



HAL
open science

**Maladie d'Alzheimer et Syndrome d'Apnées du
Sommeil : deux pathologies liées ? Etude des
conséquences d'un stress hypoxique sur la cognition et la
pathologie Tau dans le modèle murin transgénique
THY-Tau22**

Claire Alves Pires

► **To cite this version:**

Claire Alves Pires. Maladie d'Alzheimer et Syndrome d'Apnées du Sommeil : deux pathologies liées ? Etude des conséquences d'un stress hypoxique sur la cognition et la pathologie Tau dans le modèle murin transgénique THY-Tau22. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S035 . tel-01883857

HAL Id: tel-01883857

<https://theses.hal.science/tel-01883857>

Submitted on 28 Sep 2018

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 LILLE NORD DE FRANCE
UNIVERSITE DROIT ET SANTE DE LILLE 2
Ecole Doctorale Biologie Santé (ED446)

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2
Spécialité : neurosciences

Présentée par
Claire ALVES PIRES

Maladie d'Alzheimer et Syndrome d'Apnées du Sommeil : deux pathologies liées ?

Etude des conséquences d'un stress hypoxique sur la cognition et la pathologie Tau dans le modèle murin transgénique THY-Tau22.

Soutenue publiquement le 10 Décembre 2015 devant le Jury composé de :

Mme le Pr. Marie Pia D'ORTHO
Mr le Pr. Jean-Pierre BRION
Mr le Pr. Jean-Louis PÉPIN
Mme le Pr. Christelle CHARLEY-MONACA
Mr le Dr. Luc BUÉE

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Directeur de thèse

*A ma famille,
A mes proches,
A Manon et Marius*

Remerciements

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet de thèse.

En premier lieu, je souhaite adresser ma profonde gratitude aux Professeurs Marie-Pia d'Ortho et Jean-Pierre Brion, pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci d'apporter votre expertise et votre regard critique sur les résultats présentés dans ce manuscrit.

Je souhaite également remercier très sincèrement le Professeur Jean-Louis Pépin, pour avoir accepté d'évaluer l'avancée de ces travaux de thèse lors des réunions du Comité de Suivi de Thèse, et pour me faire à nouveau l'honneur de juger ce travail aujourd'hui. Merci également de nous avoir permis de mettre en place la collaboration avec l'équipe HP2 de Grenoble afin de réaliser les expositions à l'hypoxie intermittente dans notre modèle transgénique.

Je remercie bien sûr mes deux directeurs de thèse, le Dr Luc Buée et le Pr Christelle Charley, sans qui la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible.

Luc, merci pour votre soutien dans les moments difficiles ; merci de m'avoir laissée poursuivre ces études sur l'hypoxie quand tout allait de travers. Même si ce travail n'a pas toujours été simple et que les désillusions ont été nombreuses (finalement, ouvrons-nous un jour une bouteille de champagne ?), l'hypoxie aura été « mon » projet, et je suis fière de l'avoir mené jusqu'au bout.

Christelle, comment te remercier ? Pour ton soutien sans faille, sur le plan professionnel comme sur le plan personnel, un énorme MERCI. Merci d'avoir relu ce manuscrit jusque dans tes weekends, merci de m'avoir dit que je réussirais à en venir à bout. Je l'ai fait (et je n'en reviens toujours pas) !

Je souhaite également remercier toutes les personnes associées à ce projet.

Merci au Dr Claire Arnaud, à Grenoble, pour son accueil et son expertise scientifique du modèle d'hypoxies intermittentes et son aide dans la réalisation des expérimentations grenobloises.

Un énorme merci à Dominique Demeyer, qui a réalisé toutes les études transcriptomiques présentées dans ce manuscrit. Domi, merci pour ton aide, et merci d'être celle que tu es, toujours souriante, coquette et avenante.

Je remercie également Nadège Zommer, qui a réalisé avec moi les épilations des souris (entre autres) et connu la galère de la guillotine. Définitivement, ce n'était pas fait pour nous... Merci

pour l'ascension (sportive) de la colline de la Bastille à Grenoble et pour tous les bons moments que nous avons partagé là-bas ! Merci aussi pour ton soutien lors de la rédaction de ce manuscrit.

Merci à Raphaëlle Caillierez, pour son aide dans la réalisation des marquages immunohistochimiques et pour avoir partagé avec moi les longues journées de montage des coupes sur les lames. Merci aussi pour la grande mission que je t'ai confiée pendant la rédaction de ce manuscrit. Il n'aurait sans doute pas été aussi bien sans les références des anticorps utilisés en immunohisto !

Merci au Dr David Blum, pour son aide précieuse dans l'interprétation de nos résultats, la rédaction de l'article et tous ses conseils avisés dans le domaine des tests comportementaux (et des tests statistiques qui vont avec). Au passage, encore merci pour l'adresse de la pizzeria à Grenoble, c'était vraiment délicieux ! ^^

Un merci spécial à ma relectrice non officielle, Vanessa Flaten, pour avoir consacré ses soirées et weekends à la relecture de ce manuscrit, et avoir accepté de se replonger pendant un temps dans le monde merveilleux de la maladie d'Alzheimer. Merci d'avoir été là pour me dire que je pouvais le faire et pour y avoir cru quand moi-même je n'y croyais pas. Merci de ne pas avoir émis le moindre jugement lorsque j'ai précisé qu'après une nuit de 3 heures j'avais terminé la rédaction de ce manuscrit vêtue d'un pantalon de survêtement et d'un poncho.

Un merci spécial aussi pour Elodie Marciniak, co-doctorante et co-rédactrice de thèse. Parce que tu as connu les mêmes galères aux mêmes moments, et qu'on s'en est sorties toutes les deux !

Enfin, et parce qu'elle aura sans aucun doute été la personne qui aura le plus « souffert » de cette période rédactionnelle, je remercie ma compagne, Manon Kobsch. Merci d'avoir pris soin de moi et de m'avoir permis de m'investir à 100% dans la rédaction de ce manuscrit ; merci de t'être aussi bien occupée de notre fils et de toute l'intendance de la maison. Pardonne moi les moments où le stress m'a fait perdre patience, et sois assurée que je mesure les sacrifices que tu as du faire pour que je puisse mener à son terme cette rédaction de thèse.

Sur le plan personnel, je souhaite remercier deux personnes en particulier...

En premier lieu, je vais remercier celui qui a changé ma vie le 26 Janvier 2015 à 17h29. Marius, mon bébé, mon p'tit bonhomme... Merci d'être avec nous, merci pour ton rire communicatif et la joie de vivre dont tu fais preuve. Merci d'avoir changé ma vision des choses. Avant toi j'ai toujours pensé qu'il fallait faire de longues études, et que tant que l'on pouvait faire plus, il fallait le faire, parce que cela rendait fiers tes grands-parents et arrière-grands-parents d'avoir une fille et une petite-fille avec le titre de Docteur en Pharmacie, et bientôt (j'espère) celui de Docteur en Neurosciences. A 30 ans, je me suis enfin rendu compte que mon bonheur ne

dépendait pas de mon CV. Alors me voilà « docteur au carré », à me poser enfin la VRAIE question : « Qu'est ce qui me rend heureuse, moi ? ». Et la réponse, c'est : « Toi ». Ces derniers mois de thèse ont été une réelle souffrance pour moi. J'ai souffert de devoir te déposer à la crèche tous les matins, même si je savais que tu y étais bien. J'ai souffert de te voir réclamer mes bras en pleine période d'angoisse de séparation et de devoir te les refuser parce que j'avais du « travail »... Je pensais naïvement que je serais capable de concilier une vie de famille et une carrière dans la recherche, mais quand je vois les sacrifices que cette carrière-là demande, je réalise que je ne suis pas prête à les faire. Je ne veux plus rentrer le soir, m'émerveiller de te voir faire quelque chose de nouveau, et entendre ta maman me dire « Il fait ça depuis plusieurs jours déjà... ». J'ai raté trop de tes premières fois, qui ne se représenteront pas... Mais je peux faire en sorte d'être là pour les suivantes, et je le ferai. J'espère que plus tard, tu seras fier de moi comme je suis fière de toi. Je t'aime fort mon chichounet <3.

Manon, mon rayon de soleil... Les choses n'ont pas toujours été simples (c'est le moins que l'on puisse dire...), malgré tout nous sommes toujours là, et nous construisons notre famille. Merci d'être comme tu es ; même si je crois que je ne comprendrai jamais ton sens de l'humour... Je croise les doigts pour que Marius n'en ait pas hérité ! Merci pour ton soutien au cours de ces deux dernières années, merci de m'aimer comme je suis et non pas comme tu voudrais que je sois. J'admire ton courage au quotidien et je suis fière que tu sois la maman de mon fils. J'espère que nous pourrons lui donner un petit frère ou une petite sœur bientôt... Je t'aime.

Merci à ma famille...

Papa, Maman, merci d'avoir toujours été là pour me soutenir et de m'avoir permis de faire des études. Merci d'accepter ma vie sans sourciller et de ne prendre en compte que mon bonheur. Je vous aime et j'espère qu'en ce jour particulier, vous êtes fiers de moi.

Merci à mes grands-parents. Papy, Mamie, j'ai de la chance de vous avoir. Vous avez tellement souhaité me voir réussir qu'aujourd'hui, je sais que vous êtes fiers de moi. Merci pour votre soutien sans faille, et merci d'accepter Manon telle qu'elle est. Je suis heureuse que Marius ait la chance de vous connaître, et j'espère qu'il en profitera le plus longtemps possible !

J'ai une pensée particulière pour Papy Julien, qui n'a connu de moi que sa petite-fille pianiste. J'espère que de là où tu es, tu as vu la femme et la mère que je suis devenue. J'ignore ce que tu aurais pensé de toutes ces études, toi... Je pense à toi à chaque fois que je pose les mains sur le clavier de mon piano, et parfois la nuit, je rêve que tu me joues de l'accordéon, comme quand j'étais petite. J'ai également une grande pensée pour Mamie Jeanne, qui t'a rejoint il y a quelques mois... Mamie, j'ai eu la chance de pouvoir te présenter Marius avant que tu

n'entames ton dernier voyage, mais j'aurais tellement aimé que tu puisses apprendre à le connaître... Vous me manquez tous les deux, je ne vous oublie pas.

Je remercie également mes frères et sœur. Nous avons tout partagé ensemble, et je regrette de vivre aussi loin de vous et de ne pouvoir vous voir qu'une ou deux fois par an... Cécile, tu peux être fière de toi, de tes deux loulous (que j'adore !!!) et de ce que tu as accompli professionnellement. Pierre, franchement, tu m'épates. Je ne comprends toujours pas comment tu réussis à te lever tous les jours au milieu de la nuit pour aller bosser... La nuit, c'est fait pour dormir, non ? Et je m'y connais en sommeil, il n'y a qu'à voir le titre de cette thèse ! Thomas, mon pouss'pin... Toi je t'ai vu tout petit, quand tu essayais de fourrer ton index dans le nez de tout le monde... Nos 16 ans de différence font que nous n'avons jamais vraiment vécu ensemble, et cela me manque, parfois. Maintenant tu es un jeune homme et j'ai l'impression d'avoir raté des étapes, parce qu'hier, je me rappelle, tu avais 3 ans et tu étais debout sur une chaise dans la cuisine pour m'aider à préparer un gâteau au chocolat. Si je peux te donner un conseil de grande sœur : « Fais ce qui te rend heureux, la vie passe trop vite pour avoir des regrets ! ». Et joue du piano aussi, si ça te rend heureux ! Je vous aime tous les 3.

Merci à Nadia (tu as vu, je n'ai pas précisé notre degré de filiation !). Tata (zut, ça m'a échappé...), merci à toi aussi pour ton soutien de toujours. Toi seule sait ce que sont une « poissonne » et des « froufrounes ».

J'ai également une pensée pour Ludo et « Jean-Jean »...

Merci à mes amis...

Mes poulettes d'amour, s'il ne devait rester qu'une seule chose positive de ces années au labo, ce serait bien notre amitié ! Vaness, merci d'avoir accepté d'être la marraine de Marius et les obligations qui vont avec ! Nadège, rassure-toi, on a prévu d'en faire un autre... ^^ Merci à toutes les deux pour avoir été là dans tous les moments ; les bons comme les moins bons. Je ne compte plus le nombre de séances de remontage de moral auxquelles vous vous êtes adonnées sans sourcilier ! Il me tarde d'en avoir fini avec tout ça et d'avoir enfin un peu de temps pour vous deux. D'ailleurs, ça fait longtemps que nous n'avons pas fait de maca-biiiiips, non ? Oui, je sais, ce n'est pas comme ça que l'on dit, mais il s'agit d'une thèse, je ne peux pas écrire de grossièretés ici... ^^ Bref, MERCI d'être là !

Merci à ma Beilbeil. Malgré la distance, tu n'es jamais loin. J'espère que le futur nous donnera plus souvent l'occasion de nous voir... Je suis certaine que tu vas faire une maman géniale, et j'ai hâte de voir la frimousse de ton « mini-toi » !

Merci aux autres poulettes (une vraie basse-cour, tout ça...) ! Sophie, Katia, Julie, il me tarde de pouvoir reprendre des soirées de poulettes à base de Caïpis, friteries et ADP ! Vous me manquez les filles.

Merci à mes collègues (anciens et actuels).

Tout d'abord, merci à mes co-bureautiers préférés : Elo, Max et Simon.

Elo, merci de m'avoir offert l'opportunité de réaliser des tests comportementaux à des heures très (trop) matinales, et d'avoir été solidaire du comportement toi aussi le 1^{er} Mai 2012. Les joies de l'expérimentation animale... ;) Merci d'avoir partagé la dernière ligne droite avec moi. Je te souhaite de tout déchirer le 14 Décembre et de pouvoir trouver un boulot qui te plait par la suite. Ça aura été sympa de finir nos thèses ensemble !

Max, Simon... J'ai voulu écrire un paragraphe pour chacun d'entre vous, mais il faut croire que vous restez inséparables même jusque dans ce manuscrit ! Vous êtes tous les deux docteurs, maintenant, et je n'ai malheureusement pas pu être là physiquement pour vous soutenir le jour J, j'espère que vous ne m'en voulez pas trop. En écrivant ces lignes, je réalise que toi, Max, tu as déjà quitté le labo, et pourtant tu restes mon co-bureautier ! Je me surprends parfois à regarder ton bureau et à me dire « tiens, Max a rangé son bazar ! » avant de réaliser que ce n'est plus ton bureau. Je crois que dans mon esprit, le « bureau » est resté figé à l'époque des Spion et de vos blagues lourdingues. La bonne époque, quoi. Je vous souhaite à tous les deux beaucoup de bonheur sur le plan personnel, et la réussite que vous méritez sur le plan professionnel. Il n'y a pas à dire, vous, vous êtes faits pour ça ! Alors foncez !

Merci également à ceux qui sont ou ont été mes co-bureautiers à un moment donné au cours de ces quatre années de thèse : Laëticia (alias Maurice), Katia, Sophie, Lucie, Nadège, Vanessa, Antoine, Andrea, Davina, Roby, Claire et Lucrezia. A un moment donné ou à un autre, la proximité géographique aura permis des échanges humains intéressants avec chacun d'entre vous. Merci pour ces moments.

Merci à Raph et à Cedrick, avec qui le courant est toujours bien passé ! Merci à tous les deux pour la joie qui se trouvait en permanence derrière la porte de la salle d'immunohisto quand je venais la squatter ^^ Je vous souhaite à tous les deux beaucoup de bonheur et de réussite dans vos vies respectives.

Merci à tous les chercheurs de l'équipe, pour les différents échanges (scientifiques ou non) que nous avons pu avoir au cours de cette thèse : Bernard, Susanna, Claire-Marie, Morvane, Marie, Bruno, Marie-Laure, David, Nico, Malika, Valérie et Sandrine.

Merci aussi à Valérie Vingtdeux et à Seb pour les bons moments partagés ensemble.

Je souhaite également remercier l'ensemble des ITA du labo, sans lesquels celui-ci ne pourrait pas fonctionner : Domi, Raph, Sabiha, Hélène, Sébastien, Meliza, Amélie, Séverine.

Merci également à toute l'équipe du laboratoire HP2 de Grenoble pour votre accueil, votre sympathie et votre disponibilité lors de mes venues. Vous avez tous contribué à rendre cette collaboration agréable !

Enfin, bonne chance aux prochains sur la liste : Toto, Banban, Vincent, Coline, Manon, Mélissa et les autres. Je vous dirais bien : « Vous verrez, on y survit », mais comme je n'en suis pas encore sûre...

Pour finir, je souhaite remercier très vivement l'ensemble du personnel technique et administratif du JPARC : Céline, Sophie, Michèle, Nathalie, Staëlle, Patrick, Karim, Thomas : merci à tous pour votre bonne humeur et votre professionnalisme ! Une mention spéciale pour vous les filles, vous qui avez su m'écouter quand j'en ai eu besoin : Merci !

Je remercie également toute l'équipe de l'animalerie, et plus particulièrement Delphine et Yann, pour le soin que vous avez apporté à mes animaux. Sans vous, les manip *in vivo* seraient impossibles, merci pour tout ce que vous faites !

Enfin, je terminerai par remercier les organismes qui ont financé ces travaux de thèse : le CHRU de Lille, la SFRMS et le Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative multifactorielle constituant la première cause de démence. Au niveau cérébral, deux types de lésions histopathologiques sont retrouvées chez les patients : les dépôts amyloïdes, constitués de peptides β -amyloïdes ($A\beta$) agrégés dans le milieu extracellulaire ; et la dégénérescence neurofibrillaire (DNF), accumulation intraneuronale de fibrilles formées de filaments appariés en hélices, majoritairement constitués de protéines Tau agrégées et pour lesquelles l'état de phosphorylation est altéré. Si le principal facteur de risque de MA est l'âge, de nombreux facteurs de risques environnementaux et génétiques ont également été identifiés. Depuis plusieurs années, les études cliniques réalisées chez des patients atteints de la MA semblent indiquer que les troubles du sommeil, et en particulier le syndrome d'apnées du sommeil (SAS), pourraient être à l'origine de la conversion des patients présentant une déficience cognitive légère vers une MA, ainsi que d'une aggravation du tableau cognitif chez ces patients Alzheimer.

Dans ce contexte, plusieurs études expérimentales se sont intéressées aux effets d'un stress hypoxique intermittent sur la composante amyloïde de la MA. En particulier, il a été démontré qu'un stress hypoxique intermittent pouvait potentialiser la synthèse de peptides $A\beta$ *in vitro* mais également *in vivo*. En revanche, à l'heure actuelle, l'effet d'un stress hypoxique intermittent sur la pathologie Tau demeure très peu connu. Or, chez l'homme, la progression de la DNF est corrélée avec celle des atteintes cognitives. De fait, et suite aux études cliniques semblant indiquer une majoration des troubles cognitifs chez les patients Alzheimer présentant un SAS, il nous a semblé pertinent de nous intéresser à la pathologie Tau en situation d'hypoxie.

Les objectifs de ces travaux de thèse étaient d'évaluer l'effet d'un stress hypoxique sur la mémoire et la protéine Tau chez l'animal. Pour cela, nous avons utilisé le modèle murin transgénique THY-Tau22, qui surexprime une protéine Tau humaine mutée et développe une pathologie Tau progressive corrélée avec une atteinte mnésique observable lors de tests comportementaux. Nous avons utilisé des animaux à différents stades de la pathologie Tau : les premiers présentaient une pathologie Tau modérée, les seconds présentaient une pathologie Tau à un stade plus avancé. Les animaux ont été soumis à deux protocoles d'hypoxie différents : un protocole d'hypoxies aiguës (Fraction inspirée en oxygène (FiO_2) égale à 8% pendant une heure) mais répétées de façon bihebdomadaire pendant plusieurs mois, et un protocole d'hypoxies intermittentes (FiO_2 variant de 5% à 21% par cycles de 60 secondes, 8 heures par jour, pendant deux semaines).

Nos résultats ont mis en évidence des effets inattendus du stress hypoxique sur la mémoire des animaux, associés à des modifications de l'état de phosphorylation et de l'agrégation de la protéine Tau. En particulier, les animaux transgéniques les plus âgés (donc présentant une pathologie Tau à un stade avancé) soumis au protocole d'hypoxies intermittentes (modèle de SAS) ont présenté une amélioration de leurs capacités mnésiques, ce qui va à l'encontre des observations réalisées en clinique humaine (aggravation des troubles cognitifs des sujets atteints de la MA et présentant un SAS). Ces résultats sont associés à une réduction des quantités de protéines Tau agrégées dans l'hippocampe, signe d'une réduction de la pathologie Tau dans le modèle. Nous discutons ici ces résultats et leur apport en clinique humaine.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial neurodegenerative pathology constituting the first cause of dementia. At a cerebral level, two kinds of histopathological lesions are found in patients: amyloid deposits (extracellular aggregates of β -amyloid peptides: A β) and neurofibrillary degeneration (NFD). NFD consists in intraneuronal accumulation of paired helical filaments, mainly composed of aggregated and hyperphosphorylated Tau proteins. Aging is the main risk factor for AD. However, numerous environmental and genetic risk factors have also been identified. Since several years, some clinical studies have shown that sleep disorders breathing, and especially the sleep apnea syndrome (SAS) could be responsible of the conversion of mild cognitive impairment to AD. SAS could also be an aggravating factor for AD, with an increase of the cognitive decline seen in patients.

In this context, many experimental studies have been interested in the consequences of an intermittent hypoxic stress on the amyloid pathology. More specifically, it has been shown that an intermittent hypoxic stress could potentiate A β synthesis both *in vitro* and *in vivo*. Nevertheless, the impact of an intermittent hypoxic stress on Tau pathology remains poorly investigated. As clinical studies in AD patients with a SAS have shown an increase of the cognitive decline, and that it is well known that NFD is correlated with the cognitive impairment in AD patients, we were interested to study the Tau pathology under hypoxia.

Our objectives in this thesis were to evaluate the consequences of a hypoxic stress on memory and Tau protein in animals. We used the THY-Tau22 transgenic mouse model, overexpressing a human mutated Tau protein and presenting a progressive Tau pathology correlated with a memory impairment observable in behavioural tasks. The animals were submitted to hypoxia at different stages of the Tau pathology: the younger animals showed a moderate Tau pathology whereas the olders presented a major Tau pathology. Two different protocols were used in this work. The first one consisted in repeated acute hypoxias (inspired fraction of oxygen (FiO₂): 8% for 1 hour, twice a week, for several months). The second one was a protocol of intermittent hypoxias (FiO₂ comprised between 5% and 21%, 60 seconds cycles, 8 hours per day, for 2 weeks).

We observed some unexpected results of hypoxic stress on memory and Tau pathology in our transgenic mice. More specifically, the THY-Tau22 mice exhibiting the stronger Tau pathology (the older animals) have shown an improvement of their memory after two weeks of intermittent hypoxia. This result goes against the clinical observations (aggravation of the cognitive decline of AD patients with a SAS), but is correlated in our model to a significant decrease of aggregated Tau protein in the hippocampi of our mice. We discuss here these results and their contribution to human pathology.

Table des matières

Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	11
Liste des abréviations.....	12
Introduction	16
Chapitre I : La maladie d'Alzheimer.....	19
I. Un peu d'histoire.....	19
II. Quelques chiffres.....	20
III. Signes cliniques.....	21
IV. Facteurs de risque	21
A) Facteurs de risque génétiques.....	21
B) Facteurs de risque non génétiques.....	21
V. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.....	22
A) Description des lésions histopathologiques.....	22
(1) La protéine APP	22
(a) Gène et épissage alternatif.....	23
(b) Métabolisme de l'APP.....	23
(i) Voie non-amyloïdogénique.....	23
(ii) Voie amyloïdogénique.....	24
(c) Fonctions physiologiques de l'APP et ses métabolites.....	24
(d) Rôles physiopathologiques dans la MA.....	24
(e) Progression spatio-temporelle de la pathologie amyloïde	25
(2) Les protéines Tau.....	26
(a) Gène et épissage alternatif.....	26
(b) Modifications post traductionnelles	27
(i) Phosphorylation.....	27
(ii) Autres modifications post-traductionnelles	28
(c) Localisations et fonctions physiologiques connues de la protéine Tau.....	28
(d) Rôles physiopathologiques dans la MA.....	29
(e) Progression spatio-temporelle de la pathologie Tau	29
B) Les autres atteintes cérébrales.....	30
VI. Diagnostic.....	30
VII. Prise en charge thérapeutique	32
A) Traitements pharmacologiques actuellement disponibles.....	32

B) Traitements pharmacologiques en cours de développement	32
C) Prise en charge non pharmacologique	32
Chapitre II : Le syndrome d'apnées du sommeil.....	34
I. Un peu d'histoire... ..	34
II. Données épidémiologiques	35
III. Quelques définitions.....	35
A) Apnée	35
B) Hypopnée	35
C) Index d'apnées hypopnées	36
IV. Classification des apnées du sommeil	36
V. Signes cliniques	36
VI. Facteurs de risque	37
VII. Comorbidités associées au SAS.....	37
VIII. Diagnostic.....	38
A) Critères diagnostiques du SAS	38
B) Sévérité du SAS.....	38
IX. Prise en charge thérapeutique	39
A) Mesures hygiéno-diététiques	39
B) Ventilation par pression positive continue	39
C) Orthèse d'avancée mandibulaire.....	40
D) Chirurgie	40
E) Traitements pharmacologiques.....	41
Chapitre III : Réponse à l'hypoxie de l'organisme : voies de signalisation HIF, EPO et VEGF.	42
I. Les facteurs induits par l'hypoxie (HIF).....	42
II. L'érythropoïétine (EPO).....	44
III. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).....	44
Chapitre IV : Troubles cognitifs observés sous hypoxie en clinique humaine.....	45
I. Troubles cognitifs observés chez les patients souffrant d'un SAS	45
A) Troubles de l'attention	45
B) Troubles des fonctions exécutives.....	46
C) Troubles mnésiques.....	46
II. Troubles cognitifs observés dans d'autres situations de stress hypoxique.....	46
A) Troubles cognitifs observés dans un contexte pathologique : cas de la BPCO	46
B) Troubles cognitifs observés en altitude	47
Chapitre V : Syndrome d'apnées du sommeil et maladie d'Alzheimer	48
I. Etudes cliniques.....	48

A) Apnées du sommeil chez les patients atteints de la MA.....	48
B) Maladie d'Alzheimer et syndrome d'apnées du sommeil : similitudes sur le plan biologique.....	49
(1) Peptide β -amyloïde.....	49
(2) Protéine Tau	50
(3) Génotype APOE4	50
(4) Stress oxydant	51
(5) Inflammation	51
(6) Hypertension artérielle et hypoperfusion cérébrale.....	51
II. Etudes expérimentales	52
A) Etudes du sommeil des animaux	52
B) Evaluations comportementales in vivo : effets de l'hypoxie et de la fragmentation du sommeil sur la mémoire des animaux	53
(1) Protocoles d'hypoxies.....	53
(a) Animaux WT	53
(i) Exposition à un stress hypoxique intermittent	53
(ii) Exposition à un stress hypoxique répété	54
(b) Animaux transgéniques modèles de la MA.....	55
(2) Fragmentation du sommeil.....	56
C) Etude des différentes atteintes cérébrales communes à la MA et au SAS.....	57
(1) Effets du stress hypoxique sur la pathologie amyloïde.....	57
(a) Etudes réalisées dans des modèles animaux de MA.....	57
(b) Etude réalisée dans un modèle animal sauvage	58
(c) Etudes réalisées <i>in vitro</i>	58
(2) Effets du stress hypoxique sur la pathologie Tau.....	59
(a) Etude réalisée dans un modèle animal transgénique	59
(b) Etudes réalisées dans des modèles animaux sauvages.....	59
(c) Etude réalisée <i>in vitro</i>	60
(3) Effets du stress hypoxique intermittent sur le stress oxydant et l'inflammation au niveau du système nerveux central	60
Objectifs de ce travail de thèse	62
Matériels et méthodes	66
Chapitre I : Matériels et méthodes communs aux deux expérimentations.....	67
I. Animaux.....	67
A) Description des lignées murines.....	67
(1) Lignée THY-Tau22	67
(2) Souris littermates.....	68

B)	Description des animaux utilisés	68
II.	Test de reconnaissance d'objets.....	69
A)	Matériel utilisé.....	69
B)	Phase d'habituation préalable.....	70
C)	Phase de test	70
III.	Mise à mort	71
IV.	Préparation du plasma	72
V.	Prélèvement des différentes structures cérébrales.....	72
VI.	Analyses biochimiques	72
A)	Extraction protéique pour analyse SDS-PAGE.....	72
B)	Dosage protéique	72
C)	Préparation des échantillons de dépôt.....	72
D)	Electrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE.....	73
E)	Western Blot (transfert des protéines).....	73
F)	Révélation des protéines	73
G)	Quantifications	74
VII.	Dosages ELISA.....	74
VIII.	Analyses immunohistologiques	75
A)	Post-fixation des héli-cerveaux	75
B)	Coupe au cryostat.....	75
C)	Marquages immunohistochimiques sur coupes flottantes.....	75
D)	Montage des lames	76
E)	Quantifications	76
IX.	Analyses statistiques	77
Chapitre II : Matériel et méthodes spécifiques au protocole d'hypoxies répétées (Lille).....		78
I.	Dispositif à hypoxies	78
II.	Protocole d'hypoxies répétées	78
III.	Tests comportementaux.....	79
A)	Y maze	80
(1)	Matériel utilisé.....	80
(2)	Protocole de test utilisé.....	80
B)	Test de reconnaissance d'objets.....	81
IV.	Prélèvements sanguins et préparation du plasma.....	81
V.	Chronologie de la mise à mort des animaux par rapport au stress hypoxique.....	81
Chapitre III : Matériel et méthodes spécifiques au protocole d'hypoxies intermittentes (Grenoble)		
.....		82

I.	Dispositif à hypoxies intermittentes	82
II.	Protocole d'hypoxies intermittentes	82
III.	Enregistrements de SaO ₂ , FiO ₂ et fréquence cardiaque	82
IV.	Mesure du poids des animaux.....	83
V.	Chronologie de la mise à mort des animaux par rapport au stress hypoxique.....	83
VI.	Extraction protéique et fractionnement soluble/insoluble	83
VII.	Analyses transcriptomiques.....	84
	Résultats.....	86
	Partie expérimentale 1 : Etude des effets d'un protocole d'hypoxies répétées sur la cognition et la pathologie Tau chez des souris WT et THY-Tau22 (hypoxies Lille)	87
I.	Introduction / Objectifs	87
II.	Résultats	88
A)	Evaluations comportementales : effets du protocole d'hypoxies répétées sur la mémoire à court terme des animaux.....	88
(1)	Animaux WT	89
(a)	Test du labyrinthe en Y	89
(b)	Test de reconnaissance d'objets	90
(2)	Animaux THY-Tau22.....	91
(a)	Test du labyrinthe en Y	91
(b)	Test de reconnaissance d'objets	92
B)	Etude de la protéine Tau	93
(1)	Analyses immunohistochimiques dans le cerveau des souris THY-Tau22.....	93
(2)	Analyses biochimiques : Western Blots	95
C)	Dosages plasmatiques de l'EPO	96
III.	Discussion intermédiaire	100
A)	Dosages plasmatiques de l'EPO	100
B)	Evaluations comportementales : effets du protocole d'hypoxies répétées sur la mémoire à court terme des animaux.....	101
C)	Etude de la protéine Tau	102
	Partie expérimentale 2 : Etude des effets d'un protocole d'hypoxies intermittentes sur la cognition et la pathologie Tau chez des souris WT et THY-Tau22 (hypoxies Grenoble)	104
I.	Introduction / Objectifs	104
II.	Résultats	105
A)	Validation du protocole d'hypoxies intermittentes	105
(1)	Enregistrements de SaO ₂ et de FC en fonction de la FiO ₂	105
(2)	Suivi du poids des animaux.....	108
(3)	Etude des marqueurs de stress hypoxique	110

(a)	Marqueurs périphériques	111
(b)	Marqueurs cérébraux	112
B)	Effets du protocole d'hypoxies intermittentes sur la mémoire à court terme des animaux.....	114
C)	Etude de la protéine Tau	116
(1)	Dosage des protéines Tau humaines dans le plasma des souris THY-Tau22.....	116
(2)	Analyses immunohistologiques chez les souris THY-Tau22	117
(3)	Analyses transcriptomiques : expression cérébrale des gènes codant pour les protéines Tau humaine et murine sous hypoxie intermittente	119
(a)	Expression cérébrale du gène codant pour la protéine Tau murine	119
(i)	Animaux WT	120
(ii)	Animaux THY-Tau22	120
(b)	Expression cérébrale du transgène (codant pour la protéine Tau humaine) chez les animaux THY-Tau22	121
(4)	Analyses biochimiques : expression cérébrale des protéines Tau humaine et murine sous hypoxie intermittente	122
(a)	Analyses SDS-PAGE de la phosphorylation des protéines Tau humaine et murine.....	122
(i)	Animaux WT	122
(ii)	Animaux THY-Tau22	124
(b)	Fractionnement Soluble/Insoluble à partir des hippocampes de souris THY-Tau22 âgées de 8 mois	126
D)	Etude des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation	128
E)	Etude d'un marqueur de l'apoptose chez les animaux âgés de 8 mois	130
III.	Discussion intermédiaire	131
A)	Validation du protocole d'hypoxies intermittentes	131
B)	Effets du protocole d'hypoxies intermittentes sur la mémoire à court terme des animaux.....	133
C)	Effet du protocole d'hypoxies intermittentes sur la pathologie Tau	134
D)	Effet du stress hypoxique intermittent sur différents gènes impliqués dans le stress oxydant et l'inflammation	137
E)	Etude de l'apoptose.....	138
	Discussion générale	139
	Références	146
	Annexes	176
I.	Annexe 1 : MMSE (Mini Mental State Examination).....	177
II.	Echelle IADL simplifiée.....	178
III.	Echelle d'Epworth.....	179

IV.	Curriculum Vitae	180
V.	Manuscrit publié dans la revue Médecine du sommeil (2013)	182
VI.	Manuscrit de la communication en cours de soumission dans European Respiratory Journal 183	
VII.	Poster présenté lors de la 4 ^{ème} journée des doctorants, Lille, 2012.....	191
VIII.	Poster présenté lors de la 11 ^{ème} réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer, Toulouse, 2012	192
IX.	Poster présenté lors de la Journée André Verbert, Lille, 2013	193
X.	Poster présenté lors du congrès DN2M, Lille, 2015	194
XI.	Collaborations ayant donné lieu à des publications au cours de cette thèse	195
	A) Marciniak E, Faivre E, Dutar P, Alves Pires C, Demeyer D, Caillierez R, Laloux C, Buée L, Blum D, Humez S. The Chemokine MIP-1 α /CCL3 impairs mouse hippocampal synaptic transmission, plasticity and memory.....	196
	B) Brouillette J, Caillierez R, Zommer N, Alves Pires C, Benilova I, Blum D, De Strooper B, Buée L. Neurotoxicity and Memory Deficits Induced by Soluble Low-Molecular-Weight Amyloid- β 1-42 Oligomers Are Revealed In Vivo by Using a Novel Animal Model	197

Liste des figures

Figure 1 : Dr Aloïs Alzheimer et sa patiente	19
Figure 2 : Lésions histologiques observées par le Dr Aloïs Alzheimer.	20
Figure 3 : Représentation du nombre total de publications relatives à la maladie d'Alzheimer par année	20
Figure 4 : Lésions histopathologiques de la maladie d'Alzheimer	22
Figure 5 : Métabolisme de l'APP.....	23
Figure 6 : Stades de Braak du développement de la pathologie amyloïde.	25
Figure 7 : Représentations schématiques du gène codant pour la protéine Tau humaine, de son transcrit primaire et des 6 isoformes protéiques résultant de l'épissage alternatif.....	26
Figure 8 : Stades de Braak du développement de la dégénérescence neurofibrillaire.	29
Figure 9 : Atrophie cérébrale observée chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.....	30
Figure 10 : Roman de Charles Dickens et illustration du personnage "Fat Joe"	34
Figure 11 : Enregistrement polygraphique nocturne chez un patient présentant un syndrome d'apnées du sommeil.....	35
Figure 12 : Représentation schématique d'un appareil à Pression Positive Continue.....	39
Figure 13 : Modèle d'orthèse d'avancée mandibulaire	40
Figure 14 : Représentation schématique du métabolisme des sous-unités α et β des facteurs induits par l'hypoxie (HIF)	43
Figure 15 : Représentation schématique de notre hypothèse de travail sur laquelle reposent les études réalisées dans le cadre de cette thèse.....	63
Figure 16 : Construction du transgène de la lignée THY-Tau22	67
Figure 17 : Immunohistochimies AT8, MC1 et AT100 dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 12 mois.....	68
Figure 18 : Résultats du test de la piscine de Morris chez les souris THY-Tau22 âgées de 10 mois.....	68
Figure 19 : Objets utilisés pour le test de reconnaissance d'objets.....	69
Figure 20 : Photographie des chambres à hypoxie utilisées à Lille	78
Figure 21 : Conditions d'application du stress hypoxique dans les cinétiques d'hypoxies répétées	78
Figure 22 : Représentation des différents tests comportementaux réalisés au cours des deux cinétiques, en fonction de l'âge des animaux	79
Figure 23 : Labyrinthe en Y.....	80
Figure 24 : Conditions d'application du stress hypoxique intermittent.....	82
Figure 25 : Clip Collar Sensor	82

Figure 26 : Exemple de résultats obtenus lors de l'évaluation comportementale par le test du labyrinthe en Y chez les animaux WT de la première cinétique	89
Figure 27 : Marquages immunohistochimiques de la protéine Tau dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 10,5 mois exposées ou non au protocole d'hypoxies répétées	94
Figure 28 : Marquages immunohistochimiques de la protéine Tau dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 13,5 mois exposées ou non au protocole d'hypoxies répétées	94
Figure 29 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris WT et THY-Tau22 âgées de 10,5 mois lors de la mise à mort et exposées ou non au protocole d'hypoxies répétées	95
Figure 30 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris WT et THY-Tau22 âgées de 13,5 mois lors de la mise à mort et exposées ou non au protocole d'hypoxies répétées	96
Figure 31 : Dosages ELISA de l'EPO chez les animaux WT et THY-Tau22 âgés de 10,5 mois au moment de la mise à mort.....	97
Figure 32 : Dosages ELISA de l'EPO chez les animaux WT et THY-Tau22 âgés de 13,5 mois au moment de la mise à mort.....	98
Figure 33 : Exemple d'enregistrement de SaO ₂ et de fréquence cardiaque (FC) chez un animal exposé au protocole d'HI.....	106
Figure 34 : Suivi du poids des animaux.....	109
Figure 35 : Représentation des poids en baseline et des poids au terme des expérimentations	110
Figure 36 : Dosages ELISA de l'EPO et du VEGF chez les animaux WT et THY-Tau22	111
Figure 37 : Représentation des résultats des études transcriptomiques d'expression de VEGF-A et HIF-1A	112
Figure 38 : Immunomarquages anti-VEGF réalisés dans le cortex et l'hippocampe des animaux WT et THY-TAU22 âgés de 5 mois.....	113
Figure 39 : Résultats du test de reconnaissance d'objets réalisé sur les animaux WT et THY-Tau22 exposés ou non au protocole d'hypoxies intermittentes pendant 14 jours et âgés de 8 mois	115
Figure 40 : Dosages ELISA des protéines Tau humaines (hTau) dans le plasma des souris THY-Tau22 exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes	116
Figure 41 : Marquages immunohistochimiques de la protéine Tau dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 5 mois exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes	118
Figure 42 : Marquages immunohistochimiques de la protéine Tau dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 8 mois exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes	119
Figure 43 : Représentation des résultats des études transcriptomiques d'expression du gène codant pour la protéine Tau murine dans le cortex et l'hippocampe des animaux WT.	120

Figure 44 : Représentation des résultats des études transcriptomiques d’expression du gène codant pour la protéine Tau murine dans le cortex et l’hippocampe chez les animaux transgéniques THY-Tau22	120
Figure 45 : Représentation des résultats des études transcriptomiques d’expression du gène codant pour la protéine Tau humaine dans le cortex et l’hippocampe chez les animaux transgéniques THY-Tau22	121
Figure 46 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris WT âgées de 5 mois et exposées ou non au protocole d’hypoxies intermittentes.....	122
Figure 47 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris WT âgées de 8 mois et exposées ou non au protocole d’hypoxies intermittentes.....	123
Figure 48 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris THY-Tau22 âgées de 5 mois et exposées ou non au protocole d’hypoxies intermittentes.....	124
Figure 49 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris THY-Tau22 âgées de 8 mois et exposées ou non au protocole d’hypoxies intermittentes.....	125
Figure 50 : Effet du protocole d’hypoxies intermittentes sur le ratio insoluble/soluble de la protéine Tau dans l’hippocampe des souris transgéniques THY-Tau22 âgées de 8 mois	127
Figure 51 : Etude transcriptomique de différents gènes impliqués dans les processus de stress oxydant et d’inflammation dans le cortex et l’hippocampe des animaux WT et THY-Tau22 âgés de 5 mois et exposés ou non au protocole d’hypoxies intermittentes	128
Figure 52 : Etude transcriptomique de différents gènes impliqués dans les processus de stress oxydant et d’inflammation dans le cortex et l’hippocampe des animaux WT et THY-Tau22 âgés de 8 mois et exposés ou non au protocole d’hypoxies intermittentes	129
Figure 53 : Immunomarquages anti-NeuN réalisés dans l’hippocampe et le cortex des animaux WT et THY-Tau22 âgés de 8 mois et exposés ou non au protocole d’hypoxies intermittentes	130
Figure 54 : Hypothèse de l’implication de la serine protéase HTRA1 dans la survenue des troubles cognitifs observés chez les patients présentant un syndrome d’apnées du sommeil et une maladie d’Alzheimer	145

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes isoformes de la protéine Tau retrouvées au niveau cérébral	27
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différents anticorps primaires utilisés au cours des études biochimiques.....	74
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents anticorps primaires utilisés au cours des études immunohistochimiques.....	76
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des amorces de RT-PCR utilisées dans cette étude	85
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats des différents tests de labyrinthe en Y réalisés chez les animaux WT tout au long des deux cinétiques expérimentales	90
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats des différents tests de reconnaissance d'objets réalisés chez les animaux WT au cours des deux cinétiques expérimentales.	90
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des résultats des différents tests de labyrinthe en Y réalisés chez les animaux transgéniques THY-Tau22 tout au long des deux cinétiques expérimentales	92
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des résultats des différents tests de reconnaissance d'objets réalisés chez les animaux transgéniques THY-Tau22 au cours des deux cinétiques expérimentales	93
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des enregistrements de SaO ₂ , FiO ₂ et FC réalisés chez les animaux âgés de 5 mois.....	107
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des enregistrements de SaO ₂ , FiO ₂ et FC réalisés chez les animaux âgés de 8 mois.....	107
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des variations de poids mesurées dans les différents groupes d'animaux entre le début et la fin du protocole d'hypoxies intermittentes.....	110

Liste des abréviations

A

Aa : Acide aminé

A β : Peptide β amyloïde

AD : Alzheimer's Disease

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AICD : Domaine intracellulaire de l'APP

APOE2 : Allèle 2 du gène de l'apolipoprotéine

APOE4 : Allèle 4 du gène de l'apolipoprotéine

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde

APP695/751/770 : Protéine précurseur de l'amyloïde de 695/751/770 acides aminés

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNT1 : Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 1

ATP : Adénosine tri-phosphate

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

B

BACE1 : Beta-secretase 1

BCA : Bicinchoninic acid assay

BIN1 : Bridging integrator 1

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

BPM : Battements par minute

BSA : Serum albumine bovine

C

CA1, CA3 : Cornes d'Ammon 1 et 3

CDK5 : Cyclin-Dependent Kinase 5

cDNA : Acide désoxyribonucléotide complémentaire

COX2 : Cyclooxygénase 2

CTF α/β : Fragment carboxy-terminal α/β de l'APP

D

DAB : 3-3' diaminobenzidine

DNF : Dégénérescence neurofibrillaire

DR6 : Death Receptor 6

E

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EPO : Erythropoïétine

ERK : Extracellular signal regulated-kinases

F

FDR : Facteur de risque

FIH-1 : Facteur Inhibiteur de HIF-1

FiO₂ : Fraction inspirée en oxygène

G

Grb2 : Growth factor-bound protein 2

GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β

GWAS : Genome Wide Association Studies

H

HAS : Haute Autorité de Santé

HI : Hypoxies intermittentes

HIF : Facteur induit par l'hypoxie

HRE : Elément de réponse à l'hypoxie

HTA : Hypertension artérielle

hTau : Protéine Tau humaine

HTRA1 : Human High Temperature Requirement Serine Protease A1

I

IADL : Instrumental Activities of Daily Living

IAH : Index d'Apnées-Hypopnées

IHC : Immunohistochimie

IL-1 β , IL-6 : Interleukines 1 β et 6

iNOS : Inducible Nitric Oxide Synthase

IR : Index de reconnaissance

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

L

LCR : Liquide céphalorachidien

LDS : Lithium Dodecyl Sulfate

LTP : Potentialisation à long terme

M

MA : Maladie d'Alzheimer

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MAPT : Microtubule Associated Protein Tau

MMSE : Mini Mental State Examination

N

NAPDH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NeuN : Neuronal Nuclei

NFD : Neurofibrillary degeneration

NFκB : Nuclear factor-kappa B

No : Normoxie

O

O₂ : Dioxygène

OAM : Orthèse d'Avancée Mandibulaire

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

P

P83 : fragment P83 de l'APP

PBS : Phosphate Buffered Saline

PHD : Prolyl Hydroxylase

PHF : Paired Helical Filament

PI3K : Phosphoinositide 3 kinase

PLCδ : Phospholipase Cδ

PIGF : Plasmatic Growth Factor

PPC : Pression Positive Continue

PS1, PS2 : Présenilines 1 et 2

P-Tau : Protéine Tau phosphorylée

pVHL : protéine Von Hippel Lindau

R

REM : Rapid Eye Movements

RO : Reconnaissance d'objets

S

SaO₂ : Saturation artérielle en oxygène

sAPP α/β : Protéine précurseur de l'amyloïde soluble α/β

SAS : Syndrome d'Apnées du Sommeil

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SOD : Superoxyde dismutase

SORL1 : Sorlitin-Related receptor 1

SpO₂ : Saturation de pouls en oxygène

T

Tau : Tubulin-associated unit

TILE : Test Itératif de Latence d'Endormissement

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TNT : Tampon Tris-NaCl-Tween

V

VAS : Voies Aériennes Supérieures

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

W

WT : Wild-Type

Y

Ym : Y-maze

Introduction

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative multifactorielle constituant la première cause de démence. Si le principal facteur de risque de MA est l'âge, de nombreux facteurs de risques environnementaux et génétiques ont également été identifiés. Depuis plusieurs années, les études cliniques réalisées chez des patients atteints de la MA semblent indiquer que les troubles du sommeil, et en particulier le syndrome d'apnées du sommeil (SAS), pourraient être à l'origine de la conversion des patients présentant une déficience cognitive légère vers une MA, ainsi que d'une aggravation du tableau cognitif chez ces patients Alzheimer.

Si les mécanismes sous-jacents à l'atteinte cognitive retrouvée dans la MA ne sont pas complètement élucidés, les décennies de recherche sur cette maladie neurodégénérative ont néanmoins permis de relier cette atteinte cognitive avec le développement cérébral de la pathologie Tau. De la même façon que pour la MA, les mécanismes sous-jacents à l'atteinte cognitive retrouvée chez les patients présentant un SAS demeurent inconnus. Il semblerait néanmoins qu'ils puissent être dus (au moins pour partie) à l'hypoxémie nocturne retrouvée chez ces patients.

A partir de ces différentes observations, nous avons élaboré une hypothèse de travail selon laquelle l'aggravation des troubles cognitifs observés chez les patients présentant à la fois un SAS et une MA pourrait être causée par une aggravation de la dégénérescence neurofibrillaire, elle-même étant due à l'hypoxémie nocturne retrouvée chez les patients.

Le sujet de ce travail de thèse se situant à la frontière entre la maladie d'Alzheimer et le syndrome d'apnées du sommeil, dans l'introduction de ce travail, nous commencerons tout d'abord par présenter ces deux pathologies.

Dans un second temps, nous effectuerons un bref rappel concernant la réponse biologique de l'organisme à l'hypoxie. Cette réponse est notamment médiée par les facteurs induits par l'hypoxie (HIF). Elle a également des conséquences sur la production d'érythropoïétine (EPO) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).

Nous nous intéresserons ensuite aux données de la littérature montrant une relation entre l'existence d'un stress hypoxique dans différents contextes physiologiques ou pathologiques et la survenue de troubles cognitifs en clinique humaine.

Enfin, la dernière partie de cette introduction sera consacrée à l'étude des données de la littérature associant la maladie d'Alzheimer et le syndrome d'apnées du sommeil, directement ou indirectement, chez l'homme et à travers diverses expérimentations animales.

Au terme de cette introduction, les objectifs fixés dans le cadre de cette thèse seront développés. Ainsi, la première partie des travaux de recherche réalisés dans le cadre de ce travail de thèse aura pour objectif d'évaluer les conséquences d'un stress hypoxique répété (HR) réalisé sur une longue durée expérimentale, afin de mimer la situation des montagnards se rendant régulièrement en haute montagne, et chez lesquels des troubles cognitifs ont été décrits. La seconde partie de ces travaux de thèse consistera quant-à-elle à étudier les

conséquences d'un stress hypoxique intermittent (modèle de syndrome d'apnées du sommeil) sur la mémoire et la pathologie Tau dans un modèle murin de Tauopathies.

Par la suite, les matériels et méthodes qui ont été utilisés au cours de ces travaux de thèse seront présentés. Cette présentation sera découpée en 3 parties. Nous présenterons dans un premier temps les matériels et méthodes communs à l'ensemble de nos études, puis une partie sera dédiée à la description des matériels et méthodes utilisés pour l'étude des conséquences d'un protocole d'hypoxies répétées (expériences réalisées à Lille), et celle des conséquences d'un protocole d'hypoxies intermittentes (expériences réalisées à Grenoble), respectivement.

La présentation des résultats de nos expérimentations sera découpée en 2 parties, les résultats des expériences d'hypoxies répétées seront présentés en premier lieu, suivis des résultats des expériences d'hypoxies intermittentes. Pour chacune de ces deux parties, une brève introduction menant aux objectifs de ces expérimentations sera effectuée, et les résultats obtenus feront l'objet d'une discussion intermédiaire.

Enfin, une discussion plus générale reprenant les points importants de nos travaux de thèse ainsi que les limites respectives de nos deux études sera effectuée, permettant par la suite de conclure ce manuscrit de thèse en proposant de nouvelles perspectives de recherche.

Chapitre I : La maladie d'Alzheimer

I. Un peu d'Histoire...

Le 25 Novembre 1901, le Docteur Alois Alzheimer entreprit d'étudier le cas d'une patiente, Madame Auguste Deter, internée dans un asile d'aliénés à Francfort (Figure 1).

Il suivit cette patiente jusqu'à son décès, le 8 Avril 1906, et publia en 1907 les résultats de ses observations dans son article intitulé «*Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*» (A propos d'une étrange maladie du cortex cérébral) (Alzheimer et al., 1995).

Le Dr Alzheimer y rapporta une nouvelle forme de démence, ne permettant à l'époque aucun diagnostic de pathologie connue.

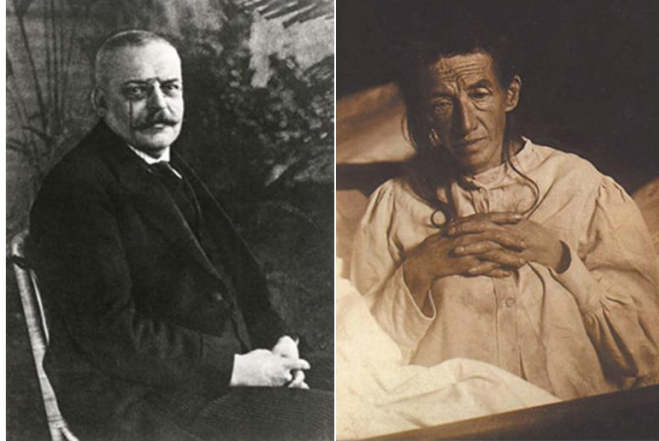


Figure 1 : Dr Aloïs Alzheimer (à gauche) et sa patiente, Mme Auguste Deter (à droite)

Les premiers symptômes qu'il décrivit associaient une altération mnésique rapide et une désorientation spatiale. L'état de santé de la patiente se dégrada progressivement, et le Dr Alzheimer put alors observer une diminution des facultés cognitives, une désorientation spatiotemporelle, ainsi que des troubles de la compréhension et du comportement, ces derniers étant vraisemblablement liés à des hallucinations auditives. Il décrivit également des phases de rémission partielle, au cours desquelles la patiente était calme mais désorientée, s'excusant alors de « *ne pas avoir terminé les tâches ménagères* » et indiquant ne pas « *très bien comprendre la situation dans laquelle elle se trouvait* ».

Au fil des années, l'état de Mme Deter continua à se détériorer, et elle présenta alors, en plus de l'aggravation majeure de ses capacités mnésiques, une aphasie (troubles du langage). Le Dr Alzheimer rapporta même une aggravation de « *l'imbécilité* » de sa patiente. Pour autant, Mme Deter ne présentait pas de symptômes somatiques qui auraient pu expliquer ce tableau cognitif.

Peu de temps avant son décès, elle fut décrite par le Dr Alzheimer comme restant alitée dans une position fœtale « *complètement pathétique* », souffrant d'incontinence et d'escarres.

Suite au décès de la patiente, son cerveau fut remis au Dr Alzheimer par le directeur de l'asile dans lequel elle se trouvait, Mr Sioli.

Lors de l'autopsie du cerveau, le Dr Alzheimer nota une atrophie cérébrale majeure et releva, sur le plan histologique, la présence de lésions cérébrales caractéristiques de cette nouvelle maladie, qu'il décrit ainsi : *[Au centre d'une cellule apparemment normale se dressent une ou plusieurs fibrilles caractérisées par leur épaisseur et leur imprégnabilité particulière]*, et reproduisit... (Figure 2)

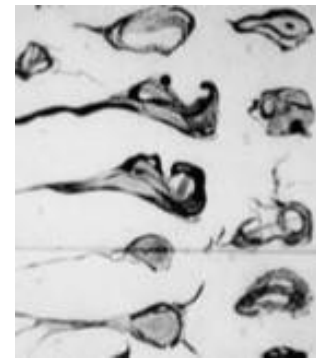


Figure 2 : Lésions histologiques observées par le Dr Aloïs Alzheimer, 1907.

Un siècle plus tard, cette maladie, baptisée du nom de celui qui fut le premier à la décrire, suite à la proposition de l'un de ses confrères, le psychiatre Emil Kraepelin, présente encore de nombreuses zones d'ombre...

II. Quelques chiffres

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative constituant la première cause de démence. On estime en effet que sur les 850 000 patients déments en France, et les plus de 25 millions à travers le monde, 60 à 80% d'entre eux présentent une MA. A ce titre, la MA constitue un réel problème socio-économique auquel sont associés des besoins en recherche considérables, sur le plan diagnostique comme sur le plan thérapeutique. Avec l'accroissement prévisible du nombre de personnes démentes à l'avenir (on estime que le nombre de cas de démences aura triplé en 2040, atteignant alors près de 80 millions de personnes à travers le monde), ces besoins seront majorés (Ballard et al., 2011; Mayeux and Stern, 2012).

En réponse à cette problématique, la communauté scientifique internationale se mobilise pour tenter de diagnostiquer, comprendre, prévenir et traiter cette pathologie.

Depuis les années 1980, les articles scientifiques traitant de la MA sont toujours plus nombreux, et la barre des 100 000 publications référencées dans la base de données PubMed (mots clés : « Alzheimer's disease ») a été franchie en 2014 (Figure 3). La figure 3 représente le nombre total de publications traitant de la MA par année depuis sa description en 1906.

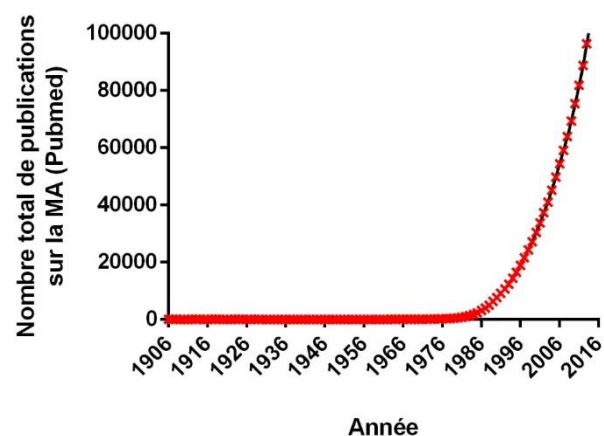


Figure 3 : Représentation du nombre total de publications relatives à la maladie d'Alzheimer par année (recherche effectuée sur PubMed).

III. Signes cliniques

D'un point de vue clinique, la MA se manifeste par un ensemble de troubles cognitifs d'évolution progressive. Amnésie (perte de la mémoire), Aphasie (troubles du langage), Apraxie (difficulté à effectuer un mouvement) et Agnosie (perte de la capacité de reconnaissance) sont ainsi fréquemment associées et regroupées sous la dénomination des « quatre A ». Les patients atteints de la MA présentent également une désorientation spatiotemporelle, un déficit des fonctions exécutives (difficultés pour planifier des projets, pour effectuer un calcul, etc.), ainsi que des troubles du comportement d'expression variable (agitation, agressivité, etc.). Par ailleurs, ces patients peuvent présenter des perturbations affectives allant de l'anxiété à la dépression, ainsi que des troubles psychotiques à type de délires et hallucinations.

IV. Facteurs de risque

A) *Facteurs de risque génétiques*

Le gène codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) a été découvert en 1987 (Tanzi et al., 1987). C'est le premier gène sur lequel des mutations responsables de la MA furent identifiées en 1991 (Goate et al., 1991). Depuis les années 1990, d'autres gènes ont été identifiés comme pouvant porter des mutations à l'origine de formes familiales de MA, notamment les gènes codant pour les présénilines 1 et 2 (PS1, PS2) (Schellenberg et al., 1992). Ces formes familiales ne représentent toutefois qu'une infime partie (moins de 1%) des cas de MA.

Par la suite, les études d'association du génome (Genome-Wide Association Studies, GWAS) de la MA ont permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans les différents processus pathologiques de la maladie. Ainsi, les patients porteurs du génotype APOE4 (allèle 4 du gène de l'apolipoprotéine E) sont plus à risque de développer une MA que les autres (Corder et al., 1993), alors que le génotype APOE2 (allèle 2 du gène de l'apolipoprotéine E) s'avère quant à lui protecteur vis-à-vis de la MA (Bonner-Jackson et al., 2012).

D'autres gènes ont également été identifiés (Reitz and Mayeux, 2014), tels que BIN1 (Bridging Integrator 1, également retrouvé sous le nom d'Amphiphysine 2) ou SORL1 (Sortilin-Related Receptor 1). Ces gènes sont notamment impliqués dans la pathologie Tau et le trafic intracellulaire de l'APP (pour BIN1 et SORL1), ainsi que dans la synthèse et l'élimination des peptides A β (pour SORL1).

B) *Facteurs de risque non génétiques*

Il est aujourd'hui bien établi que la MA est une maladie multifactorielle, pour laquelle plusieurs facteurs de risque (FDR) ont été identifiés, le premier étant l'âge (Drachman, 2006). Ainsi, les cas de MA diagnostiqués avant 65 ans sont rares. L'incidence de la maladie atteint 2 à 4% de la population générale après 65 ans, et augmente rapidement pour atteindre 15% de la population âgée de 80 ans. Parmi les autres FDR identifiés, nous pouvons citer l'obésité, la consommation d'alcool, l'hypertension artérielle (HTA), l'hypercholestérolémie, les

antécédents d'accident vasculaire cérébral (AVC), la solitude ou encore le diabète de type 2 (Anstey et al., 2009; Arvanitakis et al., 2004; Beydoun et al., 2008; Skoog and Gustafson, 2006; Wilson et al., 2007).

En revanche, s'il existe des facteurs potentialisant la MA, d'autres ont un effet protecteur vis-à-vis de cette maladie. Parmi ces facteurs protecteurs, nous retrouvons la réserve cognitive (haut niveau d'éducation, niveau occupationnel élevé, etc.), le régime méditerranéen, ou encore le fait de pratiquer une activité physique (Hamer and Chida, 2009; Scarmeas et al., 2006; Stern et al., 1994).

Enfin, il existe des facteurs pouvant aggraver la MA, tels que les changements dans l'environnement du patient (déménagements, etc.).

V. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

La MA est une maladie neurodégénérative d'évolution progressive, dans laquelle l'apparition des premiers symptômes est postérieure à celle des différentes atteintes cérébrales.

Sur le plan histologique, la MA se caractérise par l'existence de deux types de lésions : les dépôts amyloïdes (plaques séniles) et la dégénérescence neurofibrillaire (DNF), qu'Aloïs Alzheimer observa en 1907 (Figure 4).

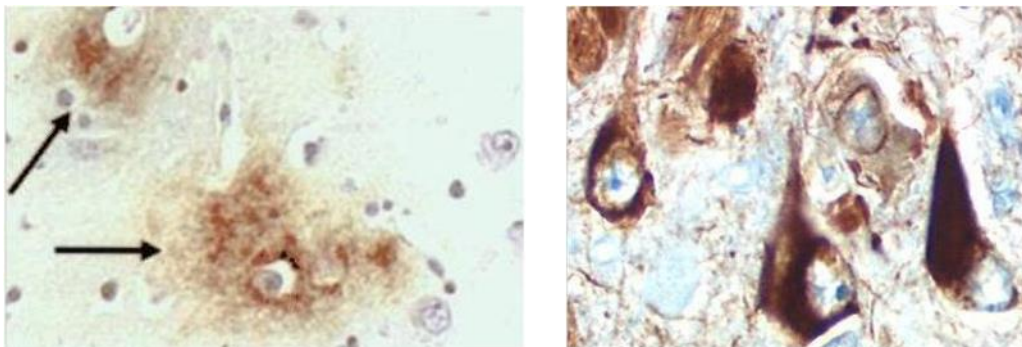


Figure 4 : Lésions histopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Marquages immunohistochimiques des dépôts amyloïdes (à gauche) et de la dégénérescence neurofibrillaire (à droite) (source : Pr Maurage, CHRU de Lille).

Le développement de ces deux lésions est progressif, ce qui a donné lieu à une classification de la MA en différents stades (stades de Braak), proposée pour la première fois en 1991 (Braak and Braak, 1991).

A) Description des lésions histopathologiques

(1) La protéine APP

La protéine précurseur de l'amyloïde est une protéine transmembranaire présentant une courte extrémité C-terminale cytoplasmique et une extrémité N-terminale extracellulaire beaucoup plus longue.

(a) Gène et épissage alternatif

Chez l'homme, le gène codant pour l'APP se situe sur le chromosome 21. Des mutations autosomiques dominantes ont été décrites pour ce gène, et elles sont à l'origine de certaines formes familiales de la MA.

Après transcription du gène, l'ARN messager est soumis à un épissage alternatif pouvant, suite à la traduction, générer 3 isoformes protéiques, contenant alors 695, 751 ou 770 acides aminés (APP695, APP751 et APP770, respectivement). L'APP695 est l'isoforme retrouvée de façon prédominante dans les neurones, alors que les isoformes APP751 et APP770 sont retrouvées dans la plupart des tissus (Zhang et al., 2011).

(b) Métabolisme de l'APP

L'APP subit de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation (Schedin-Weiss et al., 2014) et la phosphorylation (Suzuki and Nakaya, 2008). Elle est protéolysée en plusieurs étapes par des sécrétases, générant alors différents fragments de protéolyse, dont le peptide β -amyloïde. On distingue ainsi 2 voies de protéolyse, la voie non-amyloïdogénique (ne conduisant pas à la synthèse du peptide $A\beta$), et la voie amyloïdogénique (générant le peptide $A\beta$) (Figure 5).

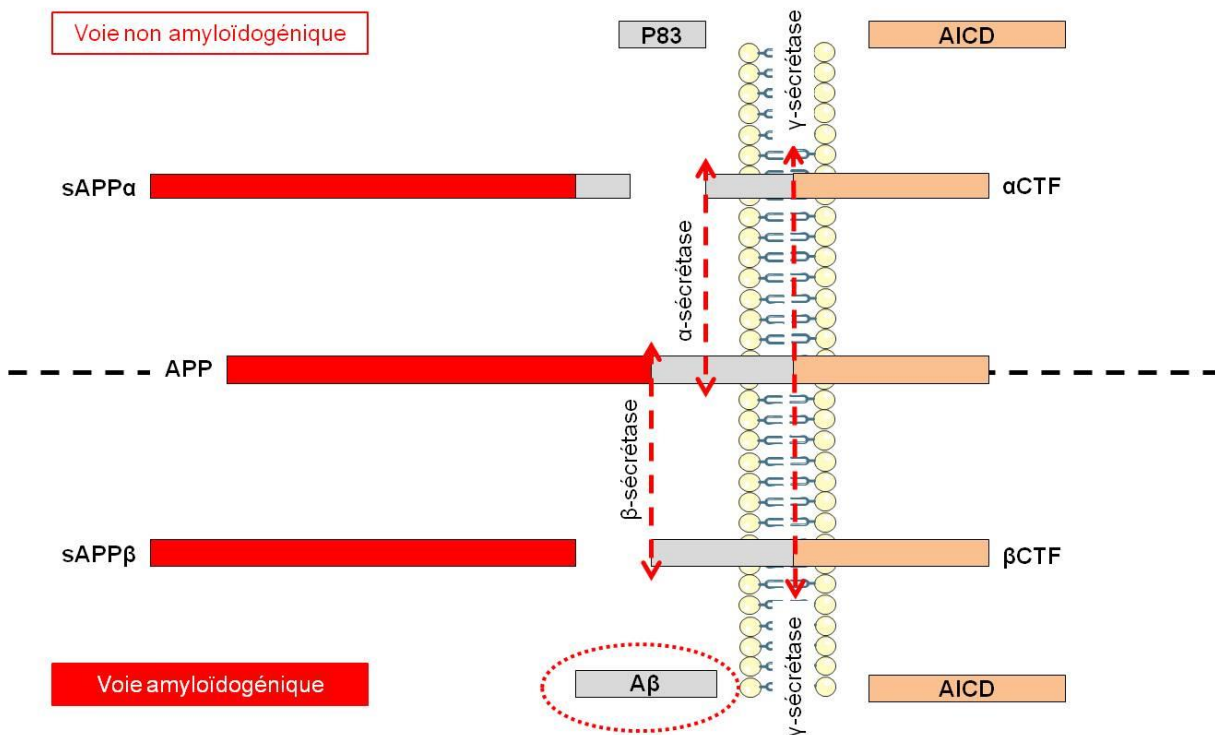


Figure 5 : Métabolisme de l'APP. Voies non amyloïdogénique (en haut) et amyloïdogénique (en bas). Modifié d'après Zhang et al, 2011. AICD : domaine intra-cellulaire de l'APP, APP : protéine précurseur de l'amyloïde, CTF : fragment carboxy-terminal, sAPP : forme soluble de l'APP.

(i) Voie non-amyloïdogénique

Dans un premier temps, l'APP va être clivée par une α -sécrétase au niveau du domaine $A\beta$, générant l'APP α soluble (sAPP α) dans le milieu extracellulaire et le fragment carboxy-terminal

(CTF) de l'APP (α CTF). Parmi les α -sécrétases identifiées, nous retrouvons plusieurs protéases de la famille ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) telles qu'ADAM10 et ADAM17 (Vingtdeux and Marambaud, 2012).

Le fragment α CTF va ensuite subir un clivage par une γ -sécrétase au niveau du domaine transmembranaire. Les γ -sécrétases sont un complexe constitué pour partie des présénilines 1 et 2 (Zhang et al., 2014b). Ce second clivage génère le fragment P83 et le domaine intracellulaire de l'APP (APP intracellular domain, AICD).

(ii) Voie amyloïdogénique

Dans la voie amyloïdogénique, l'APP est dans un premier temps clivé par une β -sécrétase (beta-site APP cleaving enzyme-1 : BACE1), générant ainsi la forme soluble de l'APP β (sAPP β) dans le milieu extracellulaire et le fragment β CTF (Kandalepas and Vassar, 2014).

Le fragment β CTF va ensuite subir, comme décrit précédemment pour le fragment α CTF, un clivage par une γ -sécrétase au niveau du domaine transmembranaire. Ce second clivage générera alors le peptide A β (principalement les formes A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂) ainsi que le domaine AICD.

(c) Fonctions physiologiques de l'APP et ses métabolites

L'APP joue un rôle dans la viabilité neuronale (Perez et al., 1997), la croissance neuritique (Allinquant et al., 1995; Small et al., 1999; Young-Pearse et al., 2008) et l'adhésion cellulaire (Behr et al., 1996).

L'APP α soluble joue un rôle dans la plasticité neuronale et protège les neurones des phénomènes d'excitotoxicité (Furukawa et al., 1996). Il antagonise également la dégénérescence dendritique et la mort neuronale induites par un stress protéasomal (Copanaki et al., 2010).

Les domaines AICD, quant à eux, peuvent former un complexe transcriptionnel avec Fe65 et Tip60, et ainsi réguler la transcription de plusieurs gènes, parmi lesquels ceux codant pour l'APP lui-même (Rotz et al., 2004), la GSK3 β (Kim et al., 2003) (dont le rôle sera décrit dans le chapitre suivant : pathologie Tau) ou encore la néprilysine (Pardossi-Piquard et al., 2005) (enzyme de dégradation des peptides A β).

Enfin, le fragment C31 généré par le clivage des domaines AICD par des caspases induit l'apoptose neuronale (Bertrand et al., 2001; Lu et al., 2003; Park et al., 2009).

