chez des souris transgéniques que l'infusion d'homogénats provenant d'autopsies de cerveaux de patients atteints de la MA permet une propagation d'Aβ

et une formation accélérée des plaques amyloïdes[219]. Tester dans un modèle sans plaque permet de démontrer que ce « spreading » peut également induire la formation de plaque. Différentes études ont ainsi proposé un mécanisme semblable au Prion, i.e. où la MA serait conduite par une propagation de l'infection. Ce type de modèle permet donc d'évaluer ce type d'hypothèse. Nous avons dans un premier temps réalisé deux groupes injectés en intrahippocampique : soit avec du PBS, soit avec les vecteurs AAV-APP + AAV-PS1. Un mois après, nous avons réinjectés dans certains groupes des homogénats de cerveau provenant soit de patients contrôles, soit de patients atteints de la MA (AD6742). De façon intéressante et après 12 mois, des plaques amyloïdes se sont formées uniquement dans le groupe injecté AAV-APP/PS1 + homogénats de patients atteints de la MA (**Figure 32**). Un manuscrit sera bientôt en préparation (Gary et al. *in preparation*).

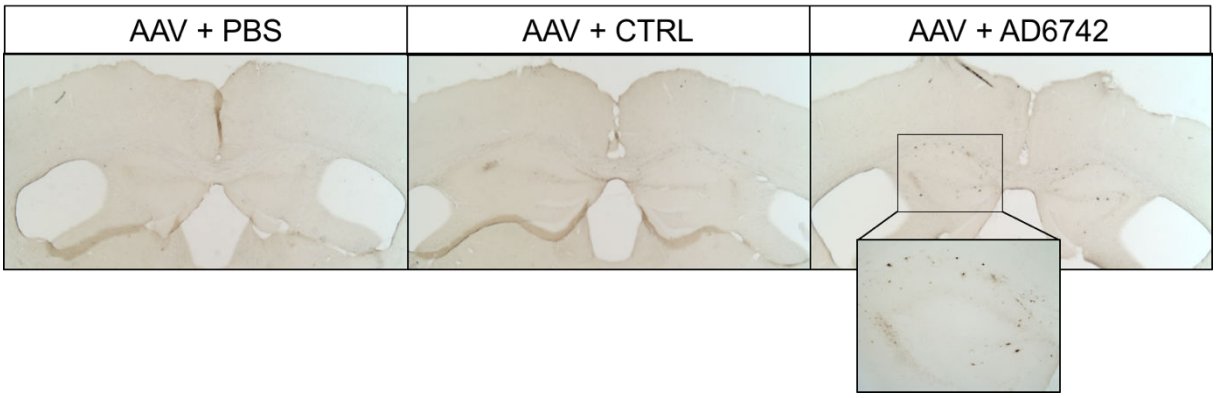


Figure 32 : L'injection d'homogénats de cerveaux de patients atteints de la MA entraine la formation de plaques chez les souris AAV-APP/PS1

Injection dans le bulbe olfactif

Nous avons tout juste commencé un projet collaboratif avec le Dr **Cécile Viollet** sur l'étude du rôle neuroprotecteur de la somatostatine sur les atteintes amyloïdes précoces dans le système olfactif. Il a été suggéré que la baisse de la somatostatine constitue un biomarqueur de la MA[220]. Par ailleurs, une atteinte somatostatinergique a été démontrée dans des structures clés des voies olfactives au cours du vieillissement[221]. L'objectif est ici d'injecter nos constructions dans le bulbe olfactif de souris WT afin d'entrainer une expression d'APP et son métabolisme ainsi qu'une potentielle hyperphosphorylation de Tau. Il sera ensuite étudié différents paramètres pour mieux comprendre la vulnérabilité des interneurones

somatostatinergiques dans le cas d'une pathologie amyloïde dans ce modèle développé à façon.

Développement d'un modèle primate

Comme je l'ai déjà précisé (voir §3.3.), les modèles NHP de la MA bien que peu nombreux, sont relevants dans la compréhension des mécanismes liés à la MA. Le transfert de gène est évidemment un des outils les plus pertinents pour développer ce type de modèle puisque l'utilisation de la transgénèse prendrait des années. Nous avons d'ores et déjà démontré la faisabilité de cette stratégie chez la souris puis chez le rat. De plus, les résultats de protéomique comparative sur les fluides biologiques de nos rats ainsi que l'expertise de Philippe Hantraye à MIRCen seront des arguments de poids en faveur du développement d'un tel modèle dans les mois/années à venir.

Développement de la société AgenT

L'ensemble de ce travail ainsi que le dépôt du brevet ont permis l'élaboration d'un projet de structure, développé et géré par **Jérôme Braudeau**. La société AgenT qui sera créée permettra via des prestations de services de proposer ces modèles propriétaires pour des études précliniques. Une étude de marché à d'ores et déjà commencé.

Figure 33 : Logo de la société AgenT

En résumé, l'utilisation du double transfert des gènes APP et PS1 pour modéliser des évènements succeptibles d'être impliqués dans les phases intiales de la MA, représente une stratégie originale et prometteuse. Même si de nombreuses étapes de caractérisation sont encore nécéssaires, nous espérons pouvoir confirmer nos résultats obtenus chez la souris très rapidement chez le rat. Nous devrions également obtenir différentes données sur d'éventuels biomarqueurs qui renforceront la relevance de ce modèle quand à ce type d'utilisation. La publication du deuxième article ainsi que le développement de la société permettra très certainement de nouvelles collaborations et projets amenant, nous l'espérons, à une meilleure compréhension des premières phases de la MA.

Annexes

Brevet

Mickael Audrain, **Jérome Braudeau**, **Nathalie Cartier**, **Nicole Déglon**, **Philippe Hantraye**

Numéro de publication : WO2015067668 A1

NEW ANIMAL MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

FIELD OF THE INVENTION:

The present invention relates to a vector comprising a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and/or the PS1 protein or variants thereof.
The invention also relates to a method for inducing Alzheimer's disease in an animal using the vector of the invention and to animal model having Alzheimer's disease obtained by said method.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

Alzheimer's disease (AD) is the most frequently encountered form of dementia (about 70% of dementia cases). With improved life expectancy, especially in developed countries, the incidence of dementia has dramatically increased and current forecasts speak in terms of a doubling of the number of persons affected every 20 years. In France, it is estimated that more than 850,000 people (with a majority of woman) are currently suffering from dementia, and around 225,000 new cases appear each year. AD is characterized by the accumulation of senile plaques (SP), neurofibrillary tangles (NFT), and selective synaptic and neuronal loss in plaques are composed of insoluble extracellular aggregates consisting mainly of amyloid β (Aβ) peptides derived from proteolytic cleavages of the amyloid precursor protein (APP). Genetic studies, together with the demonstration of a direct toxic effect of Aβ, led to the development of the amyloid cascade hypothesis to explain the Aβ-associated neurodegenerative process. Aβ rapidly aggregates to form amorphous and fibrillar oligomers, which then deposit to build senile plaques. A number of studies have provided evidence that

βCTF and soluble Aβ oligomers are more toxic to cells than mature fibrils (Kayed et al., 2003) and these neurotoxic peptides are originally produced by the cleavage of APP.
Mutations in genes that encode APP or proteases that generate Aβ (PS1; PS2) are responsible for the familial forms (5% of cases) of AD (Selkoe et al., 2001).
Different AD animal models have been developed, most of them being transgenic mouse models obtained by transferring genes carrying mutations identified in familial AD including APP, PS1 and PS2 (Lee and Han, 2013). Although not perfect, these models offer a mean to gain knowledge on the physiopathology of AD but they also suffer from various limitations (expression of neurotoxic peptides from in utero development, associated compensatory effect, genetic drift in particular) which impair their use in research.
The use of viral vectors to develop experimental models would be a valuable breakthrough in the field. AAV vectors are attractive tools for gene transfer in the central nervous system (CNS) due to their lack of toxicity, their strong capacity to transduce neurons and to stably express recombinant proteins (for several years in rodents, dogs and primates). Viral vectors have already and are currently being used in several clinical trials in human patients worldwide (Cartier et al., 2009). The use of viral vectors to develop new animal models of neurodegenerative disorders is currently under investigation (Deglon and Hantraye, 2005). This strategy holds various advantages compared to classical transgenic approaches: viral vectors are versatile, highly flexible tools to perform in vivo studies and multiple genetic models can be created in a short period of time. High transduction efficiencies as well as robust and sustained transgene expression lead to the rapid appearance of functional and behavioral abnormalities and severe neurodegeneration. Targeted injections in different brain areas can be used to investigate the regional specificity of the neuropathology and eliminate potential side effects associated with a widespread overexpression of the transgene. Finally, models can be established in different mammalian species including large animals like dogs, pigs and non-human primates, thereby providing an opportunity to assess complex behavioral changes and perform longitudinal follow-up of neuropathological alterations by imaging. Lentiviral or AAV vectors were successfully injected in the brain of adult mice, rats or primates to create models of various neurodegenerative diseases such as Huntington's, Parkinson's, Machado-Joseph diseases (Kirik et al., 2002; Lo Bianco et al., 2002).

SUMMARY OF THE INVENTION:

The inventors have now developed an efficient and powerful animal model of Alzheimer's disease by using optimized APPsl and PS1 genes and Adeno-associated virus (AAV) vectors.
Thus, the invention relates to a vector comprising a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and/or the PS1 protein or variants thereof.
The invention also relates to a method for inducing the Alzheimer's disease in an animal using the vector of the invention and to animal model having the Alzheimer's disease obtained by said method.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

Vectors of the invention

A first object of the invention relates to a vector comprising a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and/or the PS1 protein or variants thereof.

In one embodiment, the vector of the invention comprises a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and a nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein.
In another embodiment, the vector of the invention may comprises any variant of the nucleic acid sequence which encodes for the APP protein and/or any variant of the nucleic acid sequence which encodes for the PS1 protein.
In another embodiment, the vector of the invention may comprises any variant of the nucleic acid sequence which encodes for any variant of the APP protein and/or any variant of the nucleic acid sequence which encodes for any variant of the PS1 protein.

In another embodiment, the invention relates to a vector comprising a nucleic acid sequence that encodes the APP protein or variants thereof and a vector comprising a nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein or variants thereof.

As used herein, the term "APP" or "Amyloid Precursor Protein" denotes an integral membrane protein expressed in many tissues and concentrated in the synapses of neurons. Its primary function is not known, though it has been implicated as a regulator of synapse formation, neural plasticity and iron export. APP is best known as the precursor molecule

whose proteolysis generates beta amyloid (Aβ), a 37 to 49 amino acid peptide whose amyloid fibrillar form is the primary component of amyloid plaques found in the brains of Alzheimer's disease patients. The cDNA sequence for APP is disclosed in Genbank under access number Gene ID: 351 and has the sequence SEQ ID NO:1 as described below:

ATGCTGCCCGGACTGGCTCTGCTGCTGCTGGCCGCTTGGACCGCCAGAGCCCTGG
AAGTGCCCACCGATGGCAATGCTGGCCTGCTGGCCGAGCCCCAGATCGCCATGTT
CTGCGGCAGACTGAACATGCACATGAACGTGCAGAACGGCAAGTGGGACAGCGA
CCCCAGCGGCACCAAGACCTGCATCGACACCAAAGAGGGCATCCTGCAGTATTG
CCAGGAAGTGTACCCCGAGCTGCAGATCACCAACGTGGTGGAAGCCAACCAGCC
CGTGACCATCCAGAACTGGTGCAAGCGGGGCAGAAAGCAGTGCAAGACCCACCC
CCACTTCGTGATCCCTTACCGGTGCCTGGTCGGAGAGTTCGTGTCCGACGCCCTG
CTGGTGCCCGACAAGTGCAAGTTCCTGCATCAGGAACGGATGGACGTCTGCGAG
ACACATCTGCACTGGCACACCGTGGCCAAAGAGACATGCAGCGAGAAGTCCACC
AACCTGCACGACTACGGCATGCTGCTGCCCTGCGGCATCGACAAGTTCCGGGGCG
TGGAATTCGTGTGCTGCCCCCTGGCCGAGGAATCCGACAACGTGGACAGCGCCG
ACGCCGAAGAGGACGACAGCGACGTGTGGTGGGGCGGAGCCGACACCGATTACG
CCGACGGCAGCGAGGACAAGGTCGTGGAAGTGGCTGAAGAGGAAGAGGTGGCC
GAGGTCGAAGAAGAGGAAGCCGACGACGACGAGGATGACGAGGACGGCGACGA
AGTGGAAGAAGAAGCCGAGGAACCCTACGAGGAAGCCACCGAGCGGACCACCT
CTATCGCCACCACCACCACAACCACTACCGAGAGCGTGGAAGAGGTGGTGCGCG
AAGTGTGCAGCGAGCAGGCCGAGACAGGCCCCTGCCGGGCCATGATCAGCCGGT
GGTACTTCGACGTGACCGAGGGCAAGTGCGCCCCCTTCTTCTATGGCGGCTGCGG
CGGCAACCGGAACAACTTCGACACCGAGGAATACTGCATGGCCGTGTGCGGCAG
CGCCATCCCTACCACAGCCGCCAGCACCCCCGACGCCGTGGACAAGTACCTGGA
AACCCCTGGCGACGAGAACGAGCACGCCCACTTCCAGAAGGCCAAAGAGCGGCT
GGAAGCCAAGCACCGCGAGCGGATGAGCCAGGTGATGAGAGAGTGGGAAGAGG
CCGAGAGACAGGCCAAGAACCTGCCCAAGGCCGACAAGAAAGCCGTGATCCAGC
ACTTCCAGGAAAAGGTCGAAAGCCTGGAACAGGAAGCCGCCAACGAGCGGCAGC
AGCTGGTGGAAACCCACATGGCCAGAGTGGAAGCCATGCTGAACGACCGGCGGA
GACTGGCCCTGGAAAACTACATCACCGCCCTGCAGGCCGTGCCCCCCAGACCCAG
ACACGTGTTCAACATGCTGAAGAAATACGTGCGGGCCGAGCAGAAGGACCGGCA
GCACACCCTGAAGCACTTCGAGCACGTGCGGATGGTGGACCCCAAGAAGGCCGC
CCAGATCCGCTCTCAGGTCATGACCCACCTGAGAGTGATCTACGAGAGAATGAAC

CAGAGCCTGAGCCTGCTGTACAATGTGCCCGCCGTGGCCGAAGAAATCCAGGAC
GAGGTGGACGAGCTGCTGCAGAAAGAGCAGAACTACAGCGACGACGTGCTGGCC
AACATGATCAGCGAGCCCCGGATCAGCTACGGCAACGACGCCCTGATGCCCAGC
CTGACCGAGACAAAGACCACCGTGGAACTGCTGCCCGTGAACGGCGAGTTCAGC
CTGGACGACCTGCAGCCCTGGCACAGCTTTGGCGCTGATAGCGTGCCCGCCAACA
CCGAGAACGAGGTGGAACCCGTGGACGCCAGACCTGCCGCCGACAGAGGCCTGA
CCACAAGACCTGGCAGCGGCCTGACCAACATCAAGACCGAAGAGATCAGCGAAG
TGAACCTGGACGCCGAGTTCCGGCACGACAGCGGCTACGAGGTGCACCACCAGA
AACTGGTGTTCTTCGCCGAGGACGTGGGCAGCAACAAGGGCGCCATCATCGGCCT
GATGGTCGGAGGCGTGGTGATCGCCACCGTGATCATCATCACCCTGGTGATGCTG
AAAAAGAAGCAGTACACCAGCATCCACCACGGCGTGGTCGAAGTGGACGCCGCT
GTGACCCCCGAGGAACGGCACCTGAGCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAGAAC
CCCACCTACAAGTTCTTCGAGCAGATGCAGAACTGA.

