Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année 2013 **Thèse n°**

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement
le 4 octobre 2013 à POITIERS par
Mademoiselle Vérité Julie née le 9 Septembre 1987

Rôle des cellules immunitaires dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer : impact du chimiotactisme au niveau de la barrière hémato-encéphalique

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur Bernard Fauconneau, Toxicologie

Membres : Madame le Docteur Catherine Dejean-Remblier, Pharmacologie

Monsieur le Docteur Lydwin Hounkanlin, Pharmacien

Madame le Docteur Perrine Piquemal, Pharmacien

Directeur de Thèse : Madame le Professeur Guylène Page, Biologie Cellulaire

UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année universitaire 2012-2013

PHARMACIE

Professeurs

- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- JOUANNETAUD Marie-Paule, Chimie Thérapeutique
- LEVESQUE Joël, Pharmacognosie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DE SCHEEMAEKER Henri, Botanique, Biologie végétale, Mycologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie
- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

PAST - Maître de Conférences Associé

- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue

- LILWALL Amy

ATER

- GIRARDOT Marion

Moniteurs

- FRANCOIS Arnaud

Remerciements

Tout d'abord, un grand merci à Mme Guylène Page, pour croire en moi et m'avoir suivie pendant une bonne partie de mon cursus en Pharmacie. D'abord le stage de M1, puis en M2R, et enfin la thèse de Pharmacie. Merci pour votre présence, votre rigueur, et votre passion communicative pour la recherche. J'espère que çà ne s'arrêtera pas là. Enfin, merci d'avoir accepté de juger mon travail et de m'avoir aidée à le réaliser, ce fut un véritable honneur pour moi et j'espère ne pas avoir déçu vos attentes.

A mesdames et messieurs les membres du jury, merci d'avoir accepté d'honorer mon travail par votre présence.

Merci à toute l'équipe du CiMoTheMA sans qui une partie de cette thèse n'aurait pas eu lieu. Merci à Thierry pour son encadrement, et merci à Arnaud, Agnès, Damien et Elodie pour votre bonne humeur. Ces 6 mois sont un très bon souvenir en votre compagnie (je garde malheureusement quelques séquelles musicales depuis, mais au moins je ne vous oublie pas, un dernier mot pour la fin : oui).

Je remercie ma famille, Laurie, Stéphanie je ne vous dirais jamais assez combien je vous aime (je préfère vous battre à un certain jeu...).

Merci à toi Papa, pour ta présence rassurante de tous les jours, ton soutien, merci à toi d'être là pour nous tous, çà compte beaucoup. Enfin Maman je ne t'oublie pas, je pense à toi. Et une petite pensée pour Maria aussi, j'espère vous rendre tous fiers.

Merci à ma bande de joyeux lurons sans qui la vie serait bien fade, je cite dans le désordre Marion, Perrine, Louise, Mathieu, Virginie, Angie, et Delphine, merci pour nos fous rires, nos craquages en b.u. pour certain(e)s (le fameux peigne Marion...), nos soirées zombies (Virginie!) et j'en passe, à bientôt pour de nouvelles aventures !

Pour finir, (on garde toujours le meilleur pour la fin parait-il) un grand merci à Marion, pour ton soutien dans les moments difficiles (et les bons!), merci de croire en moi. (Bon maintenant passons aux choses sérieuses : quelle destination pour les prochaines vacances !?)

SOMMAIRE

GENERALITES

I. La maladie d'Alzheimer

I-1 Découverte et épidémiologie..... p1

I-2 Facteurs de risque et Hérédité..... p2

I-2.1 Facteurs de risque..... p2

I-2.2 Hérédité et génétique de la maladie d'Alzheimer..... p4

I-3 Signes cliniques..... p6

I-4 Lésions histopathologiques..... p7

I-4.1 Les plaques séniles..... p7

I-4.2 Les dégénérescences neurofibrillaires.(DNFs)..... p10

I-4.3 La perte neuronale, atrophie cérébrale..... p12

I-4.4 La réaction inflammatoire..... p14

I-5 Diagnostic..... p16

I-5.1Tests neuropsychologiques..... p16

I-5.2 Imagerie..... p19

I-6 Les traitements..... p23

I-6.1 Inhibiteurs de l'acétylcholine-estérase..... p24

I-6.2 Antagoniste des récepteurs NMDA : Mémantine..... p25

I-6.3 Autres traitements en cours d'essais cliniques……..... p26

I-6.3.1 Inhibiteurs des γ-sécrétases..... p26

I-6.3.2 Vaccination..... p27

II. L'inflammation..... p28

II-1 Généralités sur la réponse inflammatoire..... p28

II-1-1. Initiation du processus inflammatoire..... p29

II-1-2. Maintien et amplification de la réaction inflammatoire..... p34

II-1-3. Résolution de l'inflammation..... p35

II-1-4. La voie NF-κB, principale voie de signalisation intracellulaire dans l'inflammation..... p37
II-2 La réponse inflammatoire dans la MA..... p40
II-2.1 Acteurs cellulaires et moléculaires au niveau central..... p40
II-2.1.1 La microglie..... p40
II-2.1.2 Les astrocytes..... p43
II-2.1.3 Les neurones..... p45
II-2.1.4 Les cytokines et chimiokines..... p45
II-2.1.5 Les cyclooxygénases..... p52
II-2.1.6 Les radicaux libres..... p53
II-2.2 Les acteurs périphériques de l'inflammation..... p53
II-3 Traitements à visée anti-inflammatoire testés dans la MA
II-3.1 Les AINS..... p54
II-3.2 Les glucocorticoïdes..... p56
II-3.3 Les anti-TNFα..... p56
II-3.4 Les anti-NF-κB..... p57
II-3.5 Les anti-PPARs..... p58
III. La barrière hématoencéphalique (BHE)..... p59
III-1 Structure et fonctions de la BHE..... p59
III-2 Les différents modèles de BHE..... p60
III-3 La BHE et la maladie d'Alzheimer..... p61
ETUDE EXPERIMENTALE..... p64
I- Objectifs..... p64
II- Matériels et méthodes..... p64
III- Résultats..... p73
IV- Discussion..... p81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... p85

Abréviations

Ac : Anticorps

Aβ42 : Peptide β-amyloïde 42

α-SMA : alpha-smooth muscle actin

bFGF : β-human Basic Fibroblast Growth Factor

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BSA : Bovin serum albumine

CMRR : Centre Mémoire de Ressources et de Recherche

COX : Cyclo-oxygénase

DMSO : Diméthylsulfoxide HybriMax

DNFs : Dégénérescences neurofibrillaires

DSM : Diagnostic and Statistical Manual

FD4 : dextran-Fluorescein-isothiocyanate

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

IBA1 : Ionized calcium-binding protein Adapter molecule 1

LCR : Liquide céphalo-rachidien

MA : Maladie d'Alzheimer

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1

MIP-1β : Macrophage inflammatory protein-1β

MFI : Median fluorescence intensity

MMSE : Mini Mental State Examination

MO : Moelle osseuse

NaF : Fluorure de sodium

NINCDS-ADRDA : National Institute of Neurological and Communicative Disorders and stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association.

NSE : Neuron Specific Enolase

PBMCs : Peripheral blood mononuclear cells

PHA : phytohaemagglutine

PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique

PBS : Phosphate Buffer Saline

PSEN : Préséniline

PMSF : Fluorure de phénylméthyl sulfonyl

PFA : ParaFormAldéhyde

QC : Quality Control

RANTES : Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted

RI : Réponse inflammatoire

SI : Système immunitaire

SNC : Système Nerveux Central

TEER : TransEndothelial Electrical resistance

vWF : Von Willebrand factor

GENERALITES

I. La maladie d'Alzheimer

I-1 Découverte et épidémiologie

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui fut décrite pour la première fois en 1907 par le docteur et physicien allemand Aloïs Alzheimer.

Elle fut découverte suite à ses observations cliniques concernant une de ses patientes âgée alors de 51 ans; Auguste D. qui présentait des troubles cognitifs qui ne correspondaient à aucune maladie mentale jusqu'alors décrite, à savoir des dysfonctionnements cognitifs progressifs, des symptômes neurologiques focaux, des hallucinations, des idées délirantes et des troubles psychosociaux. Ces troubles étaient corrélés avec la découverte en *post-mortem* chez cette patiente de plaques séniles, d'enchevêtrements neurofibrillaires, de pertes neuronales ainsi que d'artériosclérose (Lage, 2006).

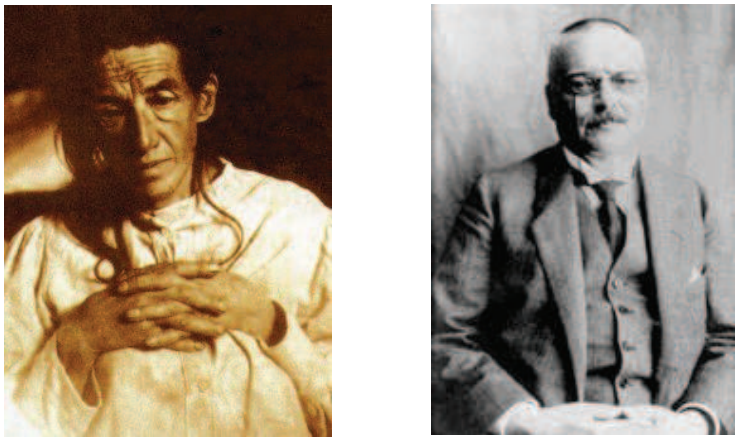

Figure 1 : ***Auguste D. (1850-1906)*** *à gauche, et* ***Aloïs Alzheimer (1864-1915)*** *à droite.*

A l'heure actuelle, la MA représente la première cause de démence chez l'Homme à travers le monde. En France, environ 860 000 personnes souffrent de la MA ou de maladies apparentées (chiffres de 2007) et 225 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année, occupant ainsi la 4ème place, en terme de mortalité.

La MA est principalement une maladie du sujet âgé et touche environ 5% de la population âgée de plus de 65 ans, et jusqu'à 15% des personnes de plus de 85 ans. Avec l'espérance de vie qui augmente, l'INSEE estime qu'un français sur quatre de plus de 65 ans pourrait être touché en 2020 si aucun traitement curatif n'est trouvé d'ici là.

Nous sommes donc au carrefour d'un problème à la fois médical, scientifique, social et économique majeur, et ce d'autant plus dans tous les pays développés où l'espérance de vie augmente constamment depuis un siècle.

I-2 Facteurs de risque et Hérédité

I-2.1 Facteurs de risque

Il est important pour un pharmacien en tant qu'acteur de santé publique de connaitre ces facteurs de risque, dans le but de pouvoir prévenir et/ou accompagner l'apparition, voir la progression d'une MA chez sa patientèle âgée.

Plusieurs facteurs de risques sont connus à l'heure actuelle concernant le développement de la MA, tels que des facteurs sociodémographiques, des facteurs liés au mode de vie, des facteurs liés à la nutrition, des facteurs médicaux, ou encore d'autres facteurs qui ne rentrent pas dans ces catégories comme des facteurs environnementaux (expositions professionnelles aux métaux).

Concernant les facteurs de risque sociodémographiques, l'âge reste le principal facteur de risque de la maladie d'Alzheimer, mais d'autres facteurs semblent impliqués, tels que le sexe, le niveau d'éducation, l'exercice physique, ainsi que la consommation d'alcool et de tabac.

En effet, certains auteurs ont pu mettre en évidence une prévalence plus élevée de patients atteints de la MA chez les femmes par rapport aux hommes. Bien qu'à l'heure actuelle, on ne sait toujours pas s'il existe un risque relatif au sexe féminin concernant cette pathologie, ou si cette augmentation de prévalence est due à un nombre plus élevé de femmes par rapport aux hommes à un âge avancé (Hebert et al., 2001).

Pour le niveau d'éducation, il apparait maintenant clairement qu'un faible niveau d'éducation dans les premières années de la vie, c'est à dire avant 25 ans est un facteur de risque de la MA. En effet un niveau d'études élevé chez un individu est souvent corrélé avec un gain de poids au niveau cérébral, mais fait aussi apparaitre l'hypothèse d'une réserve cognitive qui serait plus efficace chez ces individus pour compenser (au moins d'un point de vue clinique) les effets délétères d'une maladie neurodégénérative. Il faut quand même rester

prudent, un haut niveau d'études n'entraine pas un risque moins élevé de développer une MA, mais elle retarde et diminue l'expression clinique de la démence chez ces individus, en comparaison à des personnes de bas niveau d'éducation (Brayne et al., 2010).

Bien que cet effet est remarqué de manière plus significative d'un point de vue statistique durant les premières années de vie de la personne, il ne faut pas oublier de rappeler au patient que même à un âge avancé, varier les activités intellectuelles stimulantes sont un réel plus pour lutter contre la progression de la MA, et qu'il n'est jamais trop tard pour commencer à se stimuler intellectuellement.

La sédentarité (c'est-à-dire l'inactivité physique) est considérée à l'heure actuelle comme un facteur de risque de la MA. En effet plusieurs études suggèrent à l'inverse un rôle bénéfique de l'exercice physique dans la prévention des troubles cognitifs.

Le mécanisme sous-jacent n'est pas complètement élucidé et semble multifactoriel. Les mécanismes les plus souvent évoqués sont l'amélioration de la perfusion cérébrale, l'augmentation de production de facteurs neurotrophiques, ainsi que la diminution de l'inflammation et du stress oxydatif (Barnes and Yaffe, 2011, Samaras, 2012).

On a d'abord cru dans un premier temps, à un rôle protecteur du tabac vis à vis du déclin cognitif, mais ce résultat n'a jamais été confirmé par la suite. Au contraire, l'analyse de données longitudinales de nombreuses études ont montré un risque accru chez les fumeurs de développer une démence ou une MA. Autre point intéressant, une seule étude de grande envergure ayant suivi 9 209 sujets pendant une moyenne de 2,3 ans rapporte que l'exposition tabagique cumulée, mesurée par le nombre de paquets-années, accélère le déclin cognitif chez les non déments avec une relation dose-effet (Ott et al., 2004), (extrait du dossier scientifique INSERM de 2007).