(d) Rôles physiopathologiques dans la MA

Dans la MA, les peptides A β générés par la voie amyloïdogénique du métabolisme de l'APP vont s'oligomériser puis s'agréger pour constituer les plaques séniles (Zhang et al., 2011). Les données actuelles de la littérature indiquent que les formes oligomériques seraient les plus toxiques (Kayed and Lasagna-Reeves, 2013). Les oligomères de peptides A β agiraient notamment en bloquant la potentialisation à long terme (LTP, *long term potentiation*) dans l'hippocampe (Walsh et al., 2002).

Les études réalisées sur les cerveaux des patients atteints de la MA ont montré des taux de protéines ADAM10 diminués (Marcinkiewicz and Seidah, 2000) et corrélés avec la quantité de plaques amyloïdes dans l'hippocampe (Bekris et al., 2012). Des taux élevés de BACE1 ont aussi été mis en évidence dans le cerveau des patients atteints de la MA (Fukumoto et al., 2002; Johnston et al., 2005; Yang et al., 2003), favorisant ainsi la voie amyloïdogénique du métabolisme de l'APP. Une baisse d'expression de la néprilysine, métalloprotéase capable de dégrader les peptides β -amyloïdes, a également été rapportée dans l'hippocampe de patients atteints de la MA (Yasojima et al., 2001)

Par ailleurs, le fragment APP β soluble, suite à un clivage générant un fragment amino-terminal capable de se lier au récepteur de mort cellulaire DR6, jouerait un rôle dans la mort neuronale rencontrée chez les patients (Nikolaev et al., 2009).

(e) Progression spatio-temporelle de la pathologie amyloïde

La pathologie amyloïde peut être classée en 3 stades : A, B et C, en fonction des zones cérébrales atteintes et de la charge amyloïde (quantité de peptides A β déposés) (Figure 6).

Au stade A, de faibles quantités de dépôts amyloïdes sont retrouvées dans les régions basales du cortex frontal, temporal et occipital. De rares dépôts amyloïdes sont également trouvés au niveau du présubiculum et du cortex entorhinal.

Au stade B, des densités moyennes de dépôts amyloïdes sont retrouvées dans la plupart des aires associatives isocorticales, à l'exception des aires sensorielles primaires et du cortex moteur primaire. L'hippocampe commence à être atteint.

Enfin, au stade C, l'ensemble de l'isocortex est atteint, et les dépôts retrouvés dans l'hippocampe n'évoluent pas par rapport au stade B.

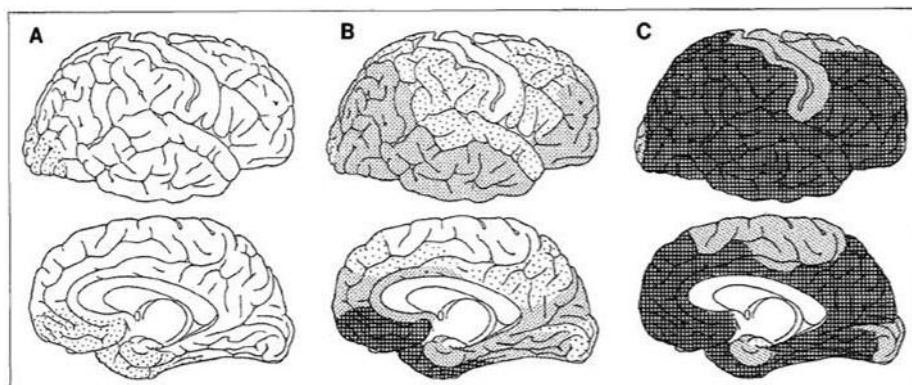


Figure 6 : Stades de Braak du développement de la pathologie amyloïde proposés en 1991. Modifié d'après Braak et Braak, 1991.

(2) Les protéines Tau

La DNF observée dans la MA correspond à l'accumulation intra-neuronale de fibrilles formées de filaments caractéristiques : les filaments appariés en hélices (PHF, *paired helical filaments*). Ces PHF sont majoritairement constitués de protéines Tau (Tubulin-associated unit) agrégées (Brion et al., 1985; Delacourte and Defossez, 1986), pour lesquelles l'état de phosphorylation est altéré (pour revue : Buée et al., 2000; Sergeant et al., 2008).

Chez l'Homme, la protéine Tau peut être retrouvée sous forme agrégée dans le cerveau dans différentes pathologies regroupées sous le nom de « tauopathies ». Ainsi, si la MA constitue la principale tauopathie, des agrégats de protéines Tau sont également retrouvés dans les démences fronto-temporales, la démence à corps de Lewy, la maladie de Pick, la dégénérescence cortico-basale ou encore la paralysie supra-nucléaire progressive, cette liste n'étant pas exhaustive (Sergeant et al., 2005).

(a) Gène et épissage alternatif

La protéine Tau est codée chez l'homme par le gène MAPT (Microtubule-Associated Protein Tau) se situant sur le chromosome 17, en position 17q21 (Neve et al., 1986).

La transcription de ce gène MAPT conduit à la formation d'un pré-ARNm de 16 exons qui va subir un épissage alternatif (Figure 7).

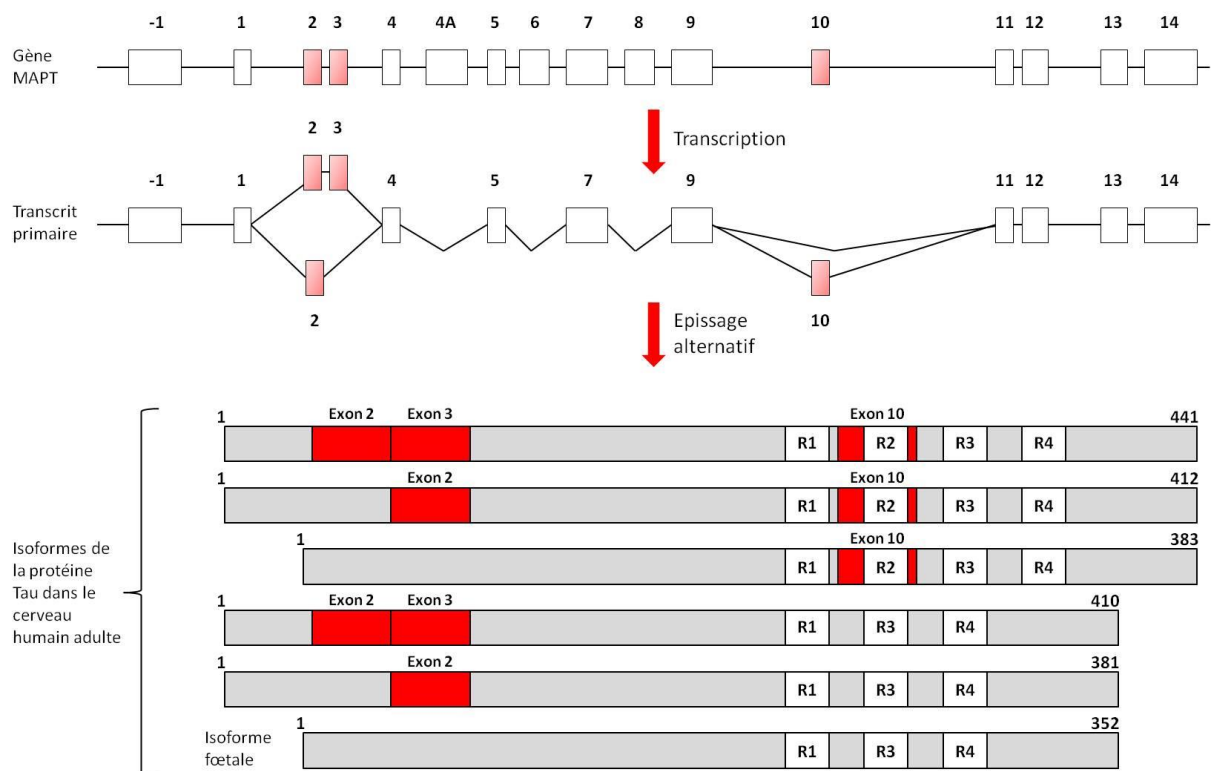


Figure 7 : Représentations schématisques du gène codant pour la protéine Tau humaine, de son transcrit primaire et des 6 isoformes protéiques résultant de l'épissage alternatif. Modifié d'après Buée et al, 2000 et Sergeant et al, 2008.

Les exons 2, 3 et 10 sont alternativement épissés, ce qui permet l'expression de 6 isoformes de la protéine Tau au niveau du système nerveux central (SNC) (Tableau 1). Ces 6 isoformes ont une taille comprise entre 352 et 441 acides aminés (aa), en fonction de l'inclusion et/ou l'exclusion des exons 2, 3 et 10 (Andreadis, 2005).

Isoforme	Epissage	Nombre d'acides aminés
0N3R	2 ⁻ 3 ⁻ 10 ⁻	352
1N3R	2 ⁺ 3 ⁻ 10 ⁻	381
0N4R	2 ⁻ 3 ⁻ 10 ⁺	383
2N3R	2 ⁺ 3 ⁺ 10 ⁻	410
1N4R	2 ⁺ 3 ⁻ 10 ⁺	412
2N4R	2 ⁺ 3 ⁺ 10 ⁺	441

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes isoformes de la protéine Tau retrouvées au niveau cérébral.

Au niveau de la région amino-terminale de la protéine Tau (également appelée domaine de projection), l'exon 3 n'est inclus qu'en présence de l'exon 2 au niveau du cerveau humain.

Au niveau de la région carboxy-terminale de la protéine Tau, l'épissage alternatif de l'exon 10 conduit à l'incorporation de 3 à 4 motifs répétés (R1 à R4) suivant les isoformes. Ces motifs répétés constituent les domaines de liaison aux microtubules.

La seule isoforme qui soit retrouvée chez le fœtus est l'isoforme 2⁻3⁻10⁻, d'où son appellation d' « isoforme fœtale ».

(b) Modifications post-traductionnelles

(i) Phosphorylation

La phosphorylation (ajout d'un groupement phosphate PO₄³⁻ sur une Sérine, une Thréonine ou une Tyrosine) de la protéine Tau constitue le type de modification post-traductionnelle le plus fréquent.

Sur son isoforme la plus longue (441 aa), la protéine Tau compte 85 sites potentiels de phosphorylation, dont la phosphorylation et la déphosphorylation dépendent de l'activité respective des protéines kinases et des protéines phosphatases. A ce jour, plus d'une vingtaine de protéines kinases ont été décrites comme étant capables de phosphoryler la protéine Tau, parmi lesquelles nous pouvons citer GSK3β (*Glycogen Synthase Kinase 3β*), Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase 5*) ou encore des MAP kinases (MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*) (Sergeant et al., 2008). La déphosphorylation de la protéine Tau est quant à elle assurée par différentes phosphatases, dont la principale est PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) (Liu et al., 2005).

(ii) *Autres modifications post-traductionnelles*

Bien que non investiguées dans le cadre de ce travail de thèse, il faut noter l'existence d'autres modifications post-traductionnelles de la protéine Tau. Ainsi, près de trois décennies de recherches ont permis d'identifier : l'ubiquitinylation (Mori et al., 1987), la glycation (Ledesma et al., 1995), la N-glycosylation (Wang et al., 1996), la prolyl cis-trans isomérisation (Lu et al., 1999), la polyamination (Singer et al., 2002), la nitration (Horiguchi et al., 2003), la O-glycosylation (Liu et al., 2004), la sumoylation (Dorval and Fraser, 2006), l'acétylation (Cohen et al., 2011) ou encore la méthylation (Thomas et al., 2012). Comme pour la phosphorylation, ces différentes modifications post-traductionnelles peuvent altérer le fonctionnement de la protéine Tau. Elles jouent donc un rôle important dans les Tauopathies.

(c) Localisations et fonctions physiologiques connues de la protéine Tau

En fonction de sa localisation cellulaire, la protéine Tau va assurer différentes fonctions.

Au niveau cytoplasmique, la protéine Tau joue un rôle dans la régulation de la dynamique microtubulaire. En effet, Tau est capable de se lier aux microtubules au niveau de ses motifs répétés en partie carboxy-terminale de la protéine. Cette liaison de Tau aux microtubules favorise leur polymérisation (Gustke et al., 1994) et est sensible à l'état de phosphorylation de la protéine Tau (Gustke et al., 1994; Lindwall and Cole, 1984). Ainsi, lorsqu'elle se trouve dans un état déphosphorylé (en conditions physiologiques), la protéine Tau se lie fortement aux microtubules, assurant ainsi leur polymérisation (stabilisation). L'espacement entre les microtubules est quant à lui influencé par la longueur du domaine de projection (qui varie selon l'inclusion ou la non inclusion des exons 2 et 3) (Frappier et al., 1994). La protéine Tau interagit également avec la kinésine et la dynéine (Dixit et al., 2008), et intervient donc dans le transport axonal. Enfin, il a été mis en évidence que la liaison de Tau aux microtubules est utile au maintien de la polarité neuronale (Caceres and Kosik, 1990).

La protéine Tau est également retrouvée dans le compartiment nucléaire (Loomis et al., 1990). Des études récentes montrent qu'elle y jouerait un rôle de protection de l'ADN en situation de stress cellulaire (Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014).

Enfin, Tau a été retrouvée associée à la membrane plasmique, via son domaine de projection (Brandt et al., 1995). A ce niveau, elle pourrait interagir avec des protéines tyrosine kinases de la famille Src, telles que la protéine Fyn (Lee, 2005). Des études plus récentes ont mis en évidence une interaction de Tau avec Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), PLC γ (phospholipase C γ) ou encore PI3K (phosphoinositide 3 kinase) (Reynolds et al., 2008). L'ensemble de ces interactions indique que la protéine Tau pourrait intervenir dans différentes voies de signalisation cellulaire.

(d) Rôles physiopathologiques dans la MA

Dans la MA, la protéine Tau est retrouvée sous forme hyper-phosphorylée (phosphorylation plus importante sur des sites de phosphorylation dits « physiologiques »), et/ou anormalement phosphorylée (phosphorylation sur des sites qui ne sont pas phosphorylés chez les individus sains). Différents anticorps ont été développés ces dernières décennies, ciblant des épitopes de phosphorylation physiologique ou pathologique de la protéine Tau. Des études réalisées dans le cerveau des patients atteints de la MA ont mis en évidence une dérégulation des activités des protéines phosphatases (Gong et al., 1995).

Les modifications de son état de phosphorylation conduisent la protéine Tau à se détacher des microtubules puis à s'agréger dans les neurones sous forme de PHF (Trojanowski and Lee, 1995).

(e) Progression spatio-temporelle de la pathologie Tau

De même que pour la pathologie amyloïde, une progression spatio-temporelle de la pathologie Tau a pu être observée dans le cerveau des patients atteints de la MA. Sur le plan clinique, la propagation de la DNF dans le cerveau est corrélée avec le déclin cognitif observé chez les patients atteints de la MA (Delacourte et al., 1999). La pathologie amyloïde pourrait agir en synergie avec la DNF, permettant alors l'extension de cette dernière à l'ensemble des territoires corticaux (Delacourte et al., 2002).

La propagation de la DNF peut être classée en 6 stades : I, II, III, IV, V et VI, en fonction des régions cérébrales atteintes et de la quantité de PHF. Aux stades I et II, la DNF envahit le locus coeruleus et la région trans-entorhinale. Elle se propage ensuite au cortex entorhinal et à l'hippocampe (régions fortement impliquées dans les processus mnésiques) aux stades III et IV. Pour finir, aux stades V et VI, la DNF atteint les aires polymodales puis unimodales, avant d'envahir l'ensemble du cortex (Braak and Braak, 1991; Braak and Del Tredici, 2011; Delacourte et al., 1999) (Figure 8).

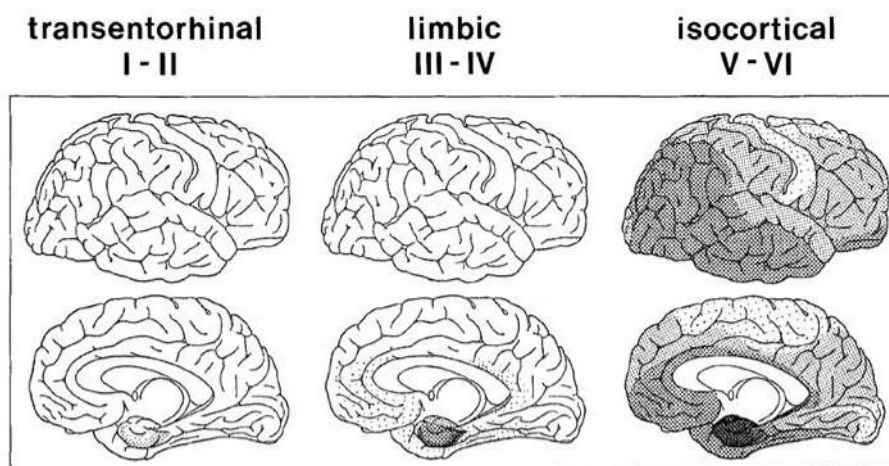


Figure 8 : Stades de Braak du développement de la dégénérescence neurofibrillaire proposés en 1991. Modifié d'après Braak et Braak, 1991.

B) Les autres atteintes cérébrales

En parallèle de la découverte et de l'étude des deux lésions histopathologiques présentées précédemment, d'autres modifications cérébrales sont retrouvées chez les patients atteints de la MA.

Ainsi, une perte d'activité cholinergique fut décrite en 1976 dans le cortex de patients atteints de la MA (Bowen et al., 1976; Davies and Maloney, 1976). Quelques années plus tard, elle fut corrélée à la sévérité de l'atteinte cognitive observée chez les patients atteints de la MA (Perry et al., 1981). Ces observations furent d'ailleurs à l'origine du développement des premiers traitements de la MA, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, visant à limiter ce déficit cholinergique (voir section VII – Prise en charge thérapeutique).

En parallèle de cette perte d'activité cholinergique, les cerveaux de patients atteints de la MA présentent également une neuroinflammation décelable dès les premiers stades de la maladie (Fuster-Matanzo et al., 2013; Heneka et al., 2015; Morales et al., 2014). Ces phénomènes inflammatoires seraient notamment liés à l'existence des plaques séniles (Meda et al., 1995; Paresce et al., 1996) et du stress oxydatif (Perry et al., 2002) retrouvés dans le cerveau des patients.

Il semble néanmoins que la neuroinflammation puisse être un phénomène délétère en lui-même. Des études expérimentales ont ainsi mis en évidence qu'elle participerait au développement de la DNF (Yoshiyama et al., 2007).

Par ailleurs, des dysfonctions mitochondriales ont pu être observées dans les cerveaux de patients (Chaturvedi and Flint Beal, 2013). Ces dysfonctions mitochondriales, en générant des espèces oxygénées réactives, contribuent au stress oxydatif retrouvé chez les patients.

VI. Diagnostic

Actuellement, seule une étude anatomopathologique post-mortem du cerveau des patients permet, par la mise en évidence des plaques séniles et de la dégénérescence neurofibrillaire *in situ*, le diagnostic de certitude de la MA.

Au plan macroscopique, les patients atteints de la MA présentent également une atrophie cérébrale majeure (Figure 9).

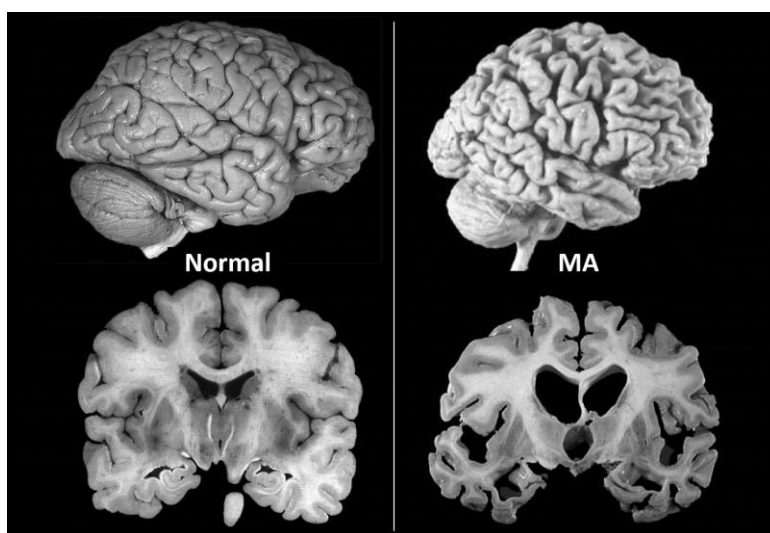


Figure 9 : Atrophie cérébrale observée chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (à droite) comparativement à un cerveau sain (à gauche). Source : recherche Google Images.

La combinaison de plusieurs approches permet aujourd'hui un diagnostic de plus en plus précoce, en associant l'évaluation du statut cognitif des patients, l'imagerie cérébrale et l'étude des biomarqueurs présents dans le liquide céphalorachidien (LCR). Une révision des critères diagnostiques du NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) de 1984 a été proposée en 2007 (Dubois et al., 2007), puis en 2011 (McKhann et al., 2011).

Ces critères diagnostiques définissent comme probable la maladie d'Alzheimer en présence :

- d'un début insidieux et progressif,
- de troubles cognitifs objectifs (évalués par des tests neuropsychologiques),
- d'une présentation clinique :
 - o soit amnésique : les troubles cognitifs affectent essentiellement la mémoire des patients et sont associés à l'atteinte d'au moins un autre domaine cognitif,
 - o soit non amnésique : les patients présentent au minimum 2 atteintes parmi les domaines suivants : troubles du langage, troubles visuo-constructifs et dysfonctions exécutives.

De plus, les patients ne doivent pas présenter de critère d'exclusion qui pourrait expliquer le tableau clinique cognitif. Sont considérés comme des critères d'exclusion :

- la présence conjointe d'une pathologie cérébrovasculaire,
- les caractéristiques importantes d'un autre type de démence (démence à corps de Lewy, démence fronto-temporale, etc.),
- l'existence d'une comorbidité non neurologique ou l'utilisation de médicaments pouvant avoir un effet sur la cognition.

La probabilité de MA est renforcée dans les situations où un déclin cognitif a été documenté, et/ou lorsqu'une mutation génétique du gène codant pour l'APP ou de ceux codant pour les présénilines est présente.

Les dosages de biomarqueurs dans le LCR, associés aux études de neuro-imagerie fonctionnelle, viennent de plus en plus conforter le diagnostic de la MA, malgré la nécessité de réaliser une ponction lombaire (acte médical semi invasif). Par ailleurs, ces dosages ont permis en 2011 de définir un nouveau concept de « maladie d'Alzheimer prodromale », stade précédant celui de démence (Sperling et al., 2011).

Au moment du diagnostic, les atteintes cognitive et fonctionnelle des patients sont évaluées afin de mieux caractériser le stade de la MA. L'atteinte cognitive est le plus souvent appréciée grâce au Mini Mental State Examination (MMSE – [Annexe 1](#)), qui est un test à la fois rapide et facile à reproduire, et qui permet l'exploration de différents domaines cognitifs (orientation spatiotemporelle, apprentissage, mémorisation, attention, calcul, raisonnement, langage et praxies constructives). L'atteinte fonctionnelle est quant à elle généralement évaluée à l'aide de l'échelle simplifiée des activités instrumentales de la vie quotidienne (IADL simplifiée – [Annexe 2](#)), qui évalue les 4 items suivants : utilisation du téléphone, utilisation des transports,

prise de médicaments et gestion des finances. Ce dépistage de la dépendance au moment du diagnostic peut permettre de proposer une prise en charge adaptée à la situation du patient (aides à domicile, soutien aux aidants, placement en institution, etc.).

VII. Prise en charge thérapeutique

A) *Traitements pharmacologiques actuellement disponibles*

Actuellement, la prise en charge thérapeutique des patients atteints de la MA repose sur l'utilisation de 4 molécules.

Trois d'entre elles appartiennent à la famille des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase : la Rivastigmine (Exelon®), le Donepezil (Aricept®) et la Galantamine (Reminyl®). La quatrième molécule utilisée est un antagoniste des récepteurs NMDA, la Memantine (Ebixa®).

Ces 4 molécules, mises sur le marché entre 1998 et 2003, sont indiquées dans le traitement des formes légères à modérées de la MA, et n'ont montré qu'une faible efficacité dans le traitement de la MA. A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif de la MA, de même qu'aucun des traitements disponibles ne permet de stopper l'évolution de la pathologie.

B) *Traitements pharmacologiques en cours de développement*

Des dizaines de molécules font l'objet d'essais cliniques pour le traitement de la MA (Mangialasche et al., 2010), et l'on peut distinguer 2 grands axes de recherche, ciblant respectivement la pathologie amyloïde et la pathologie Tau :

- Les modes d'action des traitements anti-amyloïdes en cours de développement ciblent le développement des plaques séniles (réduction de la synthèse du peptide A β par action sur les sécrétases, prévention de l'agrégation du peptide A β) ainsi que leur élimination par des approches immunologiques (immunothérapies active et passive).
- Les traitements dirigés contre la protéine Tau ciblent sa phosphorylation (via l'inhibition des kinases et l'activation des phosphatases), son agrégation et son élimination (immunothérapies active et passive) (Götz et al., 2012). Des études visant à stabiliser les microtubules ont également été réalisées (Morris et al., 2011).

Enfin, d'autres études ciblent – entre autres – la dysfonction mitochondriale, la neuroinflammation, et visent à stimuler la neurogenèse (Aisen et al., 2012).

C) *Prise en charge non pharmacologique*

A l'heure actuelle, devant le manque évident de traitements pharmacologiques, la prise en charge de la MA repose essentiellement sur des mesures préventives. Il est donc capital d'identifier et de traiter les éventuelles comorbidités qui constituent des FDR de développer la MA, telles que l'HTA, l'hypercholestérolémie ou encore le diabète de type 2.

Dans la mesure du possible, il convient aussi d'éviter les facteurs aggravants de la MA, tels qu'un déménagement, qui constituerait une perte de repères majeure.

Il est également possible de proposer des stimulations cognitives adaptées aux différents stades de la MA, ainsi que des exercices physiques, ceci dans le but de ralentir au maximum la perte d'autonomie des patients.

Enfin, différentes approches telles que la musicothérapie (Guétin et al., 2009) ou la lumbinothérapie pourraient avoir un effet bénéfique sur le plan comportemental, et peuvent donc être envisagées dans le cadre de la prise en charge d'un patient souffrant de la MA.

Chapitre II : Le syndrome d'apnées du sommeil

I. Un peu d'Histoire...

La première description du syndrome d'apnées du sommeil (SAS) fut faite en 1956 par le Dr Burwell (Burwell et al., 1956).

A l'époque, elle fut désignée sous le nom de « syndrome de Pickwick » en référence à Fat Joe, l'un des personnages du roman de Charles Dickens : *The Pickwick Papers* (*Papiers posthumes du Pickwick Club*), publié en 1837 (Figure 10).

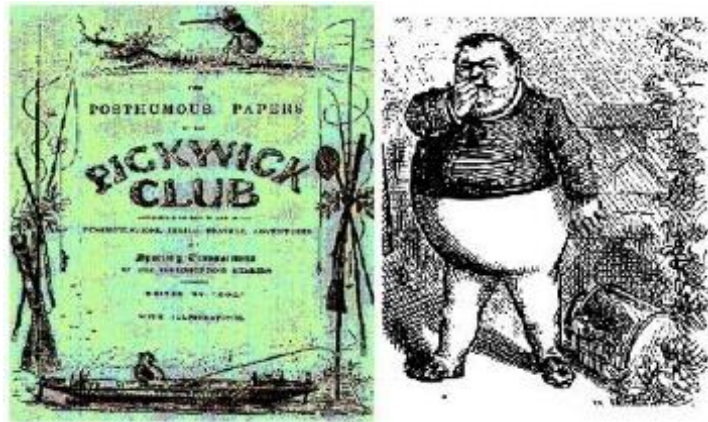


Figure 10 : Roman de Charles Dickens (à gauche) et illustration du personnage "Fat Joe" (à droite). Source : recherche Google Images.

L'auteur décrivait en effet ce personnage comme un [jeune garçon, gros, rougeaud et joufflu], souffrant d'une somnolence incontrôlable :

- [*« Joe ! Damné garçon ! il est encore à dormir !*
- *Voilà un jeune homme bien extraordinaire, dit M. Pickwick. Est-ce qu'il est toujours assoupi comme cela ?*
- *Assoupi ! Il dort toujours. Il fait mes commissions en dormant ; et quand il sert à table, il ronfle.*
- *Bien extraordinaire ! répéta M. Pickwick.*
- *Ha ! extraordinaire en vérité, reprit le vieux gentleman. Je suis orgueilleux de ce garçon. Je ne voudrais m'en séparer à aucun prix, sur mon âme. C'est une curiosité naturelle. Hé ! Joe ! Joe ! ôtez tout cela, et débouchez une autre bouteille, m'entendez-vous ? »].*

Le syndrome de Pickwick associe une obésité extrême, une hypersomnolence, une hypoventilation alvéolaire et une insuffisance cardiaque droite. Il ne constitue en réalité qu'une forme exceptionnelle et sévère du SAS.

Les apnées au cours du sommeil furent quant à elles mises en évidence en 1965, suite à l'étude des patients atteints du syndrome de Pickwick (Gastaut et al., 1965).

II. Données épidémiologiques

Dans la population générale, la prévalence du syndrome d'apnées du sommeil est estimée entre 2 et 5% (Bixler et al., 2001; Young et al., 1993). Le SAS est une pathologie fréquente qui concernerait 1 à 3 millions de personnes en France (source : Haute Autorité de Santé) et représente, à ce titre, un enjeu sanitaire et économique majeur.

III. Quelques définitions

A) Apnée

Une apnée se caractérise par un arrêt du flux aérien respiratoire pendant plus de 10 secondes chez un adulte.

B) Hypopnée

Une hypopnée se définit par une diminution du flux aérien de plus de 50%, associée à une réduction de la saturation en oxygène d'au moins 3% et/ou un micro-éveil pendant une durée minimale de 10 secondes chez un adulte.

Remarque :

Ces troubles respiratoires nocturnes (apnées et hypopnées) vont occasionner des épisodes hypoxiques répétés tout au long du sommeil. L'aspect de la courbe de saturation en O₂ prend alors chez ces patients un aspect en peigne avec de fréquentes désaturations (Figure 11).

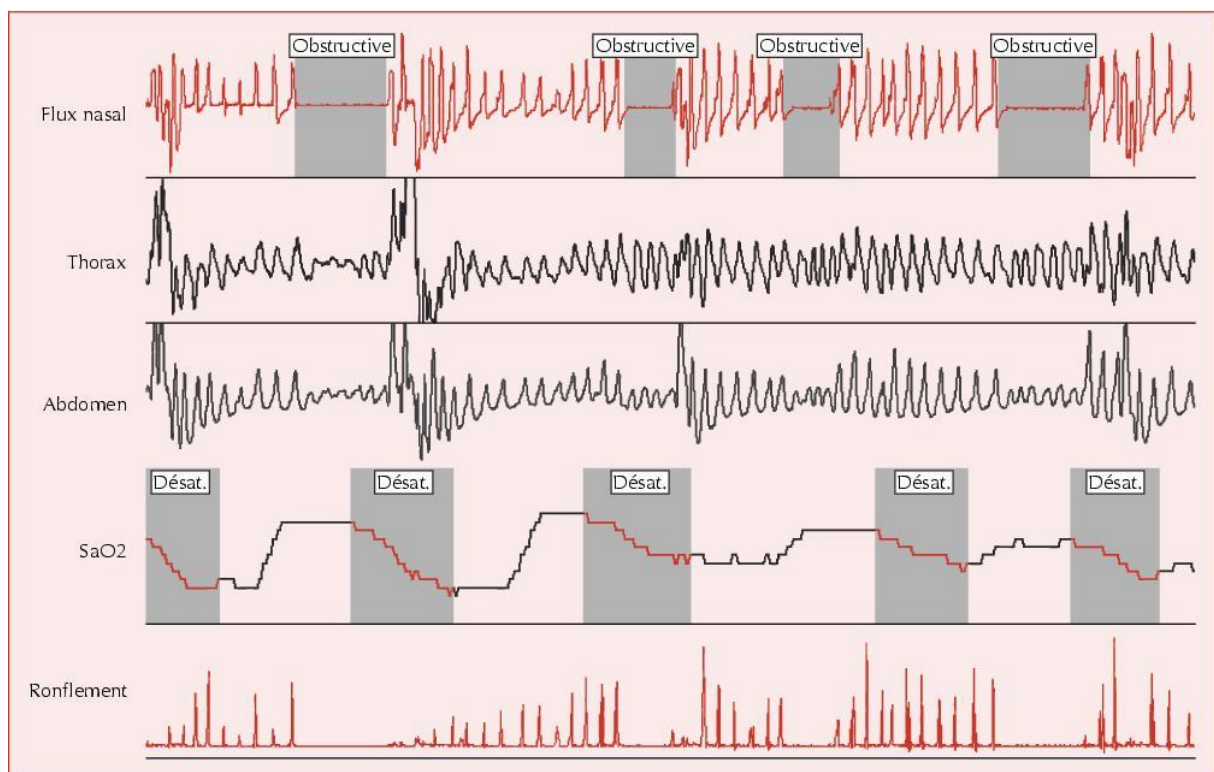


Figure 11 : Enregistrement polygraphique nocturne chez un patient présentant un syndrome d'apnées du sommeil. Image extraite de Badoual et al, 2005 (Badoual et al., 2005).

C) *Index d'apnées hypopnées*

L'index d'apnées hypopnées (IAH) représente le nombre d'apnées et/ou hypopnées survenant par heure de sommeil.

IV. Classification des apnées du sommeil

En fonction de leur origine, on distingue 3 types d'apnées du sommeil :

- Les apnées du sommeil obstructives, les plus fréquentes, sont causées par une interruption du flux aérien due à l'obstruction des voies aériennes supérieures (VAS), avec conservation des mouvements respiratoires thoraco-abdominaux.
- Les apnées du sommeil centrales sont plus rares, elles sont causées par un arrêt de la commande respiratoire et l'interruption du flux aérien est associée à une disparition des mouvements respiratoires thoraco-abdominaux.
- Les apnées du sommeil mixtes associent les deux types d'apnées précédentes, puisqu'elles consistent en la succession d'une apnée centrale puis obstructive.

V. Signes cliniques

Les premiers signes cliniques rencontrés chez les patients souffrant d'un SAS sont la ronchopathie et les épisodes apnéiques au cours du sommeil, événements souvent rapportés par les conjoints des patients.

La grande majorité des patients présentent également une somnolence diurne excessive (Seneviratne and Puvanendran, 2004), évaluable par plusieurs méthodes parmi lesquelles on retrouve le score d'Epworth (Johns, 1991). Ce score est déterminé par un auto-questionnaire évaluant de 0 (aucun risque) à 3 (risque important) le risque de somnoler dans 8 situations de la vie quotidienne ([Annexe 3](#)). Le score obtenu s'étend de 0 à 24, et le seuil de normalité obtenu chez les volontaires sains est inférieur ou égal à 10.

Certains patients présentent également des troubles cognitifs d'expression variable (Gagnon et al., 2014). Ces troubles cognitifs seront traités dans le chapitre suivant (Chapitre IV – Troubles cognitifs observés sous hypoxie en clinique humaine).

Les événements respiratoires nocturnes (apnées et hypopnées) retrouvés dans le SAS vont entraîner une fragmentation du sommeil du fait de micro-éveils survenant lors des reprises inspiratoires. Cette fragmentation du sommeil serait vraisemblablement à l'origine de la somnolence diurne excessive et d'une partie des troubles cognitifs.

Enfin, parmi les autres symptômes que l'on peut retrouver chez les patients souffrant d'un SAS, nous pouvons citer la présence de réveils en sursaut avec sensation d'étouffement, de nycturie, de sueurs nocturnes, ou encore de céphalées matinales.

VI. Facteurs de risque

Les principaux facteurs de risque de développer un SAS sont l'obésité (Peppard et al., 2000a; Strobel and Rosen, 1996; Young et al., 1993), l'âge compris entre 40 et 65 ans (Bixler et al., 1998), le sexe masculin (Young et al., 1993), la ménopause chez les femmes (Bixler et al., 2001) et le tabagisme (Kashyap et al., 2001). La configuration anatomique des VAS est également un facteur prédisposant au SAS (Dempsey et al., 2002). Ainsi, les personnes présentant un rétrécissement des VAS et/ou des anomalies morphologiques de la sphère ORL (sphère oto-rhino-laryngée), telles qu'une micrognathie (hypoplasie de la mâchoire inférieure) ou une rétrognathie (rétraction de la mâchoire inférieure) seront plus susceptibles de développer un SAS que les autres.

Par ailleurs, le syndrome d'apnées du sommeil est aggravé par la consommation d'alcool (Scrima et al., 1982; Taasan et al., 1981), l'utilisation de médicaments pouvant induire une sédation (hypnotiques, certains myorelaxants, etc...) (Guilleminault et al., 1984) et le sommeil en décubitus dorsal (Joosten et al., 2014; Oksenberg and Silverberg, 1998).

VII. Comorbidités associées au SAS

S'il existe plusieurs facteurs de risques de développer un syndrome d'apnées du sommeil, celui-ci se trouve également être un facteur de risque de développer d'autres pathologies.

Ainsi, les patients souffrant d'un SAS sont plus enclins à développer une hypertension artérielle (HTA) (Konecny et al., 2014; Nieto et al., 2000; Peppard et al., 2000a) ainsi que des pathologies cardiovasculaires : insuffisance cardiaque (Chami et al., 2011; Garcia-Touchard et al., 2008; Gottlieb et al., 2010), troubles du rythme cardiaque (Guilleminault et al., 1983; Olmetti et al., 2008), accidents vasculaires cérébraux (Arzt et al., 2005; Dyken and Im, 2009; Yaggi et al., 2005) et pathologies coronariennes (Peker et al., 2006; Schäfer et al., 1999). Ces pathologies cardiaques peuvent conduire à une réduction de l'oxygénation tissulaire par réduction du flux sanguin, et donc contribuer au stress hypoxique retrouvé chez les patients apnéiques.

Sur le plan métabolique, ces patients présentent également plus de risques de développer un syndrome métabolique (Coughlin et al., 2004) et une résistance à l'insuline (Ip et al., 2002).

Enfin, au plan psychocomportemental, les patients présentant un SAS sont également plus enclins à développer une dépression (Harris et al., 2009; Peppard et al., 2006).

VIII. Diagnostic

A) Critères diagnostiques du SAS

Selon les critères proposés en 1999 par l'académie américaine de médecine du sommeil, le SAS se définit par les critères suivants :

- A : existence d'une somnolence diurne excessive non expliquée par d'autres facteurs
- B : au minimum 2 des critères suivants non expliqués par d'autres facteurs :
 - o Ronflements sévères et quotidiens
 - o Sensations d'étouffement ou de suffocation pendant le sommeil
 - o Sommeil non réparateur
 - o Fatigue diurne
 - o Difficultés de concentration
 - o Nycturie (plus d'une miction par nuit)
- C : Existence d'un minimum de 5 épisodes d'apnées ou hypopnées par heure de sommeil (index d'apnées hypopnées ≥ 5).

Le diagnostic de SAS est établi en présence des critères A ou B et du critère C.

B) Sévérité du SAS

La sévérité du SAS prend en compte deux composantes : l'IAH et l'importance de la somnolence diurne. Ainsi, on distingue pour chacune de ces deux composantes 3 stades : léger, modéré et sévère. La sévérité du SAS est celle de la composante au stade le plus sévère.

Concernant l'IAH, les stades sont définis en fonction du nombre d'épisodes apnéiques/hypopnéiques survenant par heure de sommeil :

- stade léger : $5 \leq \text{IAH} \leq 14$
- stade modéré : $15 \leq \text{IAH} \leq 29$
- stade sévère : $30 \leq \text{IAH}$.

L'IAH est déterminé suite à un enregistrement polysomnographique (ou polygraphique ventilatoire avec uniquement des capteurs respiratoires et cardiaques), examen permettant d'enregistrer plusieurs variables physiologiques (paramètres respiratoires, cardiaques, neuromusculaires, électroencéphalogramme, électromyogramme, électro-oculogramme) au cours du sommeil du patient.

Concernant la somnolence diurne, les 3 stades sont définis comme suivant :

- stade léger : somnolence indésirable ou épisodes de sommeil involontaire survenant pendant des activités nécessitant peu d'attention (regarder la télévision, être passager d'une voiture), et ayant peu de répercussions sur la vie sociale et/ou professionnelle du patient
- stade modéré : somnolence indésirable ou épisodes de sommeil involontaire survenant pendant des activités nécessitant de l'attention (réunions, présentations,

concerts) et ayant des répercussions modérées sur la vie sociale et/ou professionnelle du patient

- stade sévère : somnolence indésirable ou épisodes de sommeil involontaire survenant pendant des activités nécessitant une attention plus active (par exemple en mangeant, marchant, conduisant ou tenant une conversation) et perturbant de façon importante la vie sociale et/ou professionnelle du patient.

La sévérité de la somnolence diurne peut être appréciée par la réalisation de tests itératifs de latence d'endormissement (TILE), plus objectifs que le score obtenu à l'Echelle d'Epworth, et qui consistent en un enregistrement polysomnographique de 20 minutes, répété 4 à 5 fois toutes les 2 heures. Le patient a pour consigne de rester allongé sans lutter contre le sommeil, et le délai d'endormissement est mesuré, permettant de calculer une latence moyenne d'endormissement. Une somnolence excessive se traduit par un délai moyen d'endormissement inférieur à 8 minutes.

IX. Prise en charge thérapeutique

A) Mesures hygiéno-diététiques

En raison de l'existence de nombreux facteurs de risque de développer un syndrome d'apnées du sommeil, la première prise en charge qui peut être proposée aux patients repose sur l'application de mesures hygiéno-diététiques. Ainsi, chez les patients obèses ou en surpoids, une perte de poids peut s'avérer bénéfique. Il a en effet été démontré qu'une perte de 10% de la masse corporelle entraînait une réduction de l'IAH de 18 à 34% (Peppard et al., 2000b). De même, il va être recommandé à ces patients de limiter l'usage de médicaments sédatifs et leur consommation d'alcool vespérale, ainsi que de dormir préférentiellement sur le côté (plutôt qu'en décubitus dorsal).

B) Ventilation par pression positive continue

Le traitement par pression positive continue (PPC), mis au point en 1981 (Sullivan et al., 1981), consiste en un dispositif de ventilation nasale qui permet aux voies aériennes de rester dégagées pendant le sommeil, en propulsant de l'air ambiant sous pression dans un masque (Figure 12).

Chez les patients présentant un SAS sévère (avec un IAH supérieur à 30) et ceux présentant un IAH compris entre 15 et 30 associé à un sommeil de mauvaise qualité ou une maladie cardiovasculaire grave, la Haute Autorité de Santé (HAS) recommande l'utilisation de la PPC en première intention. Chez ces patients, en cas de refus ou



Figure 12 : Représentation schématique d'un appareil à Pression Positive Continue. Source : recherche Google Images.

d'intolérance à la PPC, un traitement par orthèse d'avancée mandibulaire pourra être proposé en seconde intention.

Il est important d'utiliser cet appareillage à PPC quotidiennement et pendant toute la durée du sommeil. En effet, les bénéfices de la PPC ne sont visibles qu'à partir du seuil minimum de 3 à 4 heures d'utilisation quotidienne (Weaver et al., 2007). Cependant, les contraintes associées à ce traitement (port du masque, bruit, ...) constituent un frein à son utilisation pour certains patients et sont donc parfois à l'origine d'une mauvaise observance du traitement.

Concernant les bénéfices de ce traitement, les patients présentent une réduction de leur IAH associée à une diminution de la somnolence diurne, un sommeil plus réparateur et une amélioration globale de leur qualité de vie (Barnes et al., 2002; Giles et al., 2006; Loreda et al., 1999). D'autre part, il a également été mis en évidence une amélioration de l'HTA (Faccenda et al., 2001), associée à une réduction du risque cardiovasculaire (Buchner et al., 2007; Marin et al., 2005) chez les patients traités par PPC. Enfin, il a également été démontré que certains troubles cognitifs étaient partiellement réversibles lors du traitement par PPC (Canessa et al., 2011) ; ce point sera développé dans le chapitre suivant (Chapitre IV – Troubles cognitifs observés sous hypoxie en clinique humaine).

C) *Orthèse d'avancée mandibulaire*

L'orthèse d'avancée mandibulaire (OAM) est un dispositif dentaire réalisé sur mesure qui permet de maintenir la mâchoire inférieure en position avancée pendant le sommeil, favorisant alors le passage de l'air au niveau du pharynx (Figure 13).



Figure 13 : Modèle d'orthèse d'avancée mandibulaire. Source : recherche Google Images.

L'OAM est recommandée en première intention lorsque l'IAH est compris entre 15 et 30, en l'absence de maladie cardiovasculaire grave associée. Elle est également recommandée en seconde intention lors de l'échec de la mise en place d'un traitement par PPC.

Les patients bénéficiant d'un traitement par OAM présentent une amélioration de la vigilance diurne ainsi qu'une réduction significative de leur IAH, associée à un sommeil de meilleure qualité (Petitjean et al., 2000).

D) *Chirurgie*

Des traitements chirurgicaux peuvent être proposés en fonction de la sévérité du SAS et de l'échec des traitements de référence (PPC et OAM).

Des traitements chirurgicaux légers peuvent intervenir sur le voile du palais et les amygdales en cas d'hypertrophie amygdalienne majeure chez les patients présentant un SAS sévère. Ces traitements peuvent aussi être recommandés chez les patients présentant un SAS léger à modéré, et refusant ou ne tolérant pas la PPC et l'OAM.

La chirurgie d'avancée des maxillaires est quant à elle une chirurgie beaucoup plus lourde, et n'est recommandée que chez les patients présentant une malposition faciale et un SAS sévère et refusant ou ne tolérant pas la PPC et l'OAM.

E) *Traitements pharmacologiques*

Des traitements pharmacologiques à base de stimulants respiratoires ont été envisagés dans le SAS mais n'ont à ce jour pas démontré d'efficacité et ne sont donc pas recommandés dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des patients.

Chapitre III : Réponse à l'hypoxie de l'organisme : voies de signalisation HIF, EPO et VEGF.

Préambule :

Dans le cadre de nos études expérimentales réalisées chez les animaux WT et THY-Tau22 exposés à un stress hypoxique répété ou intermittent, une partie de nos analyses a consisté en l'évaluation de la réponse au stress hypoxique des animaux.

Pour cela, nous avons concentré nos analyses sur la réponse liée au manque d'oxygène. Celle-ci est médiée par le facteur induit par l'hypoxie 1 α (HIF1 α , Hypoxia Inducible Factor 1 α), et résulte en une augmentation des quantités d'érythropoïétine (EPO) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) dans l'organisme.

Nous proposons ici un bref rappel de ces voies de signalisation moléculaire.

I. Les facteurs induits par l'hypoxie (HIF)

Historiquement, la découverte des facteurs HIF eut lieu au début des années 1990, suite à l'étude du gène codant pour l'érythropoïétine (EPO) (Weidemann and Johnson, 2008). Semenza et ses collaborateurs découvrirent alors une séquence située en position 3' non-codante dans le promoteur du gène de l'EPO : la séquence HRE (Elément de réponse à l'hypoxie, *Hypoxia Response Element*), qui fixe la protéine HIF-1 en condition d'hypoxie (Semenza and Wang, 1992; Semenza et al., 1991). Par la suite, cette séquence HRE fut localisée sur plus de 70 autres gènes, parmi lesquels celui codant pour le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).

A l'heure actuelle, 3 isoformes de facteurs induits par l'hypoxie (HIF) ont été décrits dans la littérature chez l'homme : HIF-1, HIF-2 et HIF-3 ; HIF-1 et HIF-2 étant les plus étudiés (Loboda et al., 2010, 2012).

Ces facteurs HIF sont des protéines qui vont donc agir comme facteurs de transcription en réponse à un stress hypoxique.

Les facteurs HIF sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α et une sous-unité β .

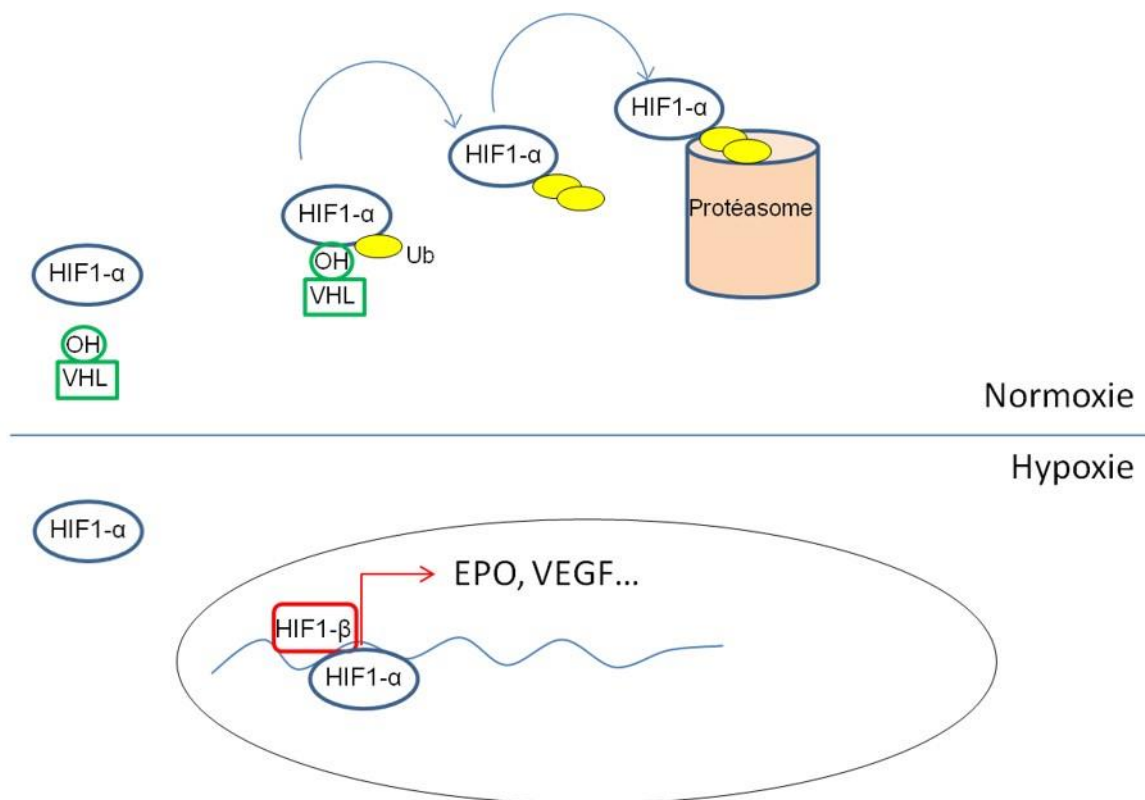
La sous-unité β , également connue sous le nom d'ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), est retrouvée sous une forme stable dans le noyau des cellules en condition de normoxie.

En condition de normoxie, la sous-unité α va en revanche subir une hydroxylation dès sa sortie du noyau par des prolyl hydroxylases (PHD) (Weidemann and Johnson, 2008). Elle va ensuite être liée par la protéine pVHL (Von Hippel Lindau protein), ubiquitinée et rapidement dégradée par le protéasome dans le cytoplasme cellulaire (Figure 14). Ainsi, la demi-vie de HIF- α est de seulement 5 minutes dans le cytoplasme des cellules en condition de normoxie

(Salceda and Caro, 1997). En outre, une activation du facteur inhibiteur de HIF-1 (FIH-1 : *Factor Inhibiting HIF-1*) a également été rapportée sous normoxie, bloquant alors la transcription des gènes cibles de HIF tels que l'EPO et le VEGF (Mahon et al., 2001).

Lors d'une hypoxie, la sous-unité α ne pouvant plus être hydroxylée par les PHD en raison du manque d'oxygène disponible, elle est retrouvée sous forme stable dans le cytoplasme des cellules. Elle va alors être transloquée au niveau du noyau, où elle pourra s'assembler avec la sous-unité β , ainsi que certains cofacteurs, formant ainsi le complexe HIF-1 activant la transcription de plusieurs gènes en se fixant au niveau des éléments HRE. En situation d'hypoxie, l'activité de FIH-1 est par ailleurs bloquée.

Enfin, lors du retour à la normoxie après un épisode d'exposition à l'hypoxie, les sous-unités α des facteurs HIF se trouvant dans le noyau des cellules seront ubiquitinées et dégradées par le protéasome nucléaire.



OH : prolyl-hydroxylase / VHL : protéine de Van Hippel Lindau / Ub : ubiquitine

Figure 14 : Représentation schématique du métabolisme des sous-unités α et β des facteurs induits par l'hypoxie (HIF). EPO : Erythropoïétine; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor.

II. L'érythropoïétine (EPO)

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone glycoprotéique de 165 acides aminés essentiellement produite par le rein (Jelkmann, 1992; Krantz, 1991).

Une production d'EPO est également retrouvée au niveau du foie (essentiellement chez le fœtus) (Thomas and Yoffey, 1964), de l'utérus (Yasuda et al., 1998) et du cerveau. Au niveau cérébral, il semblerait que l'EPO soit synthétisée par les astrocytes (Marti, 2004; Masuda et al., 1994, 1997), et que les récepteurs de l'EPO soient retrouvés au niveau des neurones (Masuda et al., 1993; Morishita et al., 1997).

En réponse à un stress hypoxique, l'EPO va être acheminée au niveau de la moelle osseuse afin d'y jouer son rôle de facteur de croissance érythrocytaire, permettant ainsi d'augmenter le nombre de globules rouges dans le sang, et donc le potentiel de captage en oxygène du sang. Au final, l'augmentation de la synthèse d'EPO permet donc à l'organisme d'améliorer l'apport d'oxygène aux tissus cibles, et donc de minimiser les effets délétères du manque d'oxygène.

Au niveau cérébral, l'EPO jouerait un rôle neuroprotecteur lors des situations d'hypoxie (baisse des quantités d'oxygène disponibles dans le sang, entraînant une hypoxémie tissulaire) et d'ischémie (baisse de l'apport sanguin au niveau tissulaire, ayant pour conséquence une hypoxémie locale) (Bernaudin et al., 1999; Rabie and Marti, 2008; Sakanaka et al., 1998).

III. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire est une glycoprotéine qui, comme son nom l'indique, joue un rôle dans l'angiogenèse (formation des nouveaux vaisseaux sanguins). Cinq molécules différentes ont été identifiées : VEGF-A à VEGF-D, ainsi que le PlGF, facteur de croissance placentaire (*Placental Growth Factor*) (Breen, 2007).

Le VEGF agit principalement sur les cellules de l'endothélium vasculaire, stimulant leur prolifération et leur migration.

Dans le cerveau adulte, le VEGF jouerait également un rôle dans la neurogenèse et la plasticité synaptique (Carmeliet and Storkebaum, 2002; Licht and Keshet, 2013).

Chapitre IV : Troubles cognitifs observés sous hypoxie en clinique humaine

En clinique humaine, certaines situations peuvent entraîner des hypoxies qu'il est possible de classer en fonction de leur mode de survenue. Ainsi il sera possible de distinguer :

- Des hypoxies intermittentes chez les patients présentant un SAS,
- Des hypoxies « chroniques » chez les patients présentant une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO),
- Des hypoxies aiguës chez les sujets se rendant en altitude.

De façon intéressante, des troubles cognitifs ont pu être décrits dans toutes ces situations.

I. Troubles cognitifs observés chez les patients souffrant d'un SAS

Les troubles cognitifs observés dans le SAS sont d'expression variable (Bucks et al., 2013; Gagnon et al., 2014; Sforza and Roche, 2012). Les patients peuvent en effet présenter des difficultés de concentration, des troubles mnésiques ou bien encore des dysfonctions exécutives. Des études prospectives ont montré que les patients souffrant d'un SAS présentaient un risque accru de développer une atteinte cognitive légère ou une démence, ce risque étant corrélé avec l'IAH (Chang et al., 2013; Yaffe et al., 2011). Ces atteintes cognitives légères et démences surviendraient en outre à un âge plus jeune chez les patients apnéiques que dans la population générale, et le délai d'apparition serait amélioré par le traitement par PPC (Osorio et al., 2015).

La fragmentation du sommeil et l'hypoxémie nocturne retrouvées dans le SAS seraient à l'origine de ces troubles cognitifs. Chez des patients présentant un SAS modéré à sévère non traité, une perte de substance grise a par ailleurs été mise en évidence en imagerie par résonance magnétique (IRM) dans plusieurs régions cérébrales, incluant notamment l'hippocampe, le cervelet, le cortex frontal, le cortex pariétal et le gyrus cingulaire antérieur ; régions impliquées dans les processus cognitifs et la régulation motrice des voies aériennes supérieures (Macey et al., 2002; Morrell, 2003; Morrell et al., 2010). Ces lésions cérébrales pourraient également contribuer aux troubles cognitifs observés chez les patients. Il a d'ailleurs été montré qu'une augmentation du volume de matière grise dans le cerveau de patients apnéiques traités par PPC était associée à une réduction des troubles cognitifs (Canessa et al., 2011).

A) *Troubles de l'attention*

Plusieurs études ont rapporté des troubles de l'attention chez les patients présentant un SAS (Aloia et al., 2004; Fulda and Schulz, 2001; Karimi et al., 2015). Les patients présenteraient en effet plus d'erreurs et des temps de réaction allongés par rapport aux témoins dans les tests cognitifs nécessitant de l'attention (Bédard et al., 1991a; Mazza et al., 2005; Sforza et al., 2004).

Il semblerait que la fragmentation du sommeil soit à l'origine de ces troubles de l'attention, et que ceux-ci seraient améliorés par le traitement du SAS (Bédard et al., 1991b; Ferini-Strambi et al., 2003; Montserrat et al., 2001). Néanmoins l'hypoxémie nocturne pourrait également contribuer à la pathogenèse de ces troubles (Bédard et al., 1991a).

B) *Troubles des fonctions exécutives*

Des dysfonctions exécutives (mémoire de travail, planification, flexibilité cognitive, etc.) ont été rapportées dans plusieurs études chez les patients apnéiques (Lau et al., 2015; Naëgelé et al., 1995; Saunamäki and Jehkonen, 2007). La présence des dysfonctions exécutives ne serait pas associée à la sévérité du SAS (Borges et al., 2013).

Le traitement par PPC pourrait améliorer certaines dysfonctions exécutives (Felver-Gant et al., 2007; Olaithe and Bucks, 2013; Saunamäki and Jehkonen, 2007). Concernant les troubles des fonctions exécutives observées dans le SAS, il semblerait qu'elles soient principalement causées par l'hypoxémie nocturne (Adams et al., 2001; Bédard et al., 1991b; Borges et al., 2013).

C) *Troubles mnésiques*

Une atteinte de la mémoire à court terme a été rapportée chez les patients apnéiques (Grenèche et al., 2011). Le SAS semble aussi affecter la mémoire épisodique verbale et visuo-spatiale (Kloepfer et al., 2009; Wallace and Bucks, 2013).

Le traitement par PPC améliorerait ces troubles mnésiques (Dalmases et al., 2015).

II. Troubles cognitifs observés dans d'autres situations de stress hypoxique

A) *Troubles cognitifs observés dans un contexte pathologique : cas de la BPCO*

Les patients ayant une BPCO sont également soumis à une hypoxie. Cette dernière prend un aspect différent de celle observée chez un patient apnéique. En effet, dans le cadre de la BPCO, l'hypoxie est plus prolongée. Les patients atteints d'une BPCO présentent des déficits cognitifs semblables à ceux retrouvés chez les patients apnéiques (Andreou et al., 2014). Il a ainsi été possible d'observer, dans la BPCO, des troubles de la mémoire, de l'apprentissage ou encore de l'attention/de la concentration (Hynninen et al., 2005; Klein et al., 2010). Il a également été observé des performances moindres au MMSE chez les patients souffrant d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Incalzi et al., 1993; Li et al., 2013).

Ces troubles cognitifs semblent être liés à l'hypoxémie et à l'hypercapnie retrouvées dans la BPCO, et il a été estimé que 27% des patients présentant une hypoxémie modérée et 61% des patients présentant une hypoxémie sévère présentaient des troubles cognitifs (Grant et al., 1987). Il faut toutefois noter que des troubles cognitifs ont également pu être observés chez des sujets ne présentant pas d'hypoxémie (Liesker et al., 2004).

B) *Troubles cognitifs observés en altitude*

De nombreuses études ont été réalisées sur des sujets se rendant en haute montagne ou exposés à un stress hypoxique dans le cadre d'une acclimatation en vue d'une ascension, et ont permis de mettre en évidence des troubles cognitifs (atteinte de la mémoire à court terme, difficultés de concentration, troubles de la compréhension, etc.) chez ces sujets (Hornbein, 2001).

Ainsi, certaines études se sont intéressées aux conséquences d'un stress hypoxique soutenu sur les fonctions cognitives, dans le cadre de simulations d'ascensions du mont Everest pendant 40 jours (Kennedy et al., 1989) ou 31 jours (Abraini et al., 1998). D'autres études ont évalué un stress hypoxique aigu (ascension rapide à 4500 mètres d'altitude en une journée) chez des sujets non acclimatés (Regard et al., 1991). D'autres sujets ont participé à des études évaluant leurs fonctions cognitives avant et après l'ascension du mont Everest ou d'un autre sommet dépassant les 6400 mètres d'altitude (Hornbein et al., 1989; Nelson et al., 1990). L'ensemble de ces études a mis en évidence des atteintes cognitives suite à l'exposition à un stress hypoxique.

Une étude a mis en évidence la persistance de ces troubles cognitifs chez des sujets ayant été exposés plusieurs fois à des altitudes extrêmes (Regard et al., 1989).

En revanche, l'étude d'une exposition courte (5 jours) à un protocole d'hypoxies intermittentes sévères, dans le cadre d'une acclimatation, n'a pas permis de mettre en évidence des troubles cognitifs significatifs (Leiffen et al., 1997).

A la lumière de ces différentes études réalisées chez l'homme, dans un contexte pathologique ou non, il semble bien apparaître un lien entre l'exposition à un stress hypoxique (aigu, intermittent ou chronique) et la survenue de troubles cognitifs d'expression variable.

Chapitre V : Syndrome d'apnées du sommeil et maladie d'Alzheimer

Préambule :

Les troubles du sommeil sont fréquents dans les pathologies neurodégénératives.

En ce qui concerne la maladie d'Alzheimer, des altérations du rythme veille-sommeil sont connues depuis plusieurs années (Loewenstein et al., 1982; Vitiello et al., 1990). Les patients présentent un sommeil agité, de nombreux réveils et des déambulations nocturnes associés à un état de somnolence et de ralentissement diurne (Onen and Onen, 2003; van Someren et al., 1996; Witting et al., 1990). Ces perturbations du rythme veille-sommeil sont corrélées avec la sévérité des troubles cognitifs. Concernant l'architecture de leur sommeil, les patients atteints de la MA présentent une réduction de la durée du sommeil lent profond et du sommeil paradoxal accompagnée d'un allongement de la durée du sommeil léger (stades 1 et 2) (Loewenstein et al., 1982; Vitiello and Prinz, 1989). Au plan biologique, ces altérations du rythme veille-sommeil sont associées à une perte neuronale dans le noyau suprachiasmatique (Stopa et al., 1999). Des perturbations de la sécrétion rythmique (Mishima et al., 1999; Uchida et al., 1996), ainsi qu'une diminution globale des quantités de mélatonine sécrétées (Liu et al., 1999) ont également été observées dans la MA (Lin et al., 2013). De même, une perte de la rythmicité circadienne de clairance des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ dans le LCR (Bateman et al., 2007; Huang et al., 2012) a été rapportée chez les patients atteints de la MA (Potter et al., 2013). Enfin, une baisse des taux d'hypocrétine (orexine) dans le cerveau des patients a également été observée (Friedman et al., 2007; Fronczek et al., 2012).

Néanmoins, dans le cadre de ce travail de thèse, nous ne détaillerons ici qu'un seul trouble du sommeil retrouvé dans la MA : le syndrome d'apnées du sommeil.

I. Etudes cliniques

A) Apnées du sommeil chez les patients atteints de la MA

Les patients atteints de la MA présentent une prévalence plus élevée des troubles respiratoires du sommeil (en particulier du SAS) que les sujets non déments du même âge (Reynolds et al., 1985). La prévalence du SAS chez les patients atteints de la MA se situerait aux alentours de 40% (Hoch et al., 1986; Reynolds et al., 1985), voire 50% à 70% chez les patients institutionnalisés (Ancoli-Israel et al., 1991; Onen and Onen, 2010; Rongve et al., 2010).

Chez ces patients, la sévérité du SAS (estimée par l'index apnées hypopnées) serait corrélée à celle de leur atteinte cognitive (Hoch et al., 1986; Janssens et al., 2000; Reynolds et al., 1985). Il semblerait également que les patients atteints de la MA présentent des troubles respiratoires du sommeil plus sévères que des sujets âgés non déments (Bombois et al., 2010).

L'ensemble de ces observations a conduit à étudier le sommeil, la somnolence diurne excessive et l'évolution des troubles cognitifs chez les patients atteints de la MA et traités par PPC dans le cadre de leur SAS. Il a ainsi été montré chez ces patients une amélioration rapide (dès le premier jour de traitement) de l'architecture de leur sommeil (Cooke et al., 2009a). De même que chez les patients non déments, une réduction significative de la somnolence diurne excessive a pu être observée chez les patients atteints de la MA (Chong et al., 2006).

Enfin, sur le plan cognitif, les patients déments ont présenté une amélioration cognitive rapide (Ancoli-Israel et al., 2008) ainsi qu'un ralentissement de leur déclin cognitif à plus long terme sous PPC (Cooke et al., 2009b; Troussière et al., 2014).

Toutes ces études mettent en évidence l'intérêt d'un traitement par PPC chez les patients apnéiques, y compris ceux atteints de la MA, afin de retarder au maximum l'apparition du déclin cognitif ou de ralentir son évolution lorsqu'il est déjà installé.

B) *Maladie d'Alzheimer et syndrome d'apnées du sommeil : similitudes sur le plan biologique*

Lorsque l'on s'intéresse plus en détail à la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer et aux conséquences physiopathologiques du SAS, il apparaît que ces deux maladies présentent de nombreuses similitudes (Daulatzai, 2012, 2013, 2015).

(1) Peptide β -amyloïde

Des études récentes se sont intéressées au dosage des peptides amyloïdes dans le sérum et le LCR des patients présentant un SAS.

Dans le LCR, une diminution des taux de peptides $A\beta_{42}$ a été rapportée chez les patients apnéiques (au statut cognitif normal) présentant un génotype APOE4, cette diminution étant négativement corrélée avec l'IAH (Osorio et al., 2014). Une diminution des taux de peptides $A\beta_{42}$ a également été rapportée dans le LCR de patients atteints de la MA (Galasko et al., 1998; Hulstaert et al., 1999; Sunderland T et al., 2003).

Une seconde étude a permis de mettre en évidence des taux significativement plus élevés de peptides $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ et $A\beta$ totaux dans le sérum de patients apnéiques, cette élévation étant corrélée positivement avec l'IAH et négativement avec la SaO_2 moyenne et la SaO_2 minimale, suggérant ainsi un rôle majeur de l'hypoxémie nocturne dans ces observations (Bu et al., 2015). Dans la MA, une élévation des taux plasmatiques d' $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ semble être associée au génotype APOE4 (facteur de risque de la MA) (Blennow et al., 2009). Une élévation des taux plasmatiques de peptides $A\beta_{42}$ a également été montrée comme étant associée à une survenue précoce de la MA chez des patients atteints de syndrome de Down (Schupf et al., 2007).

Toutefois, une étude récente réalisée post-mortem chez des patients ayant présenté un SAS a montré que la durée de sommeil en situation d'hypoxémie ($SpO_2 < 95\%$), corrélée à l'IAH, ainsi que la durée du sommeil à ondes lentes n'étaient pas associées au développement des plaques séniles dans le cerveau des patients (Gelber et al., 2015).

(2) Protéine Tau

En parallèle de l'étude des biomarqueurs de la pathologie amyloïde dans le LCR et le sérum de patients souffrant d'un syndrome d'apnées du sommeil, les mêmes auteurs se sont intéressés au dosage de la protéine Tau, biomarqueur de la dégénérescence neurofibrillaire observée dans le cerveau des patients atteints de la MA.

Ainsi, Osorio et ses collaborateurs (Osorio et al., 2014) ont mis en évidence, chez les patients apnéiques, une élévation des taux de protéines Tau totales et phosphorylées positivement corrélée avec l'IAH chez les patients présentant un génotype APOE3. En revanche, aucune variation n'a été observée pour les génotypes APOE2 et APOE4. Dans la MA, une élévation des taux de protéines Tau dans le LCR a déjà été décrite à plusieurs reprises et ne semble pas être dépendante du génotype APOE (Galasko et al., 1998; Hulstaert et al., 1999; Sunderland et al., 2003).

L'équipe de Bu et ses collaborateurs (Bu et al., 2015) s'est quant à elle intéressée aux taux sériques de protéines Tau totales et phosphorylées chez des patients atteints du SAS. Cette étude a mis en évidence une élévation significative des quantités de protéines Tau phosphorylées (P-Tau 181), mais aucune variation concernant les quantités totales de protéines Tau. Les auteurs ont également montré que l'augmentation des quantités sériques de protéines Tau phosphorylées était corrélée positivement avec celles des peptides $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ et $A\beta$ totaux. Une élévation des protéines Tau plasmatiques a également été rapportée dans la MA (Zetterberg et al., 2013).

Enfin, de même que pour la pathologie amyloïde, l'étude de Gelber et collaborateurs (Gelber et al., 2015) n'a pas rapporté d'association entre le développement de la DNF et la durée de sommeil sous hypoxémie ni la durée de sommeil à ondes lentes lors de l'autopsie du cerveau de patients apnéiques.