The protein sequence of the APP protein has the sequence SEQ ID NO: 2 as described below:

MLPGLALLLLAAWTARALEVPTDGNAGLLAEPQIAMFCGRLNMHMNVQNGKWDS
DPSGTKTCIDTKEGILQYCQEVYPELQITNVVEANQPVTIQNWCKRGRKQCKTHPHF
VIPYRCLVGEFVSDALLVPDKCKFLHQERMDVCETHLHWHTVAKETCSEKSTNLHD
YGMLLPCGIDKFRGVEFVCCPLAEESDNVDSADAEEDDSDVWWGGADTDYADGSE
DKVVEVAEEEEVAEVEEEEADDDEDDEDGDEVEEEAEEPYEEATERTTSIATTTTTTT
ESVEEVVREVCSEQAETGPCRAMISRWYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEY
CMAVCGSAIPTTAASTPDAVDKYLETPGDENEHAHFQKAKERLEAKHRERMSQVMR
EWEEAERQAKNLPKADKKAVIQHFQEKVESLEQEAANERQQLVETHMARVEAMLN
DRRRLALENYITALQAVPPRPRHVFNMLKKYVRAEQKDRQHTLKHFEHVRMVDPK
KAAQIRSQVMTHLRVIYERMNQSLSLLYNVPAVAEEIQDEVDELLQKEQNYSDDVL
ANMISEPRISYGNDALMPSLTETKTTVELLPVNGEFSLDDLQPWHSFGADSVPANTEN
EVEPVDARPAADRGLTTRPGSGLTNIKTEEISEVNLDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAE
DVGSNKGAIIGLMVGGVVIATVIIITLVMLKKKQYTSIHHGVVEVDAAVTPEERHLSK
MQQNGYENPTYKFFEQMQN.

In another embodiment, the APP used according to the invention is the APP (SEQ ID NO: 2) with the Swedish and London mutations (APPsl) which has the following protein sequence (SEQ ID NO: 3):

MLPGLALLLLAAWTARALEVPTDGNAGLLAEPQIAMFCGRLNMHMNVQNGKWDS
DPSGTKTCIDTKEGILQYCQEVYPELQITNVVEANQPVTIQNWCKRGRKQCKTHPHF
VIPYRCLVGEFVSDALLVPDKCKFLHQERMDVCETHLHWHTVAKETCSEKSTNLHD
YGMLLPCGIDKFRGVEFVCCPLAEESDNVDSADAEEDDSDVWWGGADTDYADGSE
DKVVEVAEEEEVAEVEEEEADDDEDDEDGDEVEEEAEEPYEEATERTTSIATTTTTTT
ESVEEVVREVCSEQAETGPCRAMISRWYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEY
CMAVCGSAIPTTAASTPDAVDKYLETPGDENEHAHFQKAKERLEAKHRERMSQVMR
EWEEAERQAKNLPKADKKAVIQHFQEKVESLEQEAANERQQLVETHMARVEAMLN
DRRRLALENYITALQAVPPRPRHVFNMLKKYVRAEQKDRQHTLKHFEHVRMVDPK
KAAQIRSQVMTHLRVIYERMNQSLSLLYNVPAVAEEIQDEVDELLQKEQNYSDDVL
ANMISEPRISYGNDALMPSLTETKTTVELLPVNGEFSLDDLQPWHSFGADSVPANTEN
EVEPVDARPAADRGLTTRPGSGLTNIKTEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA
EDVGSNKGAIIGLMVGGVVIATVIVITLVMLKKKQYTSIHHGVVEVDAAVTPEERHL
SKMQQNGYENPTYKFFEQMQN.

As used herein, the term “PS1” or “Presenilin 1” denotes a protein encoded by the PSEN1 gene. Presenilin 1 is one of the four core proteins in presenilin complex, which mediate the regulated proteolytic events of several proteins in the cell, including gamma secretase. Gamma-secretase is considered to play a strong role in generation of beta amyloid, accumulation of which is related to the onset of Alzheimer ’s disease, from the beta-amyloid precursor protein. The cDNA sequence for PS1 is disclosed in Genbank under access number Gene ID: 5663 and code for the following protein sequence (SEQ ID NO:4):

MTELPAPLSYFQNAQMSEDNHLSNTVRSQNDNRERQEHNDRRSLGHPEPLSNGRPQ
GNSRQVVEQDEEEDEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMVVVVATIKSVSFYTRKDGQ
LIYTPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIVVLTILLVVLYKYRCYKVIHAWLIISSLLL
LFFFSFIYLGEVFKTYNVAVDYITVALLIWNFGVVGMISIHWKGPLRLQQAYLIMISAL
MALVFIKYLPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFPALIYSS
TMVWLVNMAEGDPEAQRRVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGGFSEEWEAQRD
SHLGPHRSTPESRAAVQELSSSILAGEDPEERGVKLGLGDFIFYSVLVGKASATASGD
WNTTIACFVAILIGLCLTLLLLAIFKKALPALPISITFGLVFYFATDYLVQPFMDQLAFH
QFYI.

In one embodiment, the PS1 protein used according to the invention may be modified (PS1 M146L) and may have the protein sequence sequence (SEQ ID NO: 5) as described below:

MTELPAPLSYFQNAQMSEDNHLSNTVRSQNDNRERQEHNDRRSLGHPEPLSNGRPQ
GNSRQVVEQDEEEDEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMVVVVATIKSVSFYTRKDGQ
LIYTPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIVVMTILLVVLYKYRCYKVIHAWLIISSLL
LLFFFSFIYLGEVFKTYNVAVDYITVALLIWNFGVVGMISIHWKGPLRLQQAYLIMISA
LMALVFIKYLPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFPALIYS
STMVWLVNMAEGDPEAQRRVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGGFSEEWEAQR
DSHLGPHRSTPESRAAVQELSSSILAGEDPEERGVKLGLGDFIFYSVLVGKASATASG
DWNTTIACFVAILIGLCLTLLLLAIFKKALPALPISITFGLVFYFATDYLVQPFMDQLAF
HQFYI.

In another embodiment, the vector of the invention comprising a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and/or the PS1 or PS2 proteins or variants thereof.

As used herein, the term “PS2” or “Presenilin 2” denotes a protein encoded by the PSEN2 gene. Presenilin 2 is one of the four core proteins in presenilin complex, which mediate the regulated proteolytic events of several proteins in the cell, including gamma secretase. Gamma-secretase is considered to play a strong role in generation of beta amyloid, accumulation of which is related to the onset of Alzheimer’s Disease, from the beta-amyloid precursor protein. The cDNA sequence for PS2 is disclosed in Genbank under access number Gene ID: 5664 and code for the following protein (SEQ ID NO:6):

MLTFMASDSEEEVCDERTSLMSAESPTPRSCQEGRQGPEDGENTAQWRSQENEEDGE
EDPDRYVCSGVPGRPPGLEEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMIVVVATIKSVRFYTEK
NGQLIYTPFTEDTPSVGQRLLNSVLNTLIMISVIVVMTIFLVVLYKYRCYKFIHGWLIM
SSLMLLFLFTYIYLGEVLKTYNVAMDYPTLLLTVWNFGAVGMVCIHWKGPLVLQQA
YLIMISALMALVFIKYLPEWSAWVILGAISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNEPF
PALIYSSAMVWTVGMAKLDPSSQGALQLPYDPEMEEDSYDSFGEPSYPEVFEPPLTG
YPGEELEEEEERGVKLGLGDFIFYSVLVGKAAATGSGDWNTTLACFVAILIGLCLTLL
LLAVFK KALPALPISITFGLIFYFST DNLVRPFMDT LASHQLYI.

In one embodiment, the vector of the invention comprises a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and a nucleic acid sequence that encodes the PS2 protein.
In one embodiment, the vector of the invention comprises a nucleic acid sequence that encodes the APP protein, a nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein and a nucleic acid sequence that encodes the PS2 protein.
In another embodiment, the vector of the invention may comprises any variant of the nucleic acid sequence which encodes for the APP protein and/or any variant of the nucleic acid sequence which encodes for the PS1 protein and/or variant of the nucleic acid sequence which encodes for the PS2 protein.
In another embodiment, the vector of the invention may comprises any variant of the nucleic acid sequence which encodes for any variant of the APP protein and/or any variant of the nucleic acid sequence which encodes for any variant of the PS1 protein and/or any variant of the nucleic acid sequence which encodes for any variant of the PS2 protein.
The variants include, for instance, naturally-occurring variants due to allelic variations between individuals (e.g., polymorphisms), alternative splicing forms, etc. The term variant also includes genes sequences of the invention from other sources or organisms. Variants are preferably substantially homologous to sequences according to the invention, i.e., exhibit a nucleotide sequence identity of typically at least about 75%, preferably at least about 85%, more preferably at least about 90%, more preferably at least about 95% with sequences of the invention. Variants of the genes of the invention also include nucleic acid sequences, which hybridize to a sequence as defined above (or a complementary strand thereof) under stringent hybridization conditions. Typical stringent hybridisation conditions include temperatures above 30° C, preferably above 35°C, more preferably in excess of 42°C, and/or salinity of less than about 500 mM, preferably less than 200 mM. Hybridization conditions may be adjusted by the skilled person by modifying the temperature, salinity and/or the concentration of other reagents such as SDS, SSC, etc.

In one embodiment, the vector use according to the invention is a non viral vector or a viral vector.
In a particular embodiment, the non viral vector may be a plasmid comprising a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and/or the PS1 protein.
In another particular embodiment, the vector may a viral vector.

Gene delivery viral vectors useful in the practice of the present invention can be constructed utilizing methodologies well known in the art of molecular biology. Typically, viral vectors carrying transgenes are assembled from polynucleotides encoding the transgene, suitable regulatory elements and elements necessary for production of viral proteins which mediate cell transduction.

The terms “gene transfer” or “gene delivery” refer to methods or systems for reliably inserting foreign DNA into host cells. Such methods can result in transient expression of non-integrated transferred DNA, extrachromosomal replication and expression of transferred replicons (e. g. episomes), or integration of transferred genetic material into the genomic DNA of host cells.

Such recombinant viruses may be produced by techniques known in the art, such as by transfecting packaging cells or by transient transfection with helper plasmids or viruses. Typical examples of virus packaging cells include PA317 cells, PsiCRIP cells, GPenv+ cells, 293 cells, etc. Detailed protocols for producing such replication-defective recombinant viruses may be found for instance in WO95/14785, WO96/22378, US5,882,877, US6,013,516, US4,861,719, US5,278,056 and WO94/19478.

In a particular embodiment, the viral vector may be an adenoviral, a retroviral, a lentiviral, an herpesvirus or an adeno-associated virus (AAV) vectors.

In a preferred embodiment, adeno-associated viral (AAV) vectors are employed.

In another preferred embodiment, the AAV vector is AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AA5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 or any other serotypes of AAV that can infect human, rodents, monkeys or other species.

In a more preferred embodiment, the AAV vector is an AAV10 or AAV9.

By an "AAV vector" is meant a vector derived from an adeno-associated virus serotype, including without limitation, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV6, etc. AAV vectors can have one or more of the AAV wild-type genes deleted in whole or part, preferably the rep and/or cap genes, but retain functional flanking ITR sequences. Functional ITR sequences are necessary for the rescue, replication and packaging of the AAV virion. Thus, an AAV vector is defined herein to include at least those sequences required in cis for replication and packaging (e. g., functional ITRs) of the virus. ITRs don’t need to be the wild-type nucleotide sequences, and may be altered, e. g , by the insertion, deletion or substitution of nucleotides, so long as the sequences provide for functional rescue, replication and packaging. AAV expression vectors are constructed using known techniques to at least provide as operatively linked components in the direction of transcription, control elements including a

transcriptional initiation region, the DNA of interest (i.e. the nucleic acid sequences of the invention) and a transcriptional termination region.

The control elements are selected to be functional in a mammalian cell. The resulting construct which contains the operatively linked components is bounded (5’ and 3’) with functional AAV ITR sequences. By "adeno-associated virus inverted terminal repeats" or "AAVITRs" is meant the art-recognized regions found at each end of the AAV genome which function together in cis as origins of DNA replication and as packaging signals for the virus. AAV ITRs, together with the AAV rep coding region, provide for the efficient excision and rescue from, and integration of a nucleotide sequence interposed between two flanking ITRs into a mammalian cell genome. The nucleotide sequences of AAV ITR regions are known. As used herein, an "AAV ITR" does not necessarily comprise the wild-type nucleotide sequence, but may be altered, e. g., by the insertion, deletion or substitution of nucleotides. Additionally, the AAV ITR may be derived from any of several AAV serotypes, including without limitation, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV6, etc. Furthermore, 5' and 3' ITRs which flank a selected nucleotide sequence in an AAV vector need not necessarily be identical or derived from the same AAV serotype or isolate, so long as they function as intended, i. e., to allow for excision and rescue of the sequence of interest from a host cell genome or vector, and to allow integration of the heterologous sequence into the recipient cell genome when AAV Rep gene products are present in the cell. Additionally, AAV ITRs may be derived from any of several AAV serotypes, including without limitation, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV 5, AAV6, etc. Furthermore, 5' and 3' ITRs which flank a selected nucleotide sequence in an AAV expression vector need not necessarily be identical or derived from the same AAV serotype or isolate, so long as they function as intended, i. e., to allow for excision and rescue of the sequence of interest from a host cell genome or vector, and to allow integration of the DNA molecule into the recipient cell genome when AAV Rep gene products are present in the cell.

Particularly preferred are vectors derived from AAV serotypes having tropism for and high transduction efficiencies in cells of the mammalian CNS, particularly neurons. A review and comparison of transduction efficiencies of different serotypes is provided in this patent application. In one preferred example, AAV2 based vectors have been shown to direct long-term expression of transgenes in CNS, preferably transducing neurons. In other non limiting examples, preferred vectors include vectors derived from AAV10 and AAV11 serotypes, which have also been shown to transduce cells of the CNS.

The selected nucleotide sequence is operably linked to control elements that direct the transcription or expression thereof in the subject in vivo. Such control elements can comprise control sequences normally associated with the selected gene.
Alternatively, heterologous control sequences can be employed. Useful heterologous control sequences generally include those derived from sequences encoding mammalian or viral genes. Examples include, but are not limited to, the phophoglycerate kinase (PKG) promoter, CAG, neuronal promoters, promoter of Dopamine-1 receptor and Dopamine-2 receptor, the SV40 early promoter, mouse mammary tumor virus LTR promoter; adenovirus major late promoter (Ad MLP); a herpes simplex virus (HSV) promoter, a cytomegalovirus (CMV) promoter such as the CMV immediate early promoter region (CMVIE), rous sarcoma virus (RSV) promoter, synthetic promoters, hybrid promoters, and the like. In addition, sequences derived from nonviral genes, such as the murine metallothionein gene, will also find use herein. Such promoter sequences are commercially available from, e. g. , Stratagene (San Diego, CA). For purposes of the present invention, both heterologous promoters and other control elements, such as CNS-specific and inducible promoters, enhancers and the like, will be of particular use.
Examples of heterologous promoters include the CMV promoter. Examples of CNS specific promoters include those isolated from the genes of myelin basic protein (MBP), glial fibrillary acid protein (GFAP), and neuron specific enolase (NSE).