L'étude de l'association positive entre consommation de vin modérée et son impact sur la survenue d'une MA a trouvé son point de départ avec l'étude PAQUID (Lemeshow et al., 1998). A partir de là; d'autres travaux se sont développés, et ont pu montrer un effet plutôt protecteur d'une consommation modérée d'alcool, et pas uniquement de vin, dans le risque de maladie d'Alzheimer (Letenneur et al., 2004).

Afin d'expliquer cette relation positive, il a été avancé comme hypothèses que cette consommation modérée serait associée à un mode de vie protecteur des consommateurs modérés, à une diminution du risque cardiovasculaire, à une action directe de l'alcool sur le

métabolisme de l'acétylcholine ou, plus spécifiquement pour le vin, à un rôle protecteur des composés flavonoïdes (Savaskan et al., 2003), (extrait du dossier scientifique INSERM de 2007).

D'autres facteurs comme les facteurs de risque vasculaire, tels que le diabète, l'hypertension artérielle, les pathologies cardiaques (comme la fibrillation auriculaire ou l'insuffisance cardiaque), un indice de masse corporelle (IMC) élevé (l'obésité), les dyslipidémies (le risque étant le plus fort avec un niveau de cholestérol élevé durant le milieu de la vie), sont tous des facteurs de risque de survenue d'une maladie d'Alzheimer.

Il est essentiel pour le pharmacien d'insister sur les bonnes règles d'hygiéno-diététiques dans le but de prévenir la survenue potentielle d'un déclin cognitif, avec l'utilisation préférentielle d'un régime alimentaire de type méditerranéen (régime riche en fruits, légumes et céréales, en graisses insaturées comme l'huile d'olive, modérément élevé en poisson, moyen en produits laitiers, faible en viandes et volailles, et pour finir une consommation modérée en vin). Ce régime alimentaire a pu montrer lorsqu'il est suivi par les patients, une diminution de la survenue de pathologies cardiovasculaires et de la mortalité, ainsi qu'une diminution du risque de déclin cognitif (extrait du dossier scientifique INSERM de 2007).

La dépression est aussi connue pour être un facteur de risque de survenue de la MA, et ce d'autant plus lorsque celle-ci apparait tôt dans la vie du patient. Concernant la dépression déclarée tardivement dans la vie de l'individu, elle serait plus un syndrome prodromal d'une MA (Barnes, 2012).

I-2.2 Hérédité et génétique de la maladie d'Alzheimer

A côté des formes dites sporadiques de la MA, qui représentent la forme majoritaire d'expression de cette maladie, il existe des formes de MA héréditaires. L'hérédité de la MA est complexe, et multigénique. On peut observer des formes de transmission autosomique dominante qui représentent près de 20% des formes à début précoce (avant l'âge de 60 ans), mais cela représente moins de 3% du nombre total de malades. Il s'agit alors de formes familiales ou FAD (Familial Alzheimer's Disease).

Ces formes sont dues à des mutations, en particulier des duplications sur les gènes de la préséniline 1 (PSEN1) (pour 45%), du précurseur du peptide amyloïde (APP, Amyloid precursor protein) (pour 7,9%) et plus rarement de la préséniline 2 (PSEN2) (3,5%) (Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database).

Concernant le gène de l'APP situé sur le chromosome 21, 32 mutations ont été mises en évidence, parmi lesquelles nous pouvons citer par exemple la mutation Swedish (K670D/M671L) (Mullan et al., 1992) (Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database), mutation qui est souvent utilisée dans certains modèles transgéniques de souris alzheimer.

Les présénilines PSEN1 et PSEN2 sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires par l'intermédiaire de leur association au complexe protéolytique de la γ-sécrétase qui clive de nombreux substrats y compris l'APP, et participant avec la β-sécrétase à la production du peptide β amyloïde (Aβ).

A ce jour, 161 mutations différentes ont été décrites pour le gène PSEN1, représentant 80% des formes de FAD. Ces formes ont en général une expression très précoce et agressive, avec des patients qui déclarent la maladie entre 16 et 65 ans (Sherrington et al., 1995, Cruts and Van Broeckhoven, 1998).

Concernant les autres formes dites sporadiques, plusieurs gènes de susceptibilité ont été identifiés dont celui de l'ApoE, gène qui code pour l'apolipoprotéine E aidant au transport du cholestérol et d'autres acides gras du sang vers les cellules.

Des trois variantes du gène ApoE (ApoEε2, ApoEε3 et ApoEε4), c'est l'isoforme ApoEε4 qui est associée à un risque accru de MA. En effet, normalement présente à hauteur de 16% dans la population générale (Cedazo-Minguez, 2007), la proportion de l'allèle ε4 peut atteindre jusqu'à 40% dans une population de patients atteints de MA tardive (Strittmatter et al., 1993).

Le risque de développer la MA est plus élevé entre 60 et 80 ans, et cela augmente d'autant plus avec le nombre d'allèles présents : de trois à cinq fois pour les porteurs hétérozygotes de l'allèle ε4 de l'ApoE, et de dix à douze fois pour les porteurs homozygotes.

De plus, une étude européenne a récemment permis d'identifier deux nouveaux gènes de prédisposition de la MA : le gène de la clusterine (CLU), connue aussi sous le nom d'apolipoprotéine J, et le gène du récepteur 1 du composant 3b/4b du complément (CR1).

Le rôle de ces deux nouveaux gènes dans l'apparition de la MA n'est pas encore connu, mais des études antérieures suggèrent qu'ils pourraient intervenir dans l'élimination du constituant majeur des plaques amyloïdes, le peptide Aβ (Lambert et al., 2009).

I-3 Signes cliniques

La MA est classiquement décrite comme une pathologie dont la progression comprend deux phases, à savoir une phase pré-symptomatique, et une phase symptomatique. Sachant que cette dernière peut être divisée entre une phase qu'on qualifie de « légère » car sans retentissement sur la vie quotidienne (le patient arrive encore à compenser les effets délétères de la MA) et une phase démentielle (avec des symptômes cliniques visibles).

La phase asymptomatique peut durer plus de 20 ans. Ensuite, apparaissent des lésions dans le lobe temporal et plus précisément au niveau de l'hippocampe qui est la principale région cérébrale impliquée dans l'encodage des processus mnésiques. Ces lésions se répandent ensuite vers les lobes frontaux, temporaux, pariétaux et occipitaux. Ces aires cérébrales sont dédiés aux fonctions dites "supérieures" : telles que le raisonnement, le langage, le contrôle moteur, et l'identification visuelle.

Le début de la maladie est généralement insidieux, avec progressivement une aggravation, marquée en premier lieu par la perte de la mémoire à court terme (amnésie). Elle se manifeste initialement par des oublis mineures (qui peuvent passer pour de la distraction) qui s'accentuent progressivement avec la progression de la maladie, tandis que les souvenirs plus anciens sont dans un premier temps relativement préservés. Ce déclin cognitif léger ou MCI « Mild Cognitive Impairment » est considéré comme étant une phase symptomatique prédémentielle pouvant évoluer vers une MA (Sarazin and Dubois, 2002, Jicha et al., 2006). Le malade perd alors le sens de l'initiative, de l'attention et présente des troubles du langage. De ce fait, les symptômes en début de MA peuvent parfois être confondus avec un syndrome dépressif. Comme on l'a vu précédemment, une dépression peut d'ailleurs être un syndrome prodromal d'une MA (Barnes, 2012). Ce stade dure de 2 à 4 ans.

Après quelques années, les symptômes s'aggravent avec l'apparition des troubles cognitifs plus sévères, troubles qui ont non seulement un retentissement sur les activités de la vie quotidienne, mais qui entrainent aussi des troubles psychologiques et comportementaux. En effet, une atteinte de la mémoire à long terme, perte de l'orientation spatiotemporelle, c'est à dire que le patient mélange souvenirs, époques et sa vie actuelle. Le patient présente aussi des troubles du comportement, de l'agitation, le sens du rythme circadien, des troubles psychiques (délires, hallucinations, dépression, troubles de l'humeur avec de l'agressivité). Cette phase peut évoluer sur 2 à 6 ans.

A des phases plus tardives, les patients présentent des altérations sévères du langage (=aphasie), des troubles du geste (=apraxie), un profond déficit de la capacité de reconnaissance aussi bien des personnes de leur entourage, que des objets de la vie quotidienne (=agnosie), et des difficultés à effectuer des tâches plus au moins complexes (utiliser les appareils électroménagers, téléphoner). Le phénomène de mémorisation est totalement altéré, on sait que la phase d'encodage dans le processus de la mémorisation est celle qui est la plus touchée. Mais en plus des souvenirs récents, le patient oublie également les évènements survenus tout au long de sa vie. Le patient a beaucoup de difficultés à se déplacer et tombe fréquemment (atteinte du cervelet et du cortex préfrontal). A ce stade, le maintien à domicile devient très compliqué pour l'entourage. Le placement en institution médicalisée devient vraiment nécessaire. Cette phase sévère évolue sur 2 à 4 ans.

La phase terminale dure en moyenne deux années. Le patient perd alors toute autonomie. Il ne peut plus communiquer ni se déplacer. L'évolution conduit irrémédiablement le malade vers un état grabataire. Grande fatigue, perte de poids et infections bronchiques entraînent le décès du patient huit à douze ans après le diagnostic de la maladie [pour revue, (Soto et al., 2007)].

I-4 Lésions histopathologiques

I-4.1 Les plaques séniles

Les plaques séniles sont formées par des dépôts extracellulaires d'un peptide agrégé, le peptide Aβ (Figure 2). Il s'agit d'un polypeptide de 39 à 43 aminoacides et dont la conformation en feuillets beta lui confère son caractère insoluble et probablement, sa toxicité.

Ce peptide provient d'un clivage anormal d'une grosse glycoprotéine membranaire appelée APP (Shoji et al., 1992). Autour des dépôts amyloïdes, on retrouve des prolongements neuritiques dystrophiques, et des cellules gliales réactives avec de nombreux autophagolysosomes (Fiala, 2007).

Ces lésions sont localisées principalement dans les régions limbiques du cerveau tels que l'hippocampe (au niveau de la région CA1) et le complexe amygdalien, ainsi que dans des régions corticales et subcorticales, avant de se répandre dans le cortex des patients affectés.

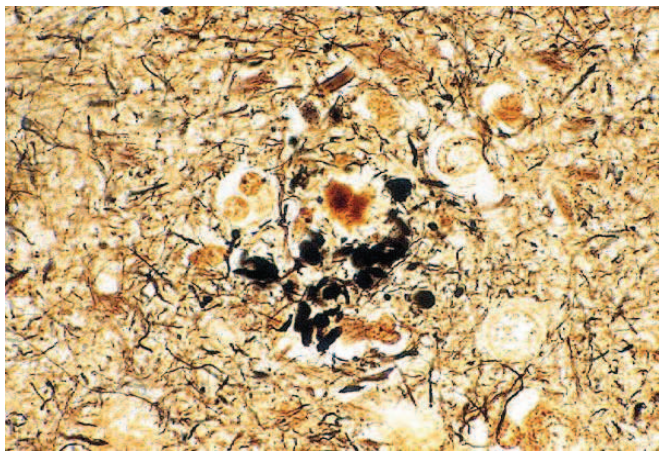

Figure 2 : *Marquage de plaques amyloïdes (en marron) sur une coupe de cortex d'un patient atteint de MA, par coloration de type Bielschowsky. (http://www.pathology.vcu.edu)*

L'APP est une protéine transmembranaire composée de 695 à 770 acides aminés codée par un seul gène (Checler, 1995). Cette protéine APP semble avoir un rôle dans la croissance neuronale, la survie et la réparation après une blessure (Lee et al., 2010b).

Il existe deux voies de dégradation de l'APP (Figure 3) : dans la première voie dite amyloïdogénique, le précurseur APP est d'abord clivé du côté N-terminal extracellulaire par la β-sécrétase ou BACE1, ce qui produit un fragment soluble sAPPβ et un fragment C-terminal de 99 résidus (C99) contenant la totalité du peptide Aβ. Dans la seconde voie non-amyloïdogénique, le clivage de l'APP par l'α-sécrétase a lieu au sein même du peptide Aβ pour générer un large domaine soluble (sAPPα) aux propriétés neurotrophiques et laisser un fragment de 83 acides aminés (C83). Ce clivage au milieu de l'Aβ empêche la formation du peptide insoluble et toxique.

C83 et C99 sont tous les deux des substrats d'une troisième protéase, la γ-sécrétase. Cette enzyme est constituée d'un complexe multiprotéique, comprenant la préséniline, la nicastrine, Aph-1 (Anterior Pharynx defective-1) et Pen-2 (Presenilin enhancer-2) (De Strooper, 2003).

La protéolyse de C99 par la γ-sécrétase produit le peptide Aβ, alors que C83 est clivée pour donner p3, une forme d'Aβ tronquée au niveau de la partie N-terminale (Aβ17−40/42). Dans les deux cas, le fragment AICD (domaine intracellulaire de l'APP) est libéré, jouant un rôle de signalisation, probablement pour activer, directement ou indirectement une régulation de gènes de survie neuronale dont la néprilysine (Pardossi-Piquard et al., 2005).