(3) Génotype APOE4

Le génotype APOE4, vraisemblablement associé aux variations de peptides β -amyloïdes retrouvées chez les patients apnéiques (Osorio et al., 2014) pourrait être un facteur de risque commun à la MA et au SAS. Il est en effet connu depuis de nombreuses années pour être un facteur de risque de la MA (Michaelson, 2014; Strittmatter et al., 1993). Plus récemment, des études réalisées sur des cohortes de sujets sains ont suggéré que le génotype APOE4 pourrait également être un facteur de risque du SAS (Gottlieb et al., 2004; Kadotani et al., 2001), bien que cette observation soit controversée (Thakre et al., 2009).

(4) Stress oxydant

En raison de l'existence de l'hypoxémie intermittente retrouvée dans le SAS, de nombreuses études se sont intéressées au stress oxydant chez ces patients (Asker et al., 2015; Lavie, 2003; Lavie et al., 2004; Lee et al., 2012). Ainsi, il a par exemple pu être observé, dans le sérum de patients présentant un SAS sévère, une réduction significative de l'activité de deux enzymes antioxydantes : la catalase et la glutathion peroxydase (Asker et al., 2015). Cette baisse d'activité était corrélée à l'IAH et associée à une élévation significative des taux de malondialdéhyde, produit notamment par l'action des espèces réactives de l'oxygène sur les acides gras insaturés (peroxydation lipidique) (Asker et al., 2015). D'autres études se sont intéressées à des marqueurs de stress oxydant différents et ont mis en évidence des résultats semblables (baisse d'activité du système antioxydant, augmentation des produits issus du stress oxydant et des espèces oxygénées réactives), ainsi qu'une réduction du stress oxydant sous PPC (Barceló et al., 2000; Del Ben et al., 2012; Christou et al., 2003; Katsoulis et al., 2011; Pilkauskaitė et al., 2013).

De la même façon, plusieurs études ont rapporté l'existence d'un stress oxydant dans les maladies neurodégénératives, dont la MA (Dasuri et al., 2013; Markesbery et al., 2005; Uttara et al., 2009). Chez ces patients, la dysfonction mitochondriale pourrait être à l'origine de la production des espèces oxygénées réactives (Adam-Vizi, 2005; Chaturvedi and Flint Beal, 2013; Friedland-Leuner et al., 2014), bien qu'une autre théorie concernant l'origine du stress oxydant dans la MA ait été formulée. Selon cette dernière, les peptides β -amyloïdes pourraient être à l'origine du stress oxydant retrouvé dans la MA (Butterfield and Sultana, 2011; Yatin et al., 1999).

(5) Inflammation

Lors d'un stress oxydant, les espèces oxygénées réactives peuvent activer une cascade inflammatoire, résultant en une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (interleukine-6, interleukine-8, tumor necrosis factor α) et de la protéine C réactive, comme cela a été rapporté chez des patients atteints du SAS (Güven et al., 2011; de Lima et al., 2015; Lui et al., 2009; Ohga et al., 2003; Yokoe et al., 2003). L'étude du traitement par PPC sur la protéine C réactive dans le SAS a montré une diminution significative de ce marqueur inflammatoire après 3 mois de traitement (Guo et al., 2012).

Des observations similaires ont également été rapportées dans la MA (Alsadany et al., 2013; Alvarez et al., 2009; Dursun et al., 2015; Yasojima et al., 2000).

(6) Hypertension artérielle et hypoperfusion cérébrale

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypertension artérielle est une comorbidité commune au SAS et à la MA. De manière plus générale, il a été montré que les facteurs de risques cardiovasculaires de la MA (dont l'HTA) pouvaient être à l'origine d'une atteinte vasculaire et d'une hypoperfusion cérébrales (Torre et al., 2012) potentiellement médiées par le SAS (Buratti et al., 2014).

En effet, des études récentes ont mis en évidence une hypoperfusion cérébrale chez des patients présentant un SAS modéré à sévère (Baril et al., 2015; Innes et al., 2015). Ces études suggèrent que l'hypoperfusion précéderait la perte de substance grise précédemment décrite dans le SAS.

Une hypoperfusion cérébrale a également été observée dans la MA (Mazza et al., 2011), ainsi que chez les patients présentant une déficience cognitive sévère et ceux à fort risque de développer une MA, suggérant là encore qu'elle constituerait un phénomène précurseur du développement de la pathologie (Austin et al., 2011).

L'ensemble de ces observations cliniques semble indiquer que le SAS et la MA sont associés, et qu'ils présentent de nombreuses perturbations communes sur le plan biologique. Ces données viennent conforter l'hypothèse selon laquelle le SAS pourrait constituer un facteur de risque direct ou indirect de la MA.

II. Etudes expérimentales

Préambule :

Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques associés au SAS et à la MA, de nombreux travaux de recherche ont été réalisés in vitro et in vivo.

Dans le cadre du SAS, plusieurs études ont évalué les conséquences du stress hypoxique intermittent sur le système cardiovasculaire et au plan métabolique, permettant aujourd'hui une bonne modélisation des observations retrouvées en clinique humaine (Chopra et al., 2015; Dematteis et al., 2009; Drager et al., 2015; Levy et al., 2012).

Toutefois, le sujet de cette thèse concernant les conséquences centrales du SAS et leur potentielle association à la MA, cette section abordera uniquement les études réalisées sur le sommeil, la cognition, et les atteintes cérébrales observées dans des modèles d'hypoxies intermittentes ou d'hypoxies répétées chez des animaux adultes. Ainsi, les études in vivo dans lesquelles les animaux ont été exposés à un stress hypoxique aigu, un stress hypoxique chronique ou un stress hypoxique néonatal ne seront pas abordées dans ce chapitre.

A) Etudes du sommeil des animaux

A l'heure actuelle, en dépit des études ayant mis en évidence l'existence de troubles du sommeil dans la MA (Loewenstein et al., 1982; Vitiello et al., 1990), et de façon plus globale, de l'association entre des troubles du sommeil et l'existence de troubles cognitifs en clinique humaine (Fulda and Schulz, 2001; Yaffe et al., 2014), peu d'études se sont intéressées à l'étude du sommeil des animaux, en particulier celui d'animaux transgéniques, modèles de la MA.

Deux études du sommeil ont toutefois été réalisées dans le modèle Tg2576 (Wisor et al., 2005; Zhang et al., 2005). Ce modèle surexprime un gène de l'APP (APP695) en raison d'une double

mutation Swedish: K670N, et M671L (Hsiao et al., 1995). Il a été montré dans ce modèle une réduction du sommeil REM (pour *rapid eye movements*, sommeil paradoxal chez l'homme) à l'âge de 6 et 12 mois, mais pas à 2 mois (Zhang et al., 2005). Un allongement de la période circadienne a également été rapporté à tous les âges (Wisor et al., 2005). Enfin, il a été suggéré que l'atteinte cholinergique observée dans le cerveau des animaux pouvait être à l'origine de ces troubles du sommeil (Zhang et al., 2005).

Une troisième étude a été réalisée sur le modèle triple transgénique 3xTg (Sterniczuk et al., 2010). Ce modèle surexprime 3 gènes mutés retrouvés dans les formes familiales de MA : mutation Swedish de l'APP, mutation M146V de la PS1 et mutation P301L de Tau (Oddo et al., 2003). Les auteurs de ces travaux ont montré l'existence de perturbations de l'activité circadienne des animaux, avec un allongement d'activité dans la phase inactive et une réduction d'activité dans la phase active. Ces observations ont été associées à une perte cellulaire au niveau des noyaux suprachiasmatiques chez les animaux (Sterniczuk et al., 2010).

Ces trois études viennent conforter les observations des troubles du sommeil des patients atteints de la MA, lesquels présentent effectivement une atteinte cholinergique cérébrale et une perte cellulaire dans le noyau supra-chiasmatique.

B) *Evaluations comportementales in vivo : effets de l'hypoxie et de la fragmentation du sommeil sur la mémoire des animaux*

A la suite de l'observation des troubles cognitifs chez les patients apnéiques et leur attribution à l'hypoxémie nocturne et à la fragmentation du sommeil, de nombreuses études se sont intéressées à la mémoire des animaux dans ces conditions.

(1) Protocoles d'hypoxies

(a) Animaux WT

(i) *Exposition à un stress hypoxique intermittent*

Concernant l'étude du stress hypoxique intermittent, une équipe de recherche en particulier a réalisé un grand nombre d'études sur l'apprentissage et la mémorisation de rats et de souris dans ces conditions ; il s'agit de l'équipe du Pr. David Gozal, à Chicago.

En 2003 et 2004, une première série de travaux a été réalisée sur des rats Sprague-Dawley adultes (Goldbart et al., 2003; Li et al., 2003; Row et al., 2003) et des souris de type sauvage (adultes également) (Li et al., 2004). Les animaux ont été exposés à un protocole d'hypoxies intermittentes (FiO₂ variant de 21% à 10% par cycles de 90 secondes, 12 heures par jour pendant 7 jours), et leurs capacités d'apprentissage ont été évaluées par le test de la piscine de Morris (Morris, 1984). Dans ce test, les animaux doivent apprendre à localiser une plateforme immergée dans une piscine dont l'eau a été opacifiée (rendant la plateforme invisible). Pour cela, la piscine est entourée de repères visuels, permettant ainsi aux animaux de s'orienter dans l'espace afin de retrouver de plus en plus rapidement la plateforme

immergée pendant toute la phase d'apprentissage. Comparativement aux animaux contrôles, tous les animaux soumis au protocole d'hypoxies intermittentes (rats et souris) ont présenté significativement plus de difficultés à apprendre à localiser la plateforme, témoignant d'une atteinte de leurs facultés d'apprentissage (Li et al., 2004; Row et al., 2003).

Ces résultats ont été confirmés par la suite dans une nouvelle série d'expériences sur les rats adultes Sprague-Dawley exposés à ce protocole d'hypoxies intermittentes pendant 3 (Goldbart et al., 2003), 7 (Row et al., 2007) ou 14 jours (Goldbart et al., 2003; Li et al., 2003, 2011) ; ainsi que sur des souris WT (C57Bl6) exposées à ce protocole d'hypoxies intermittentes pendant 14 (Dayyat et al., 2012; Ignacak et al., 2009; Nair et al., 2011a) ou 30 jours (Ignacak et al., 2009).

D'autres équipes de recherche se sont également intéressées aux conséquences d'un stress hypoxique intermittent sur la mémoire des animaux, confirmant les résultats précédents. En effet, dans une étude réalisée sur des rats Fischer/Brown Norway adultes exposés à un protocole d'hypoxies intermittentes proche de celui décrit précédemment (FiO_2 variant de 19% à 6% par cycles de 2 minutes, 10 heures par jour) pendant 3 jours, une altération de l'apprentissage des animaux dans le test de la piscine de Morris a pu être observée (Ward et al., 2009), comme décrit précédemment (Goldbart et al., 2003). De même, deux autres études, réalisée sur des souris adultes WT (C57Bl/6) exposées à un stress hypoxique intermittent (FiO_2 variant de 21% à 6% par cycles de 90 secondes, 8 à 12 heures par jour suivant l'étude) pendant 14 ou 21 jours ont montré des résultats identiques (Deng et al., 2015; Shan et al., 2007). Enfin, une étude récente, réalisée sur des souris ICR adultes, exposées à 4 semaines d'un protocole d'hypoxies intermittentes (FiO_2 variant de 19-21% à 6-8% par cycles de 60 secondes, 8 heures par jour) a également mis en évidence une atteinte cognitive (difficultés d'apprentissage et altération de la mémoire spatiale) dans le test de la piscine de Morris à l'issue des 4 semaines de protocole (Wang et al., 2015).

Si de nombreuses études ont montré un déficit d'apprentissage dans le test de la piscine de Morris après une exposition à des protocoles d'hypoxies intermittentes appliqués pendant 3 à 30 jours, il apparaît toutefois que l'évaluation mnésique réalisée chez les animaux après une exposition de seulement 24 heures au stress hypoxique intermittent ne diffère pas de celle des animaux des groupes contrôles (Ward et al., 2009). Ces observations suggèrent la nécessité d'une répétition du stress hypoxique intermittent pendant plusieurs jours pour observer un effet sur la mémoire des animaux.

(ii) Exposition à un stress hypoxique répété

Si les protocoles de stress hypoxiques répétés ne reflètent pas réellement l'intermittence des troubles hypoxémiques retrouvés dans le SAS, en raison de la durée importante de la période d'hypoxémie et de sa non-intermittence sur un nyctémère, plusieurs équipes les utilisent néanmoins dans le cadre de l'étude des conséquences du SAS.

Nous pouvons citer ici une première étude visant à évaluer l'effet d'un protocole d'hypoxies répétées sur la cognition dans un modèle de rats adultes Sprague-Dawley (Zhang et al.,

2014a). Les animaux ont été exposés à une FiO_2 égale à 10%, 6 heures par jour, 6 jours par semaine, pendant 1, 2, 4 ou 8 semaines. Les auteurs de cette étude ont montré des résultats similaires à ceux observés sous hypoxie intermittente, à savoir une altération de l'apprentissage et de la mémorisation dans le test de la piscine de Morris (Zhang et al., 2014a).

Une seconde étude a quant à elle évalué la mémoire de souris adultes (souris ICR) ayant été exposées à un protocole d'hypoxies répétées (Zhang et al., 2006). Dans cette étude, les animaux ont été exposés quotidiennement à 4 heures d'hypoxie (FiO_2 égale à 16% ou 10,8% selon les groupes d'animaux) pendant 2 à 25 jours. Dans cette étude, aucune perturbation de l'apprentissage n'a été observée dans le test de la piscine de Morris, quelles que soient les conditions d'hypoxie et la durée du protocole (Zhang et al., 2006). En revanche, les auteurs de cette étude ont rapporté une atteinte cognitive chez les animaux exposés au stress hypoxique répété dans le test « Two-Way Shuttle Box ». Ce test consiste à placer l'animal dans une boîte composée de 2 compartiments de taille identique. Dans un premier temps, l'animal est placé dans l'un des deux compartiments, un stimulus sonore ou lumineux est déclenché, et est rapidement suivi d'un choc électrique (transmis à l'animal au niveau du sol du compartiment dans lequel il se trouve). L'animal va alors se déplacer dans le second compartiment, mettant ainsi fin au choc électrique. Plusieurs sessions (stimulus sonore ou lumineux suivi rapidement d'un choc électrique) sont ainsi réalisées (le stimulus et le choc électrique se déclenchant alternativement entre les deux compartiments), et l'expérimentateur évalue la capacité de l'animal à éviter le choc électrique en se rendant dans le second compartiment dès qu'il perçoit le stimulus sonore ou lumineux. Dans l'étude de Zhang et collaborateurs, les animaux exposés aux deux protocoles d'hypoxies répétées (FiO_2 égale à 16% ou 10,8%) pendant 10 et 25 jours ont présenté un nombre d'évitements du choc électrique significativement plus faible que celui des animaux non hypoxiés.

(b) Animaux transgéniques modèles de la MA

Concernant les effets d'un stress hypoxique sur la cognition dans un modèle murin transgénique de la MA, une étude réalisée en 2006 a évalué l'effet d'un protocole d'hypoxies répétées (FiO_2 égale à 8%, 16 heures par jour, pendant 1 mois chez la souris APP23 (Sun et al., 2006). Ce modèle surexprime un gène de l'APP (APP751) porteur d'une double mutation Swedish (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Dans ce modèle, les auteurs ont mis en évidence une aggravation du déficit mnésique chez les souris APP23 hypoxiées comparativement aux animaux transgéniques non hypoxiés, dans le test de la piscine de Morris (Sun et al., 2006).

Une seconde étude a été réalisée dans le modèle APP/PS1 (Gao et al., 2013). Ce modèle surexprime deux gènes mutés codant pour l'APP (mutation Swedish) et la PS1 (mutation A246E) (Borchelt et al., 1997). Dans cette étude, les animaux, âgés de 6 mois, ont été exposés à un stress hypoxique quotidien pendant 60 jours. Le protocole d'hypoxie en lui-même a consisté à enfermer les animaux dans un compartiment hermétique de 125mL et à les en retirer dès l'apparition des premiers signes de halètement. Les auteurs ont rapporté une aggravation de l'atteinte cognitive dans le test de la piscine de Morris (difficultés

d'apprentissage associées à une altération de la mémoire spatiale) chez les animaux transgéniques soumis au protocole d'hypoxies répétées.

(2) Fragmentation du sommeil

En parallèle des études évaluant les conséquences d'un stress hypoxique sur la mémoire des animaux, d'autres études se sont intéressées aux conséquences d'une fragmentation du sommeil *in vivo*.

Une première étude a été réalisée sur des rats adultes Fischer/Brown Norway (Ward et al., 2009). Les animaux ont été placés dans des cages soumises à des séries de mouvements brusques d'une durée de 30 secondes suivies de phases d'immobilité pendant 90 secondes. Ce cycle (permettant d'induire 30 réveils chez les animaux toutes les heures) a été répété continuellement pendant 24 heures. Les auteurs de cette étude ont montré que lorsque la fragmentation du sommeil avait lieu avant la phase d'apprentissage du test de la piscine de Morris, leurs capacités d'apprentissage n'étaient pas altérées, comparativement aux animaux contrôles. De même, lorsque les animaux étaient de nouveau placés dans la piscine après 24 heures de rétention afin d'évaluer leur mémorisation de l'emplacement de la plateforme (appris la veille), la fragmentation du sommeil n'altérait pas la mémoire des animaux. En revanche, lorsque la fragmentation du sommeil avait lieu après la phase d'apprentissage (donc au cours des 24 heures séparant la phase d'apprentissage de la phase de test), les animaux ayant été soumis au protocole de fragmentation du sommeil présentaient un déficit mnésique significatif (alors que leur apprentissage de la veille était correct, ils avaient donc appris à localiser la plateforme immergée). Ces résultats indiquent que la fragmentation du sommeil altérerait davantage la consolidation mnésique plutôt que l'apprentissage des animaux.

Une seconde étude de fragmentation du sommeil a été réalisée chez des souris WT adultes (C57Bl/6) (Nair et al., 2011b). Dans cette étude, les animaux ont été exposés à un protocole de fragmentation du sommeil pendant 14 jours consécutifs, à l'issue desquels les capacités cognitives des animaux ont été évaluées par le test de la piscine de Morris. Les auteurs ont mis en évidence que ce protocole de fragmentation du sommeil entraînait une altération des capacités d'apprentissage et de mémorisation chez les animaux (Nair et al., 2011b).

Enfin, une troisième étude, réalisée chez des rats Sprague-Dawley adultes soumis à 12 jours de fragmentation du sommeil, a évalué les fonctions cognitives des animaux par le test de Barnes (Sportiche et al., 2010). Ce test est composé d'une plateforme circulaire surélevée bordée de 22 trous (répartis uniformément en périphérie de la plateforme), l'un de ces trous menant à une boîte noire (dissimulée sous la plateforme, donc invisible pour les rongeurs) et dans laquelle l'animal peut trouver refuge. La plateforme est entourée de repères visuels (de la même façon que la piscine de Morris). Ce test permet d'évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale des animaux. Dans cette étude (Sportiche et al., 2010), les auteurs ont observé une stratégie d'apprentissage chez les animaux soumis à la fragmentation du sommeil différente de celle des autres animaux (leur stratégie ne faisant pas appel à l'orientation spatiale), indiquant une perturbation de leur processus d'apprentissage.

L'ensemble de ces études réalisées in vivo démontre la responsabilité du stress hypoxique intermittent et de la fragmentation du sommeil dans la survenue de troubles cognitifs chez les animaux, ce qui conforte la responsabilité de ces deux évènements dans le développement des troubles cognitifs observés chez les patients présentant un SAS. De plus, ces expérimentations réalisées chez l'animal ont permis d'investiguer plus spécifiquement les différentes atteintes cérébrales identifiées comme étant communes à la MA et au SAS.

C) *Etude des différentes atteintes cérébrales communes à la MA et au SAS*

L'objectif de ce paragraphe est de répertorier les différentes observations réalisées dans des modélisations *in vitro* et *in vivo* des conséquences d'un stress hypoxique sur les différentes atteintes cérébrales précédemment identifiées comme étant communes à la maladie d'Alzheimer et au syndrome d'apnées du sommeil.

(1) Effets du stress hypoxique sur la pathologie amyloïde

(a) Etudes réalisées dans des modèles animaux de MA

L'effet d'un protocole d'hypoxies répétées a été évalué dans un premier modèle transgénique de MA : la souris APP23 (Sun et al., 2006). Les animaux, âgés de 8 mois, ont été exposés à une FiO_2 égale à 8%, 16 heures par jour, pendant 1 mois. Les auteurs ont mis en évidence une augmentation des taux de peptides $A\beta$, du nombre et de la taille des plaques séniles dans le cerveau des animaux.

Une seconde étude a été réalisée dans un modèle murin transgénique de la MA, la souris APP/PS1 (Li et al., 2009). Ce modèle surexprime deux gènes mutés codant pour l'APP (mutation Swedish) et la PS1 (mutation A246E) (Borchelt et al., 1997). Les animaux, âgés de 9 mois, ont été exposés à un stress hypoxique quotidien (enfermement dans un compartiment hermétique de 125mL jusqu'à l'apparition des premiers signes de halètement) pendant 60 jours. Les auteurs de cette étude ont mis en évidence une augmentation des quantités de peptides $A\beta_{42}$ et de plaques séniles dans le cerveau des animaux, et ces résultats étaient associés à une potentialisation du clivage de l'APP par les β -sécrétases et un moindre clivage par les γ -sécrétases (Li et al., 2009). Par la suite, le même protocole d'hypoxies a été reproduit sur des souris APP/PS1 âgées de 6 mois (Gao et al., 2013). Les auteurs de ce travail ont à nouveau rapporté une augmentation des quantités de peptides $A\beta$ et de plaques séniles dans le cerveau des animaux (Gao et al., 2013).

Plus récemment, une étude (Shiota et al., 2013) s'est intéressée aux effets d'un protocole d'hypoxies intermittentes (alternance de la FiO_2 de 21% à 5% par cycles de 10 minutes, 8 heures par jour pendant 4 semaines) chez la souris triple transgénique citée précédemment (Oddo et al., 2003) âgée de 6 mois. Les auteurs de ce travail ont observé une augmentation des quantités de peptides $A\beta_{42}$ dans le cerveau des animaux.

Remarque :

Le modèle murin transgénique APP/PS1 précédemment décrit (Borchelt et al., 1997) a également été exposé à un stress hypoxique prénatal (Zhang et al., 2013). Les souris gestantes ont été placées dans des chambres à hypoxie dans lesquelles la FiO₂ était égale à 11,1% (mimant une altitude de 5000 mètres), pendant 6 heures par jour entre le 7^{ème} et le 20^{ème} jour de gestation. Les auteurs de cette étude ont rapporté une augmentation des plaques séniles et de la synthèse de peptides β -amyloïdes dans la descendance à l'âge adulte, associées à une augmentation des taux d'APP et de BACE1 et une diminution des taux de néprilysine (enzyme de dégradation des peptides A β). Bien qu'il ne s'agisse pas ici d'une modélisation qui pourrait correspondre au sujet de cette thèse, il est intéressant de noter qu'un stress hypoxique prénatal peut avoir les mêmes effets sur la pathologie amyloïde à l'âge adulte qu'un stress hypoxique réalisé sur des sujets adultes.

(b) Etude réalisée dans un modèle animal sauvage

A notre connaissance, une seule étude de la pathologie amyloïde a été réalisée chez des animaux non transgéniques. Ces travaux ont été réalisés sur des rats Sprague–Dawley âgés de 2 mois soumis à un protocole d'hypoxies intermittentes (FiO₂ variant de 21% à 5% par cycles de 1 minute, 8 heures par jour). Les auteurs ont montré une augmentation significative des taux de peptides β -amyloïdes dans l'hippocampe des animaux après 3 jours d'exposition à l'hypoxie (Ng et al., 2010). Cette élévation était associée à une augmentation d'expression de BACE1. Toutefois, après 7 jours d'exposition au protocole d'hypoxie, les taux de peptides β -amyloïdes et de BACE1 s'étaient normalisés (Ng et al., 2010).

(c) Etudes réalisées *in vitro*

L'ensemble des observations faites *in vivo* précédemment décrites a été confirmé par des observations *in vitro*.

Ainsi, une augmentation des quantités de peptides A β ₄₂ a été rapportée dans des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y exposées à 8 cycles consécutifs d'hypoxie intermittente (1% d'O₂ pendant 10 minutes suivi par 21% d'O₂ pendant 20 minutes) (Shiota et al., 2013).

Remarque :

Bien qu'il ne s'agisse pas de protocoles d'hypoxies intermittentes ni répétées, nous pouvons citer ici d'autres études réalisées *in vitro* sur les conséquences d'un stress hypoxique sur la pathologie amyloïde.

Une augmentation des quantités de peptides β -amyloïdes a pu être observée dans des cultures primaires d'astrocytes (Smith et al., 2004) et de neurones de rat (Webster et al., 2006) cultivées sous hypoxie (2,5% d'O₂) pendant 24 heures.

De même, une augmentation des quantités de peptides β -amyloïdes associée à une augmentation d'activité enzymatique et d'expression de BACE1 a pu être observée dans des

cellules de neuroblastome murin exprimant l'isoforme humaine APP695 et cultivées en anoxie (1% d'O₂) pendant 2, 4 ou 8 heures (Zhang et al., 2007).

Une réduction des taux d'ADAM10 a également été rapportée dans des cellules SH-SY5Y cultivées sous hypoxie (2,5% d'O₂) pendant 24 heures (Webster et al., 2002).

Enfin, une diminution d'expression de la néprilysine et de son activité ont été observées dans des cultures primaires de neurones corticaux de rat exposées pendant 24 heures à une anoxie (1% d'O₂) (Fisk et al., 2007). Des résultats similaires ont été rapportés dans des cultures primaires de neurones (de cortex ou d'hippocampe) de souris exposées à une anoxie (1% d'O₂) pendant 12, 24 ou 48 heures (Wang et al., 2011).

(2) Effets du stress hypoxique sur la pathologie Tau

(a) Etude réalisée dans un modèle animal transgénique

En parallèle de l'étude de la cognition et de la pathologie amyloïde, l'étude de Gao et collaborateurs précédemment décrite (Gao et al., 2013) s'est intéressée à l'étude de la pathologie Tau dans des souris APP/PS1 âgées de 6 mois exposées à un protocole d'hypoxies quotidien (par enfermement dans une enceinte hermétique jusqu'aux premiers signes de halètement) pendant 60 jours. Les auteurs de cette étude ont rapporté une hyper-phosphorylation de la protéine Tau sur plusieurs épitopes (Thr205, Thr231 et Ser396), sans modification des quantités totales de protéines Tau.

(b) Etudes réalisées dans des modèles animaux sauvages

Une étude visant à évaluer l'effet d'un protocole d'hypoxies répétées sur la pathologie Tau a été réalisée dans un modèle de rats adultes Sprague-Dawley (Zhang et al., 2014a). Les animaux ont été exposés à une FiO₂ égale à 10%, 6 heures par jour, 6 jours par semaine, pendant 1, 2, 4 ou 8 semaines. Les auteurs de cette étude ont rapporté une hyper-phosphorylation de la protéine Tau sur de multiples épitopes (Ser198/199/202, Thr205, Ser262, Ser396, Ser404) dans l'hippocampe des animaux pour toutes les cinétiques d'exposition à l'hypoxie (Zhang et al., 2014a). Dans ce modèle, cette hyper-phosphorylation était associée à une augmentation de la forme active de GSK-3 β et de la forme inactive de PP2A pour toutes les durées du protocole testées. Une diminution de la forme active de PP2A a également été rapportée chez les animaux exposés au protocole d'hypoxies répétées pendant 4 et 8 semaines.

Remarque :

A notre connaissance, l'étude de Zhang et collaborateurs (Zhang et al., 2014a) est la seule à avoir étudié la pathologie Tau chez des animaux soumis à un stress hypoxique répété, et aucune étude utilisant un protocole d'hypoxies intermittentes dans ce but n'a été publiée jusqu'à présent. Toutefois, nous pouvons présenter ici une étude qui a caractérisé les modifications post-traductionnelles de la protéine Tau dans un modèle in vivo soumis à un protocole de stress hypoxique aigu. Dans cette étude, des souris adultes C57Bl/6 ont été exposées à une hypoxie aiguë (FiO₂ égale à 8%, pendant 2 et 4 heures) (Fang et al., 2010). Les auteurs de ces travaux ont observé une hyper-phosphorylation de la protéine Tau sur plusieurs

épitopes (Ser195/198/199/202, Thr205) associée à une augmentation des quantités de la MAP kinase ERK (Fang et al., 2010).

(c) Etude réalisée *in vitro*

La seule étude s'étant intéressée à la protéine Tau sous hypoxie dans des modèles *in vitro* est l'étude de Fang et ses collaborateurs (Fang et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des cultures primaires de neurones d'hippocampes de rat (E17) et des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. Une hyper-phosphorylation de la protéine Tau a été observée sur les épitopes Ser202 et Thr205 dans les cellules SH-SY5Y cultivées sous 1% d'O₂ pendant 12 heures. Enfin, dans les cultures primaires de neurones de rat, les auteurs ont rapporté une hyper-phosphorylation de la protéine Tau sur les épitopes Ser195/198/199/202 et Thr205, après 2, 4 et 8 heures d'exposition à 1% d'O₂.

(3) Effets du stress hypoxique intermittent sur le stress oxydant et l'inflammation au niveau du système nerveux central

L'effet d'un stress hypoxique intermittent sur le stress oxydant au niveau central a été caractérisé par l'équipe du Pr. David Gozal, en parallèle des travaux visant à évaluer la cognition des animaux. Il a ainsi pu être observé, dans le cerveau des animaux exposés à un protocole d'hypoxies intermittentes, une augmentation de la peroxydation lipidique et des concentrations d'isoprostanes (Row et al., 2003); lipides provenant d'un métabolisme radicalaire de l'acide arachidonique (Montuschi et al., 2004).

Une seconde étude a montré que le stress hypoxique intermittent entraînait une augmentation des quantités d'espèces oxygénées réactives au niveau du cortex des animaux associée à une mort neuronale (Xu et al., 2004). Les auteurs de cette étude ont par ailleurs rapporté une augmentation de l'oxydation des protéines, de la peroxydation lipidique et de l'oxydation des acides nucléiques au niveau cortical; ainsi qu'une augmentation des marqueurs de stress oxydatifs NF-κB, c-FOS et c-Jun (Xu et al., 2004).

Une augmentation des quantités de NF-κB a également été rapportée dans l'hippocampe de souris exposées à un protocole d'hypoxies intermittentes, en association à une augmentation des quantités de malondialdéhyde et une diminution des taux de superoxyde dismutase (SOD, une enzyme antioxydante) (Deng et al., 2015). Une élévation significative des taux de NADPH Oxydase (enzyme permettant la synthèse des espèces oxygénées réactives) et de son activité ont également été rapportées sous hypoxie intermittente (dans le cortex et l'hippocampe de souris WT), en association à des quantités élevées de malondialdéhyde (Nair et al., 2011a).

Concernant l'inflammation, il a pu être observé, dans des rats Sprague-Dawley adultes exposés à une hypoxie intermittente (FiO₂ variant de 21% à 10,5% par cycles de 2 minutes, 8 h/jour, pendant 1, 3 ou 14 jours), une augmentation d'expression de plusieurs gènes de l'inflammation dans la microglie corticale: iNOS (inducible-NOS, *Nitric Oxide Synthase*), COX-2 (*Cyclo-Oxygenase 2*), TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-α*), IL-1β (*Interleukine-1β*) et IL-6 (*Interleukine-6*), cette augmentation étant positivement corrélée avec la durée d'exposition des animaux au protocole d'hypoxies intermittentes (à l'exception de TNFα) (Smith et al.,

2013). Une élévation des quantités protéiques de COX-2 et de son expression (Li et al., 2003) ainsi qu'une augmentation d'expression et d'activité de iNOS (Li et al., 2004) ont également été rapportées au niveau cortical sous hypoxie intermittente. Plus récemment, il a été démontré qu'un protocole d'hypoxies intermittentes chez des souris WT adultes (C57BL/6J) pouvait entraîner une activation de la microglie dans l'hippocampe des animaux après 6 à 24 semaines de protocole (Sapin et al., 2015).

A travers ces différentes études, il apparaît que le stress hypoxique pourrait agir sur les différentes composantes cérébrales affectées dans la MA. Si la pathologie amyloïde sous hypoxie et le stress oxydant ont été relativement bien investigués dans ce contexte, nous dénombrons en revanche un faible nombre d'études des conséquences d'un stress hypoxique sur la pathologie Tau, en dépit de la corrélation existant entre la propagation de la DNF dans le cerveau et la survenue des troubles cognitifs.

Devant ce constat, nous avons donc choisi d'évaluer plus en détail les conséquences d'un stress hypoxique (en particulier un stress hypoxique intermittent) sur la cognition et la DNF dans un modèle murin de Tauopathies : le modèle THY-Tau22.

Objectifs de ce travail de thèse

La maladie d'Alzheimer (MA) et le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) partagent, comme nous venons de le voir, de nombreuses similitudes sur le plan biologique, ces similitudes ayant été décrites à la fois chez l'homme et dans des modèles animaux expérimentaux. Une attention particulière a notamment été apportée à l'étude de la pathologie amyloïde et du stress oxydant dans ce contexte.

Il semblerait également que les patients présentant ces deux pathologies voient leur atteinte cognitive s'aggraver plus rapidement mais aussi plus sévèrement que des patients présentant une MA isolée. Si les mécanismes sous-jacents à l'atteinte cognitive retrouvée dans la MA ne sont pas complètement élucidés, les décennies de recherche sur cette maladie neurodégénérative ont néanmoins permis de relier cette atteinte cognitive avec le développement cérébral de la pathologie Tau. De la même façon que pour la MA, les mécanismes sous-jacents à l'atteinte cognitive retrouvée chez les patients présentant un SAS demeurent inconnus. Il semblerait néanmoins qu'ils puissent être dus (au moins pour partie) à l'hypoxémie nocturne retrouvée chez ces patients.

A partir de ces différentes observations, nous avons élaboré une hypothèse de travail selon laquelle l'aggravation des troubles cognitifs observés chez les patients présentant à la fois un SAS et une MA pourrait être causée par une aggravation de la dégénérescence neurofibrillaire (DNF), elle-même étant due à l'hypoxémie nocturne retrouvée chez les patients (Figure 15).

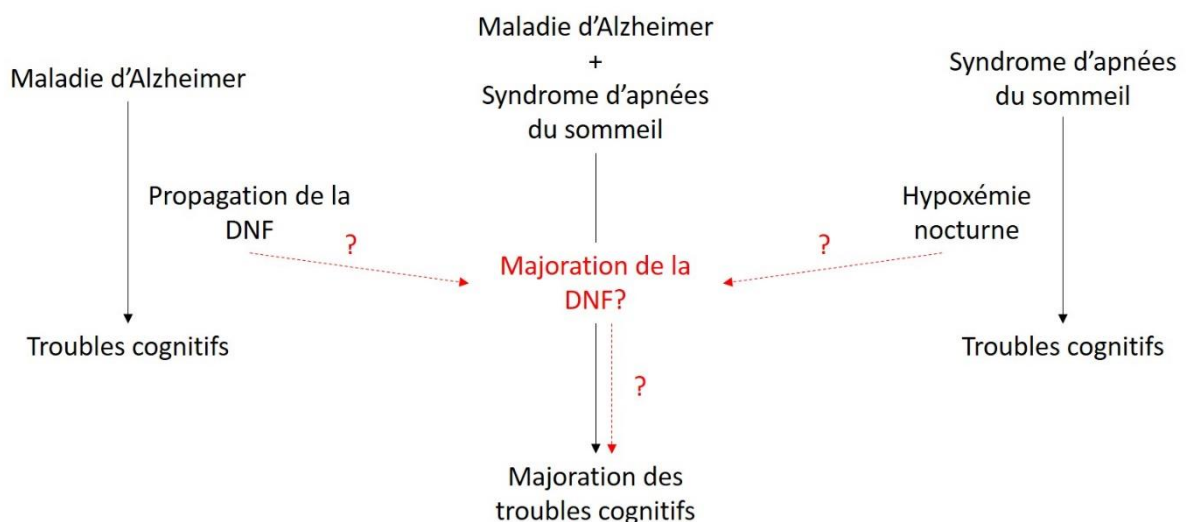


Figure 15 : Représentation schématique de notre hypothèse de travail sur laquelle reposent les études réalisées dans le cadre de cette thèse. DNF : Dégénérescence neurofibrillaire.

A l'heure actuelle, plusieurs modèles animaux permettant l'étude de la pathologie Tau ont été développés par la communauté scientifique. Ces modèles animaux surexpriment une protéine Tau humaine (mutée ou non) et les animaux vont reproduire certaines caractéristiques de la MA telles que l'hyper-phosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau, associées à des troubles comportementaux.

Parmi ces animaux, le laboratoire dans lequel a été effectué la majeure partie de ces travaux de thèse a développé le modèle THY-Tau22 (Schindowski et al., 2006). Ce modèle murin, de fond génétique C57Bl/6, surexprime une protéine Tau humaine de 412 acides aminés (isoforme 1N4R) présentant une double mutation (G272V et P301S) ; ces deux mutations ayant été décrites dans certaines Tauopathies en clinique humaine. Les animaux transgéniques THY-Tau22 développent une pathologie Tau dont la progression spatiotemporelle est corrélée avec l'atteinte comportementale retrouvée dans le modèle. De façon intéressante, l'expression du transgène se limitant au système nerveux central, celui-ci n'est quasiment pas retrouvé au niveau de la moelle épinière. Les animaux THY-Tau22 ne présentent ainsi pas de troubles moteurs (alors que cela est le cas dans d'autres modèles de pathologie Tau), ce qui permet de réaliser facilement différents tests comportementaux chez la souris THY-Tau22. L'objectif de ces travaux de thèse étant d'évaluer la potentielle aggravation de la DNF sous hypoxie et de réaliser une évaluation comportementale chez les animaux exposés à un stress hypoxique, l'utilisation du modèle transgénique THY-Tau22 nous a donc semblé pertinente.

Le développement de la pathologie Tau étant progressif dans le modèle THY-Tau22, nous avons choisi d'évaluer les conséquences d'un stress hypoxique sur la mémoire et la pathologie Tau chez des animaux présentant une pathologie Tau modérée (à l'âge de 4,5 – 5 mois) ainsi que chez des animaux présentant une pathologie Tau à un stade plus avancé (à l'âge de 7,5 – 8 mois).

Dans la littérature, il existe de nombreux protocoles d'exposition à l'hypoxie : hypoxie aiguë, hypoxie répétée, hypoxie intermittente.

Au vu de notre problématique, nous avons choisi d'évaluer les conséquences de deux types de stress hypoxique sur la cognition et la pathologie Tau dans notre modèle murin transgénique THY-Tau22 :

- un stress hypoxique répété (HR), réalisé sur une longue durée expérimentale ($FiO_2 = 8\%$ pendant une heure, deux fois par semaine, sur une durée totale d'exposition de 6 mois), mimant la situation de montagnards se rendant en haute montagne régulièrement et pouvant présenter des troubles cognitifs ;
- un stress hypoxique intermittent (HI), réalisé sur une durée expérimentale beaucoup plus courte (FiO_2 variant de 21% à 5% par cycles de 60 secondes, 8 heures par jour pendant 15 jours), connu comme étant un bon modèle de syndrome d'apnées du sommeil.

Chronologiquement, les expérimentations évaluant l'effet d'un stress hypoxique répété sur la mémoire et la pathologie Tau chez la souris THY-Tau22 ont été réalisées en premier, au cours de ma première année de thèse, à Lille. Au terme de cette première année, lors de l'évaluation annuelle de mes travaux au cours du Comité de Suivi de Thèse (CST), une collaboration a pu être mise en place avec le Professeur Jean-Louis Pépin pour la suite de ce projet, permettant alors la réalisation des expositions de nos animaux transgéniques au protocole d'hypoxies intermittentes (HI) au sein du laboratoire de recherche HP2 (Inserm UMR-S 1042, à Grenoble).

L'objectif principal de ce travail de thèse a consisté en l'étude de la pathologie Tau et de la mémoire des animaux exposés à nos deux protocoles de stress hypoxique (répété ou intermittent). Les objectifs secondaires ont consisté en la caractérisation de la réponse à l'hypoxie de l'organisme, ainsi qu'en l'étude de différents marqueurs de stress oxydant, de neuroinflammation et d'apoptose, décrits dans la littérature comme pouvant être sensibles au stress hypoxique, et retrouvés à la fois dans la maladie d'Alzheimer et dans le syndrome d'apnées du sommeil.

Matériels et méthodes

Chapitre I : Matériels et méthodes communs aux deux expérimentations

I. Animaux

A) Description des lignées murines

Deux lignées murines ont été utilisées au cours de cette thèse : les souris transgéniques THY-Tau22 et leurs contrôles littermates (dénommées WT pour *Wild Type* dans ce manuscrit).

(1) Lignée THY-Tau22

Le modèle transgénique THY-Tau22 a été développé au sein du laboratoire Alzheimer et Tauopathies (INSERM UMR-S1172, ex-INSERM U837), à Lille (Schindowski et al., 2006). Ce modèle est issu d'une lignée murine C57Bl/6. Les animaux surexpriment une isoforme 1N4R (412 aa) de la protéine Tau présentant les mutations G272V et P301S retrouvées dans certaines Tauopathies. L'expression du transgène se fait sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1.2 dont l'expression débute à P6 (6 jours après la naissance), et ne perturbe donc pas le développement embryogénique (Figure 16). Les animaux utilisés sont hétérozygotes.

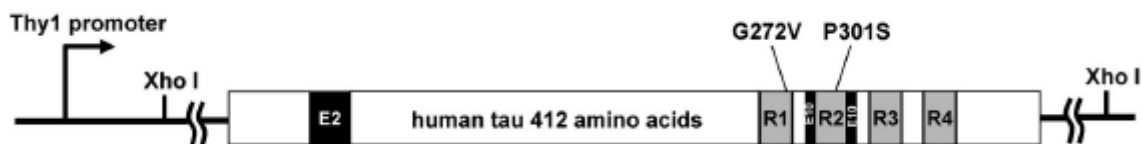


Figure 16 : Construction du transgène de la lignée THY-Tau22 (Schindowski et al., 2006)

La lignée est stable, elle est entretenue par des croisements entre les souris THY-Tau22 et des souris C57Bl/6 provenant de chez Charles River.

Les animaux ne présentent pas de problèmes de fertilité ni de problèmes moteurs. Ce dernier point permet la réalisation de tests comportementaux pour évaluer leurs fonctions cognitives.

Les souris THY-Tau22 vont développer une pathologie Tau qui débute à l'âge de 3 mois dans la CA1 de l'hippocampe, et qui va ensuite s'étendre au gyrus denté et à la CA3 de l'hippocampe, puis à d'autres structures cérébrales : striatum, bulbe olfactif, cortex occipital, amygdale, noyaux ventraux du thalamus, et couches profondes du cortex entorhinal. Cette pathologie Tau est définie par la présence de protéines Tau hyper-phosphorylées (sites de phosphorylation physiologiques), anormalement phosphorylées (sites de phosphorylation pathologiques), et agrégées sous forme de paires de filaments appariés en hélices (PHF). Ces différents états de phosphorylation sont observables et quantifiables par des techniques d'électrophorèse mono-dimensionnelle et d'immunomarquage (immunohistochimie) (Figure 17).

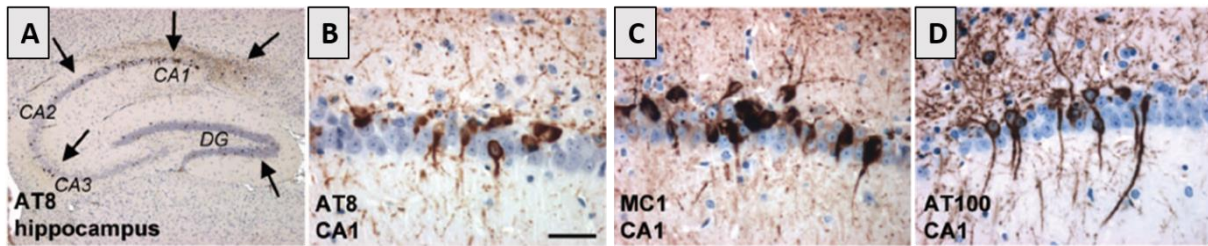


Figure 17 : Immunohistochimies AT8 (protéine Tau hyper-phosphorylée ; A, B), MC1 (protéine Tau à un stade pré-agrégatif ; C) et AT100 (protéine Tau agrégée ; D) dans l'hippocampe (A), et plus spécifiquement dans la CA1 (B à D) chez des souris THY-Tau22 âgées de 12 mois. Modifié d'après Schindowski et al, 2006 (Schindowski et al., 2006).

Une électrophorèse à deux dimensions (2D) permet également une approche qualitative.

Conjointement au développement de la pathologie Tau, les animaux présentent une atteinte mnésique apparaissant à l'âge de 6 mois et s'accroissant avec l'âge (Van der Jeugd et al., 2013; Schindowski et al., 2006).

Ainsi, les tests comportementaux permettent de mettre en évidence à la fois des troubles de l'apprentissage, mais également des troubles de la mémorisation, comme dans le cas du test de la piscine de Morris (*Morris Water Maze*) (**Figure 18**).

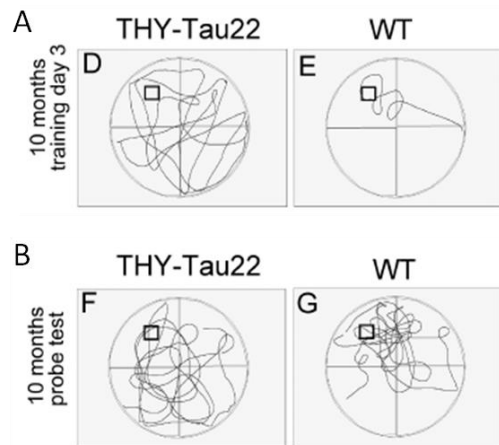


Figure 18 : Résultats du test de la piscine de Morris chez les souris THY-Tau22 âgées de 10 mois. A : phase d'apprentissage. B : phase de test (évalue la mémorisation) (Schindowski et al., 2006).

(2) Souris littermates

Les souris littermates sont les animaux issus des croisements entre une souris hétérozygote THY-Tau22 et une souris sauvage C57Bl/6 n'ayant pas hérité du transgène. Ces animaux sont ainsi ceux qui se rapprochent le plus, au niveau du fond génétique, du modèle transgénique THY-Tau22. De plus, l'utilisation de ces animaux comme souris contrôles permet de comparer l'effet de nos protocoles expérimentaux sur deux lignées murines en tout point comparables au regard de leur environnement (conditions d'élevage, alimentation, etc...), ce qui serait impossible avec des animaux sauvages du commerce.

B) Description des animaux utilisés

Tous les animaux utilisés dans le cadre de ces travaux de recherche étaient des femelles. En effet, lors de mon arrivée au laboratoire, les animaux transgéniques mâles générés au sein de l'animalerie étaient déjà utilisés dans le cadre d'autres travaux de recherche. Dans un souci de cohérence nous avons donc par la suite choisi de poursuivre ces travaux de thèse sur des animaux femelles, afin de pouvoir comparer entre eux nos différents résultats.

L'âge des animaux au début des expérimentations était compris entre 4,5 et 8 mois, et entre 5,5 et 13 mois au moment du sacrifice (voir chapitres « protocoles d'hypoxies utilisés »).

Les animaux ont été hébergés dans les conditions conventionnelles, c'est-à-dire dans des cages standards, avec un accès à volonté à l'eau et à la nourriture, des cycles jour/nuit d'une durée de 12h et une température de la pièce d'hébergement maintenue à 22°C.

L'ensemble des expérimentations a été approuvé par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale du Nord Pas-de-Calais (numéro d'approbation 342012, obtenu en décembre 2012).

II. Test de reconnaissance d'objets

Le test de reconnaissance d'objets a été utilisé dans le cadre des expérimentations réalisées à Lille et de celles réalisées à Grenoble. Toutefois, quelques modifications ont dû être apportées au protocole pour nous permettre de réaliser l'évaluation comportementale chez nos animaux exposés au protocole d'hypoxies intermittentes. Cette section décrit donc le matériel et le protocole utilisés à Lille, et les modifications apportées pour les expériences réalisées à Grenoble y sont précisées.

A) Matériel utilisé

Le test de reconnaissance d'objets s'est déroulé dans une arène carrée, aux dimensions de 49 cm x 49 cm pour une hauteur de 25 cm. Les parois de l'arène étaient opaques.

Remarque :

Dans le cadre des expérimentations réalisées à Grenoble, le test de reconnaissance d'objets s'est déroulé dans une arène rectangulaire, aux dimensions de 39 cm x 28,5 cm pour une hauteur de 35,5 cm et dont les parois étaient opaques.

Trois types d'objets ont été utilisés au cours de ce test (Figure 19) :

- Des erlenmeyers en verre de 50 mL (diamètre du fond : 5 cm ; diamètre du col : 3 cm ; hauteur : 9 cm)
- Des flacons pour prélèvement urinaire, composés d'un corps transparent et d'un couvercle vissé rouge (diamètre de la base du pot : 3 cm ; diamètre du couvercle : 3,5 cm ; hauteur : 7 cm)
- Des balles de golf (diamètre 4 cm)

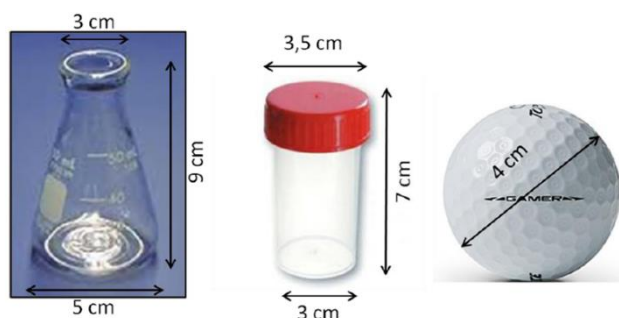


Figure 19: Objets utilisés pour le test de reconnaissance d'objets.

Lors du test, deux objets ont été placés au centre de l'arène, à équidistance des parois et du second objet.

B) *Phase d'habituation préalable*

Dans un premier temps, afin de minimiser le stress des animaux le jour du test, une phase d'habituation sur une période de 2 jours a été réalisée.

Le premier jour, les animaux ont été placés pendant 10 minutes dans l'arène vide, afin de s'habituer à ce nouvel environnement ; puis ils ont été replacés dans leur cage d'expérimentation.

Le lendemain, une habituation à l'exploration d'objets a été réalisée. Pour cela, les animaux ont été à nouveau placés dans l'arène dans laquelle avaient été placés 2 erlenmeyers identiques. Les animaux ont été laissés libres d'explorer ces deux objets pendant 10 minutes avant d'être replacés dans leur cage d'expérimentation.

Remarque :

Lors de la phase d'habituation réalisée à Grenoble, la durée d'exploration de l'arène et des objets a été ramenée à 5 minutes.

C) *Phase de test*

La réalisation du test a eu lieu 24 heures après la fin de la phase d'habituation. Comme pour le test du labyrinthe en Y, le test de reconnaissance d'objets s'est déroulé en 2 temps.

Remarque :

La phase de test réalisée à Grenoble a eu lieu 72 heures après la fin de la phase d'habituation.

Dans un premier temps (phase d'acquisition), les animaux ont été placés dans l'arène en présence de 2 objets identiques (soit 2 balles de golf, soit 2 flacons pour prélèvement urinaire) pour une durée de 15 minutes. Un temps d'exploration des 2 objets inférieur à 20 secondes a été défini comme critère d'exclusion dans les analyses des résultats. Au terme de la phase d'acquisition, les animaux ont été replacés dans leur cage d'expérimentation pour une durée de 1 heure.

Remarque :

La durée de la phase d'acquisition a été ramenée à 5 minutes pour les expérimentations réalisées à Grenoble. De ce fait, la durée minimale d'exploration des 2 objets a été fixée à 5 secondes. A l'issue de la phase d'acquisition, les animaux ont été replacés dans leur cage d'expérimentation pour une durée de 15 minutes.

Dans un second temps (phase de test) les animaux ont de nouveau été placés dans l'arène, en présence d'un flacon pour prélèvement urinaire et d'une balle de golf, l'emplacement des objets au centre de l'arène n'ayant pas été modifié par rapport à la phase précédente. En fonction des objets utilisés au cours de la phase d'acquisition, l'un de ces objets (balle de golf

ou flacon pour prélèvement urinaire) a constitué un « nouvel objet », par rapport au second objet (« objet familier ») qui lui était associé et que l'animal avait déjà eu la possibilité d'explorer. Une alternance de la position du nouvel objet par rapport à l'objet familier (droite ou gauche) a été réalisée. Les animaux ont été laissés libres d'explorer les deux objets présentés pendant 5 minutes.

Remarque :

La durée de la phase de test a été ramenée à 3 minutes pour les expérimentations réalisées à Grenoble.

L'ordre de passage des animaux, le choix de la paire d'objets présentés lors de la phase d'acquisition ainsi que la position du nouvel objet lors de la phase de test (à droite ou à gauche de l'objet familier) ont été randomisés.

Entre chaque passage d'animal dans l'arène, celle-ci ainsi que les objets utilisés par l'animal précédent ont été nettoyés avec de l'alcool à 60° modifié, afin d'éliminer tous les indices olfactifs.

Les paramètres d'exploration de chaque objet (nombre de contacts avec les objets, durée d'exploration, etc.) ont été calculés par le logiciel de tracking EthoVision® XT (Noldus).

Les données obtenues ont permis de calculer l'index de reconnaissance (IR) pour chaque animal.

$IR = \frac{\text{Temps passé à explorer le nouvel objet}}{(\text{Temps passé à explorer le nouvel objet} + \text{Temps passé à explorer l'objet familier})}$.

Remarque sur l'adaptation du protocole pour les expérimentations réalisées à Grenoble :

Les durées pendant lesquelles les animaux ont pu explorer l'arène et les objets lors de la phase habituation, ainsi que celles appliquées lors des phases d'acquisition et de test ont été raccourcies, comparativement au protocole utilisé à Lille. En effet, alors qu'à Lille nous disposions de 12 heures de phase de « jour » pour réaliser nos tests comportementaux (la mémoire des animaux n'étant pas évaluée le même jour que la réalisation d'un stress hypoxique), à Grenoble nous avons dû adapter le protocole à la contrainte horaire de la fin du protocole d'hypoxies intermittentes (survenant à 14 heures).

III. Mise à mort

A l'issue des protocoles d'hypoxie, les animaux vigiles ont été mis à mort par décapitation. En effet, sachant qu'une anesthésie générale pouvait potentialiser l'hyper-phosphorylation de la protéine Tau via l'hypothermie qu'elle induit (Planel et al., 2007), une anesthésie des animaux avant leur mise à mort aurait constitué un biais lors de notre étude biochimique de la protéine Tau.

Le sang des animaux au moment de la décapitation a été récupéré dans des tubes Capiject® additionnés en EDTA (*Terumo*®), le cerveau des animaux a quant à lui été extrait de la boîte crânienne, et les 2 hémisphères cérébraux ont été séparés. Le premier hémisphère a été destiné aux analyses immunohistologiques et le second aux analyses biochimiques et aux études transcriptomiques.

Des précisions concernant le moment de la mise à mort par rapport aux protocoles d'hypoxie sont données dans les sections individuelles de méthodes.

IV. Préparation du plasma

Suite à la décapitation, le sang récupéré a été centrifugé (4000 rpm, 4°C, 10 min), et le plasma obtenu a été immédiatement stocké à -20°C jusqu'à son utilisation.

V. Prélèvement des différentes structures cérébrales

A l'issue de la mise à mort, un hémisphère cérébral de chaque animal a été immédiatement disséqué sur glace afin de récupérer l'hippocampe et le cortex. Les structures disséquées ont été immédiatement congelées en tubes eppendorfs à -80°C, afin de pouvoir être ensuite utilisées pour les analyses biochimiques et transcriptomiques.

VI. Analyses biochimiques

A) *Extraction protéique pour analyse SDS-PAGE*

Tout le protocole d'extraction protéique a été effectué à la température de 4°C.

Les hippocampes et cortex destinés aux analyses biochimiques ont été repris dans 200µL d'une solution Tris/Sucrose additionnée d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases commercial (Tris 10mM, Sucrose 320mM, inhibiteurs de protéases Complete EDTA-free® (*Roche*) : 1 pastille QSP 10 mL de solution Tris/Sucrose, pH 7,4). Les échantillons ont ensuite été soniqués 40 coups à 40 kHz, homogénéisés pendant 1 heure, puis centrifugés (12000 rpm, 10 min). Les surnageants, contenant les extraits protéiques totaux ont alors été prélevés et congelés à -20°C.

B) *Dosage protéique*

Les extraits protéiques totaux ont été dosés grâce à un kit de dosage BCA (*Pierce*) suivant les recommandations du fabricant. La concentration protéique totale des échantillons a été déterminée par comparaison avec une gamme de BSA (sérum albumine bovine).

C) *Préparation des échantillons de dépôt*

Afin de déposer une quantité constante de protéines dans les puits des gels d'acrylamide, des échantillons de dépôt à la concentration constante ont été préparés. Les surnageants contenant les extraits protéiques totaux ont ainsi été mélangés avec des volumes adéquats de tampon de dépôt (composé de LDS4X, *Invitrogen*™ et d'agent réducteur 10X, *Invitrogen*™) afin d'obtenir une concentration protéique finale de 1 µg/µL dans les échantillons de dépôt.

Ces derniers ont été chauffés pendant 10 minutes à 100°C afin de permettre la dénaturation des protéines avant leur dépôt sur gel.

D) *Electrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE*

Afin de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire, des électrophorèses monodimensionnelles SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) ont été réalisées. Pour chaque échantillon, une quantité de 10 µg de protéines (10 µL d'échantillon de dépôt) a été déposée en gel d'acrylamide pré-coulé (gradient 4-12%, système NuPage®, *Invitrogen™*). La migration des protéines s'est déroulée à un voltage constant de 200V pendant une heure dans une solution de tampon de migration MOPS (*Invitrogen™*).

Des marqueurs de poids moléculaires ont également été déposés (Novex®, *Invitrogen™*).

E) *Western Blot (transfert des protéines)*

Les protéines contenues dans les gels d'acrylamide ont ensuite été transférées sur des membranes de nitrocellulose 0,45 µm Hybond®-ECL (*GE Healthcare Amersham™*), à un voltage constant de 30V pendant 75 min dans un tampon de transfert (Glycine 192mM, Tris 25mM, Ethanol 20%).

L'efficacité du transfert a été vérifiée par coloration des protéines au Rouge Ponceau (acide trichloroacétique 3%, rouge ponceau 0,2%) pendant quelques minutes.

F) *Révélation des protéines*

Après lavage au TNT (Tris 15mM pH 8, NaCl 140mM, Tween20 0,5%), les membranes ont été incubées pendant 30 min à température ambiante dans une solution de saturation (lait écrémé 5%, TNT ou BSA 5%, TNT) afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques.

Les membranes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire d'intérêt ([Tableau 2](#)) pendant une nuit à 4°C.

A l'issue de l'incubation avec les différents anticorps primaires, les membranes ont été lavées au TNT (trois fois 10 min), puis incubées avec un anticorps secondaire anti-immunoglobulines totales de souris ou de lapin couplé à une peroxydase (*Vector Laboratories*) pendant 45 min à température ambiante.

Après une dernière série de 3 lavages au TNT, la révélation a été réalisée grâce à l'utilisation du kit de détection ECL® (*GE Healthcare Amersham™*).

Enfin, la détection du signal a été effectuée grâce à l'appareil LAS-3000 (*Fujifilm*).

Anticorps	Epitopes	Espèce	Fournisseur	Dilution WB
12E8	pSer262/pS356	Souris	Peter Seubert	1/5000
AT100	pThr212/pSer214	Souris	Pierce	1/1000
AT180	pThr231	Souris	Pierce	1/500
AT8	pSer202/pThr205	Souris	Thermo Scientific	1/500
B-actine	Extrémité NH2 terminale	Souris	Sigma	1/10000
M19G (Tau-Nter)	19 premiers acides aminés de l'extrémité NH2 terminale de Tau	Lapin	Produit par l'UMR-S1172	1/10000
pS396	pSer396	Lapin	Invitrogen	1/10000
pS404	pSer404	Lapin	Invitrogen	1/10000
Tau-1	Ser195/Ser198/Ser199/Ser202 non phosphorylées	Souris	Millipore	1/10000
Tau-Cter	15 derniers acides aminés de l'extrémité COOH terminale de Tau	Lapin	Produit par l'UMR-S1172	1/10000

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différents anticorps primaires utilisés au cours des études biochimiques. WB : Western Blot.

G) *Quantifications*

Les signaux obtenus ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ® (*Scion*), et les résultats ont été normalisés sur la β -actine.

VII. Dosages ELISA

Les différents dosages ELISA réalisés dans le cadre de ce travail de thèse ont été effectués suivant les protocoles fournis par les fabricants (Mouse VEGF Quantikine® ELISA, *R&D Systems*® ; Mouse Erythropoietin Quantikine® ELISA, *R&D Systems*® ; INNOTEST® hTau Ag, *Innogenetics*®).

Ces dosages ont été effectués sur les échantillons plasmatiques issus des différentes cinétiques expérimentales.

Toutes les étapes ont été réalisées à température ambiante.

Brièvement, les plasmas ont été placés dans des puits dans lesquels étaient fixés les antigènes (anti-VEGF murin, anti-EPO murine ou anti-Tau humaine) pendant 2 à 12 heures (selon le kit), afin de permettre la fixation des protéines plasmatiques d'intérêt dans les puits. Une gamme étalon et un échantillon « contrôle » (fourni par le fabricant et de concentration connue) ont également été placés dans des puits.

Après une série de rinçages, un anticorps de détection (couplé à une enzyme) a été ajouté pendant 30 minutes à 2 heures (selon le kit) afin de se fixer à la protéine d'intérêt. Après une

nouvelle série de rinçages, une solution contenant le substrat de l'enzyme couplée à l'anticorps de détection a été ajoutée pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. A l'issue de ces 30 minutes, une solution « stop » a été ajoutée, permettant de stopper la réaction enzyme-substrat dans les puits ; et une mesure de la densité optique à 450 nm dans les puits a alors été effectuée. Une droite de régression a été établie à partir des densités optiques mesurées dans les puits de la gamme étalon, permettant par la suite de calculer les concentrations protéiques des échantillons plasmatiques testés. La concentration du puits « contrôle » a également été déterminée par mesure de la densité optique (sa valeur devant être comprise dans les limites indiquées par le fabricant pour valider la réussite du dosage).

VIII. Analyses immunohistologiques

A) *Post-fixation des héli-cerveaux*

A l'issue du sacrifice, l'un des deux hémisphères cérébraux de chaque animal a été placé dans une solution contenant 4% de paraformaldéhyde, et conservé à 4°C pendant une semaine afin de fixer les tissus (post-fixation). Après 7 jours de post-fixation, les hémisphères cérébraux ont été transférés dans une solution de sucrose à 20% pendant 24h, afin de protéger les tissus lors de la congélation. Après 24h, les hémisphères cérébraux ont été immergés pendant 60 secondes dans une solution d'isopentane refroidie entre -40°C et -30°C afin de les congeler rapidement, puis ils ont été immédiatement stockés à -80°C.

B) *Coupe au cryostat*

Les hémisphères cérébraux ont ensuite été coupés en sections sagittales de 40µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat (*Leica*®). Les sections ont été réparties en plusieurs séries et ont été transférées dans une solution de PBS-Azide 0,2% et conservées à 4°C.

C) *Marquages immunohistochimiques sur coupes flottantes*

Après rinçage dans une solution de PBS-Triton 0,2%, les coupes de cerveaux ont été incubées avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ 0,3%) afin d'inhiber les peroxydases endogènes.

Les coupes ont ensuite été rincées puis saturées avec du M.O.M™ (Mouse IgG blocking reagent, *Vector Laboratories*) avant d'être incubées en présence de l'anticorps primaire, toute une nuit à 4°C ([Tableau 3](#)).

Le lendemain, les coupes ont été rincées puis incubées avec un anticorps secondaire (anti-mouse IgG biotinylated, *Vector Laboratories*). *

* *Remarque* : l'anticorps primaire anti-NeuN utilisé dans le cadre de cette thèse étant déjà biotinylé, cette étape n'a pas été nécessaire.

Après un nouveau rinçage, les coupes ont été incubées avec un kit de détection commercial reconnaissant les protéines biotinylées et contenant une peroxydase (kit Vectastain® ABC, *Vector Laboratories*). La révélation a ensuite été effectuée, après un dernier rinçage, par ajout d'un mélange d'une solution commerciale contenant un chromogène (DAB, *Sigma*®) avec du

peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ 30%). Lorsque le marquage colorimétrique des tissus était suffisant, la réaction colorée a été stoppée par rinçage des coupes dans de l'eau.

A l'issue de cette étape de révélation, les coupes ont été placées dans une solution de sérum physiologique (NaCl 0,9%) et conservées à 4°C jusqu'au montage sur lames.

Anticorps	Epitopes	Espèce	Fournisseur	Dilution IHC
AT100	pThr212/pSer214	Souris	Pierce	1/400
AT8	pSer202/pThr205	Souris	Thermo Scientific	1/400
MC1	Anticorps conformationnel [#]	Souris	Peter Davies	1/1000
NeuN biotinylé	^{##}	Souris	Abcam	1/1000
VEGF	Partie NH2-terminale de la protéine	Chèvre	Santa Cruz	1/500

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents anticorps primaires utilisés au cours des études immunohistochimiques. IHC : Immunohistochimie. [#]L'anticorps conformationnel MC1 reconnaît le repliement des acides aminés 7 à 9 sur les acides aminés 326 à 330 de la protéine Tau humaine. ^{##}L'anticorps anti NeuN (Neuronal Nuclei) marque les noyaux des neurones.

D) *Montage des lames*

Les coupes sagittales de tissu cérébral ont été montées sur des lames gélatinées à l'aide d'un pinceau. Après séchage des coupes à l'air ambiant, les tissus ont été déshydratés par immersion successive des lames dans des bains d'éthanol de concentration croissante (30%, 70%, 95%, 100%). Suite à la déshydratation, les lames ont été immergées dans du toluène, et les lamelles ont été montées sur les lames avec le milieu de montage VectaMount™ Permanent (*Vector Laboratories*).

E) *Quantifications*

Toutes les quantifications ont été réalisées à l'aveugle.

Les lames ont été observées et photographiées avec un microscope couplé à une caméra (DM2000, *Leica*).

Les images ont ensuite été importées dans le logiciel ImageJ® (*Scion*) et converties en images en noir et blanc. Le seuil de détection du marquage immunohistochimique a été déterminé manuellement et toutes les quantifications ont ensuite été effectuées avec le même seuil de détection. Les zones d'intérêt (hippocampe et cortex) ont été délimitées manuellement (à l'aide d'un atlas du cerveau de souris en coupe sagittale) et le nombre de pixels dans ces zones a été quantifié par le logiciel ImageJ®. Le nombre obtenu reflétait l'intensité du marquage immunohistochimique dans la zone définie.

IX. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6® (*GraphPad Software Inc.*).

Les données biologiques obtenues pour les différents groupes d'animaux ont été comparées entre elles par le test de Mann et Whitney.

Les pesées des animaux ont été comparées aux différents temps pour un même groupe par un test Wilcoxon.

La comparaison des résultats des dosages ELISA de plusieurs échantillons plasmatiques provenant d'un même groupe d'animaux à des temps différents a été effectuée par le test Wilcoxon.

Pour le Y maze, le temps passé dans chaque bras a été comparé par le test Mann et Whitney.

Pour le test de reconnaissance d'objets, les temps d'exploration de chaque objet à l'intérieur d'un même groupe ont été comparés par un test de Mann et Whitney.

Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Chapitre II : Matériel et méthodes spécifiques au protocole d'hypoxies répétées (Lille)

I. Dispositif à hypoxies

Les hypoxies ont été réalisées en chambres à hypoxie OxyCycler® A420C (BioSpherix®) (Figure 20).

Ces dispositifs sont reliés à un moniteur contrôlant l'injection de N₂ et O₂ à l'intérieur des enceintes dans lesquelles sont placés les animaux, en fonction de la FiO₂ enregistrée en temps réel grâce à un capteur placé à l'intérieur de chaque enceinte. Le moniteur est lui-même relié à un ordinateur disposant d'un programme dans lequel l'expérimentateur définit les conditions expérimentales qu'il souhaite appliquer.



Figure 20 : Photographie des chambres à hypoxie utilisées à Lille (modèle OxyCycler® A420C, BioSpherix®).

Deux chambres à hypoxie ont été utilisées en parallèle. Les animaux hypoxiés ont été placés dans l'enceinte de la première chambre (programmée pour appliquer le protocole d'hypoxies prédéfini par l'utilisateur) ; les animaux témoins ont été placés dans l'enceinte de la seconde chambre (programmée quant à elle pour maintenir une condition de normoxie, soit 21% d'O₂). Les animaux témoins ont donc été placés dans les mêmes conditions environnementales que ceux exposés au protocole d'hypoxies répétées.

II. Protocole d'hypoxies répétées

Le protocole d'hypoxies répétées que nous avons utilisé a consisté en la répétition, 2 fois par semaine pendant 6 semaines, d'une hypoxie avec une FiO₂ égale à 8% (Figure 21) pendant une durée de 1 heure.

Les expositions à l'hypoxie (ou à la normoxie) ont été réalisées pendant la phase de « jour » de la pièce de stabulation (entre 7h00 et 19h00).