The AAV expression vector which harbors the DNA molecule of interest bounded by AAV ITRs, can be constructed by directly inserting the selected sequence (s) into an AAV genome which has had the major AAV open reading frames ("ORFs") excised therefrom. Other portions of the AAV genome can also be deleted, so long as a sufficient portion of the ITRs remain to allow for replication and packaging functions. Such constructs can be designed using techniques well known in the art. See, e. g. , U. S. Patents Nos. 5,173, 414 and 5,139, 941; International Publications Nos. WO 92/01070 (published 23 January 1992) and WO 93/03769 (published 4 March 1993). Alternatively, AAV ITRs can be excised from the viral genome or from an AAV vector containing the same and fused 5' and 3'of a selected nucleic acid construct that is present in another vector using standard ligation techniques. AAV vectors which contain ITRs have been described in, e. g. , U. S. Patent no. 5,139, 941. In particular, several AAV vectors are described therein which are available from the American Type Culture Collection ("ATCC") under Accession Numbers 53222,53223, 53224,53225 and 53226. Additionally, chimeric genes can be produced synthetically to include AAV ITR

sequences arranged 5'and 3'of one or more selected nucleic acid sequences. Preferred codons for expression of the chimeric gene sequence in mammalian CNS cells can be used. The complete chimeric sequence is assembled from overlapping oligonucleotides prepared by standard methods. In order to produce AAV virions, an AAV expression vector is introduced into a suitable host cell using known techniques, such as by transfection. A number of transfection techniques are generally known in the art. Particularly suitable transfection methods include calcium phosphate co-precipitation, direct microinjection into cultured cells, electroporation, liposome mediated gene transfer, lipid-mediated transduction, and nucleic acid delivery using high-velocity microprojectiles.
For instance, a particular viral vector, such as the AAV10 or AAV9, comprises, in addition to a nucleic acid sequences of the invention, the backbone of AAV vector with ITR derived from AAV-2, the promoter, such as the mouse PGK (phosphoglycerate kinase) gene or the cytomegalovirus/β-actin hybrid promoter (CAG) consisting of the enhancer from the cytomegalovirus immediate gene, the promoter, splice donor and intron from the chicken β-actin gene, the splice acceptor from rabbit β-globin, or any neuronal promoter such as the promoter of Dopamine-1 receptor or Dopamine-2 receptor, or the synapsin promoter, with or without the wild-type or mutant form of woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE). The viral vector may comprise in addition, a nucleic acid sequence encoding an antibiotic resistance gene such as the genes of resistance ampicilline (AmpR), kanamycine, hygromycine B, geneticine, blasticidine S or puromycine.

In a particular embodiment, the vector of the invention contains a nucleic acid sequence that encodes the APP protein or APP mutated familiar forms (for example Tottori, Flemish, Arctic, Dutch, Iowa, Iranian, Austrian, German, French, Florida, Indiana or Australian mutations) and in particular APPsl (Swedish and London mutations).
In another particular embodiment, the vector of the invention contains a nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein, PS1 M146L, or PS2.
In another particular embodiment, the vector of the invention contains a nucleic acid sequence that encodes the APPsl protein and a nucleic sequence that encodes the PS1 protein.
In another particular embodiment, the vector of the invention contains a nucleic acid sequence that encodes the APPsl protein and a nucleic sequence that encodes the PS1 protein or a nucleic sequence that encodes the PS2 protein.

In another particular embodiment, the vector of the invention contains a nucleic acid sequence that encodes the APPsl protein, a nucleic sequence that encodes the PS1 protein and a nucleic sequence that encodes the PS2 protein.
In a particular embodiment of the invention, the vector of the invention is a viral vector, for example the AAV10 or AAV9 vectors which contains a nucleic acid sequence that encodes the APPsl protein and a nucleic sequence that encodes the PS1 protein M146L and/or a nucleic sequence that encodes the PS2 protein, the gene AmpR, sequences ITR and the promoter CAG.

Methods of the invention

A second object of the invention relates to a method for inducing the Alzheimer's disease in an animal, said method comprising the administration of at least one vector containing a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and/ or the PS1 protein or a variant thereof.

In one embodiment, the vector used for inducing the Alzheimer's disease comprises the nucleic acid sequence that encodes the APP protein and the nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein.
In another embodiment, the method for inducing the Alzheimer's disease in an animal comprises the administration of a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the APP protein or a variant thereof and a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein or a variant thereof.
In another embodiment, the method for inducing the Alzheimer's disease in an animal comprises the administration of a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein.
In another embodiment, the method for inducing the Alzheimer's disease in an animal comprises the administration of a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the APPsl protein and a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein M146L.

In a particular embodiment, the method for inducing the Alzheimer's disease in an animal comprises the administration of a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the

APP protein and/or a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein and/or a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the PS2 protein.
In another particular embodiment, the method for inducing the Alzheimer's disease in an animal comprises the administration of a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the PS2 protein.
In another particular embodiment, the method for inducing the Alzheimer's disease in an animal comprises the administration of a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein and a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the PS2 protein.

Particularly, the method according to the invention is not a method of treatment, in particular a method of treatment of the human or animal body by surgery or therapy.

Methods of delivery of vectors to neurons and/or astrocytes of the animal model includes generally any method suitable for delivery vectors to the neurons and/or astrocytes such that at least a portion of cells of a selected synaptically connected cell population is transduced. Vectors may be delivered to any cells of the central nervous system, or both. Generally, the vector is delivered to the cells of the central nervous system, including for example cells of the spinal cord, brainstem (medulla, pons, and midbrain), cerebellum, diencephalon (thalamus, hypothalamus), telencephalon (corpus striatum, cerebral cortex, or, within the cortex, the occipital, temporal, parietal or frontal lobes), or combinations thereof, or preferably any suitable subpopulation thereof. Further preferred sites for delivery include the ruber nucleus, corpus amygdaloideum, entorhinal cortex and neurons in ventralis lateralis, or to the anterior nuclei of the thalamus.
In a particular embodiment, vectors of the invention are delivered by stereotactic injections or microinjections directly in the brain and more precisely in the hippocampus.
To deliver vectors of the invention specifically to a particular region and to a particular population of cells of the CNS, vectors may be administered by stereotaxic microinjection. For example, animals have the stereotactic frame base fixed in place (screwed into the skull). The brain with stereotactic frame base (MRIcompatible with fiducial markings) is imaged using high resolution MRI. The MRI images are then transferred to a computer which runs stereotactic software. A series of coronal, sagittal and axial images are used to determine the target (site of AAV vector injection) and trajectory. The software directly translates the

trajectory into 3 dimensional coordinates appropriate for the stereotactic frame. Holes are drilled above the entry site and the stereotactic apparatus positioned with the needle implanted at the given depth. The AAV vector is then injected at the target sites. Since the AAV vector integrates into the target cells, rather than producing viral particles, the subsequent spread of the vector is minor, and mainly a function of passive diffusion from the site of injection and of course the desired transsynaptic transport, prior to integration. The degree of diffusion may be controlled by adjusting the ratio of vector to fluid carrier.
Additional routes of administration may also comprise local application of the vector under direct visualization, e. g., superficial cortical application, or other nonstereotactic application. The vector may be delivered intrathecally, in the ventricules or by intravenous injection.

Preferably, the method of the invention comprises intracerebral administration through stereotaxic injections. However, other known delivery methods may also be adapted in accordance with the invention. For example, for a more widespread distribution of the vector across the CNS, it may be injected into the cerebrospinal fluid, e. g. , by lumbar puncture. To direct the vector to the peripheral nervous system, it may be injected into the spinal cord or into the peripheral ganglia, or the flesh (subcutaneously or intramuscularly) of the body part of interest. In certain situations the vector can be administered via an intravascular approach. For example, the vector can be administered intra-arterially (carotid) in situations where the blood-brain barrier is disturbed or not disturbed. Moreover, for more global delivery, the vector can be administered during the "opening" of the blood-brain barrier achieved by infusion of hypertonic solutions including mannitol.

Vectors used herein may be formulated in any suitable vehicle for delivery. For instance they may be placed into a pharmaceutically acceptable suspension, solution or emulsion. Suitable mediums include saline and liposomal preparations. More specifically, pharmaceutically acceptable carriers may include sterile aqueous of non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers (such as those based on Ringer's dextrose), and the like.
Preservatives and other additives may also be present such as, for example, antimicrobials, antioxidants, chelating agents, and inert gases and the like.

A colloidal dispersion system may also be used for targeted gene delivery. Colloidal dispersion systems include macromolecule complexes, nanocapsules, microspheres, beads, and lipid-based systems including oil-in-water emulsions, micelles, mixed micelles, and liposomes.

In another embodiment, the method according to the invention may further comprise injections of molecules that can help to establish the Alzheimer's disease in animals. For example, the protein Tau can be injected or overexpressed to the animal to promote the process of establishing the disease. Moreover, the protein ApoE4 can be also injected.
Thus, the invention may relates to a method for inducing the Alzheimer's disease in an animal, said method comprising the administration of at least one vector containing a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and/or the PS1 protein or a variant thereof and the protein Tau and/or the protein ApoE4.
In another embodiment, the method for inducing the Alzheimer's disease in an animal comprises the administration of a vector comprising the nucleic acid sequence that encodes the APPsl protein and the nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein and the protein Tau and/or the protein ApoE4.
In another embodiment, the method for inducing the Alzheimer's disease in an animal comprises the administration of a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the APP protein and a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the PS1 protein and the protein Tau and/or the protein ApoE4.
Particularly, a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the protein Tau and/or the protein ApoE4 may be use in the method according to the invention.

As used herein, the term "protein Tau" denotes a protein that stabilizes microtubules. The protein is abundant in neurons of the central nervous system and is less common elsewhere, but is also expressed at very low levels in CNS astrocytes and oligodendrocytes. Pathologies and dementias of the nervous system such as Alzheimer's disease can result when Tau proteins become defective and no longer stabilize microtubules properly.

As used herein, the term "protein ApoE4" denotes a protein which confers a risk for Alzheimer and cardiovascular disease. The ApoE gene codes for a protein which is implicated in the cholesterol regulation. There are three relatively common allelic variants of ApoE (accession number: NP_000032.1) known as ApoE2, ApoE3, and ApoE4. The most common

variant overall is ApoE3 which is neutral. ApoE2 protect while ApoE4 confers a higher risk for Alzheimer and cardiovascular disease.

In another aspect, the invention relates to a vector containing a nucleic acid sequence that encodes the APP mutated familiar forms (for example Tottori, Flemish, Arctic, Dutch, Iowa, Iranian, Austrian, German, French, Florida, Indiana or Australian mutations) and in particular APPsl and/or the PS1 protein for use in a method for inducing the Alzheimer's disease in an animal.

Animals of the invention

A third object of the invention relates to an animal having the Alzheimer's disease, said animal being obtained by the method according to the invention.
An animal obtained by the method of the invention will preferably display increased production of amyloid peptides, hyperphosphorylation of Tau protein and cognitive deficits, parameters which are characteristics of Alzheimer's disease.

Thus, in a specific embodiment, said animal is for use as a model of Alzheimer's disease. The invention further relates to the use of an animal having increased production of amyloid peptides, hyperphosphorylation of Tau protein and cognitive deficits as a model of Alzheimer's disease, said animal being obtained by the method of the invention.

The animal obtained by the method of the invention may be of any species. It may for instance be a rodent or a non-human primate. Particularly, the animal obtained by the method of the invention is not a human. Typically, the animal obtained by the method of the invention may be a rat, a mouse or a macacus microceb. The animal may be a genetically modified animal, such as a 'knockout' animal in which the function or expression of a gene has been reduced or eliminated.
Animals obtained by the method of the invention can be easily distinguished from prior art Alzheimer models and offer many advantages (see examples).
Indeed, contrary to prior art transgenic animals, animals obtained by the method of the invention can be obtained rapidly e.g. in one month and can be obtained in several animal lines for example in most of the mouse lines. Moreover, the animal obtained by the method of

the invention overcomes two major drawbacks of transgenic models: 1) continuous transgenes expression from in utero, 2) limitation of the transgenesis to mice.
Furthermore, contrary to animal obtained by injection, animals obtained by the method product all neurotoxic metabolites derived from APP (Aβ42 and βCTF), in a continuous manner and in a pathophysiologic level.

Methods of screening of the invention

Such animal model may for instance be of major interest for industrial validation of current and future treatments against this disease.
Therefore, in a fourth object, the invention relates to a method of screening a compound for therapeutic use in the treatment of Alzheimer's disease, using the animal of the invention.
The invention also concerns the use of said animal for assessing potential side-effects of treatment of Alzheimer's disease. Said treatment may include, for example, administration of therapeutic compounds that act on APP accumulation, as described below.
The compound to be screened for therapeutic use against Alzheimer's disease may be used for preventing or treating Alzheimer's disease. Such compound may be any kind of compound that may act Alzheimer's disease. It may for instance decrease accumulation of APP and/or decrease accumulation of neurotoxic metabolites derived from APP (Aβ42 and βCTF) for example. The compound to be screened for therapeutic use against Alzheimer's disease should preferably display a low toxicity.
The screening may for instance include the steps of administering a compound to be screened to the animal of the invention, waiting for a certain period of time, optionally repeating the administration, measuring the accumulation of APP and/or neurotoxic metabolites, and selecting the compound according to its effect on the accumulation of APP and/or neurotoxic metabolites. For example, if the compound tested allows a decrease of the accumulation of APP and/or neurotoxic metabolites, it could be select as potential therapeutic drug against Alzheimer's disease.

Alternatively, the animal of the invention may also be for use for studying the mechanism of Alzheimer's disease. Another embodiment concerns the use of an animal having Alzheimer's disease for studying the mechanism of the disease, said animal being obtained by the method of the invention. For instance, such an animal can be useful for understanding the physio-pathology or the molecular mechanism involved in Alzheimer's disease.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES:

Figure 1. Western blot analysis of transgene expression. (A) Representative Western blots of PS1 M146L, human APP (hAPP) and human + murine APP (total APP: tAPP) in hippocampus homogenates transduced by AAV9 or AAV10 vectors carrying the PS1 M146L (PS1*), APPsl (APP) and/or APPsl + PS1 M146L (APP/PS1*) transgenes. (B) A densitometric analysis of the immunoreactivities to the antibodies shown in panel A confirms effective expression of our transgenes.

Figure 2. Amyloidogenic processing of APP. APP protein is cleaved by the β secretase which leads to the production of soluble fragment sAPPβ and βCTF fragment that remains anchored in the membrane. The βCTF is then cleaved by the PS1 (belonging to the γ secretase complex) allowing production of Aβ42 and Aβ40 peptides.

Figure 3. Simultaneous intracerebral injection of AAV10-APPsl and AAV10-PS1 M146L in 8 weeks old C57BL/6J mice induce amyloid cascade one month after injection. APP is metabolized to (A) βCTF and then (B) Aβ42 peptide. (C) In contrast to APP and βCTF that decreased with PS1 M146L overexpression, Aβ42 production is increased confirming the interest of the simultaneous intracerebral injection of both vectors. (D) In accordance, abnormal phosphorylation on Threonine residue 181 of murine Tau was stimulated by the double injection of AAV coding for APP and PS1 M146L genes. In all cases, AAV10 induced greater production of neurotoxic metabolites.

Figure 4: Simultaneous intracerebral injection of AAV10-APPsl and AAV10-PS1 M146L in 8 weeks old C57BL/6J mice induce amyloid cascade at least up to five months. (A) The amyloidogenic pathway of APP involved in AD leads to the production of two metabolites of the neurotoxic APP peptides, Aβ42 and βCTF into hippocampus. (B) Hippocampal injection of AAV10 vectors encoding the APPsl and PS1 M146L proteins allowed, within the first

month, the induction of a significant production of Aβ42 as well as βCTF. This production was stable with time (analyzed up to 5 months). (C-D) The presence of neurotoxic metabolites of APP did not induce astrocytosis as determined by a stable expression of the Glial acidic fibrillatory protein (GFAP) (C) but led to increased levels of phosphorylated Tau (D) in mice hippocampus between 3 and 5 post-injection.

Figure 5: Cognitive deficits following simultaneous intracerebral injection of AAV-APPsl and AAV-PS1 M146L. Openfield: (A) Measurement of anxiety levels by analysis of time spent in the periphery relative to the time spent in the center of the apparatus (P/C ratio). The ratio rises when the anxiety of mice rises too. APPsl/PS1 M146L mice thus appeared hyper-anxious compared to PS1 M146L mice (=0.05). Morris water maze: (B) Both groups, APPsl/PS1 M146L and PS1 M146L mice, had an equivalent learning abilities. This learning was confirmed by the appearance of a spatial bias between learning days 1 and 5. (C) Unlike APPsl/PS1 M146L mice, PS1 M146L mice showed a significant preference for the target quadrant suggesting a long term memory impairment of APPsl/PS1 M146L mice 72 hours after learning session (n = 8 mice per group).