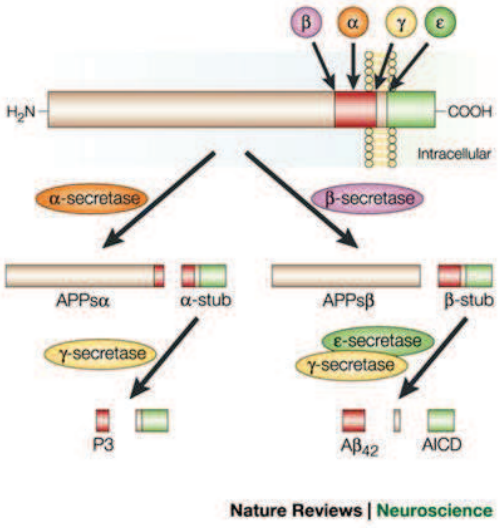

Figure 3 : *Les deux voies de maturation de l'APP (LaFerla, 2002)*

Les formes les plus abondantes d'Aβ sont celles avec 40 et 42 acides aminés (Aβ40 et Aβ42). Ces deux formes ont un rôle prépondérant dans la MA, mais l'Aβ42 est à l'heure actuelle considéré comme le plus neurotoxique de par sa propriété hautement insoluble et sa capacité à s'agréger en feuillets β (Jarrett et al., 1993). Il s'agit donc du constituant principal des plaques séniles.

L'accumulation du peptide Aβ est due à la fois à sa production, ainsi qu'à sa dégradation altérée. En effet, en plus de sa surproduction lors de la MA, il semblerait que sa dégradation soit aussi perturbée par des peptidases « spécifiques », (Selkoe, 2001, Iwata et al., 2002).

La formation des plaques séniles est progressive et s'effectue selon un processus bien déterminé. Les peptides amyloïdes monomériques vont d'abord s'assembler en oligomères,

puis ceux-ci vont s'associer en protofibrilles, qui devenues fibrilles formeront les plaques amyloïdes (Dobson, 2003).

En plus de leur influence directe, les agrégats d'Aβ peuvent activer la microglie, et induire la production de médiateurs inflammatoires comme celle d'oxyde nitrique (NO), d'espèces oxygénées réactives (ROS), du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), d'interleukines (IL-1, IL-6, IL-18) et de prostaglandines (PG-E2) qui participent à la mort neuronale. En d'autres termes, l'accumulation d'Aβ contribue directement de par sa présence à la survenue de dommages neuronaux, mais il intervient aussi indirectement en activant une neuroinflammation qui participe à la progression de la MA (Lee et al., 2010b).

Il est important de noter que des agrégats de type amyloïde impliquant d'autres protéines comme les prions se retrouvent également dans des maladies aussi différentes que le diabète de type 2, la maladie de Huntington ou les maladies liées aux prions (Bartolini and Andrisano, 2010), ce qui explique pourquoi des théories furent avancées comme quoi la MA serait un diabète de type III, ou encore que la MA serait une maladie à prions.

I-4.2 Les dégénérescences neurofibrillaires (DNFs)

En plus des dépôts extracellulaires d'Aβ (plaques séniles), certaines populations neuronales touchées par la MA présentent des enchevêtrements intracellulaires de neurofibrilles occupant la quasi-totalité du cytoplasme périnucléaire et qui affectent leur cytosquelette.

Ces fibrilles sont appelées paires de filaments appariés en hélice (PHFs = paired helical filaments) et correspondent aux dégénérescences neurofibrillaires (Figure 4).

Ce type de lésions impliquant la protéine tau n'est pas spécifique à la MA. En effet, c'est également retrouvé dans d'autres maladies neurodégénératives regroupées sous le terme de "tauopathies", incluant par exemple le syndrome de Down, la démence fronto-temporale parkinsonienne et la dégénérescence corticobasale (Spillantini and Goedert, 1998).

Ces enchevêtrements de neurofibrilles sont constitués d'agrégats de protéines tau sous forme anormale, c'est-à-dire sous forme hyperphosphorylée (Grundke-Iqbal et al., 1986). La régulation de l'état de phosphorylation de la protéine tau résulte des activités conjointes de protéines kinases et de protéines phosphatases (Billingsley and Kincaid, 1997, Martin et al., 2013a, Martin et al., 2013b).

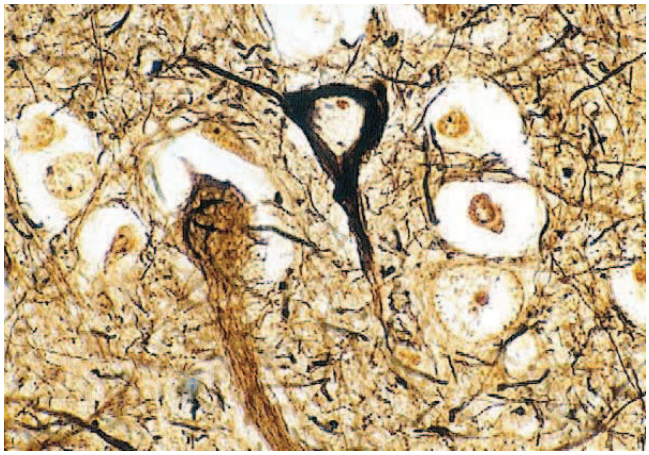

Figure 4 : *dégénérescences neurofibrillaires mises en évidence par imprégnation argentique de Bielschowsky (marquage noir intracytoplasmique). (http://www.pathology.vcu.edu)*

La protéine tau à l'état normal est une protéine abondante, qui est responsable de l'assemblage et de la stabilisation des microtubules, composants essentiels du cytosquelette des neurones. Cependant, suite à cette hyperphosphorylation, tau se dissocie des microtubules (Bramblett et al., 1993), perturbant ainsi leur stabilisation et leur fonctionnement. Cela conduit à une altération des transports axonaux et dendritiques ainsi qu'à une dégénérescence des neurones.

De plus, la protéine tau sous sa forme hyperphosphorylée devient insoluble, elle perd son affinité pour les microtubules et s'assemble à elle-même (Lee et al., 2010b).

Elle est aussi plus sensible aux modifications chimiques induites par le stress oxydant et subit des changements de conformation suite à ces oxydations. Elle s'agrège alors, selon un processus de polymérisation avec une étape de nucléation (Barghorn and Mandelkow, 2002) sous forme de PHFs. Ces derniers s'associent ensuite en structures plus grandes : les neurofibrilles. Cette agrégation de tau pourrait être favorisée par leur ubiquitinylation et glycation.

D'autres co-facteurs pourraient être impliqués tels que l'ApoE, les glycosaminoglycanes et autres polyanions (Buee et al., 2000).

Les lésions de type DNFs sont assez bien systématisées et leur topographie est corrélée à la nature des signes cliniques.

La propagation des DNFs est classée en 10 stades, et va concerner successivement les 10 régions cérébrales suivantes (Figure 5) (Delacourte et al., 2002) :

- début d'une DNF dans la région transentorhinale,
- stade 2 : DNF dans le cortex entorhinal,
- stade 3 : DNF dans l'hippocampe,
- stade 4 : DNF dans le cortex temporal antérieur,
- stade 5 : DNF dans le cortex temporal inférieur,
- stade 6 : DNF dans le cortex temporal moyen,
- stade 7 : DNF dans les régions corticales polymodales,
- stade 8 : DNF dans les régions uni modales,
- stade 9 : DNF dans les régions corticales primaires, visuelles et/ou motrices,
- stade 10 : DNF présente de manière diffuse, y compris dans les noyaux gris centraux.

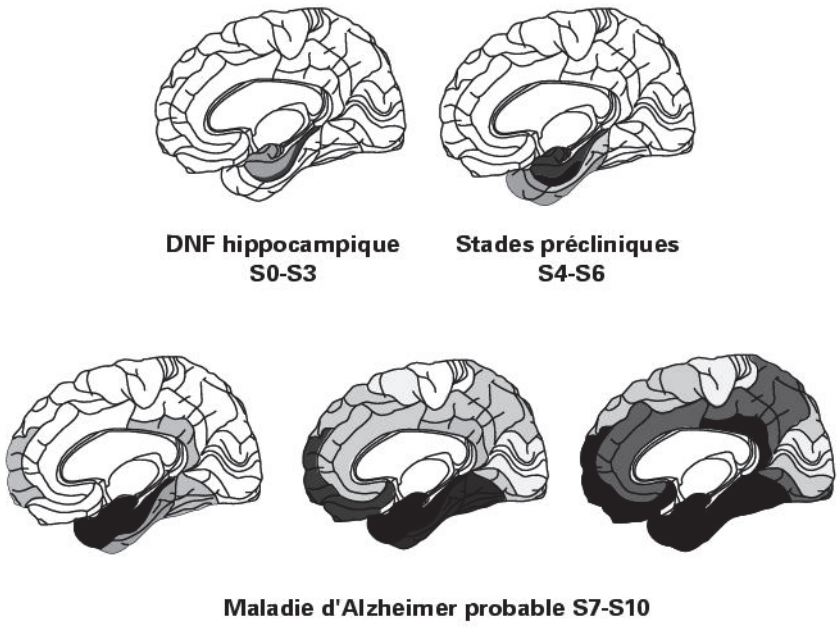

Figure 5 : *Schéma de la progression de la lésion histopathologique en 10 stades (dans 10 régions cérébrales différentes) proposé par Delacourte (Buee and Delacourte, 2006).*

I-4.3 La perte neuronale, atrophie cérébrale

Il est normal avec l'avancement de l'âge d'observer une perte de poids cérébral, cela devient sensible à partir de l'âge de 45 ans, et ce même chez une personne dite saine. Le cerveau des personnes âgées peut présenter une atrophie cérébrale (qui va toucher surtout des

zones telles que les zones médianes et inférieures des lobes temporaux, ou encore le néocortex pariétal), atrophie cérébrale qui peut se caractériser par une perte de 7 à 8% du poids du cerveau en fin de vie, par rapport au poids du cerveau du jeune adulte. Il ne faut pas oublier de rappeler que nous vieillissons tous au niveau de notre cerveau dès l'âge de 20 ans. Mais il faut distinguer un vieillissement normal, d'un vieillissement pathologique accéléré.

En effet, chez le patient atteint d'une MA, une atrophie beaucoup plus prononcée va toucher les zones d'association frontale et temporale, ainsi que le lobe pariétal du cortex. La perte de la masse cérébrale est aussi détectée dans la partie ventrale du lobe temporal, notamment au niveau du gyrus parahippocampique alors que les gyrus paracentraux semblent moins touchés tout comme les zones occipitales du cortex.

En parallèle, d'autres changements ultra structuraux ont été mis en évidence comme un élargissement ventriculaire (Figure 6), une atrophie des noyaux amygdaliens et des bulbes olfactifs, ainsi qu'une altération de la substance noire et du locus coeruleus (pour revue, (Dawbarn, 2007).

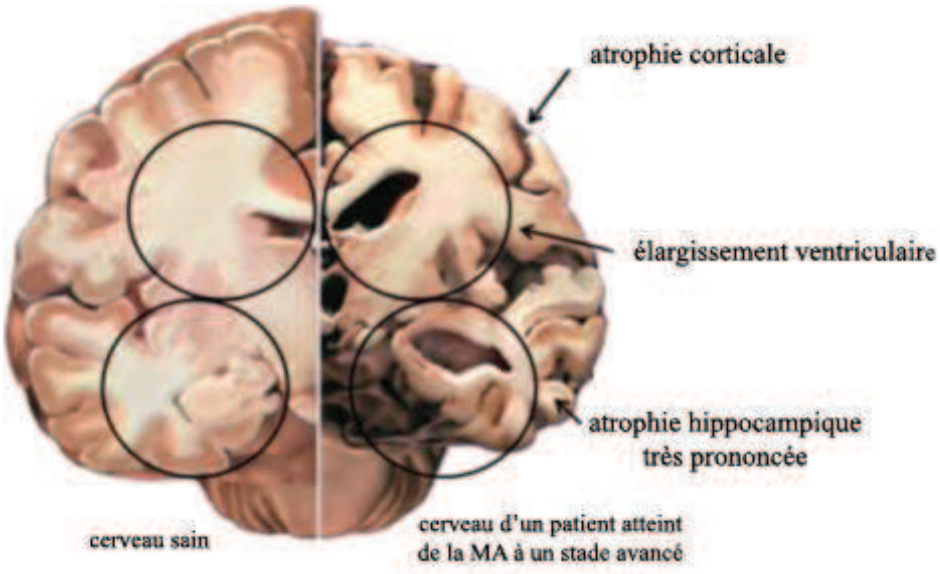

Figure 6 : *représentation schématique de la perte neuronale massive dans une maladie d'Alzheimer avancée, modifiée à partir de la revue de Lee (Lee et al., 2010b).*

Ces lésions macroscopiques observées dans la MA touchent principalement les voies cholinergiques mais d'autres régions sont atteintes également. Il en résulte une diminution parfois massive des taux de neurotransmetteurs circulant dans le cerveau. Le déficit cholinergique d'un patient Alzheimer par rapport au sujet sain peut atteindre jusqu'à 90 % dans les stades sévères de la maladie.

Le noyau basal de Meynert assurant l'innervation cholinergique du cortex est l'une des premières structures sous-corticales touchées, avant le cortex entorhinal, l'amygdale et l'hippocampe. Ce noyau basal de Meynert intervient dans des processus tels que les cycles veille/sommeil, l'attention, et la vigilance.

De par le rôle d'innervation cholinergique de nombreuses structures neuronales au niveau du système nerveux, la perte de concentration en acétylcholine au niveau de ces régions (surtout au niveau de l'hippocampe et des neurones corticaux) pourrait entrainer une perte de la modulation des transmissions synaptiques à ce niveau-là, et une désafférentation de ces régions dans la MA. Cette perte neuronale implique un déficit de synthèse de l'acétylcholine, qui est corrélé avec les déficits cognitifs (comme des troubles de l'attention, et donc des troubles dans les processus mnésiques) (Trillo et al., 2013).