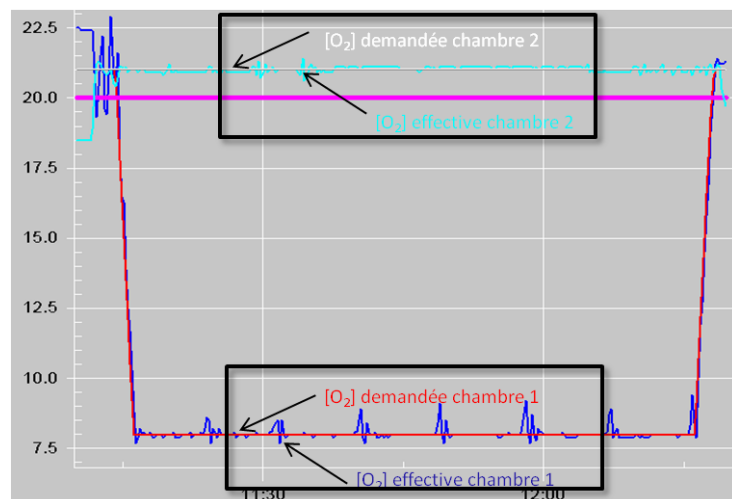


Figure 21 : Conditions d'application du stress hypoxique dans les cinétiques d'hypoxies répétées. La chambre 1 est la chambre dans laquelle ont été réalisées les hypoxies, la chambre 2 a été utilisée pour les groupes contrôles (normoxie).

A l'issue des 6 premières semaines d'exposition, le protocole a été suspendu pendant 14 jours avant d'être de nouveau appliqué pendant plusieurs semaines, puis de nouveau interrompu, etc. (Figure 22).

Au total, les animaux ont été exposés à ce stress hypoxique répété pendant une durée totale de 6 mois.

Deux cinétiques d'expérimentation ont été réalisées, la première sur des animaux âgés de 4,5 mois (âge au moment de la mise à mort : 10,5 mois), la seconde sur des animaux âgés de 7,5 mois (âge au moment de la mise à mort : 13,5 mois).

Pour chaque cinétique, 4 groupes d'animaux ont été utilisés :

- Animaux WT exposés à la normoxie : WT-No,
- Animaux WT exposés aux hypoxies répétées WT-HR,
- Animaux THY-Tau22 exposés à la normoxie : THY-Tau22-No,
- Animaux THY-Tau22 exposés aux hypoxies répétées : THY-Tau22-HR.

III. Tests comportementaux

L'atteinte mnésique des animaux soumis au protocole d'hypoxies répétées a été évaluée par deux tests comportementaux : le labyrinthe en Y (test de mémoire spatiale hippocampique à court terme) et le test de reconnaissance d'objets (test de mémoire de travail). Ces tests ont été réalisés peu après (3 ou 4 jours) et à distance (14 ou 17 jours) de la dernière hypoxie.

Cinétique 1

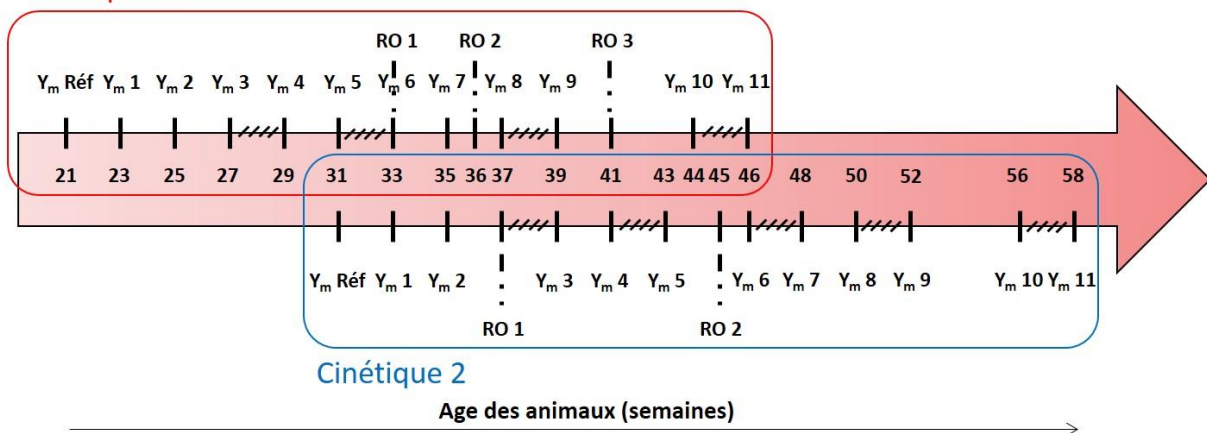


Figure 22 : Représentation des différents tests comportementaux réalisés au cours des deux cinétiques, en fonction de l'âge des animaux. Les parties hachurées correspondent aux périodes de 2 semaines d'interruption du protocole. Y_m : Y maze, RO : reconnaissance d'objets.

A) *Y maze*

(1) Matériel utilisé

Comme son nom l'indique, le labyrinthe utilisé dans ce test à la forme d'un Y (**Figure 23**).

Les 3 bras sont constitués de cloisons opaques, et les dimensions de chaque bras sont les suivantes : longueur 28 cm ; largeur 6,2 cm ; hauteur 15 cm. Une porte amovible (également opaque) permet la fermeture de l'un des 3 bras lors de la phase d'acquisition.



Afin de tester la mémoire spatiale des souris, plusieurs repères visuels sont placés sur les murs de la pièce dans laquelle se trouve le labyrinthe.

Figure 23 : Labyrinthe en Y (Y maze). Source : recherche Google Images.

Le fond du dispositif est recouvert de litière (identique à celle des cages d'hébergement des animaux), et celle-ci a été mélangée entre chaque passage des animaux, afin d'éliminer les indices olfactifs.

(2) Protocole de test utilisé

Ce test se déroule en 2 phases.

Au cours de la première phase (phase d'acquisition), les animaux ont été placés dans le labyrinthe (au niveau du bras de « départ », face à la cloison de l'extrémité du bras) pour une durée de 5 minutes. Au cours de cette phase d'acquisition, les animaux ont eu un accès restreint à seulement 2 des 3 bras du Y (bras de « départ » et bras « autre »), le troisième bras (bras « nouveau ») étant fermé par la porte opaque.

Après 5 minutes d'exploration des 2 bras disponibles, les animaux ont été replacés dans leur cage d'hébergement pour une durée de 2 minutes (période de rétention).

Enfin, à l'issue de la période de rétention, les animaux ont à nouveau été placés dans le labyrinthe (au niveau du bras de « départ », face à la cloison de l'extrémité du bras) pour une durée de 5 minutes (phase de test), avec cette fois un accès aux 3 bras du labyrinthe en Y.

Le temps passé dans chaque bras a été mesuré grâce au logiciel EthoVision® XT (système de tracking visuel des animaux, *Noldus*).

L'ordre de passage des animaux et l'alternance des bras « autre » et « nouveau » ont été randomisés.

Les animaux montrant une nette préférence pour l'un des deux bras (répartition du temps d'exploration supérieure à 30% - 70%) lors de la phase d'acquisition ont été exclus lors de l'analyse des résultats.

B) *Test de reconnaissance d'objets*

Le test de reconnaissance d'objets est décrit dans le Chapitre I : Matériel et Méthodes communs aux deux expérimentations.

IV. Prélèvements sanguins et préparation du plasma

A l'issue de différents tests comportementaux, des prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau de la veine caudale, afin de doser différents marqueurs plasmatiques de réponse au stress hypoxique. Le sang a été prélevé à l'aide d'un tube capillaire additionné en EDTA (Microvette® CB 300 EDTA-K, *Sarstedt*), centrifugé (4000 rpm, 10 minutes, 4°C), et le plasma collecté a été stocké à -20°C jusqu'à son utilisation.

V. Chronologie de la mise à mort des animaux par rapport au stress hypoxique

Les animaux ont été mis à mort quelques heures après avoir effectué leur dernier test comportemental dans le labyrinthe en Y. Pour les deux cinétiques, le dernier Y maze a été effectué 14 jours après la dernière exposition au stress hypoxique, après un nombre total d'hypoxies égal à 33 pour la cinétique réalisée sur les animaux les plus jeunes (âgés de 10,5 mois lors de la mise à mort), et égal à 30 pour la cinétique réalisée sur les animaux les plus âgés (âgés de 13,5 mois lors de la mise à mort).

Chapitre III : Matériel et méthodes spécifiques au protocole d'hypoxies intermittentes (Grenoble)

I. Dispositif à hypoxies intermittentes

Les hypoxies intermittentes ont été réalisées au sein du laboratoire HP2 (Inserm UMR-S 1042), à Grenoble, en collaboration avec le Pr Jean-Louis Pépin et le Dr Claire Arnaud. Les animaux ont été stabulés dans des cages d'expérimentation standards sur un portoir ventilé relié à un automate permettant de contrôler l'atmosphère à l'intérieur des cages. La FiO_2 à l'intérieur des cages a été mesurée à l'aide d'un analyseur de gaz (ML206, ADInstruments).

II. Protocole d'hypoxies intermittentes

Le protocole d'hypoxies intermittentes utilisé a consisté en des cycles de 60 secondes de FiO_2 oscillant entre 21% et 5%, 8 heures par jour (entre 6h et 14h) pendant 15 jours (Figure 24).

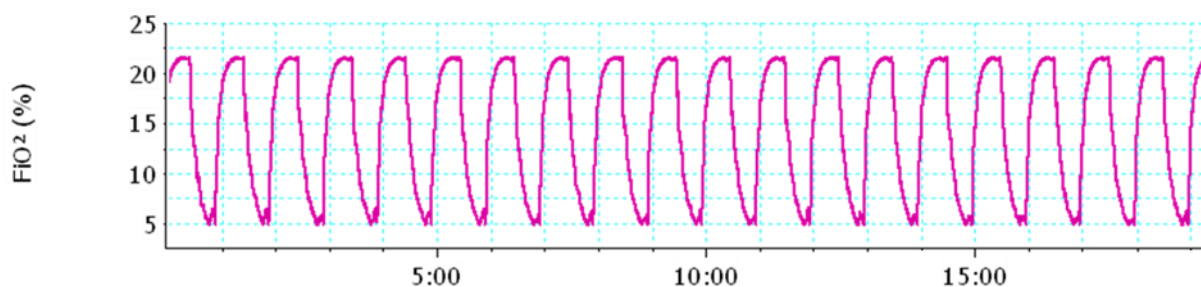


Figure 24 : Conditions d'application du stress hypoxique intermittent.

Comme pour le protocole d'hypoxies répétées, deux cinétiques expérimentales ont été réalisées ; la première sur des animaux âgés de 5 mois (âge au moment de la mise à mort : 5,5 mois), la seconde sur des animaux âgés de 8 mois (âge au moment de la mise à mort : 8,5 mois).

III. Enregistrements de SaO_2 , FiO_2 et fréquence cardiaque

La SaO_2 et la fréquence cardiaque (FC) en fonction de la FiO_2 ont été enregistrées chez quelques animaux pendant la période d'exposition à l'hypoxie intermittente, à l'aide du système MouseOx® (Starr Life Sciences). Les enregistrements ont été réalisés sur animaux vigiles, préalablement dépilés en région cervicale antérolatérale en raison de leur pelage noir qui bloquait la transmission du signal lumineux. Le clip (Collar Sensor, Starr Life Sciences), placé au niveau du cou de l'animal (Figure 25), était relié à un moniteur permettant de collecter les données en

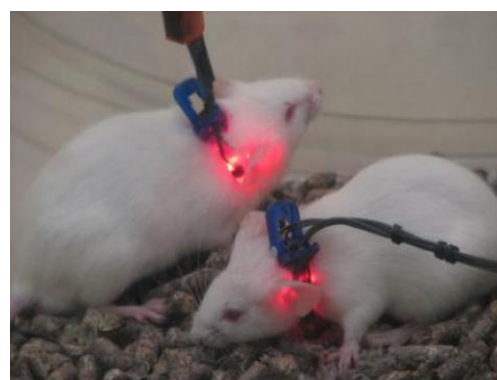


Figure 25 : Clip Collar Sensor, image Starr Life Sciences.

temps réel. Les analyses des différents paramètres enregistrés (valeurs maximales/minimales/moyennes de la SaO₂, FC, etc.) ont été réalisées grâce au logiciel Starr-link™ (Starr Life Sciences).

Remarque :

Pour les besoins de l'expérimentation, les animaux qui ont été utilisés pour ces enregistrements ont été placés dans des cages individuelles, afin d'empêcher leurs congénères de leur retirer le clip cervical. A la fin des enregistrements, les animaux ont été replacés dans leur cage d'hébergement, en présence de leurs congénères.

IV. Mesure du poids des animaux

Les animaux ont été pesés la veille du début du protocole d'hypoxies intermittentes afin d'établir un poids de référence. Par la suite, plusieurs mesures ont été effectuées, toujours après 14h, lorsque la phase d'exposition quotidienne aux hypoxies intermittentes était terminée et que l'ensemble des animaux se trouvait de nouveau en condition de normoxie.

V. Chronologie de la mise à mort des animaux par rapport au stress hypoxique

Les mises à mort des animaux ont été réalisées dans la matinée (avant 14 heures), c'est-à-dire pendant la phase d'exposition au protocole d'hypoxies intermittentes. Les mises à mort ont été réalisées dans une pièce adjacente à l'animalerie dans laquelle se trouvait le dispositif d'hypoxies intermittentes. Les cages ont été retirées du dispositif une par une, et tous les animaux d'une même cage ont été mis à mort consécutivement. Les cages d'expérimentation contenant environ 10 animaux par cage, nous avons estimé que la première souris de chaque cage avait été mise à mort environ 10 minutes après le retrait de la cage du dispositif à hypoxies, contre environ une heure pour la dernière souris de chaque cage.

VI. Extraction protéique et fractionnement soluble/insoluble

Tout le protocole d'extraction protéique a été effectué à la température de 4°C.

Comme pour l'extraction des protéines pour une électrophorèse SDS-PAGE, les hippocampes destinés au fractionnement soluble/insoluble ont été repris dans 200µL d'une solution Tris/Sucrose additionnée d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases commercial (Tris 10mM, Sucrose 320mM, inhibiteurs de protéases Complete EDTA-free® (Roche) : 1 pastille QSP 10 mL de solution Tris/Sucrose, pH 7,4). Les échantillons ont ensuite été soniqués 40 coups à Amplitude 40, puis homogénéisés pendant 1 heure.

Les homogénats ont ensuite été dosés (dosage BCA) afin d'ajuster la concentration des différents échantillons à 2 µg/µL. Après ajout d'une solution de Triton 0,23% (Sigma), les échantillons ont été soniqués 20 coups à 40 kHz puis centrifugés (5000 g, 10 min, 4°C) afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant, contenant les extraits protéiques totaux, a

alors été soumis à une ultracentrifugation (100 000g, 1 heure, 4°C). Le surnageant résultant (fraction soluble) a été mis de côté et congelé à -20°C. Le culot restant a été repris dans une solution de Sarkosyl 1% (*Sigma*), soniqué 20 coups à 40 kHz puis une nouvelle ultracentrifugation a été réalisée (100 000g, 1 heure, 4°C). Le surnageant résultant (fraction hypersoluble) a été mis de côté et congelé à -20°C. Le culot restant (fraction insoluble) a également été congelé à -20°C.

La préparation des échantillons de dépôt pour électrophorèse SDS-PAGE a été effectuée selon le protocole suivant. Les surnageants contenant les fractions soluble et hypersoluble ont été dilués au demi dans du LDS2X (*Invitrogen™*) et chauffés à 100°C pendant 10 minutes. Les culots contenant la fraction insoluble ont été repris dans 100µL de LDS2X (*Invitrogen™*), soniqués 20 coups à 40 kHz et chauffés à 100°C pendant 10 minutes.

VII. Analyses transcriptomiques

Les ARN totaux ont été extraits et purifiés à partir des échantillons de cortex et d'hippocampe avec le kit RNeasy® Lipid Tissue (*Qiagen*), selon les instructions fournies par le fabricant. Un dosage des ARN a été réalisé par mesure de l'absorbance à 260 nm grâce à un NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (*Thermo Scientific*).

Une rétro-transcription a ensuite été effectuée à partir de 1µg d'ARN à l'aide d'un kit commercial (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, *ThermoFisher Scientific*).

Les RT-PCR (*Real Time – Polymerase Chain Reaction*) ont ensuite été effectuées en utilisant la technologie SYBR Green (Power SYBR® Green PCR Master Mix, *Applied Biosystems*) sur un appareil ABI Prism® 7900HT (*Applied Biosystems*). Les conditions du thermo-cycleur utilisées ont été les suivantes : 10 min à 95°C, suivies de 45 cycles de PCR à 2 étapes (15 secondes à 95°C puis 25 secondes à 60°C).

Les amorces qui ont été utilisées dans le cadre de ce travail de thèse sont données dans le [tableau 4](#).

Toutes les amplifications ont été réalisées en duplicats ou en triplicats, et l'expression relative des ARNm a été déterminée par la méthode du $\Delta\Delta CT$. Le gène de la cyclophiline A a été utilisé comme gène de référence.

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille de l'amplicon (pb)
CCL3	TGCCCTTGCTGTTCTTCTCT	GTGGAATCTTCCGGCTGTAG	112
CuZnSOD	CAGGACCTCATTTTAATCCTCAC	TGCCCAGGTCTCCAACAT	77
Cyclophilin	AGCATACAGGTCCTGGCATC	TTCACCTTCCCAAAGACCAC	126
HIF1A	TCCCATACAAGGCAGCAGAA	GTGCAGTATTGTAGCCAGGC	230
HO-1	CACAGATGGCGTCACTTCGTC	GTGAGGACCCACTGGAGGAG	129
hTau	GTACGGGTTGGGGGACAGGA	CCCGGTTACTCAGATCCGTC	129
Keap1	CACAGCAGCGTGGAGAGA	CAACATTGGCGCGACTAGA	62
MnSOD	TGGACAAACCTGAGCCCTAA	GACCCAAAGTCACGCTTGATA	76
NCF1	GGACACCTTCATTCGCCATA	CTGCCACTTAACCAGGAACAT	94
NRF2	CATGATGGACTTGGAGTTGC	CCTCCAAAGGATGTCAATCAA	75
mTau (ex2/3)	AGCAGGCATCGGAGACAC	CATTTCTGTCTCTTGTCTTGC	91
TNFalpha	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GAGGCCATTTGGGAACTTCT	116
VEGFA	CCGGTTTAAATCCTGGAGCG	GAGAGGTCTGGTTCCCGAAA	224

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des amorces de RT-PCR utilisées dans cette étude. pb : paires de bases.

Résultats

Partie expérimentale 1 : Etude des effets d'un protocole d'hypoxies répétées sur la cognition et la pathologie Tau chez des souris WT et THY-Tau22 (hypoxies Lille)

I. Introduction / Objectifs

De nombreuses études ont été réalisées sur des sujets se rendant en haute montagne ou exposés à un stress hypoxique dans le cadre d'une acclimatation en vue d'une ascension, et ont permis de mettre en évidence des troubles cognitifs transitoires (atteinte de la mémoire à court terme, difficultés de concentration, troubles de la compréhension, etc.) chez ces sujets.

A l'heure actuelle, les mécanismes physiopathologiques reliant le stress hypoxique à la survenue des troubles cognitifs restent inconnus.

Toutefois, au vu des études récentes associant une pathologie dans laquelle on retrouve un stress hypoxique (le syndrome d'apnées du sommeil) avec une pathologie neurodégénérative bien connue pour ses effets sur la mémoire (la maladie d'Alzheimer), il a été évoqué la possibilité que ces deux pathologies puissent partager des mécanismes physiopathologiques communs.

Dans ce contexte, de nombreuses études se sont intéressées à l'effet d'un stress hypoxique sur la pathologie amyloïde et le stress oxydant. En revanche, très peu d'études ont évalué les conséquences d'un stress hypoxique sur la pathologie Tau, alors que le développement spatio-temporel de celle-ci est corrélé avec les troubles cognitifs en clinique humaine.

Devant ces différentes observations, nous avons émis l'hypothèse que la survenue des troubles mnésiques décrits chez les montagnards pourrait être due à des perturbations de la biologie de la protéine Tau.

Afin de nous permettre d'étudier notre hypothèse de recherche, nous avons exposé des animaux transgéniques THY-Tau22 (modélisant la pathologie Tau) ainsi que leurs contrôles littermates à un protocole d'hypoxies répétées (FiO_2 égale à 8% pendant 1 heure, 2 fois par semaine) pendant 6 mois.

Le premier objectif de ce travail de thèse a consisté en l'étude de la mémoire des animaux exposés au protocole d'hypoxies répétées tout au long des 6 mois d'expérimentation. Dans un second temps, nous avons souhaité caractériser la réponse au stress hypoxique répété de la protéine Tau par des analyses biochimiques. Enfin, la dernière partie de ce travail de thèse a consisté en l'évaluation de la réponse à l'hypoxie tout au long des 6 mois d'expérimentation.

II. Résultats

Dans la première partie expérimentale de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet d'un stress hypoxique répété (FiO_2 imposée de 8% pendant 1 heure, 2 fois par semaine pendant 6 mois) sur différents paramètres (dosage de l'EPO, mémoire des animaux et pathologie Tau).

Deux cinétiques expérimentales ont été réalisées ; sur des animaux âgés de 4,5 mois et 7,5 mois, respectivement. Au cours de ces cinétiques, le protocole d'exposition à l'hypoxie a été interrompu à plusieurs reprises pendant une durée de 2 semaines. Ces interruptions avaient pour objectif de nous permettre de réaliser une évaluation comportementale ainsi que des prélèvements sanguins à une distance plus ou moins longue de la dernière exposition à l'hypoxie, et donc de pouvoir distinguer les éventuelles conséquences du dernier épisode hypoxique de celles de l'exposition chronique (pendant plusieurs mois) au stress hypoxique répété.

Un total de 46 animaux a été utilisé dans le cadre de ces expérimentations ; répartis en 24 animaux âgés de 4,5 mois (WT-No : n = 7 ; WT-HR : n = 7 ; THY-Tau22-No : n = 5 ; THY-Tau22-HR : n = 5) et 22 animaux âgés de 7,5 mois (WT-No : n = 6 ; WT-HR : n = 7 ; THY-Tau22-No : n = 4 ; THY-Tau22-HR : n = 5).

A) *Evaluations comportementales : effets du protocole d'hypoxies répétées sur la mémoire à court terme des animaux*

Au cours de ces expérimentations *in vivo*, deux tests comportementaux ont été réalisés à de nombreuses reprises chez tous nos groupes d'animaux (WT et THY-Tau22, exposés ou non au protocole d'hypoxies répétées), à différents âges tout au long de nos deux cinétiques expérimentales.

Le premier de ces tests est le test du labyrinthe en Y (Y maze). Ce test évalue la mémoire spatiale des animaux à court terme (le délai de rétention entre la phase d'acquisition et la phase de test étant de seulement 2 minutes).

Le second test comportemental utilisé dans le cadre de ces expérimentations est le test de reconnaissance d'objets. Ce test permet une évaluation de la mémoire de travail des animaux.

Au total, 48 tests de labyrinthe en Y et 10 tests de reconnaissance d'objets (RO) ont été réalisés dans le cadre de l'étude comportementale des conséquences d'un stress hypoxique répété sur l'ensemble de nos animaux.

Il apparaît donc impossible de présenter individuellement les résultats de chacun de ces tests comportementaux dans ce manuscrit de thèse. Pour cette raison, les résultats de ces études seront présentés ici sous la forme de quatre tableaux récapitulatifs : 2 tableaux présenteront les résultats des tests de labyrinthe en Y chez les souris WT et THY-Tau22, respectivement ; et 2 autres tableaux présenteront sur le même modèle les résultats des tests de reconnaissance d'objets.

(1) Animaux WT

(a) Test du labyrinthe en Y

Les capacités mnésiques des animaux WT ont été évaluées, tout au long de la cinétique d'expérimentation, par plusieurs tests du labyrinthe en Y. Ces tests comportementaux nous ont permis de réaliser une observation surprenante.

En effet, lorsque nous avons évalué la mémoire des animaux WT de la première cinétique 3 jours après la dernière exposition à l'hypoxie, nous avons observé que les animaux du groupe WT-HR ne présentaient pas d'atteinte mnésique (Figure 26, Tableau 5).

En revanche, lorsque les tests comportementaux étaient effectués 4, 14 ou 17 jours après la dernière exposition à l'hypoxie, ces mêmes animaux présentaient alors une atteinte mnésique dans le test du labyrinthe en Y. Ces observations ont été reproduites chez les animaux de la seconde cinétique, jusqu'à un âge plus avancé (13 mois).

Nous pouvons également souligner que l'atteinte cognitive observée chez les animaux exposés au protocole d'hypoxies répétées semble présenter un caractère réversible, puisqu'elle disparaissait à la reprise des expositions à l'hypoxie, lorsque les tests comportementaux étaient réalisés 3 jours après la dernière exposition.

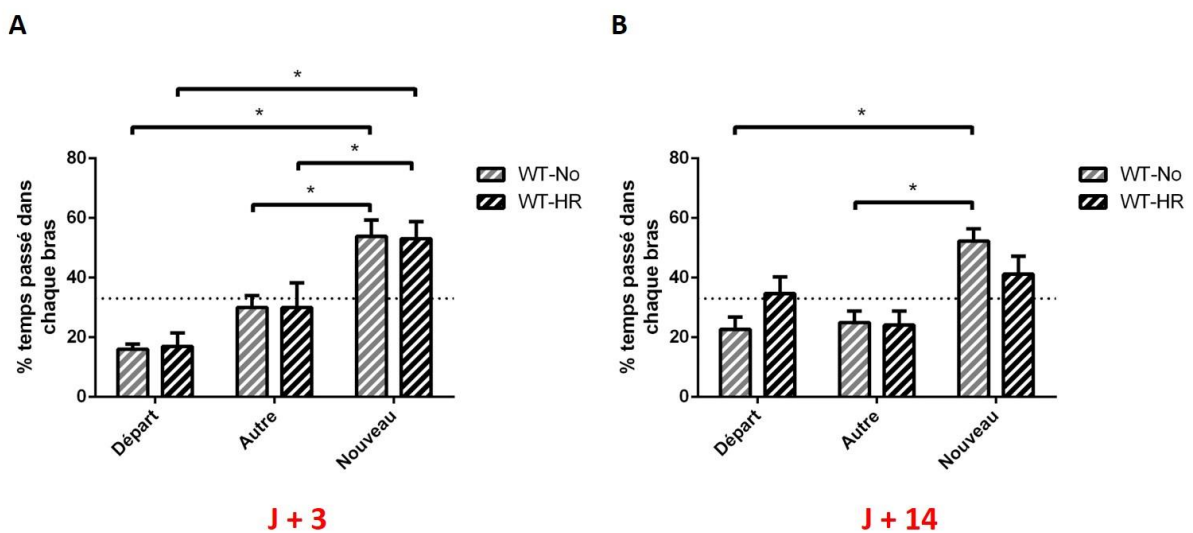


Figure 26 : Exemple de résultats obtenus lors de l'évaluation comportementale par le test du labyrinthe en Y chez les animaux WT de la première cinétique, 3 jours (A) et 14 jours (B) après la dernière exposition à l'hypoxie. La ligne en pointillés indique 33%, pour représenter une exploration identique des 3 bras (bras de départ, bras autre, bras nouveau). * $p < 0,05$, test de Mann et Whitney. WT-No : $n = 7$; WT-HR : $n = 7$. No : Normoxie ; HR : Hypoxies Répétées.

WT	Cinétique 1	Age des animaux (semaines)	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39		44	46						
		Labyrinthe en Y	Réf	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11						
		Nombre total d'hypoxies	0	3	7	11	12	16	17	21	24	24		33	33						
		Moment du test (J+)	-	3	3	3	14	3	14	3	4	17		3	14						
		Apprentissage du groupe No																			
	Apprentissage du groupe HR																				
	WT																				
	Cinétique 2	Age des animaux (semaines)						31	33	35		39	41	43		46	48	50	52	56	58
		Labyrinthe en Y						Réf	1	2		3	4	5		6	7	8	9	10	11
		Nombre total d'hypoxies						0	3	7		12	15	16		22	22	25	25	30	30
Moment du test (J+)							-	4	4		14	4	14		3	17	3	14	3	14	
Apprentissage du groupe No																					
Apprentissage du groupe HR																					




 Apprentissage du groupe
 Pas d'apprentissage du groupe hypoxié
 Pas d'apprentissage du groupe contrôle : test ininterprétable

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats des différents tests de labyrinthe en Y réalisés chez les animaux WT tout au long des deux cinétiques expérimentales. Les cinétiques 1 et 2 correspondent respectivement à celles effectuées chez les animaux âgés de 4,5 mois et 7,5 mois lors des premières expositions au stress hypoxique répété. Cinétique 1 : WT-No : n = 7 ; WT-HR : n = 7. Cinétique 2 : WT-No : n = 6 ; WT-HR : n = 7. Réf : test de référence. No : Normoxie ; HR : Hypoxies Répétées.

(b) Test de reconnaissance d'objets

En complément de la réalisation des tests de labyrinthe en Y, nous avons évalué la mémoire de travail chez nos animaux grâce au test de reconnaissance d'objets (RO). Bien qu'ayant réalisé un nombre moins important d'évaluations avec ce test, nous avons toutefois pu observer des résultats similaires aux précédents, à savoir l'absence de troubles mnésiques 3 jours après la dernière hypoxie, alors que de tels troubles ont pu être observés 13 jours après la dernière hypoxie (Tableau 6).

WT	Cinétique 1	Age des animaux (semaines)	33	36		41	
		RO	1	2		3	
		Nombre total d'hypoxies	17	23		27	
		Moment du test (J+)	13	3		3	
		Apprentissage du groupe No					
	Apprentissage du groupe HR						
	WT						
	Cinétique 2	Age des animaux (semaines)				37	45
		RO				1	2
		Nombre total d'hypoxies				12	21
Moment du test (J+)					3	3	
Apprentissage du groupe No							
Apprentissage du groupe HR							




 Apprentissage du groupe
 Pas d'apprentissage du groupe hypoxié
 Pas d'apprentissage du groupe contrôle : test ininterprétable

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats des différents tests de reconnaissance d'objets réalisés chez les animaux WT au cours des deux cinétiques expérimentales. Les cinétiques 1 et 2 correspondent respectivement à celles effectuées chez les animaux âgés de 4,5 mois et 7,5 mois lors des premières expositions au stress hypoxique répété. Cinétique 1 : WT-No : n = 7 ; WT-HR : n = 7. Cinétique 2 : WT-No : n = 6 ; WT-HR : n = 7. RO : Reconnaissance d'objets. No : Normoxie ; HR : Hypoxies Répétées.

Remarque :

Sur l'ensemble des tests comportementaux que nous avons réalisés chez les animaux WT, environ un tiers des tests effectués n'a pas pu être exploité en raison des difficultés mnésiques présentées par les animaux du groupe témoin (les animaux WT-No).

A la lumière de ces deux tests comportementaux, il apparaît que les animaux exposés à un stress hypoxique répété présenteraient une atteinte de leur mémoire spatiale à court terme et de leur mémoire de travail dès que l'évaluation mnésique serait réalisée plus de 3 jours après la dernière exposition à l'hypoxie. En deçà de ce délai, (ou tout au moins lorsque le test est réalisé 3 jours après le dernier stress hypoxique), la mémoire des animaux serait préservée.

Les résultats des évaluations comportementales réalisées au cours du protocole d'hypoxies répétées chez les souris WT ont fait l'objet d'un article publié dans la revue de Médecine du Sommeil (Alves Pires et al., 2014). Le manuscrit de cette communication est présenté en annexe de cette thèse.

(2) Animaux THY-Tau22

A la différence des résultats des tests comportementaux réalisés chez les souris WT, les résultats obtenus sur les animaux transgéniques THY-Tau22 sont plus difficiles à interpréter.

En effet, d'après notre connaissance du modèle, l'atteinte de la mémoire spatiale à court terme visualisable par le test du labyrinthe en Y survient entre 6 et 9 mois. La mémoire de travail dans ce modèle n'a quant-à-elle pas été évaluée à ce jour, hormis dans le cadre de ce travail de thèse.

(a) Test du labyrinthe en Y

Concernant les résultats de l'évaluation mnésique par le test du labyrinthe en Y chez les animaux de la première cinétique, il semble que l'atteinte mnésique survienne entre la 25^{ème} et la 29^{ème} semaine (soit entre 6 et 7 mois), ces données étant cohérentes avec la littérature (Tableau 7). Il ne semble par ailleurs pas exister de différence majeure sur le plan mnésique entre les animaux exposés à la normoxie et ceux exposés au protocole d'hypoxies répétées.

En revanche, les résultats obtenus chez les animaux THY-Tau22 de la seconde cinétique expérimentale nous indiquent qu'au même âge, alors que les animaux de la première cinétique présentaient déjà une atteinte mnésique, ceux de la seconde cinétique étaient toujours en mesure de reconnaître le bras nouveau lors du test du labyrinthe en Y. Ces facultés mnésiques semblaient d'ailleurs être conservées au moins jusqu'à l'âge de 13 mois chez ces animaux. Or, à cet âge, la quasi-totalité du cerveau est atteinte par la pathologie Tau, et les animaux présentent habituellement une atteinte cognitive sévère.

THY-Tau22	Cinétique 1	Age des animaux (semaines)	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39		44	46								
		Labyrinthe en Y	Réf	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11								
		Nombre total d'hypoxies	0	3	7	11	12	16	17	21	24	24		33	33								
		Moment du test (J+)	-	3	3	3	14	3	14	3	4	17		3	14								
		Apprentissage du groupe No												x									
	Apprentissage du groupe HR																						
	Cinétique 2	Age des animaux (semaines)						31	33	35				39	41	43		46	48	50	52	56	58
		Labyrinthe en Y						Réf	1	2				3	4	5		6	7	8	9	10	11
		Nombre total d'hypoxies						0	3	7				12	15	16		22	22	25	25	30	30
		Moment du test (J+)						-	4	4				14	4	14		3	17	3	14	3	14
Apprentissage du groupe No																							
Apprentissage du groupe HR																							

	Apprentissage du groupe
	Pas d'apprentissage du groupe
x	Résultats non exploitables (nombre d'animaux insuffisant, ...)

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des résultats des différents tests de labyrinthe en Y réalisés chez les animaux transgéniques THY-Tau22 tout au long des deux cinétiques expérimentales. Les cinétiques 1 et 2 correspondent respectivement à celles effectuées chez les animaux âgés de 4,5 mois et 7,5 mois lors des premières expositions au stress hypoxique répété. Cinétique 1 : THY-Tau22-No : n = 5 ; THY-Tau22-HR : n = 5. Cinétique 2 : THY-Tau22-No : n = 4 ; THY-Tau22-HR : n = 5. Réf : test de référence. No : Normoxie ; HR : Hypoxies Répétées.

(b) Test de reconnaissance d'objets

Le test de reconnaissance d'objets n'avait jusqu'à présent jamais été utilisé pour tester la mémoire des souris THY-Tau22. A la différence du Y maze, nous ne savions donc pas à quelle réponse des animaux du groupe contrôle nous attendre en fonction de leur âge, et donc de l'avancement de la pathologie.

Il semblerait néanmoins qu'à l'âge de 33 semaines (7,5 mois), les souris THY-Tau22 du groupe contrôle (THY-Tau22-No) étaient encore capables de reconnaître un nouvel objet (**Tableau 8**). Par la suite, les tests de reconnaissance d'objets réalisés à partir de la 36^{ème} semaine (soit 9 mois) ont permis d'observer une altération mnésique pour l'ensemble des animaux : cinétiques 1 et 2, animaux contrôles (No) ou exposés au protocole d'hypoxies répétées (HR). Nous pouvons supposer que cette atteinte mnésique pourrait être une conséquence du développement de la pathologie Tau à cet âge. En effet, à un âge identique, les souris WT sont tout à fait capables de différencier un nouvel objet d'un objet familier.

THY-Tau22	Cinétique 1	Age des animaux (semaines)	33	36	41	
		RO	1	2	3	
		<i>Nombre total d'hypoxies</i>	17	23	27	
		Moment du test (J+)	12	3	3	
		Apprentissage du groupe No				
		Apprentissage du groupe HR				
THY-Tau22	Cinétique 2	Age des animaux (semaines)			37	45
		RO			1	2
		<i>Nombre total d'hypoxies</i>			12	21
		Moment du test (J+)			3	3
		Apprentissage du groupe No				
		Apprentissage du groupe HR				



Apprentissage du groupe
Pas d'apprentissage du groupe

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des résultats des différents tests de reconnaissance d'objets réalisés chez les animaux transgéniques THY-Tau22 au cours des deux cinétiques expérimentales. Les cinétiques 1 et 2 correspondent respectivement à celles effectuées chez les animaux âgés de 4,5 mois et 7,5 mois lors des premières expositions au stress hypoxique répété. Cinétique 1 : THY-Tau22-No : n = 5 ; THY-Tau22-HR : n = 5. Cinétique 2 : THY-Tau22-No : n = 4 ; THY-Tau22-HR : n = 5. RO : Reconnaissance d'objets. No : Normoxie ; HR : Hypoxies Répétées.

A la différence des observations réalisées chez les souris WT, aucun effet évident du stress hypoxique répété sur la mémoire spatiale à court terme ni la mémoire de travail n'a pu être observé dans notre modèle transgénique THY-Tau22.

B) Etude de la protéine Tau

(1) Analyses immunohistochimiques dans le cerveau des souris THY-Tau22

Dans un premier temps, afin d'évaluer le développement de la DNF dans le cerveau de nos animaux transgéniques, en particulier au niveau de l'hippocampe, nous avons réalisé des immunomarquages anti-Tau sur plusieurs séries de coupes cérébrales. Par la suite, nous avons évalué la densité de marquage (reflet des quantités de protéines) dans l'hippocampe des animaux.

Trois anticorps dirigés contre la protéine Tau ont été utilisés dans le cadre de ces expérimentations :

- AT8, qui permet de reconnaître une hyper-phosphorylation de la protéine Tau ;
- MC1, qui reconnaît une conformation de la protéine Tau caractéristique du stade pré-agrégatif ;
- AT100, qui reconnaît les protéines Tau agrégées.

Les immunomarquages réalisés chez les animaux âgés de 10,5 mois (cinétique 1, [Figure 27](#)) et ceux réalisés chez les animaux âgés de 13,5 mois (cinétique 2, [Figure 28](#)) sont cohérents avec le développement de la DNF attendu à ces âges (Schindowski et al., 2006). Ils n'ont cependant pas permis de mettre en évidence d'effet du stress hypoxique répété sur les marquages immunohistochimiques de Tau.

Néanmoins, la technique d'immunohistochimie ne permet qu'une étude semi-quantitative de la protéine étudiée (ici la protéine Tau) ; ces résultats méritent donc d'être confirmés par d'autres études.

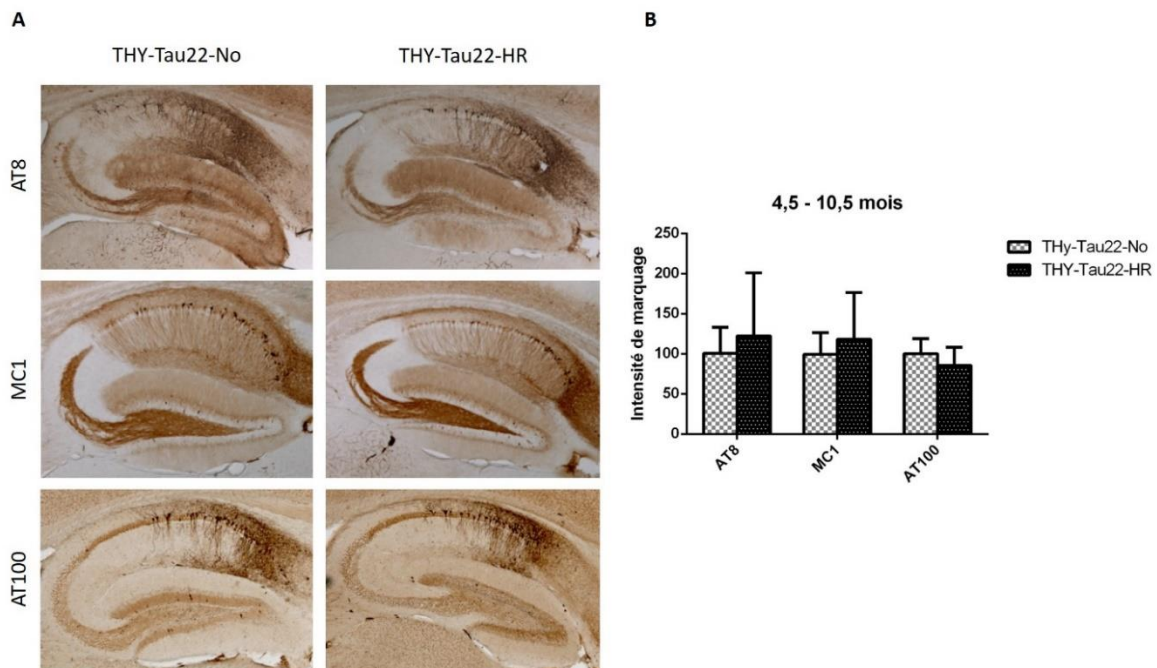


Figure 27 : Marquages immunohistochimiques de la protéine Tau dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 10,5 mois exposées ou non au protocole d'hypoxies répétées. **A :** Immunohistochimies AT8, MC1 et AT100 réalisées dans l'hippocampe des souris transgéniques THY-Tau22 âgées de 10,5 mois. **B :** Quantifications de la densité des marquages anti-Tau (reflet de la quantité protéique) dans l'hippocampe des animaux. THY-Tau22-No : n = 5 ; THY-Tau22-HR : n = 5. Test Mann et Whitney : aucune différence significative. No : Normoxie ; HR : Hypoxies Répétées.

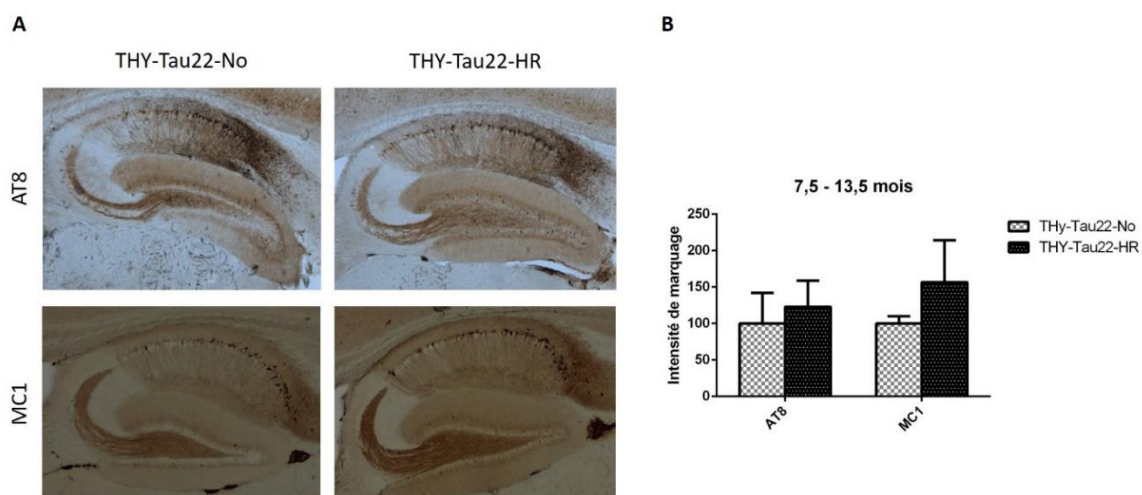


Figure 28 : Marquages immunohistochimiques de la protéine Tau dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 13,5 mois exposées ou non au protocole d'hypoxies répétées. **A :** Immunohistochimies AT8 et MC1 réalisées dans l'hippocampe des souris transgéniques THY-Tau22 âgées de 13,5 mois. **B :** Quantifications de la densité des marquages anti-Tau (reflet de la quantité protéique) dans l'hippocampe des animaux. THY-Tau22-No : n = 4 ; THY-Tau22-HR : n = 5. Test Mann et Whitney : aucune différence significative. No : Normoxie ; HR : Hypoxies Répétées.

(2) Analyses biochimiques : Western Blots

Afin de déterminer si le protocole d'hypoxies répétées pouvait avoir un effet durable sur la biochimie de la protéine Tau (la mise à mort des animaux ayant eu lieu 14 jours après le dernier épisode hypoxique), nous avons réalisé une analyse biochimique par Western Blots à partir des échantillons de cortex de l'ensemble des animaux de chaque cinétique (24 souris issues de la cinétique 1 et 22 souris issues de la cinétique 2).

Pour chaque groupe expérimental, nous avons utilisé un anticorps ciblant les protéines Tau hyperphosphorylées sur la sérine 396 (pS396), ainsi qu'un anticorps reconnaissant l'ensemble des protéines Tau (Tau-Cter).

Ces études ne nous ont pas permis de mettre en évidence de modification de la phosphorylation de protéine Tau ni des quantités totales de protéines Tau (chez les animaux WT et THY-Tau22) pour les épitopes testés, qu'il s'agisse des animaux âgés de 10,5 mois ([Figure 29](#)) ou 13,5 mois ([Figure 30](#)) lors de la mise à mort des animaux.

Ces observations mériteraient toutefois une étude biochimique plus approfondie de la protéine Tau pour être confirmés.

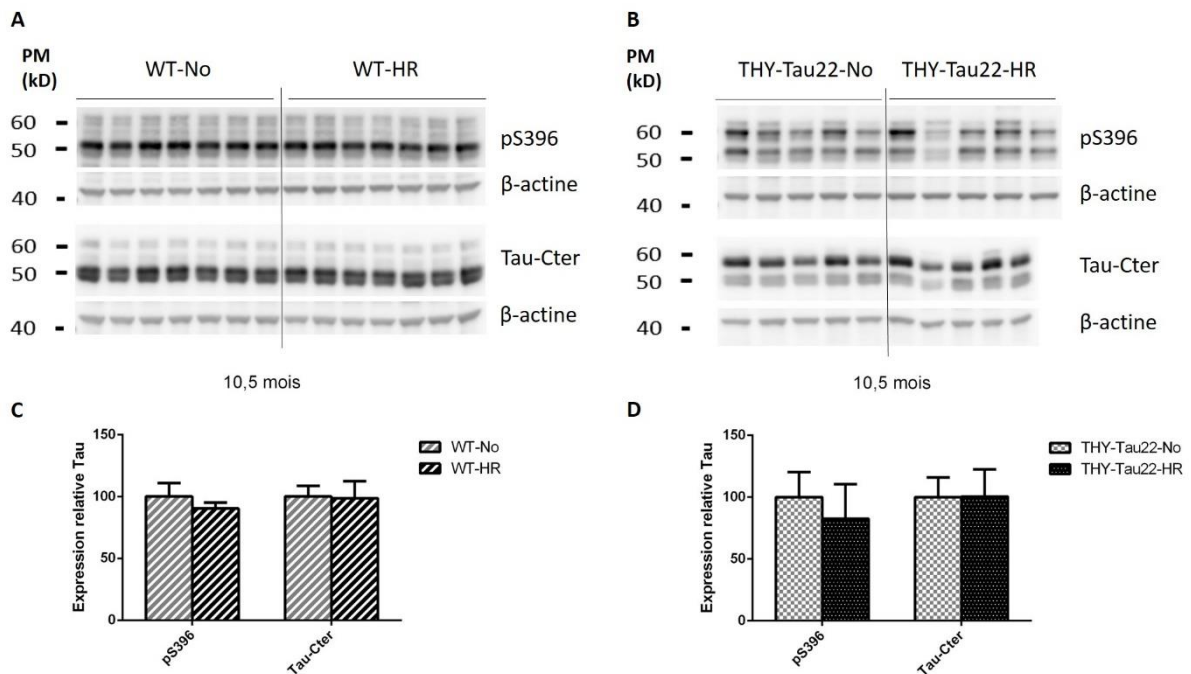


Figure 29 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris WT et THY-Tau22 âgées de 10,5 mois lors de la mise à mort et exposées ou non au protocole d'hypoxies répétées. **A, B :** immunomarquages des protéines Tau phosphorylées (pS396) et totales (Tau-Cter) chez les souris WT-No (n = 7) et WT-HR (n = 7) (**A**), et chez les souris THY-Tau22-No (n = 5) et THY-Tau22-HR (n = 5) (**B**). **C, D :** Quantifications des immunomarquages des protéines Tau phosphorylées et totales chez les animaux WT (**C**) et les animaux transgéniques THY-Tau22 (**D**) exposés ou non au protocole d'hypoxies répétées. Les résultats ont été normalisés sur la β-actine. Test de Mann et Whitney : pas de différence significative entre les animaux exposés à la normoxie et ceux soumis au protocole d'hypoxies répétées. No : Normoxie, HR : Hypoxies Répétées.

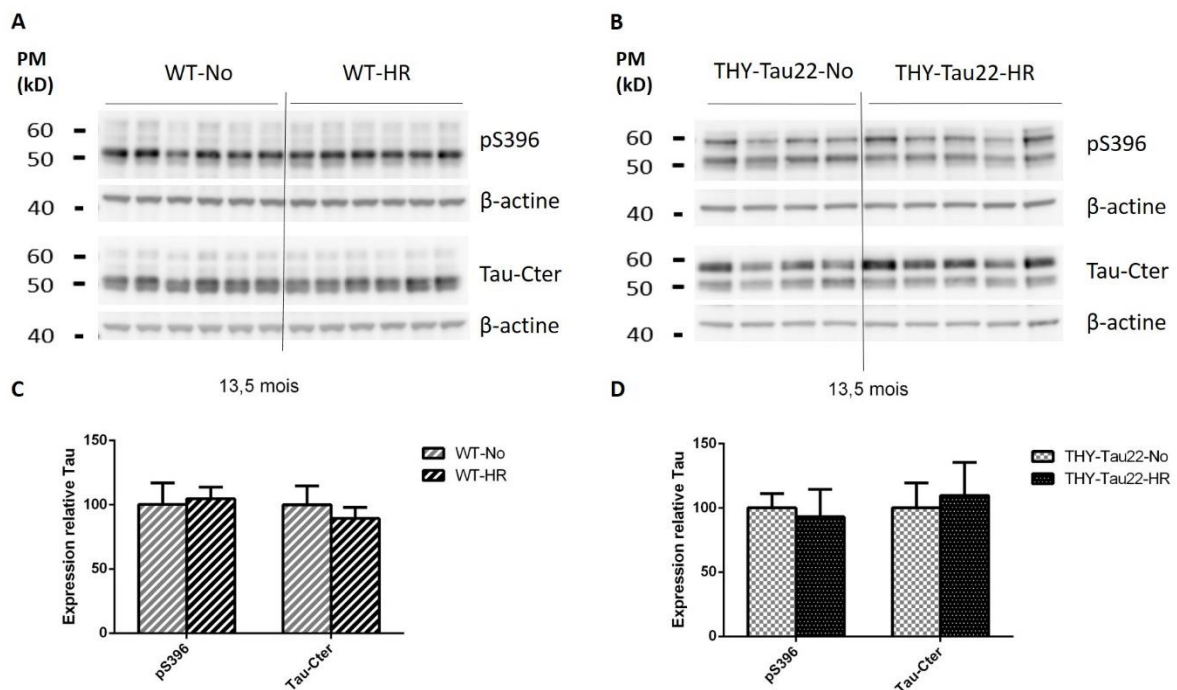


Figure 30 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris WT et THY-Tau22 âgées de 13,5 mois lors de la mise à mort et exposées ou non au protocole d'hypoxies répétées. **A**, **B** : immunomarquages des protéines Tau phosphorylées (pS396) et totales (Tau-Cter) chez les souris WT-No (n = 6) et WT-HR (n = 6) (**A**), et chez les souris THY-Tau22-No (n = 4) et THY-Tau22-HR (n = 5) (**B**). **C**, **D** : Quantifications des immunomarquages des protéines Tau phosphorylées et totales chez les animaux WT (**C**) et les animaux transgéniques THY-Tau22 (**D**) exposés ou non au protocole d'hypoxies répétées. Les résultats ont été normalisés sur la β-actine. Test de Mann et Whitney : pas de différence significative entre les animaux exposés à la normoxie et ceux soumis au protocole d'hypoxies répétées. No : Normoxie, HR : Hypoxies Répétées.

Au total, il semble donc que le protocole d'hypoxies répétées utilisé dans le cadre de nos expérimentations à Lille ne modifie pas de façon durable la biologie de la protéine Tau murine ni de la protéine Tau humaine étudiée par immunohistochimies et Western Blots.

C) Dosages plasmatiques de l'EPO

Concernant les animaux WT et THY-Tau22 pour lesquels les expositions au stress hypoxique répété ont débuté à l'âge de 4,5 mois (Cinétique 1), aucune variation des concentrations plasmatiques d'érythropoïétine (EPO) n'a pu être observée chez les animaux exposés au protocole d'hypoxies répétées (HR) comparativement aux animaux des groupes contrôles (No) (**Figure 31**), indépendamment du nombre total d'expositions à l'hypoxie (ici 24 ou 33). Cette absence de variation dans les groupes exposés au stress hypoxique a été retrouvée de façon similaire lorsque leur dernière exposition à l'hypoxie datait de 3, 4, 14 ou 17 jours.

De plus, afin d'évaluer l'évolution temporelle de la réponse à l'hypoxie dans un même groupe d'animaux, nous avons comparé, pour chaque groupe, les concentrations plasmatiques mesurées 3 ou 4 jours après le dernier épisode hypoxique avec les concentrations plasmatiques mesurées 14 ou 17 jours après celui-ci, grâce à un test Wilcoxon. A nouveau, aucune variation significative n'a pu être observée au sein d'un même groupe, les

concentrations plasmatiques d'EPO semblant être stables entre 3 et 17 jours après la dernière exposition au stress hypoxique.

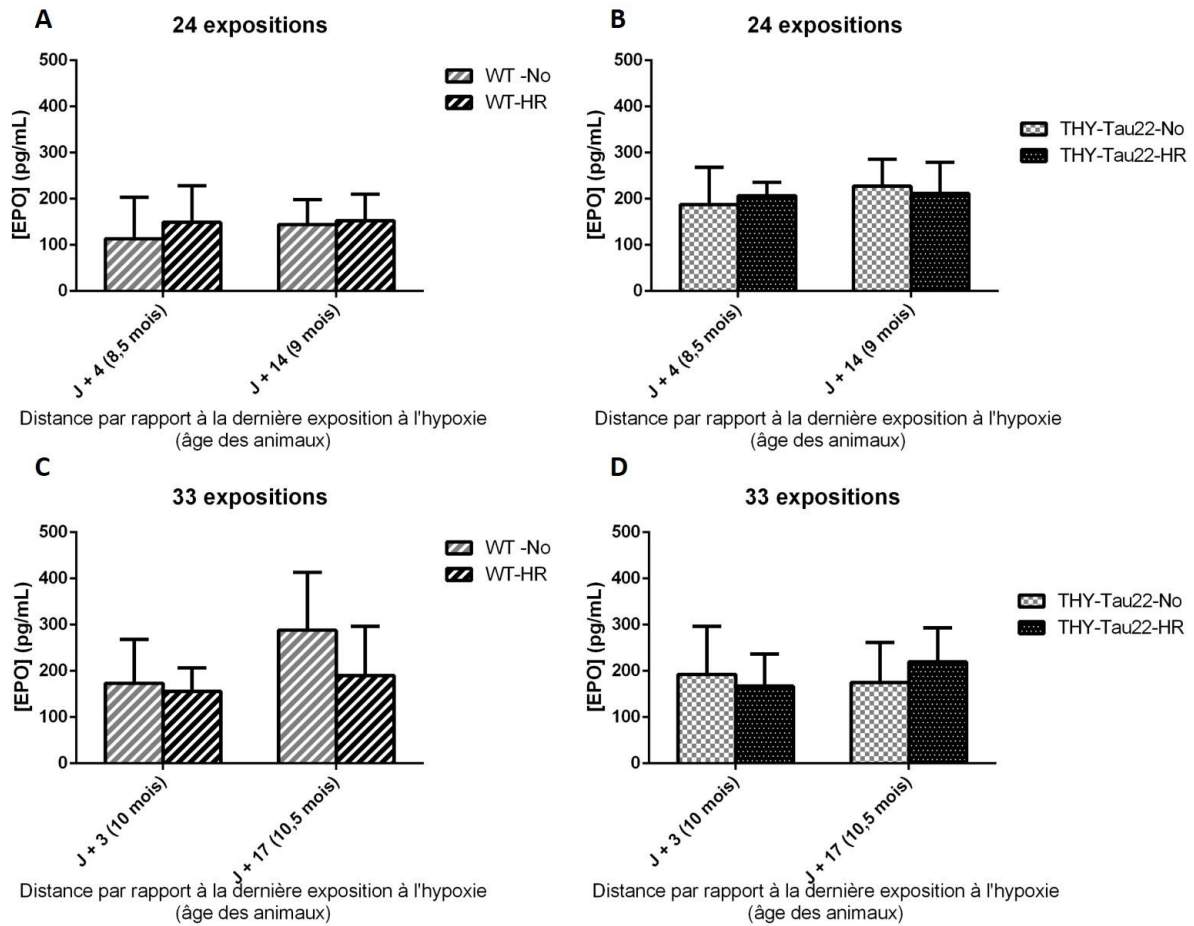


Figure 31 : Dosages ELISA de l'EPO chez les animaux WT et THY-Tau22 âgés de 10,5 mois au moment de la mise à mort. WT-No : n = 7 ; WT-HR : n = 7 ; THY-Tau22-No : n = 5 ; THY-Tau22-HR : n = 5. Dosage de l'EPO plasmatique après un total de 24 (**A, B**) et 33 (**C, D**) expositions à l'hypoxie (FiO₂ égale à 8% pendant une heure) chez les animaux WT (**A, C**) et THY-Tau22 (**B, D**) âgés de 4,5 mois au début des expérimentations et 10,5 mois lors de la mise à mort. L'âge des animaux au moment de chaque prélèvement plasmatique est indiqué entre parenthèses à côté de la distance par rapport à la dernière exposition à l'hypoxie. Comparaison des groupes exposés aux hypoxies répétées (HR) avec leurs contrôles (No) par un test Mann et Whitney. Comparaison des animaux du même groupe à J + 4 et J + 14 (exemple WT-No J + 4 versus WT-No J + 14) par un test Wilcoxon. Aucune différence significative n'a été observée. No : Normoxie ; HR : Hypoxies Répétées.

En ce qui concerne les animaux WT et THY-Tau22 pour lesquels l'exposition au stress hypoxique répété a débuté plus tardivement (à 7,5 mois), les différents prélèvements plasmatiques effectués après un total de 22, 25 ou 30 expositions à l'hypoxie n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet du stress hypoxique répété (HR) chez les animaux WT et THY-Tau22 comparativement aux animaux des groupes contrôles respectifs (WT-No et THY-Tau22-No) ; indifféremment du moment du prélèvement (3, 4, 14 ou 17 jours) par rapport à la dernière exposition à l'hypoxie (**Figure 32**).

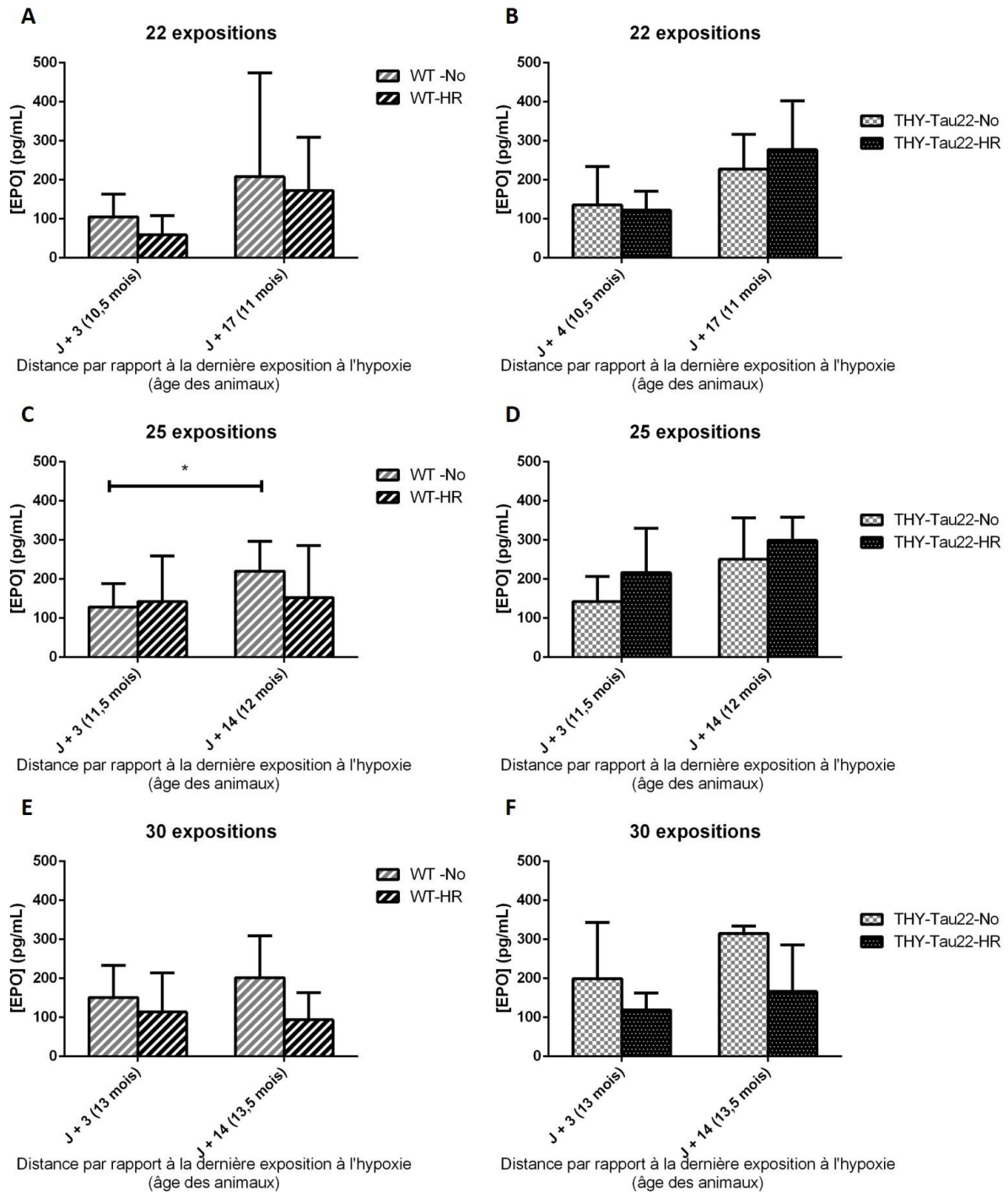


Figure 32 : Dosages ELISA de l'EPO chez les animaux WT et THY-Tau22 âgés de 13,5 mois au moment de la mise à mort. WT-No : n = 6 ; WT-HR : n = 7 ; THY-Tau22-No : n = 4 ; THY-Tau22-HR : n = 5. Dosage de l'EPO plasmatique après un total de 22 (A, B), 25 (C, D) et 30 (E, F) expositions à l'hypoxie (FiO₂ égale à 8% pendant une heure) chez les animaux WT (A, C, E) et THY-Tau22 (B, D, F) âgés de 7,5 mois au début des expérimentations et 13,5 mois lors de la mise à mort. L'âge des animaux au moment de chaque prélèvement plasmatique est indiqué entre parenthèses à côté de la distance par rapport à la dernière exposition à l'hypoxie. Comparaison des groupes exposés aux hypoxies répétées (HR) avec leurs contrôles (No) par un test Mann et Whitney. Comparaison des animaux du même groupe à J + 4 et J + 14 (exemple WT-No J + 4 versus WT-No J + 14) par un test de Wilcoxon. * p < 0,05. No : Normoxie ; HR : Hypoxies Répétées

En revanche, la comparaison des concentrations plasmatiques d'EPO chez les animaux d'un même groupe à différents moments a permis de mettre en évidence une augmentation significative de cette concentration chez les animaux WT contrôles, 14 jours après l'exposition à la 25^{ème} hypoxie, comparativement à la concentration plasmatique mesurée 11 jours plus tôt (à 3 jours de la 25^{ème} hypoxie). Une tendance à l'augmentation des concentrations plasmatiques d'EPO à distance de la dernière hypoxie semble également exister dans les autres groupes expérimentaux, après 22 et 25 expositions à l'hypoxie, bien que ces variations ne soient pas significatives. Il est difficile d'expliquer ces observations ; néanmoins, puisqu'elles semblent survenir indifféremment chez les animaux exposés à la normoxie et ceux exposés au protocole d'hypoxies répétées, nous pouvons imaginer qu'un autre facteur que l'hypoxie puisse interférer avec ces observations.

Le protocole d'hypoxies répétées utilisé dans le cadre de ces expérimentations ne semble pas entraîner de modification durable des concentrations plasmatiques d'EPO, puisqu'aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les groupes hypoxiés et les animaux contrôles 3, 4, 14 ou 17 jours après la dernière exposition à l'hypoxie.

III. Discussion intermédiaire

A) *Dosages plasmatiques de l'EPO*

Les dosages ELISA réalisés sur les différents échantillons plasmatiques prélevés au cours de nos deux cinétiques expérimentales n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet du stress hypoxique répété sur les concentrations plasmatiques d'EPO, 3 à 17 jours après la dernière exposition à l'hypoxie, indépendamment de la lignée murine étudiée (WT ou THY-Tau22) et du nombre total d'expositions à l'hypoxie.

Ces études ne nous ont toutefois pas permis de caractériser la réponse immédiate de l'organisme à l'hypoxie, puisque les prélèvements les plus rapprochés ont été réalisés 3 jours après la dernière exposition à l'hypoxie. Or, il a été décrit dans la littérature que l'élévation des quantités plasmatiques d'EPO survenait rapidement en réponse au stress hypoxique (Jelkmann, 2011).

Nos travaux montrent néanmoins l'absence de perturbation durable du métabolisme de l'EPO chez les animaux exposés pendant 6 mois à un stress hypoxique répété, suggérant un retour à la normale des quantités d'EPO plasmatiques entre deux expositions à l'hypoxie dans notre modèle.

Lors de la préparation initiale de ces différentes expérimentations, nous avons envisagé la possibilité de réaliser des prélèvements sanguins chez les animaux lors de leur sortie du dispositif à hypoxies, afin de déterminer la réponse immédiate de l'organisme à l'hypoxie, puisque nous ne disposions pas à l'époque de matériel permettant une mesure de la SaO₂ chez nos animaux. Toutefois, il nous a semblé que réaliser un prélèvement sanguin sur un animal qui venait d'être exposé pendant une heure à une hypoxie sévère (FiO₂ égale à 8%) pourrait aggraver l'hypoxémie en théorie présente dans son organisme (en raison de la baisse transitoire du volume sanguin causée par le prélèvement). Considérant que cela aurait pu constituer un biais dans le cadre de l'évaluation des conséquences de notre stress hypoxique répété, nous avons préféré différer les prélèvements plasmatiques à quelques jours après la dernière exposition à l'hypoxie.

Par ailleurs, l'étude comparative des concentrations plasmatiques d'EPO au sein d'un même groupe 3 (ou 4) jours et 14 (ou 17) jours après la dernière exposition à l'hypoxie semble mettre en évidence une tendance à l'augmentation de ces concentrations pour les prélèvements effectués à distance (14 ou 17 jours) du dernier stress hypoxique. Toutefois, ces observations étant retrouvées également dans les groupes d'animaux contrôles (No), il est probable qu'elles ne soient pas dues au stress hypoxique lui-même. Nous pouvons en revanche imaginer que ces augmentations modérées reflèteraient plutôt une réponse physiologique de l'organisme par rapport à l'hypovolémie transitoire induite par le prélèvement sanguin effectué sur les animaux quelques jours auparavant.

B) *Evaluations comportementales : effets du protocole d'hypoxies répétées sur la mémoire à court terme des animaux*

Les évaluations comportementales réalisées chez les animaux WT dans le cadre de nos deux cinétiques expérimentales nous ont permis de mettre en évidence un effet inattendu du protocole d'hypoxies répétées sur la mémoire spatiale à court terme et la mémoire de travail des animaux.

En effet, alors qu'aucune atteinte mnésique n'avait pu être observée lorsque les tests comportementaux étaient réalisés 3 jours après la dernière hypoxie, les animaux WT exposés au protocole d'hypoxies répétées présentaient une atteinte mnésique (dans le test du labyrinthe en Y et dans le test de reconnaissance d'objets) lorsque ces tests comportementaux étaient effectués 4, 14 ou 17 jours après la dernière exposition au stress hypoxique.

De façon intéressante, l'atteinte mnésique présentée par ces animaux semblait être réversible, puisqu'à la suite de la reprise du protocole d'hypoxies répétées, les animaux du groupe WT-HR semblaient à nouveau être en mesure de reconnaître le bras nouveau dans le test du labyrinthe en Y ; témoignant d'une mémoire spatiale à court terme non altérée.

Bien que n'ayant pas réalisé d'études dans ce sens, nous pouvons émettre l'hypothèse que la répétition du stress hypoxique chez nos animaux sur une longue durée leur permettrait de développer une forme de résistance cérébrale à l'hypoxie, comme cela a été décrit dans la littérature pour les modèles de préconditionnement hypoxique (Samoilov et al., 2003).

L'existence de troubles de la mémoire à court terme dans un modèle murin WT exposé à un protocole d'hypoxies répétées sur une longue durée d'exposition est cohérente avec les données de la littérature ayant rapporté des troubles mnésiques similaires chez les montagnards se rendant régulièrement en haute montagne (et étant donc exposés de façon répétée à un stress hypoxique).

En ce qui concerne les résultats des différents tests comportementaux réalisés chez les animaux WT, nous avons dû exclure de nombreux tests pour lesquels le comportement des animaux n'était pas exploitable. Plusieurs raisons peuvent expliquer les difficultés que nous avons rencontrées lors de ces études.