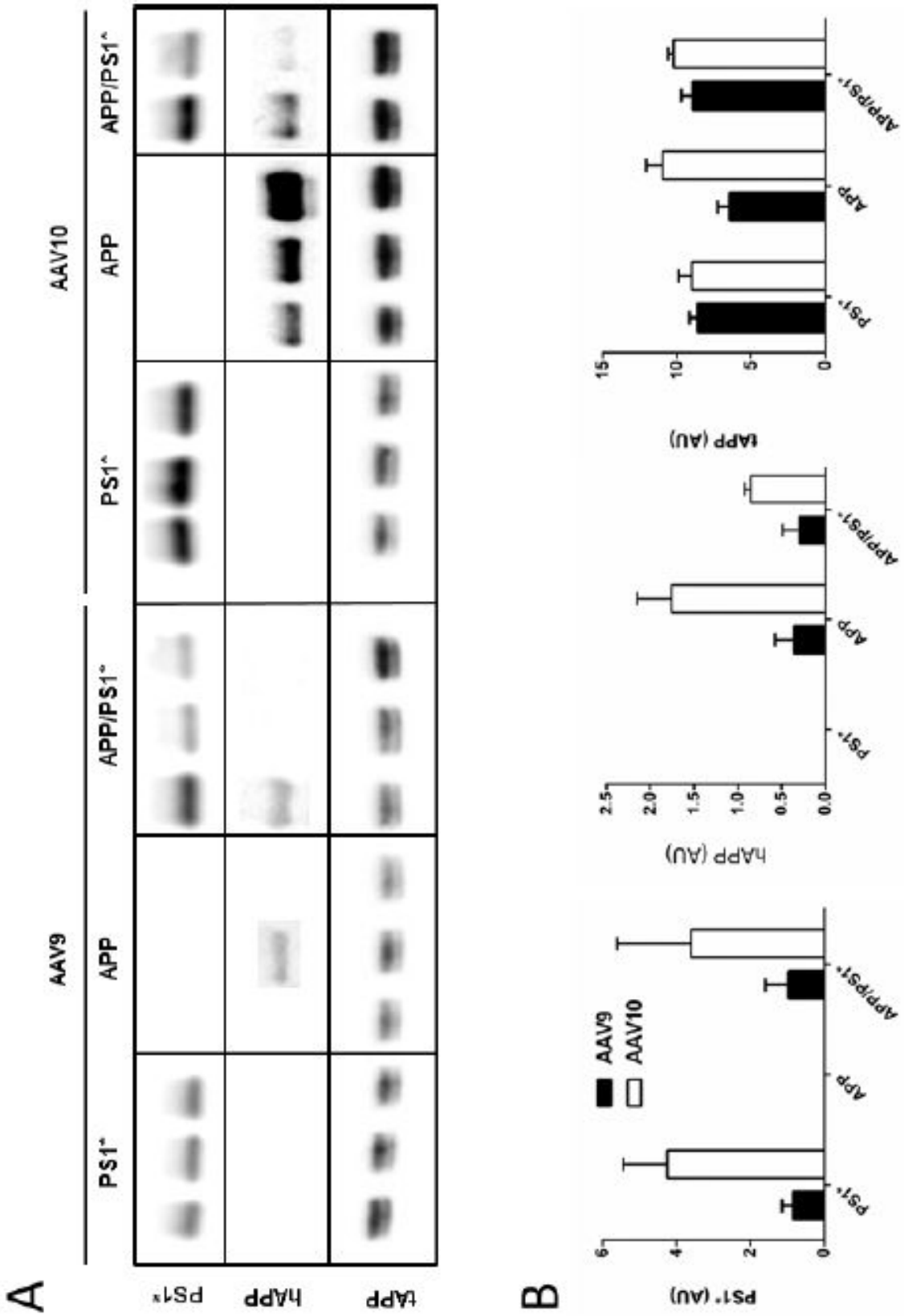

A
AAV9
AAV10
PS1*
APP
APP/PS1*
PS1*
APP
APP/PS1*
PS1*
hAPP
tAPP
B
AAV9
AAV10
PS1* (AU)
hAPP (AU)
tAPP (AU)
PS1*
APP
APP/PS1*

Figure 1

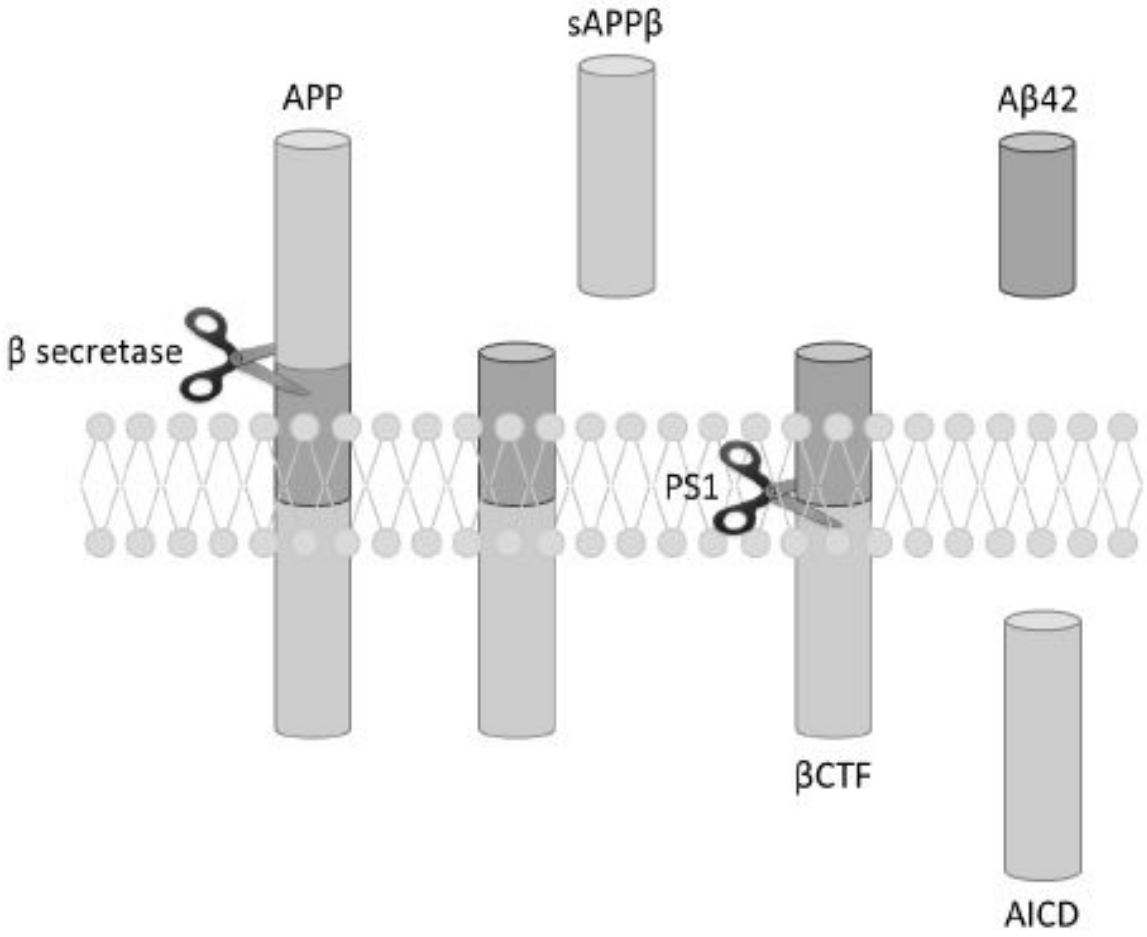


Figure 2

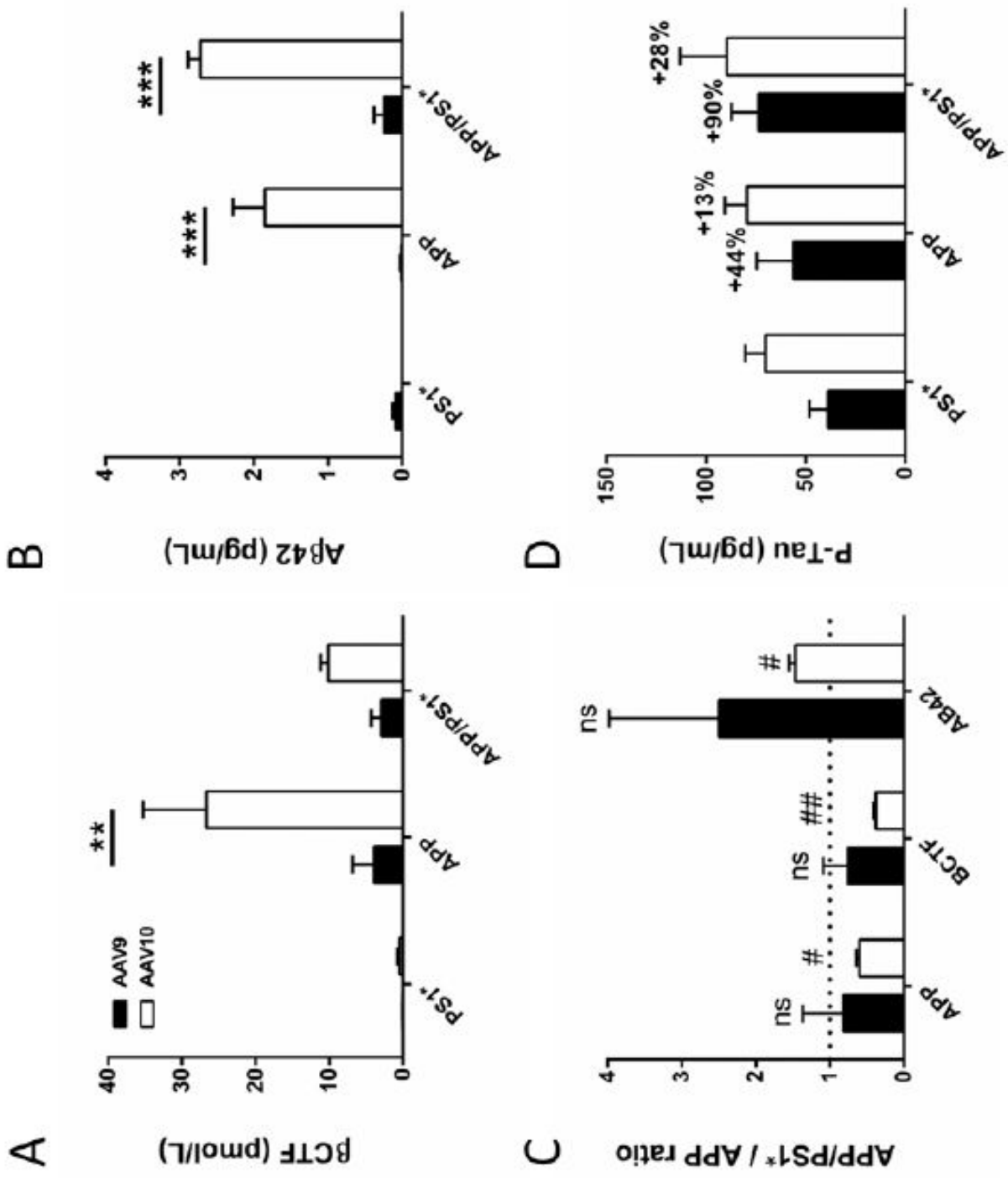

A
βCTF (pmol/L)
AAV9
AAV10
**
PS1*
APP
APP/PS1*
B
Aβ42 (pg/mL)
***
***
PS1*
APP
APP/PS1*
C
APP/PS1* / APP ratio
ns
#
ns
##
ns
#
APP
βCTF
Aβ42
D
P-Tau (pg/mL)
+28%
+90%
+13%
+44%
PS1*
APP
APP/PS1*

Figure 3

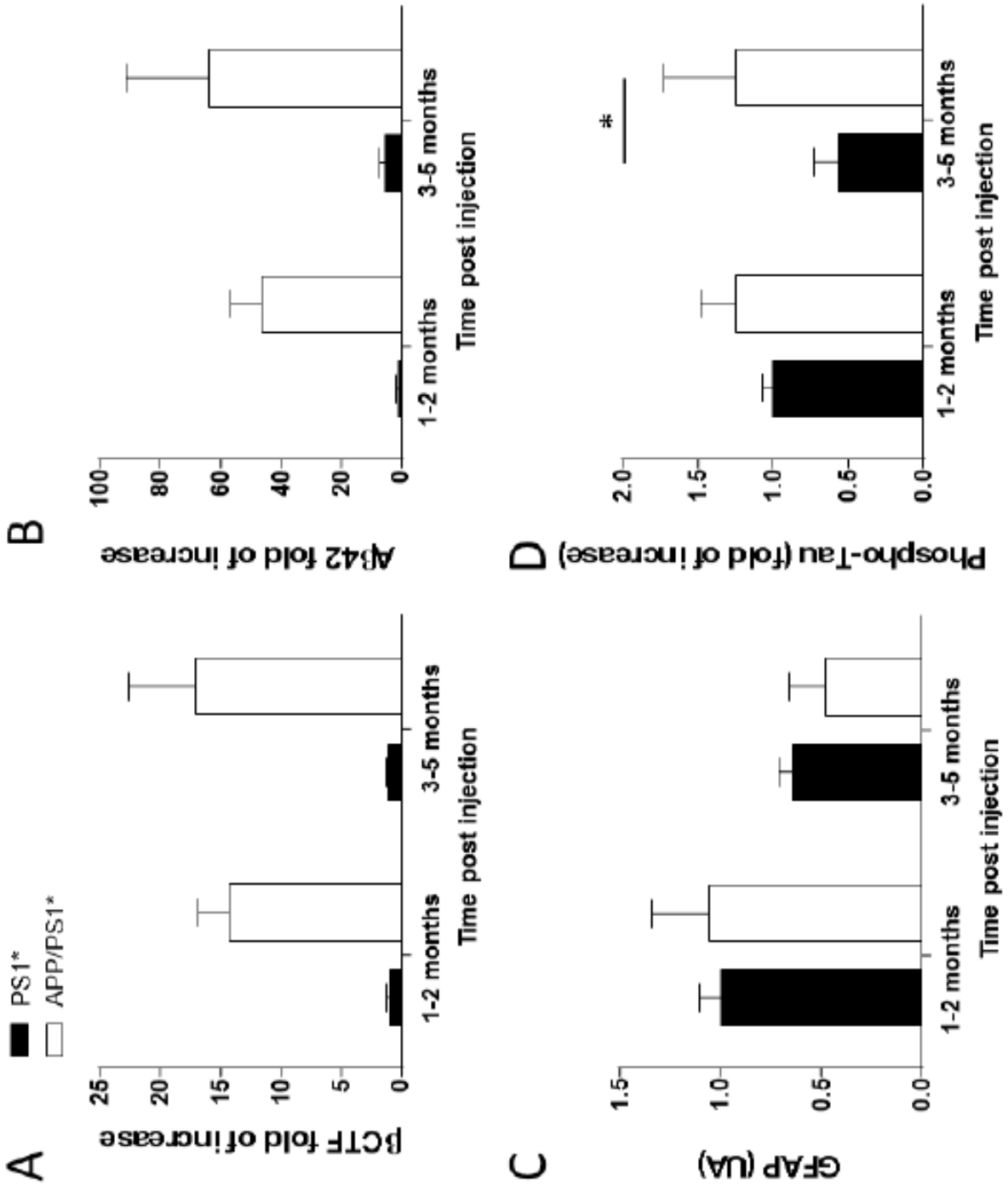

A
PS1*
APP/PS1*
βCTF fold of increase
25
20
15
10
5
0
1-2 months
3-5 months
Time post injection
B
Aβ42 fold of increase
100
80
60
40
20
0
1-2 months
3-5 months
Time post injection
C
GFAP (UA)
1.5
1.0
0.5
0.0
1-2 months
3-5 months
Time post injection
D
Phospho-Tau (fold of increase)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
1-2 months
3-5 months
Time post injection