Il faut également noter un déficit des marqueurs cholinergiques tels que la choline acétyl-transférase (ChAT), enzyme de synthèse de l'acétylcholine, et de l'enzyme de dégradation, l'acétylcholinestérase (AChE). Cette diminution des marqueurs cholinergiques est également corrélée avec une démence sévère chez des patients atteints de MA (Garcia-Alloza et al., 2005).

Cette altération de la neuromédiation cholinergique reste jusqu'à ce jour la cible privilégiée des thérapeutiques utilisées pour la MA (van Marum, 2008).

D'autres atteintes de systèmes de neurotransmetteurs ont été rapportées concernant la MA, comme par exemple le système glutamatergique (Greenamyre et al., 1988, Morrison and Hof, 1997), ou encore sérotoninergique (Garcia-Alloza et al., 2005).

I-4.4 La réaction inflammatoire

Depuis maintenant une vingtaine d'années, il est admis qu'une autre composante semble jouer un rôle important dans la progression de la MA ; à savoir la réponse inflammatoire, surtout de par son caractère chronique (Heneka and O'Banion, 2007, Heneka et al., 2010). Hypothèse appuyée non seulement par le fait qu'on a pu mettre en évidence la présence de cellules du système immunitaire périphérique dans le cerveau de patients atteints de MA en *post-mortem* (Luber-Narod and Rogers, 1988).

Mais aussi par le fait que l'utilisation chronique d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (=AINS) chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde diminuait d'un facteur 6 le

risque d'être atteint d'une MA (comparé à sa survenue dans la population générale pour les personnes du même âge), avec ainsi cette idée d'un rôle protecteur des AINS, agissant probablement sur cette neuroinflammation dans la MA (McGeer and McGeer, 2007).

A l'heure actuelle, la réponse inflammatoire fait l'objet de nombreuses discussions quant à son rôle bénéfique ou délétère dans la physiopathologie de la MA.

Les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires activent des cellules inflammatoires (à savoir les cellules microgliales et les astrocytes), et la concentration tissulaire en médiateurs pro- ou anti-inflammatoires (incluant des cytokines et des chimiokines) est altérée. De plus, des molécules inflammatoires et le système du complément ont été retrouvés au niveau de plaques amyloïdes (Lee et al., 2010b).

Nous savons maintenant que la microglie lorsqu'elle passe d'un état de repos (même s'il est inexacte de dire que la microglie est dans un état de repos, étant donné que ces cellules se déplacent constamment et assurent la surveillance immunitaire du SNC) à un état activé, une augmentation de l'expression des récepteurs appelés TSPO, c'est à dire la « protéine translocatrice de 18 kDa » (anciennement appelée « récepteurs aux benzodiazépines périphériques ») est observée ; cette protéine est maintenant utilisée comme un biomarqueur de la neuroinflammation (Figure 7), en particulier dans les maladies neurodégénératives (Cagnin et al., 2001, Cagnin et al., 2006).

Nous traiterons plus en détails la neuro-inflammation liée à la MA dans le chapitre II intitulé « L'inflammation » p28.

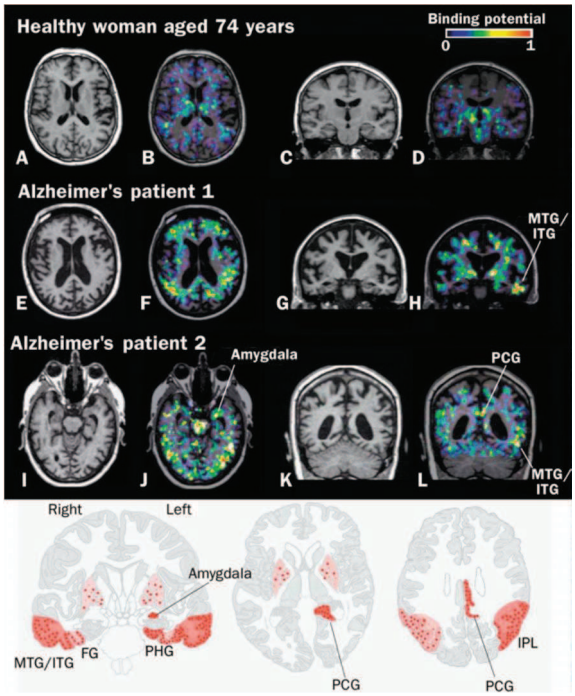

***Figure 7** : Image obtenue à partir de la technique de PET scan, on observe ici le signal qu'émet le composé [^{11}C](R)-PK11195 (qui est un ligand spécifique des récepteurs TSPO) chez des patients sains et chez des patients atteints de la MA. Pas de signal significatif du [^{11}C](R)-PK11195 au niveau du cortex sain, au contraire on a un signal important et étendu de [^{11}C](R)-PK11195 au niveau du cortex de patients atteints d'une démence sévère (E-H) avec un signal prédominant au niveau du lobe temporal gauche (Cagnin et al., 2001).*

I-5 Diagnostic

I-5.1 Tests neuropsychologiques

Encore à l'heure actuelle en 2013, le diagnostic de la MA reste probabiliste, bien qu'il existe maintenant la possibilité d'établir un diagnostic plus précoce (avec toutefois une marge d'erreurs) à l'aide de techniques de diagnostic améliorées et de certains critères (Ballard et al., 2011).

Mais le diagnostic de certitude d'une MA chez un patient ne peut se faire qu'avec l'analyse anatomo-pathologique de son cerveau en *post-mortem*.

Détecter une MA le plus précocement possible est un enjeu important, ce qui permet à la fois une prise en charge plus rapide du patient et de gagner en efficacité dans le ralentissement de la progression de la maladie, mais aussi de pouvoir agir sur d'autres troubles qui sont connus pour intervenir en sus de la maladie et qui peuvent aggraver le déclin cognitif, tels que la dépression, une déficience en vitamines, ou encore un hypothyroïdisme (Ballard et al., 2011).

Il faut savoir qu'il existe différents critères qui permettent d'établir le diagnostic d'une MA selon qu'on travaille dans le domaine de la recherche fondamentale (utile pour étudier l'évolution de la MA de manière longitudinale, mais aussi pour les essais cliniques essayant de modifier le cours de la maladie), à distinguer des critères cliniques diagnostiques actuels utilisés dans la médecine (Croisile et al., 2012).

Concernant le diagnostic utilisé en pratique clinique, nous disposons d'un panel d'outils qui ont été mis au point afin de poser un diagnostic de MA avec un degré de certitude satisfaisant, respectant les critères de démence du DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual - Revision 4) ou plus souvent du NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) qui tient compte du mécanisme causal de la maladie.

Parmi les outils d'évaluation neuropsychologiques, le plus répandu reste le test MMSE (Mini Mental State Evaluation, ou Test de Folstein) qui comporte une série de questions et tâches, réalisables en 15 minutes, généralement au chevet du patient (Tableau 1). Ce test recommandé par la HAS (Haute Autorité de Santé), explore des fonctions telles que l'orientation temporo-spatiale, l'apprentissage, la mémoire, l'attention, le calcul, le raisonnement, le langage et les praxies constructives. Il faut tout de même rappeler qu'il ne s'agit pas d'un test diagnostique, mais en revanche il précise le stade de la maladie.

Il fournit un score variant de 0 à 30 : un score ≤ 10 indique un stade sévère de la maladie, un score compris entre [11-19] indique un stade modéré de la maladie, tandis qu'un score entre [20-26] suspecte un stade léger.

Enfin, le test de Gröber et Buschke est également courant et permet la surveillance neuropsychologique pour détecter l'aggravation et l'évolution vers une démence des individus atteints de MCI. Ces tests neuropsychologiques utilisés seuls présentent un taux de spécificité de l'ordre de 92% (Sarazin and Dubois, 2002) selon l'étude nationale Pré-A1, avec un diagnostic établi en moyenne trois ans avant l'apparition de la démence.

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, posées 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		Citron		Fauteuil	☐
12. Fleur	ou	Clé	ou	Tulipe	☐
13. Porte		Ballon		Canard	☐

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		Citron		Fauteuil	☐
12. Fleur	ou	Clé	ou	Tulipe	☐
13. Porte		Ballon		Canard	☐

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 ? » ☐

« FERMEZ LES YEUX »

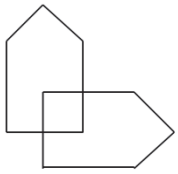

Tableau 1 : *Formulaire du Mini Mental State Evaluation*

Le test de l'horloge est également très utilisé : le patient doit représenter le cadran d'une horloge en plaçant les chiffres, sans modèle, puis les aiguilles pour indiquer une heure précise. C'est un test muni d'une échelle de cotation selon plusieurs points que l'examinateur doit vérifier, à savoir la position des nombres correspondant à chaque heure, le bon ordre des heures, la bonne représentation des deux aiguilles (petite et grande), et l'emplacement des

deux aiguilles correspondant à l'heure demandée. Ce test permet de mettre en évidence un trouble des fonctions exécutives (score inférieur à 5) et est assez sensible (Figure 8).

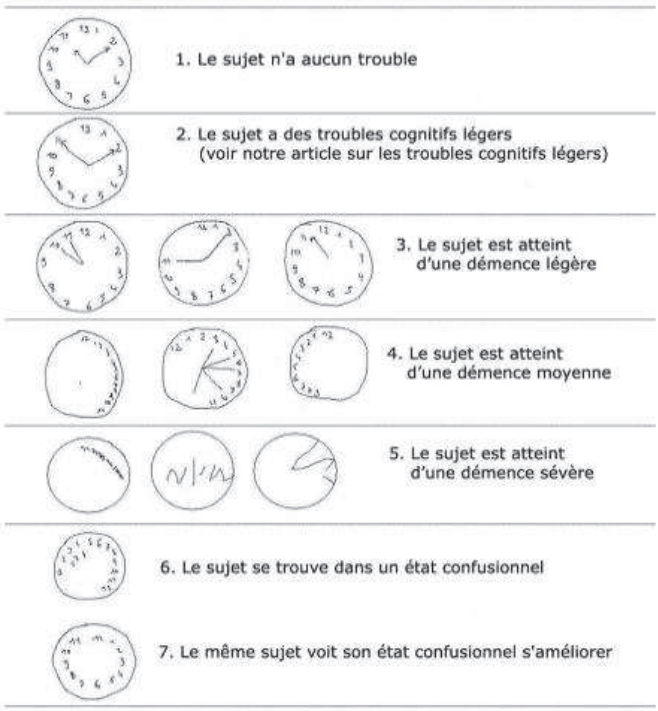

Figure 8 : *Exemples de résultats que l'on peut obtenir chez différents patients suite au test de l'horloge.* http://www.reseau-neuropsy-limousin.com/RZP_public/index.php

Aujourd'hui, l'avancé des technologies en neuro-imagerie permettent d'étendre les possibilités de détecter de manière précoce et de tendre vers un diagnostic de certitude en association avec les tests neuropsychologiques et l'utilisation de marqueurs biologiques.

En pratique son rôle est triple, il permet à la fois d'exclure d'autres pathologies (de faire un diagnostic différentiel), il permet aussi d'aider au « diagnostic positif » précoce de la MA, mais aussi de mettre en évidence des éléments de co-morbidité, comme par exemple des lésions vasculaires sous-corticales (Pariente, 2009). Rappelons que la principale cause clinique de la MA est basée sur une amnésie à prédominance hippocampique.

I-5.2 Imagerie

L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) est souvent l'examen initial lorsqu'un patient présente un trouble mnésique. Cet examen a pour but premier d'éliminer des diagnostics différentiels chirurgicaux, tels qu'un hématome sous-dural chronique, un méningiome compressif, une lésion ischémique étendue, ou encore une hydrocéphalie

chronique de l'adulte (Boncoeur-Martel et al., 2007). Cette technique permet aussi de mettre en évidence l'atrophie hippocampique (Figure 9) et corticale retrouvée chez le patient Azheimer. Des logiciels récents permettent de mesurer le volume hippocampique sur des reconstructions 3D de clichés d'IRM.

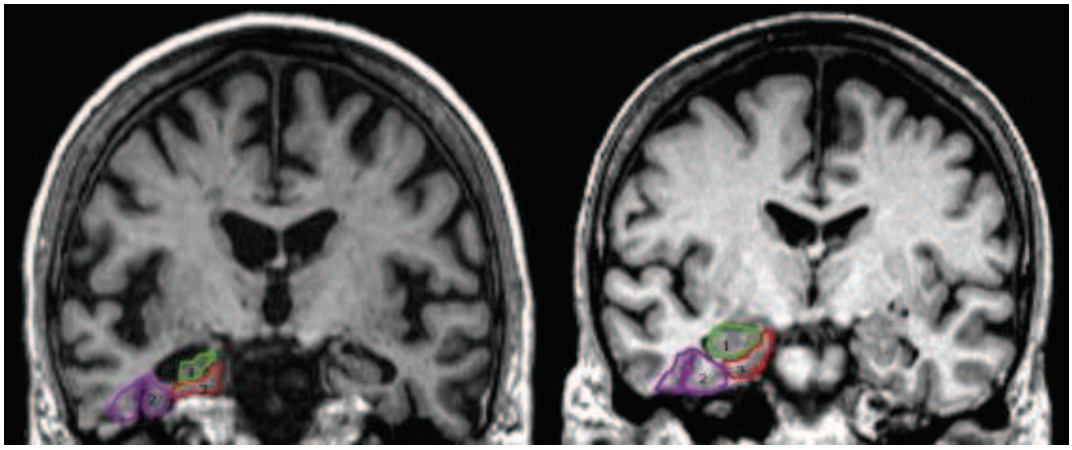

Figure 9 : *Cliché d'IRM montrant une atrophie du lobe temporal médian, à gauche IRM coronale d'un patient atteint d'une MA modérée et à droite un patient contrôle. En vert = hippocampe, en violet = cortex perirhinal, en rouge =cortex entorhinal (Rodriguez et al., 2012).*

L'IRM fonctionnelle permet quant à elle de mesurer la réponse hémodynamique associée à l'activité neuronale du cerveau. On s'intéresse plus particulièrement à l'IRM fonctionnelle au repos, c'est à dire sans relation avec une tâche cognitive spécifique bien qu'il existe aussi des études visant à évaluer l'activité cérébrale des patients lors de la réalisation d'une tâche cognitive, mais selon les stades de la maladie étudiés, on peut avoir des problèmes de coopération des patients, et donc des biais dans l'analyse des résultats obtenus.