La première d'entre elle est directement liée aux locaux dans lesquels ont été réalisés les tests cognitifs. En effet, les locaux dans lesquels se trouvaient les animaux étaient récents car le bâtiment dans lequel ils se trouvaient était en cours de rénovation. Malheureusement, il nous est arrivé à plusieurs reprises d'être dérangés au cours d'un test comportemental par des bruits d'un chantier situé à l'étage inférieur de celui où nous nous trouvions, perturbant les animaux dont nous essayions d'évaluer la mémoire.

La seconde raison pour laquelle nous avons rencontré des difficultés lors de la réalisation des tests comportementaux est liée à la répétition des tests comportementaux eux-mêmes. En effet, lors des premières évaluations mnésiques réalisées dans le labyrinthe en Y, nous n'avons pas noté de comportement exploratoire inhabituel chez les animaux ; ceux-ci explorant

rapidement l'ensemble des 3 bras une fois qu'ils avaient été placés dans le labyrinthe. En revanche, lors des derniers tests comportementaux, nous avons pu remarquer une certaine « lassitude » des animaux vis-à-vis de ce test ; leur comportement exploratoire étant alors fortement réduit. Ainsi, lorsque les animaux étaient placés dans le bras de départ du labyrinthe, ils tardaient à explorer leur environnement, rendant complexe l'analyse des résultats. Il nous est même arrivés, à plusieurs reprises, d'observer une totale passivité de l'animal dans le test ; celui-ci restant assis à l'emplacement où nous l'avions posé, et semblant « attendre patiemment » que l'expérimentateur « revienne le chercher ». Ce désintérêt vis-à-vis du test du labyrinthe en Y a été de plus en plus observé au fur et à mesure de la répétition des évaluations comportementales.

En ce qui concerne les animaux transgéniques THY-Tau22 exposés au protocole d'hypoxies répétées, nos évaluations comportementales ne nous ont pas permis de mettre en évidence de différence des capacités mnésiques chez ces animaux, comparativement aux animaux transgéniques contrôles (THY-Tau22-No). De manière générale, l'ensemble des données comportementales obtenues chez les animaux transgéniques est difficilement interprétable, notamment du fait des incohérences retrouvées chez les animaux de la seconde cinétique, qui semblaient ne pas présenter de troubles cognitifs après un an alors qu'à cet âge la pathologie Tau est présente dans l'ensemble du cerveau, entraînant un déficit mnésique important chez ces animaux.

Enfin, même si l'atteinte comportementale présente chez la souris transgénique THY-Tau22 pouvait être aggravée par le protocole d'hypoxies répétées, il serait difficile de percevoir une aggravation du déficit mnésique chez ces animaux (THY-Tau22-HR), comparativement aux animaux contrôles (THY-Tau22-No), puisque ces derniers présentent eux-mêmes un déficit cognitif. Il aurait en revanche pu être possible d'observer, chez ces animaux, une survenue éventuelle précoce des troubles cognitifs sous hypoxies répétées (les animaux THY-Tau22-HR auraient alors présenté une atteinte cognitive à un âge plus jeune que les animaux THY-Tau22-No).

Pour finir, il faut garder à l'esprit que les résultats de ces évaluations comportementales concernent des faibles nombres d'animaux (n compris entre 4 et 7 selon le groupe expérimental et la cinétique). Ces observations mériteraient donc d'être reproduites pour confirmer les résultats de notre étude.

C) *Etude de la protéine Tau*

Les premiers résultats disponibles concernant l'étude de la protéine Tau après 6 mois d'exposition à un protocole d'hypoxies répétées ne semblent pas indiquer d'effet majeur de ce stress hypoxique répété sur la phosphorylation de Tau ni sur les quantités totales de protéines Tau, pour les différents épitopes testés (AT8, MC1, AT100, pS396 et Tau-Cter).

Ces études restent néanmoins très préliminaires, et auraient nécessité une investigation plus poussée pour confirmer l'absence d'effet du stress hypoxique répété. Nous aurions pu par exemple réaliser une électrophorèse bidimensionnelle afin d'étudier l'état de

phosphorylation global de la protéine Tau. Nous aurions pu également réaliser un fractionnement soluble/insoluble afin d'étudier la répartition des espèces protéiques de Tau entre ces deux fractions, et donc d'évaluer l'agrégation des protéines Tau.

De même, les animaux ayant été mis à mort 14 jours après la dernière exposition au stress hypoxique, nous ne pouvons pas exclure l'existence d'un possible effet transitoire du stress hypoxique répété sur la protéine Tau (qui n'aurait pas pu être visualisé chez nos animaux en raison du délai important entre la dernière hypoxie et la mise à mort des souris).

Enfin, notre étude par Western Blot a été réalisée uniquement dans le cortex des animaux. Bien que celui-ci soit atteint par la DNF aux âges auxquels les animaux ont été mis à mort, il aurait également été intéressant d'évaluer la protéine Tau dans l'hippocampe des animaux (siège notamment de la mémoire spatiale).

Cependant, devant l'importante charge de travail qu'aurait constitué une étude plus poussée de la protéine Tau, et au vu de la complexité d'interprétation des données comportementales dans notre modèle transgénique, il nous a été recommandé, dans le cadre de ma première évaluation annuelle d'avancement des travaux de thèse (par les membres du Comité de Suivi de Thèse), de concentrer la suite de mes travaux de recherche sur l'évaluation des conséquences d'un stress hypoxique intermittent sur la mémoire et la pathologie Tau dans le modèle THY-Tau22.

Partie expérimentale 2 : Etude des effets d'un protocole d'hypoxies intermittentes sur la cognition et la pathologie Tau chez des souris WT et THY-Tau22 (hypoxies Grenoble)

I. Introduction / Objectifs

La principale caractéristique du syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est l'existence d'épisodes d'apnées et/ou d'hypopnées au cours du sommeil des patients, ayant pour conséquence une hypoxémie nocturne intermittente. Afin d'étudier dans quelles mesures cette hypoxémie nocturne pouvait affecter la protéine Tau, et donc éventuellement potentialiser la dégénérescence neurofibrillaire préexistante chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) et présentant un SAS, nous avons exposé des animaux transgéniques modélisant la pathologie Tau à un protocole de stress hypoxique intermittent.

Une corrélation entre la sévérité de l'hypoxémie et celle de l'atteinte cognitive semblant exister en clinique humaine chez les patients présentant un SAS et une MA, nous avons choisi d'utiliser un protocole de stress hypoxique intermittent modélisant un SAS sévère en clinique humaine (c'est-à-dire entraînant des désaturations artérielles en oxygène majeures) dans le cadre de nos expérimentations.

Ainsi, des animaux transgéniques THY-Tau22 (modélisant la pathologie Tau) ainsi que leurs contrôles littermates ont été exposés à un protocole d'hypoxies intermittentes avec une FiO_2 variant de 21% à 5% par cycles de 60 secondes, 8 heures par jour pendant 15 jours. Afin d'évaluer l'effet de ce stress hypoxique intermittent sur la pathologie Tau à différents stades de développement, nous avons utilisé des animaux âgés de 5 mois dans le cadre d'une première série d'expérimentations, puis des animaux âgés de 8 mois, présentant donc une pathologie Tau plus développée que les précédents.

Le premier objectif de ce travail de thèse a consisté en l'étude de la pathologie Tau dans le modèle transgénique THY-Tau22 après exposition à deux semaines de protocole d'hypoxies intermittentes.

Le second objectif de ces travaux était d'évaluer la mémoire des animaux exposés au stress hypoxique intermittent.

Enfin, nous avons souhaité caractériser la réponse à l'hypoxie dans notre modèle par l'étude du facteur induit par l'hypoxie (HIF), de l'érythropoïétine (EPO) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) ; ainsi que par l'étude des marqueurs de stress oxydant, de neuroinflammation et d'apoptose ; des variations de ces différents marqueurs ayant été décrites sous hypoxie intermittente dans la littérature.

II. Résultats

Dans la seconde partie expérimentale de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet d'un stress hypoxique intermittent (FiO_2 variant de 21% à 5% par cycles de 60 secondes, 8 heures par jour pendant 15 jours) sur différents paramètres (SaO_2 , fréquence cardiaque, études des facteurs HIF, de l'EPO et du VEGF, mémoire, pathologie Tau, stress oxydant, inflammation et apoptose).

Un total de 81 animaux a été utilisé dans le cadre de ces expérimentations ; répartis en 40 animaux âgés de 5 mois (WT-No : n = 10 ; WT-HI : n = 10 ; THY-Tau22-No : n = 10 ; THY-Tau22-HI : n = 10) et 41 animaux âgés de 8 mois (WT-No : n = 11 ; WT-HI : n = 10 ; THY-Tau22-No : n = 9 ; THY-Tau22-HI : n = 11).

A) Validation du protocole d'hypoxies intermittentes

Dans un premier temps, nous avons souhaité valider le modèle d'hypoxies intermittentes choisi. Pour cela, nous avons réalisé des enregistrements de la SaO_2 et de la fréquence cardiaque des animaux au cours de l'exposition à l'hypoxie intermittente ou à la normoxie.

En parallèle, un suivi du poids a été réalisé au début, pendant, et à la fin des deux semaines de protocole pour l'ensemble des animaux.

Par ailleurs, une exploration de différents marqueurs de réponse au stress hypoxique a été réalisée, par des études biochimiques (dosages ELISA de l'EPO et du VEGF plasmatiques), une analyse immunohistologique (marquage anti-VEGF sur les coupes cérébrales) et une analyse transcriptomique (réalisée sur des échantillons de cortex et d'hippocampe).

(1) Enregistrements de SaO_2 et de FC en fonction de la FiO_2

Au cours de nos deux cinétiques d'expérimentation (animaux âgés de 5 et 8 mois), nous avons réalisé des enregistrements de SaO_2 et de FC sur plusieurs animaux des groupes HI lors de la phase d'exposition au protocole d'hypoxies intermittentes, mais aussi sur des animaux des groupes contrôles (No), dans les mêmes conditions environnementales (notamment en raison du bruit de l'appareillage lors de la phase d'hypoxies intermittentes). Pour cette exploration, 2 souris contrôles (No) et 3 souris hypoxiées (HI) de chaque lignée (WT et THY-Tau22) ont été utilisées parmi les animaux âgés de 5 mois ; et seulement 1 souris contrôle (No) et 2 souris hypoxiées (HI) de chaque lignée (WT et THY-Tau22) parmi les animaux âgés de 8 mois.

Remarque :

*A la fin des enregistrements, la cage des animaux des groupes HI a été placée en condition de normoxie pendant une dizaine de minutes, ceci afin d'observer les tracés de ces animaux lors des deux périodes (HI et normoxie). Au terme de ce court enregistrement en condition de normoxie, les animaux ont immédiatement été replacés avec leurs congénères, et donc à nouveau exposés au protocole d'HI. La **figure 33** représente l'enregistrement d'un animal appartenant à un groupe exposé au protocole d'HI, lors de son exposition au protocole d'HI et de sa brève exposition à la normoxie.*

Les différents enregistrements réalisés chez les animaux âgés de 5 mois et ceux âgés de 8 mois nous ont permis d'observer une corrélation étroite entre la courbe de SaO₂ et celle de FiO₂ (figure 33), ainsi qu'une élévation importante de la fréquence cardiaque (FC) sous hypoxie. Les tracés obtenus chez les animaux transgéniques THY-Tau22 étaient comparables à ceux observés chez les animaux WT.

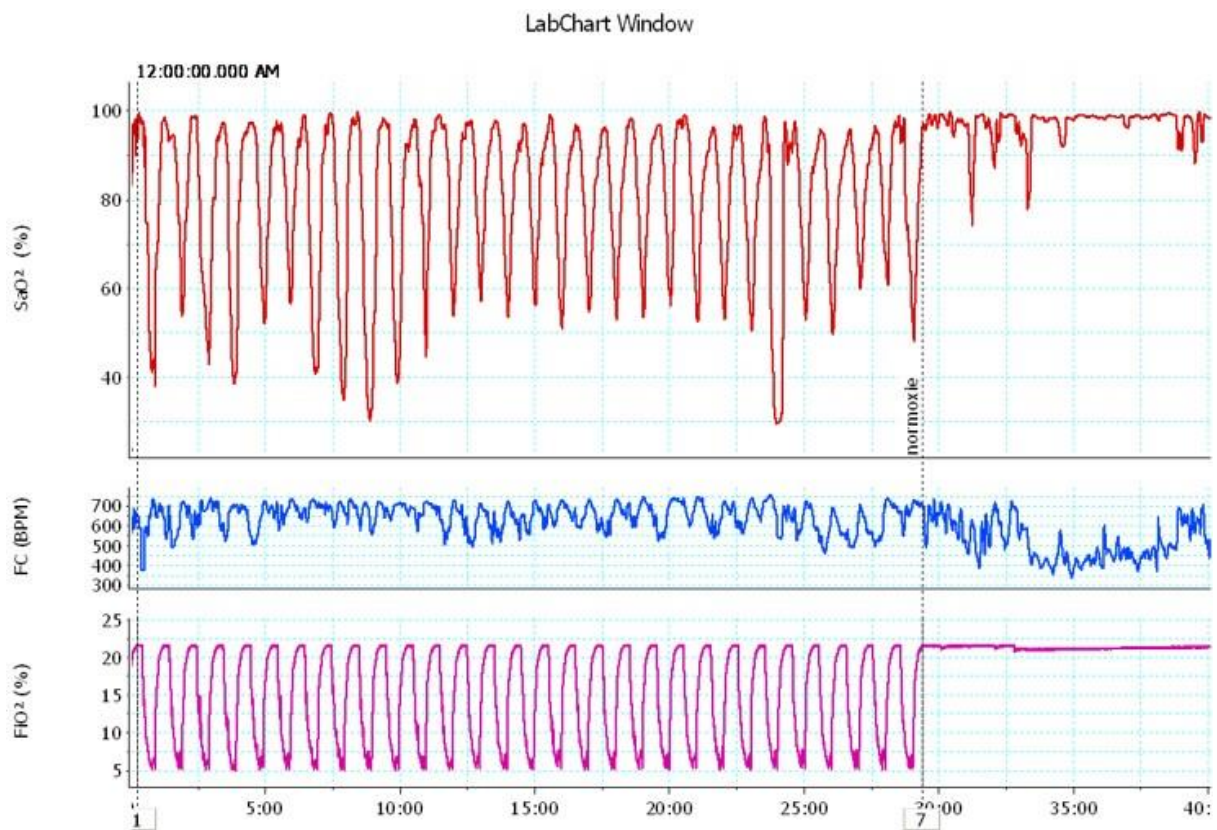


Figure 33 : Exemple d'enregistrement de SaO₂ et de fréquence cardiaque (FC) chez un animal exposé au protocole d'HI (ici une souris WT-HI âgée de 5 mois), pendant son exposition à la condition hypoxique et son bref retour à la condition de normoxie (entre la 30^{ème} et la 40^{ème} minute d'enregistrement). SaO₂ : saturation en oxygène, FC : fréquence cardiaque, FiO₂ : fraction inspirée en oxygène.

Les tracés réalisés chez les animaux exposés au protocole d'HI nous ont permis d'observer une normalisation quasi immédiate de la SaO₂ lors du retour à la condition de normoxie (Figure 33).

Ces constatations ont été confirmées lors de l'analyse des enregistrements. Ainsi, lorsque l'on s'intéresse aux valeurs moyennes, minimales et maximales de la SaO₂ et de la FiO₂, nous pouvons observer des valeurs comparables entre les animaux des groupes HI enregistrés brièvement en période de normoxie et leurs animaux contrôles respectifs (groupes No) (tableaux 9 et 10).

Lorsque l'on s'intéresse plus particulièrement à la SaO₂ chez les animaux exposés au protocole d'HI, on note, pour tous les groupes d'animaux (WT et THY-Tau22 ; 5 et 8 mois), une SaO₂

moyenne d'environ 80% et une FiO₂ d'environ 40%, ce qui correspond, en clinique humaine à un SAS sévère.

5 mois	WT-No	WT-HI		THY-Tau22-No	THY-Tau22-HI	
		No	HI		No	HI
SaO ₂ Moyenne (%)	95,8 ± 2,3	97,6 ± 0,5	81,1 ± 2,2	97,1 ± 2,9	98,4 ± 1,0	85,0 ± 3,4
SaO ₂ Minimale (%)	80,9 ± 1,9	84,8 ± 10,0	38,8 ± 10,5	80,1 ± 5,9	84,9 ± 14,6	41,1 ± 4,9
SaO ₂ Maximale (%)	99,9 ± 0,7	99,7 ± 0,3	99,5 ± 0,1	100,0 ± 0,6	100,2 ± 0,2	100,2 ± 0,2
FiO ₂ Moyenne (%)	21,0 ± 0,1	21,4 ± 0,2	14,5 ± 0,2	21,1 ± 0,2	21,1 ± 0,1	14,1 ± 0,2
FiO ₂ Minimale (%)	20,8 ± 0,0	21,0 ± 0,3	4,9 ± 0,1	21,0 ± 0,2	19,2 ± 1,3	4,2 ± 0,1
FiO ₂ Maximale (%)	21,2 ± 0,1	21,7 ± 0,0	21,7 ± 0,0	21,2 ± 0,2	21,3 ± 0,0	21,2 ± 0,0
FC Moyenne (BPM)	659,3 ± 18,5	573,3 ± 85,7	638,6 ± 13,2	703,9 ± 26,2	641,3 ± 34,7	644,9 ± 13,4
FC Minimale (BPM)	437,5 ± 35,1	454,9 ± 150,0	356,9 ± 127,1	569,8 ± 28,9	476,1 ± 75,3	523,9 ± 42,1
FC Maximale (BPM)	752,2 ± 32,1	724,6 ± 12,7	741,6 ± 12,2	793,4 ± 47,8	720,6 ± 11,2	690,9 ± 21,0

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des enregistrements de SaO₂, FiO₂ et FC réalisés chez les animaux âgés de 5 mois. SaO₂ : saturation en oxygène, FC : fréquence cardiaque, FiO₂ : fraction inspirée en oxygène. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente. BPM : Battements par minute. WT-No : n = 2 ; WT-HI : n = 3 ; THY-Tau22-No : n = 2 ; THY-Tau22-HI : n = 3.

8 mois	WT-No *	WT-HI		THY-Tau22-No *	THY-Tau22-HI	
		No	HI		No	HI
SaO ₂ Moyenne (%)	91,3	96,8 ± 4,7	80,6 ± 7,9	94,5	97,0 ± 2,6	78,3 ± 10,1
SaO ₂ Minimale (%)	89,0	94,9 ± 7,2	38,0 ± 2,2	89,3	96,0 ± 3,4	39,6 ± 4,7
SaO ₂ Maximale (%)	94,0	98,9 ± 2,0	96,4 ± 5,5	97,7	97,9 ± 2,2	98,6 ± 1,6
FiO ₂ Moyenne (%)	21,1	21,0 ± 0,1	14,9 ± 0,3	21,2	21,1 ± 0,0	15,1 ± 0,2
FiO ₂ Minimale (%)	20,9	20,9 ± 0,1	4,7 ± 0,2	21,0	20,9 ± 0,0	5,1 ± 0,0
FiO ₂ Maximale (%)	21,3	21,1 ± 0,1	21,4 ± 0,2	21,4	21,2 ± 0,1	21,3 ± 0,0
FC Moyenne (BPM)	665,6	646,7 ± 50,3	627,6 ± 44,1	678,4	521,6 ± 119,7	646,6 ± 41,2
FC Minimale (BPM)	597,3	613,8 ± 40,0	543,3 ± 35,3	600,8	460,3 ± 113,4	509,6 ± 84,3
FC Maximale (BPM)	720,5	693,6 ± 71,0	670,6 ± 43,1	719,4	662,9 ± 0,9	715,9 ± 20,9

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des enregistrements de SaO₂, FiO₂ et FC réalisés chez les animaux âgés de 8 mois. SaO₂ : saturation en oxygène, FC : fréquence cardiaque, FiO₂ : fraction inspirée en oxygène. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente. BPM : Battements par minute. *Remarque : un seul enregistrement a pu être réalisé dans les deux groupes d'animaux contrôles, expliquant l'absence de valeur d'écart type dans le tableau. WT-No : n = 1 ; WT-HI : n = 2 ; THY-Tau22-No : n = 1 ; THY-Tau22-HI : n = 2.

Concernant la fréquence cardiaque, les résultats sont plus difficiles à interpréter en raison de la plus grande variabilité interindividuelle. Alors que la FiO_2 est une variable imposée par l'expérimentateur et la SaO_2 une réponse physiologique de l'organisme à la FiO_2 de son environnement, la FC, quant à elle, est sensible à plusieurs paramètres, notamment celui du stress des animaux. Il semblerait néanmoins qu'une élévation brève de la fréquence cardiaque survienne à chaque « pic » de désaturation (Figure 33), et que la fréquence cardiaque moyenne soit plus élevée sous hypoxie qu'en condition de normoxie, ceci ayant été observé sur différents tracés. Ces observations n'apparaissent toutefois pas à la lecture des tableaux 9 et 10, probablement en raison du stress des animaux. En effet, la durée moyenne d'enregistrement était d'environ 30 minutes par animal, soit un temps relativement court si l'on prend en compte l'isolement brutal de l'animal dans une cage individuelle et la présence du clip cervical autour de son cou, deux événements très stressants pour un rongeur. Afin de confirmer nos observations relatives à la FC, il aurait probablement fallu réaliser des enregistrements sur des durées beaucoup plus longues, afin que l'animal ait le temps de s'habituer à la présence du clip et à son isolement dans une cage d'expérimentation individuelle.

En résumé :

- La SaO_2 est étroitement corrélée à la FiO_2 imposée aux animaux, indépendamment de leur âge et de leur lignée.
- Une normalisation quasi immédiate de la SaO_2 a été observée lors du retour à la condition de normoxie chez les animaux des groupes HI ; suggérant l'absence d'effet résiduel du protocole d'HI sur ce paramètre.
- Les SaO_2 moyennes et minimales enregistrées sous hypoxie correspondent à un SAS sévère en clinique humaine et ne sont pas sensibles à l'âge ou à la lignée des animaux.
- Il semblerait qu'une élévation globale de la FC ait lieu sous hypoxie, et qu'elle soit accompagnée d'une élévation transitoire de la FC à chaque « pic » de désaturation.

(2) Suivi du poids des animaux

Une perte de poids ayant été rapportée dans la littérature chez les animaux exposés à ce protocole d'hypoxies intermittentes (Polak et al., 2013), nous avons réalisé des mesures du poids de l'ensemble des animaux de nos différents groupes au début, au cours et à la fin du protocole d'hypoxie intermittente (Figure 34).

Comme attendu, une perte de poids significative a pu être observée dans tous les groupes d'animaux exposés au protocole d'HI, indépendamment de l'âge ou de la lignée (Tableau 11). Ainsi, une perte de poids moyenne comprise entre -1,4 et -1,9 g a été observée lors de cette étude, ces résultats étant comparables à ceux de la littérature (Polak et al., 2013).

Par ailleurs, nous avons noté une différence de poids de base (J_0) significative entre les animaux des groupes WT et ceux des groupes THY-Tau22, le poids des animaux transgéniques étant significativement inférieur (-0,8 g à 5 mois et -2,2 g à 8 mois) à celui des animaux littermates. Cette différence se maintenait au terme de l'expérimentation (J_{14}) (Figure 35).

Ainsi, après 14 jours d'expérimentation, le poids des animaux THY-Tau22 était significativement inférieur à celui des animaux WT, dans les groupes contrôles (No) (-0,9 g à 5 mois et -2,0 g à 8 mois) et dans les groupes exposés au protocole d'HI (-1,4 g à 5 mois et -2,7 g à 8 mois).

Cette différence de poids avait été préalablement décrite au sein du laboratoire (Leboucher et al., 2013), et serait due à une prise alimentaire inférieure à celle des animaux littermates, ainsi qu'à une augmentation d'activité (données non publiées car en cours de caractérisation au sein du laboratoire).

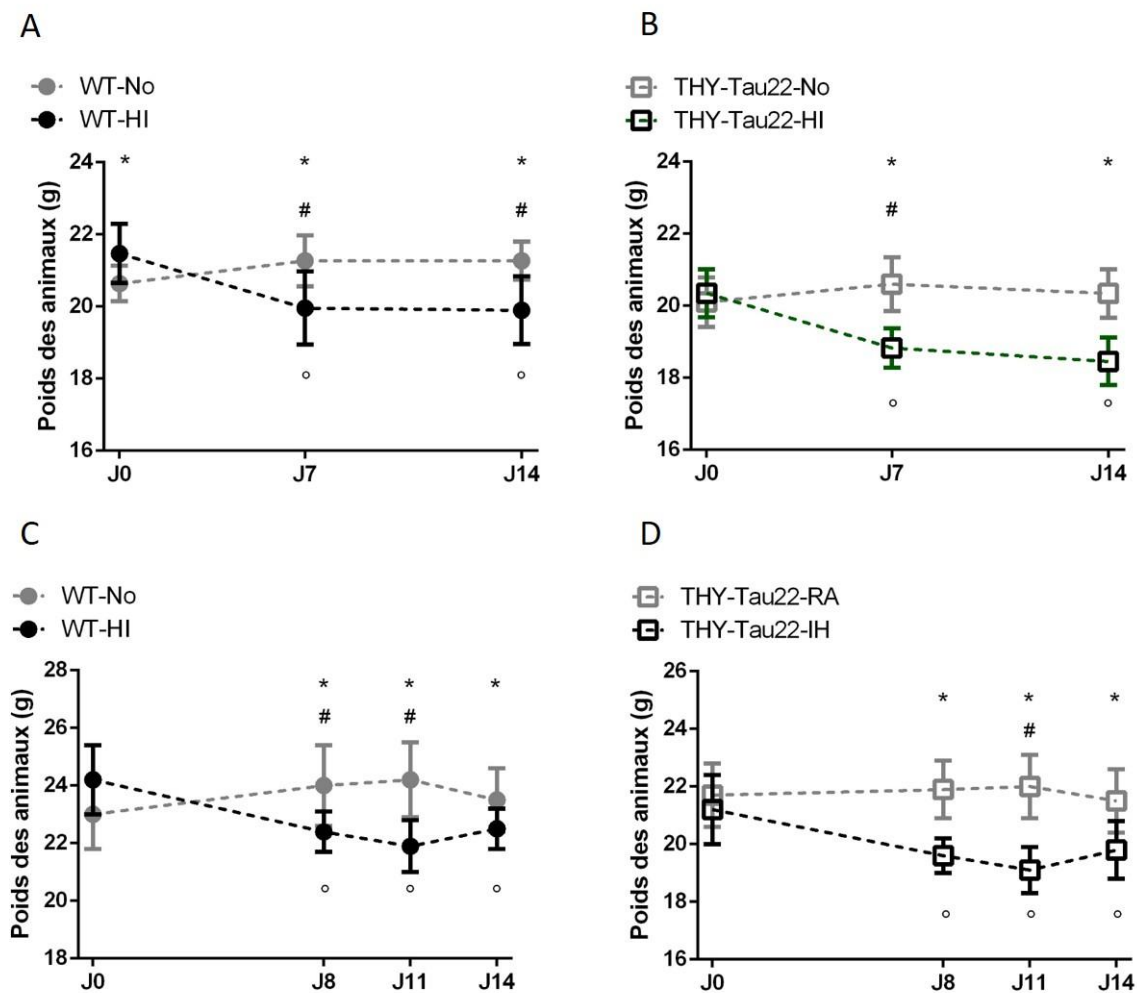


Figure 34 : Suivi du poids des animaux. **A, B** : animaux âgés de 5 mois. **C, D** : animaux âgés de 8 mois. **A** : WT-No : n = 10 ; WT-HI : n = 10. **B** : THY-Tau22-No : n = 10 ; THY-Tau22-HI : n = 10. **C** : WT-No : n = 11 ; WT-HI : n = 10. **D** : THY-Tau22-No : n = 9 ; THY-Tau22-HI : n = 11. * p < 0,05 ; groupes No vs HI (test Mann et Whitney). # p < 0,05 ; J7/J8/J11/J14 vs J0 groupes No (test Wilcoxon). ° p < 0,05 ; J7/J8/J11/J14 vs J0 groupes HI (test Wilcoxon). No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente.

		WT		THY-Tau22	
		No	HI	No	HI
Δ_{J14-J0}	5 mois	0,6 ± 0,4 g *	-1,6 ± 0,7 g *	0,2 ± 0,4 g *	-1,9 ± 0,7 g *
	8 mois	0,5 ± 0,8 g *	-1,8 ± 1,5 g *	-0,2 ± 0,5 g *	-1,4 ± 0,7 g *

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des variations de poids mesurées dans les différents groupes d'animaux entre le début et la fin du protocole d'hypoxies intermittentes. * p < 0,05 ; Δ_{J14-J0} pour tous les groupes (test Wilcoxon). No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente.

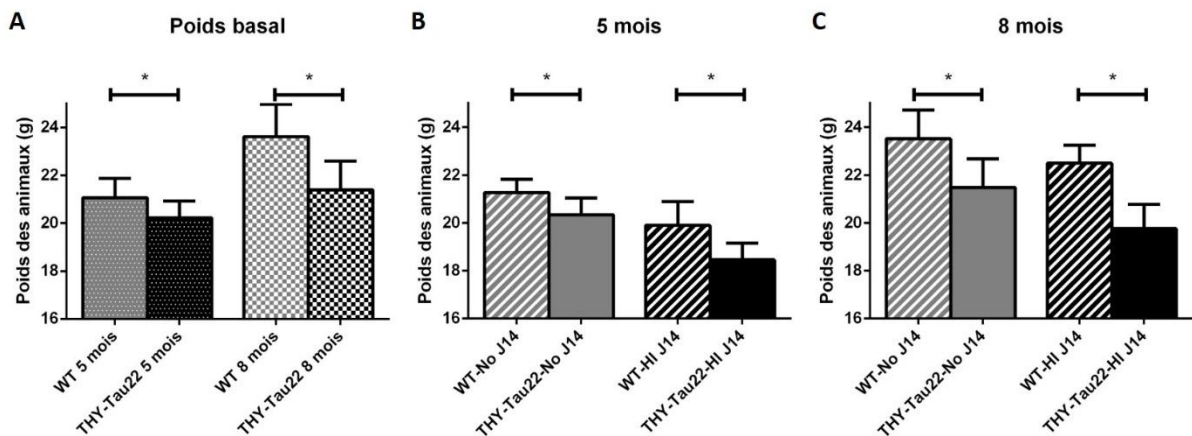


Figure 35 : Représentation des poids en baseline (A) et des poids au terme des expérimentations (B, C) chez les animaux âgés de 5 mois (A, B) et 8 mois (A, C). * p < 0,05 (test Mann et Whitney). A : WT 5 mois : n = 20 ; THY-Tau22 5 mois : n = 20 ; WT 8 mois : n = 21 ; THY-Tau22 8 mois : n = 20. B : WT-No J14 : n = 10 ; THY-Tau22-No J14 : n = 10 ; WT-HI J14 : n = 10 ; THY-Tau22-HI J14 : n = 10. C : WT-No J14 : n = 11 ; THY-Tau22-No J14 : n = 9 ; WT-HI J14 : n = 10 ; THY-Tau22-HI J14 : n = 11. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente.

En résumé :

- En accord avec les données de la littérature, nous avons observé une perte de poids significative chez nos animaux exposés au protocole d'hypoxies intermittentes.
- Cette perte de poids était comparable entre les différents groupes ; indifféremment de l'âge ou de la lignée.

(3) Etude des marqueurs de stress hypoxique

Afin de mieux caractériser la réponse à l'hypoxie de nos différents groupes d'animaux, nous avons réalisé des dosages plasmatiques ainsi que des marquages immunohistochimiques et des études transcriptomiques à partir des échantillons cérébraux de différents marqueurs de réponse à l'hypoxie.

(a) Marqueurs périphériques

Dans un premier temps, nous avons réalisé des dosages plasmatiques des quantités d'EPO et de VEGF, à partir des échantillons récupérés lors du sacrifice des animaux (Figure 36). A l'exception d'une souris âgée de 5 mois issue du groupe WT-HI pour laquelle le plasma n'a pas pu être collecté lors du sacrifice, les plasmas de tous les animaux ont été dosés (soit un total de 80 échantillons).

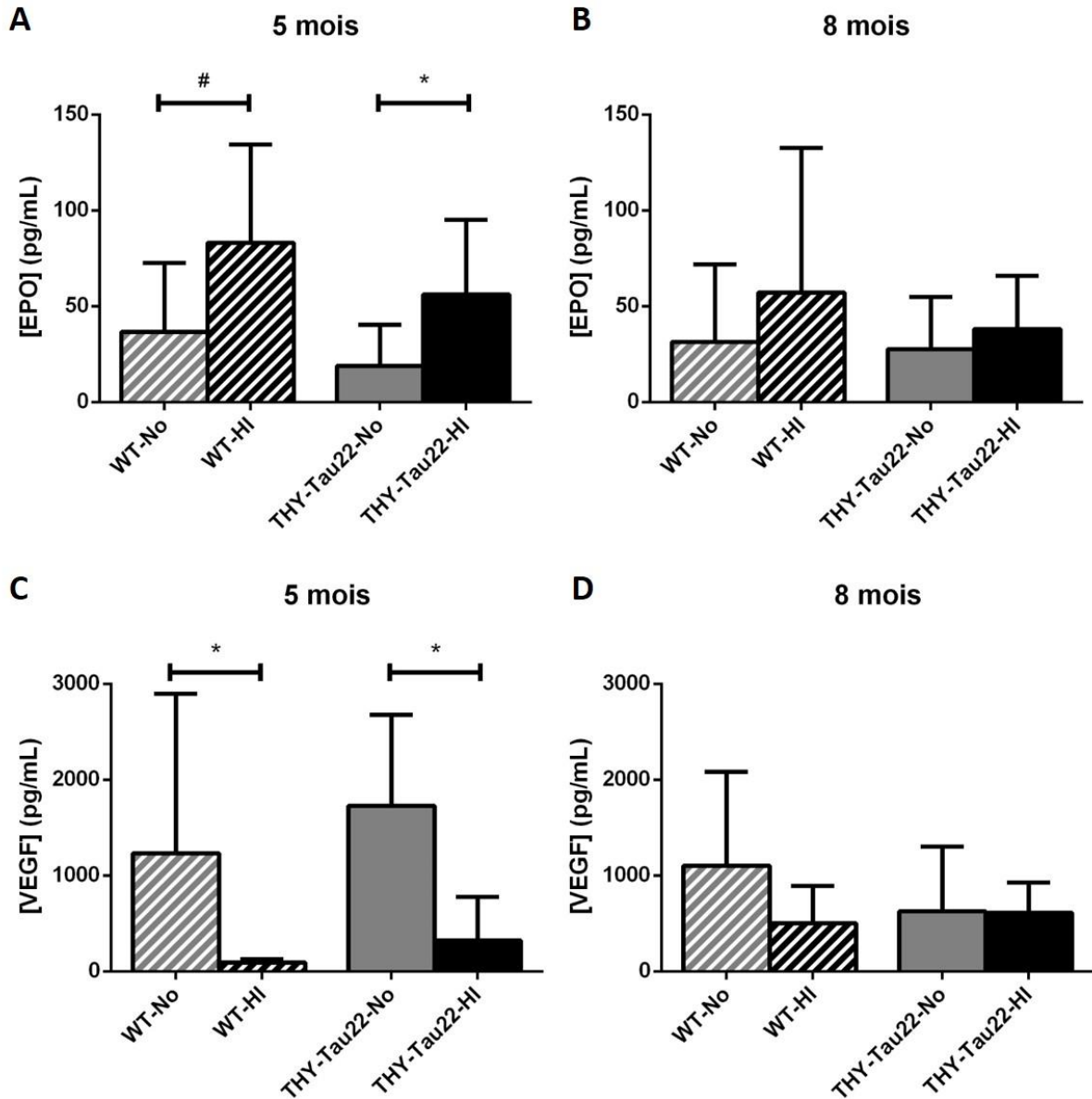


Figure 36 : Dosages ELISA de l'EPO et du VEGF chez les animaux WT et THY-Tau22 âgés de 5 mois (A, C) et 8 mois (B, D). **A** : Dosage de l'EPO plasmatique chez les animaux âgés de 5 mois. WT-No : n = 10 ; WT-HI : n = 9 ; THY-Tau22-No : n = 10 ; THY-Tau22-HI : n = 10. **B** : Dosage de l'EPO plasmatique chez les animaux âgés de 8 mois. WT-No : n = 11 ; WT-HI : n = 10 ; THY-Tau22-No : n = 9 ; THY-Tau22-HI : n = 11. **C** : Dosage du VEGF plasmatique chez les animaux âgés de 5 mois. WT-No : n = 10 ; WT-HI : n = 9 ; THY-Tau22-No : n = 10 ; THY-Tau22-HI : n = 10. **D** : Dosage du VEGF plasmatique chez les animaux âgés de 8 mois. WT-No : n = 11 ; WT-HI : n = 10 ; THY-Tau22-No : n = 9 ; THY-Tau22-HI : n = 11. * p < 0,05 ; # p = 0.0554 ; test Mann et Whitney. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente.

Concernant les animaux âgés de 5 mois, nous avons observé une augmentation significative (ou quasi significative pour le dosage d'EPO chez les souris WT) des taux plasmatiques d'EPO (de l'ordre du double chez les souris WT et du triple chez les souris THY-Tau22), associée à une diminution significative de VEGF chez les animaux exposés au protocole d'HI (les taux de VEGF étant environ 13 fois inférieurs sous hypoxie chez les animaux WT et 5 fois chez les animaux THY-Tau22).

En revanche, chez les animaux âgés de 8 mois, les mêmes variations semblent persister mais les différences entre les groupes contrôles et les groupes hypoxiés ne sont plus significatives, suggérant une réponse atténuée à l'hypoxie.

(b) Marqueurs cérébraux

En parallèle de l'étude des marqueurs plasmatiques de réponse à l'hypoxie, nous avons réalisé des études transcriptomiques d'expression de HIF-1A et de VEGF-A dans le cortex et l'hippocampe des animaux (Figure 37). Pour cela, la moitié des échantillons de cortex et hippocampe issus des animaux de chaque groupe expérimental ont été utilisés (soit un nombre d'échantillons compris entre 4 et 6 par groupe).

Remarque :

La totalité des échantillons d'hippocampe des souris THY-Tau22 (No et HI) âgées de 8 mois ayant été utilisés pour le fractionnement soluble/insoluble des analyses biochimiques, nous n'avons pas pu réaliser d'études transcriptomiques dans l'hippocampe pour ces 2 groupes.

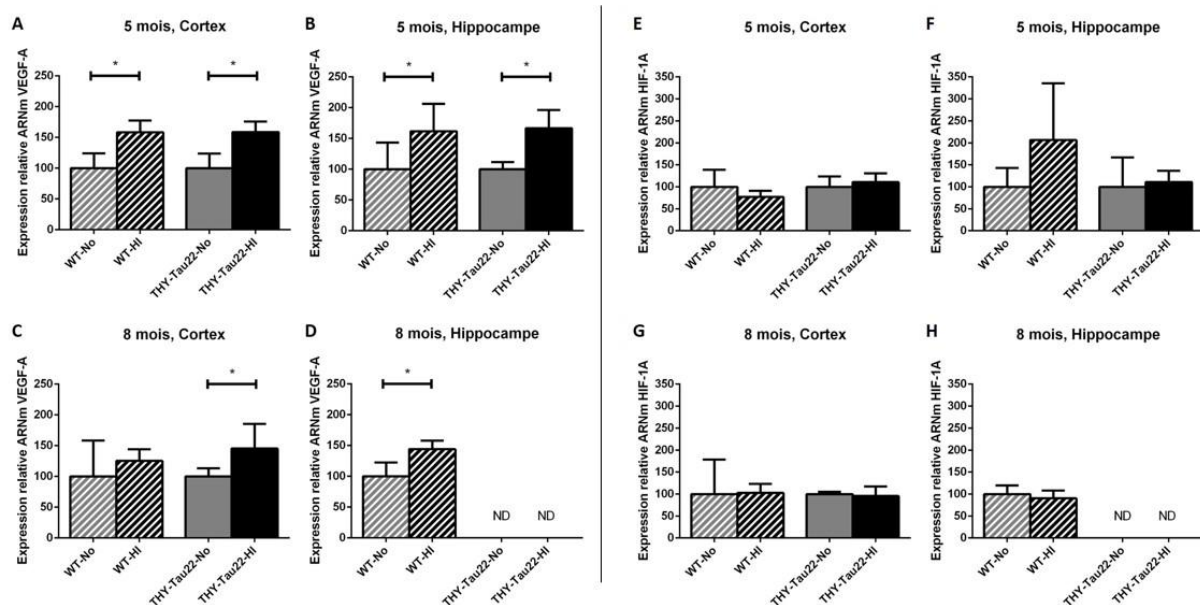


Figure 37 : Représentation des résultats des études transcriptomiques d'expression de VEGF-A et HIF-1A. **A – D** : Expression de VEGF-A dans le cortex (**A, C**) et l'hippocampe (**B, D**) des animaux âgés de 5 mois (**A, B**) et 8 mois (**C, D**). **E – H** : Expression de HIF-1A dans le cortex (**E, G**) et l'hippocampe (**F, H**) des animaux âgés de 5 mois (**E, F**) et 8 mois (**G, H**). **A, B, E, F** : n = 5 par groupe. **C, G** : WT-No : n = 5 ; WT-HI : n = 5 ; THY-Tau22-No : n = 4 ; THY-Tau22-HI : n = 6. **D, H** : WT-No : n = 6 ; WT-HI : n = 5. * p < 0,05, test Mann et Whitney. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente. ND : Non Disponible.

Ces analyses ont permis de mettre en évidence une augmentation significative (d'environ 50%) d'expression génique de VEGF-A sous hypoxie, comparativement aux animaux exposés à la normoxie. Cette augmentation n'est pas retrouvée dans les échantillons corticaux des souris WT âgées de 8 mois soumises au protocole d'hypoxie intermittentes, probablement en raison d'une trop grande variabilité interindividuelle dans le groupe contrôle.

En revanche, aucune variation significative entre les animaux exposés au protocole d'HI et les animaux contrôles n'a pu être observée en ce qui concerne l'expression génique de HIF-1A.

Au niveau protéique, nous avons également réalisé des immunomarquages anti-VEGF sur une série de coupes cérébrales pour chaque animal âgé de 5 mois, soit un total de 40 animaux (Figure 38). Les quantifications du marquage anti-VEGF réalisées dans le cortex et l'hippocampe de ces animaux n'ont pas permis de mettre en évidence de différence des quantités protéiques de VEGF sous hypoxie, indépendamment de la lignée murine étudiée (WT ou THY-Tau22).

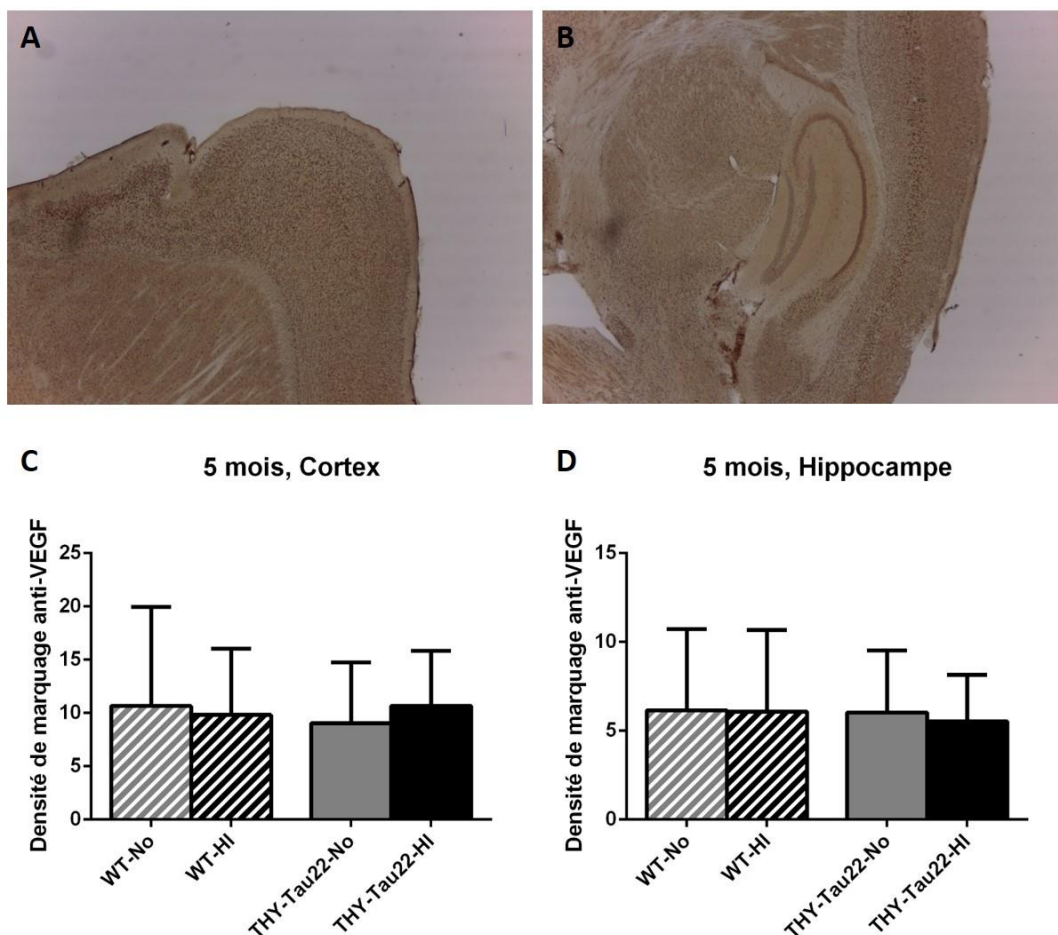


Figure 38 : Immunomarquages anti-VEGF réalisés dans le cortex (A, C) et l'hippocampe (B, D) des animaux WT et THY-TAU22 âgés de 5 mois. **A, B** : exemple d'immunomarquages anti-VEGF dans le cortex (**A**) et l'hippocampe (**B**). **C, D** : Quantifications de la densité de marquage anti-VEGF (reflet de la quantité protéique) dans le cortex (**C**) et l'hippocampe (**D**) des animaux WT et THY-Tau22 contrôles et exposés au protocole d'hypoxies intermittentes. N = 20 coupes cérébrales (issues de 10 animaux différents) par groupe. Test Mann et Whitney : aucune différence significative. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente.

Remarque :

En l'absence de variation d'immunomarquage anti-VEGF chez les souris âgées de 5 mois (alors que ces animaux présentent vraisemblablement une meilleure réponse à l'hypoxie que les animaux âgés de 8 mois en ce qui concerne l'EPO et le VEGF), et en raison du faible nombre de coupes de cerveau encore disponibles, nous n'avons pas réalisé de marquage anti-VEGF chez les animaux âgés de 8 mois, afin de conserver du matériel.

L'étude des enregistrements de SaO₂ et FC en fonction de la FiO₂ imposée aux animaux nous indique que les animaux des groupes HI ont bien été sensibles au protocole d'hypoxies intermittentes que nous avons appliqué, et que l'organisme des animaux transgéniques répond similairement à celui des animaux contrôles au stress hypoxique intermittent. De plus, une perte de poids significative a pu être relevée pour l'ensemble des groupes d'animaux exposés au protocole d'hypoxies intermittentes, en accord avec les données de la littérature. Enfin, une modification des marqueurs d'hypoxie testés a pu être observée sous hypoxie, au niveau périphérique et au niveau central.

L'ensemble de ces résultats valide le protocole d'hypoxies intermittentes utilisé au cours de cette étude. La lignée transgénique THY-Tau22 semble réagir de façon similaire au stress hypoxique comparativement aux animaux littermates.

B) *Effets du protocole d'hypoxies intermittentes sur la mémoire à court terme des animaux*

Préambule :

Lorsque nous avons réalisé nos expérimentations sur la première série d'animaux (ceux âgés de 5 mois), la réalisation d'un test comportemental s'était avérée impossible car le laboratoire d'accueil n'était pas équipé du matériel nécessaire, et que nous n'avions pas mis au point de test comportemental transportable de Lille à Grenoble. Les seules données comportementales disponibles chez les animaux exposés au protocole d'HI concernent donc les animaux âgés de 8 mois.

La **figure 39** présente les résultats du test de reconnaissance d'objets réalisé le 14^{ème} jour du protocole d'exposition à l'hypoxie intermittente.

Au cours de ce test, les animaux du groupe WT-No (groupe de référence sur le plan cognitif) ont, comme attendu, montré une préférence significative pour l'exploration du nouvel objet, témoignant de l'efficacité de leur mémoire à court terme.

Concernant les animaux contrôles de la lignée transgénique (les souris THY-Tau22-No), la valeur de l'index de reconnaissance est proche de zéro, témoignant de l'absence de préférence d'exploration de l'un ou l'autre des deux objets, et donc une altération de la mémoire à court terme (**Figure 39, A**). Ces résultats sont cohérents avec l'état d'avancement

de la pathologie Tau dans ce modèle transgénique et l'atteinte mnésique qui avait déjà été décrite au sein du laboratoire à cet âge (Troquier et al., 2012).

Concernant les animaux de type sauvage exposés au protocole d'HI, bien que l'IR moyen reste positif (Figure 39, A), lorsque l'on s'intéresse à la discrimination de chaque objet, la préférence pour l'exploration du nouvel objet n'est plus significative (Figure 39, B). Il semble donc que le protocole d'HI puisse affecter la mémoire à court terme des animaux WT. Ces résultats semblent concorder avec les données de la littérature qui ont mis en évidence des troubles cognitifs sous hypoxie en clinique humaine et dans le cadre de diverses expérimentations réalisées sur l'animal (voir chapitres IV et V de l'introduction de cette thèse).

Enfin, lorsque l'on s'intéresse à la mémoire à court terme des animaux transgéniques exposés au protocole d'hypoxies intermittentes (THY-Tau22-HI), on observe, de façon inattendue, une restauration de leur mémoire à court terme (comparativement aux animaux THY-Tau22-No), leur faculté de discrimination étant alors semblable à celle des animaux de référence dans ce test, les souris WT-No (Figure 39, A).

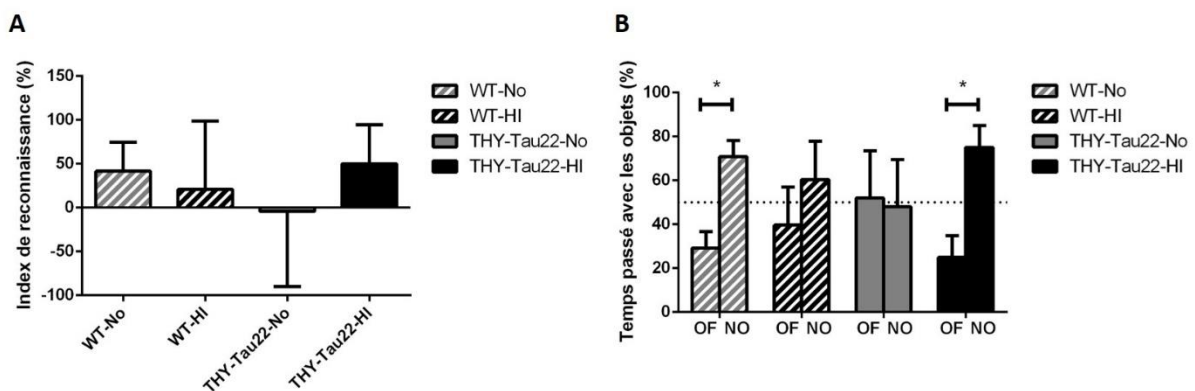


Figure 39 : Résultats du test de reconnaissance d'objets réalisé sur les animaux WT et THY-Tau22 exposés ou non au protocole d'hypoxies intermittentes pendant 14 jours et âgés de 8 mois. **A** : Présentation des résultats sous forme d'index de reconnaissance (IR). Une valeur positive de l'IR témoigne d'un comportement exploratoire préférentiel du nouvel objet. Une valeur négative témoigne d'un comportement exploratoire préférentiel de l'objet familier, un IR nul témoigne d'un comportement exploratoire identique pour les deux objets. **B** : Représentation des pourcentages de temps d'exploration de chaque objet (nouvel objet et objet familier) pour les 4 groupes d'animaux. Les temps d'exploration de chaque objet ont été comparés entre eux par un test Mann et Whitney (* $p < 0,05$). WT-No : $n = 5$; WT-HI : $n = 5$; THY-Tau22-No : $n = 4$; THY-Tau22-HI : $n = 5$. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente ; OF : Objet Familier ; NO : nouvel objet.

L'étude de la mémoire à court terme des animaux grâce au test de reconnaissance d'objets nous a permis d'observer un effet délétère de l'hypoxie intermittente chez les animaux WT âgés de 8 mois, comme attendu au regard des données de la littérature actuelle. En revanche, il semblerait que ce protocole ait eu un effet bénéfique sur la mémoire à court terme de notre modèle transgénique THY-Tau22 au même âge.

C) Etude de la protéine Tau

Afin de déterminer si le stress hypoxique intermittent de notre protocole pouvait agir sur la protéine Tau, nous avons réalisé plusieurs études complémentaires de cette dernière, par différentes approches méthodologiques :

- Dosage plasmatique des protéines Tau humaines chez la souris THY-Tau22 ;
- Marquages immunohistochimiques utilisant des anticorps dirigés contre différents états (hyper-phosphorylation, conformation pré-agrégative, agrégation) de la protéine Tau ;
- Etude transcriptomique du tissu cérébral pour analyser l'expression des gènes codant pour la protéine Tau humaine et la protéine Tau murine ;
- Analyses biochimiques permettant une étude précise de l'état de phosphorylation de la protéine Tau et de son agrégation (grâce au fractionnement soluble/insoluble).

(1) Dosage des protéines Tau humaines dans le plasma des souris THY-Tau22

Dans un premier temps, nous avons effectué un dosage des quantités plasmatiques de protéine Tau humaine pour l'ensemble de nos animaux transgéniques âgés de 5 et 8 mois (n = 8 à 10 dans chaque groupe), et soumis ou non au protocole d'HI. Les résultats de ces dosages sont présentés dans la [figure 40](#). Une diminution significative (de l'ordre de 50%) des quantités de protéines Tau humaines circulantes a été observée sous hypoxie, chez les animaux transgéniques âgés de 5 et 8 mois.

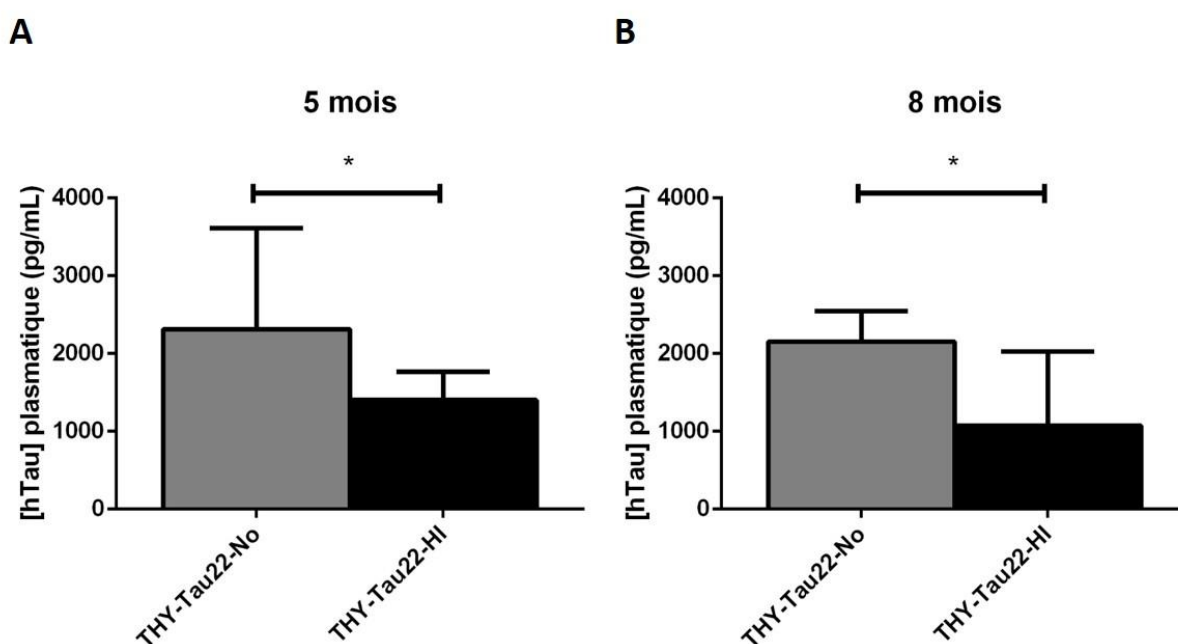


Figure 40 : Dosages ELISA des protéines Tau humaines (hTau) dans le plasma des souris THY-Tau22 âgées de 5 mois (A) et 8 mois (B), exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes. A : Animaux âgés de 5 mois : THY-Tau22-No : n = 10 ; THY-Tau22-HI : n = 9. B : Animaux âgés de 8 mois : THY-Tau22-No : n = 8 ; THY-Tau22-HI : n = 10. * p < 0,05 ; test Mann et Whitney. No : Normoxie, HI : Hypoxie Intermittente.

Remarque :

En raison du volume limité de plasma collecté lors de la mise à mort des animaux et de la réalisation préalable des dosages ELISA de l'EPO et du VEGF plasmatiques, nous ne disposions plus d'échantillons à doser pour quelques animaux (1 souris THY-Tau22-HI âgée de 5 mois, 1 souris THY-Tau22-No âgée de 8 mois et 1 souris THY-Tau22-HI âgée de 8 mois) lors du dosage ELISA des protéines Tau humaines.

Le protocole d'hypoxies intermittentes utilisé dans ce travail de thèse entraîne une réduction significative des quantités plasmatiques de protéines Tau humaines dans notre modèle murin transgénique à 5 mois et 8 mois.

(2) Analyses immunohistologiques chez les souris THY-Tau22

Afin d'étudier le développement de la pathologie Tau dans le cerveau des animaux transgéniques, et plus particulièrement au niveau de l'hippocampe, nous avons réalisé des immunomarquages anti-Tau sur plusieurs séries de coupes cérébrales, et nous avons ensuite évalué la densité de marquage hippocampique. Cette approche méthodologique par immunohistochimie permet une étude semi-quantitative des quantités protéiques retrouvées dans le tissu cérébral.

Dans le cerveau des animaux âgés de 5 mois (n = 10 animaux par groupe), nous avons pu observer un marquage AT8 positif, ainsi qu'un début de marquage MC1 dans la CA1 de l'hippocampe (Figure 41).

Pour rappel, l'anticorps AT8 reconnaît les protéines Tau hyperphosphorylées ; et l'anticorps MC1 reconnaît quant-à-lui un changement de conformation de la protéine Tau ; changement conformationnel survenant juste avant l'agrégation de la protéine Tau (on parle donc de stade pré-agrégatif).

Ces observations sont cohérentes avec le développement de la pathologie attendu à cet âge (Schindowski et al., 2006).

Bien qu'une tendance à l'augmentation du signal chez les animaux soumis au protocole d'hypoxies intermittentes semble exister à cet âge pour les deux anticorps testés, aucune différence significative n'a toutefois pu être observée.

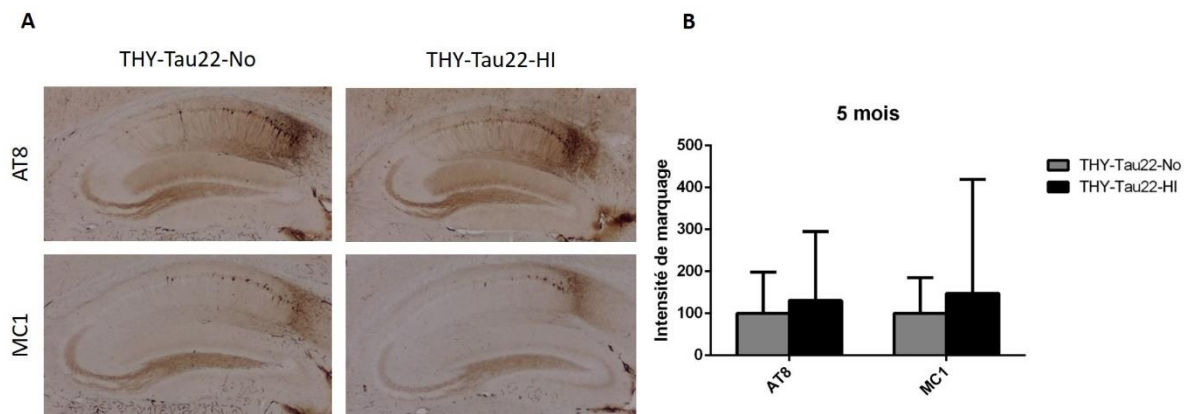


Figure 41 : Marquages immunohistochimiques de la protéine Tau dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 5 mois exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes. **A** : Immunohistochimies AT8 et MC1 réalisées dans l'hippocampe des souris transgéniques THY-Tau22 âgées de 5 mois. **B** : Quantifications de la densité des marquages anti-Tau (reflet de la quantité protéique) dans l'hippocampe des animaux. n = 10 par groupe. Test Mann et Whitney : aucune différence significative. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente.

Nous avons également réalisé ces mêmes marquages immunohistochimiques chez les animaux transgéniques âgés de 8 mois, exposés ou non au protocole d'hypoxies intermittentes (THY-Tau22-No : n = 9 ; THY-Tau22-HI : n = 11).

En complément des marquages AT8 et MC1 ; nous avons effectué un marquage AT100 (pour mémoire, cet anticorps reconnaît les protéines Tau agrégées) chez ces animaux (**Figure 42**).

Ces immunomarquages nous ont permis de mettre en évidence une augmentation du marquage MC1 dans l'hippocampe des animaux âgés de 8 mois, comparativement aux animaux âgés de 5 mois (**Figure 42**), ce qui témoigne d'un développement de la pathologie Tau, comme attendu en raison du vieillissement des animaux (Schindowski et al., 2006). Un marquage positif pour AT100 a également pu être observé chez les animaux âgés de 8 mois, témoignant de la présence de protéines Tau agrégées dans l'hippocampe des animaux.

En revanche, de la même façon que chez les animaux âgés de 5 mois, les quantifications de la densité de marquage dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 8 mois n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les animaux du groupe contrôle (No) et ceux exposés au protocole d'hypoxies intermittentes (HI) (**Figure 42**).

Concernant le marquage MC1, il semblerait toutefois que les animaux exposés au protocole d'HI présentent une tendance à l'augmentation (non significative) des quantités de protéines Tau à un stade pré-agrégatif, cette observation n'étant pas associée avec une augmentation du marquage AT100 (donc des protéines Tau agrégées).

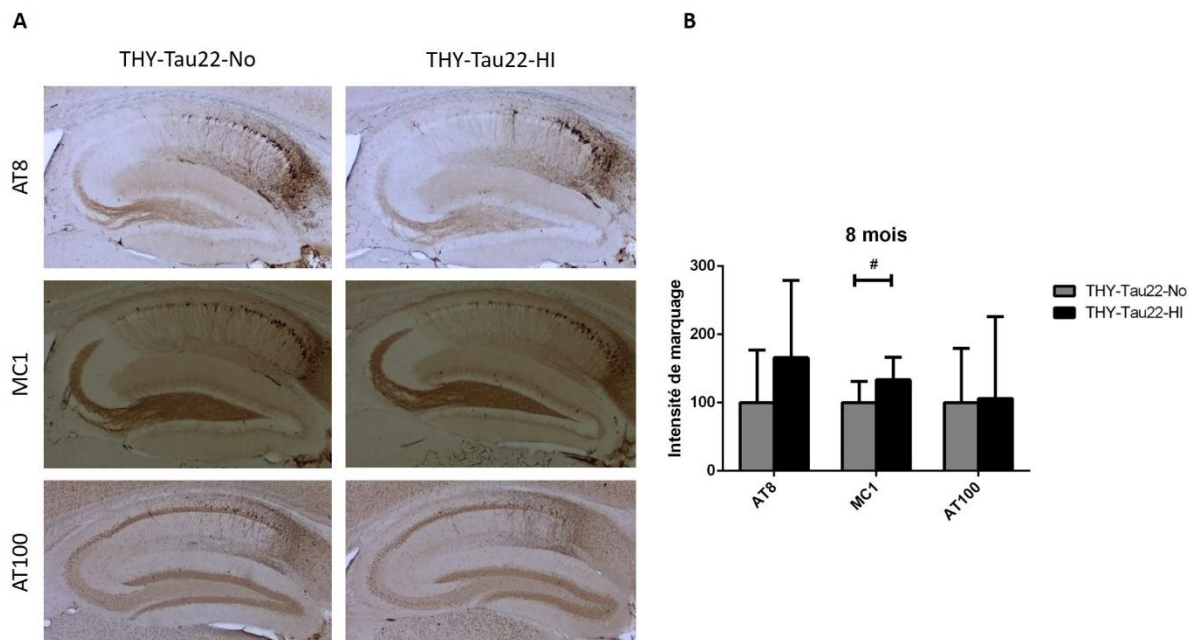


Figure 42 : Marquages immunohistochimiques de la protéine Tau dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 8 mois exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes. **A** : Immunohistochimies AT8, MC1 et AT100 réalisées dans l'hippocampe des souris transgéniques THY-Tau22 âgées de 8 mois. **B** : Quantifications de la densité des marquages anti-Tau (reflet de la quantité protéique) dans l'hippocampe des animaux. THY-Tau22-No : n = 9 ; THY-Tau22-HI : n = 11. Test Mann et Whitney : aucune différence significative, mais # p = 0,0640. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente.

Les analyses immunohistologiques réalisées sur les coupes cérébrales des animaux transgéniques âgés de 5 et 8 mois ne nous ont pas permis de mettre en évidence un effet significatif de notre protocole d'hypoxies intermittentes sur les quantités de protéines Tau hyperphosphorylées ni celles se trouvant à un stade agrégé dans l'hippocampe. En revanche, nous avons pu observer un développement de la pathologie Tau associé au vieillissement des animaux, comme attendu à ces âges.

(3) Analyses transcriptomiques : expression cérébrale des gènes codant pour les protéines Tau humaine et murine sous hypoxie intermittente

(a) Expression cérébrale du gène codant pour la protéine Tau murine

Afin de déterminer si notre protocole d'hypoxies intermittentes pouvait affecter la protéine Tau murine chez nos animaux, nous avons effectué une analyse transcriptomique à partir des échantillons cérébraux de cortex et d'hippocampe issus des animaux WT et des animaux transgéniques THY-Tau22 ; âgés de 5 mois et 8 mois. Dans le cadre de ces études transcriptomiques, nous avons utilisé les échantillons de cortex et d'hippocampe issus de la moitié des animaux de chaque groupe, à l'exception des souris THY-Tau22 âgées de 8 mois pour lesquelles nous ne disposons plus d'échantillons d'hippocampe, ceux-ci ayant été utilisés dans leur intégralité pour les analyses biochimiques.

(i) Animaux WT

L'étude transcriptomique d'expression du gène codant pour la protéine Tau murine (mTau) n'a pas permis de mettre en évidence, chez les animaux WT, de différence entre les groupes exposés à l'hypoxie intermittente (WT-HI) et des groupes contrôles (WT-No) dans le cortex et l'hippocampe des animaux âgés de 5 mois (Figure 43, A) et 8 mois (Figure 43, B).

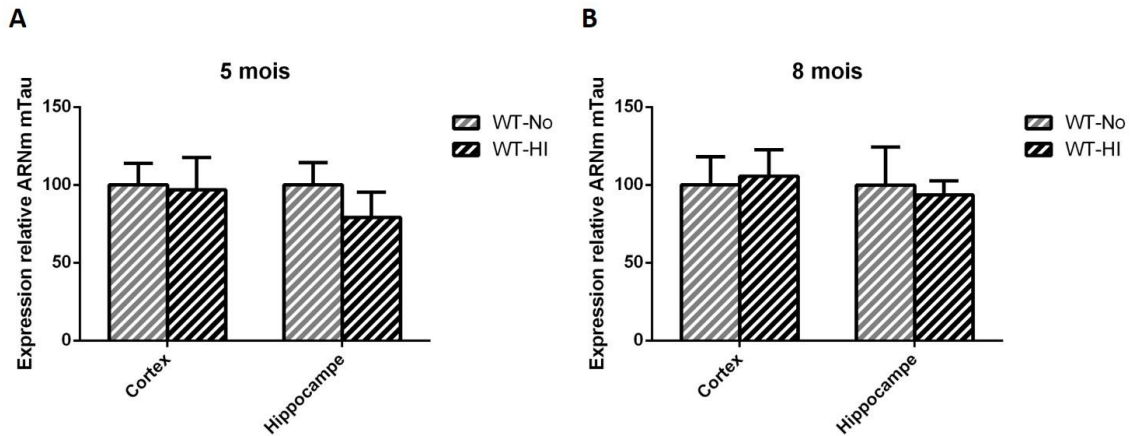


Figure 43 : Représentation des résultats des études transcriptomiques d'expression du gène codant pour la protéine Tau murine (mTau) dans le cortex et l'hippocampe des animaux WT âgés de 5 mois (A) et 8 mois (B). A : n = 5 par groupe. B : Cortex : n = 5 par groupe ; Hippocampe : WT-No : n = 6 ; WT-HI : n = 5. Test Mann et Whitney : aucune différence significative entre les groupes contrôles (No) et les groupes exposés à l'hypoxie intermittente (HI). No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente.

(ii) Animaux THY-Tau22

De la même façon que chez les animaux WT, l'étude transcriptomique d'expression du gène codant pour la protéine Tau murine (mTau) dans le cortex et l'hippocampe des animaux transgéniques THY-Tau22 âgés de 5 mois (Figure 44, A) ainsi que dans le cortex des animaux THY-Tau22 âgés de 8 mois (Figure 44, B) n'ont pas permis d'observer de variation d'expression entre les animaux contrôles (No) et ceux exposés au protocole d'hypoxies intermittentes (HI).