Figure 4

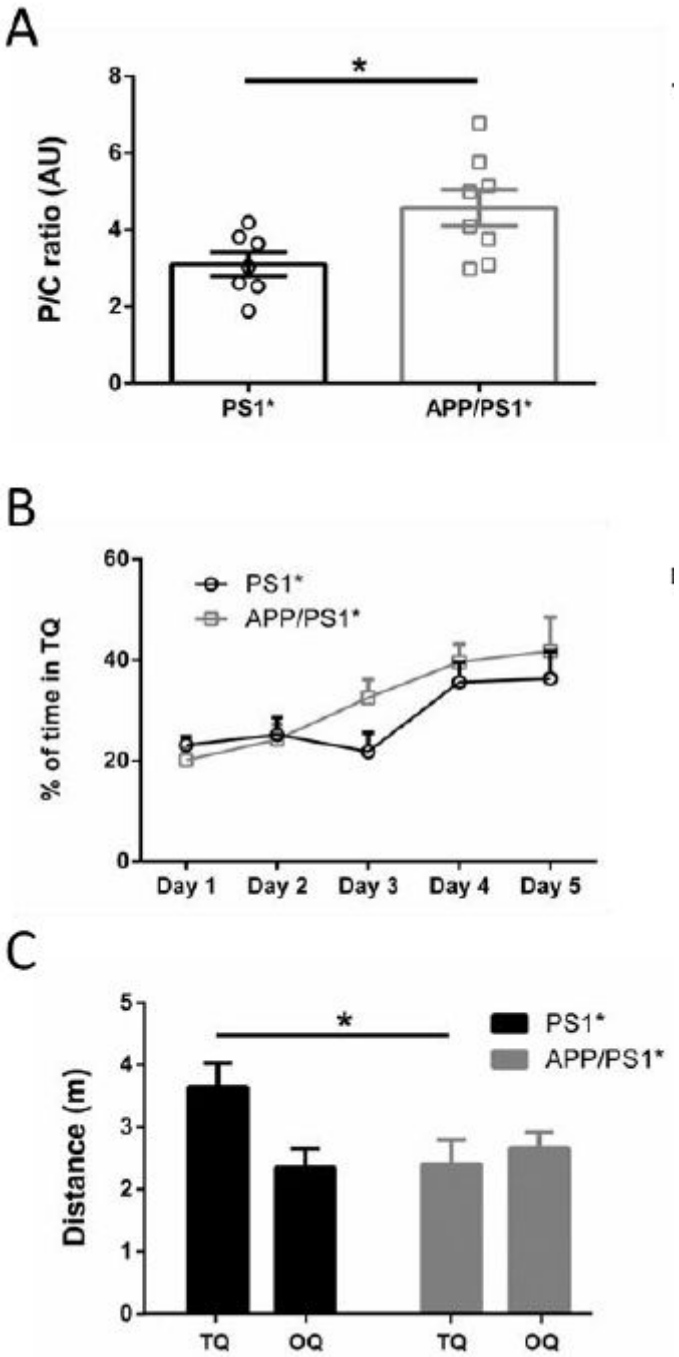

A
*
P/C ratio (AU)
8
6
4
2
0
PS1*
APP/PS1*
B
PS1*
APP/PS1*
% of time in TQ
60
40
20
0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
C
*
PS1*
APP/PS1*
Distance (m)
5
4
3
2
1
0
TQ
OQ
TQ
OQ

Figure 5

EXAMPLE:

Material & Methods

Tissue collection

Test mice were anesthetized with ketamine/xylazine and perfused transcardially with 20 ml PBS. One hemisphere was post-fixed for 24h in 4% PFA, cryoprotected in 30% of sucrose in PBS and cut into 40 µm sections using a freezing microtome for immunohistochemical and histological analyses (data not shown). The other half was frozen immediately on dry ice and used for Western blots and ELISAs.

ELISAs and Western blots

Mice hippocampal tissue was homogenized in a lysis buffer (TBS, NaCl 150 mM, Triton 1%, Phosphatase and Protease inhibitors) and centrifugated 20' at 13000 rpm. Protein levels were normalized by BCA protein assay (Pierce Biotechnology). Extracted Aβ was then measured using the MSD Human Aβ42 Kit. βCTF was measured using the IBL Human βCTF Kit and the P-Tau using the Innogenetics Phospho-Tau 181P Kit. Aliquots of protein were electrophoretically separated using NuPAGE Bis-Tris Gels (Life Technologies). Electrophoresed proteins were then transferred to nitrocellulose membranes using the iBlot 7-Minute Blotting System, blocked in Tris-buffered saline containing 5% non-fat dry milk and subsequently hybridized with vaarious primary antibodies: APP 6E10 (Sigma), APP Cter (Calbiochem) and Presinilin 1 (Millipore). Densitometry quantification of bands was realised with the Bio1D software.

Behavioral analysis

Open field: Movement in an open field was used to assess whether APP and PS1 injection had an effect on anxiety which may affect memory and learning behaviors. Mice were placed in the center of a square field. The amount of time spent at the periphery along the walls was recorded as measures of anxiety.

Morris water maze: The Morris water maze (MWM) task quantifies mice memory abilities (Morris, 1984). This test was used as a measure of spatial learning, the mouse must learn the location of a hidden platform by referring to visual cues placed around the room. The platform location was kept constant throughout training but the starting point varied between trials. MWM consists of five consecutive learning days (3 trials per day). Seventy-two hours

after the last trial of the fifth day a probe trial is realized to quantify long-term memory. In both testing phases, distance traveled in the quadrant containing the platform or target quadrant is quantified. An effective memory storage must therefore be accompanied by the establishment of a spatial bias characterized by a distance travelled in the target quadrant over than 25%.

Results

Example 1: Relevance of the animal model

To evaluate the relevance of our model, we have performed a comparative study between AAV9 and AAV10 vectors encoding the codon-optimized human APP (APPsl, Swedish-London mutations, promoting the cleavage by β secretase complex) and/or PS1 M146L (M146L) transgenes in mice (Figure 1). Stereotactic injections were performed bilaterally in the hippocampus, an early-affected region in AD.

These results show that the expression of human APPsl by gene transfer leads to lowly increase the total quantity of APP. Co-express with the PS1 M146L, human APP and βCTF amount decrease due to APP metabolization by secretase complexes. Moreover, AAV10 virus seems to be better to efficiently produce human APP in mice than AAV9 virus.

AD is characterized by the amyloidogenic pathway of APP metabolism that results from the cleavage of APP by PS1 (Figure 2). Animals injected with AAV vector encoding human PS1 M146L protein only (control animal) or with AAV vectors encoding the APPsl and PS1 M146L were sacrificed at 1 month post-injection for histopathological (data not shown), and biochemical and molecular studies (Figures 3).

We confirmed by immunohistochemistry our results showed in Figure 1: AAV10 seems to be better than AAV9 to express APP, in particular in CA2 and Subiculum regions of the hippocampus (data not shown). Co-expression of APPsl and PS1 M146L leads to decreased concentration of βCTF as revealed by APP C-ter antibody, or 4G8 antibody staining (data not shown). Expression of PS1 M146L leads to increased metabolism of βCT in Aβ42 peptides as explained in Figure 2.

Example 2: Production of metabolites in the animal model

APP is cleaved into different metabolites like C-terminal fragment of APP (βCTF) and Aβ42 peptide with characterized neurotoxic properties. We showed that expression of PS1 M146L leads to increased metabolism of βCTF in Aβ42 peptides. Indeed decreased concentration of

βCTF is observed in the hippocampus of mice co-injected with AAV10-APPsl and AAV10-PS1 M146L vectors (Figure 3).

The amount of βCTF showed respectively a 56- and 25-fold increase for APPsl and APPsl/PS1 M146L mice compared to PS1 M146L control mice one month after injection (Figure 3A). Overexpression of human APPsl thus significantly promotes the production of βCTF. βCTF concentration is decreased in APPsl/PS1 M146L mice compared to APPsl mice, demonstrating increased metabolism of βCTF with overexpression of PS1 M146L. βCTF was also detected in cortical structures in the absence of cortical production sites which argues for diffusion of βCTF produced into the hippocampus towards the cortical structures (data not shown). Aβ42 (the main neurotoxic peptide in AD) production is, on the other side, strongly increased in APPsl/PS1 M146L mice.

A longitudinal study was performed to analyze the kinetics of neurotoxic peptides production in mouse brain (Figure 4). A statistically significant (43 fold) increase of Aβ42 peptides production was observed in mice injected with both AAV10-APPsl and AAV10-PS1 M146L vectors in the hippocampus ($p=.002$). βCTF production also showed a significant 15-fold increase ($p=.0001$). In addition, evidence of murine Tau hyperphosphorylation (Threonine residue 181) appeared between 3 and 5 months after injection ($p=0.03$).

Example 3: Behavioral analysis of the animal model

At 2.5 months post-injection, a behavioral study was performed in injected animals (Figure 5) for a period of 2.5-3 months. The Openfield test was used to evaluate spontaneous locomotion of mice and behavior response to a new environment. The ratio between time spent in the periphery (noted P, area less anxiogenic) and in the center (noted C) of the open field was significantly increased in APPsl/PS1 M146L mice compared to PS1 M146L mice ($p<0.05$), suggesting an increased level of anxiety in APPsl/PS1 M146L mice.

During the learning phase of the Morris water maze test, no learning defect was observed in APPsl/PS1 M146L compared to PS1 M146L control mice The two groups had therefore a normal learning profile. During the restitution phase of acquired information (72 hours retention time), a failure to return to platform quadrant previously acquired was observed in APPsl/PS1 M146L mice. The distance traveled by the mouse PS1 M146L in the target quadrant (TQ) was significantly greater than in other quadrants ($p=0.01$) confirming the presence of a spatial bias. The presence of this spatial bias was not observed for APPsl/PS1 M146L mice (p=ns). So APPsl/PS1 M146L mice traveled less distance in the quadrant

previously containing the platform. These results confirm a lack of long-term memory in these mice compared to control mouse PS1 M146L (p=0.02).

In conclusion, AAV-APPsl and AAV-PS1 M146L injection in wild type mouse leads to rapid (1 month) and stable (evaluated up to 5 months) increased production of amyloid peptides, hyperphosphorylation of Tau protein and cognitive deficits in mice, parameters which are characteristics of Alzheimer's disease.
Such models could be useful to analyze deleterious mechanisms induced by amyloid pathway, as well as to evaluate biomarkers or screen therapeutic approaches.

Example 4: Advantages of animal model of the invention from other models
The generation of AD animal models aims to reproduce symptoms, injuries or causes similar to those observed in the human disease. Many strains of transgenic mice are successful to reproduce these lesions: extracellular deposits of Aß peptide and intracellular accumulation of Tau protein. However the existing models are imperfect. To identify new therapeutic targets and the effectiveness of treatments in AD, various pharmaceutical companies have developed their own mouse models. Some companies also developed / used different models for provision of services as Contract Research Organizations (CROs).
These models have specific drawbacks:

- Transgenic models have an important expression of transgenes from the embryonic stages of development which will ultimately lead to the establishment of adaptive mechanisms. In addition, the cost of production is very high. They often imperfectly reproduce the AD phenotype and are difficult to transpose to larger species. Obtain models of AD in large species (rats and primates in particular) would be crucial to develop biomarkers and validate therapeutic approaches in a context as close as possible to the human pathophysiology.

- Models by intracerebral injection of amyloid peptides, truncated or not, are very easy to develop, relatively inexpensive and do not induce adaptive mechanisms. However, they suffer from several drawbacks:in addition to providing a partial model of AD, they do not have all the neurotoxic products generated in AD and in particular βCTF, products described as highly neurotoxic even at low doses. The administered concentrations of Aβ42 or 25-35 are much higher than those observed in human pathological conditions. These models are therefore particularly suitable for measuring the neuroprotective ability of drugs but have a reduced interest to characterize compounds that modulate thepathological APP metabolism or

intracellular changes resulting from the production of neurotoxic metabolites derived from APP.

In comparison with current transgenic models, the present AAV-APPsl / AAV-PS1 M146L model offers many advantages (see table 2):

- No establishment of breeding colony, but induction of “on-demand model”, on standard commercial animals with an expression of toxic metabolites of APP at one month after injection: saving time (at least one year for the establishment of sufficient colony to produce experimental batches) and financial gain (no need to decontaminate strains before implantation nor to keep the breeding continuously).
- Ability to induce amyloid pathology in specific transgenic mouse lines. It could be useful to determine the involvement of new therapeutic targets (for example to understand a hypothetic involvement of the kinase DIRK1A in AD we could induce the amyloid pathology by these constructions in a model of mice over-expressing DIRK1A protein).
- The use of a model by gene transfer overcomes two major drawbacks of transgenic models: 1) continuous transgenes expression from in utero, 2) limitation of the transgenesis to mice. The transfer of this technology in other species (particularly rats & non-human primates) will allow imaging studies, search for biomarkers in cerebrospinal or blood fluids and more advanced cognitive tests.

As compared to models by injection, our model has many advantages (see table 1):

- Production of all neurotoxic metabolites derived from APP (Aβ42 and βCTF)
- Continuous production of all neurotoxic APP derivatives
- Pathophysiologic production level

Thus, a mouse model (and/or rat) of Alzheimer's disease by gene transfer would be a powerful tool that would combine the advantages of transgenic animals (complete and stable modeling of the amyloid cascade) without the inconvenience of adaptive mechanisms, and with reduced production costs. Such model could be a major alternative for companies like CROs.

REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

Cartier, N. et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. Science 326, 818-823, doi:10.1126/science.1171242 (2009).

Deglon, N. & Hantraye, P. Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. The journal of gene medicine 7, 530-539, doi:10.1002/jgm.707 (2005).

Devi, L. & Ohno, M. Phospho-eIF2alpha level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD mice. PloS one 5, e12974, doi:10.1371/journal.pone.0012974 (2010).

Drummond, E. S. et al. Pathology associated with AAV mediated expression of beta amyloid or C100 in adult mouse hippocampus and cerebellum. PloS one 8, e59166, doi:10.1371/journal.pone.0059166 (2013).

Jaworski, T. et al. AAV-tau mediates pyramidal neurodegeneration by cell-cycle re-entry without neurofibrillary tangle formation in wild-type mice. PloS one 4, e7280, doi:10.1371/journal.pone.0007280 (2009).

Kayed, R. et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science 300, 486-489, doi:10.1126/science.1079469 (2003).

Kim, T. K. et al. Analysis of differential plaque depositions in the brains of Tg2576 and Tg-APPswe/PS1dE9 transgenic mouse models of Alzheimer's disease. Experimental & molecular medicine 44, 492-502, doi:10.3858/emm.2012.44.8.056 (2012).

Kirik, D. et al. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22, 2780-2791, doi:20026246 (2002).

Lawlor, P. A. et al. Novel rat Alzheimer's disease models based on AAV-mediated gene transfer to selectively increase hippocampal Abeta levels. Molecular neurodegeneration 2, 11, doi:10.1186/1750-1326-2-11 (2007).

Lee, J. E. & Han, P. L. An update of animal models of Alzheimer's disease with a reevaluation of plaque depositions. Experimental neurobiology 22, 84-95, doi:10.5607/en.2013.22.2.84 (2013).

Lee, K. W. et al. Progressive neuronal loss and behavioral impairments of transgenic C57BL/6 inbred mice expressing the carboxy terminus of amyloid precursor protein. Neurobiology of disease 22, 10-24, doi:10.1016/j.nbd.2005.09.011 (2006).

Lewis, J. et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. Science 293, 1487-1491, doi:10.1126/science.1058189 (2001).

Lo Bianco, C., Ridet, J. L., Schneider, B. L., Deglon, N. & Aebischer, P. alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of

Parkinson's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 10813-10818, doi:10.1073/pnas.152339799 (2002).

Nalbantoglu, J. et al. Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. Nature 387, 500-505, doi:10.1038/387500a0 (1997).

McGowan, E. et al. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. Neuron 47, 191-199, doi:10.1016/j.neuron.2005.06.030 (2005).

Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P. & LaFerla, F. M. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. Neurobiology of aging 24, 1063-1070 (2003).

Palop, J. J. et al. Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 9572-9577, doi:10.1073/pnas.1133381100 (2003).

Schindowski, K. et al. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. The American journal of pathology 169, 599-616, doi:10.2353/ajpath.2006.060002 (2006).

Selkoe, D. J. Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 11039-11041, doi:10.1073/pnas.211352598 (2001).

Tanemura, K. et al. Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22, 133-141 (2002).

Weiss, C. et al. Impaired eyeblink conditioning and decreased hippocampal volume in PDAPP V717F mice. Neurobiology of disease 11, 425-433 (2002).