En pratique, il existe une diminution de l'activité cérébrale au repos dans le cingulaire postérieur et dans l'hippocampe. Cela suggère une altération de la connectivité entre ces deux régions qui permettrait d'expliquer en partie l'hypométabolisme dans la région cingulaire postérieure détecté chez les patients atteints d'une MA légère.

La TEMP (Tomographie d'émission monophotonique) repose sur la mesure de l'émission des rayonnements gamma après désintégration d'un traceur radioactif préalablement injecté chez le patient. De très nombreuses études ont montré l'intérêt de la TEMP dans le diagnostic des démences dégénératives. Dans la MA, L'existence d'une hypoperfusion pariétale associée à une hypoperfusion postérieure est très évocatrice de MA.

Avec l'évolution de la maladie, l'hypoperfusion va progressivement s'étendre et toucher le cortex frontal. Il existe une relation entre la sévérité de l'atteinte cognitive et le degré d'anomalies perfusionnelles (Pariente, 2009). La TEMP est principalement utilisée pour le diagnostic précoce de la MA et dans les formes cliniquement atypiques (en accord avec les recommandations de la HAS).

La TEP (Tomographie par émission de positons) était à l'origine utilisée dans la MA pour la mesure de la consommation régionale de glucose qui est un reflet du métabolisme neuronal (le glucose étant la principale source énergétique du SNC), grâce au ^{18}F-2-fluoro-2-déoxy-D-glucose (FDG) (Figure 10).

Une réduction du métabolisme dans les aires associatives néocorticales (cortex cingulaire postérieur, cortex temporopariétal et frontal multimodal) est souvent détectée alors que les régions visuelles et sensorimotrices, les ganglions de la base et le cervelet sont relativement préservés (Herholz et al., 2002).

Il est intéressant de noter qu'à l'heure actuelle, cette technique ne fait pas partie des recommandations de la HAS pour porter un diagnostic positif de la MA, tandis qu'elle fait déjà partie des techniques pouvant être utilisée dans l'arbre diagnostic aux Etats-Unis.

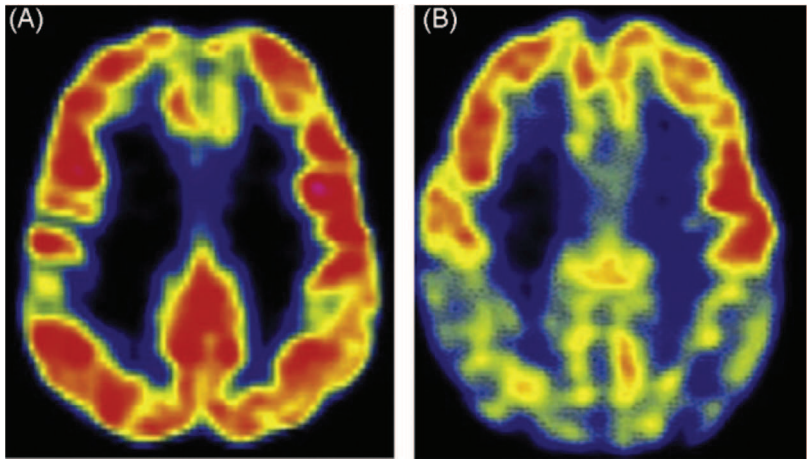

Figure 10 : *TEP-FDG. A. Sujet sain. B. Patient porteur d'une maladie d'Alzheimer à un stade léger (Pariente, 2009).*

Il existe depuis quelques années maintenant un radio-ligand amyloïde qui permet le marquage *in vivo* et spécifique des lésions cérébrales d'une MA sous-jacente, notamment le Pittsburg Compund-B (= [^{11}C]2-(4′-methylaminophenyl)-6-hydroxy-benzothiazole = PIB) (Figure 11). Ce traceur permet des analyses quantitatives des dépôts amyloïdes dans le

cerveau, il est devenu en l'espace de quelques années un outil puissant dans le domaine des Neurosciences (Nordberg, 2007).

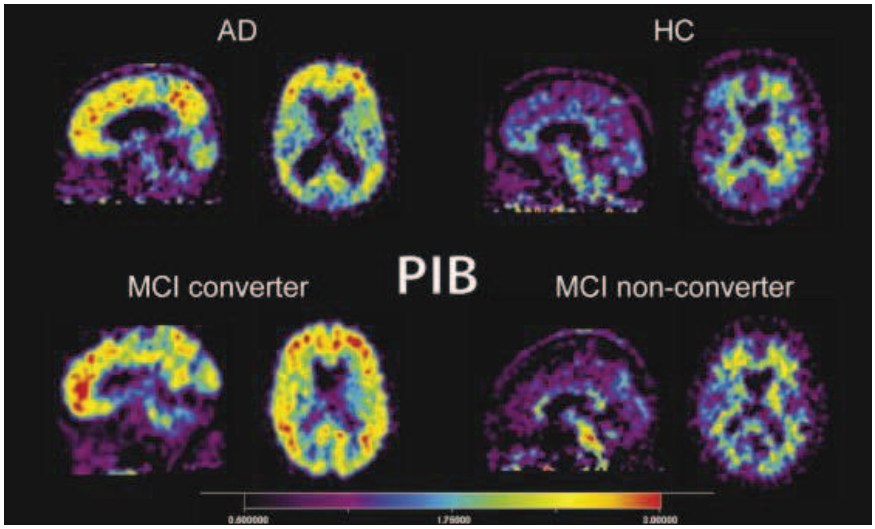

Figure 11 : *PET scan avec marquage au PIB chez un patient MA (en haut à gauche), un patient présentant un MCI qui s'est ensuite converti en MA (en bas à gauche), puis un patient sain (en haut à droite) et un patient présentant un MCI (qui ne s'est pas converti en MA). Un marquage rouge est synonyme d'un dépôt amyloïde important.(Forsberg et al., 2008)*

Enfin les études récentes utilisant le ^{18}F-AV-45 permettant un marquage en TEP des plaques amyloïdes sont extrêmement prometteuses puisque sa grande sensibilité pourrait permettre un diagnostic plus précoce et plus précis (Wong et al., 2010).

Enfin des équipes évaluent actuellement un radiomarqueur de la neuro-inflammation cité précédemment, à savoir le TSPO (Translocator protein 18 kDa). Dans le cerveau sain, le TSPO a une expression basale très faible. En revanche, dans des conditions de neuro-inflammation telle que la MA, le taux d'expression de cette protéine est significativement augmentée (James et al., 2008). L'expression du récepteur TSPO reflétant l'étendue de l'activation microgliale, le développement de radiotraceurs efficaces et utilisables en clinique pour ce récepteur pourrait servir d'indicateur précoce dans les cerveaux pathologiques (Venneti et al., 2006).

En plus de ces techniques d'imagerie, une autre façon d'explorer la MA concerne ce qu'on appelle les biomarqueurs, accessibles par ponction lombaire et quantifiés au niveau du liquide céphalorachidien. Ces biomarqueurs sont intéressants à plus d'un titre, non seulement

ils sont accessibles durant le vivant du patient MA, et permettraient de détecter la MA à un stade dit pré-démentiel ce que ne permet pas par exemple les critères NINCDS-ADRDA. Ces biomarqueurs seraient aussi utiles pour prédire le passage d'un stade MCI à un stade MA (Tarawneh and Holtzman, 2010).

Il faut bien comprendre que l'enjeu actuel du diagnostic de MA se situe à ce stade prédémentiel de la maladie d'Alzheimer, dans la perspective du développement des médicaments susceptibles d'agir sur l'étiologie de la maladie (disease-modifying) (de Souza et al., 2012).

Trois biomarqueurs intéressant la MA sont actuellement dosés (ou en cours d'évaluation) : le peptide Aβ1-42, la protéine tau totale (ou protéine MAPT pour Microtubule Associated Protéin Tau) et les protéines tau hyperphosphorylées (Ptau).

Le peptide Aβ1-42 abaissé, la protéine tau élevée et les protéines tau hyperphosphorylées augmentées sont des critères « positifs », c'est à dire en faveur du diagnostic de MA (Dubois, 2012).

Le dosage sérique de biomarqueurs est en cours d'évaluation notamment concernant le peptide amyloïde qui fait l'objet d'un grand nombre d'études actuellement. Ces dosages sériques faciliteraient évidemment le dépistage et le suivi des patients car une simple prise de sang est nécessaire, surtout quand la ponction lombaire est difficile chez des personnes âgées.

En France, nous avons connu la succession de trois plans Alzheimer, le dernier en date (2008-2012) a permis des avancées significatives sur le plan du diagnostic de la MA. Dans l'avenir, nous pourrons nous approcher au plus près d'un diagnostic de certitude (et non pas probabiliste) avec la combinaison de la clinique, des techniques d'imagerie et du dosage des biomarqueurs dans le LCR.

I-6 Les traitements

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif, qui agit directement sur les lésions histopathologiques de la MA. Les cliniciens ne disposent pour le moment que de traitements dit symptomatiques, qui ont pour but de ralentir la progression de la MA.

I-6.1 Inhibiteurs de l'acétylcholine-estérase

Les inhibiteurs de l'acétylcholine-estérase (AchE) sont indiqués en première intention dans la MA plutôt dans les stades légers (MMSE > 20, entre 20-25) voir modérés (11 < MMSE < 19) de la maladie. Les inhibiteurs de l'AchE sont utilisés pour inhiber l'action de l'enzyme acétylcholine-estérase qui dégrade l'acétylcholine dans la fente synaptique.

Le but de ce traitement médicamenteux est donc d'augmenter la concentration en acétylcholine dans la fente synaptique et de prolonger son action, et d'essayer de compenser la perte de production de ce neurotransmetteur suite à la dégénérescence des neurones cholinergiques, et d'agir sur des troubles cognitifs liés à cette perte d'afférences cholinergiques.

Il existe trois molécules principales dans cette classe médicamenteuse, à savoir le donézépil (Aricept®), la galantamine (Reminyl®) et la rivastigmine (Exelon®). Pour mémoire, la première molécule inhibant l'AchE mise sur le marché était la tacrine, mais elle fut retirée car elle entrainait de graves effets indésirables hépatiques.

Le donézépil est disponible sous forme de comprimés orodispersibles, et sous forme de comprimés pelliculés. L'initiation du traitement préconise une dose de 5 mg/jour pendant un mois afin d'évaluer la tolérance du patient au traitement. Puis la dose peut être augmentée jusqu'à 10 mg/jour en une prise (plutôt le soir de préférence). Le donézépil est un inhibiteur spécifique et réversible de l'AchE.

Pour la galantamine, il existe une forme comprimé simple ainsi qu'une forme à libération prolongée (LP) et une solution buvable. La galantamine est un alcaloïde tertiaire qui inhibe de manière réversible et compétitive l'AchE, et peut aussi stimuler des récepteurs nicotiniques de l'Ach. Le traitement est d'instauration progressive, et la dose maximale recommandée est de 24 mg/j (pour la forme LP administrable en une fois, plutôt le matin) et donc 12 mg/2 fois par jour pour les formes non LP.

La rivastigmine s'administre par voie orale (comprimés) deux fois par jour (jusqu'à 6 mg /2 fois par jour) ou sous forme de patch, avec une augmentation progressive des doses à l'initiation du traitement. D'un point de vue pharmacodynamie, elle inhibe aussi la butylcholinesterase en plus de l'AchE. Elle n'est que faiblement métabolisée par le cytochrome P450 et peut donc présenter un intérêt chez les patients poly-médicamentés.

Les effets indésirables les plus fréquents sont communs à ces trois molécules, à savoir des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées), des crampes musculaires, de la fatigue et des insomnies. Il semblerait que parmi ces trois molécules, le donézépil serait la mieux tolérée (Tayeb et al., 2012).

L'impact de ces médicaments sur la pathologie reste malheureusement modeste et transitoire, avec des effets bénéfiques ne pouvant durer que 12 à 24 mois au maximum (Tayeb et al., 2012).

En effet, une étude récente visant à étudier le coût qu'entraine un patient atteint de la MA de par son institutionnalisation dans une structure médicalisée, ainsi que le bénéfice qu'entrainerait la prise précoce des inhibiteurs de l'AchE a pu montrer que la prise des traitements médicamenteux existants même à un stade précoce de la maladie ne retarde que de 90 jours l'entrée du patient dans une institution médicalisée par rapport à un patient qui n'en prend pas (Geldmacher et al., 2013).

De nombreuses études ont montré un léger effet bénéfique de ce traitement plutôt dans les stades légers, voire modérés de la maladie, et une perte de cet effet significatif dans les stades sévères de la MA, probablement car une grande partie des structures cholinergiques est trop atteinte.

Enfin, il semblerait aussi que l'association d'un inhibiteur de l'AchE avec la mémantine serait une solution alternative plus efficace pour lutter contre la progression de la MA (Gauthier and Molinuevo, 2013), par rapport à une monothérapie.

I-6.2 Antagoniste des récepteurs NMDA : Mémantine

La mémantine (Ebixa®) est quant à elle un antagoniste voltage-dépendant non compétitif des récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) d'affinité modérée, donnée dans les formes modérées à sévères de la MA.

Elle module les effets de taux élevés pathologiques de glutamate qui pourrait aboutir à un dysfonctionnement neuronal. En effet, il apparait de plus en plus clairement que le dysfonctionnement de la neurotransmission glutaminergique contribue à la fois à l'expression des symptômes et à la progression de la maladie dans la démence neurodégénérative.