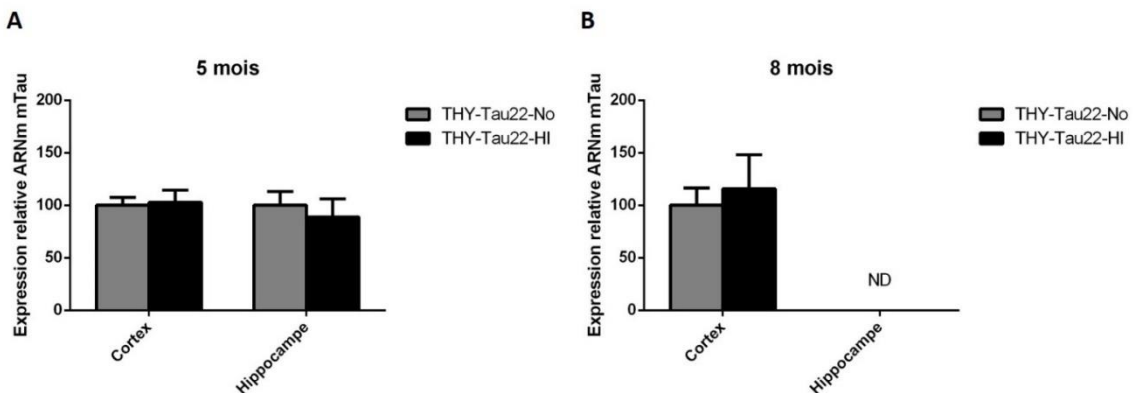


Figure 44 : Représentation des résultats des études transcriptomiques d'expression du gène codant pour la protéine Tau murine dans le cortex et l'hippocampe, chez les animaux transgéniques THY-Tau22 âgés de 5 mois (A) et 8 mois (B). A : n = 5 par groupe. B : THY-Tau22-No : n = 4 ; THY-Tau22-HI : n = 6. Test Mann et Whitney : aucune différence significative entre les groupes contrôles (No) et les groupes exposés à l'hypoxie intermittente (HI). No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente. ND : Non Disponible.

Le protocole d'hypoxies intermittentes utilisé dans le cadre de ces expérimentations ne semble pas affecter l'expression corticale ni hippocampique du gène codant pour la protéine Tau murine, chez les animaux WT comme chez les animaux transgéniques THY-Tau22, indépendamment de leur âge (5 ou 8 mois).

(b) Expression cérébrale du transgène (codant pour la protéine Tau humaine) chez les animaux THY-Tau22

En parallèle de l'étude transcriptomique d'expression du gène codant pour la protéine Tau murine, nous avons également évalué l'expression du transgène (gène codant pour la protéine Tau humaine : hTau) dans le cortex et l'hippocampe de notre modèle THY-Tau22. Ainsi, de la même façon que précédemment, les échantillons de cortex et d'hippocampe de la moitié des animaux âgés de 5 mois, ainsi que des échantillons de cortex de la moitié des animaux âgés de 8 mois ont été utilisés pour ces expérimentations.

Alors que le stress hypoxique intermittent ne semblait pas affecter l'expression cérébrale du gène codant pour la protéine Tau murine, il semble en revanche qu'il puisse affecter celle du gène codant pour la protéine Tau humaine. En effet, une augmentation significative d'expression (d'environ 40%) de ce gène a été observée sous hypoxie dans le cortex des animaux transgéniques âgés de 5 mois (Figure 45, A). Cette augmentation significative n'a en revanche pas été observée dans l'hippocampe des mêmes animaux, ni dans le cortex des animaux âgés de 8 mois. Dans ce dernier groupe, une tendance à l'augmentation a toutefois pu être observée (Figure 45, B) sous hypoxie intermittente, bien que la différence d'expression avec le groupe contrôle (No) ne soit pas significative (probablement en raison de la variabilité interindividuelle importante dans ce groupe).

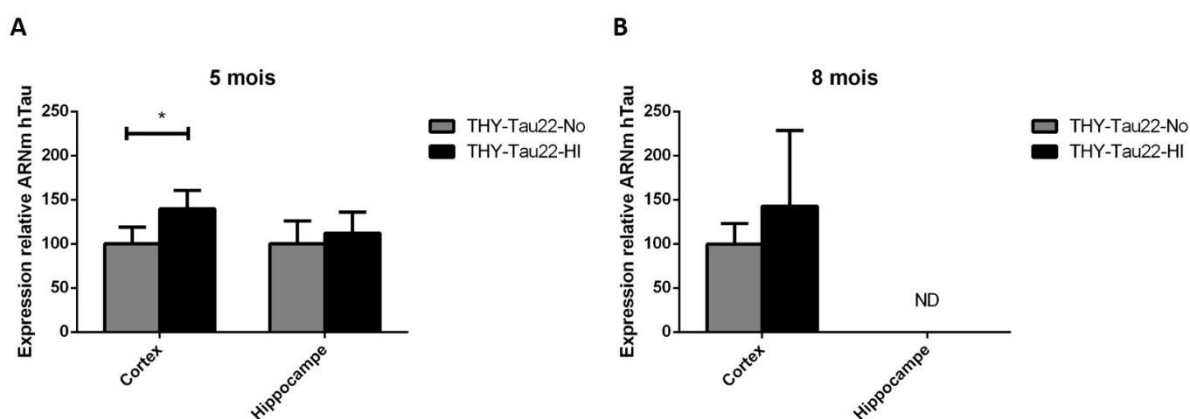


Figure 45 : Représentation des résultats des études transcriptomiques d'expression du gène codant pour la protéine Tau humaine dans le cortex et l'hippocampe, chez les animaux transgéniques THY-Tau22 âgés de 5 mois (A) et 8 mois (B). A : n = 5 par groupe. B : THY-Tau22-No : n = 4 ; THY-Tau22-HI : n = 6. * p < 0,05, test Mann et Whitney. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente. ND : Non Disponible.

Le stress hypoxique intermittent appliqué aux animaux dans le cadre de ce travail de thèse pourrait entraîner une augmentation de l'expression du gène codant pour la protéine Tau humaine dans le cortex des animaux transgéniques âgés de 5 mois (et éventuellement dans celui des animaux âgés de 8 mois).

(4) Analyses biochimiques : expression cérébrale des protéines Tau humaine et murine sous hypoxie intermittente

Afin de déterminer si un stress hypoxique intermittent pouvait modifier l'état de phosphorylation de la protéine Tau, une part importante de nos travaux de thèse a été consacrée à la réalisation d'analyses biochimiques à partir des hippocampes des animaux WT et THY-Tau22 exposés ou non au protocole d'hypoxies intermittentes, âgés de 5 et 8 mois.

(a) Analyses SDS-PAGE de la phosphorylation des protéines Tau humaine et murine

Dans un premier temps, nous avons réalisé des électrophorèses SDS-PAGE à partir des hippocampes de 5 souris de chaque groupe expérimental, afin d'étudier la phosphorylation (grâce aux anticorps pS396, Tau-1, 12E8, pS404, AT8, AT100 et AT180) et les quantités totales de protéines Tau (grâce aux anticorps Tau-Nter et Tau-Cter reconnaissant l'ensemble des protéines Tau, phosphorylées ou non).

(i) Animaux WT

Concernant les animaux WT âgés de 5 mois, nous n'avons pas mis en évidence de variation de phosphorylation des protéines Tau ni des quantités de protéines Tau totales dans l'hippocampe des animaux exposés au protocole d'hypoxies intermittentes (WT-HI) comparativement aux animaux contrôles (WT-No) (Figure 46).

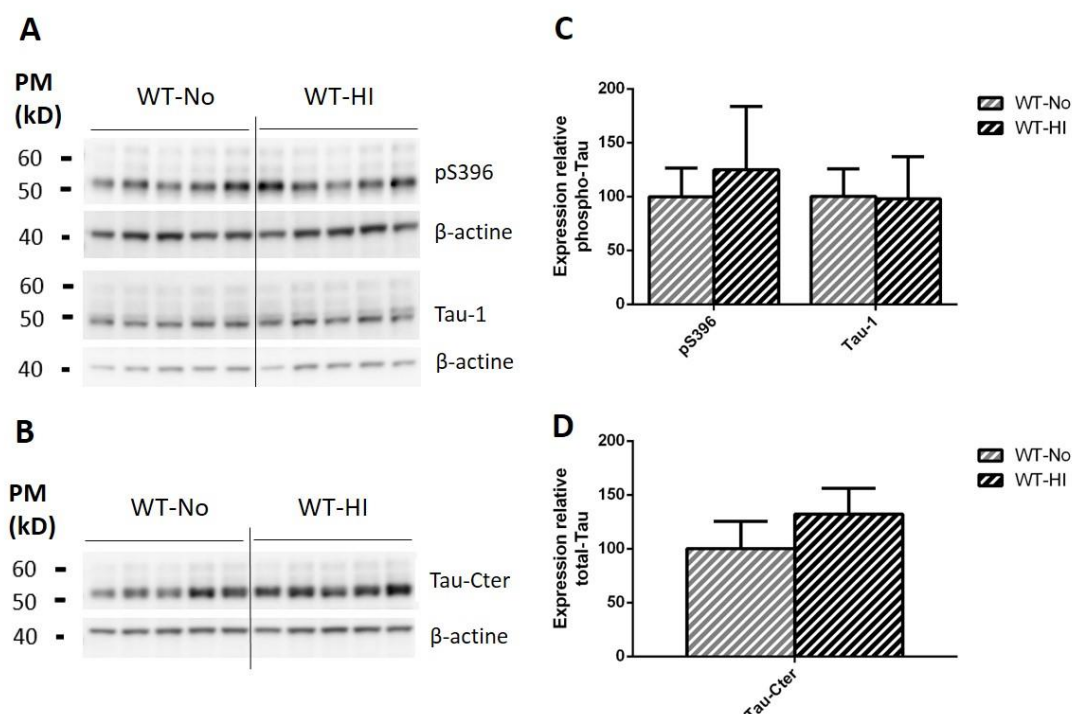


Figure 46 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris WT âgées de 5 mois et exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes. **A**, **B** : immunomarquages des protéines Tau phosphorylées (**A**) et totales (**B**) chez les souris WT-No (n = 5) et WT-HI (n = 5). **C**, **D** : Quantifications des immunomarquages des protéines Tau phosphorylées (**C**) et totales (**D**). Les résultats ont été normalisés sur la β-actine. Test de Mann et Whitney : pas de différence significative entre les animaux exposés à la normoxie et ceux soumis au protocole d'hypoxies intermittentes. No : Normoxie, HI : Hypoxie Intermittente.

De la même façon, nous avons réalisé des immunomarquages dirigés contre la protéine Tau dans l'hippocampe de souris WT âgées de 8 mois exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes (n = 5 par groupe). A nouveau, ces analyses biochimiques ne nous ont pas permis de mettre en évidence de variation de phosphorylation de la protéine Tau ni des quantités de protéines Tau totales chez les animaux exposés au protocole d'HI (Figure 47).

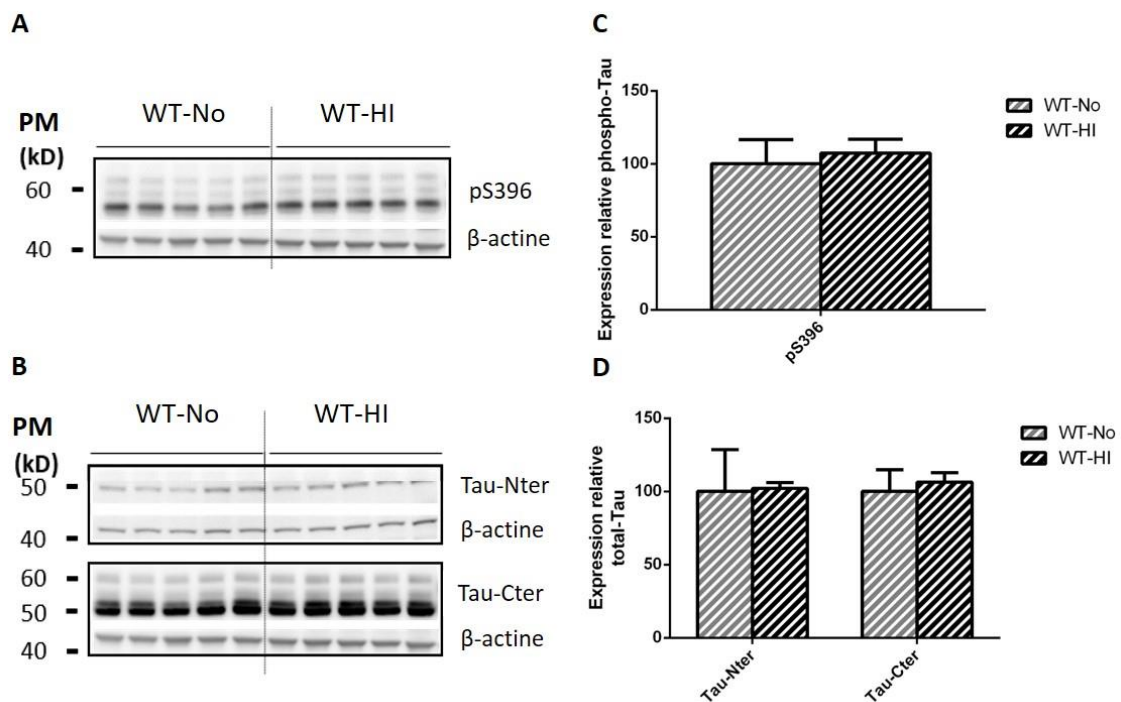


Figure 47 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris WT âgées de 8 mois et exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes. **A**, **B** : immunomarquages des protéines Tau phosphorylées (**A**) et totales (**B**) chez les souris WT-No (n = 5) et WT-HI (n = 5). **C**, **D** : Quantifications des immunomarquages des protéines Tau phosphorylées (**C**) et totales (**D**). Les résultats ont été normalisés sur la β-actine. Test de Mann et Whitney : pas de différence significative entre les animaux exposés à la normoxie et ceux soumis au protocole d'hypoxies intermittentes. No : Normoxie, HI : Hypoxie Intermittente.

Les analyses biochimiques de la protéine Tau murine réalisées dans l'hippocampe des souris WT âgées de 5 et 8 mois ne nous ont pas permis de mettre en évidence d'effet du protocole d'hypoxies intermittentes sur la phosphorylation ni les quantités de protéines Tau totales. Notre protocole d'hypoxies intermittentes ne semble donc pas affecter la biologie de la protéine Tau murine.

(ii) Animaux THY-Tau22

En parallèle de nos études biochimiques réalisées chez les souris WT, nous avons également réalisé des immunomarquages dirigés contre les protéines Tau (phosphorylées et totales) dans notre modèle transgénique THY-Tau22 exposé ou non au protocole d'hypoxies intermittentes à l'âge de 5 et 8 mois.

Les immunomarquages réalisés chez les animaux transgéniques âgés de 5 mois nous ont permis de mettre en évidence une diminution de la phosphorylation de la protéine Tau au niveau des sérines 262 et 356 (anticorps 12E8), ainsi qu'une tendance à la déphosphorylation de la sérine 396 chez les animaux exposés au protocole d'hypoxies intermittentes (Figure 48).

Cette déphosphorylation ne semble pas s'accompagner d'une baisse des quantités totales de protéines Tau, l'immunomarquage Tau-Cter étant stable sous hypoxie.

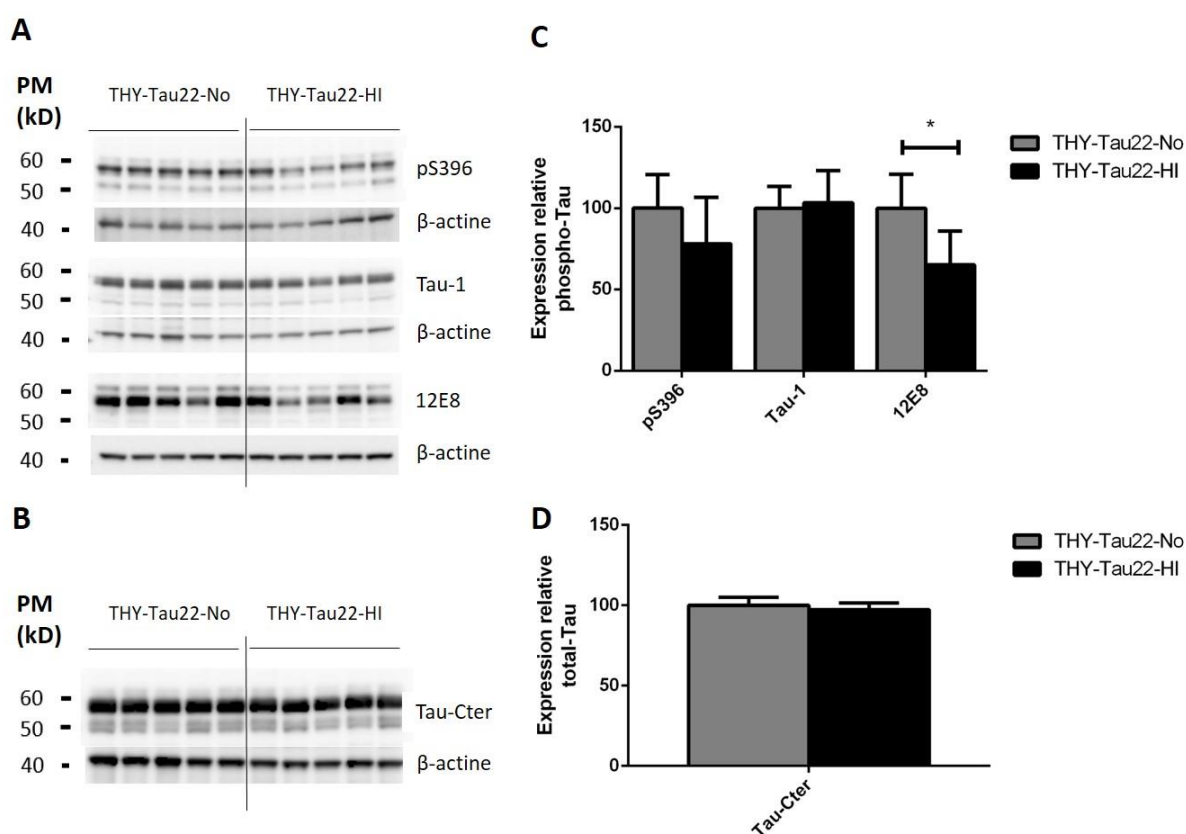


Figure 48 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris THY-Tau22 âgées de 5 mois et exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes. **A, B** : immunomarquages des protéines Tau phosphorylées (**A**) et totales (**B**) chez les souris THY-Tau22-No (n = 5) et THY-Tau22-HI (n = 5). **C, D** : Quantifications des immunomarquages des protéines Tau phosphorylées (**C**) et totales (**D**). Les résultats ont été normalisés sur la β -actine. * $p < 0,05$ (Test de Mann et Whitney). No : Normoxie, HI : Hypoxie Intermittente.

De façon similaire, les immunomarquages anti-Tau réalisés chez les souris transgéniques THY-Tau22 âgées de 8 mois nous ont permis de mettre en évidence une déphosphorylation significative sur de nombreux épitopes de la protéine Tau sous hypoxie : sérines 262 et 356 (12E8), sérine 396 (pS396), sérine 202 et thréonine 205 (AT8). Une tendance à la déphosphorylation sur la thréonine 212 et la sérine 214 (AT100, qui reconnaît les protéines Tau agrégées) a également été observée chez ces animaux hypoxiés (Figure 49).

Cette déphosphorylation de la protéine Tau semble s'accompagner d'une diminution des quantités totales de protéines Tau, bien que seul le marquage Tau-Cter diminue sous hypoxie ; le marquage Tau-Nter restant comparable à celui observé chez les animaux contrôles THY-Tau22-No.

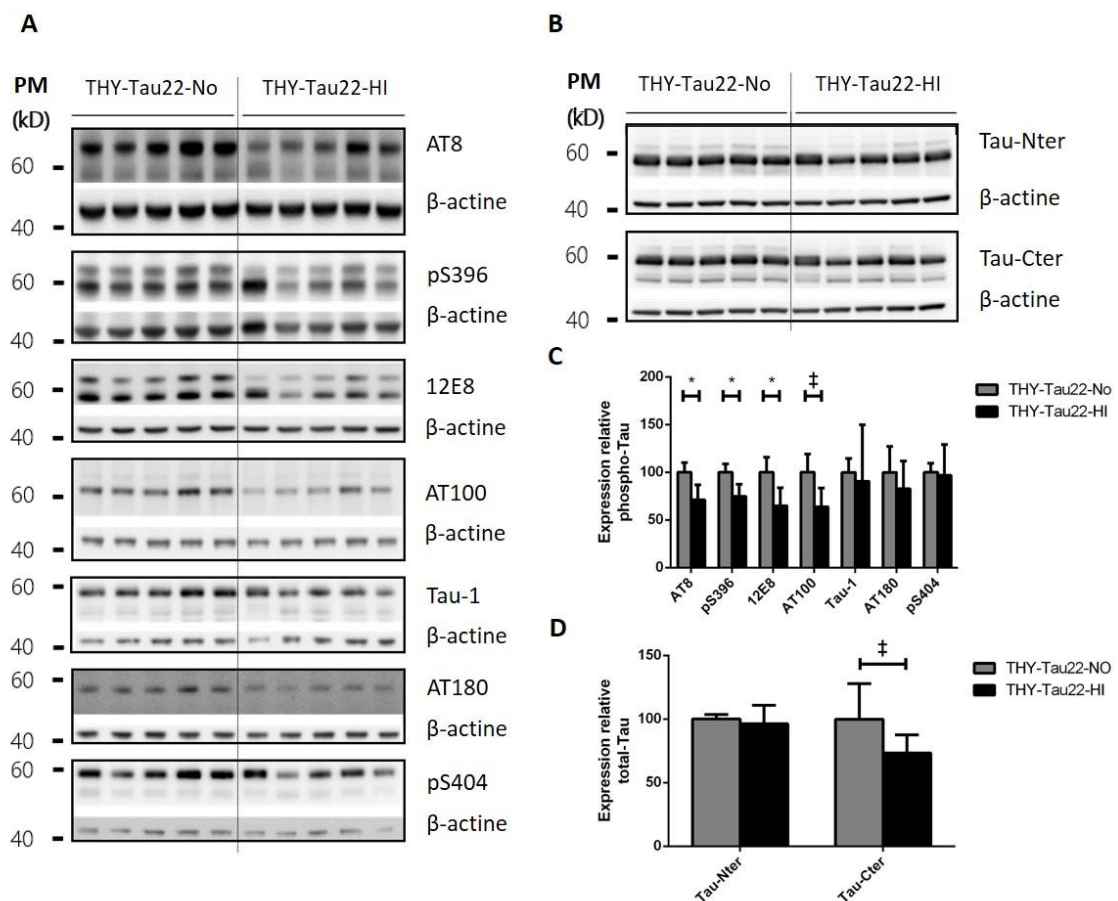


Figure 49 : Western Blots représentatifs des marquages anti-Tau réalisés chez les souris THY-Tau22 âgées de 8 mois et exposées ou non au protocole d'hypoxies intermittentes. **A, B** : immunomarquages des protéines Tau phosphorylées (**A**) et totales (**B**) chez les souris THY-Tau22-No (n = 5) et THY-Tau22-HI (n = 5). **C, D** : Quantifications des immunomarquages des protéines Tau phosphorylées (**C**) et totales (**D**). Les résultats ont été normalisés sur la β-actine. * p < 0,05 ; ‡ p = 0,0556 (Test de Mann et Whitney). No : Normoxie, HI : Hypoxie Intermittente.

Notre protocole d'hypoxies intermittentes semble être à l'origine d'une déphosphorylation de la protéine Tau humaine dans notre modèle murin transgénique THY-Tau22. Son effet sur les quantités totales de protéines Tau reste indéterminé.

(b) Fractionnement Soluble/Insoluble à partir des hippocampes de souris THY-Tau22 âgées de 8 mois

La dernière partie de nos expérimentations consacrées à l'étude de la protéine Tau sous hypoxie a été réalisée chez les animaux transgéniques THY-Tau22 âgés de 8 mois, exposés ou non au protocole d'hypoxies intermittentes.

Pour cela, nous avons réalisé un fractionnement soluble/insoluble à partir des hippocampes prélevés lors de la mise à mort des animaux, puis nous avons réalisé une électrophorèse SDS-PAGE afin de séparer selon leur poids moléculaire les protéines contenues dans les fractions solubles (à savoir la fraction soluble et la fraction hypersoluble issues des ultracentrifugations réalisées lors du fractionnement) et celles contenues dans la fraction insoluble (c'est-à-dire dans le culot issu du fractionnement).

Des immunomarquages anti-Tau ont ensuite été effectués, afin de visualiser la répartition dans les différentes fractions des protéines Tau totales (grâce aux anticorps dirigés contre les extrémités amino- et carboxy-terminales de Tau). Pour ces deux anticorps, nous avons quantifié le signal dans chaque puits ; soit 2 signaux correspondant aux fractions solubles (soluble + hypersoluble) ainsi que le signal correspondant à la fraction insoluble. Nous avons ensuite effectué, pour chaque animal, un rapport insoluble/(soluble + hypersoluble), et nous avons ensuite moyenné ces rapports pour les 6 animaux de chaque groupe.

La **figure 50** présente les immunomarquages et les moyennes des ratios insoluble/soluble réalisés à partir de 6 animaux de chaque groupe expérimental (THY-Tau22-No : n = 6 ; THY-Tau22-HI : n = 6).

Ces résultats nous indiquent que, dans l'hippocampe des animaux, le ratio insoluble/soluble diminue significativement sous hypoxie intermittente. En d'autres termes, les animaux transgéniques exposés au protocole d'hypoxies intermittentes présentent significativement moins de protéines Tau insolubles (les protéines Tau agrégées) que les animaux contrôles exposés à la normoxie.

En complément de ces analyses, nous avons réalisé un immunomarquage AT100 (permettant de marquer les protéines Tau agrégées) sur les mêmes échantillons. Bien que nous n'ayons pas pu effectuer de quantifications en raison d'un trop faible signal détecté, nous avons pu constater, sur le plan qualitatif, un signal AT100 dans la fraction insoluble inférieur chez les animaux hypoxiés, comparativement aux souris contrôles. Cette observation renforce donc les résultats précédents.

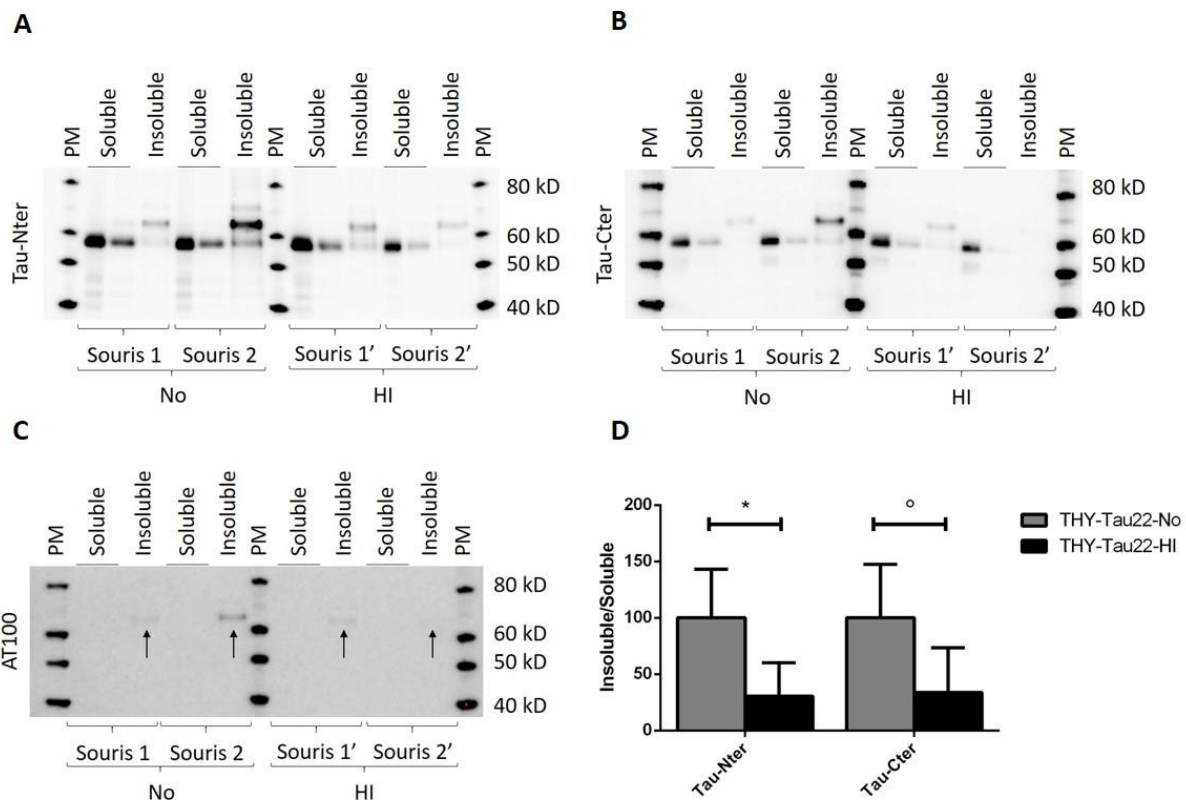


Figure 50 : Effet du protocole d'hypoxies intermittentes sur le ratio insoluble/soluble de la protéine Tau dans l'hippocampe des souris transgéniques THY-Tau22 âgées de 8 mois. **A – C** : Immunomarquages représentatifs des fractions solubles et de la fraction insoluble de la protéine Tau. Trois épitopes ont été évalués : Tau-Nter (**A**), Tau-Cter (**B**) et AT100 (**C**). Un total de 6 animaux par groupe (THY-Tau22-No et THY-Tau22-HI) a été évalué : souris numéro 1 à 6 pour le groupe contrôle (THY-Tau22-No) et numéro 1' à 6' pour le groupe soumis au protocole d'HI (THY-Tau22-HI). Seuls 2 animaux de chaque groupe sont présentés ici. **D** : Quantification du ratio insoluble/soluble pour les deux épitopes reconnaissant l'ensemble des protéines Tau : Tau-Nter et Tau-Cter. * $p < 0,05$; ° $p = 0,0667$; test de Mann et Whitney. PM : Poids Moléculaire. No : normoxie (n = 6), HI : Hypoxie Intermittente (n = 6).

Le protocole d'hypoxies intermittentes utilisé dans le cadre de ces expérimentations a entraîné une diminution significative des quantités de protéines Tau agrégées dans l'hippocampe des animaux transgéniques THY-Tau22.

Les résultats de l'étude de la protéine Tau et ceux des tests comportementaux sous hypoxie intermittente chez les souris transgéniques THY-Tau22 âgées de 8 mois font l'objet d'un article en cours de soumission sous un format court dans European Respiratory Journal. Le manuscrit de cette communication est présenté en annexe de cette thèse.

D) Etude des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation

En complément des expérimentations visant à valider le protocole d'hypoxies intermittentes et de celles ayant évalué la pathologie Tau et la cognition chez les animaux, nous avons réalisé une analyse transcriptomique de différents gènes impliqués dans le stress oxydant et l'inflammation dans le cerveau de nos animaux. En effet, un stress oxydant et une neuro-inflammation avaient déjà été décrits dans la littérature sous hypoxie intermittente.

Pour cela, nous avons utilisé les échantillons de cortex et d'hippocampe de la moitié des animaux de chaque groupe expérimental (WT et THY-Tau22, exposés ou non à l'hypoxie intermittente et âgés de 5 ou 8 mois). Au total, 8 gènes ont été étudiés ; 6 d'entre eux intervenant dans le stress oxydant (MnSOD, CuZnSOD, HO1, NCF1, NRF2 et Keap1) et 2 intervenant dans les processus inflammatoires (TNF α et CCL3).

Globalement, les résultats de cette étude transcriptomique n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet majeur du stress hypoxique intermittent sur ces 8 gènes.

Nous avons toutefois pu noter une diminution significative des taux d'ARNm de MnSOD dans l'hippocampe des souris WT âgées de 5 mois exposées au protocole d'hypoxies intermittentes, ainsi qu'une augmentation quasi-significative des taux de l'expression du gène codant pour CCL3 dans le cortex de ces mêmes animaux (Figure 51). Dans l'hippocampe des souris transgéniques THY-Tau22 du même âge (5 mois), nous avons également pu observer une diminution significative d'expression du gène codant pour NCF1 associée à une diminution quasi-significative des taux d'ARNm de CCL3.

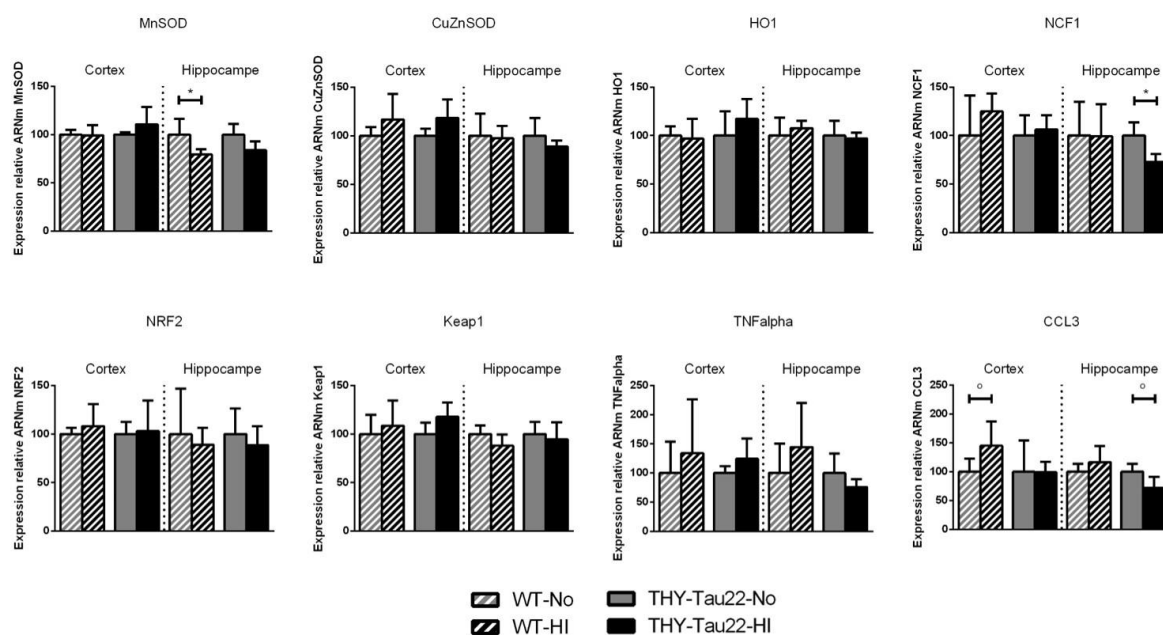


Figure 51 : Etude transcriptomique de différents gènes impliqués dans les processus de stress oxydant et d'inflammation dans le cortex et l'hippocampe des animaux WT et THY-Tau22 âgés de 5 mois et exposés ou non au protocole d'hypoxies intermittentes. n = 5 par groupe. * p < 0,05 ; ° p = 0,0556 (test Mann et Whitney). No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente.

En ce qui concerne les études transcriptomiques réalisées chez les animaux WT et THY-Tau22 âgés de 8 mois, aucune variation d'expression n'a été observée sous hypoxie pour les 8 gènes que nous avons testés (Figure 52).

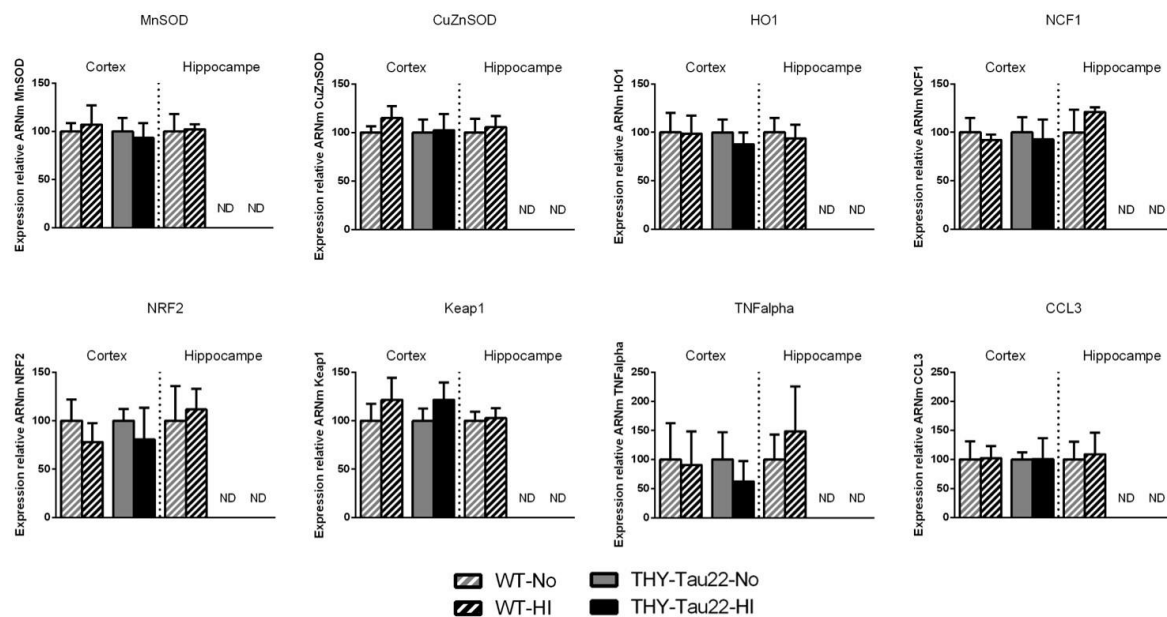


Figure 52 : Etude transcriptomique de différents gènes impliqués dans les processus de stress oxydant et d'inflammation dans le cortex et l'hippocampe des animaux WT et THY-Tau22 âgés de 8 mois et exposés ou non au protocole d'hypoxies intermittentes. **Cortex** : WT-No : n = 5 ; WT-HI : n = 5 ; THY-Tau22-No : n = 4 ; THY-Tau22-HI : n = 6. **Hippocampe** : WT-No : n = 6 ; WT-HI : n = 5. Test Mann et Whitney : aucune différence significative entre les groupes contrôles (No) et les groupes exposés à l'hypoxie intermittente (HI). No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente. ND : Non disponible.

En ce qui concerne les marqueurs de stress oxydant testés, nous avons donc observé une diminution d'expression du gène codant pour MnSOD sous hypoxie dans l'hippocampe des souris WT âgées de 5 mois. D'autre part, une diminution significative d'expression du gène NCF1 a été observée sous hypoxie dans l'hippocampe des animaux transgéniques âgés de 5 mois.

Concernant l'inflammation, nos résultats mettent en évidence un effet opposé de l'hypoxie intermittente chez les animaux WT et THY-Tau22 âgés de 5 mois. Alors que dans le cortex des animaux WT âgés de 5 mois, une augmentation des taux d'ARNm de CCL3 a été observée sous hypoxie, témoignant vraisemblablement de l'existence d'une inflammation, nous avons pu observer à l'inverse une diminution de l'expression du gène CCL3 dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 5 mois sous hypoxie.

Remarque :

Bien que ces données n'aient pas encore été publiées, une élévation des quantités de CCL3 a été observée dans le modèle transgénique THY-Tau22, comparativement aux animaux littermates du même âge ; cette différence apparaissant à partir de l'âge de 3 mois. Cette

diminution d'expression observée sous hypoxie correspondrait donc en réalité plutôt à une « normalisation » des taux d'ARNm de CCL3.

Le protocole d'hypoxies intermittentes utilisé dans le cadre de ce travail de thèse ne semble pas avoir d'effet majeur sur l'expression des différents gènes impliqués dans le stress oxydant et l'inflammation que nous avons testés.

E) Etude d'un marqueur de l'apoptose chez les animaux âgés de 8 mois

La dernière partie de nos travaux de recherche réalisés chez des animaux exposés à un protocole d'hypoxies intermittentes a consisté à effectuer un marquage NeuN (Neuronal Nuclei), c'est-à-dire un marquage des noyaux des neurones afin de déterminer si notre protocole d'hypoxies intermittentes pouvait induire une apoptose chez les animaux WT et THY-Tau22 âgés de 8 mois.

Pour cela, nous avons réalisé un immunomarquage sur des séries de coupes issues de 5 souris de chaque groupe, et nous avons quantifié le marquage NeuN obtenu dans le cortex et l'hippocampe des animaux.

Comme illustré dans la **figure 53**, aucune différence de marquage n'a pu être observée entre les groupes WT et THY-Tau22 âgés de 8 mois et exposés ou non au protocole d'hypoxies intermittentes.

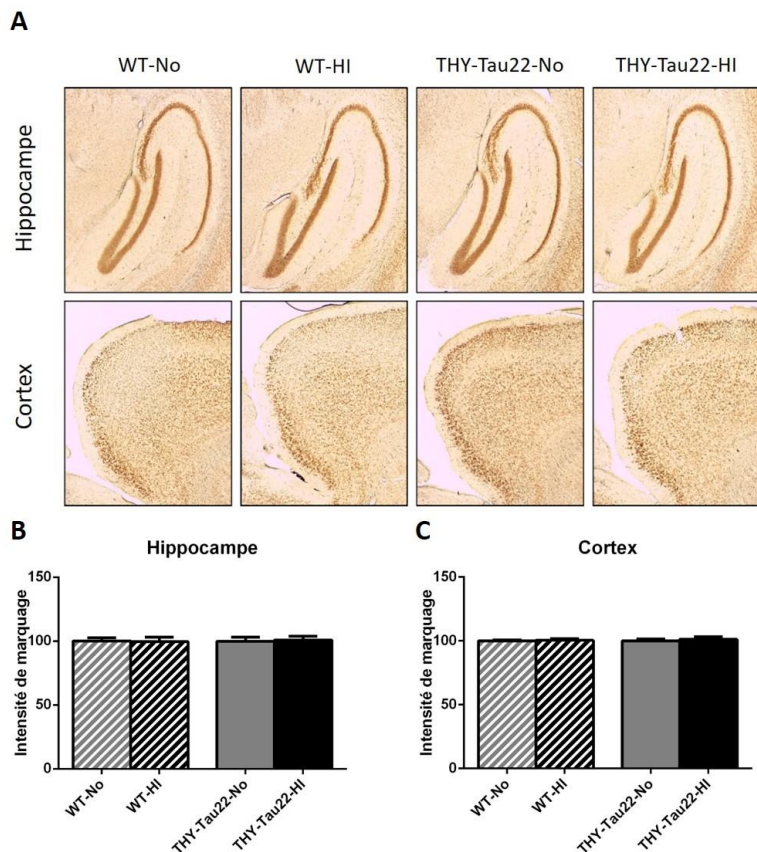


Figure 53 : Immunomarquages anti-NeuN réalisés dans l'hippocampe et le cortex des animaux WT et THY-Tau22 âgés de 8 mois et exposés ou non au protocole d'hypoxies intermittentes. **A** : Marquages immunohistochimiques représentatifs anti-NeuN dans l'hippocampe et le cortex des 4 groupes d'animaux âgés de 8 mois. **B**, **C** : Quantifications de la densité de marquage anti-NeuN (reflet de la quantité protéique) dans l'hippocampe (**B**) et le cortex (**C**) des animaux. n = 5 souris par groupe (8 à 12 coupes d'hippocampe et 2 à 7 coupes de cortex ont été quantifiées pour chaque animal). Test Mann et Whitney : aucune différence significative. No : Normoxie ; HI : Hypoxie Intermittente

Notre protocole d'hypoxies intermittentes ne semble pas induire d'apoptose dans le cortex ni l'hippocampe d'animaux WT et THY-Tau22 âgés de 8 mois.

III. Discussion intermédiaire

A) Validation du protocole d'hypoxies intermittentes

La première partie de ce travail a consisté en la validation du protocole d'HI choisi, afin de s'assurer de l'effet réel de la FiO_2 appliquée sur les organismes des animaux, et de s'assurer que nos animaux transgéniques répondaient au stress hypoxique de façon semblable aux animaux contrôles. Les expérimentations réalisées dans ce sens nous ont permis de confirmer la réponse des organismes animaux à la FiO_2 imposée, puisque nous avons pu observer que celle-ci était parfaitement corrélée avec la SaO_2 mesurée.

Nous avons également pu observer une perte de poids chez les animaux exposés au protocole d'HI similaire à celle rapportée dans la littérature (Polak et al., 2013).

Aucune différence n'a par ailleurs été observée entre les animaux âgés de 5 et 8 mois, ni entre les animaux WT et les animaux transgéniques THY-Tau22, suggérant que l'âge et la présence du transgène n'interfèrent pas dans ces réponses physiologiques (variation de la SaO_2 et du poids) à l'hypoxie.

Concernant l'étude des marqueurs de réponse au stress hypoxique HIF-1 α , VEGF et EPO, les résultats que nous avons observés sont plus surprenants. Dans un premier temps, nous avons réalisé des dosages ELISA de l'EPO et du VEGF murins à partir des échantillons plasmatiques prélevés lors de la mise à mort des animaux.

Comme attendu, nous avons observé une augmentation significative des quantités d'EPO circulantes chez les animaux WT et THY-Tau22 âgés de 5 mois exposés au protocole d'HI. A 8 mois, une tendance à l'augmentation des taux d'EPO plasmatiques semblait persister, même si la différence entre les groupes contrôles et hypoxiés n'était plus significative. Cette élévation globale des quantités d'érythropoïétine consécutive à un stress hypoxique est cohérente au regard des données de la littérature sur le sujet (Cai et al., 2003; Zhang and Krzyzanski, 2014).

Concernant le VEGF, une élévation des concentrations sériques (Gozal et al., 2002) et plasmatiques (Lavie et al., 2002) de VEGF avait été préalablement rapportée dans la littérature chez les patients présentant un SAS, ainsi que dans le sérum de volontaires sains exposés pendant 14 jours à un protocole d'hypoxies intermittentes (Briançon-Marjollet et al., 2014). Le VEGF pouvant être libéré à partir des plaquettes pendant le processus de coagulation *in vitro* (Gunsilius et al., 2000), une critique pourrait toutefois être formulée quant au choix de doser le VEGF à partir d'échantillons sériques. Néanmoins, l'étude de Lavie et collaborateurs (Lavie et al., 2002) ayant mis en évidence des variations plasmatiques de VEGF semblables à celles observées dans le sérum chez des patients présentant un SAS, nous nous attendions à observer une élévation des quantités plasmatiques de ce facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

A l'inverse, les dosages réalisés sur les échantillons plasmatiques de nos animaux ont mis en évidence une diminution significative des taux de VEGF chez les animaux WT et THY-Tau22 âgés de 5 mois et exposés au protocole d'HI, ainsi qu'une tendance à la diminution chez les animaux WT-HI âgés de 8 mois. Les dosages de VEGF plasmatique réalisés chez les animaux

transgéniques THY-Tau22 âgés de 8 mois ne montraient pas de différence entre le groupe contrôle et le groupe hypoxié. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un protocole d'hypoxies intermittentes, nous pouvons tout de même comparer nos résultats avec ceux d'une étude réalisée chez des volontaires sains exposés à une hypoxie aiguë pendant 30 minutes (Oltmanns, 2005). Dans cette étude, les quantités plasmatiques de VEGF ont été mesurées 30 minutes et 180 minutes après l'initiation d'un stress hypoxique d'une durée de 30 minutes (soit des mesures effectuées immédiatement à la fin de l'exposition à l'hypoxie et 150 minutes après celle-ci). Ces mesures ont été comparées à celles effectuées 3 heures avant d'appliquer le stress hypoxique (niveau basal de VEGF). L'hypoxie a été réalisée en ajustant la FiO_2 de l'air que les patients respiraient au travers d'un masque afin d'obtenir une SaO_2 (mesurée en temps réel) égale à 75%, soit une FiO_2 proche de la FiO_2 moyenne chez nos animaux. Les auteurs de cette étude ont mis en évidence une diminution des concentrations de VEGF plasmatique à la fin de l'exposition à l'hypoxie et 150 minutes après (comparativement aux concentrations de base déterminées avant l'hypoxie), sans parvenir à expliquer ces observations. Sur le plan chronologique, le plasma de nos animaux ayant été collecté au moment de la mise à mort (qui a eu lieu entre 10 et 60 minutes après la fin de l'exposition au protocole d'HI), nos résultats semblent donc comparables à ceux de cette étude, bien que la durée du stress hypoxique en lui-même diffère.

Devant ces résultats surprenants, nous avons ensuite cherché à évaluer l'expression protéique et génique du VEGF au niveau central. Dans un premier temps, nous avons donc réalisé un immunomarquage anti-VEGF sur les coupes de cerveau des animaux âgés de 5 mois, animaux pour lesquels nous observions des variations significatives des quantités plasmatiques de VEGF. Les quantifications de densité de marquage réalisées au niveau du cortex et de l'hippocampe des animaux n'ont pas mis en évidence de différence entre les 4 groupes d'animaux, suggérant que la diminution majeure observée en périphérie n'était pas retrouvée au niveau central chez ces animaux.

En complément de ces études biochimiques, nous avons effectué une étude transcriptomique d'expression du gène VEGF-A dans le cerveau des animaux. Une étude récente, utilisant un protocole d'hypoxies intermittentes comparable au notre (FiO_2 variant de 21% à 5% par cycles de 4 minutes, 8 heures par jour, pendant 3 semaines) chez des souris WT s'était également intéressée à l'expression du gène VEGF-A dans l'hippocampe des animaux (Aubrecht et al., 2013). Les auteurs de cette étude n'avaient pas rapporté de différence d'expression de ce gène entre les animaux contrôles et ceux exposés au protocole d'hypoxies intermittentes. A l'inverse de ces résultats, notre étude nous a permis de mettre en évidence une augmentation d'expression du gène VEGF-A dans le cortex et l'hippocampe des animaux WT et THY-Tau22 exposés au protocole d'HI, à tous les âges (mais non significative dans le cortex des animaux WT âgés de 8 mois). Cette augmentation d'expression cérébrale du gène VEGF-A, bien qu'isolée et ne permettant pas d'expliquer les variations périphériques observées, semble toutefois nous indiquer que le cerveau des animaux a bien été sensible au stress hypoxique intermittent, argument supplémentaire pour valider l'utilisation de ce protocole d'HI.

Concernant l'atténuation vraisemblable de la réponse à l'hypoxie observée chez les animaux âgés de 8 mois en comparaison avec ceux âgés de 5 mois, une étude réalisée en 2011 (Rabie et al., 2011) avait montré que l'activation des gènes de l'EPO et du VEGF dans le cerveau de souris en réponse à un stress hypoxique diminuait au fur et à mesure du vieillissement des animaux.

Enfin, une étude transcriptomique d'expression du gène HIF-1A a également été effectuée, mais n'a pas permis de mettre en évidence de variation entre les animaux contrôles et ceux exposés au protocole d'hypoxies intermittentes. A notre connaissance, l'expression du gène HIF-1A n'avait jusqu'à présent pas été évaluée chez des animaux exposés à un protocole HI. Il semblerait néanmoins que l'expression cérébrale du gène HIF-1A puisse être augmentée pendant l'exposition à un stress hypoxique aigu (Wiener et al., 1996), mais que cette augmentation disparaisse rapidement lors du retour à la normoxie (Heidbreder et al., 2003). Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons cherché à étudier la sous-unité protéique HIF1 α , mais nos tentatives de mises au point de marquage de cette protéine sont restées vaines. De plus, en raison de la demi-vie très courte de ce facteur HIF1 α en condition de normoxie (environ 5 minutes) (Salceda and Caro, 1997), et de la durée d'exposition à la normoxie chez nos animaux avant la mise à mort (comprise entre 10 et 60 minutes), nous pouvons supposer qu'aucune variation protéique d'HIF1 α n'aurait pu être observée chez nos animaux.

B) *Effets du protocole d'hypoxies intermittentes sur la mémoire à court terme des animaux.*

L'étude de la mémoire à court terme des animaux dans le cadre de ces expérimentations nous a permis, dans un premier temps, de mettre en évidence une atteinte mnésique chez des animaux de type sauvage exposés à un protocole d'hypoxies intermittentes. A notre connaissance, nos travaux sont les premiers à rapporter ce type d'atteinte mnésique sous HI, les autres études réalisées dans ce contexte ayant essentiellement évalué la mémoire à long terme des animaux. En raison toutefois du faible nombre d'animaux que nous avons utilisé dans le cadre de cette évaluation mnésique, une nouvelle expérimentation utilisant un plus grand nombre d'animaux serait nécessaire afin de confirmer ces résultats et de pouvoir mettre en évidence une différence significative de l'index de reconnaissance entre les animaux contrôles et ceux soumis au protocole d'HI, ce qui n'a pas pu être le cas dans notre étude.

D'autre part, l'évaluation comportementale réalisée chez les animaux transgéniques a permis de mettre en évidence un résultat inattendu. En effet, alors que les animaux transgéniques du groupe contrôle présentaient une altération de la mémoire à court terme, comme attendu au regard de leur âge et du développement de la DNF, il semblerait que le protocole d'HI ait été à l'origine d'une restauration des facultés mnésiques des animaux. Ainsi, notre hypothèse de travail initiale, selon laquelle un stress hypoxique intermittent pourrait aggraver les troubles cognitifs dans notre modèle transgénique ne s'est pas vérifiée.

L'une des limites à ce travail de thèse est l'absence d'évaluation comportementale réalisée chez les animaux âgés de 5 mois, en particulier pour les animaux transgéniques. En effet, nous

avons prévu, dans le cadre de ces travaux de thèse, d'évaluer la mémoire des animaux exposés au protocole d'HI à deux âges différents, afin de pouvoir observer un éventuel effet de la pathologie Tau sur la mémoire des animaux sous hypoxie. Il aurait été intéressant de savoir si, chez des animaux présentant une pathologie Tau moins développée, le protocole d'HI aurait eu les mêmes conséquences sur la mémoire à court terme des animaux.

Dans le test de reconnaissance d'objets, deux structures cérébrales semblent être impliquées : l'hippocampe et le cortex périrhinal (pour revue : Antunes and Biala, 2012). Alors que l'hippocampe semble être mis en jeu dans la phase d'apprentissage ainsi que dans la phase de restitution (lorsque le temps de rétention entre la présentation des objets au cours du test est long), le cortex périrhinal serait de son côté plutôt impliqué dans la phase de restitution lorsque ce temps de rétention est court (comme c'est le cas dans notre étude, le délai de rétention étant de 15 minutes) ; bien que cela soit toujours discuté au sein de la communauté scientifique.

Ainsi, l'atteinte cognitive observée chez les animaux WT-HI pourrait être liée à une atteinte hippocampique, perturbant l'apprentissage lors de l'exploration des objets au cours de la phase d'acquisition (comme cela semble être le cas dans les autres études réalisées *in vivo*, montrant des difficultés d'apprentissage significatives dans le test de la piscine de Morris chez les animaux exposés à un protocole d'HI), et/ou à une atteinte du cortex périrhinal, empêchant la restitution de l'information encodée lors de la phase d'acquisition, et donc ne permettant pas aux animaux de reconnaître l'objet familier comme tel.

A l'inverse, nous pouvons supposer que l'amélioration cognitive observée chez nos animaux transgéniques pourrait être associée à une réduction de la pathologie Tau dans l'hippocampe et/ou le cortex périrhinal ; ces deux structures étant affectées par la DNF lorsque les animaux sont âgés de 8 mois.

C) *Effet du protocole d'hypoxies intermittentes sur la pathologie Tau*

L'étude des conséquences d'un stress hypoxique intermittent sur la protéine Tau murine chez les animaux WT âgés de 5 et 8 mois ne nous a pas permis de mettre en évidence de modification d'expression cérébrale du gène codant pour la protéine Tau chez les animaux hypoxiés, comparativement aux animaux contrôles. De même, l'étude de l'état de phosphorylation de cette protéine Tau murine par une approche biochimique n'a pas mis en évidence de différence entre les groupes exposés au protocole d'HI et les groupes contrôles. Ces résultats semblent donc indiquer que lors d'un stress hypoxique intermittent d'une durée de 15 jours chez une souris de type sauvage, la protéine Tau murine ne serait pas sensible au stress hypoxique. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que chez ces animaux, les troubles cognitifs observés dans le cadre de notre thèse (mais aussi ceux décrits dans la littérature) ne seraient pas liés à des modifications transcriptionnelles ni post-traductionnelles de la protéine Tau.

Les études réalisées chez les animaux transgéniques THY-Tau22 âgés de 5 et 8 mois n'ont également pas mis en évidence de modification transcriptionnelle du gène codant pour la protéine Tau murine, confirmant les observations réalisées chez les animaux WT. Concernant

les analyses biochimiques réalisées par Western Blots, lorsque nous appliquions un anticorps dirigé contre la protéine Tau (phosphorylée ou totale) sur nos membranes, celui-ci reconnaissait la protéine Tau humaine mais également la protéine Tau murine. Toutefois, dans notre modèle transgénique (sur-exprimant la protéine Tau humaine), la détection du signal était beaucoup plus rapide que pour les membranes sur lesquelles nous avons déposé des échantillons de souris WT. Ainsi, le signal détecté lors de la révélation des membranes sur lesquelles se trouvaient des échantillons issus de souris THY-Tau22 correspond, en très grande majorité, aux anticorps anti-Tau ayant reconnu la protéine Tau humaine.

Les différentes études de la protéine Tau humaine réalisées à partir du modèle transgénique THY-Tau22 nous ont permis d'observer plusieurs choses lors de l'application d'un stress hypoxique intermittent.

Tout d'abord, les marquages anti-Tau réalisés en immunohistochimie semblent mettre en évidence une augmentation des quantités de protéines Tau au stade pré-agrégatif chez les animaux transgéniques âgés de 8 mois exposés au protocole d'hypoxies intermittentes ; sans que nous ne puissions observer de variation des quantités de protéines Tau agrégées (ce qui témoignerait d'une aggravation de la pathologie et serait cohérent avec l'augmentation du marquage MC1). Gardant à l'esprit que les études immunohistologiques ne constituent qu'une méthode expérimentale semi-quantitative, nous pouvons néanmoins imaginer que cette augmentation de protéines Tau à un stade pré-agrégatif pourrait en réalité s'accompagner d'une augmentation des quantités de protéines Tau agrégées, mais que ces dernières ne seraient pas visualisables car dégradées et éliminées de l'organisme aussitôt qu'elles sont formées.

Nous avons également pu observer sous hypoxie une diminution importante des quantités de protéines Tau retrouvées dans le plasma des animaux. Au niveau cérébral, cette diminution serait associée à une augmentation d'expression du transgène dans le cortex des animaux âgés de 5 mois (et vraisemblablement également dans le cortex des animaux âgés de 8 mois). A l'heure actuelle, le métabolisme de la protéine Tau entre le système nerveux central et la périphérie n'est pas connu, rendant difficile l'interprétation de ces observations. Néanmoins, chez les patients atteints de la MA, il a été observé une augmentation des quantités plasmatiques de protéines Tau, comparativement aux dosages effectués dans le plasma de sujets sains du même âge (Zetterberg et al., 2013). Ainsi, il semblerait que dans la MA, l'augmentation des quantités de protéines Tau retrouvée au niveau central soit associée à une augmentation des quantités de protéines Tau retrouvées dans le plasma. Nous pouvons donc supposer que la baisse de quantités de protéines Tau observée dans le plasma de nos animaux transgéniques exposés au protocole d'hypoxies intermittentes pourrait être associée, à l'inverse, à une diminution des quantités de protéines Tau au niveau cérébral.

Cette hypothèse est par ailleurs appuyée par les résultats de nos analyses biochimiques par Western Blot. En effet, il semble que dans le cerveau de nos animaux transgéniques âgés de 8 mois et exposés au protocole d'hypoxies intermittentes, une diminution des quantités de

protéines Tau totales soit observée. En effet, ces animaux présentent un marquage Tau-Cter inférieur à celui des animaux contrôles (THY-Tau22-No). Toutefois, ce marquage ne s'accompagne pas d'une baisse du marquage Tau-Nter. Devant cette observation, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une troncation de la protéine Tau au niveau de son extrémité carboxy-terminale. Nous avons alors observé le marquage obtenu avec l'anticorps Tau-Cter au niveau des poids moléculaires inférieurs à 50 – 60 kD (le poids moléculaire de la protéine Tau), afin de déterminer si le profil électrophorétique des fragments de troncation (observable sur nos membranes) était modifié sous hypoxie. Ces observations n'ayant pas mis en évidence de modification du profil électrophorétique des fragments de troncation sous hypoxie, nous pouvons supposer que la troncation de la protéine Tau n'est pas modifiée par le stress hypoxique intermittent que nous avons imposé à nos animaux transgéniques.

Concernant la phosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau, ces travaux de thèse ont mis en évidence des résultats inattendus. En effet, alors que nous nous attendions à observer une majoration de la pathologie Tau sous hypoxie (se traduisant par une hyper-phosphorylation de la protéine Tau et une augmentation de l'agrégation), nous avons observé les effets inverses chez nos animaux transgéniques soumis au protocole d'HI.

En effet, les expérimentations réalisées chez les souris transgéniques THY-Tau22 âgées de 5 et 8 mois ont permis d'observer une déphosphorylation de la protéine Tau sur plusieurs épitopes. Une électrophorèse bidimensionnelle aurait pu permettre de mieux caractériser la phosphorylation globale de la protéine Tau, mais n'a malheureusement pas pu être réalisée à partir de nos échantillons cérébraux. De la même façon, il aurait été intéressant d'évaluer l'expression et l'activité des protéines kinases et des protéines phosphatases impliquées dans la phosphorylation et la déphosphorylation des épitopes de la protéine Tau pour lesquels nous avons observé des modifications sous hypoxie intermittente, études que nous n'avons pas pu réaliser dans le cadre de ce travail de thèse.

En parallèle de cette déphosphorylation, nos résultats indiquent également que les quantités de protéines Tau agrégées seraient moindres sous hypoxie intermittente, comparativement aux animaux contrôles.

Ces observations de déphosphorylation et de diminution des quantités de protéines Tau agrégées pourraient être à l'origine de l'amélioration cognitive observée chez nos animaux transgéniques exposés au protocole d'hypoxies intermittentes. En effet, une amélioration cognitive a été préalablement décrite dans ce modèle animal lorsque la phosphorylation et l'agrégation de Tau étaient réduites (Santacruz et al., 2005; Troquier et al., 2012).

En ce qui concerne les mécanismes ayant conduit à une diminution de la phosphorylation et des quantités de protéines Tau agrégées, nous n'avons pas à ce jour réalisé d'études complémentaires afin de les déterminer, mais nous pouvons formuler des hypothèses pour les expliquer.

La première hypothèse concerne la phosphorylation. Lorsque les quantités d'oxygène disponible diminuent (ce qui est le cas dans notre modèle d'hypoxies intermittentes), la mitochondrie ne peut plus fonctionner correctement et la cellule perd ainsi sa principale source d'ATP (adénosine tri-phosphate). En réduisant sa production d'ATP, la cellule voit alors sa source de phosphates disponibles pour la phosphorylation des protéines diminuer également. La mise à mort de nos animaux ayant eu lieu rapidement après la sortie du dispositif à hypoxies intermittentes, nous pouvons émettre l'hypothèse que la déphosphorylation de la protéine Tau que nous avons observée chez nos animaux hypoxiés pourrait refléter cette baisse d'ATP disponible, ou tout au moins qu'elle aurait pu y contribuer. Ceci reste néanmoins une simple hypothèse qui nécessiterait d'autres investigations pour être vérifiée, notamment la réalisation d'une cinétique de dosage des quantités d'ATP disponibles pendant le stress hypoxique intermittent (la durée du protocole étant de 8 heures chaque jour, il est probable que les cellules mettent en place un métabolisme anaérobie pour synthétiser leur ATP et continuer à fonctionner), ainsi qu'en condition de normoxie.

La seconde hypothèse que nous pouvons formuler concerne quant à elle l'agrégation de la protéine Tau. Une étude récente a en effet montré que les agrégats de protéines Tau pouvaient être dégradés par la sérine protéase HTRA1 (Human High Temperature Requirement Serine Protease A1) (Tennstaedt et al., 2012). Dans le cerveau des patients atteints de la MA, les taux d'HTRA1 seraient négativement corrélés avec ceux des protéines Tau totales, phosphorylées et agrégées. Les auteurs de cette étude ont par ailleurs mis en évidence une augmentation des taux d'ARNm d'HTRA1 ainsi qu'une augmentation d'activité de cette protéase en réponse à des concentrations élevées de protéines Tau au niveau cérébral. Il semblerait qu'un stress hypoxique puisse également être responsable d'une augmentation activation d'HTRA1. A partir de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une activation accrue d'HTRA1 dans notre modèle transgénique exposé au protocole d'HI, ce qui expliquerait la diminution des quantités de protéines Tau totales, phosphorylées et agrégées dans l'hippocampe de nos souris. Une exploration d'HTRA1 dans le cerveau de nos animaux est prévue au cours des prochaines semaines, et les résultats de cette étude pourront être présentés lors de la soutenance de thèse.

D) *Effet du stress hypoxique intermittent sur différents gènes impliqués dans le stress oxydant et l'inflammation*

Au cours de ce travail de thèse, nous avons réalisé une analyse transcriptomique de différents gènes intervenant dans le stress oxydant et l'inflammation.

En ce qui concerne les marqueurs de stress oxydant testés, nous avons donc observé une diminution d'expression du gène codant pour MnSOD sous hypoxie dans l'hippocampe des souris WT âgées de 5 mois. Bien qu'isolés, ces résultats sont cohérents avec la diminution des taux de SOD récemment décrits dans la littérature (Deng et al., 2015).

D'autre part, une diminution significative d'expression du gène NCF1 a été observée sous hypoxie dans l'hippocampe des animaux transgéniques âgés de 5 mois. Le gène NCF1

(pour Neutrophil Cytosolic Factor 1) code pour une protéine de 47 kD qui constitue une sous-unité de la NADPH oxydase. Une diminution d'expression de ce gène pourrait donc en théorie conduire à une diminution des quantités de NADPH oxydase. Or, dans la littérature, une augmentation des taux de NADPH oxydase et de son activité ont été rapportées dans l'hippocampe de souris WT exposées à un protocole d'hypoxies intermittentes (Nair et al., 2011a). Nos résultats se limitant cependant à l'étude de l'expression du gène, des études complémentaires seraient nécessaires pour évaluer les quantités et l'activité de la NADPH oxydase chez nos animaux.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de cette thèse ne nous ont pas permis de mettre en évidence d'effet majeur du stress hypoxique intermittent sur l'expression de ces différents gènes, alors que des variations avaient été décrites dans la littérature. Néanmoins, les données de la littérature rapportaient essentiellement des variations de quantités protéiques et/ou d'activités enzymatiques, et non des variations au niveau du gène. Il nous aurait donc fallu caractériser au niveau protéique les marqueurs de stress oxydant et d'inflammation que nous avons testés dans cette étude.

Toutefois, par manque de temps et sachant que l'étude du stress oxydant sortait du cadre de recherche initial fixé pour ce travail de thèse (étude de la cognition et de la protéine Tau sous hypoxie), nous n'avons pas poursuivi ces investigations.

E) *Etude de l'apoptose*

Alors qu'une apoptose avait été décrite dans la littérature sous hypoxie intermittente, le marquage NeuN que nous avons réalisé chez les animaux âgés de 8 mois n'a pas mis en évidence d'apoptose chez les animaux hypoxiés comparativement aux animaux contrôles. Bien que nous n'expliquions pas cette observation, elle nous permet tout de même de supposer que la baisse des quantités de protéines Tau observée dans le cerveau des animaux transgéniques à cet âge ne serait donc pas due à une mort neuronale plus importante sous hypoxie, et suggère qu'il existerait donc bien un autre mécanisme pouvant expliquer les observations réalisées sur la protéine Tau.

Discussion générale

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse nous ont permis d'évaluer l'effet chez la souris de deux types d'exposition à l'hypoxie sur la mémoire et la pathologie Tau *in vivo*.

Pour cela, nous avons choisi d'exposer un modèle murin transgénique de pathologie Tau, la souris THY-Tau22, à deux protocoles de stress hypoxique ; afin d'évaluer leurs conséquences sur la mémoire et le développement de la pathologie Tau présente chez ces animaux.

Le premier protocole a consisté en un stress hypoxique répété sur une durée de 6 mois. Les résultats de ces expérimentations nous ont permis de mettre en évidence une atteinte cognitive réversible chez les animaux hypoxiés, à l'image de ce qui a pu être décrit chez les montagnards se rendant en haute montagne. Cette atteinte cognitive n'a pas pu être reliée à des modifications de la protéine Tau.

Le second protocole a consisté en la réalisation d'un stress hypoxique intermittent sur une courte durée (15 jours). Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence, chez les animaux WT, une atteinte cognitive qui ne semblait pas être associée à des modifications de la protéine Tau. Concernant les animaux transgéniques THY-Tau22, nous avons observé un effet inattendu de notre protocole d'hypoxies intermittentes. En effet, les animaux exposés à ce protocole ont pu retrouver des capacités mnésiques comparables à celles d'animaux WT du même âge, cette observation ayant été corrélée avec une réduction des agrégats de protéines Tau au niveau cérébral.

Dans toutes les expérimentations réalisées au cours de cette thèse, des animaux contrôles WT de même âge et de même sexe que les animaux transgéniques ont été exposés aux mêmes stress hypoxiques que les animaux transgéniques. Ceci avait pour objectif de permettre l'étude de la mémoire des animaux. En effet, le modèle transgénique THY-Tau22 développe spontanément des troubles mnésiques en raison de la DNF retrouvée chez les animaux. De ce fait, il ne constitue pas un bon modèle d'étude lorsque l'on souhaite évaluer l'apparition des troubles mnésiques sous hypoxie dans un organisme sain, comme c'est le cas chez les sujets montagnards ; alors que les animaux WT permettent cette approche expérimentale. Le modèle THY-Tau22 constitue en revanche un bon modèle d'étude lorsque l'on s'intéresse à la potentialisation sous hypoxie des troubles cognitifs observés chez les patients présentant à la fois un SAS et une MA.