Westerman, M. A. et al. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22, 1858-1867 (2002).

Wolf, S. A. et al. Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. Biological psychiatry 60, 1314-1323, doi:10.1016/j.biopsych.2006.04.004 (2006).

Publications et communications

Publications

Burlot M-A, Braudeau J, Michaelsen-Preusse K, Potier B, Ayciriex S, Varin J, Gautier B, Djelti F, **Audrain M**, Dauphinot L, Fernandez-Gomez F-J, Caillierez R, Laprévote O, Bièche I, Auzeil N, Potier M-C, Dutar P, Korte M, Buée L, Blum D, Cartier N. **Cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology**. *Human Molecular Genetics.* September 2015

Fol R, Braudeau J, Ludewig S, Abel T, Weyer S, Roederer J-P, Brod F, **Audrain M**, Bemelmans A-P, Buchholz C, Korte M, Cartier N, Müller U. **Viral gene transfer of APPsα rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model**. *Acta Neuropathologica.* November 2015

Audrain M, Fol R, Dutar P, Potier B, Billard J-M, Flament J, Alves S, Burlot M-A, Dufayet-Chaffaud G, Bemelmans A-P, Valette J, Hantraye P, Déglon N, Cartier N, Braudeau J. **Alzheimer's disease-like APP processing in wild-type mice identifies synaptic defects as initial steps of disease progression**. *Molecular Neurodegeneration*. January 2016

Audrain M*, Souchet B*, Haddjeri A, Alves S, Fol R, Déglon N, Hantraye P, Akwa Y, Billard J-M, Potier B, Dutar P, Cartier N, Braudeau J. **Early-onset Alzheimer's disease and its progression explored in a novel rat model based on gene transfer**. *In preparation*.

Alves S, Churlaud G, **Audrain M**, Braudeau J, Fol R, Dufayet-Chaffaud G, Fouquet F, Bosch F, Klatzmann D, Cartier N. **Sustained peripheral AAV-based administration of Interleukin-2 improves amyloid pathology and memory in Alzheimer's disease mice**. *In preparation*

Communications

AAIC 15, Washington, USA, July 18-23, 2015 (poster presentation)

AD/PD 2015, Nice, France, March 18-22, 2015 (selected oral presentation)

AAIC 14, Copenhagen, Denmark, July 12-17, 2014 (poster presentation)

Réunion Francophone sur la Maladie d'Alzheimer & les syndromes apparentés, Montpellier, France, June 11-13, 2014 (selected oral presentation)

CEA-I²BM PhD Students Meeting, SHFJ Orsay, France, June 24th, 2014 (oral presentation)

SFTCG, Toulouse, France, March 23-26, 2014 (poster presentation)

DSV PhD Students Meeting, Porquerolles, France, October 13-15, 2013 (oral presentation)

Bibliographie

1. Cummings, J. L., Morstorf, T. & Zhong, K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's research & therapy* **6,** 37 (2014).

2. Wu, Y.-T., Fratiglioni, L., Matthews, F. E., Lobo, A., Breteler, M. M. B., Skoog, I. & Brayne, C. Dementia in western Europe: epidemiological evidence and implications for policy making. *Lancet neurology* **15,** 116–124 (2016).

3. Alzheimer, A. Über einen eigenartigen schweren Erkrankung- sprozeβ der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt* **23,** 1129–1136 (1906).

4. Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N. & Murtagh, F. R. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clinical anatomy* **8,** 429–431 (1995).

5. Maurer, K., Volk, S. & Gerbaldo, H. Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet* **349,** 1546–1549 (1997).

6. Perusini, G. Uber klinisch und histologisch eigenartige psychische Erkrankungen des späteren Lebensalters. *Nissl F, Alzheimer A, eds. Histologische und Histopathologische Arbeiten* 297–351 (1909).

7. Alzheimer, A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die gesamte neurologie und psychiatrie* **4,** 356–385 (1911).

8. Klünemann, H. H., Fronhöfer, W., Wurster, H., Fischer, W., Ibach, B. & Klein, H. E. Alzheimer's second patient: Johann F. and his family. *Annals of neurology* **52,** 520–523 (2002).

9. Divry, P. & Florkin, M. Sur les proprietes optiques de l'amyloide. *C R Soc Biol* **97,** 1808–1810 (1927).

10. Kidd, M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197,** 192–193 (1963).

11. Glenner, G. G. & Wong, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications* **120,** 885–890 (1984).

12. Glenner, G. G., Wong, C. W., Quaranta, V. & Eanes, E. D. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* **2,** 357–369 (1984).

13. Brion, J. P., Passareiro, E., Nunez, J. & Flament-Durand, J. Mise en evidence immunologique de la protein tau au niveau des lesions de degenerescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol* **95,** 229–235 (1985).

14. Nukina, N. & Ihara, Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J. Biochem.* **99,** 1541–1544 (1986).

15. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S. & Wisniewski, H. M. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *The Journal of biological chemistry* **261,** 6084–6089 (1986).

16. Robakis, N. K., Ramakrishna, N., Wolfe, G. & Wisniewski, H. M. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84,** 4190–4194 (1987).

17. Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B. & Benson, M. D. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* **254,** 97–99 (1991).

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

19. Chartier-Harlin, M. C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P. & Hardy, J. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* **353,** 844–846 (1991).

20. Mullan, M., Houlden, H., Windelspecht, M., Fidani, L., Lombardi, C., Diaz, P., Rossor, M., Crook, R., Hardy, J. & Duff, K. A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat. Genet.* **2,** 340–342 (1992).

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

22. Reznik-Wolf, H., Treves, T. A., Davidson, M., Aharon-Peretz, J., St George Hyslop, P. H., Chapman, J., Korczyn, A. D., Goldman, B. & Friedman, E. A novel mutation of presenilin 1 in familial Alzheimer's disease in Israel detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum. Genet.* **98,** 700–702 (1996).

23. Lemere, C. A., Lopera, F., Kosik, K. S., Lendon, C. L., Ossa, J., Saido, T. C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A., Madrigal, L., Hincapie, L., Arango, J. C., Anthony, D. C., Koo, E. H., Goate, A. M. & Selkoe, D. J. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nature medicine* **2,** 1146–1150 (1996).

24. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. & Citron, M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286,** 735–741 (1999).

25. Fjell, A. M., McEvoy, L., Holland, D., Dale, A. M., Walhovd, K. B. & Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. Brain changes in older adults at very low risk for Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33,** 8237–8242 (2013).

26. Erten-Lyons, D., Dodge, H. H., Woltjer, R., Silbert, L. C., Howieson, D. B., Kramer, P. & Kaye, J. A. Neuropathologic basis of age-associated brain atrophy. *JAMA Neurol* **70,** 616–622 (2013).

27. Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M. & Braak, H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **58,** 1791–1800 (2002).

28. DaRocha-Souto, B., Scotton, T. C., Coma, M., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Sereno, L., Rodriguez, M., Sanchez, B., Hyman, B. T. & Gomez-Isla, T. Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **70,** 360–376 (2011).

29. Cheng, I. H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J. J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., Puolivali, J., Lesne, S., Ashe, K. H., Muchowski, P. J. & Mucke, L. Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *The Journal of biological chemistry* **282,** 23818–23828 (2007).

30. Tomiyama, T., Nagata, T., Shimada, H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., Takuma, H., Kuwano, R., Imagawa, M., Ataka, S., Wada, Y., Yoshioka, E., Nishizaki, T., Watanabe, Y. & Mori, H. A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Annals of neurology* **63,** 377–387 (2008).

31. Storandt, M., Mintun, M. A., Head, D. & Morris, J. C. Cognitive decline and brain volume loss as signatures of cerebral amyloid-beta peptide deposition identified with Pittsburgh compound B: cognitive decline associated with Abeta deposition. *Archives of neurology* **66,** 1476–1481 (2009).

32. Morris, J. C., Roe, C. M., Grant, E. A., Head, D., Storandt, M., Goate, A. M., Fagan, A. M., Holtzman, D. M. & Mintun, M. A. Pittsburgh compound B imaging and prediction of progression from cognitive normality to symptomatic Alzheimer disease. *Archives of neurology* **66,** 1469–1475 (2009).

33. Gibson, P. H. Form and distribution of senile plaques seen in silver impregnated sections in the brains of intellectually normal elderly people and people with Alzheimer-type dementia. *Neuropathology and applied neurobiology* **9,** 379–389 (1983).

34. Mackenzie, I. R., McLachlan, R. S., Kubu, C. S. & Miller, L. A. Prospective neuropsychological assessment of nondemented patients with biopsy proven senile plaques. *Neurology* **46,** 425–429 (1996).

35. Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T. & Hyman, B. T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42,** 631–639 (1992).

36. Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussière, T., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Gold, G. & Hof, P. R. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* **60,** 1495–1500 (2003).

37. Kidd, M. ALZHEIMER'S DISEASE--AN ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY. *Brain : a journal of neurology* **87,** 307–320 (1964).

38. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. & Binder, L. I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83,** 4913–4917 (1986).

39. Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E.-M. & Hyman, B. T. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* **103,** 26–35 (2002).

40. Braak, H. & Braak, E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* **82,** 239–259 (1991).

41. Taylor, K. I. & Probst, A. Anatomic localization of the transentorhinal region of the perirhinal cortex. *Neurobiology of aging* **29,** 1591–1596 (2008).

42. Price, J. L., Davis, P. B., Morris, J. C. & White, D. L. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **12,** 295–312 (1991).

43. Grignon, Y., Duyckaerts, C., Bennecib, M. & Hauw, J. J. Cytoarchitectonic alterations in the supramarginal gyrus of late onset Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* **95,** 395–406 (1998).

44. Troncoso, J. C., Sukhov, R. R., Kawas, C. H. & Koliatsos, V. E. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease: correlations with senile plaques and disease progression. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **55,** 1134–1142 (1996).

45. Selznick, L. A., Holtzman, D. M., Han, B. H., Gökden, M., Srinivasan, A. N., Johnson, E. M. & Roth, K. A. In situ immunodetection of neuronal caspase-3 activation in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **58,** 1020–1026 (1999).

46. Scheff, S. W., DeKosky, S. T. & Price, D. A. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **11,** 29–37 (1990).

47. Scheff, S. W. & Price, D. A. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* **33,** 190–199 (1993).

48. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298,** 789–791 (2002).

49. Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, W., Da Silva, H. A., Haines, J. L., Perkicak-Vance, M. A., Tanzi, R. E., Roses, A. D., Fraser, P. E., Rommens, J. M. & St George Hyslop, P. H. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375,** 754–760 (1995).

50. Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K. & Tsuda, T. Familial Alzheimer‘s disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer’s disease type 3 gene. *Nature* **376,** 775–778 (1995).

51. Finckh, U., Alberici, A., Antoniazzi, M., Benussi, L., Fedi, V., Giannini, C., Gal, A., Nitsch, R. M. & Binetti, G. Variable expression of familial Alzheimer disease associated with presenilin 2 mutation M239I. *Neurology* **54,** 2006–2008 (2000).

52. Cruts, M., van Duijn, C. M., Backhovens, H., Van den Broeck, M., Wehnert, A., Serneels, S., Sherrington, R., Hutton, M., Hardy, J., St George Hyslop, P. H., Hofman, A. & Van Broeckhoven, C. Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Human molecular genetics* **7,** 43–51 (1998).

53. Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D. M. & Neve, R. L. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* **235,** 880–884 (1987).

54. Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. & Müller-Hill, B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325,** 733–736 (1987).

55. Goldgaber, D., Lerman, M. I., McBride, O. W., Saffiotti, U. & Gajdusek, D. C. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* **235,** 877–880 (1987).

56. Cai, X. D., Golde, T. E. & Younkin, S. G. Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* **259,** 514–516 (1993).

57. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. & Selkoe, D. J. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* **360,** 672–674 (1992).

58. Haass, C., Hung, A. Y., Selkoe, D. J. & Teplow, D. B. Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *The Journal of biological chemistry* **269,** 17741–17748 (1994).

59. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297,** 353–356 (2002).

60. Xia, D., Watanabe, H., Wu, B., Lee, S. H., Li, Y., Tsvetkov, E., Bolshakov, V. Y., Shen, J. & Kelleher, R. J. Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease. *Neuron* **85,** 967–981 (2015).

61. Koedam, E. L. G. E., Lauffer, V., van der Vlies, A. E., van der Flier, W. M., Scheltens, P. & Pijnenburg, Y. A. L. Early-versus late-onset Alzheimer's disease: more than age alone. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **19,** 1401–1408 (2010).

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

63. Ueki, A., Kawano, M., Namba, Y., Kawakami, M. & Ikeda, K. A high frequency of apolipoprotein E4 isoprotein in Japanese patients with late-onset nonfamilial Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* **163,** 166–168 (1993).

64. Noguchi, S., Murakami, K. & Yamada, N. Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease. *Lancet* **342,** 737 (1993).

65. Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. & Gauthier, S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* **342,** 697–699 (1993).

66. Rebeck, G. W., Reiter, J. S., Strickland, D. K. & Hyman, B. T. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* **11,** 575–580 (1993).

67. DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Parsadanian, M., May, P. C., O'Dell, M. A., Taylor, J. W., Harmony, J. A. K., Aronow, B. J., Bales, K. R., Paul, S. M. & Holtzman, D. M. ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron* **41,** 193–202 (2004).

68. Xu, W., Tan, L. & Yu, J.-T. The Role of PICALM in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **52,** 399–413 (2015).

69. Rogers, J., Li, R., Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Ahern, G., Cao, P., Kolody, H., Vedders, L., Kolb, W. P. & Sabbagh, M. Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiology of aging* **27,** 1733–1739 (2006).

70. Crehan, H., Holton, P., Wray, S., Pocock, J., Guerreiro, R. & Hardy, J. Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. *Immunobiology* **217,** 244–250 (2012).

71. Bertram, L., Lange, C., Mullin, K., Parkinson, M., Hsiao, M., Hogan, M. F., Schjeide, B. M. M., Hooli, B., Divito, J., Ionita, I., Jiang, H., Laird, N., Moscarillo, T., Ohlsen, K. L., Elliott, K., Wang, X., Hu-Lince, D., Ryder, M., Murphy, A., Wagner, S. L., Blacker, D., Becker, K. D. & Tanzi, R. E. Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am. J. Hum. Genet.* **83,** 623–632 (2008).

72. Neumann, H. & Daly, M. J. Variant TREM2 as risk factor for Alzheimer's disease. *The New England*

journal of medicine **368,** 182–184 (2013).

73. Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J. S. K., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J.-C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., Powell, J., St George-Hyslop, P., Singleton, A., Hardy, J.Alzheimer Genetic Analysis Group. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* **368,** 117–127 (2013).

74. Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A. I., Lah, J. J., Rujescu, D., Hampel, H., Giegling, I., Andreassen, O. A., Engedal, K., Ulstein, I., Djurovic, S., Ibrahim-Verbaas, C., Hofman, A., Ikram, M. A., van Duijn, C. M., Thorsteinsdottir, U., Kong, A. & Stefansson, K. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* **368,** 107–116 (2013).

75. Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D. & Tanzi, R. E. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.* **39,** 17–23 (2007).

76. Dubal, D. B. & Wise, P. M. Estrogen and neuroprotection: from clinical observations to molecular mechanisms. *Dialogues Clin Neurosci* **4,** 149–161 (2002).

77. Pines, A. Surgical menopause and cognitive decline. *Climacteric* **17,** 580–582 (2014).

78. Domínguez, R. O., Pagano, M. A., Marschoff, E. R., González, S. E., Repetto, M. G. & Serra, J. A. Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. *Neurologia* **29,** 567–572 (2014).

79. Folstein, M. F., Folstein, S. E. & McHugh, P. R. 'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* **12,** 189–198 (1975).

80. Fagan, A. M., Roe, C. M., Xiong, C., Mintun, M. A., Morris, J. C. & Holtzman, D. M. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Archives of neurology* **64,** 343–349 (2007).

81. Fagan, A. M., Head, D., Shah, A. R., Marcus, D., Mintun, M., Morris, J. C. & Holtzman, D. M. Decreased cerebrospinal fluid Abeta(42) correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly. *Annals of neurology* **65,** 176–183 (2009).