La mémantine possèderait d'autres propriétés intéressantes dans une MA, à savoir qu'elle possèderait la capacité de promouvoir la potentialisation sur le long terme (LTP, c'est un mécanisme neuronal important pour le bon fonctionnement des synapses, mécanisme mis en évidence par exemple au niveau de régions hippocampiques et les processus de mémoire), mais aussi elle diminuerait l'hyperphosphorylation de tau (Tayeb et al., 2012).

L'instauration de la dose recommandée est progressive, et elle peut atteindre jusqu'à 20 mg/jour. Il existe deux formes à ce jour, à savoir : des comprimés pelliculés, et une solution buvable.

Les études cliniques et des méta-analyses ont montré que le traitement par mémantine améliore la cognition, mais aussi les symptômes neuropsychiatriques et comportementaux, et l'impression clinique globale du patient, avec un effet positif surtout sur les stades avancés de la MA (Tayeb et al., 2012).

Les effets indésirables sont peu fréquents à savoir des céphalées, des vertiges, de la constipation, de la somnolence et de l'hypertension.

I-6.3 Autres traitements en cours d'essais cliniques

I-6.3.1 Inhibiteurs des γ-sécrétases

Devant l'effet modeste des traitements actuellement utilisés pour ralentir la progression de la MA, plusieurs pistes sont actuellement étudiées afin de trouver d'autres traitements capable de ralentir la progression de la MA.

Une des pistes explorées actuellement se base sur le ciblage de l'Aβ. En effet plusieurs molécules ont été testées pour inhiber l'action de l'enzyme responsable de la dégradation de l'APP en peptides insolubles et toxiques : la γ-sécrétase.

Un premier problème de toxicité s'est posé ; il faut savoir que la γ-sécrétase est une protéase qui possède de nombreux substrats autres que l'APP (comme des protéines du cytosquelette ou des protéines intervenant dans la signalisation cellulaire), et qu'instaurer un tel traitement peut entrainer de nombreux effets indésirables. A titre d'exemple, la protéine transmembranaire Notch est une des protéines qui doit être dégradée par la γ-sécrétase, afin de libérer son domaine intracellulaire et pouvoir ainsi exercer ses fonctions en lien avec le signal intracellulaire et la modulation de la différenciation et de la prolifération d'un type varié de cellules proliféatrices (son rôle est important dans l'embryogénèse). L'arrêt de la

signalisation de la protéine Notch entraine l'expression d'un phénotype fatal ce qui a limité sérieusement les essais cliniques.

L'enjeu est d'arriver à développer une molécule qui ne bloque pas complètement la γ-sécrétase, mais qui altère de manière sélective la fonction de l'enzyme allouée au clivage de l'APP sans agir sur le clivage d'autres substrats essentiels tel que Notch (Tayeb et al., 2012).

Pour les essais cliniques, nous pouvons citer le Semagacestat (LY450139) qui en phase III a montré une aggravation d'un point de vue cognitif et fonctionnel, et un risque augmenté de cancer de la peau chez les patients traités.

La Tarenflurbil (Flurizan) quant à lui en phase III n'a montré aucun bénéfice cognitif pour le moment (Tayeb et al., 2012).

I-6.3.2 Vaccination

Une autre façon d'explorer la thèse amyloïde comme piste thérapeutique est celle des vaccins. En effet une première étude publiée en 1999 par Mr Schenk (Schenk et al., 1999), a montré qu'un vaccin injecté dans des souris transgéniques Alzheimer (phénotype PPAD) et contenant le peptide amyloïde afin d'y induire une immunisation active était bénéfique. En effet, deux résultats intéressants sont apparus, tout d'abord cette injection chez les animaux jeunes (donc pas encore de dépôts amyloïdes) a entrainé une diminution voir une prévention de l'apparition des plaques amyloïdes. Tandis que chez les animaux âgés (donc avec déjà apparition de plaques amyloïdes) le vaccin a entrainé non seulement une diminution de la charge amyloïde mais aussi une amélioration des fonctions cognitives.

Ces résultats étant très prometteurs, on a voulu reconduire et tester cette possibilité chez l'homme.

Il existe deux types d'essais cliniques chez l'homme, à savoir l'immunisation active, et l'immunisation passive.

La première étude clinique chez l'homme a été celle intitulée AN1792 où l'on a injecté chez une cohorte de 300 patients atteints de la MA un vaccin activé en vue d'une immunisation contre le peptide Aβ-42 agrégé (Gilman et al., 2005), malheureusement cet essai clinique a du s'interrompre prématurément en phase II car 6% des patients ont été atteints d'une méningo-encéphalite.

Malgré l'arrêt de cet essai clinique, on a pu suivre les patients qui ont reçu une voire deux injections sur le long terme, pour analyser les réponses clinico-biologiques suite à ce vaccin. Ils ont pu montrer chez 60% de ces patients une production d'anticorps dirigés contre le peptide Aβ-42, mais malheureusement ils n'ont pu montrer une amélioration significative des fonctions cognitives chez ces patients.

Les autres essais en cours se focalisent sur une immunisation moins massive (dirigée par exemple contre seulement un épitope du peptide Aβ-42 et pas son intégralité) afin d'éviter l'activation de cellules-T périphériques responsables probablement des méningo-encéphalites dans l'étude AN1792, c'est à dire essayer de favoriser la réponse immunitaire humorale et non pas cellulaire (Galimberti et al., 2013).

Concernant l'immunisation passive, cette alternative est intéressante car elle permet d'éviter l'activation d'une réponse cellulaire, le but est d'injecter au patient des anticorps anti-Aβ et stimuler ainsi sa réponse immunitaire. On peut citer par exemple l'anticorps anti-Aβ Bapineuzumab, testé chez 200 patients atteints d'une MA légère à modérée. Cette étude a montré une bonne tolérance du traitement en phase II, mais aucune amélioration cognitive des patients en phase III (Checler and Buee, 2009, Galimberti et al., 2013).

Il reste encore beaucoup à faire dans le domaine de l'immunothérapie dirigée contre le peptide amyloïde, non seulement pour l'immunisation active où il faut entrainer une immunisation modérée et non pas trop forte car mal tolérée chez le patient MA, mais aussi pour l'immunisation passive où même s'il l'on a une clairance augmentée du peptide amyloïde, ce n'est pas encore accompagné d'un point de vue clinique par une amélioration des fonctions cognitives chez le patient MA.

II. L'inflammation

II-1 Généralités sur la réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire est un processus dynamique généralement indispensable à notre survie, c'est le mécanisme mis en première ligne lors de l'agression d'un tissu par des agents irritants, des agents pathogènes à la fois physiques ou chimiques ou encore à une nécrose tissulaire (après une blessure post-ischémique par exemple), elle permet de contenir les pathogènes et de préserver le reste de notre organisme contre les infections.

L'inflammation est à la base de toutes les réponses immunitaires ; elle fait appel à toutes les ressources de l'immunité innée, sur lesquelles viennent se greffer, en cas de besoin (c'est à dire en fonction de la présence d'une infection et/ou de sa gravité) toutes celles de l'immunité adaptative.

L'inflammation aiguë comporte 4 grandes étapes, à savoir : 1) la reconnaissance des signaux de danger, 2) le recrutement de cellules sur le site de l'infection (=phase cellulaire), 3) l'élimination du pathogène et la « résolution » de l'inflammation conduisant à un retour de l'homéostasie tissulaire (appelée plus grossièrement la phase cytokinique) et 4) la phase cicatricielle (en effet, lors de l'inflammation on a une destruction intentionnelle du tissu touché pour éviter la métastase de bactéries par exemple et éviter leur prolifération, destruction qu'il faut ensuite reconstruire).

Etant donné que nous sommes sur une réponse de l'organisme qui fait intervenir une communication entre de nombreux acteurs cellulaires (de types variés) et des facteurs solubles, une réponse inflammatoire est une réponse difficile à réguler, et son exacerbation peut entrainer des dommages irrémédiables et conduire à la destruction de certains tissus touchés. La non « résolution » de l'inflammation peut entrainer l'installation d'une inflammation chronique (Nathan, 2002).

II-1-1. Initiation du processus inflammatoire

Le déclenchement de la réponse inflammatoire (=RI) est un processus dont la rapidité et la sensibilité est primordiale. Ceci est rendu possible grâce à un système de reconnaissance des signaux de danger élaboré. En effet il existe plusieurs types de signaux exogènes et endogènes qui peuvent initier la réponse inflammatoire aiguë.

- **Signaux exogènes :** les principaux signaux exogènes capable d'induire la RI sont obtenus par les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), qui sont hautement conservés au sein d'organismes infectieux (bactéries, parasites, virus). Parmi ces PAMPs, on retrouve par exemple le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane, l'acide lipotéichoïque etc… (Zhang and Ghosh, 2001). Cela permet à l'organisme de reconnaitre un certain nombre de pathogènes à l'aide d'un nombre assez limité de récepteurs, à savoir les Pattern Recognition Receptors (=PRR). Parmi ces PRR, nous pouvons citer les Toll like receptors (=TLR), ainsi que les NLR (=Nod-like receptors). Ces récepteurs sont retrouvés au niveau membranaire des macrophages et des cellules

dendritiques pré-infiltrés dans le tissu lésé (pour les TLR) et au niveau du cytoplasme (pour les NLR).

- **Signaux endogènes :** les alarmines sont les équivalents des PAMPs à la différence qu'elles sont endogènes et non infectieuses d'où le nom de « Damage-associated molecular pattern molecules » (DAMPs). Elles ont plusieurs caractéristiques : elles sont rapidement libérées par la mort cellulaire non programmée (mais pas par les cellules apoptotiques), les cellules du système immunitaire (=SI) qui peuvent être stimulées pour produire et libérer des alarmines, elles recrutent et activent de manière directe ou indirecte les récepteurs exprimés par les cellules du SI inné (y compris les cellules dendritiques), elles peuvent aussi stimuler la RI adaptative. Pour finir elles peuvent restaurer l'homéostasie en promouvant la reconstruction du tissu lésé (tissu détruit soit par blessure directe, ou d'un effet secondaire à l'inflammation). Parmi ces alarmines nous pouvons citer le chef de fil : le facteur de transcription HMGB1 (pour High Mobility Group Box 1) qui va favoriser la migration des polynucléaires neutrophiles au niveau de la lésion, ou encore les protéines HSP qui lorsqu'elles sont dans le milieu extracellulaire, pourront conduire à la production et à la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages.

  En plus de ces alarmines, il ne faut pas oublier de citer les biopeptides actifs (comme la substance P) libérés par les neurones en réponse à la douleur, qui eux aussi sont capables d'induire une RI (Nathan, 2002). Notons aussi que le peptide amyloïde est aussi une DAMP (Bamberger et al., 2003, Landreth and Reed-Geaghan, 2009, Cameron et al., 2012).

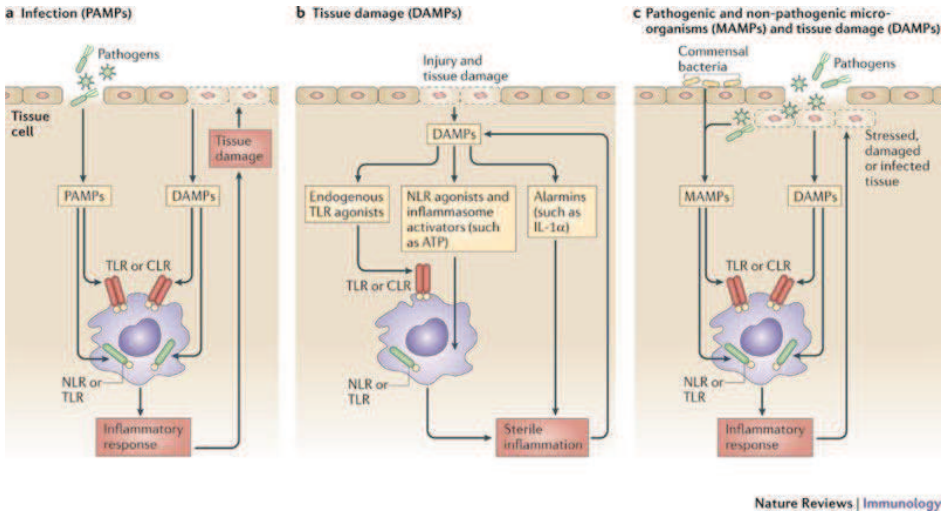

Figure 12 : *illustrations de différentes voies d'activation de la RI innée (Mills, 2011).*

En réponse à ces signaux, les mastocytes pré-infiltrés dans le tissu lésé libèrent leurs stocks d'histamine, d'eïcosanoïdes (leucotriènes, prostaglandines pro-inflammatoires) et de protéases (favorisant la vasodilatation et l'extravasation), de TNF-α, et de chimiokines (Nathan, 2002). Ces chimiokines sont en fait des molécules chimiotactiques qui lorsqu'elles sont libérées, forment un gradient de concentration qui permet d'attirer spécifiquement les leucocytes circulants vers le site de la lésion. Elles permettent le guidage spécifique des leucocytes aussi bien en condition basale, qu'en condition inflammatoire (D'Ambrosio et al., 2003).

Les polynucléaires neutrophiles activés (par le TNF-α et les leucotriènes produits par les mastocytes) sont les premières cellules à traverser la paroi des vaisseaux, ils sécrètent alors de grandes quantités de protéases (cathepsin G par exemple), d'hydrolases et de peptides antimicrobiens (les défensines) provoquant ainsi un véritable « burst » respiratoire (ou explosion oxydative), avec une production importante d'oxydants (les espèces oxygénées réactives) comme le peroxyde d'hydrogène. Ces oxydants en plus d'être très actifs vis à vis des bactéries, vont activer les métalloprotéinases matricielles (MMP) dont le rôle est de dégrader la matrice extracellulaire, mais aussi de cliver le TNF-α séquestré sur la membrane plasmique des monocytes et des macrophages infiltrés (Nathan, 2002, Vuitton, 2009).