La première partie de ces travaux de thèse a consisté à évaluer l'effet d'un stress hypoxique répété, mimant l'exposition des montagnards à l'hypoxie relative rencontrée en altitude. Pour cela, nous avons réalisé deux cinétiques d'expérimentation d'une durée de 6 mois, chez des animaux WT ainsi que des animaux transgéniques présentant une pathologie Tau modérée et d'autres une pathologie Tau à un stade plus avancé. Une évaluation comportementale a été effectuée tout au long de ces deux cinétiques d'expérimentation. Alors que chez les animaux transgéniques, nous avons rencontré des difficultés d'interprétation des résultats des tests comportementaux, nos expérimentations ont en revanche permis de mettre en évidence des troubles cognitifs chez les souris WT exposées au protocole d'hypoxies répétées. Ces résultats

sont cohérents avec les données de la littérature montrant une atteinte cognitive chez les montagnards se rendant en haute montagne (Hornbein, 2001). De façon intéressante, nous avons également pu observer une réversibilité de l'atteinte mnésique des animaux WT. Ces observations peuvent être rapprochées de celles ayant montré une atteinte mnésique transitoire chez les sujets se rendant en altitude. Nous pouvons imaginer que, de la même façon que dans le cadre des études de préconditionnement hypoxique (exposant par exemple des rats à une FiO_2 égale à 10%, 2 heures par jour pendant 3 jours (Rybnikova et al., 2005)), l'exposition répétée à un stress hypoxique chez nos animaux pourrait jouer un rôle protecteur vis-à-vis de la survenue des troubles cognitifs, leur permettant de retrouver un statut cognitif normal peu de temps après leur retour à la condition de normoxie. A l'inverse, un effet délétère des hypoxies sur la mémoire des animaux semblerait pouvoir être observé dès lors que la répétition des hypoxies est interrompue.

En revanche, l'étude de la protéine Tau réalisée chez les animaux WT et THY-Tau22 exposés au protocole d'hypoxies répétées n'a pas permis d'observer d'effet persistant de l'hypoxie (14 jours après la fin de l'exposition des animaux) sur la biochimie de la protéine Tau ; suggérant que celle-ci ne serait pas responsable des troubles cognitifs observés chez les animaux au même moment ; une atteinte mnésique ayant été observée 4, 14 et 17 jours après la dernière exposition au stress hypoxique répété. Il est donc probable que chez les sujets montagnards se rendant en haute altitude, les troubles cognitifs observés ne soient pas dus à une modification du métabolisme de la protéine Tau, et qu'ils fassent donc intervenir d'autres mécanismes moléculaires.

La seconde partie de ces travaux de thèse a consisté en l'évaluation des conséquences d'un stress hypoxique intermittent sur la cognition et la pathologie Tau chez des animaux WT et des animaux THY-Tau22. Dans le cadre de cette étude, nous souhaitons évaluer l'effet d'un protocole d'hypoxies intermittentes modélisant un SAS sévère chez l'homme, ce qui a été le cas ici. En effet, les analyses des enregistrements de SaO_2 nous ont permis de caractériser la sévérité de l'atteinte hypoxémique chez les animaux, et d'observer une désaturation moyenne située aux alentours de 80%.

Ces études nous ont permis de mettre en évidence une atteinte de la mémoire à court terme chez les animaux WT. L'étude de la protéine Tau réalisée chez ces animaux ne nous a toutefois pas permis de relier ces troubles cognitifs à une perturbation du métabolisme de la protéine Tau, suggérant l'implication d'autres mécanismes moléculaires, comme cela a notamment été décrit dans la littérature pour l'inflammation (de Lima et al., 2015) et le stress oxydant (Asker et al., 2015). Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence de variation d'expression de gènes codant pour des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation chez nos animaux hypoxiés.

L'évaluation cognitive des animaux transgéniques exposés à ce même protocole d'hypoxies intermittentes nous a permis d'observer un effet inattendu chez les animaux âgés de 8 mois. En effet, alors que les animaux transgéniques non exposés au protocole d'hypoxies intermittentes présentaient, à cet âge, une atteinte cognitive comme attendu au vu du développement de la DNF dans leur cerveau (Schindowski et al., 2006), nous avons pu observer une restauration des capacités mnésiques chez les animaux transgéniques exposés au protocole d'hypoxies intermittentes.

Par la suite, nous avons pu relier cette amélioration cognitive avec une diminution des quantités de protéines Tau agrégées dans le cerveau des animaux. Bien que n'ayant à l'heure actuelle pas déterminé par quel(s) mécanisme(s) cette diminution d'agrégation de la protéine Tau avait été rendue possible, nous pouvons suspecter une activation de la sérine protéase HTRA1.

Il a en effet été démontré dans la littérature que cette protéase pouvait dégrader les agrégats de protéines Tau dans le cerveau, et qu'elle pouvait être activée par des concentrations importantes de protéines Tau ainsi que par un stress hypoxique (Tennstaedt et al., 2012). Nous pouvons imaginer que, dans notre modèle d'exposition « courte » au protocole d'hypoxies intermittentes (pendant 15 jours), HTRA1 aurait pu jouer un rôle protecteur vis-à-vis du stress hypoxique, en permettant la dégradation des agrégats de protéines Tau dans le cerveau des animaux, conduisant alors à la restauration des capacités mnésiques chez ces animaux.

Une amélioration cognitive avait déjà été rapportée dans ce modèle transgénique THY-Tau22 chez les animaux présentant une réduction des agrégats protéiques de Tau (Santacruz et al., 2005; Troquier et al., 2012).

Lorsque l'on s'intéresse aux troubles cognitifs observés en clinique humaine chez les patients présentant un SAS et une MA, la durée d'exposition au stress hypoxique intermittent ne se limite toutefois pas à quelques semaines. Chez ces patients, nous pourrions envisager que le système de dégradation des protéines Tau par HTRA1 soit dérégulé et/ou saturé, en raison d'une exposition beaucoup plus longue à l'hypoxémie nocturne ainsi que des quantités importantes d'agrégats protéiques de Tau dans le cerveau des patients atteints de la MA. Il serait alors possible, chez ces patients, d'observer les conséquences délétères du stress hypoxique intermittent sur la pathologie Tau et la mémoire des patients.

Une exposition de nos animaux transgéniques à un protocole d'hypoxies intermittentes pendant une durée d'exposition plus longue nous aurait peut-être permis d'observer une atteinte cognitive et une pathologie Tau majorées chez ces animaux, reflétant alors les observations réalisées en clinique humaine.

De façon plus globale, les deux protocoles de stress hypoxiques que nous avons utilisés dans le cadre de ces travaux de thèse ne nous ont pas permis d'observer d'effet de l'hypoxie sur la protéine Tau murine chez les animaux WT, alors que nous avons pu observer des troubles cognitifs chez ces animaux. Nous pouvons ainsi nous questionner sur les effets de l'hypoxie observés uniquement sur la protéine Tau humaine en dépit de l'homologie importante (88%) entre les protéines Tau humaine et murine (Poorkaj et al., 2001). Les différences entre ces deux protéines se situent essentiellement au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine (Poorkaj et al., 2001). A ce jour, deux haplotypes du gène MAPT ont été identifiés chez l'homme : H1 et H2. Une étude de 2012 a montré l'existence d'une région HRE (élément de réponse à l'hypoxie) sur l'haplotype H2 du gène MAPT (Maloney and Lahiri, 2012). A notre connaissance, aucune donnée de la littérature n'a mis en évidence l'existence similaire d'un élément de réponse à l'hypoxie sur le gène codant pour la protéine Tau murine. Ces données pourraient ainsi expliquer l'absence de modification de la protéine Tau murine en condition d'hypoxie, comme nous l'avons observé au cours de nos deux études expérimentales. Elles confortent par ailleurs notre hypothèse selon laquelle la protéine Tau humaine pourrait être modifiée en réponse à un stress hypoxique.

Concernant l'ensemble de nos expérimentations, un autre point mérite d'être discuté : celui du sexe des animaux. Bien que n'ayant pas réellement « choisi » d'utiliser des animaux femelles dans le cadre de l'ensemble de nos expérimentations puisqu'il s'agissait d'un choix par défaut (les animaux mâles étant déjà destinés à d'autres études), nous pouvons aujourd'hui nous questionner sur l'utilisation des animaux femelles dans le cadre de nos études. En effet, bien que cela ne soit pas très clair dans la littérature, il semblerait qu'il puisse exister un dimorphisme sexuel dans la réponse à l'hypoxie (Chavez-Valdez et al., 2014; Gassmann et al., 2009; Yang et al., 2014), bien que ces observations soient controversées (Nakano et al., 2005). Il serait donc utile de reproduire ces expérimentations sur des animaux mâles pour confirmer nos résultats.

De même, après analyse critique de nos résultats et de nos protocoles expérimentaux, il apparaît que certains points auraient pu être améliorés.

En premier lieu, chez les animaux exposés au protocole d'hypoxies répétées, il nous aurait fallu espacer la réalisation de nos tests comportementaux et/ou multiplier la diversité des tests réalisés, afin de prévenir le comportement d' « habitude » que nous avons pu observer chez nos animaux.

De plus, il aurait peut-être été plus judicieux de réaliser l'évaluation comportementale le lendemain de l'exposition à l'hypoxie, au lieu de la réaliser 3 jours après. De même, il aurait probablement été préférable de réaliser les prélèvements sanguins de façon plus rapprochée

de l'exposition à l'hypoxie, afin de pouvoir observer la réponse à l'hypoxie de l'organisme, qui survient rapidement en condition de stress hypoxique.

De la même façon, nous avons pris le parti d'effectuer la mise à mort des animaux 14 jours après la dernière exposition à l'hypoxie, car c'est à ce moment-là qu'ils présentaient une atteinte cognitive, et que nous espérions donc pouvoir observer un effet sur la pathologie Tau. Nous avons longuement discuté ce point lors de la préparation des expérimentations, lorsque nous avons observé la réponse comportementale des animaux. Nous avons également envisagé de sacrifier la moitié des animaux 3 jours après la dernière exposition à l'hypoxie, et l'autre moitié 14 jours après. Toutefois, en raison d'un nombre d'animaux par groupe trop faible (en moyenne nous disposions de 7 animaux par groupe WT et 5 animaux par groupe THY-Tau22), nous avons jugé plus judicieux de mettre à mort tous les animaux au même moment, afin de pouvoir réaliser des analyses statistiques par la suite lors de l'exploitation des résultats, ce qui aurait été impossible avec seulement 2 ou 3 animaux par groupe. A l'avenir, il serait intéressant de débiter l'exposition à notre protocole d'hypoxies répétées avec un plus grand nombre d'animaux. Ceci nous permettrait de procéder à des mises à mort de quelques animaux après différentes durées d'exposition au protocole d'hypoxies répétées, et également après un délai variable par rapport à la dernière exposition à l'hypoxie. Ainsi, nous pourrions envisager de sacrifier une partie des animaux immédiatement après la fin de l'exposition à hypoxie ; ou bien quelques heures ou jours après celle-ci.

Ces travaux de thèse ne nous ont pas permis de vérifier notre hypothèse de travail initiale, qui proposait que l'aggravation des troubles cognitifs observés chez les patients présentant un syndrome d'apnées du sommeil et une maladie d'Alzheimer pourrait être médiée par une aggravation de la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) sous hypoxie. Toutefois, cette hypothèse n'a pas non plus été complètement écartée, et les résultats de nos observations nous ont permis de proposer une nouvelle piste de recherche : l'étude de la sérine protéase HTRA1.

Nous pensons que lors d'une exposition à un stress hypoxique intermittent sur une période courte chez un animal présentant une DNF (ou par extension, chez un patient présentant une MA), cette protéase pourrait éliminer les agrégats de protéines Tau (sous l'effet conjoint de la présence de protéines Tau agrégées dans son environnement et d'un stress hypoxique). Cette hypothèse, si elle s'avère vraie, pourrait expliquer l'amélioration cognitive observée chez nos animaux transgéniques exposés au protocole d'hypoxies intermittentes (Figure 54). Lors d'une exposition à plus long terme, nous pouvons envisager que ce système de dégradation des agrégats de protéines Tau pourrait être saturé, permettant alors au stress hypoxique intermittent de promouvoir la dégénérescence neurofibrillaire préexistante chez les patients atteints de la MA, entraînant alors l'aggravation cognitive observée en clinique humaine.

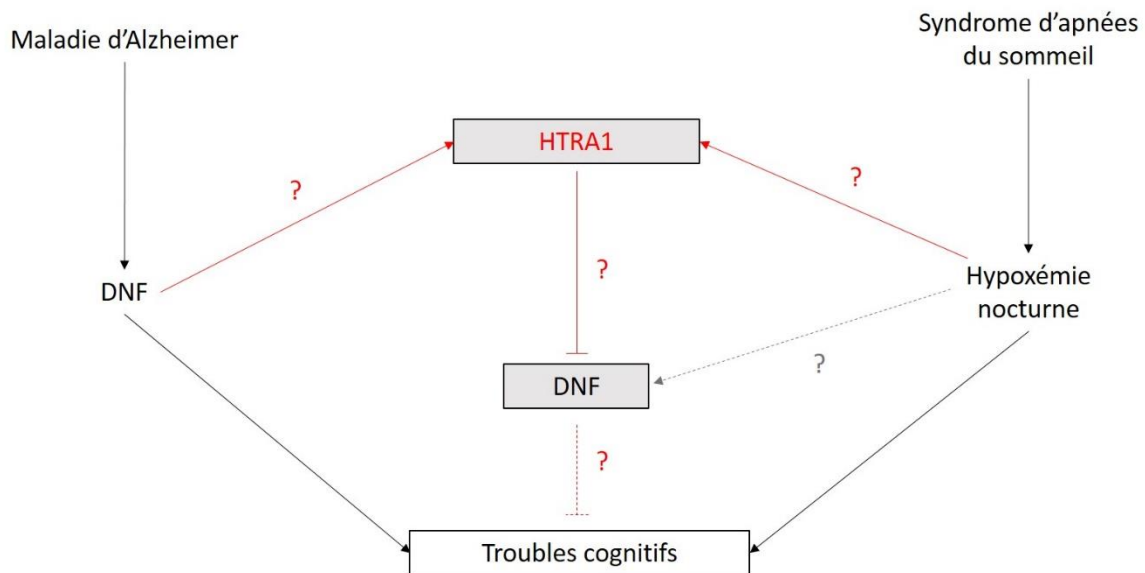


Figure 54 : Hypothèse de l'implication de la serine protéase HTRA1 dans la survenue des troubles cognitifs observés chez les patients présentant un syndrome d'apnées du sommeil et une maladie d'Alzheimer. DNF : dégénérescence neurofibrillaire.

Afin de confirmer cette nouvelle hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'expression d'HTRA1 dans le cerveau de nos animaux exposés au protocole d'hypoxies intermittentes.

Il serait également intéressant de réévaluer la mémoire et la pathologie Tau chez les souris THY-Tau22 exposées à un protocole plus long d'hypoxies intermittentes.

Ainsi, si nous parvenons à confirmer l'implication d'HTRA1 dans la survenue des troubles cognitifs observés sous hypoxie intermittente, nous apporterons un nouvel élément de réponse à la question à l'origine de ce travail de thèse :

« Maladie d'Alzheimer et Syndrome d'Apnées du Sommeil : deux pathologies liées ? »

Références

A

Abirami, J.H., Bouquet, C., Joulia, F., Nicolas, M., and Kriem, B. (1998). Cognitive performance during a simulated climb of Mount Everest: implications for brain function and central adaptive processes under chronic hypoxic stress. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *436*, 553–559.

Adams, N., Strauss, M., Schluchter, M., and Redline, S. (2001). Relation of measures of sleep-disordered breathing to neuropsychological functioning. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *163*, 1626–1631.

Adam-Vizi, V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid. Redox Signal.* *7*, 1140–1149.

Aisen, P.S., Cummings, J., and Schneider, L.S. (2012). Symptomatic and nonamyloid/tau based pharmacologic treatment for Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a006395.

Allinquant, B., Hantraye, P., Mailleux, P., Moya, K., Bouillot, C., and Prochiantz, A. (1995). Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J. Cell Biol.* *128*, 919–927.

Aloia, M.S., Arnedt, J.T., Davis, J.D., Riggs, R.L., and Byrd, D. (2004). Neuropsychological sequelae of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: a critical review. *J. Int. Neuropsychol. Soc. JINS* *10*, 772–785.

Alsadany, M.A., Shehata, H.H., Mohamad, M.I., and Mahfouz, R.G. (2013). Histone deacetylases enzyme, copper, and IL-8 levels in patients with Alzheimer's disease. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* *28*, 54–61.

Alvarez, X.A., Sampedro, C., Cacabelos, R., Linares, C., Aleixandre, M., García-Fantini, M., and Moessler, H. (2009). Reduced TNF- α and increased IGF-I levels in the serum of Alzheimer's disease patients treated with the neurotrophic agent cerebrolysin. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* *12*, 867–872.

Alves Pires, C., Zommer, N., Caillierez, R., Arnaud, C., Pepin, J.-L., Buee, L., and Monaca Charley, C. (2014). Stress hypoxique intermittent, atteinte mnésique et protéine Tau : évaluations in vivo. *Médecine Sommeil* *11*, 7.

Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., and Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Clin. Anat. N. Y.* *N 8*, 429–431.

Ancoli-Israel, S., Klauber, M.R., Butters, N., Parker, L., and Kripke, D.F. (1991). Dementia in institutionalized elderly: relation to sleep apnea. *J. Am. Geriatr. Soc.* *39*, 258–263.

Ancoli-Israel, S., Palmer, B.W., Cooke, J.R., Corey-Bloom, J., Fiorentino, L., Natarajan, L., Liu, L., Ayalon, L., He, F., and Lored, J.S. (2008). Cognitive effects of treating obstructive sleep apnea in Alzheimer's disease: a randomized controlled study. *J. Am. Geriatr. Soc.* *56*, 2076–2081.

Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* *1739*, 91–103.

Andreou, G., Vlachos, F., and Mankanikas, K. (2014). Effects of chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea on cognitive functions: evidence for a common nature. *Sleep Disord.* *2014*, 768210.

Anstey, K.J., Mack, H.A., and Cherbuin, N. (2009). Alcohol consumption as a risk factor for dementia and cognitive decline: meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry* *17*, 542–555.

Antunes, M., and Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process.* *13*, 93–110.

Arvanitakis, Z., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Evans, D.A., and Bennett, D.A. (2004). Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch. Neurol.* *61*, 661–666.

Arzt, M., Young, T., Finn, L., Skatrud, J.B., and Bradley, T.D. (2005). Association of Sleep-disordered Breathing and the Occurrence of Stroke. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *172*, 1447–1451.

Asker, S., Asker, M., Sarikaya, E., Sunnetcioglu, A., Aslan, M., and Demir, H. (2015). Oxidative stress parameters and their correlation with clinical, metabolic and polysomnographic parameters in severe obstructive sleep apnea syndrome. *Int. J. Clin. Exp. Med.* *8*, 11449–11455.

Aubrecht, T.G., Weil, Z.M., Magalang, U.J., and Nelson, R.J. (2013). Dim light at night interacts with intermittent hypoxia to alter cognitive and affective responses. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* *305*, R78–R86.

Austin, B.P., Nair, V.A., Meier, T.B., Xu, G., Rowley, H.A., Carlsson, C.M., Johnson, S.C., and Prabhakaran, V. (2011). Effects of hypoperfusion in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* *26 Suppl 3*, 123–133.

B

Badoual, T., Hittinger, L., and Ortho, M.-P. d' (2005). Syndrome d'apnées du sommeil dans l'insuffisance cardiaque. *MT Cardio* *1*, 407–416.

Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet* *377*, 1019–1031.

Barceló, A., Miralles, C., Barbé, F., Vila, M., Pons, S., and Agustí, A.G. (2000). Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur. Respir. J.* *16*, 644–647.

- Baril, A.-A., Gagnon, K., Arbour, C., Soucy, J.-P., Montplaisir, J., Gagnon, J.-F., and Gosselin, N. (2015). Regional Cerebral Blood Flow during Wakeful Rest in Older Subjects with Mild to Severe Obstructive Sleep Apnea. *Sleep* 38, 1439–1449.
- Barnes, M., Houston, D., Worsnop, C.J., Neill, A.M., Mykytyn, I.J., Kay, A., Trinder, J., Saunders, N.A., Douglas McEvoy, R., and Pierce, R.J. (2002). A randomized controlled trial of continuous positive airway pressure in mild obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 773–780.
- Bateman, R.J., Wen, G., Morris, J.C., and Holtzman, D.M. (2007). Fluctuations of CSF amyloid-beta levels: implications for a diagnostic and therapeutic biomarker. *Neurology* 68, 666–669.
- Bédard, M.A., Montplaisir, J., Richer, F., and Malo, J. (1991a). Nocturnal hypoxemia as a determinant of vigilance impairment in sleep apnea syndrome. *Chest* 100, 367–370.
- Bédard, M.A., Montplaisir, J., Richer, F., Rouleau, I., and Malo, J. (1991b). Obstructive sleep apnea syndrome: pathogenesis of neuropsychological deficits. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 13, 950–964.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C.L., and Multhaup, G. (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J. Biol. Chem.* 271, 1613–1620.
- Bekris, L.M., Lutz, F., Li, G., Galasko, D.R., Farlow, M.R., Quinn, J.F., Kaye, J.A., Leverenz, J.B., Tsuang, D.W., Montine, T.J., et al. (2012). ADAM10 expression and promoter haplotype in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* 33, 2229.e1–e2229.e9.
- Del Ben, M., Fabiani, M., Loffredo, L., Polimeni, L., Carnevale, R., Baratta, F., Brunori, M., Albanese, F., Augelletti, T., Violi, F., et al. (2012). Oxidative stress mediated arterial dysfunction in patients with obstructive sleep apnoea and the effect of continuous positive airway pressure treatment. *BMC Pulm. Med.* 12, 36.
- Bernaudin, M., Marti, H.H., Rousel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T., and Petit, E. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 643–651.
- Bertrand, E., Brouillet, E., Caillé, I., Bouillot, C., Cole, G.M., Prochiantz, A., and Allinquant, B. (2001). A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Neurosci.* 18, 503–511.
- Beydoun, M.A., Beydoun, H.A., and Wang, Y. (2008). Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 9, 204–218.
- Bixler, E.O., Vgontzas, A.N., Have, T. Ten, Tyson, K., and Kales, A. (1998). Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 144–148.

- Bixler, E.O., Vgontzas, A.N., Lin, H.-M., HAVE, T. TEN, Rein, J., Vela-Bueno, A., and Kales, A. (2001). Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *163*, 608–613.
- Blennow, K., De Meyer, G., Hansson, O., Minthon, L., Wallin, A., Zetterberg, H., Lewczuk, P., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., Kornhuber, J., et al. (2009). Evolution of Abeta42 and Abeta40 levels and Abeta42/Abeta40 ratio in plasma during progression of Alzheimer's disease: a multicenter assessment. *J. Nutr. Health Aging* *13*, 205–208.
- Bombois, S., Derambure, P., Pasquier, F., and Monaca, C. (2010). Sleep disorders in aging and dementia. *J. Nutr. Health Aging* *14*, 212–217.
- Bonner-Jackson, A., Okonkwo, O., Tremont, G., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2012). Apolipoprotein E ϵ 2 and functional decline in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry* *20*, 584–593.
- Borchelt, D.R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M.K., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., and Sisodia, S.S. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* *19*, 939–945.
- Borges, J.G., Ginani, G.E., Hachul, H., Cintra, F.D., Tufik, S., and Pompéia, S. (2013). Executive functioning in obstructive sleep apnea syndrome patients without comorbidities: focus on the fractionation of executive functions. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* *35*, 1094–1107.
- Bowen, D.M., Smith, C.B., White, P., and Davison, A.N. (1976). Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain J. Neurol.* *99*, 459–496.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *82*, 239–259.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2011). Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? *Acta Neuropathol. (Berl.)* *121*, 589–595.
- Brandt, R., Léger, J., and Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* *131*, 1327–1340.
- Breen, E.C. (2007). VEGF in biological control. *J. Cell. Biochem.* *102*, 1358–1367.
- Briançon-Marjollet, A., Pépin, J.-L., Weiss, J.W., Lévy, P., and Tamiés, R. (2014). Intermittent hypoxia upregulates serum VEGF. *Sleep Med.* *15*, 1425–1426.
- Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., and Flament-Durand, J. (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* *17*, 89–96.
- Bu, X.-L., Liu, Y.-H., Wang, Q.-H., Jiao, S.-S., Zeng, F., Yao, X.-Q., Gao, D., Chen, J.-C., and Wang, Y.-J. (2015). Serum amyloid-beta levels are increased in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sci. Rep.* *5*, 13917.

Buchner, N.J., Sanner, B.M., Borgel, J., and Rump, L.C. (2007). Continuous positive airway pressure treatment of mild to moderate obstructive sleep apnea reduces cardiovascular risk. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *176*, 1274–1280.

Bucks, R.S., Olaithe, M., and Eastwood, P. (2013). Neurocognitive function in obstructive sleep apnoea: a meta-review. *Respirol. Carlton Vic* *18*, 61–70.

Buée, L., Bussi re, T., Bu e-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *33*, 95–130.

Buratti, L., Viticchi, G., Falsetti, L., Cagnetti, C., Luzzi, S., Bartolini, M., Provinciali, L., and Silvestrini, M. (2014). Vascular impairment in Alzheimer’s disease: the role of obstructive sleep apnea. *J. Alzheimers Dis.* *38*, 445–453.

Burwell, C.S., Robin, E.D., Whaley, R.D., and Bickelmann, A.G. (1956). Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation—A pickwickian syndrome. *Am. J. Med.* *21*, 811–818.

Butterfield, D.A., and Sultana, R. (2011). Methionine-35 of $\alpha\beta(1-42)$: importance for oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Amino Acids* *2011*, 198430.

C

Caceres, A., and Kosik, K.S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* *343*, 461–463.

Cai, Z., Manalo, D.J., Wei, G., Rodriguez, E.R., Fox-Talbot, K., Lu, H., Zweier, J.L., and Semenza, G.L. (2003). Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* *108*, 79–85.

Canessa, N., Castronovo, V., Cappa, S.F., Aloia, M.S., Marelli, S., Falini, A., Alemanno, F., and Ferini-Strambi, L. (2011). Obstructive Sleep Apnea: Brain Structural Changes and Neurocognitive Function before and after Treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *183*, 1419–1426.

Carmeliet, P., and Storkebaum, E. (2002). Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* *13*, 39–53.

Chami, H.A., Resnick, H.E., Quan, S.F., and Gottlieb, D.J. (2011). Association of Incident Cardiovascular Disease With Progression of Sleep-Disordered Breathing. *Circulation* *123*, 1280–1286.

Chang, W.-P., Liu, M.-E., Chang, W.-C., Yang, A.C., Ku, Y.-C., Pai, J.-T., Huang, H.-L., and Tsai, S.-J. (2013). Sleep apnea and the risk of dementia: a population-based 5-year follow-up study in Taiwan. *PLoS One* *8*, e78655.

Chaturvedi, R.K., and Flint Beal, M. (2013). Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic. Biol. Med.* *63*, 1–29.

Chavez-Valdez, R., Martin, L.J., Razdan, S., Gauda, E.B., and Northington, F.J. (2014). Sexual dimorphism in BDNF signaling after neonatal hypoxia-ischemia and treatment with necrostatin-1. *Neuroscience* 260, 106–119.

Chong, M.S., Ayalon, L., Marler, M., Loreda, J.S., Corey-Bloom, J., Palmer, B.W., Liu, L., and Ancoli-Israel, S. (2006). Continuous positive airway pressure reduces subjective daytime sleepiness in patients with mild to moderate Alzheimer's disease with sleep disordered breathing. *J. Am. Geriatr. Soc.* 54, 777–781.

Chopra, S., Polotsky, V.Y., and Jun, J.C. (2015). Sleep Apnea Research In Animals: Past, Present, and Future. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*

Christou, K., Moulas, A.N., Pastaka, C., and Gourgoulianis, K.I. (2003). Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Med.* 4, 225–228.

Cohen, T.J., Guo, J.L., Hurtado, D.E., Kwong, L.K., Mills, I.P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.Y. (2011). The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat. Commun.* 2, 252.

Cooke, J.R., Ancoli-Israel, S., Liu, L., Loreda, J.S., Natarajan, L., Palmer, B.S., He, F., and Corey-Bloom, J. (2009a). Continuous positive airway pressure deepens sleep in patients with Alzheimer's disease and obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 10, 1101–1106.

Cooke, J.R., Ayalon, L., Palmer, B.W., Loreda, J.S., Corey-Bloom, J., Natarajan, L., Liu, L., and Ancoli-Israel, S. (2009b). Sustained use of CPAP slows deterioration of cognition, sleep, and mood in patients with Alzheimer's disease and obstructive sleep apnea: a preliminary study. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* 5, 305–309.

Copanaki, E., Chang, S., Vlachos, A., Tschäpe, J.-A., Müller, U.C., Kögel, D., and Deller, T. (2010). sAPPalpha antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 386–393.

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

Coughlin, S.R., Mawdsley, L., Mugarza, J.A., Calverley, P.M.A., and Wilding, J.P.H. (2004). Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur. Heart J.* 25, 735–741.

D

Dalmases, M., Solé-Padullés, C., Torres, M., Embid, C., Nuñez, M.D., Martínez-García, M.Á., Farré, R., Bargalló, N., Bartrés-Faz, D., and Montserrat, J.M. (2015). Effect of CPAP on Cognition, Brain Function and Structure among Elderly Patients with Obstructive Sleep Apnea: a Randomized Pilot Study. *Chest*.

Dasuri, K., Zhang, L., and Keller, J.N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 170–185.

- Daulatzai, M.A. (2012). Quintessential Risk Factors: Their Role in Promoting Cognitive Dysfunction and Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* 37, 2627–2658.
- Daulatzai, M.A. (2013). Death by a Thousand Cuts in Alzheimer's Disease: Hypoxia—The Prodrome. *Neurotox. Res.* 24, 216–243.
- Daulatzai, M.A. (2015). Evidence of neurodegeneration in obstructive sleep apnea: Relationship between obstructive sleep apnea and cognitive dysfunction in the elderly. *J. Neurosci. Res.*
- Davies, P., and Maloney, A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.
- Dayyat, E.A., Zhang, S.X., Wang, Y., Cheng, Z.J., and Gozal, D. (2012). Exogenous erythropoietin administration attenuates intermittent hypoxia-induced cognitive deficits in a murine model of sleep apnea. *BMC Neurosci.* 13, 77.
- Delacourte, A., and Defossez, A. (1986). Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76, 173–186.
- Delacourte, A., David, J.P., Sergeant, N., Buée, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghazali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F., et al. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52, 1158–1165.
- Delacourte, A., Sergeant, N., Champain, D., Wattez, A., Maurage, C.-A., Lebert, F., Pasquier, F., and David, J.-P. (2002). Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 59, 398–407.
- Dematteis, M., Godin-Ribuot, D., Arnaud, C., Ribuot, C., Stanke-Labesque, F., Pépin, J.-L., and Lévy, P. (2009). Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding of the human disease. *ILAR J.* 50, 262–281.
- Dempsey, J.A., Skatrud, J.B., Jacques, A.J., Ewanowski, S.J., Woodson, B.T., Hanson, P.R., and Goodman, B. (2002). Anatomic determinants of sleep-disordered breathing across the spectrum of clinical and nonclinical male subjects. *Chest* 122, 840–851.
- Deng, Y., Guo, X.-L., Yuan, X., Shang, J., Zhu, D., and Liu, H.-G. (2015). P2X7 Receptor Antagonism Attenuates the Intermittent Hypoxia-induced Spatial Deficits in a Murine Model of Sleep Apnea Via Inhibiting Neuroinflammation and Oxidative Stress. *Chin. Med. J. (Engl.)* 128, 2168–2175.
- Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319, 1086–1089.
- Dorval, V., and Fraser, P.E. (2006). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 281, 9919–9924.
- Drachman, D.A. (2006). Aging of the brain, entropy, and Alzheimer disease. *Neurology* 67, 1340–1352.

Drager, L.F., Polotsky, V.Y., O'Donnell, C.P., Cravo, S.L., Lorenzi-Filho, G., and Machado, B.H. (2015). Translational approaches to understanding metabolic dysfunction and cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309, H1101–H1111.

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

Durán, J., Esnaola, S., Rubio, R., and Iztueta, Á. (2001). Obstructive sleep apnea–hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 685–689.

Dursun, E., Gezen-Ak, D., Hanağası, H., Bilgiç, B., Lohmann, E., Ertan, S., Atasoy, İ.L., Alaylıoğlu, M., Araz, Ö.S., Önal, B., et al. (2015). The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J. Neuroimmunol.* 283, 50–57.

Dyken, M.E., and Im, K.B. (2009). Obstructive sleep apnea and stroke. *Chest* 136, 1668–1677.

F

Faccenda, J.F., Mackay, T.W., Boon, N.A., and Douglas, N.J. (2001). Randomized placebo-controlled trial of continuous positive airway pressure on blood pressure in the sleep apnea-hypopnea syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 344–348.

Fang, H., Zhang, L.-F., Meng, F.-T., Du, X., and Zhou, J.-N. (2010). Acute hypoxia promote the phosphorylation of tau via ERK pathway. *Neurosci. Lett.* 474, 173–177.

Felver-Gant, J.C., Bruce, A.S., Zimmerman, M., Sweet, L.H., Millman, R.P., and Aloia, M.S. (2007). Working memory in obstructive sleep apnea: construct validity and treatment effects. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* 3, 589–594.

Ferini-Strambi, L., Baietto, C., Di Gioia, M.R., Castaldi, P., Castronovo, C., Zucconi, M., and Cappa, S.F. (2003). Cognitive dysfunction in patients with obstructive sleep apnea (OSA): partial reversibility after continuous positive airway pressure (CPAP). *Brain Res. Bull.* 61, 87–92.

Fisk, L., Nalivaeva, N.N., Boyle, J.P., Peers, C.S., and Turner, A.J. (2007). Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes. *Neurochem. Res.* 32, 1741–1748.

Frappier, T.F., Georgieff, I.S., Brown, K., and Shelanski, M.L. (1994). tau Regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling. *J. Neurochem.* 63, 2288–2294.

Friedland-Leuner, K., Stockburger, C., Denzer, I., Eckert, G.P., and Müller, W.E. (2014). Chapter Seven - Mitochondrial Dysfunction: Cause and Consequence of Alzheimer's Disease. In

Progress in Molecular Biology and Translational Science, H.D. Osiewacz, ed. (Academic Press), pp. 183–210.

Friedman, L.F., Zeitzer, J.M., Lin, L., Hoff, D., Mignot, E., Peskind, E.R., and Yesavage, J.A. (2007). In Alzheimer disease, increased wake fragmentation found in those with lower hypocretin-1. *Neurology* 68, 793–794.

Fronczek, R., van Geest, S., Frölich, M., Overeem, S., Roelandse, F.W.C., Lammers, G.J., and Swaab, D.F. (2012). Hypocretin (orexin) loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 33, 1642–1650.

Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T., and Irizarry, M.C. (2002). Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59, 1381–1389.

Fulda, S., and Schulz, H. (2001). Cognitive dysfunction in sleep disorders. *Sleep Med. Rev.* 5, 423–445.

Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M., and Mattson, M.P. (1996). Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J. Neurochem.* 67, 1882–1896.

Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Hernández, F., and Avila, J. (2013). Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators Inflamm.* 2013, 260925.

G

Gagnon, K., Baril, A.-A., Gagnon, J.-F., Fortin, M., Décary, A., Lafond, C., Desautels, A., Montplaisir, J., and Gosselin, N. (2014). Cognitive impairment in obstructive sleep apnea. *Pathol. Biol.* 62, 233–240.

Galasko, D., Chang, L., Motter, R., Clark, C.M., Kaye, J., Knopman, D., Thomas, R., Kholodenko, D., Schenk, D., Lieberburg, I., et al. (1998). High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch. Neurol.* 55, 937–945.

Gao, L., Tian, S., Gao, H., and Xu, Y. (2013). Hypoxia increases A β -induced tau phosphorylation by calpain and promotes behavioral consequences in AD transgenic mice. *J. Mol. Neurosci.* MN 51, 138–147.

Garcia-Touchard, A., Somers, V.K., Olson, L.J., and Caples, S.M. (2008). Central sleep apnea: implications for congestive heart failure. *Chest* 133, 1495–1504.

Gassmann, M., Tissot van Patot, M., and Soliz, J. (2009). The neuronal control of hypoxic ventilation: erythropoietin and sexual dimorphism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1177, 151–161.

Gastaut, H., Tassinari, C.A., and Duron, B. (1965). [Polygraphic study of diurnal and nocturnal (hypnic and respiratory) episodal manifestations of Pickwick syndrome]. *Rev. Neurol. (Paris)* 112, 568–579.

Gelber, R.P., Redline, S., Ross, G.W., Petrovitch, H., Sonnen, J.A., Zarow, C., Uyehara-Lock, J.H., Masaki, K.H., Launer, L.J., and White, L.R. (2015). Associations of brain lesions at autopsy with polysomnography features before death. *Neurology* 84, 296–303.

Giles, T.L., Lasserson, T.J., Smith, B.J., White, J., Wright, J., and Cates, C.J. (2006). Continuous positive airways pressure for obstructive sleep apnoea in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001106.

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

Goldbart, A., Row, B.W., Kheirandish, L., Schurr, A., Gozal, E., Guo, S.Z., Payne, R.S., Cheng, Z., Brittan, K.R., and Gozal, D. (2003). Intermittent hypoxic exposure during light phase induces changes in cAMP response element binding protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. *Neuroscience* 122, 585–590.

Gong, C.X., Shaikh, S., Wang, J.Z., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1995). Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 65, 732–738.

Gottlieb, D.J., DeStefano, A.L., Foley, D.J., Mignot, E., Redline, S., Givelber, R.J., and Young, T. (2004). APOE epsilon4 is associated with obstructive sleep apnea/hypopnea: the Sleep Heart Health Study. *Neurology* 63, 664–668.

Gottlieb, D.J., Yenokyan, G., Newman, A.B., O'Connor, G.T., Punjabi, N.M., Quan, S.F., Redline, S., Resnick, H.E., Tong, E.K., Diener-West, M., et al. (2010). Prospective Study of Obstructive Sleep Apnea and Incident Coronary Heart Disease and Heart Failure: The Sleep Heart Health Study. *Circulation* 122, 352–360.

Götz, J., Ittner, A., and Ittner, L.M. (2012). Tau-targeted treatment strategies in Alzheimer's disease. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1246–1259.

Gozal, D., Lipton, A.J., and Jones, K.L. (2002). Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep* 25, 59–65.

Grant, I., Prigatano, G.P., Heaton, R.K., McSweeney, A.J., Wright, E.C., and Adams, K.M. (1987). Progressive neuropsychologic impairment and hypoxemia. Relationship in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch. Gen. Psychiatry* 44, 999–1006.

Grenèche, J., Krieger, J., Bertrand, F., Erhardt, C., Maumy, M., and Tassi, P. (2011). Short-term memory performances during sustained wakefulness in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Brain Cogn.* 75, 39–50.

Guétin, S., Portet, F., Picot, M.C., Pommié, C., Messaoudi, M., Djabelkir, L., Olsen, A.L., Cano, M.M., Lecourt, E., and Touchon, J. (2009). Effect of music therapy on anxiety and depression in patients with Alzheimer's type dementia: randomised, controlled study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 28, 36–46.

Guilleminault, C., Connolly, S.J., and Winkle, R.A. (1983). Cardiac arrhythmia and conduction disturbances during sleep in 400 patients with sleep apnea syndrome. *Am. J. Cardiol.* 52, 490–494.

Guilleminault, C., Silvestri, R., Mondini, S., and Coburn, S. (1984). Aging and sleep apnea: action of benzodiazepine, acetazolamide, alcohol, and sleep deprivation in a healthy elderly group. *J. Gerontol.* 39, 655–661.

Gunsilius, E., Petzer, A., Stockhammer, G., Nussbaumer, W., Schumacher, P., Clausen, J., and Gastl, G. (2000). Thrombocytes are the major source for soluble vascular endothelial growth factor in peripheral blood. *Oncology* 58, 169–174.

Guo, Y., Pan, L., Ren, D., and Xie, X. (2012). Impact of continuous positive airway pressure on C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath.* 17, 495–503.

Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1994). Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry (Mosc.)* 33, 9511–9522.

Guven, S.F., Turkkani, M.H., Ciftci, B., Ciftci, T.U., and Erdogan, Y. (2011). The relationship between high-sensitivity C-reactive protein levels and the severity of obstructive sleep apnea. *Sleep Breath.* 16, 217–221.

H

Hamer, M., and Chida, Y. (2009). Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychol. Med.* 39, 3–11.

Harris, M., Glozier, N., Ratnavadivel, R., and Grunstein, R.R. (2009). Obstructive sleep apnea and depression. *Sleep Med. Rev.* 13, 437–444.

Heidbreder, M., Fröhlich, F., Jöhren, O., Dendorfer, A., Qadri, F., and Dominiak, P. (2003). Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 1541–1543.

Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J. El, Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., et al. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14, 388–405.

Hoch, C.C., Reynolds, C.F., Kupfer, D.J., Houck, P.R., Berman, S.R., and Stack, J.A. (1986). Sleep-disordered breathing in normal and pathologic aging. *J. Clin. Psychiatry* 47, 499–503.

Horiguchi, T., Uryu, K., Giasson, B.I., Ischiropoulos, H., Lightfoot, R., Bellmann, C., Richter-Landsberg, C., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2003). Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am. J. Pathol.* 163, 1021–1031.

Hornbein, T.F. (2001). The high-altitude brain. *J. Exp. Biol.* 204, 3129–3132.

Hornbein, T.F., Townes, B.D., Schoene, R.B., Sutton, J.R., and Houston, C.S. (1989). The cost to the central nervous system of climbing to extremely high altitude. *N. Engl. J. Med.* *321*, 1714–1719.

Hsiao, K.K., Borchelt, D.R., Olson, K., Johannsdottir, R., Kitt, C., Yunis, W., Xu, S., Eckman, C., Younkin, S., Price, D., et al. (1995). Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron* *15*, 1203–1218.

Huang, Y., Potter, R., Sigurdson, W., Santacruz, A., Shih, S., Ju, Y.-E., Kasten, T., Morris, J.C., Mintun, M., Duntley, S., et al. (2012). Effects of age and amyloid deposition on A β dynamics in the human central nervous system. *Arch. Neurol.* *69*, 51–58.

Hulstaert, F., Blennow, K., Ivanoiu, A., Schoonderwaldt, H.C., Riemenschneider, M., De Deyn, P.P., Baner, C., Cras, P., Wiltfang, J., Mehta, P.D., et al. (1999). Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* *52*, 1555–1562.

Hynninen, K.M.J., Breitve, M.H., Wiborg, A.B., Pallesen, S., and Nordhus, I.H. (2005). Psychological characteristics of patients with chronic obstructive pulmonary disease: a review. *J. Psychosom. Res.* *59*, 429–443.

I

Ignacak, M.L., Harbaugh, S.V., Dayyat, E., Row, B.W., Gozal, D., and Czyzyk-Krzeska, M.F. (2009). Intermittent hypoxia regulates RNA polymerase II in hippocampus and prefrontal cortex. *Neuroscience* *158*, 1436–1445.

Incalzi, R.A., Gemma, A., Marra, C., Muzzolon, R., Capparella, O., and Carbonin, P. (1993). Chronic obstructive pulmonary disease. An original model of cognitive decline. *Am. Rev. Respir. Dis.* *148*, 418–424.

Innes, C.R.H., Kelly, P.T., Hlavac, M., Melzer, T.R., and Jones, R.D. (2015). Decreased Regional Cerebral Perfusion in Moderate-Severe Obstructive Sleep Apnoea during Wakefulness. *Sleep* *38*, 699–706.

Ip, M.S.M., Lam, B., Ng, M.M.T., Lam, W.K., Tsang, K.W.T., and Lam, K.S.L. (2002). Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *165*, 670–676.

J

Janssens, J.P., Pautex, S., Hilleret, H., and Michel, J.P. (2000). Sleep disordered breathing in the elderly. *Aging Milan Italy* *12*, 417–429.

Jelkmann, W. (1992). Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol. Rev.* *72*, 449–489.

Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *J. Physiol.* *589*, 1251–1258.

Van der Jeugd, A., Vermaercke, B., Derisbourg, M., Lo, A.C., Hamdane, M., Blum, D., Buée, L., and Hooze, R. D' (2013). Progressive age-related cognitive decline in tau mice. *J. Alzheimers Dis.* *37*, 777–788.

Johns, M.W. (1991). A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* *14*, 540–545.

Johnston, J.A., Liu, W.W., Todd, S.A., Coulson, D.T.R., Murphy, S., Irvine, G.B., and Passmore, A.P. (2005). Expression and activity of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme in Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 1096–1100.

Joosten, S.A., O'Driscoll, D.M., Berger, P.J., and Hamilton, G.S. (2014). Supine position related obstructive sleep apnea in adults: pathogenesis and treatment. *Sleep Med. Rev.* *18*, 7–17.

K

Kadotani, H., Kadotani, T., Young, T., Peppard, P.E., Finn, L., Colrain, I.M., Murphy, G.M., and Mignot, E. (2001). Association between apolipoprotein E epsilon4 and sleep-disordered breathing in adults. *JAMA* *285*, 2888–2890.

Kandalepas, P.C., and Vassar, R. (2014). The normal and pathologic roles of the Alzheimer's β -secretase, BACE1. *Curr. Alzheimer Res.* *11*, 441–449.

Karimi, M., Hedner, J., Zou, D., Eskandari, D., Lundquist, A.-C., and Grote, L. (2015). Attention deficits detected in cognitive tests differentiate between sleep apnea patients with or without a motor vehicle accident. *Sleep Med.* *16*, 528–533.

Kashyap, R., Hock, L.M., and Bowman, T.J. (2001). Higher prevalence of smoking in patients diagnosed as having obstructive sleep apnea. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* *5*, 167–172.

Katsoulis, K., Kontakiotis, T., Spanogiannis, D., Vlachogiannis, E., Kougioulis, M., Gerou, S., and Daskalopoulou, E. (2011). Total antioxidant status in patients with obstructive sleep apnea without comorbidities: the role of the severity of the disease. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* *15*, 861–866.

Kayed, R., and Lasagna-Reeves, C.A. (2013). Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J. Alzheimers Dis. JAD* *33 Suppl 1*, S67–S78.

Kennedy, R.S., Dunlap, W.P., Banderet, L.E., Smith, M.G., and Houston, C.S. (1989). Cognitive performance deficits in a simulated climb of Mount Everest: Operation Everest II. *Aviat. Space Environ. Med.* *60*, 99–104.

Kim, H.-S., Kim, E.-M., Lee, J.-P., Park, C.H., Kim, S., Seo, J.-H., Chang, K.-A., Yu, E., Jeong, S.-J., Chong, Y.H., et al. (2003). C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 β expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 1951–1953.

Klein, M., Gauggel, S., Sachs, G., and Pohl, W. (2010). Impact of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) on attention functions. *Respir. Med.* *104*, 52–60.

Kloepfer, C., Riemann, D., Nofzinger, E.A., Feige, B., Unterrainer, J., O’Hara, R., Sorichter, S., and Nissen, C. (2009). Memory before and after sleep in patients with moderate obstructive sleep apnea. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* 5, 540–548.

Konecny, T., Kara, T., and Somers, V.K. (2014). Obstructive sleep apnea and hypertension: an update. *Hypertension* 63, 203–209.

Krantz, S.B. (1991). Erythropoietin. *Blood* 77, 419–434.

L

Lau, E.Y.Y., Choi, E.W.M., Lai, E.S.K., Lau, K.N.T., Au, C.T., Yung, W.H., and Li, A.M. (2015). Working memory impairment and its associated sleep-related respiratory parameters in children with obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 16, 1109–1115.

Lavie, L. (2003). Obstructive sleep apnoea syndrome – an oxidative stress disorder. *Sleep Med. Rev.* 7, 35–51.

Lavie, L., Kraiczi, H., Hefetz, A., Ghandour, H., Perelman, A., Hedner, J., and Lavie, P. (2002). Plasma Vascular Endothelial Growth Factor in Sleep Apnea Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1624–1628.

Lavie, L., Vishnevsky, A., and Lavie, P. (2004). Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 27, 123–128.

Leboucher, A., Laurent, C., Fernandez-Gomez, F.-J., Burnouf, S., Troquier, L., Eddarkaoui, S., Demeyer, D., Caillierez, R., Zommer, N., Vallez, E., et al. (2013). Detrimental effects of diet-induced obesity on τ pathology are independent of insulin resistance in τ transgenic mice. *Diabetes* 62, 1681–1688.

Ledesma, M.D., Bonay, P., and Avila, J. (1995). Tau protein from Alzheimer’s disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. *J. Neurochem.* 65, 1658–1664.

Lee, G. (2005). Tau and src family tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 323–330.

Lee, S.D., Ju, G., Choi, J.-A., Kim, J.-W., and Yoon, I.-Y. (2012). The association of oxidative stress with central obesity in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* 16, 511–517.

Leifflen, D., Poquin, D., Savourey, G., Barraud, P.A., Raphel, C., and Bittel, J. (1997). Cognitive performance during short acclimation to severe hypoxia. *Aviat. Space Environ. Med.* 68, 993–997.

Levy, P., Tamisier, R., Arnaud, C., Monneret, D., Baguet, J.P., Stanke-Labesque, F., Dematteis, M., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., and Pepin, J.-L. (2012). Sleep deprivation, sleep apnea and cardiovascular diseases. *Front. Biosci. Elite Ed.* 4, 2007–2021.

Li, J., Huang, Y., and Fei, G.-H. (2013). The evaluation of cognitive impairment and relevant factors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 85, 98–105.

- Li, L., Zhang, X., Yang, D., Luo, G., Chen, S., and Le, W. (2009). Hypoxia increases A β generation by altering β - and γ -cleavage of APP. *Neurobiol. Aging* 30, 1091–1098.
- Li, R.C., Row, B.W., Gozal, E., Kheirandish, L., Fan, Q., Brittan, K.R., Guo, S.Z., Sachleben, L.R., and Gozal, D. (2003). Cyclooxygenase 2 and intermittent hypoxia-induced spatial deficits in the rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 469–475.
- Li, R.C., Row, B.W., Kheirandish, L., Brittan, K.R., Gozal, E., Guo, S.Z., Sachleben, L.R., and Gozal, D. (2004). Nitric oxide synthase and intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits in the rat. *Neurobiol. Dis.* 17, 44–53.
- Li, R.C., Guo, S.Z., Raccurt, M., Moudilou, E., Morel, G., Brittan, K.R., and Gozal, D. (2011). Exogenous growth hormone attenuates cognitive deficits induced by intermittent hypoxia in rats. *Neuroscience* 196, 237–250.
- Licht, T., and Keshet, E. (2013). Delineating multiple functions of VEGF-A in the adult brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1727–1737.
- Liesker, J.J., Postma, D.S., Beukema, R.J., Hacken, N.H., ten, van der Molen, T., Riemersma, R.A., van Zomeren, E.H., and Kerstjens, H.A. (2004). Cognitive performance in patients with COPD. *Respir. Med.* 98, 351–356.
- de Lima, F.F.F., Mazzotti, D.R., Tufik, S., and Bittencourt, L. (2015). The role inflammatory response genes in obstructive sleep apnea syndrome: a review. *Sleep Breath. Schlaf Atm.*
- Lin, L., Huang, Q.-X., Yang, S.-S., Chu, J., Wang, J.-Z., and Tian, Q. (2013). Melatonin in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14575–14593.
- Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* 259, 5301–5305.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G.W., and Gong, C.-X. (2004). O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10804–10809.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1942–1950.
- Liu, R.Y., Zhou, J.N., van Heerikhuizen, J., Hofman, M.A., and Swaab, D.F. (1999). Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein E-epsilon4/4 genotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 323–327.
- Loboda, A., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors — Similar but not identical. *Mol. Cells* 29, 435–442.
- Loboda, A., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2012). HIF-1 versus HIF-2 — Is one more important than the other? *Vascul. Pharmacol.* 56, 245–251.

Loewenstein, R.J., Weingartner, H., Gillin, J.C., Kaye, W., Ebert, M., and Mendelson, W.B. (1982). Disturbances of sleep and cognitive functioning in patients with dementia. *Neurobiol. Aging* 3, 371–377.

Loomis, P.A., Howard, T.H., Castleberry, R.P., and Binder, L.I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8422–8426.

Loredo, J.S., Ancoli-Israel, S., and Dimsdale, J.E. (1999). Effect of continuous positive airway pressure vs placebo continuous positive airway pressure on sleep quality in obstructive sleep apnea. *Chest* 116, 1545–1549.

Lu, D.C., Soriano, S., Bredesen, D.E., and Koo, E.H. (2003). Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. *J. Neurochem.* 87, 733–741.

Lu, P.J., Wulf, G., Zhou, X.Z., Davies, P., and Lu, K.P. (1999). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399, 784–788.

Lui, M.M., Lam, J.C., Mak, H.K.-F., Xu, A., Ooi, C., Lam, D.C., Mak, J.C., Khong, P.L., and Ip, M.S.-M. (2009). C-reactive protein is associated with obstructive sleep apnea independent of visceral obesity. *Chest* 135, 950–956.

M

Macey, P.M., Henderson, L.A., Macey, K.E., Alger, J.R., Frysinger, R.C., Woo, M.A., Harper, R.K., Yan-Go, F.L., and Harper, R.M. (2002). Brain Morphology Associated with Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1382–1387.

Mahon, P.C., Hirota, K., and Semenza, G.L. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 15, 2675–2686.

Maloney, B., and Lahiri, D.K. (2012). Structural and functional characterization of H2 haplotype MAPT promoter: Unique neurospecific domains and a hypoxia-inducible element would enhance rationally targeted tauopathy research for Alzheimer's disease. *Gene* 501, 63–78.

Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., and Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.* 9, 702–716.

Marcinkiewicz, M., and Seidah, N.G. (2000). Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J. Neurochem.* 75, 2133–2143.

Marin, J.M., Carrizo, S.J., Vicente, E., and Agusti, A.G.N. (2005). Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet Lond. Engl.* 365, 1046–1053.

Markesbery, W.R., Kryscio, R.J., Lovell, M.A., and Morrow, J.D. (2005). Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 58, 730–735.

- Marti, H.H. (2004). Erythropoietin and the hypoxic brain. *J. Exp. Biol.* 207, 3233–3242.
- Masuda, S., Nagao, M., Takahata, K., Konishi, Y., Gallyas, F., Tabira, T., and Sasaki, R. (1993). Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 268, 11208–11216.
- Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M., and Sasaki, R. (1994). A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 19488–19493.
- Masuda, S., Chikuma, M., and Sasaki, R. (1997). Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res.* 746, 63–70.
- Mayeux, R., and Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Mazza, M., Marano, G., Traversi, G., Bria, P., and Mazza, S. (2011). Primary cerebral blood flow deficiency and Alzheimer’s disease: shadows and lights. *J. Alzheimers Dis. JAD* 23, 375–389.
- Mazza, S., Pépin, J.-L., Naëgelé, B., Plante, J., Deschaux, C., and Lévy, P. (2005). Most obstructive sleep apnoea patients exhibit vigilance and attention deficits on an extended battery of tests. *Eur. Respir. J.* 25, 75–80.
- McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Jr, Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., et al. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 7, 263–269.
- Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, L., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., and Rossi, F. (1995). Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374, 647–650.
- Michaelson, D.M. (2014). APOE ε4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 10, 861–868.
- Mishima, K., Tozawa, T., Satoh, K., Matsumoto, Y., Hishikawa, Y., and Okawa, M. (1999). Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer’s type with disturbed sleep-waking. *Biol. Psychiatry* 45, 417–421.
- Montserrat, J.M., Ferrer, M., Hernandez, L., Farré, R., Vilagut, G., Navajas, D., Badia, J.R., Carrasco, E., De Pablo, J., and Ballester, E. (2001). Effectiveness of CPAP treatment in daytime function in sleep apnea syndrome: a randomized controlled study with an optimized placebo. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 608–613.
- Montuschi, P., Barnes, P.J., and Roberts, L.J. (2004). Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1791–1800.

Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G.A., and Maccioni, R.B. (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.

Mori, H., Kondo, J., and Ihara, Y. (1987). Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* *235*, 1641–1644.

Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y., and Sasaki, R. (1997). Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* *76*, 105–116.

Morrell, M. (2003). Changes in brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* *4*, 451–454.

Morrell, M.J., Jackson, M.L., Twigg, G.L., Ghiassi, R., McRobbie, D.W., Quest, R.A., Pardoe, H., Pell, G.S., Abbott, D.F., Rochford, P.D., et al. (2010). Changes in brain morphology in patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax* *65*, 908–914.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* *11*, 47–60.

Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., and Mucke, L. (2011). The many faces of tau. *Neuron* *70*, 410–426.

N

Naëgelé, B., Thouvard, V., Pépin, J.L., Lévy, P., Bonnet, C., Perret, J.E., Pellat, J., and Feuerstein, C. (1995). Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. *Sleep* *18*, 43–52.

Nair, D., Dayyat, E.A., Zhang, S.X., Wang, Y., and Gozal, D. (2011a). Intermittent hypoxia-induced cognitive deficits are mediated by NADPH oxidase activity in a murine model of sleep apnea. *PloS One* *6*, e19847.

Nair, D., Zhang, S.X.L., Ramesh, V., Hakim, F., Kaushal, N., Wang, Y., and Gozal, D. (2011b). Sleep Fragmentation Induces Cognitive Deficits Via Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase-dependent Pathways in Mouse. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *184*, 1305–1312.

Nakano, D., Hayashi, T., Tazawa, N., Yamashita, C., Inamoto, S., Okuda, N., Mori, T., Sohmiya, K., Kitaura, Y., Okada, Y., et al. (2005). Chronic hypoxia accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* *28*, 837–845.

Nelson, T.O., Dunlosky, J., White, D.M., Steinberg, J., Townes, B.D., and Anderson, D. (1990). Cognition and metacognition at extreme altitudes on Mount Everest. *J. Exp. Psychol. Gen.* *119*, 367–374.

Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., and Donlon, T.A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 387, 271–280.

Ng, K.-M., Lau, C.-F., and Fung, M.-L. (2010). Melatonin reduces hippocampal beta-amyloid generation in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Brain Res.* 1354, 163–171.

Nieto, F.J., Young, T.B., Lind, B.K., Shahar, E., Samet, J.M., Redline, S., Agostino, R.B. D', Newman, A.B., Lebowitz, M.D., and Pickering, T.G. (2000). Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study. JAMA* 283, 1829–1836.

Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D.M., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457, 981–989.

○

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Aβ and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.

Ohga, E., Tomita, T., Wada, H., Yamamoto, H., Nagase, T., and Ouchi, Y. (2003). Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J. Appl. Physiol.* 94, 179–184.

Oksenberg, A., and Silverberg, D.S. (1998). The effect of body posture on sleep-related breathing disorders: facts and therapeutic implications. *Sleep Med. Rev.* 2, 139–162.

Olaithe, M., and Bucks, R.S. (2013). Executive dysfunction in OSA before and after treatment: a meta-analysis. *Sleep* 36, 1297–1305.

Olmetti, F., La Rovere, M.T., Robbi, E., Taurino, A.E., and Fanfulla, F. (2008). Nocturnal cardiac arrhythmia in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 9, 475–480.

Oltmanns, K.M. (2005). Acute hypoxia decreases plasma VEGF concentration in healthy humans. *AJP Endocrinol. Metab.* 290, E434–E439.

Onen, F., and Onen, H. (2010). [Obstructive sleep apnea and cognitive impairment in the elderly]. *Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.* 8, 163–169.

Onen, F., and Onen, S.H. (2003). Altérations des rythmes du sommeil dans la maladie d'Alzheimer Sleep rhythm disturbances in Alzheimer's disease. *Rev. Médecine Interne* 24, 165–171.

Osorio, R.S., Ayappa, I., Mantua, J., Gumb, T., Varga, A., Mooney, A.M., Burschtin, O.E., Taxin, Z., Doring, E., Spector, N., et al. (2014). Interaction between sleep-disordered breathing and apolipoprotein E genotype on cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease in cognitively normal elderly individuals. *Neurobiol. Aging* 35, 1318–1324.

Osorio, R.S., Gumb, T., Pirraglia, E., Varga, A.W., Lu, S.-E., Lim, J., Wohlleber, M.E., Ducca, E.L., Koushyk, V., Glodzik, L., et al. (2015). Sleep-disordered breathing advances cognitive decline in the elderly. *Neurology*.

P

Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., Adamio, L. D', Shen, J., Müller, U., et al. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46, 541–554.

Paresce, D.M., Ghosh, R.N., and Maxfield, F.R. (1996). Microglial Cells Internalize Aggregates of the Alzheimer's Disease Amyloid β -Protein Via a Scavenger Receptor. *Neuron* 17, 553–565.

Park, S.A., Shaked, G.M., Bredesen, D.E., and Koo, E.H. (2009). Mechanism of cytotoxicity mediated by the C31 fragment of the amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 450–455.

Peker, Y., Carlson, J., and Hedner, J. (2006). Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a long-term follow-up. *Eur. Respir. J.* 28, 596–602.

Peppard, P.E., Young, T., Palta, M., and Skatrud, J. (2000a). Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N. Engl. J. Med.* 342, 1378–1384.

Peppard, P.E., Young, T., Palta, M., Dempsey, J., and Skatrud, J. (2000b). Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 284, 3015–3021.

Peppard, P.E., Szklo-Coxe, M., Hla, K.M., and Young, T. (2006). Longitudinal association of sleep-related breathing disorder and depression. *Arch. Intern. Med.* 166, 1709–1715.

Perez, R.G., Zheng, H., Van der Ploeg, L.H., and Koo, E.H. (1997). The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 9407–9414.

Perry, E.K., Blessed, G., Tomlinson, B.E., Perry, R.H., Crow, T.J., Cross, A.J., Dockray, G.J., Dimaline, R., and Arregui, A. (1981). Neurochemical activities in human temporal lobe related to aging and Alzheimer-type changes. *Neurobiol. Aging* 2, 251–256.

Perry, G., Cash, A.D., and Smith, M.A. (2002). Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *J. Biomed. Biotechnol.* 2, 120–123.

Petitjean, T., Chammas, N., Langevin, B., Philit, F., and Robert, D. (2000). Principles of mandibular advancement device applied to the therapeutic of snoring and sleep apnea syndrome. *Sleep* 23 *Suppl* 4, S166–S171.

Pilkauskaite, G., Miliauskas, S., Sakalauskas, R., Pilkauskaite, G., Miliauskas, S., and Sakalauskas, R. (2013). Reactive Oxygen Species Production in Peripheral Blood Neutrophils of Obstructive Sleep Apnea Patients, Reactive Oxygen Species Production in Peripheral Blood Neutrophils of Obstructive Sleep Apnea Patients. *Sci. World J. Sci. World J.* 2013, 2013, e421763.

Planel, E., Richter, K.E.G., Nolan, C.E., Finley, J.E., Liu, L., Wen, Y., Krishnamurthy, P., Herman, M., Wang, L., Schachter, J.B., et al. (2007). Anesthesia Leads to Tau Hyperphosphorylation through Inhibition of Phosphatase Activity by Hypothermia. *J. Neurosci.* 27, 3090–3097.

Polak, J., Shimoda, L.A., Drager, L.F., Udem, C., McHugh, H., Polotsky, V.Y., and Punjabi, N.M. (2013). Intermittent hypoxia impairs glucose homeostasis in C57BL6/J mice: partial improvement with cessation of the exposure. *Sleep* 36, 1483–1490; 1490A – 1490B.

Poorkaj, P., Kas, A., Souza, I. D', Zhou, Y., Pham, Q., Stone, M., Olson, M.V., and Schellenberg, G.D. (2001). A genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 12, 700–712.

Potter, R., Patterson, B.W., Elbert, D.L., Ovod, V., Kasten, T., Sigurdson, W., Mawuenyega, K., Blazey, T., Goate, A., Chott, R., et al. (2013). Increased in vivo amyloid- β 42 production, exchange, and loss in presenilin mutation carriers. *Sci. Transl. Med.* 5, 189ra77.

R

Rabie, T., and Marti, H.H. (2008). Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiol. Bethesda Md* 23, 263–274.

Rabie, T., Kunze, R., and Marti, H.H. (2011). Impaired hypoxic response in senescent mouse brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 655–661.

Regard, M., Oelz, O., Brugger, P., and Landis, T. (1989). Persistent cognitive impairment in climbers after repeated exposure to extreme altitude. *Neurology* 39, 210–213.

Regard, M., Landis, T., Casey, J., Maggiorini, M., Bärtsch, P., and Oelz, O. (1991). Cognitive changes at high altitude in healthy climbers and in climbers developing acute mountain sickness. *Aviat. Space Environ. Med.* 62, 291–295.

Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem. Pharmacol.*

Reynolds, C.F., Kupfer, D.J., Taska, L.S., Hoch, C.C., Sewitch, D.E., Restifo, K., Spiker, D.G., Zimmer, B., Marin, R.S., and Nelson, J. (1985). Sleep apnea in Alzheimer's dementia: correlation with mental deterioration. *J. Clin. Psychiatry* 46, 257–261.

Reynolds, C.H., Garwood, C.J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P.W., Varndell, I.M., et al. (2008). Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J. Biol. Chem.* 283, 18177–18186.

Rongve, A., Boeve, B.F., and Aarsland, D. (2010). Frequency and correlates of caregiver-reported sleep disturbances in a sample of persons with early dementia. *J. Am. Geriatr. Soc.* 58, 480–486.

Rotz, R.C. von, Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., and Konietzko, U. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J. Cell Sci.* 117, 4435–4448.

Row, B.W., Liu, R., Xu, W., Kheirandish, L., and Gozal, D. (2003). Intermittent Hypoxia Is Associated with Oxidative Stress and Spatial Learning Deficits in the Rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *167*, 1548–1553.

Row, B.W., Kheirandish, L., Cheng, Y., Rowell, P.P., and Gozal, D. (2007). Impaired spatial working memory and altered choline acetyltransferase (CHAT) immunoreactivity and nicotinic receptor binding in rats exposed to intermittent hypoxia during sleep. *Behav. Brain Res.* *177*, 308–314.

Rybnikova, E., Vataeva, L., Tyulkova, E., Gluschenko, T., Otellin, V., Pelto-Huikko, M., and Samoilov, M.O. (2005). Mild hypoxia preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia. *Behav. Brain Res.* *160*, 107–114.

S

Sakanaka, M., Wen, T.C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., and Sasaki, R. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 4635–4640.

Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions ITS STABILIZATION BY HYPOXIA DEPENDS ON REDOX-INDUCED CHANGES. *J. Biol. Chem.* *272*, 22642–22647.

Samoilov, M.O., Lazarevich, E.V., Semenov, D.G., Mokrushin, A.A., Tyul'kova, E.I., Romanovskii, D.Y., Milyakova, E.A., and Dudkin, K.N. (2003). The adaptive effects of hypoxic preconditioning of brain neurons. *Neurosci. Behav. Physiol.* *33*, 1–11.

Santacruz, K., Lewis, J., Spire, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., et al. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* *309*, 476–481.

Sapin, E., Peyron, C., Roche, F., Gay, N., Carcenac, C., Savasta, M., Levy, P., and Dematteis, M. (2015). Chronic Intermittent Hypoxia Induces Chronic Low-Grade Neuroinflammation in the Dorsal Hippocampus of Mice. *Sleep*.

Saunamäki, T., and Jehkonen, M. (2007). A review of executive functions in obstructive sleep apnea syndrome. *Acta Neurol. Scand.* *115*, 1–11.

Scarmeas, N., Stern, Y., Mayeux, R., and Luchsinger, J.A. (2006). Mediterranean diet, Alzheimer disease, and vascular mediation. *Arch. Neurol.* *63*, 1709–1717.

Schäfer, H., Koehler, U., Ewig, S., Hasper, E., Tasci, S., and Lüderitz, B. (1999). Obstructive sleep apnea as a risk marker in coronary artery disease. *Cardiology* *92*, 79–84.

Schedin-Weiss, S., Winblad, B., and Tjernberg, L.O. (2014). The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *FEBS J.* *281*, 46–62.

Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L., Alonso, M.E., et al. (1992). Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258, 668–671.

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

Schupf, N., Patel, B., Pang, D., Zigman, W.B., Silverman, W., Mehta, P.D., and Mayeux, R. (2007). Elevated plasma beta-amyloid peptide Aβ₄₂ levels, incident dementia, and mortality in Down syndrome. *Arch. Neurol.* 64, 1007–1013.

Scrima, L., Broudy, M., Nay, K.N., and Cohn, M.A. (1982). Increased severity of obstructive sleep apnea after bedtime alcohol ingestion: diagnostic potential and proposed mechanism of action. *Sleep* 5, 318–328.

Semenza, G.L., and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5447–5454.

Semenza, G.L., Neufeldt, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5680–5684.

Seneviratne, U., and Puvanendran, K. (2004). Excessive daytime sleepiness in obstructive sleep apnea: prevalence, severity, and predictors. *Sleep Med.* 5, 339–343.

Sergeant, N., Delacourte, A., and Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 179–197.

Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.-L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev. Proteomics* 5, 207–224.

Sforza, E., and Roche, F. (2012). Sleep Apnea Syndrome and Cognition. *Front. Neurol.* 3.

Sforza, E., Haba-Rubio, J., De Bilbao, F., Rochat, T., and Ibanez, V. (2004). Performance vigilance task and sleepiness in patients with sleep-disordered breathing. *Eur. Respir. J.* 24, 279–285.