82. Sunderland, T., Linker, G., Mirza, N., Putnam, K. T., Friedman, D. L., Kimmel, L. H., Bergeson, J., Manetti, G. J., Zimmermann, M., Tang, B., Bartko, J. J. & Cohen, R. M. Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* **289,** 2094–2103 (2003).

83. Mattsson, N., Zetterberg, H., Hansson, O., Andreasen, N., Parnetti, L., Jonsson, M., Herukka, S.-K., van der Flier, W. M., Blankenstein, M. A., Ewers, M., Rich, K., Kaiser, E., Verbeek, M., Tsolaki, M., Mulugeta, E., Rosén, E., Aarsland, D., Visser, P. J., Schröder, J., Marcusson, J., de Leon, M., Hampel, H., Scheltens, P., Pirttilä, T., Wallin, A., Jönhagen, M. E., Minthon, L., Winblad, B. & Blennow, K. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* **302,** 385–393 (2009).

84. Mathis, C. A., Lopresti, B. J. & Klunk, W. E. Impact of amyloid imaging on drug development in Alzheimer's disease. *Nucl. Med. Biol.* **34,** 809–822 (2007).

85. Kesslak, J. P., Nalcioglu, O. & Cotman, C. W. Quantification of magnetic resonance scans for hippocampal and parahippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Neurology* **41,** 51–54 (1991).

86. Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J. & Scheltens, P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet neurology* **6,** 734–746 (2007).

87. Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J. L., Blennow, K., DeKosky, S. T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G. B., Fox, N. C., Galasko, D., Habert, M.-O., Jicha, G. A., Nordberg, A., Pasquier, F., Rabinovici, G., Robert, P., Rowe, C., Salloway, S., Sarazin, M., Epelbaum, S., de Souza, L. C., Vellas, B., Visser, P. J., Schneider, L., Stern, Y., Scheltens, P. & Cummings, J. L. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet neurology* **13,** 614–629 (2014).

88. Drachman, D. A. & Leavitt, J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging?

Archives of neurology **30,** 113–121 (1974).

89. Davies, P. & Maloney, A. J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2,** 1403 (1976).

90. Filser, S., Ovsepian, S. V., Masana, M., Blazquez-Llorca, L., Brandt Elvang, A., Volbracht, C., Müller, M. B., Jung, C. K. E. & Herms, J. Pharmacological inhibition of BACE1 impairs synaptic plasticity and cognitive functions. *Biological psychiatry* **77,** 729–739 (2015).

91. Salloway, S., Sperling, R., Fox, N. C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L. S., Porsteinsson, A. P., Ferris, S., Reichert, M., Ketter, N., Nejadnik, B., Guenzler, V., Miloslavsky, M., Wang, D., Lu, Y., Lull, J., Tudor, I. C., Liu, E., Grundman, M., Yuen, E., Black, R., Brashear, H. R.Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* **370,** 322–333 (2014).

92. Doody, R. S., Thomas, R. G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, P. S., Siemers, E., Liu-Seifert, H., Mohs, R., Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering CommitteeSolanezumab Study Group. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* **370,** 311–321 (2014).

93. Gandy, S. & Sano, M. Alzheimer disease: Solanezumab-prospects for meaningful interventions in AD? *Nat Rev Neurol* **11,** 669–670 (2015).

94. DeMattos, R. B., Lu, J., Tang, Y., Racke, M. M., Delong, C. A., Tzaferis, J. A., Hole, J. T., Forster, B. M., McDonnell, P. C., Liu, F., Kinley, R. D., Jordan, W. H. & Hutton, M. L. A plaque-specific antibody clears existing β-amyloid plaques in Alzheimer's disease mice. *Neuron* **76,** 908–920 (2012).

95. Tsai, S.-Y. A., Pokrass, M. J., Klauer, N. R., Nohara, H. & Su, T.-P. Sigma-1 receptor regulates Tau phosphorylation and axon extension by shaping p35 turnover via myristic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112,** 6742–6747 (2015).

96. Hardy, J. & Allsop, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences* **12,** 383–388 (1991).

97. Kojro, E. & Fahrenholz, F. The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell. Biochem.* **38,** 105–127 (2005).

98. Fol, R., Braudeau, J., Ludewig, S., Abel, T., Weyer, S. W., Roederer, J.-P., Brod, F., Audrain, M., Bemelmans, A.-P., Buchholz, C. J., Korte, M., Cartier, N. & Müller, U. C. Viral gene transfer of APPsα rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta neuropathologica* (2015). doi:10.1007/s00401-015-1498-9

99. LaFerla, F. M., Green, K. N. & Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience* **8,** 499–509 (2007).

100. Luo, Y., Bolon, B., Damore, M. A., Fitzpatrick, D., Liu, H., Zhang, J., Yan, Q., Vassar, R. & Citron, M. BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. *Neurobiology of disease* **14,** 81–88 (2003).

101. Tabaton, M., Zhu, X., Perry, G., Smith, M. A. & Giliberto, L. Signaling effect of amyloid-beta(42) on the processing of AbetaPP. *Experimental neurology* **221,** 18–25 (2010).

102. Yao, Z.-X. & Papadopoulos, V. Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J.* **16,** 1677–1679 (2002).

103. Bailey, J. A., Maloney, B., Ge, Y.-W. & Lahiri, D. K. Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid β-peptide interacting domain (AβID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene* **488,** 13–22 (2011).

104. Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M. A., Goldstein, L. E., Duong, S., Tanzi, R. E. & Moir, R. D. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PloS one* **5,** e9505 (2010).

105. Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A. & Katzman, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of neurology* **30,** 572–580 (1991).

106. Dickson, D. W., Crystal, H. A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I. & Davies, P. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiology of aging* **16,** 285–98–

discussion 298–304 (1995).

107. McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I. & Masters, C. L. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* **46,** 860–866 (1999).

108. Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E. & Rogers, J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* **155,** 853–862 (1999).

109. Selkoe, D. J. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural brain research* **192,** 106–113 (2008).

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

111. Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kayed, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. & LaFerla, F. M. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* **39,** 409–421 (2003).

112. Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L. & LaFerla, F. M. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* **45,** 675–688 (2005).

113. Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L. & Selkoe, D. J. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine* **14,** 837–842 (2008).

114. Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S. & Malinow, R. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* **52,** 831–843 (2006).

115. Li, S., Hong, S., Shepardson, N. E., Walsh, D. M., Shankar, G. M. & Selkoe, D. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* **62,** 788–801 (2009).

116. Pham, E., Crews, L., Ubhi, K., Hansen, L., Adame, A., Cartier, A., Salmon, D., Galasko, D., Michael, S., Savas, J. N., Yates, J. R., Glabe, C. & Masliah, E. Progressive accumulation of amyloid-beta oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *The FEBS journal* **277,** 3051–3067 (2010).

117. Roselli, F., Tirard, M., Lu, J., Hutzler, P., Lamberti, P., Livrea, P., Morabito, M. & Almeida, O. F. X. Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25,** 11061–11070 (2005).

118. Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N. E., Shankar, G. M. & Selkoe, D. J. Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31,** 6627–6638 (2011).

119. Jacob, C. P., Koutsilieri, E., Bartl, J., Neuen-Jacob, E., Arzberger, T., Zander, N., Ravid, R., Roggendorf, W., Riederer, P. & Grünblatt, E. Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **11,** 97–116 (2007).

120. Wang, J.-Z., Xia, Y.-Y., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **33 Suppl 1,** S123–39 (2013).

121. Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. & Gong, C.-X. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* **22,** 1942–1950 (2005).

122. Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M. & Feany, M. B. Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* **293,** 711–714 (2001).

123. Götz, J., Ittner, L. M., Fändrich, M. & Schonrock, N. Is tau aggregation toxic or protective: a sensible

question in the absence of sensitive methods? *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **14,** 423–429 (2008).

124. Herrup, K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat. Neurosci.* **18,** 794–799 (2015).

125. Schneider, L. S., Mangialasche, F., Andreasen, N., Feldman, H., Giacobini, E., Jones, R., Mantua, V., Mecocci, P., Pani, L., Winblad, B. & Kivipelto, M. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J. Intern. Med.* **275,** 251–283 (2014).

126. Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T. & Gillespie, F. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* **373,** 523–527 (1995).

127. Quon, D., Wang, Y., Catalano, R., Scardina, J. M., Murakami, K. & Cordell, B. Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature* **352,** 239–241 (1991).

128. Lamb, B. T., Sisodia, S. S., Lawler, A. M., Slunt, H. H., Kitt, C. A., Kearns, W. G., Pearson, P. L., Price, D. L. & Gearhart, J. D. Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat. Genet.* **5,** 22–30 (1993).

129. Pearson, B. E. & Choi, T. K. Expression of the human beta-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90,** 10578–10582 (1993).

130. Dodart, J. C., Meziane, H., Mathis, C., Bales, K. R., Paul, S. M. & Ungerer, A. Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Behav. Neurosci.* **113,** 982–990 (1999).

131. Larson, J., Lynch, G., Games, D. & Seubert, P. Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain research* **840,** 23–35 (1999).

132. Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Saido, T. C., Shoji, M., Ashe, K. H. & Younkin, S. G. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21,** 372–381 (2001).

133. Westerman, M. A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Carlson, G. A., Younkin, S. G. & Ashe, K. H. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22,** 1858–1867 (2002).

134. Jacobsen, J. S., Wu, C.-C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J. H., Pangalos, M. N., Reinhart, P. H. & Bloom, F. E. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103,** 5161–5166 (2006).

135. Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P., Paganetti, P. A., Waridel, C., Calhoun, M. E., Jucker, M., Probst, A., Staufenbiel, M. & Sommer, B. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94,** 13287–13292 (1997).

136. Sturchler-Pierrat, C. & Staufenbiel, M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Annals of the New York Academy of Sciences* **920,** 134–139 (2000).

137. Hellweg, R., Lohmann, P., Huber, R., Kühl, A. & Riepe, M. W. Spatial navigation in complex and radial mazes in APP23 animals and neurotrophin signaling as a biological marker of early impairment. *Learn. Mem.* **13,** 63–71 (2006).

138. Maia, L. F., Kaeser, S. A., Reichwald, J., Hruscha, M., Martus, P., Staufenbiel, M. & Jucker, M. Changes in amyloid-β and Tau in the cerebrospinal fluid of transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein. *Sci Transl Med* **5,** 194re2–194re2 (2013).

139. Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K. & McConlogue, L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20,** 4050–4058 (2000).

140. Chishti, M. A., Yang, D. S., Janus, C., Phinney, A. L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., Turner, S., Lozza, G., Grilli, M., Kunicki, S., Morissette, C., Paquette, J., Gervais, F., Bergeron, C., Fraser, P. E., Carlson, G. A., George-Hyslop, P. S. & Westaway, D. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *The Journal of biological chemistry* **276,** 21562–21570 (2001).

141. Dudal, S., Krzywkowski, P., Paquette, J., Morissette, C., Lacombe, D., Tremblay, P. & Gervais, F. Inflammation occurs early during the Abeta deposition process in TgCRND8 mice. *Neurobiology of aging* **25,** 861–871 (2004).

142. Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., Iwata, N. & Saido, T. C. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **17,** 661–663 (2014).

143. Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J. & Younkin, S. Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* **383,** 710–713 (1996).

144. Barrow, P. A., Empson, R. M., Gladwell, S. J., Anderson, C. M., Killick, R., Yu, X., Jefferys, J. G. & Duff, K. Functional phenotype in transgenic mice expressing mutant human presenilin-1. *Neurobiology of disease* **7,** 119–126 (2000).

145. Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J. & Tonegawa, S. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* **89,** 629–639 (1997).

146. Yu, H., Saura, C. A., Choi, S. Y., Sun, L. D., Yang, X., Handler, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Fedeles, B., Wilson, M. A., Younkin, S., Kandel, E. R., Kirkwood, A. & Shen, J. APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice. *Neuron* **31,** 713–726 (2001).

147. Auffret, A., Gautheron, V., Mattson, M. P., Mariani, J. & Rovira, C. Progressive age-related impairment of the late long-term potentiation in Alzheimer's disease presenilin-1 mutant knock-in mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **19,** 1021–1033 (2010).

148. Jankowsky, J. L., Slunt, H. H., Ratovitski, T., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. & Borchelt, D. R. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol. Eng.* **17,** 157–165 (2001).

149. Jankowsky, J. L., Xu, G., Fromholt, D., Gonzales, V. & Borchelt, D. R. Environmental enrichment exacerbates amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **62,** 1220–1227 (2003).

150. Savonenko, A., Xu, G. M., Melnikova, T., Morton, J. L., Gonzales, V., Wong, M. P. F., Price, D. L., Tang, F., Markowska, A. L. & Borchelt, D. R. Episodic-like memory deficits in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiology of disease* **18,** 602–617 (2005).

151. Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R. & Vassar, R. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26,** 10129–10140 (2006).

152. Kimura, R. & Ohno, M. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiology of disease* **33,** 229–235 (2009).

153. Casas, C., Sergeant, N., Itier, J.-M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., Vingtdeux, V., van de Steeg, E., Ret, G., Canton, T., Drobecq, H., Clark, A., Bonici, B., Delacourte, A., Benavides, J., Schmitz, C., Tremp, G., Bayer, T. A., Benoit, P. & Pradier, L. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *The American journal of pathology* **165,** 1289–1300 (2004).

154. Breyhan, H., Wirths, O., Duan, K., Marcello, A., Rettig, J. & Bayer, T. A. APP/PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy. *Acta neuropathologica* **117,** 677–685 (2009).

155. Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W. L., Yen, S. H.,

Dickson, D. W., Davies, P. & Hutton, M. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat. Genet.* **25,** 402–405 (2000).

156. Tanemura, K., Murayama, M., Akagi, T., Hashikawa, T., Tominaga, T., Ichikawa, M., Yamaguchi, H. & Takashima, A. Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22,** 133–141 (2002).

157. Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Begard, S., Brion, J. P., Hamdane, M. & Buee, L. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *The American journal of pathology* **169,** 599–616 (2006).

158. Burlot, M.-A., Braudeau, J., Michaelsen-Preusse, K., Potier, B., Ayciriex, S., Varin, J., Gautier, B., Djelti, F., Audrain, M., Dauphinot, L., Fernandez-Gomez, F.-J., Caillierez, R., Laprévote, O., Bièche, I., Auzeil, N., Potier, M.-C., Dutar, P., Korte, M., Buée, L., Blum, D. & Cartier, N. Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology. *Human molecular genetics* **24,** 5965–5976 (2015).

159. LaFerla, F. M., Tinkle, B. T., Bieberich, C. J., Haudenschild, C. C. & Jay, G. The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat. Genet.* **9,** 21–30 (1995).

160. McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., Skipper, L., Murphy, M. P., Beard, J., Das, P., Jansen, K., Delucia, M., Lin, W.-L., Dolios, G., Wang, R., Eckman, C. B., Dickson, D. W., Hutton, M., Hardy, J. & Golde, T. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* **47,** 191–199 (2005).

161. Malin, D. H., Crothers, M. K., Lake, J. R., Goyarzu, P., Plotner, R. E., Garcia, S. A., Spell, S. H., Tomsic, B. J., Giordano, T. & Kowall, N. W. Hippocampal injections of amyloid beta-peptide 1-40 impair subsequent one-trial/day reward learning. *Neurobiology of learning and memory* **76,** 125–137 (2001).

162. Stéphan, A., Laroche, S. & Davis, S. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21,** 5703–5714 (2001).

163. Lecanu, L., Greeson, J. & Papadopoulos, V. Beta-amyloid and oxidative stress jointly induce neuronal death, amyloid deposits, gliosis, and memory impairment in the rat brain. *Pharmacology* **76,** 19–33 (2006).

164. Nakamura, S., Murayama, N., Noshita, T., Annoura, H. & Ohno, T. Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. *Brain research* **912,** 128–136 (2001).

165. Arif, M., Chikuma, T., Ahmed, M. M., Nakazato, M., Smith, M. A. & Kato, T. Effects of memantine on soluble Alphabeta(25-35)-induced changes in peptidergic and glial cells in Alzheimer's disease model rat brain regions. *Neuroscience* **164,** 1199–1209 (2009).