L'ensemble des chimiokines, des cytokines pro-inflammatoires (notamment le TNF-α et l'IL-1) et les peptides anti-microbiens libérés par les mastocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages infiltrés ainsi que par les cellules du tissu lésé vont permettre le recrutement et l'activation de lymphocytes et de cellules dendritiques au niveau de la lésion (D'Ambrosio et al., 2003).

Il existe un autre système faisant partie intégrante de l'immunité non spécifique ; le système du complément.

Le système du complément est un complexe enzymatique composé d'une trentaine de protéines solubles ou membranaires présentes dans le sang sous forme inactive, et qui jouent un rôle majeur dans les mécanismes de défense immunitaire. Le système du complément intervient préalablement à l'établissement d'une réponse immune cellulaire dépendante des lymphocytes.

Il existe trois voies d'activation du complément, que l'on différencie par leur mode d'initiation, mais elles convergent toutes vers un point commun : la formation du complexe

d'attaque membranaire (MAC), qui est un complexe enzymatique puissant, capable de perforer les surfaces cellulaires (bactéries ou autres). Il s'agit des voies classique, alterne et des lectines (Figure 13). Quelle que soit la voie activée, elles ont la faculté de s'activer en cascade, le premier composant du système est doté d'une activité protéolytique lui permettant de cliver un deuxième composant en deux fragments dont l'un acquiert lui-même une activité protéolytique spécifique d'un troisième composé. Chaque composant est généralement clivé en un petit fragment (noté a) et un grand fragment (noté b) qui se lie étroitement à la membrane de la cellule cible par son site de liaison membranaire nouvellement mis à découvert.

Dans certains cas, le petit fragment agit indépendamment comme un signal diffusible induisant une réponse inflammatoire. Ces petits fragments portent le nom d'anaphylatoxines.

La voie classique est généralement mise en place par la présence de complexes antigène-anticorps dans la circulation, mais certains agents pathogènes et d'autres molécules et structures telles l'ADN, la protéine C-réactive, le peptide Aβ fibrillaire et les corps apoptotiques peuvent aussi initier la cascade d'activation de cette voie du complément. Le premier composant activé est C1 et il conduit à une cascade protéolytique se déroulant dans l'ordre suivant : C1q, C1r, C1s, C4 et C2. Le complexe constitué par C4b2a constitue la C3 convertase, qui est une entité capable de cliver C3 en deux fragments biologiquement actifs C3a et C3b. Ce dernier fragment s'associe au précédent pour former le complexe C4b2a3b qui constitue la C5 convertase clivant C5 en C5a et C5b.

La voie alterne peut être directement mise en jeu par les polysaccharides localisés la surface des bactéries, virus et parasites. Leur paroi stabilise le C3b trouvé en très faible quantité dans le sérum. En l'absence de surface activatrice, le C3b est inactivé rapidement.

Suite à l'activation de C3b, une cascade protéolytique se déclenche et implique les facteurs B et D. Les C3 et C5 convertases constituées de C3bBb et C3bBbC3b, respectivement, agissent comme leurs homologues de la voie classique.

Enfin, la voie des Mannose binding lectines (MBL) est initiée par la liaison de lectines dépendantes du calcium telles que la mannan-binding lectin (MBL), la L-ficoline, qui sont capables de se fixer à des carbohydrates dont le mannose, le N-acétylglucosamine présents à la surface d'une grande variété de microorganismes. La MBL est homologue à C1q et peut

donc comme dans la voie classique cliver C4 et C2 en s'associant à deux sérine protéases, conduisant à la formation des C3 et C5 convertases.

Ces trois voies aboutissent à une voie terminale effectrice mettant en jeu plusieurs composants C5b, C6, C7, C8, C9 formant le MAC, très stable et capable de s'insérer dans la membrane de la cellule cible en formant un pore délimitant un canal hydrophile à l'origine de la lyse de l'agent pathogène [pour revue (Wagner, 2006)].

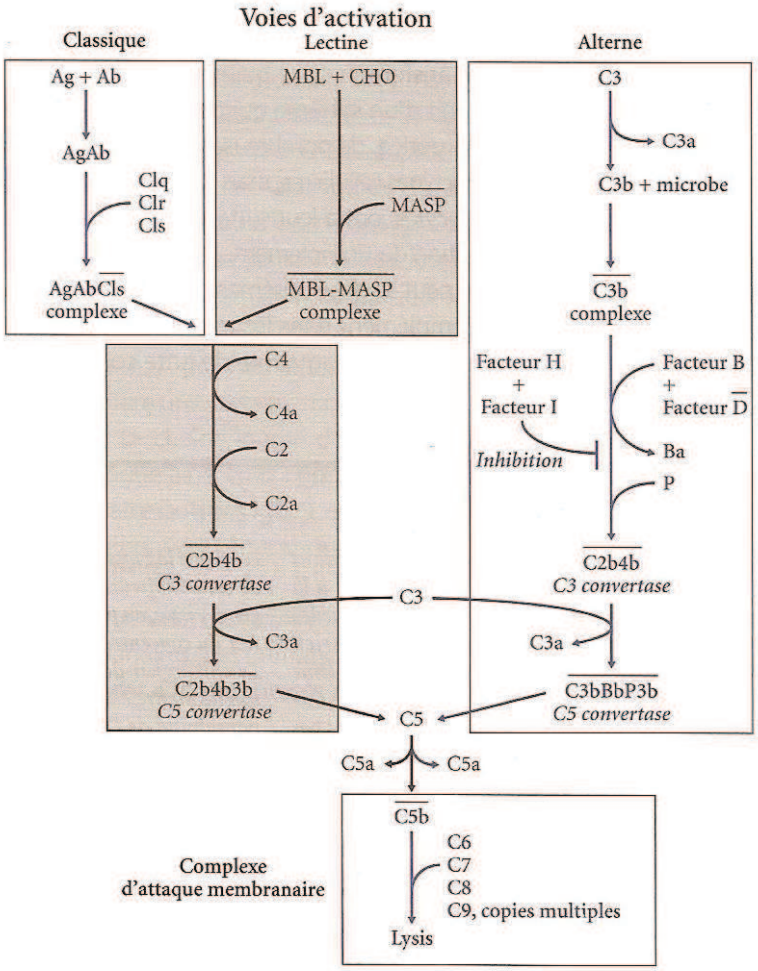

Figure 13 : *les trois voies d'activation du complément (Vuitton, 2009)*

Par ces trois voies d'activation, le système du complément assure les fonctions suivantes :

- ✓ la reconnaissance de l'agent pathogène
- ✓ l'opsonisation facilitant la phagocytose
- ✓ la stimulation de l'inflammation par les anaphylatoxines (C3a et C5a sont des

anaphylatoxines qui favorisent la réponse inflammatoire par attraction des polynucléaires pour C3a et par augmentation de la perméabilité vasculaire et le flux sanguin pour C5a)

- ✓ la destruction de l'agent pathogène par l'intermédiaire du MAC.

II-1-2. Maintien et amplification de la réaction inflammatoire

Cependant, bien qu'efficace, la RI innée n'est pas toujours capable à elle seule d'éliminer les agents pathogènes, et la persistance de l'agent infectieux au niveau de la lésion va conduire au développement d'une RI plus spécifique, à savoir la RI adaptative grâce au recrutement et à l'activation des lymphocytes.

- **Rôle de l'immunité innée**

Les cytokines et autres facteurs inflammatoires sécrétés suite à la reconnaissance des motifs PAMPs *via* les récepteurs TLR et NLR vont favoriser la vasodilatation et l'extravasation (responsables des symptômes de rougissement, de réchauffement, d'œdèmes et de douleur), mais vont aussi favoriser la migration des cellules inflammatoires du sang vers le tissu infecté (Nathan, 2002).

Les cytokines telles que le TNF-α et l'IL-1 vont conduire à la migration des leucocytes sur le site d'infection, en particulier des neutrophiles puis des monocytes (Nathan, 2006).

Les neutrophiles ont la capacité de phagocyter les pathogènes et les dirigent directement vers les phagolysosomes. Si les neutrophiles ne détectent qu'une partie du signal, c'est à dire s'ils détectent le TNF-α sans entrer en contact directement avec le pathogène, ils libèrent leurs granules dans le milieu extracellulaire afin de créer un environnement hostile pour les pathogènes environnants. Cet effet est à double tranchant car il est aussi hostile pour l'hôte (notamment avec l'élastase) avec destruction du tissu de l'hôte et phénomène de liquéfaction. Néanmoins, ce système permet de contenir l'infection (Barton, 2008).

Les macrophages contribuent également à l'élimination des pathogènes par des mécanismes similaires aux neutrophiles : phagocytose des pathogènes et sécrétion de protéases, de peptides anti-microbiens, et d'espèces oxygénées réactives.

Malgré tous ces mécanismes mis en place, on peut avoir besoin de faire appel à une RI adaptative afin de lutter plus efficacement face aux infections.

- **Rôle de l'immunité adaptative**

La reconnaissance des motifs PAMPs par les macrophages et les cellules dendritiques, en plus d'augmenter leur faculté à sécréter des médiateurs pro-inflammatoires, leur permet d'augmenter leur capacité à présenter de manière efficace l'antigène au niveau des organes lymphoïdes et ainsi entrainer l'activation des lymphocytes T.

En réponse à une stimulation antigénique, les cellules T-CD4 naïves prolifèrent puis se différencient en cellules T effectrices (=cellules T helper) qui se distinguent non seulement par leur production de cytokines mais aussi par leurs fonctions, en cellules Th1 ou Th2.

Pour rappel rapide, les cellules Th1 activent les fonctions bactéricides des macrophages et peuvent détruire les cellules infectées. Elles jouent un rôle dans le contrôle des pathogènes intracellulaires. Les cellules Th2 quant à elles favorisent la commutation isotypique (= processus qui lors de la maturation d'un lymphocyte B permet de changer l'isotype, c'est à dire la classe des immunoglobulines produites), et la production d'immunoglobulines (IgG, IgE et IgA) qui sont importantes dans le contrôle de certains pathogènes extracellulaires.

A noter qu'il existe aussi un autre groupe de lymphocytes T CD4 effecteurs à savoir les lymphocytes Th17, et qui ont été montrés pour être impliqués dans de nombreux phénomènes inflammatoires tissulaires, et qui semblent être une sorte de relais entre SI inné et adaptatif.

II-1-3. Résolution de l'inflammation

Comme décrit précédemment, la non résolution d'une RI peut entrainer sa pérennisation sur le long terme avec destruction irréversible du tissu infecté de l'hôte. Plusieurs mécanismes existent et ont pour but l'arrêt de la RI et induire un retour à l'homéostasie.

Parmi ces mécanismes, nous pouvons citer :

- **Les médiateurs lipidiques** tels que les lipoxines (générés par les lipoxygénases à partir de l'acide arachidonique par les macrophages), les

protectines ou encore les résolvines. Elles permettent de stopper l'influx des neutrophiles, de faciliter la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et permettent le recrutement des monocytes afin d'éliminer les cellules apoptotiques et les débris cellulaires.

- **Le système nerveux,** en effet une stimulation du nerf vague atténue la RI engendrée par le LPS. Le SN parasympathique induit l'activation des macrophages *via* la libération d'acétylcholine. Cette action pourrait être liée à la diminution de production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1..) et de l'induction d'une cytokine anti-inflammatoire (IL-10).

- **Les lymphocytes T régulateurs** qui exercent une activité anti-inflammatoire principalement à travers la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β mais aussi par contact direct de cellule à cellule avec les lymphocytes T effecteurs et les cellules présentatrices d'antigènes permettant ainsi la résolution du processus inflammatoire.

- **L'immunité innée :** les TLR en plus de participer à l'initiation de la RI contrôlent leur propre expression, participant à la résolution de la RI. Bien que l'activation des TLR conduit au recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 (maillon de la translocation nucléaire de NF-κB), celui-ci va permettre la production d'une protéine anti-inflammatoire : la MyD88s qui empêche la signalisation induite par MyD88.

De plus, notons que l'élimination des agents infectieux, et donc de l'expression de leurs PAMPs diminue de surcroit l'activation des TLR, et la production/libération de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires réduisant par là-même le recrutement lymphocytaire (Nathan, 2002). Les neutrophiles rentrent ensuite en apoptose et sont ensuite phagocytés par les macrophages, s'ensuit un programme d'élimination cellulaire ainsi qu'une sécrétion par les macrophages de TGF-β favorisant l'arrêt de la RI.

II-1-4. La voie NF-κB, principale voie de signalisation intracellulaire dans l'inflammation

L'une des voies centrales dans la régulation des réponses immunes et inflammatoires est la voie du facteur NF-κB. Ce dernier appartient à la super-famille des facteurs de transcription, qui sont également impliqués dans le développement, la croissance cellulaire et l'apoptose.

Décrire la voie NF-κB ne peut se faire sans parler des TLRs, ces récepteurs ont la particularité par rapport aux autres PRR de pouvoir reconnaitre, mais surtout discriminer différentes classes de pathogènes. Et l'engagement des TLRs par les pathogènes entraine une RI innée, dont la cible de signalisation intracellulaire principale active le facteur de transcription NF-κB, qui est un régulateur clé des réponses immunitaires et inflammatoires et de certains processus apoptotiques (Zhang and Ghosh, 2001).

NF-κB a une expression ubiquitaire, et peut être activé par différents stimuli tels que des protéines bactériennes, des cytokines pro-inflammatoires, du stress chimique ou physique, des lymphocytes B et T. NF-κB représente un groupe de protéines relativement conservé au cours de l'évolution (Zhang and Ghosh, 2001, Oeckinghaus and Ghosh, 2009).