Shan, X., Chi, L., Ke, Y., Luo, C., Qian, S., Gozal, D., and Liu, R. (2007). Manganese superoxide dismutase protects mouse cortical neurons from chronic intermittent hypoxia-mediated oxidative damage. *Neurobiol. Dis.* 28, 206–215.

Shiota, S., Takekawa, H., Matsumoto, S.-E., Takeda, K., Nurwidya, F., Yoshioka, Y., Takahashi, F., Hattori, N., Tabira, T., Mochizuki, H., et al. (2013). Chronic intermittent hypoxia/reoxygenation facilitate amyloid-β generation in mice. *J. Alzheimers Dis. JAD* 37, 325–333.

Singer, S.M., Zainelli, G.M., Norlund, M.A., Lee, J.M., and Muma, N.A. (2002). Transglutaminase bonds in neurofibrillary tangles and paired helical filament tau early in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* *40*, 17–30.

Skoog, I., and Gustafson, D. (2006). Update on hypertension and Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* *28*, 605–611.

Small, D.H., Clarris, H.L., Williamson, T.G., Reed, G., Key, B., Mok, S.S., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Nurcombe, V. (1999). Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* *1*, 275–285.

Smith, I.F., Boyle, J.P., Green, K.N., Pearson, H.A., and Peers, C. (2004). Hypoxic remodelling of Ca²⁺ mobilization in type I cortical astrocytes: involvement of ROS and pro-amyloidogenic APP processing. *J. Neurochem.* *88*, 869–877.

Smith, S.M.C., Friedle, S.A., and Watters, J.J. (2013). Chronic Intermittent Hypoxia Exerts CNS Region-Specific Effects on Rat Microglial Inflammatory and TLR4 Gene Expression. *PLoS ONE* *8*, e81584.

van Someren, E.J.W., Hagebeuk, E.E.O., Lijzenga, C., Scheltens, P., de Rooij, S.E.J.A., Jonker, C., Pot, A.-M., Mirmiran, M., and Swaab, D.F. (1996). Circadian rest—activity rhythm disturbances in alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* *40*, 259–270.

Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Jr, Kaye, J., Montine, T.J., et al. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* *7*, 280–292.

Sportiche, N., Suntsova, N., Methippara, M., Bashir, T., Mitrani, B., Szymusiak, R., and McGinty, D. (2010). Sustained sleep fragmentation results in delayed changes in hippocampal-dependent cognitive function associated with reduced dentate gyrus neurogenesis. *Neuroscience* *170*, 247–258.

Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T.K., Tang, M.X., Wilder, D., and Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *271*, 1004–1010.

Sterniczuk, R., Dyck, R.H., Laferla, F.M., and Antle, M.C. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 1. Circadian changes. *Brain Res.* *1348*, 139–148.

Stopa, E.G., Volicer, L., Kuo-Leblanc, V., Harper, D., Lathi, D., Tate, B., and Satlin, A. (1999). Pathologic evaluation of the human suprachiasmatic nucleus in severe dementia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *58*, 29–39.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 1977–1981.

Strobel, R.J., and Rosen, R.C. (1996). Obesity and weight loss in obstructive sleep apnea: a critical review. *Sleep* 19, 104–115.

Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13287–13292.

Sullivan, C.E., Issa, F.G., Berthon-Jones, M., and Eves, L. (1981). Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet Lond. Engl.* 1, 862–865.

Sultan, A., Nesslany, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J. Biol. Chem.* 286, 4566–4575.

Sun, X., He, G., Qing, H., Zhou, W., Dobie, F., Cai, F., Staufenbiel, M., Huang, L.E., and Song, W. (2006). Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 18727–18732.

Sunderland T, Linker G, Mirza N, and et al (2003). DEcreased β -amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with alzheimer disease. *JAMA* 289, 2094–2103.

Suzuki, T., and Nakaya, T. (2008). Regulation of amyloid beta-protein precursor by phosphorylation and protein interactions. *J. Biol. Chem.* 283, 29633–29637.

T

Taasan, V.C., Block, A.J., Boysen, P.G., and Wynne, J.W. (1981). Alcohol increases sleep apnea and oxygen desaturation in asymptomatic men. *Am. J. Med.* 71, 240–245.

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., and Neve, R.L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880–884.

Tennstaedt, A., Pöpsel, S., Truebestein, L., Hauske, P., Brockmann, A., Schmidt, N., Irlé, I., Sacca, B., Niemeyer, C.M., Brandt, R., et al. (2012). Human high temperature requirement serine protease A1 (HTRA1) degrades tau protein aggregates. *J. Biol. Chem.* 287, 20931–20941.

Thakre, T.P., Mamtani, M.R., and Kulkarni, H. (2009). Lack of association of the APOE epsilon 4 allele with the risk of obstructive sleep apnea: meta-analysis and meta-regression. *Sleep* 32, 1507–1511.

Thomas, D.B., and Yoffey, J.M. (1964). HUMAN FOETAL HAEMATOPOIESIS. II. HEPATIC HAEMATOPOIESIS IN THE HUMAN FOETUS. *Br. J. Haematol.* 10, 193–197.

Thomas, S.N., Funk, K.E., Wan, Y., Liao, Z., Davies, P., Kuret, J., and Yang, A.J. (2012). Dual modification of Alzheimer's disease PHF-tau protein by lysine methylation and ubiquitylation: a mass spectrometry approach. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 105–117.

Torre, D.L., C, J., Torre, D.L., and C, J. (2012). Cardiovascular Risk Factors Promote Brain Hypoperfusion Leading to Cognitive Decline and Dementia, Cardiovascular Risk Factors Promote Brain Hypoperfusion Leading to Cognitive Decline and Dementia. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* *2012*, *2012*, e367516.

Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1995). Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *9*, 1570–1576.

Troquier, L., Caillierez, R., Burnouf, S., Fernandez-Gomez, F.J., Grosjean, M.-E., Zommer, N., Sergeant, N., Schraen-Maschke, S., Blum, D., and Buee, L. (2012). Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY_{Tau22} mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr. Alzheimer Res.* *9*, 397–405.

Troussière, A.-C., Charley, C.M., Salleron, J., Richard, F., Delbeuck, X., Derambure, P., Pasquier, F., and Bombois, S. (2014). Treatment of sleep apnoea syndrome decreases cognitive decline in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *85*, 1405–1408.

U

Uchida, K., Okamoto, N., Ohara, K., and Morita, Y. (1996). Daily rhythm of serum melatonin in patients with dementia of the degenerate type. *Brain Res.* *717*, 154–159.

Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., and Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* *7*, 65–74.

V

Vingtdeux, V., and Marambaud, P. (2012). Identification and biology of α -secretase. *J. Neurochem.* *120 Suppl 1*, 34–45.

Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nesslany, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., et al. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front. Cell. Neurosci.* *8*, 84.

Vitiello, M.V., and Prinz, P.N. (1989). Alzheimer's disease. Sleep and sleep/wake patterns. *Clin. Geriatr. Med.* *5*, 289–299.

Vitiello, M.V., Prinz, P.N., Williams, D.E., Frommlet, M.S., and Ries, R.K. (1990). Sleep disturbances in patients with mild-stage Alzheimer's disease. *J. Gerontol.* *45*, M131–M138.

W

Wallace, A., and Bucks, R.S. (2013). Memory and obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep* *36*, 203–220.

- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 552–557.
- Wang, J., Ming, H., Chen, R., Ju, J., Peng, W., Zhang, G.-X., and Liu, C. (2015). CIH-induced neurocognitive impairments are associated with hippocampal Ca²⁺ overload, apoptosis, and dephosphorylation of ERK1/2 and CREB that are mediated by overactivation of NMDARs. *Brain Res.* *1625*, 64–72.
- Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* *2*, 871–875.
- Wang, Z., Yang, D., Zhang, X., Li, T., Li, J., Tang, Y., and Le, W. (2011). Hypoxia-induced down-regulation of neprilysin by histone modification in mouse primary cortical and hippocampal neurons. *PLoS One* *6*, e19229.
- Ward, C.P., McCoy, J.G., McKenna, J.T., Connolly, N.P., McCarley, R.W., and Strecker, R.E. (2009). Spatial learning and memory deficits following exposure to 24 hours of sleep fragmentation or intermittent hypoxia in a rat model of obstructive sleep apnea. *Brain Res.* *1294*, 128–137.
- Weaver, T.E., Maislin, G., Dinges, D.F., Bloxham, T., George, C.F.P., Greenberg, H., Kader, G., Mahowald, M., Younger, J., and Pack, A.I. (2007). Relationship between hours of CPAP use and achieving normal levels of sleepiness and daily functioning. *Sleep* *30*, 711–719.
- Webster, N.J., Green, K.N., Peers, C., and Vaughan, P.F.T. (2002). Altered processing of amyloid precursor protein in the human neuroblastoma SH-SY5Y by chronic hypoxia. *J. Neurochem.* *83*, 1262–1271.
- Webster, N.J., Ramsden, M., Boyle, J.P., Pearson, H.A., and Peers, C. (2006). Amyloid peptides mediate hypoxic increase of L-type Ca²⁺ channels in central neurones. *Neurobiol. Aging* *27*, 439–445.
- Weidemann, A., and Johnson, R.S. (2008). Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ.* *15*, 621–627.
- Wiener, C.M., Booth, G., and Semenza, G.L. (1996). In Vivo Expression of mRNAs Encoding Hypoxia-Inducible Factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *225*, 485–488.
- Wilson, R.S., Krueger, K.R., Arnold, S.E., Schneider, J.A., Kelly, J.F., Barnes, L.L., Tang, Y., and Bennett, D.A. (2007). Loneliness and risk of Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry* *64*, 234–240.
- Wisor, J.P., Edgar, D.M., Yesavage, J., Ryan, H.S., McCormick, C.M., Lapustea, N., and Murphy, G.M. (2005). Sleep and circadian abnormalities in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for cholinergic transmission. *Neuroscience* *131*, 375–385.

Witting, W., Kwa, I.H., Eikelenboom, P., Mirmiran, M., and Swaab, D.F. (1990). Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 27, 563–572.

X

Xu, W., Chi, L., Row, B., Xu, R., Ke, Y., Xu, B., Luo, C., Kheirandish, L., Gozal, D., and Liu, R. (2004). Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience* 126, 313–323.

Y

Yaffe, K., Laffan, A.M., Harrison, S.L., Redline, S., Spira, A.P., Ensrud, K.E., Ancoli-Israel, S., and Stone, K.L. (2011). Sleep-disordered breathing, hypoxia, and risk of mild cognitive impairment and dementia in older women. *Jama* 306, 613–619.

Yaffe, K., Falvey, C.M., and Hoang, T. (2014). Connections between sleep and cognition in older adults. *Lancet Neurol.* 13, 1017–1028.

Yaggi, H.K., Concato, J., Kernan, W.N., Lichtman, J.H., Brass, L.M., and Mohsenin, V. (2005). Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N. Engl. J. Med.* 353, 2034–2041.

Yang, L.-B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X.-L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., et al. (2003). Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat. Med.* 9, 3–4.

Yang, Y.-M., Yuan, H., Edwards, J.G., Skayian, Y., Ochani, K., Miller, E.J., and Sehgal, P.B. (2014). Deletion of STAT5a/b in vascular smooth muscle abrogates the male bias in hypoxic pulmonary hypertension in mice: implications in the human disease. *Mol. Med. Camb. Mass* 20, 625–638.

Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2000). Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 887, 80–89.

Yasojima, K., Akiyama, H., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2001). Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci. Lett.* 297, 97–100.

Yasuda, Y., Masuda, S., Chikuma, M., Inoue, K., Nagao, M., and Sasaki, R. (1998). Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 25381–25387.

Yatin, S.M., Varadarajan, S., Link, C.D., and Butterfield, D.A. (1999). In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiol. Aging* 20, 325–330; discussion 339–342.

Yokoe, T., Minoguchi, K., Matsuo, H., Oda, N., Minoguchi, H., Yoshino, G., Hirano, T., and Adachi, M. (2003). Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 107, 1129–1134.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53, 337–351.

Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., and Badr, S. (1993). The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N. Engl. J. Med.* 328, 1230–1235.

Young-Pearse, T.L., Chen, A.C., Chang, R., Marquez, C., and Selkoe, D.J. (2008). Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1. *Neural Develop.* 3, 15.

Z

Zetterberg, H., Wilson, D., Andreasson, U., Minthon, L., Blennow, K., Randall, J., and Hansson, O. (2013). Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 5, 9.

Zhang, Y., and Krzyzanski, I.S. and W. (2014). Dynamics of Erythropoietic Markers in Response to Hypoxia in Rats. *J. Blood Disord. Transfus.* 2014.

Zhang, B., Veasey, S.C., Wood, M.A., Leng, L.Z., Kaminski, C., Leight, S., Abel, T., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2005). Impaired rapid eye movement sleep in the Tg2576 APP murine model of Alzheimer's disease with injury to pedunculopontine cholinergic neurons. *Am. J. Pathol.* 167, 1361–1369.

Zhang, C.-E., Yang, X., Li, L., Sui, X., Tian, Q., Wei, W., Wang, J., and Liu, G. (2014a). Hypoxia-Induced Tau Phosphorylation and Memory Deficit in Rats. *Neurodegener. Dis.* 14, 107–116.

Zhang, J.-X., Lu, X.-J., Wang, X.-C., Li, W., and Du, J.-Z. (2006). Intermittent hypoxia impairs performance of adult mice in the two-way shuttle box but not in the Morris water maze. *J. Neurosci. Res.* 84, 228–235.

Zhang, X., Zhou, K., Wang, R., Cui, J., Lipton, S.A., Liao, F.-F., Xu, H., and Zhang, Y. -w. (2007). Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1)-mediated Hypoxia Increases BACE1 Expression and beta-Amyloid Generation. *J. Biol. Chem.* 282, 10873–10880.

Zhang, X., Li, L., Zhang, X., Xie, W., Li, L., Yang, D., Heng, X., Du, Y., Doody, R.S., and Le, W. (2013). Prenatal hypoxia may aggravate the cognitive impairment and Alzheimer's disease neuropathology in APPSwe/PS1A246E transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 34, 663–678.

Zhang, X., Li, Y., Xu, H., and Zhang, Y.-W. (2014b). The γ -secretase complex: from structure to function. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 427.

Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., and Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* 4, 3.

Annexes

I. Annexe 1 : MMSE (Mini Mental State Examination)

Mini Mental State Examination (MMSE) (Version consensuelle du GRECO)

Orientation

/ 10

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 :

1. En quelle année sommes-nous ?
2. En quelle saison ?
3. En quel mois ?
4. Quel jour du mois ?
5. Quel jour de la semaine ?

Je vais vous poser maintenant quelques questions sur l'endroit où 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 située ce département ?
10. A quel étage sommes-nous ?

Apprentissage

/ 3

Je vais vous dire trois mots ; je vous voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir car je vous les redemanderai tout à l'heure.

- | | | | |
|------------|---------------|-----------------|--------------------------|
| 11. Cigare | <i>Citron</i> | <i>Fauteuil</i> | <input type="checkbox"/> |
| 12. Fleur | <i>Clé</i> | <i>Tulipe</i> | <input type="checkbox"/> |
| 13. Porte | <i>Ballon</i> | <i>Canard</i> | <input type="checkbox"/> |

Répéter les 3 mots.

Attention et calcul

/ 5

Voulez-vous compter à partir de 100 en retirant 7 à chaque fois ?*

14. 93
15. 86
16. 79
17. 72
18. 65

Pour tous les sujets, même pour ceux qui ont obtenu le maximum de points, demander :

Voulez-vous épeler le mot MONDE à l'envers ?**

Rappel

/ 3

Pouvez-vous me dire quels étaient les 3 mots que je vous ai demandés de répéter et de retenir tout à l'heure ?

- | | | | |
|------------|---------------|-----------------|--------------------------|
| 11. Cigare | <i>Citron</i> | <i>Fauteuil</i> | <input type="checkbox"/> |
| 12. Fleur | <i>Clé</i> | <i>Tulipe</i> | <input type="checkbox"/> |
| 13. Porte | <i>Ballon</i> | <i>Canard</i> | <input type="checkbox"/> |

Langage

/ 8

Montrer un crayon. 22. Quel est le nom de cet objet ?*

Montrer votre montre. 23. Quel est le nom de cet objet ?**

24. Ecoutez bien et répétez après moi : « PAS DE MAIS, DE SI, NI DE ET »***

Poser une feuille de papier sur le bureau, la montrer au sujet en lui disant : « Ecoutez bien et faites ce que je vais vous dire :

25. Prenez cette feuille de papier avec votre main droite,

26. Pliez-la en deux,

27. Et jetez-la par terre. »****

Tendre au sujet une feuille de papier sur laquelle est écrit en gros caractère : « FERMEZ LES YEUX » et dire au sujet :

28. « Faites ce qui est écrit ».

Tendre au sujet une feuille de papier et un stylo, en disant :

29. « Voulez-vous m'écrire une phrase, ce que vous voulez, mais une phrase entière. »

Praxies constructives

/ 1

Tendre au sujet une feuille de papier et lui demander :

30. « Voulez-vous recopier ce dessin ? »

II. Echelle IADL simplifiée

Activités de la vie quotidienne IADL de LAWTON

Capacité à utiliser le téléphone

Je me sers du téléphone de ma propre initiative, cherche et compose les numéros	0
Je compose un petit nombre de numéros bien connus	1
Je réponds au téléphone mais je n'appelle pas	1
Je suis incapable d'utiliser le téléphone	1

Moyen de transport

Je peux voyager seul de façon indépendante (par les transports en commun, ou avec ma propre voiture)	0
Je peux me déplacer seul(e) en taxi, pas en autobus	1
Je peux prendre les transports en commun si je suis accompagné (e)	1
Transport limité au taxi ou à la voiture, en étant accompagné(e)	1
Je ne me déplace pas du tout	1

Responsabilité pour la prise des médicaments

Je m'occupe moi-même de la prise : dosage et horaire	0
Je peux les prendre moi-même, s'ils sont préparés et dosés à l'avance	1
Je suis incapable de les prendre moi-même	1

Capacité à gérer son budget

Je suis totalement autonome (gérer le budget, faire des chèques, payer des factures)	0
Je me débrouille pour les dépenses au jour le jour, mais j'ai besoin d'aide pour gérer mon budget à long terme (pour planifier les grosses dépenses)	1
Je suis incapable de gérer l'argent nécessaire à payer mes dépenses au jour le jour	1

Chaque item est coté en se basant sur les réponses du patient et en tenant compte de la personne vivant avec lui au quotidien.

III. Echelle d'Epworth

Échelle de Somnolence d'Epworth

Johns MW (Sleep 1991; 14:540-5) «A new method for measuring day time sleepiness : The Epworth Sleepiness Scale.Sleep».

La somnolence est la propension plus ou moins irrésistible à s'endormir si l'on est pas stimulé.

(Nb. Ce sentiment est très distinct de la sensation de fatigue qui parfois oblige à se reposer).

Le questionnaire suivant, qui sert à évaluer la somnolence subjective, est corrélé avec les résultats objectifs recueillis par les enregistrements du sommeil.

Prénom :	Nom :	Date de naissance:.....
Date du test :	Ronflement? oui Non.....	

Vous arrive-t-il de somnoler ou de vous endormir (dans la journée) dans les situations suivantes :

Même si vous ne vous êtes pas trouvé récemment dans l'une de ces situations, essayez d'imaginer comment vous réagiriez et quelles seraient vos chances d'assoupissement.

notez 0 : si *c'est exclu*. «Il ne m'arrive jamais de somnoler: **aucune** chance,
notez 1 : si *ce n'est pas impossible*. «Il y a un petit risque»: **faible** chance,
notez 2 : si *c'est probable*. «Il pourrait m'arriver de somnoler»: chance **moyenne**,
notez 3 : si *c'est systématique*. «Je somnolerais à chaque fois»: **forte** chance.

- | | | | | |
|--|---|---|---|---|
| - Pendant que vous êtes occupé à lire un document | 0 | 1 | 2 | 3 |
| - Devant la télévision ou au cinéma | 0 | 1 | 2 | 3 |
| - Assis inactif dans un lieu public (salle d'attente, théâtre, cours, congrès ...) | 0 | 1 | 2 | 3 |
| - Passager, depuis au moins une heure sans interruptions, d'une voiture ou d'un transport en commun (train, bus, avion, métro ...) | 0 | 1 | 2 | 3 |
| - Allongé pour une sieste, lorsque les circonstances le permettent | 0 | 1 | 2 | 3 |
| - En position assise au cours d'une conversation (ou au téléphone) avec un proche..... | 0 | 1 | 2 | 3 |
| - Tranquillement assis à table à la fin d'un repas sans alcool | 0 | 1 | 2 | 3 |
| - Au volant d'une voiture immobilisée depuis quelques minutes dans un embouteillage | 0 | 1 | 2 | 3 |

Total (de 0 à 24) :

- **En dessous de 8: vous n'avez pas de dette de sommeil.**
- **De 9 à 14: vous avez un déficit de sommeil, revoyez vos habitudes.**
- **Si le total est supérieur à 15: vous présentez des signes de somnolence diurne excessive. Consultez votre médecin pour déterminer si vous êtes atteint d'un trouble du sommeil. Si non, pensez à changer vos habitudes.**

NB. Ce questionnaire aide à mesurer votre niveau général de somnolence, il n'établit pas un diagnostic. Apportez le à votre médecin pour discuter avec lui des causes et des conséquences de ce handicap dans votre vie.

<http://www.sommeil-mg.net>

(copyleft sous réserve de mentionner la source)

IV. Curriculum Vitae

ALVES PIRES Claire (30 ans, un enfant)
107 Boulevard Montebello,
Résidence Comte de Montebello, Appt C401
59000 Lille

06 77 09 41 17
claire.alves-pires@inserm.fr

Doctorante 4^{ème} année (spécialité neurosciences)

Formation

06 2002	Obtention du Baccalauréat, Série S option SVT, Mention AB
09 2002 – 06 2009	Formation commune des études pharmaceutiques puis concours de l'internat, Poitiers (86)
11 2009 – 10 2010	DES IPR 1 ^{ère} année, UFR de Pharmacie, Université Picardie Jules Verne, Amiens, Somme (80) Master 1 « Innovation Thérapeutique et Recherche », Amiens (80)
11 2010 – 10 2011	DES IPR 2 ^{ème} année, UFR de Pharmacie, Université de Lille 2, Lille, Nord (59) Master 2 Recherche « Physiologie et physiopathologie des maladies humaines », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, Lille, Nord (59)
11 2011 – 10 2013	DES IPR 3 ^{ème} puis 4 ^{ème} année, UFR de Pharmacie, Université de Lille 2, Lille, Nord (59)
Septembre 2012	Formation à l'expérimentation animale – Niveau 2 – Lille, Nord (59)
Mai 2014	Soutenance en vue de l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie : Effet des agents anesthésiques dans la survenue des démences cognitives postopératoires et de la maladie d'Alzheimer.

Expérience professionnelle

09 2005 – 06 2006	Stage d'Initiation à la Recherche sous la direction du Pr. PAGE Guylène « Modulation des voies PKR et mTOR du contrôle traductionnel dans la rate des souris transgéniques Alzheimer APP ₅₁ /PS1 Knock in. », GREVIC EA 3808, Poitiers (86)
10 2007 – 09 2008	Externe en pharmacie, services de cardiologie, EFS, pharmacie de l'hôpital psychiatrique et laboratoire d'hématologie, CHU de Poitiers, Vienne (86)
06 2009 – 10 2009	Employée en officine, remplacement du pharmacien assistant puis du pharmacien titulaire. Pharmacie Dolbeau, Montbron, Charente (16)
11 2009 – 10 2010	Interne en pharmacie, service d'Endocrinologie et Centre de Recherche Clinique, CHU Amiens, Somme (80)
11 2010 – 10 2013	Interne en pharmacie, spécialité IPR, JPARC, INSERM U837 Equipe 1 Alzheimer et Tauopathies, Nord (59)
Depuis 11 2011	Doctorante, JPARC, INSERM UMRS1172 (ex U837) Equipe 1 Alzheimer et Tauopathies, Nord (59)

Publications

- ∂ Alves-Pires C (2011) Syndrome d'Apnées du Sommeil et Démences: quels modèles expérimentaux? Mémoire M2R. Master Biologie-Santé. Univ. Lille.
- ∂ Brouillette J, Caillierez R, Zommer N, Alves-Pires C, Benilova I, Blum D, De Strooper B, Buée L. (2012) Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight Amyloid- β 1-42 oligomers are revealed In Vivo by using a novel animal model. *J Neurosci* 32, 7852-7861.
- ∂ Alves-Pires C, Buée L, Monaca C. (2013) Impact d'un stress hypoxique répété sur la mémoire: évaluation dans un modèle murin. *Médecine du Sommeil* 10, 3-5.
- ∂ Marciniak E, Faivre E, Dutar P, Alves-Pires C, Demeyer D, Caillierez R, Laloux C, Buée L, Blum D, and Humez S (2015) The Chemokine MIP-1 α /CCL3 impairs mouse hippocampal synaptic transmission, plasticity and memory. *Sci Rep*, in press

Communications affichées

- ∂ Alves-Pires C, Deguil J, Caillierez R, Bordet R, Monaca C, Buée L. Role of hypoxia in memory : deleterious or protective ? 4th PhD Student Day, Lille (April 17th, 2012).
- ∂ Alves-Pires C, Deguil J, Caillierez R, Bordet R, Monaca C, Buée L. Hypoxie et mémoire : effets délétères ou protecteurs? 11^{ème} Réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer, Toulouse (23 Mai 2012).
- ∂ Alves-Pires C, Zommer N, Arnaud C, Bordet R, Pépin JL, Monaca Charley C, Buée L. Hypoxic stress, memory and Tau pathology : *in vivo* studies. Journée André Verbert, Lille (18 Septembre 2013).

Communications orales

- ∂ Alves-Pires C, Deguil J, Caillierez R, Zommer N, Bordet R, Buée L, Monaca C. Impact d'un stress hypoxique sur la mémoire : évaluation dans un modèle murin. Le Congrès du Sommeil, Bordeaux (23 Novembre 2012).
- ∂ Alves-Pires C, Zommer N, Caillierez R, Arnaud C, Pépin JL, Monaca Charley C, Buée L. Stress hypoxique intermittent, atteinte mnésique et protéine Tau : évaluations *in vivo*. Le Congrès du Sommeil, Marseille (21 Novembre 2013).

V. Manuscrit publié dans la revue Médecine du sommeil (2013)
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1769449312002427>

VI. Manuscrit de la communication en cours de soumission dans European Respiratory Journal

Title

Cognitive decline, Alzheimer's disease and sleep apnea syndrome: a role for Tau protein?

Claire ALVES PIRES ¹, Christelle CHARLEY MONACA ², Nadège ZOMMER ¹, Dominique DEMEYER ¹, Raphaëlle CAILLIEREZ ¹, Claire ARNAUD ³, David BLUM ¹, Régis BORDET ², Jean-Louis PEPIN ³, Luc BUEE ¹.

1: Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, UMR-S 1172, Alzheimer & Tauopathies, F-59000 Lille, France

2: Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, UMR-S 1171, Troubles cognitifs dégénératifs et vasculaires, F-59000 Lille, France

3: Univ. Grenoble Alpes, Inserm, UMR-S 1042, Hypoxie : Physiopathologie cardiovasculaire et respiratoire (HP2), F-38042 Grenoble, France

Manuscript (1200 words maximum, 1 figure, 15 references, no supplementary data)

Sleep apnoea syndrome (SAS) is a common sleep-breathing disorder (SBD) leading to intermittent hypoxia, blood hypoxemia, hypercapnia and sleep fragmentation. SAS causes cognitive impairments due to sleep fragmentation and hypoxemia [1].

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive cognitive decline associated with two cerebral lesions: senile plaques (amyloid pathology) [2], and neurofibrillary tangles (NFTs), made of intraneuronal aggregates of hyper-phosphorylated Tau proteins (Tau pathology) [3]. Converging evidence associates SAS to AD. Higher prevalence of SAS has been found in AD patients [4] which would accelerate the cognitive decline [5]. In accordance, treatment of SAS with continuous positive airway pressure has been associated with a significantly slower cognitive decline in AD patients [6]. These observations raised the possibility that SBD would impact lesions underlying AD. So far, several studies support that hypoxia potentiate amyloid pathology [7]. While Tau pathology is central in the development of cognitive decline in AD, the impact of hypoxia towards Tau pathology remains ill-defined. To address this question, we have applied intermittent hypoxia (IH) [8] to THY-Tau22 mice, a model progressively developing cognitive impairments and hippocampal AD-like Tau pathology [9], and evaluated pathophysiological consequences.

Materials and methods

Mice

We performed our experiments on heterozygous 8 months old THY-Tau22 mice distributed as: THY-Tau22 mice exposed to Room Air (RA) [THY-Tau22-RA, n=9]; and THY-Tau22 mice exposed to IH [THY-Tau22-IH, n=11]. At this age, the transgenic mice exhibit a Tau pathology associated with cognitive impairment[10]. For the need of the behavioral test, we added a group of WT mice exposed to RA [WT-RA, n=11].

All experiments were performed in compliance with, and following the approval of the local Animal Ethical Committee, standards for the care and use of laboratory animals and with French and European Community rules (Approval CEEA 342012).

Intermittent hypoxia protocol

We used a previously described protocol of IH[8]: fraction inspired of oxygen (FiO₂): 5% to 21%, 60 seconds/cycle, 8 hours/day (6:00 am to 2:00 pm), during 15 days. Control animals were housed in the same conditions and exposed to an intermittent flow of RA.

Object recognition test

The cognitive status has been evaluated by the object recognition test, 14 days after the beginning of the experiment. Animals were tested between 3:00 pm and 6:00 pm. After two days of habituation, mice were familiarized with two identical objects (training phase). After 15 minutes of latency, one familiar object (FO) was presented again, associated with a novel object (NO) (test phase). The percentage of time spent to explore each object was analyzed with the EthoVision® XT8 software (Noldus, The Netherlands).

Sacrifice

All the mice were sacrificed during the last intermittent hypoxia period, without anaesthesia (anaesthesia-induced hypothermia is able to promote Tau phosphorylation[11]), brains were removed, blood was collected, centrifuged (4000 rpm, 4°C, 10 minutes), then plasma was immediately stored at -20°C.

The cortex and hippocampus were dissected out on ice and immediately stored at -80°C for further analyses.

Immunoassays

The quantities of plasmatic human Tau protein (hTau) were determined by using the Innostest® hTau Ag (Fujirebio®) according to the manufacturer's instructions.

Biochemical analysis

Proteomics including the Insoluble/Soluble preparation was performed as previously described[10] with slight modifications. Briefly, brain homogenates in Tris buffer with 0.23% Triton X100 (Sigma, USA) were ultracentrifuged (100,000g, 1 hour, 4°C). The remaining pellet was resuspended in Sarkosyl 1% (Sigma, USA) and ultracentrifugated (100,000g, 1h, 4°C). Finally, the final pellet containing the insoluble Tau proteins was resuspended in Laemmli sample buffer. For immunoblotting, both soluble (pool of the 2 supernatants) and insoluble fractions have been analysed. Results were normalized to β-actin.

Statistical analysis

Results were expressed as means ± SEM, and analyzed with the software Prism® (GraphPad Software Inc., USA), using Mann & Whitney test. A p < 0.05 has been considered as significant.

Results

Effect of Intermittent Hypoxia on memory.

Regarding the number of contacts between the nose of the animals and the objects during the training phase, the three groups explore similarly the two identical objects (A). WT-RA mice were able to discriminate the NO ($p < 0.05$) (B). As expected at this age, THY-Tau22-RA mice exhibited major memory impairment since they were not able to discriminate the novel object. The memory performances of THY-Tau22 IH were similar to WT-RA animals.

Effect of Intermittent Hypoxia on Tau pathology.

We investigated whether memory improvement seen in THY-Tau IH mice were related to any changes on Tau protein. At peripheral level, we could observe significant reduce levels of the total human Tau protein in the plasma of THY-Tau22-IH mice, as assessed by ELISA (C). Using SDS-PAGE, we found a significant reduction of Tau phosphorylation at several Tau phospho-epitopes: AT8, pS396, 12E8; and a slight reduction of AT100 ($p = 0.0556$) (D, I). This reduction seems to be related, at least in part, to the slight reduction of total Tau protein: Tau-Cter ($p = 0.0556$) (E, J). This occurred while IH did not influence neither mRNA expression of murine nor human Tau in THY-Tau22 IH animals (data not shown). To study the impact of IH upon Tau aggregation, biochemical fractionation was performed and sarkosyl-soluble/insoluble fractions analyzed (F, G, H). The amount of sarkosyl-insoluble Tau was significantly decreased in the hippocampus of THY-Tau22 IH animals (K). Reduced Tau was not due to increase neuronal death as NeuN immunostaining did not reveal major hippocampal alteration in IH Tau mice (data not shown).

Discussion

Whereas the consequences of IH on amyloid pathology are more and more studied, little is known about their consequences on Tau pathology. A previous study [12] was interested in the combined effects of ischemia and acute hypoxia in a model of tauopathies, the P301L mice. However, there was, to our knowledge, no study of the consequences of an intermittent hypoxic stress *in vivo* in such model of tauopathies.

In the THY-Tau22 mice exposed to IH, we have observed unexpected results. Indeed, whereas the transgenic animals of the control group (THY-Tau22-RA) had memory impairments, as attempted according to the development of the Tau pathology at this age in the model [10], the mice submitted to IH have shown a memory recovery, with cognitive results similar to those of the WT-RA. These results were associated with a significant decrease of total and phosphorylated Tau proteins at a central and a peripheral level and a significant decrease of the hippocampal aggregated Tau proteins. A decrease of aggregated Tau proteins levels had already been associated with a memory recovery in previous experiments [10, 13]. This supplementary correlation between the brain load of aggregated Tau and cognitive functions is puzzling. Sleep apnea may be deleterious in elderly patients when the Tau pathology is not well established. In the present experimental, Tau pathology is already detrimental with consequences on cognitive functions. One can imagine that the IH stress has activated an ATP-independent proteolysis system, which was able to degrade the intraneuronal aggregates of Tau protein in our mice.

In conclusion, Tau proteins and the memory abilities in the THY-Tau22 mouse model confirms the interest of our model to evaluate the effect of different parameters such hypoxia on the Tau pathology.

Acknowledgements

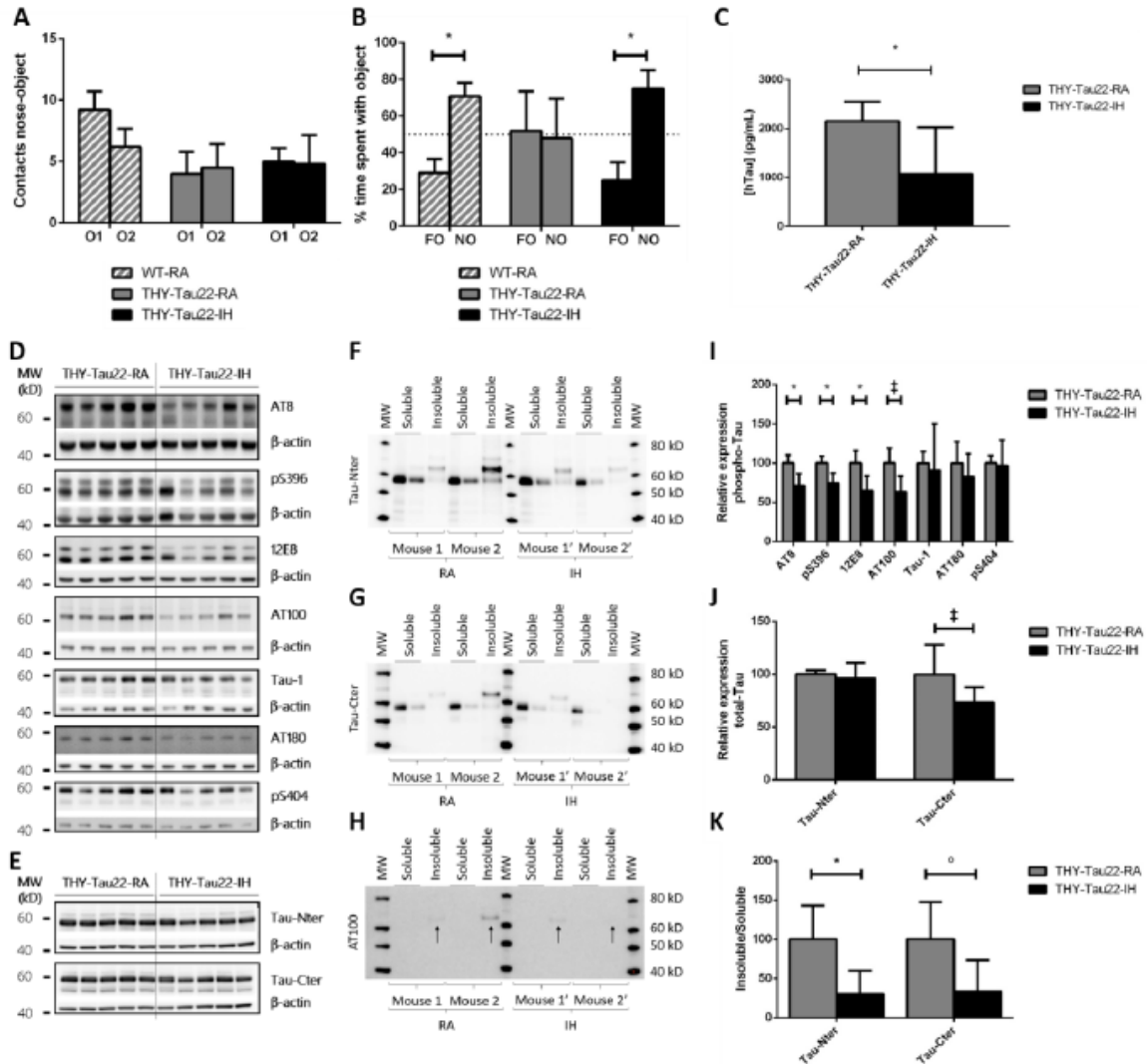
The authors thank the animal facilities of the Universities of Lille 2 and Grenoble and their staff for animal care. This work is supported by the CNRS, LabEx DISTALZ, CPER DN2M (HypoxAlz), FEDER, Conseil regional Nord/Pas-de-Calais, and SFRMS.

References

1. Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent Hypoxemia and OSA: Implications for Comorbidities. *CHEST J.* 2015; 147: 266.
2. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* 2011; 4: 3.
3. Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000; 33: 95–130.
4. Ancoli-Israel S, Klauber MR, Butters N, Parker L, Kripke DF. Dementia in institutionalized elderly: relation to sleep apnea. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1991; 39: 258–263.
5. Ancoli-Israel S, Palmer BW, Cooke JR, Corey-Bloom J, Fiorentino L, Natarajan L, Liu L, Ayalon L, He F, Loredó JS. Cognitive effects of treating obstructive sleep apnea in Alzheimer's disease: a randomized controlled study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2008; 56: 2076–2081.
6. Troussiere A-C, Charley CM, Salleron J, Richard F, Delbeuck X, Derambure P, Pasquier F, Bombois S. Treatment of sleep apnoea syndrome decreases cognitive decline in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2014; 85: 1405–1408.
7. Wang Z, Yang D, Zhang X, Li T, Li J, Tang Y, Le W. Hypoxia-induced down-regulation of neprilysin by histone modification in mouse primary cortical and hippocampal neurons. *PloS One* 2011; 6: e19229.
8. Arnaud C, Poulain L, Lévy P, Dematteis M. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 2011; 219: 425–431.
9. Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion J-P, Hamdane M, Buée 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. *Am. J. Pathol.* 2006; 169: 599–616.
10. Troquier L, Caillierez R, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Grosjean M-E, Zommer N, Sergeant N, Schraen-Maschke S, Blum D, Buee L. Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr. Alzheimer Res.* 2012; 9: 397–405.
11. Planel E, Richter KEG, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, Krishnamurthy P, Herman M, Wang L, Schachter JB, Nelson RB, Lau L-F, Duff KE. Anesthesia Leads to Tau Hyperphosphorylation through Inhibition of Phosphatase Activity by Hypothermia. *J. Neurosci.* 2007; 27: 3090–3097.

12. Liao G, Zhou M, Cheung S, Galeano J, Nguyen N, Baudry M, Bi X. Reduced early hypoxic/ischemic brain damage is associated with increased GLT-1 levels in mice expressing mutant (P301L) human tau. *Brain Res.* 2009; 1247: 159–170.

13. Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005; 309: 476–481.



A: Histograms representing the number of contacts between the nose of the mice and each object during the training phase for WT-RA (n=5), THY-Tau22-RA (n=4) and THY-Tau22-IH (n=5) groups. O1: Object 1. O2: Object 2. The two objects were strictly identical.

B: Histograms representing the percentage time spent with each object (familiar object versus novel object) for WT-RA (n=5), THY-Tau22-RA (n=4) and THY-Tau22-IH (n=5) groups. The dotted line denotes 50% (chance) preference. FO: Familiar Object. NO: Novel Object. * p < 0.05 (Mann & Whitney test)

C: Quantity of hTau protein in the plasma of THY-Tau22 mice exposed to RA (n = 8) or IH (n = 10). * p < 0.05 (Mann & Whitney test).

D, E: Representative western blots of hippocampal phospho-Tau (D) and total-Tau (E) proteins in THY-Tau22 mice exposed to RA (left) or IH (right) (n = 5 per group). MW: Molecular Weight.

F, G, H: Representative western blots of the soluble and insoluble Tau proteins in the hippocampi of THY-Tau22 mice exposed to RA or IH. Three epitopes were tested: Tau-Nter (F), Tau-Cter (G) and AT100 (H), which recognize the aggregated Tau protein and is only found in the insoluble fraction (black arrows). A total of 6 mice per group were evaluated: mice 1 to 6 for the RA group, and mice 1' to 6' for the IH group. Only two mice per group are represented in this figure. MW: Molecular Weight.

I, J: Quantification of Tau protein phosphorylation on AT8, pS396, 12E8, AT100, Tau-1, AT180 and pS404 epitopes (I) and total Tau protein (J) in the hippocampi of THY-Tau22 mice exposed to RA (n=5) or IH (n=5). * $p < 0.05$, ‡ $p = 0.0556$ (Mann & Whitney test).

K: Quantification of the Insoluble/Soluble ratio for the two total Tau epitopes (Tau-Nter and Tau-Cter) in the hippocampi of THY-Tau22 mice exposed to RA (n=6) or IH (n=6). * $p < 0.05$, ° $p = 0.0667$ (Mann & Whitney test).

All the values are expressed as mean \pm SEM. RA: Room Air. IH: Intermittent Hypoxia.

VII. Poster présenté lors de la 4^{ème} journée des doctorants, Lille, 2012

Role of hypoxia in memory: deleterious or protective? 

Claire ALVES PIRES^{1, 2, 3}, Julie DEGUIL^{2, 3, 4}, Raphaëlle CAILLIEREZ^{1, 2, 3}, Régis BORDET^{2, 3, 4},
Christelle MONACA^{2, 3, 4, 5} & Luc BUEE^{1, 2, 3}

¹INSERM U837, Equipe Alzheimer et Tauopathies, ²Université Lille Nord de France, ³DN2M, CHRU Lille, ⁴EA1046, IMPRT, ⁵Neurophysiologie clinique, Hôpital Roger Salengro, LILLE, France.

JPArC Team 1

Introduction

These last years, different clinical and experimental observations have suggested the existence of a link between hypoxia and cognitive impairment. In fact, some cognitive deficits have been described on patients and on rodents submitted to chronic or intermittent hypoxia. Paradoxically, hypoxic preconditioning is known to improve spatial learning.

In this context, our aim is to understand how hypoxia may modulate memory processes.

Methods

We performed our experiments on C57Bl6/J mice. Mice were submitted to a protocol of repeated hypoxias, with a fraction of inspired oxygen (FiO₂) of 8%; 1 hour twice a week. This protocol was stopped and reapplied 3 times until now, and will be done once more. We evaluated learning functions by Y maze (Fig. 1) and Object Recognition (Fig. 2) tasks, 3 and 14 days after the last hypoxia. Plasma samples were also collected at these times.

Experiment kinetic:

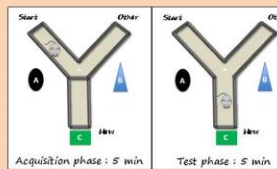
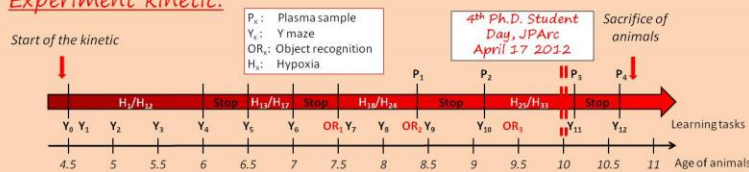


Fig. 1: Y maze.
Mice are allowed to explore 2 arms (Start and Other) of the maze for 5 minutes (Acquisition phase), then removed for 2 minutes. After retention time, mice are allowed to explore the 3 arms (including New) of the maze for 5 minutes (Test phase).
A, B, C: Visual cues.

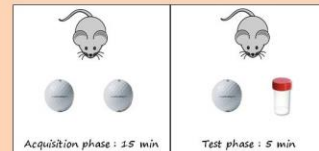


Fig. 2: Object Recognition task.
Mice are allowed to explore 2 identical objects for 15 minutes (Acquisition phase), then removed for 1 hour. After retention time, mice are allowed to explore the familiar object and the new object for 5 minutes (Test phase).

Preliminary results

During the six first weeks, no difference was observed between hypoxia and control group. When tasks were performed 3 days post hypoxia, we didn't observe cognitive impairment, as in control group (Fig. 3a, 3b & 4a, 4b).

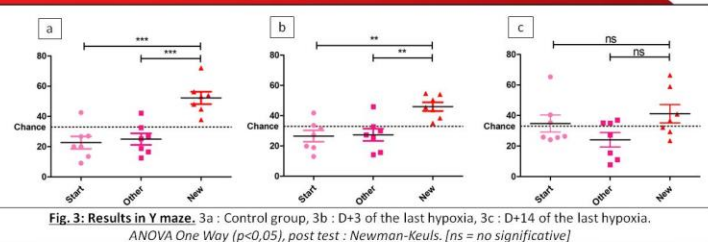


Fig. 3: Results in Y maze. 3a : Control group, 3b : D+3 of the last hypoxia, 3c : D+14 of the last hypoxia. ANOVA One Way ($p < 0,05$), post test : Newman-Keuls. (ns = no significative)

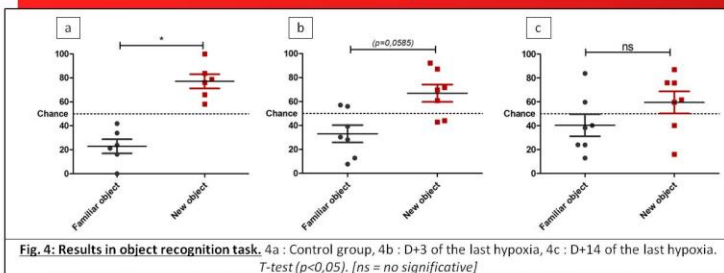
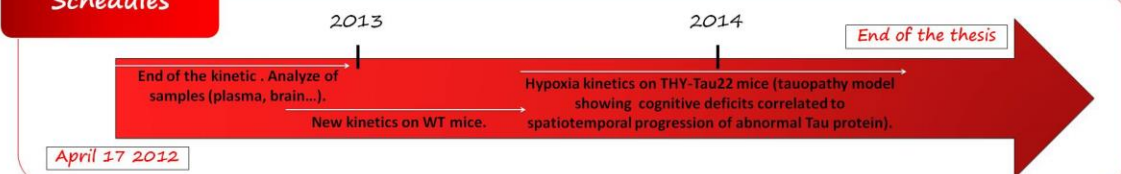


Fig. 4: Results in object recognition task. 4a : Control group, 4b : D+3 of the last hypoxia, 4c : D+14 of the last hypoxia. T-test ($p < 0,05$). [ns = no significative]

Interestingly, when tasks were done 14 days post hypoxia, mice showed some cognitive deficits, in Y maze (Fig. 3c) and in object recognition test (Fig. 4c).

The sequences of memory loss/recovery were until now observed 3 times on the same animals from age to 4.5 to 9 months.

Schedules



VIII. Poster présenté lors de la 11^{ème} réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer, Toulouse, 2012



Hypoxie et mémoire : effets délétères ou protecteurs?

Claire ALVES PIRES^{1, 2, 3}, Julie DEGUIL^{2, 3, 4}, Raphaëlle CAILLIEREZ^{1, 2, 3}, Régis BORDET^{2, 3, 4},
Christelle MONACA^{2, 3, 4, 5} & Luc BUEE^{1, 2, 3}

¹INSERM U837, Equipe Alzheimer et Tauopathies, ²Université Lille Nord de France, ³DN2M, CHRU Lille, ⁴EA1046, IMPRT, ⁵Neurophysiologie clinique, Hôpital Roger Salengro, LILLE, France.

Introduction

Ces dernières années, différentes observations cliniques et expérimentales suggèrent l'existence d'un lien entre hypoxie et troubles cognitifs. Ainsi, des troubles cognitifs ont été décrits chez des patients et sur des rongeurs soumis à un stress hypoxique chronique ou intermittent. Paradoxalement, des études portant sur le pré-conditionnement hypoxique ont montré que celui-ci pouvait améliorer les capacités cognitives des animaux.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est d'évaluer les effets d'une hypoxie répétée *in vivo*.

Matériel et Méthodes

Nous avons soumis des souris WT (C57Bl/6J) femelles âgées de 4,5 mois à un protocole d'hypoxies répétées (FiO₂ = 8%, 1 h, 2 fois par semaine).

Ce protocole a été interrompu puis repris 4 fois, et les capacités cognitives des animaux ont été évaluées à différents moments de la cinétique par les tests de Y maze (Y, Fig. 1) et de reconnaissance d'objets (RO, Fig. 2), à 3 jours et à 14 jours de la dernière hypoxie.

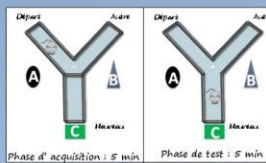


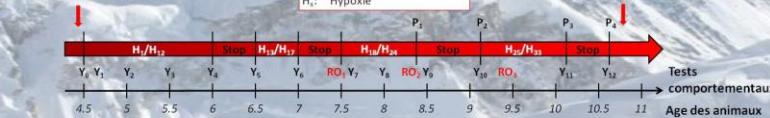
Fig. 1: Y maze.
Dans un premier temps, les souris peuvent explorer 2 bras (Départ et Autre) du labyrinthe pendant 5 minutes (Phase d'acquisition), puis sont placées en rétention pendant 2 minutes à l'issue desquelles elles peuvent explorer les 3 bras (dont le Nouveau) du labyrinthe pendant 5 minutes (Phase de test).
A, B, C: repères visuels



Fig. 2: Reconnaissance d'objets.
Dans un premier temps, les souris peuvent explorer 2 objets identiques pendant 15 minutes (Phase d'acquisition), puis sont placées en rétention pendant 1 heure. Les souris peuvent ensuite explorer l'objet familier et le nouvel objet pendant 5 minutes (Phase de test).

Cinétique d'expérimentation :

Début de la cinétique



Résultats

Au cours des 6 premières semaines, nous n'avons observé aucun déficit mnésique chez les animaux hypoxiés. Il en était de même lorsque les tests comportementaux étaient réalisés 3 jours après la dernière hypoxie (Fig. 3a, 3b & 4a, 4b).

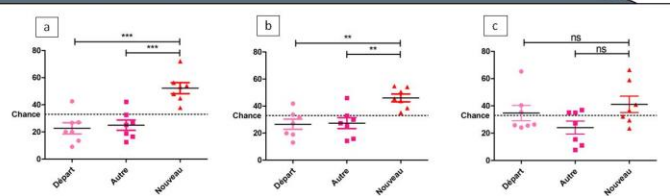


Fig. 3: Résultats en Y maze. 3a : Groupe contrôle, 3b : J+3 de la dernière hypoxie, 3c : J+14 de la dernière hypoxie. ANOVA One Way ($p < 0,05$), post test : Newman-Keuls. [ns = non significatif, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$]

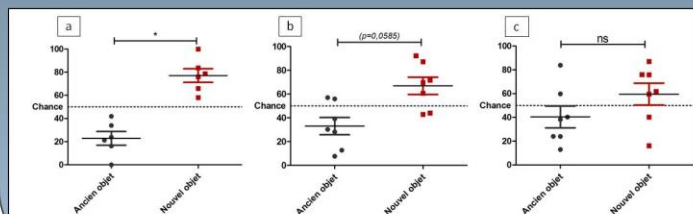


Fig. 4: Résultats en reconnaissance d'objets. 4a : Groupe contrôle, 4b : J+3 de la dernière hypoxie, 4c : J+14 de la dernière hypoxie. T-test ($p < 0,05$). [ns = non significatif]

En revanche, lorsque ceux-ci étaient réalisés 14 jours après la dernière hypoxie, nous observons un défaut d'apprentissage, à la fois en Y maze (Fig. 3c) et en reconnaissance d'objets (Fig. 4c). Ces séquences de déficit mnésique/apprentissage normal ont été observées 3 fois sur les mêmes animaux, entre 4.5 et 9 mois.

Conclusion :

➢ Notre protocole d'hypoxies répétées (FiO₂ : 8%, 1 heure deux fois par semaine) affecte les tests cognitifs effectués sur les animaux lorsque ceux-ci sont réalisés à distance (14 jours) de la dernière hypoxie.

➢ L'atteinte mnésique observée à J+14 disparaît à la reprise des hypoxies.

➢ Ces observations, confirmées par deux tests comportementaux différents, ont été reproduites 3 fois sur les mêmes animaux.

IX. Poster présenté lors de la Journée André Verbert, Lille, 2013

Hypoxic stress, memory and Tau pathology: *in vivo* studies.

ALVES PIRES Claire¹, ZOMMER Nadège¹, ARNAUD Claire¹, BORDET Régis¹, PEPIN Jean-Louis², MONACA CHARLEY Christelle¹, BUEE Luc¹.

¹INSERM U837, Lille; ²INSERM U1043, Grenoble; ³CA1046, Lille; ⁴Hôpital Roger Salengro, CHRU de Lille

Introduction

These last years, different clinical and experimental observations have suggested a link between hypoxia and cognitive impairment. Some cognitive deficits have been described on patients submitted to a chronic hypoxia (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) or an intermittent hypoxia (Sleep Apnea Syndrom, SAS). At the Regional University Hospital of Lille, a study of Mild Cognitive Impairment patients has suggested a relation between SAS and Alzheimer's Disease (AD). AD is characterized by two kinds of lesions: the amyloid pathology (extracellular deposits of Abeta peptides) and the Tau pathology (intraneuronal aggregation of hyperphosphorylated and abnormally phosphorylated Tau protein). Several studies have already shown a link between an hypoxic stress and the amyloid pathology development. However, to our knowledge, there is no study of the Tau pathology development in hypoxic conditions.

Objectives

We aim to evaluate how a repeated hypoxic stress may modulate the memory and the development of the Tau pathology *in vivo*. We used two different protocols of hypoxia on Wild Type (WT) mice.

Methods

All experiments were performed on WT mice, aged 4.5 months.

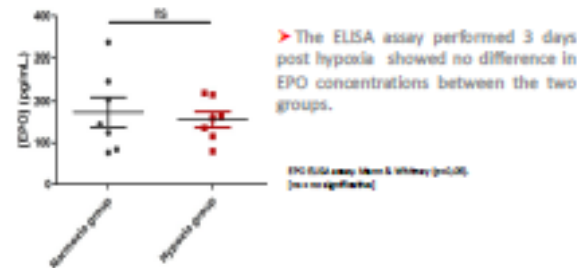
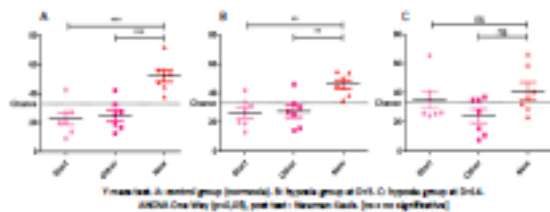
The first protocol is a protocol of repeated hypoxias: one hour, twice a week, for 6 months, with an inspired fraction of oxygen (FIO₂) of 8%. We performed cognitive tests (Y maze), erythropoietin (EPO) ELISA assay and biochemical analysis of the Tau protein.

The second protocol is a protocol of intermittent hypoxias (IH) with continuous cycles of FIO₂ comprised between 5% and 21%, each one lasting 60 seconds, 8 hours per day, for 15 days.

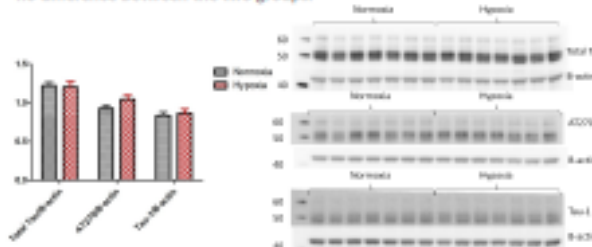
We performed measurements of oxygen saturation and weight, erythropoietin (EPO) ELISA assay and biochemical analysis of Tau protein.

Results

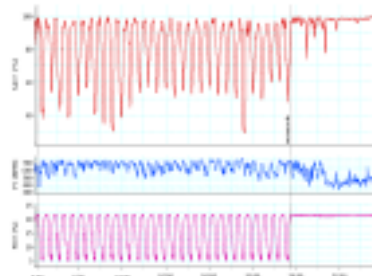
> The mice showed reversible cognitive deficits. The cognitive impairment observed when the memory tests were performed 14 days post hypoxia disappeared when the tests were performed only 3 days post hypoxia. These sequences of memory loss and memory recovery have been observed 3 times during the 6 months of the protocol.



> The Western Blot analysis performed on brain (cortex) tissues showed no difference between the two groups.

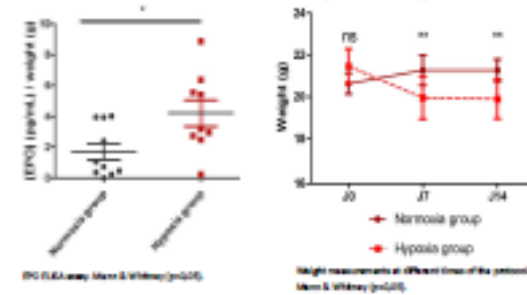


> We observed a correlation between the SaO₂, the Heart Rate and the FIO₂ in animals submitted to IH.

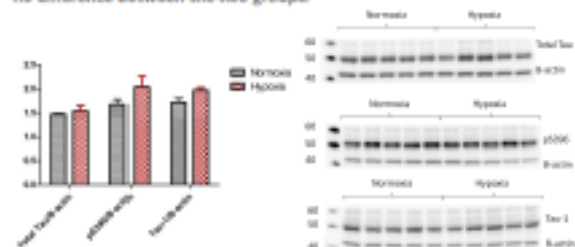


> The EPO ELISA assay performed at the end of the procedure showed a significant increase in EPO concentrations in the IH group.

> The mice submitted to IH showed a significant weight loss.



> The Western Blot analysis performed on brain (cortex) tissues showed no difference between the two groups.



Conclusion

Our first protocol, of repeated hypoxias on long term (6 months), has showed some curious sequences of memory loss and memory recovery in mice submitted to the hypoxias. There was no modification in the plasmatic EPO concentration at 3 days post hypoxia, suggesting a rapid regulation of the EPO pathway. Our second protocol, of intermittent hypoxias for 15 days, is well described in the literature as a validated model of SAS. As described, animals submitted to IH have showed a significant weight loss, and we also measured a significant increase in plasmatic EPO concentrations. Moreover, our two protocols didn't have showed any difference in total Tau protein quantity, neither in their phosphorylation status.

In the future, we want to perform cognitive tests on animals submitted to IH, in order to compare them with those of mice submitted to our repeated hypoxia protocol.



X. Poster présenté lors du congrès DN2M, Lille, 2015

Intermittent hypoxia induces a cognitive impairment and affects the Tau protein phosphorylation status in mice.

ALVES PIRES Claire¹, CHARLEY MONACA Christelle², ZOMMER Nadège¹, DEMEYER Dominique¹, CAILLIEREZ Raphaëlle¹, ARNAUD Claire¹, BORDET Régis¹, PEPIN Jean-Louis³, BUEE Luc¹.

¹INSERM UMR-51172, Lille; ²INSERM UMR-1171, Lille; ³INSERM U1042, Grenoble

Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is a common sleep and breathing disorder resulting from an upper airway obstruction and leading to intermittent hypoxia and numerous comorbidities including a cognitive impairment [1]. The animal models used to better understand the pathophysiology of the sleep apnea syndrome have allowed to elucidate some mechanisms such as an increase of oxidative stress [Lavoie, 2015] and a cerebral inflammation [Li & al., 2003]. Interestingly, these two mechanisms are common to the Alzheimer's disease [AD] [Wang & al., 2014; Holmes, 2013]. Moreover, several studies have showed a higher prevalence of OSA in AD patients [Ancofi-Israel & al., 1991], and it would be responsible of an aggravation of the cognitive decline in these AD patients [Ancofi-Israel & al., 2008]. Alzheimer's disease [AD] is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive cognitive decline, associated with two cerebral lesions: the senile plaques (amyloid pathology) and the neurofibrillary tangles (Tau pathology). The Tau pathology consists in intraneuronal aggregates of hyperphosphorylated Tau proteins [Jucker & al., 2000] and her progressive spatiotemporal development is correlated with the cognitive decline observed in AD patients [Brack & al., 1991]. We hypothesized that intermittent hypoxia may act on the Tau protein phosphorylation, and that this could explain at least in part the cognitive impairment observed in OSA.

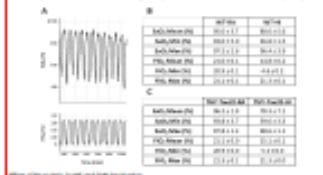
Methods

In the present study, we have used two murine lines: the heterozygous THY-Tau22 mouse [a transgenic mouse model of Tau pathology expressing a mutated human Tau protein and showing a progressive cognitive decline] and their control littermate (WT). We performed our experiments on forty one female mice distributed in four groups: WT mice exposed to room Air [RA] [WT-RA, n=11]; WT mice exposed to intermittent hypoxia [IH] [WT-IH, n=10]; THY-Tau22 mice exposed to RA [THY-Tau22-RA, n=10]; and THY-Tau22 mice exposed to IH [THY-Tau22-IH, n=11]. All the mice were 8 months old at the beginning of the RA and IH. We chose this age because we needed animals with a moderate Tau pathology to evaluate the effect of intermittent hypoxia, despite the cognitive impairment of the animals at this age. Animals exposed to the IH were submitted to an intermittent hypoxia stimulus: fraction inspired of oxygen (FIO₂) comprised between 5% and 21%, 60 seconds per cycle, during 8 hours per day (6:00 am to 2:00 pm). Animals of the control group were housed in the same conditions and exposed to an intermittent flow of room air [RA]. IH or RA exposure lasted for 15 days.

Results

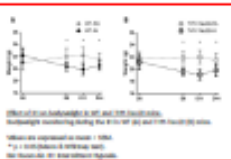
The fraction of inspired oxygen (FIO₂) correlates with the saturation in oxygen (SaO₂) in mice

Qualitatively, we observed a close correlation between the FIO₂ measured in the cage and the SaO₂ recorded in the animals [A]. Based on our recordings, it seems that there were no difference regarding the SaO₂ response to the applied FIO₂ between the two animal models [WT and THY-Tau22], neither in the RA group, and neither in the IH [B,C].



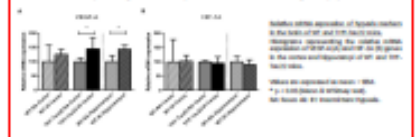
Intermittent Hypoxia induce weight loss in WT and THY-Tau22 mice

The two groups of animals submitted to the IH protocol have showed a significant weight loss at D8, D11 and D14 [A]. WT-IH: -1.8 ± 0.5g; THY-Tau22-IH: -1.4 ± 0.7g. As compared with those of control group [RA] [A]: WT-RA: +0.5 ± 0.6g; THY-Tau22-RA: +0.2 ± 0.5g.



Intermittent Hypoxia induce a significant increase in cortical and hippocampal expression of VEGF-A but not HIF-1A in the WT and THY-Tau22 mice

At the end of the experiment, we have observed an increase of expression of the VEGF-A gene in the cortex of the THY-Tau22 and the hippocampus of the WT mice submitted to the IH, as compared with the RA groups [A]. However, we did observed any change in the expression of the HIF-1A gene [B].



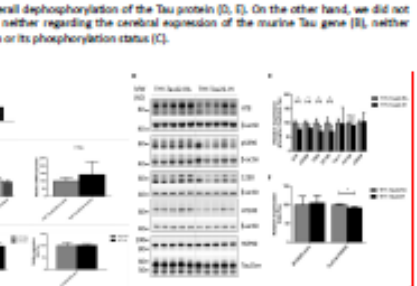
Intermittent Hypoxia induces no change in plasma concentrations of erythropoietin (EPO) or plasminogen activator growth factor (VEGF) in WT and THY-Tau22 mice

After 14 days of IH, we did not observed any difference between the RA- and the IH-groups regarding the plasma concentrations of EPO and VEGF, neither for the WT, nor for the THY-Tau22 mice.

Gene/protein	WT-RA	WT-IH	THY-Tau22-RA	THY-Tau22-IH
Erythropoietin (EPO)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1

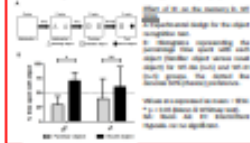
Intermittent Hypoxia induce a decrease of human Tau protein (hTau) associated with a significant dephosphorylation of the Tau protein in the brain of the THY-Tau22 mice

The THY-Tau22 mice submitted to the IH protocol have showed a significant decrease of total Tau protein, both in the plasma [A] and in the hippocampus [B]. Interestingly, this decrease seems to be associated with a slight increase of the murine- and human-Tau genes expression in the cortex of these mice [C].



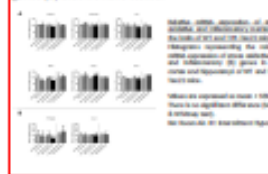
Intermittent Hypoxia impairs memory in the WT-IH mice

After 14 days of IH, the mice submitted to intermittent hypoxia [WT-IH] were not able to discriminate a novel object from a familiar object [% time spent with novel object: 60.38 ± 34.86; familiar object: 39.62 ± 34.86 (n.s)], whereas the control mice [WT-RA] were [% time spent with novel object: 70.79 ± 14.85; familiar object: 29.21 ± 14.85 (<0.05) [B].



Intermittent Hypoxia induce no change in cortical and hippocampal expression of inflammatory or stress oxidative markers genes in the WT and THY-Tau22 mice

The WT and THY-Tau22 mice submitted to the IH protocol did show any difference regarding the stress oxidative markers genes [A] neither the inflammatory genes [B] that we have tested.



In the same time, we have observed an overall dephosphorylation of the Tau protein (S, T, Y).

On the other hand, we did not observed similar findings in the WT mice, neither regarding the cerebral expression of the murine Tau gene [B], neither regarding the total hippocampal Tau protein or its phosphorylation status [C].



Discussion

Our study is, to our knowledge, the first which has evaluated the consequences of an intermittent hypoxic stress in vivo in a murine model of tauopathy. We have observed a cognitive impairment in WT mice exposed to IH, and a significant dephosphorylation of the Tau protein on several epitopes. We have also tested a lot of hypoxia markers, both at a peripheral level and a cerebral level, by numerous complementary experimental approaches. As it was already reported in the literature, the mice submitted to IH have shown a tightly correlation between the FIO₂ and the SaO₂, and a significant bodyweight loss. Other studies have shown a cognitive impairment in WT mice with a similar intermittent hypoxia protocol. At a biological level, we have observed an effect of IH on the brain of our mice by increasing the cerebral expression of VEGF-A gene. We have also evaluated the expression of genes encoding for stress oxidative or inflammatory markers, as we knew that most of them were overexpressed under intermittent hypoxia and in the brain of AD patients. Nonetheless, we did not observed any variation of expression for the genes we have tested. Finally, in the THY-Tau22 mice exposed to the IH protocol, we have observed a decrease of the total Tau protein amounts associated with a dephosphorylation on several epitopes (AT8, pS396, 12S8, AT100). However, we found no variation on Tau protein in the WT mice. We hypothesize that the dephosphorylation of Tau protein may be a minor phenomenon that could exist also in WT mice, even if we can not see it, due to low amounts of Tau proteins in these mice, as compared with the THY-Tau22 mice [overexpressing the human Tau protein]. The major limit of our study is the absence of the cognitive evaluation in the THY-Tau22 mice. We think that it will be very interesting in the future to assess the cognitive status in such mice earlier in the spatiotemporal development of the Tau pathology, when the mice are still able to learn, in order to evaluate if the IH could accelerate the cognitive impairment.

This research was funded by a grant from the IFRM and by the grant « Hypoxia » (Région Nord Pas de Calais)



XI. Collaborations ayant donné lieu à des publications au cours de cette thèse

L'expertise acquise au cours de cette thèse dans le domaine des tests comportementaux chez les souris a donné lieu à plusieurs collaborations.

Parmi celles-ci, deux d'entre elles ont fait l'objet d'une publication.

A) Marciniak E, Faivre E, Dutar P, Alves Pires C, Demeyer D, Caillierez R, Laloux C, Buée L, Blum D, Humez S. The Chemokine MIP-1 α /CCL3 impairs mouse hippocampal synaptic transmission, plasticity and memory.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/26511387>

B) *Brouillette J, Caillierez R, Zommer N, Alves Pires C, Benilova I, Blum D, De Strooper B, Buée L. Neurotoxicity and Memory Deficits Induced by Soluble Low-Molecular-Weight Amyloid-β1-42 Oligomers Are Revealed In Vivo by Using a Novel Animal Model*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/22674261>