166. Do Carmo, S. & Cuello, A. C. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Molecular neurodegeneration* **8,** 37 (2013).

167. Echeverria, V., Ducatenzeiler, A., Alhonen, L., Janne, J., Grant, S. M., Wandosell, F., Muro, A., Baralle, F., Li, H., Duff, K., Szyf, M. & Cuello, A. C. Rat transgenic models with a phenotype of intracellular Abeta accumulation in hippocampus and cortex. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **6,** 209–219 (2004).

168. Ruiz-Opazo, N., Kosik, K. S., Lopez, L. V., Bagamasbad, P., Ponce, L. R. & Herrera, V. L. Attenuated hippocampus-dependent learning and memory decline in transgenic TgAPPswe Fischer-344 rats. *Molecular medicine* **10,** 36–44 (2004).

169. Folkesson, R., Malkiewicz, K., Kloskowska, E., Nilsson, T., Popova, E., Bogdanovic, N., Ganten, U., Ganten, D., Bader, M., Winblad, B. & Benedikz, E. A transgenic rat expressing human APP with the Swedish Alzheimer's disease mutation. *Biochemical and biophysical research communications* **358,** 777–782 (2007).

170. Kloskowska, E., Pham, T. M., Nilsson, T., Zhu, S., Oberg, J., Codita, A., Pedersen, L. A., Pedersen, J. T., Malkiewicz, K., Winblad, B., Folkesson, R. & Benedikz, E. Cognitive impairment in the Tg6590

transgenic rat model of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* **14,** 1816–1823 (2010).

171. Flood, D. G., Lin, Y.-G., Lang, D. M., Trusko, S. P., Hirsch, J. D., Savage, M. J., Scott, R. W. & Howland, D. S. A transgenic rat model of Alzheimer's disease with extracellular Abeta deposition. *Neurobiology of aging* **30,** 1078–1090 (2009).

172. Liu, L., Orozco, I. J., Planel, E., Wen, Y., Bretteville, A., Krishnamurthy, P., Wang, L., Herman, M., Figueroa, H., Yu, W. H., Arancio, O. & Duff, K. A transgenic rat that develops Alzheimer's disease-like amyloid pathology, deficits in synaptic plasticity and cognitive impairment. *Neurobiology of disease* **31,** 46–57 (2008).

173. Leon, W. C., Canneva, F., Partridge, V., Allard, S., Ferretti, M. T., DeWilde, A., Vercauteren, F., Atifeh, R., Ducatenzeiler, A., Klein, W., Szyf, M., Alhonen, L. & Cuello, A. C. A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **20,** 113–126 (2010).

174. Nilsen, L. H., Melø, T. M., Saether, O., Witter, M. P. & Sonnewald, U. Altered neurochemical profile in the McGill-R-Thy1-APP rat model of Alzheimer's disease: a longitudinal in vivo 1 H MRS study. *Journal of neurochemistry* **123,** 532–541 (2012).

175. Languille, S., Blanc, S., Blin, O., Canale, C. I., Dal-Pan, A., Devau, G., Dhenain, M., Dorieux, O., Epelbaum, J., Gomez, D., Hardy, I., Henry, P.-Y., Irving, E. A., Marchal, J., Mestre-Francés, N., Perret, M., Picq, J.-L., Pifferi, F., Rahman, A., Schenker, E., Terrien, J., Théry, M., Verdier, J.-M. & Aujard, F. The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies. *Ageing Res. Rev.* **11,** 150–162 (2012).

176. Roy, M., Cardoso, C., Dorieux, O., Malgorn, C., Epelbaum, S., Petit, F., Kraska, A., Brouillet, E., Delatour, B., Perret, M., Aujard, F. & Dhenain, M. Age-associated evolution of plasmatic amyloid in mouse lemur primates: relationship with intracellular amyloid deposition. *Neurobiology of aging* **36,** 149–156 (2015).

177. Mestre-Francés, N., Keller, E., Calenda, A., Barelli, H., Checler, F. & Bons, N. Immunohistochemical analysis of cerebral cortical and vascular lesions in the primate Microcebus murinus reveal distinct amyloid beta1-42 and beta1-40 immunoreactivity profiles. *Neurobiology of disease* **7,** 1–8 (2000).

178. Alzheimer's Disease-Like Pathology Induced by Amyloid-beta Oligomers in Nonhuman Primates. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34,** 13629–13643 (2014).

179. Ardiles, A. O., Tapia-Rojas, C. C., Mandal, M., Alexandre, F., Kirkwood, A., Inestrosa, N. C. & Palacios, A. G. Postsynaptic dysfunction is associated with spatial and object recognition memory loss in a natural model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109,** 13835–13840 (2012).

180. Inestrosa, N. C., Ríos, J. A., Cisternas, P., Tapia-Rojas, C., Rivera, D. S., Braidy, N., Zolezzi, J. M., Godoy, J. A., Carvajal, F. J., Ardiles, A. O., Bozinovic, F., Palacios, A. G. & Sachdev, P. S. Age Progression of Neuropathological Markers in the Brain of the Chilean Rodent Octodon degus, a Natural Model of Alzheimer's Disease. *Brain Pathol.* **25,** 679–691 (2015).

181. Hassan, W. M., Dostal, V., Huemann, B. N., Yerg, J. E. & Link, C. D. Identifying Aβ-specific pathogenic mechanisms using a nematode model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **36,** 857–866 (2015).

182. Sashidhara, K. V., Modukuri, R. K., Jadiya, P., Dodda, R. P., Kumar, M., Sridhar, B., Kumar, V., Haque, R., Siddiqi, M. I. & Nazir, A. Benzofuran-chalcone hybrids as potential multifunctional agents against Alzheimer's disease: synthesis and in vivo studies with transgenic Caenorhabditis elegans. *ChemMedChem* **9,** 2671–2684 (2014).

183. Zamberlan, D. C., Arantes, L. P., Machado, M. L., Golombieski, R. & Soares, F. A. A. Diphenyl-diselenide suppresses amyloid-β peptide in Caenorhabditis elegans model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **278,** 40–50 (2014).

184. Kong, Y., Wu, J., Zhang, D., Wan, C. & Yuan, L. The Role of miR-124 in Drosophila Alzheimer's Disease Model by Targeting Delta in Notch Signaling Pathway. *Curr. Mol. Med.* **15,** 980–989 (2015).

185. Fernandez-Funez, P., de Mena, L. & Rincon-Limas, D. E. Modeling the complex pathology of Alzheimer's disease in Drosophila. *Experimental neurology* **274,** 58–71 (2015).

186. Ping, Y., Hahm, E.-T., Waro, G., Song, Q., Vo-Ba, D.-A., Licursi, A., Bao, H., Ganoe, L., Finch, K. & Tsunoda, S. Linking aβ42-induced hyperexcitability to neurodegeneration, learning and motor deficits, and a shorter lifespan in an Alzheimer's model. *PLoS Genet.* **11,** e1005025 (2015).

187. Trinchese, F., Liu, S., Ninan, I., Puzzo, D., Jacob, J. P. & Arancio, O. Cell cultures from animal models of Alzheimer's disease as a tool for faster screening and testing of drug efficacy. *J. Mol. Neurosci.* **24,** 15–21 (2004).

188. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126,** 663–676 (2006).

189. Hunsberger, J. G., Rao, M., Kurtzberg, J., Bulte, J. W. M., Atala, A., LaFerla, F. M., Greely, H. T., Sawa, A., Gandy, S., Schneider, L. S. & Doraiswamy, P. M. Accelerating stem cell trials for Alzheimer's disease. *Lancet neurology* (2015). doi:10.1016/S1474-4422(15)00332-4

190. Choi, S. H., Kim, Y. H., Hebisch, M., Sliwinski, C., Lee, S., D'Avanzo, C., Chen, H., Hooli, B., Asselin, C., Muffat, J., Klee, J. B., Zhang, C., Wainger, B. J., Peitz, M., Kovacs, D. M., Woolf, C. J., Wagner, S. L., Tanzi, R. E. & Kim, D. Y. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* **515,** 274–278 (2014).

191. Daya, S. & Berns, K. I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin. Microbiol. Rev.* **21,** 583–593 (2008).

192. Kaplitt, M. G., Leone, P., Samulski, R. J., Xiao, X., Pfaff, D. W., O'Malley, K. L. & During, M. J. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat. Genet.* **8,** 148–154 (1994).

193. Bourdenx, M., Dutheil, N., Bezard, E. & Dehay, B. Systemic gene delivery to the central nervous system using Adeno-associated virus. *Front Mol Neurosci* **7,** 50 (2014).

194. Samulski, R. J., Berns, K. I., Tan, M. & Muzyczka, N. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79,** 2077–2081 (1982).

195. Hudry, E., Van Dam, D., Kulik, W., De Deyn, P. P., Stet, F. S., Ahouansou, O., Benraiss, A., Delacourte, A., Bougnères, P., Aubourg, P. & Cartier, N. Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **18,** 44–53 (2010).

196. Djelti, F., Braudeau, J., Hudry, E., Dhenain, M., Varin, J., Bièche, I., Marquer, C., Chali, F., Ayciriex, S., Auzeil, N., Alves, S., Langui, D., Potier, M.-C., Laprévote, O., Vidaud, M., Duyckaerts, C., Miles, R., Aubourg, P. & Cartier, N. CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* **138,** 2383–2398 (2015).

197. Lawlor, P. A., Bland, R. J., Das, P., Price, R. W., Holloway, V., Smithson, L., Dicker, B. L., During, M. J., Young, D. & Golde, T. E. Novel rat Alzheimer's disease models based on AAV-mediated gene transfer to selectively increase hippocampal Abeta levels. *Molecular neurodegeneration* **2,** 11 (2007).

198. Jaworski, T., Dewachter, I., Lechat, B., Croes, S., Termont, A., Demedts, D., Borghgraef, P., Devijver, H., Filipkowski, R. K., Kaczmarek, L., Kügler, S. & Van Leuven, F. AAV-tau mediates pyramidal neurodegeneration by cell-cycle re-entry without neurofibrillary tangle formation in wild-type mice. *PloS one* **4,** e7280 (2009).

199. Drummond, E. S., Muhling, J., Martins, R. N., Wijaya, L. K., Ehlert, E. M. & Harvey, A. R. Pathology associated with AAV mediated expression of beta amyloid or C100 in adult mouse hippocampus and cerebellum. *PloS one* **8,** e59166 (2013).

200. Higgins, L. S., Catalano, R., Quon, D. & Cordell, B. Transgenic mice expressing human beta-APP751, but not mice expressing beta-APP695, display early Alzheimer's disease-like histopathology. *Annals of the New York Academy of Sciences* **695,** 224–227 (1993).

201. Bushman, D. M., Kaeser, G. E., Siddoway, B., Westra, J. W., Rivera, R. R., Rehen, S. K., Yung, Y. C. & Chun, J. Genomic mosaicism with increased amyloid precursor protein (APP) gene copy number in single neurons from sporadic Alzheimer's disease brains. *eLife* **4,** e05116 (2015).

202. Kim, J., Chakrabarty, P., Hanna, A., March, A., Dickson, D. W., Borchelt, D. R., Golde, T. & Janus,

C. Normal cognition in transgenic BRI2-Aβ mice. *Molecular neurodegeneration* **8,** 15 (2013).

203. Jan, A., Gokce, O., Luthi-Carter, R. & Lashuel, H. A. The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. *The Journal of biological chemistry* **283,** 28176–28189 (2008).

204. Yan, Y. & Wang, C. Abeta40 protects non-toxic Abeta42 monomer from aggregation. *J. Mol. Biol.* **369,** 909–916 (2007).

205. Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepian, S. V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L. D. B., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher, B., Wenninger-Weinzierl, A., Kremmer, E., Heneka, M. T., Thal, D. R., Giedraitis, V., Lannfelt, L., Müller, U., Livesey, F. J., Meissner, F., Herms, J., Konnerth, A., Marie, H. & Haass, C. η-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* **526,** 443–447 (2015).

206. Hardingham, G. E. & Bading, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature reviews. Neuroscience* **11,** 682–696 (2010).

207. Kervern, M., Angeli, A., Nicole, O., Léveillé, F., Parent, B., Villette, V., Buisson, A. & Dutar, P. Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid-β peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **32,** 183–196 (2012).

208. Parsons, M. P. & Raymond, L. A. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron* **82,** 279–293 (2014).

209. Potier, B., Billard, J.-M., Rivière, S., Sinet, P.-M., Denis, I., Champeil-Potokar, G., Grintal, B., Jouvenceau, A., Kollen, M. & Dutar, P. Reduction in glutamate uptake is associated with extrasynaptic NMDA and metabotropic glutamate receptor activation at the hippocampal CA1 synapse of aged rats. *Aging Cell* **9,** 722–735 (2010).

210. Xia, P., Chen, H.-S. V., Zhang, D. & Lipton, S. A. Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30,** 11246–11250 (2010).

211. Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M. W., Okamoto, S.-I., Dziewczapolski, G., Nakamura, T., Cao, G., Pratt, A. E., Kang, Y.-J., Tu, S., Molokanova, E., McKercher, S. R., Hires, S. A., Sason, H., Stouffer, D. G., Buczynski, M. W., Solomon, J. P., Michael, S., Powers, E. T., Kelly, J. W., Roberts, A., Tong, G., Fang-Newmeyer, T., Parker, J., Holland, E. A., Zhang, D., Nakanishi, N., Chen, H.-S. V., Wolosker, H., Wang, Y., Parsons, L. H., Ambasudhan, R., Masliah, E., Heinemann, S. F., Piña-Crespo, J. C. & Lipton, S. A. Aβ induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110,** E2518–27 (2013).

212. 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30,** 15927–15942 (2010).

213. Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R. & Südhof, T. C. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* **329,** 1663–1667 (2010).

214. Sharma, M., Burré, J., Bronk, P., Zhang, Y., Xu, W. & Südhof, T. C. CSPα knockout causes neurodegeneration by impairing SNAP-25 function. *The EMBO journal* **31,** 829–841 (2012).

215. Sharma, M., Burré, J. & Südhof, T. C. Proteasome inhibition alleviates SNARE-dependent neurodegeneration. *Sci Transl Med* **4,** 147ra113–147ra113 (2012).

216. Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lee, M. K., Younkin, L. H., Wagner, S. L., Younkin, S. G. & Borchelt, D. R. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Human molecular genetics* **13,** 159–170 (2004).

217. George, S., Rönnbäck, A., Gouras, G. K., Petit, G. H., Grueninger, F., Winblad, B., Graff, C. & Brundin, P. Lesion of the subiculum reduces the spread of amyloid beta pathology to interconnected brain regions in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications* **2,** 17 (2014).

218. Hochard, A., Oumata, N., Bettayeb, K., Gloulou, O., Fant, X., Durieu, E., Buron, N., Porceddu, M., Borgne-Sanchez, A., Galons, H., Flajolet, M. & Meijer, L. Aftins increase amyloid-β42, lower amyloid-β38, and do not alter amyloid-β40 extracellular production in vitro: toward a chemical model of Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **35,** 107–120 (2013).

219. Kane, M. D., Lipinski, W. J., Callahan, M. J., Bian, F., Durham, R. A., Schwarz, R. D., Roher, A. E. & Walker, L. C. Evidence for seeding of beta -amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20,** 3606–3611 (2000).

220. Epelbaum, J., Guillou, J.-L., Gastambide, F., Hoyer, D., Duron, E. & Viollet, C. Somatostatin, Alzheimer's disease and cognition: an old story coming of age? *Progress in neurobiology* **89,** 153–161 (2009).

221. Martel, G., Simon, A., Nocera, S., Kalainathan, S., Pidoux, L., Blum, D., Leclère-Turbant, S., Diaz, J., Geny, D., Moyse, E., Videau, C., Buée, L., Epelbaum, J. & Viollet, C. Aging, but not tau pathology, impacts olfactory performances and somatostatin systems in THY-Tau22 mice. *Neurobiology of aging* **36,** 1013–1028 (2015).