Après son activation , NF-κB va entrainer l'expression inductible de gènes qui vont coder pour des cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF-α, LT-α, LT-β = Lymphotoxin alpha ou béta et GM-CSF = Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), des molécules d'adhésion (ICAM, VCAM, molécule d'adhésion endothéliale leucocytaire), des protéines de la phase aigüe (SAA), des enzymes inductibles (iNOS= Oxide nitrique Synthetase inductible, COX-2), des peptides anti-microbiens (β-défensines) (Figure 14).

Les protéines NF-κB sont des activateurs transcriptionnels présents dans la cellule sous forme de dimères. Les membres de cette famille sont au nombre de cinq chez les mammifères : p50 (=NF-κB1), p52 (=NF-κB2), c-rel (=Rel), p65 (=relA) et relB. Ils forment des complexes actifs d'un point de vue transcriptionnel les uns avec les autres sous forme homomérique ou hétérodimérique.

Les complexes transactivateurs rencontrés le plus souvent sont les hétérodimères p50/p65 (qui correspondent à l'activité NF-κB décrite initialement) mais de nombreuses autres combinaisons existent.

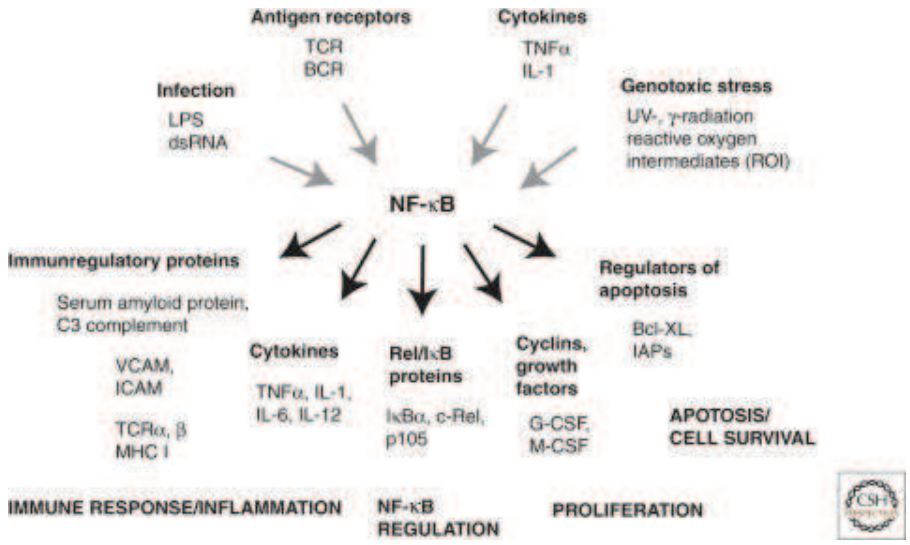

Figure 14 : *Les stimuli responsables de l'activation des voies NF-κB et les principaux gènes cibles identifiés (Oeckinghaus and Ghosh, 2009)*

En l'absence de signaux extracellulaires spécifiques, les dimères NF-κB sont retenus dans le cytoplasme sous une forme inactive par leur interaction avec les molécules de la famille IκB. Cette famille de protéines est constituée de cinq membres : IκBα, IκBβ, IκBε, et les précurseurs p105 et p100, qui ont donc une double fonction. À la suite de diverses stimulations (par des cytokines dont TNFα, IL-1, des protéines bactériennes ou virales, et divers signaux de stress), les molécules IκB sont phosphorylées par un complexe kinase composé de trois sous-unités : deux sous-unités catalytiques à activité sérine/thréonine kinase (IκB kinases, IKKα et IKKβ) et une sous-unité régulatrice, NEMO/IKKγ.

Ces phosphorylations entraînent l'ubiquitinylation des IκB puis leur dégradation par le protéasome 26S, ce qui a pour conséquence de permettre la libération du facteur NF-κB, puis d'être transloqué dans le noyau où il se fixe sur les promoteurs de gènes cibles, afin d'assurer son activité [pour revue, (May, 1998)].

Deux voies d'activation de NF-κB ont été caractérisées (Figure 15) : la voie dite « **canonique** » induite par les signaux classiques mentionnés ci-dessus. Cette voie implique NEMO et les kinases IKKα et IKKβ et aboutit à la dégradation complète des inhibiteurs IκB, libérant des complexes de type p50/p65 transloquant dans le noyau pour induire les gènes cibles.

La voie **alternative ou non canonique** induite par des molécules comme la lymphotoxine β, BAFF (B cell-activating factor belonging to the TNF family) et le ligand de CD40, est très active au cours du développement des organes lymphoïdes. Cette seconde voie implique les protéines kinases NIK (Nck interacting kinase) et IKKα et conduit à la dégradation partielle du précurseur p100, libérant ainsi des complexes de type p52/relB et p52/relA (Zhang and Ghosh, 2001, Oeckinghaus and Ghosh, 2009).

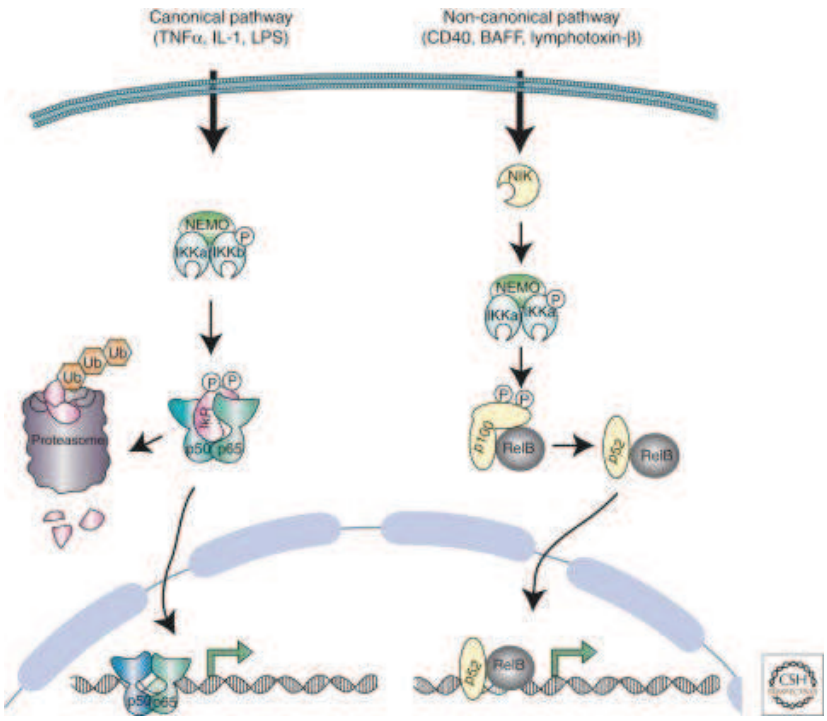

Figure 15 : *les voies NF-κB canonique et alternative d'après Oeckinghaus et al. (Oeckinghaus and Ghosh, 2009).*

Enfin, NF-κB joue également un rôle dans sa propre régulation par le contrôle des gènes IκBα, c-Rel et p105 (Oeckinghaus and Ghosh, 2009).

Plusieurs signaux de transduction conduisent à l'activation de NF-κB (Figure 16). Ces voies sont nombreuses et impliquent plusieurs récepteurs de surface dont notamment les TLRs, TNFR et les B-cell receptors (BCRs). La protéine kinase C (PKC) est un des facteurs de transduction du signal important qui participe à l'activation de la voie NF-κB en phosphorylant IKKβ.

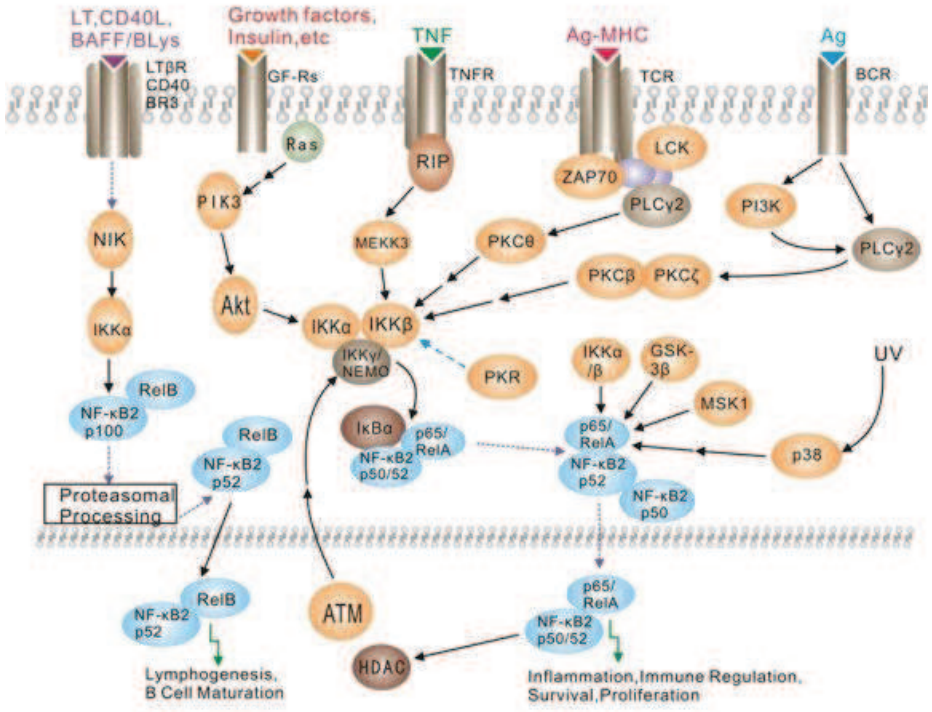

Figure 16 : *Voies de signalisation majeures conduisant à l'activation du facteur NF-κB. (http://www.signalwayantibody.com/)*

II-2 La réponse inflammatoire dans la MA

Tout d'abord il est important de distinguer la neuro-inflammation (inflammation touchant le SNC) de l'inflammation périphérique qui met en jeu ses propres acteurs cellulaires et mécanismes, et qui peut se faire aider de l'inflammation périphérique si besoin. Il est important de traiter de cette neuroinflammation car de nombreuses études ont mis en évidence un rôle déterminant de celle-ci dans la progression de la MA, surtout au niveau des régions les plus vulnérables du cerveau.

II-2.1 Acteurs cellulaires et moléculaires au niveau central

II-2.1.1 La microglie

Les cellules microgliales sont les cellules impliquées dans la surveillance immunitaire. Elles représentent la première ligne de défense de l'organisme au niveau du système nerveux central et un des deux types de populations cellulaires immunitaires d'origine myéloïde

retrouvées au niveau du SNC, qui sont activées lorsqu'elles sont dans un milieu où la neurodégénérescence se produit.

Ces cellules sont particulièrement sensibles à des changements dans leur environnement, et deviennent rapidement activées lors d'une infection, d'un traumatisme, d'un contexte pathologique ou d'une tumeur. Leurs phénotypes est en quelque sorte le reflet de leur environnement (il est « tissu-spécifique »), (Cameron and Landreth, 2010).

L'activation des cellules microgliales ne peut pas être considérée comme un évènement qui fonctionne comme « un tout, ou rien », elles sont connues pour répondre à divers stimuli et pour développer en réponse un certain nombre de profils d'activité, ceci dépendant du signal activateur et des récepteurs impliqués.

La cellule microgliale dans un « état activé » change d'un point de vue morphologique, c'est à dire qu'elle adopte une forme amoeboïde, tandis qu'à l'état « de surveillance » elle a la forme d'une cellule ramifiée, mais elle change aussi d'un point de vue phénotypique (avec un changement des marqueurs de surface exprimés) et fonctionnel (fonction de phagocytose, et production de cytokines), (Streit et al., 2009).

De plus, lorsqu'elles sont activées, elles se conduisent comme des cellules « éboueuses », elles produisent un large spectre de molécules indispensables à l'élimination de pathogènes envahissants ainsi que la clairance de facteurs toxiques [comme les dépôts de protéines « mal tronquées » d'Aβ dans la MA] et de débris cellulaires (Aguzzi et al., 2013).

Par ailleurs, que ces cellules soit dans un état « semi-actif » ou « actif » elles produisent des facteurs essentiels pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, la réparation et la régénération (à savoir des facteurs neurotrophiques, des facteurs de croissance et facteurs de survie).

Elles assurent trois grandes fonctions principales (Figure 17) :

- **Phagocytose :** les cellules microgliales sont capables de phagocyter les déchets issus de la réaction inflammatoire et de cellules mortes (surtout la mort neuronale dans la MA). Cette capacité s'exprime pleinement dans des contextes de neuroinflammation, cela se traduit par l'expression de récepteurs d'épuration de type SR-A et le récepteur au complément CR3 (Reichert and Rotshenker, 2003) L'internalisation de l'Aβ par la microglie est rendue possible par

l'intermédiaire des TLRs (2 et 4) et du co-récepteur CD14 (Cameron and Landreth, 2010).

- **Sécrétion de cytokines et autres facteurs :** ce qui permet la communication cellulaire (notamment entre les cellules du SI) mais aussi la régulation des réponses inflammatoires.

Lors d'une inflammation, elles sont une source importante de TNF-α, d'interleukines (en particulier d'IL-1β, IL-6 et cyclo-oxygénase 2 = COX-2), (Lynch, 2009).

- **Présentation de l'antigène :** les cellules microgliales font partie des cellules capables d'exprimer lorsque nécessaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité à leur surface (CMH de classe II), elle permettent le relais entre l'immunité innée et l'immunité adaptative en activant les lymphocytes T naïfs (Aloisi et al., 2000).

Ces cellules malgré toutes leurs fonctions indispensables et bénéfiques dans la surveillance et la défense immunitaire du SNC, jouissent d'une mauvaise réputation dans le cadre de la MA.

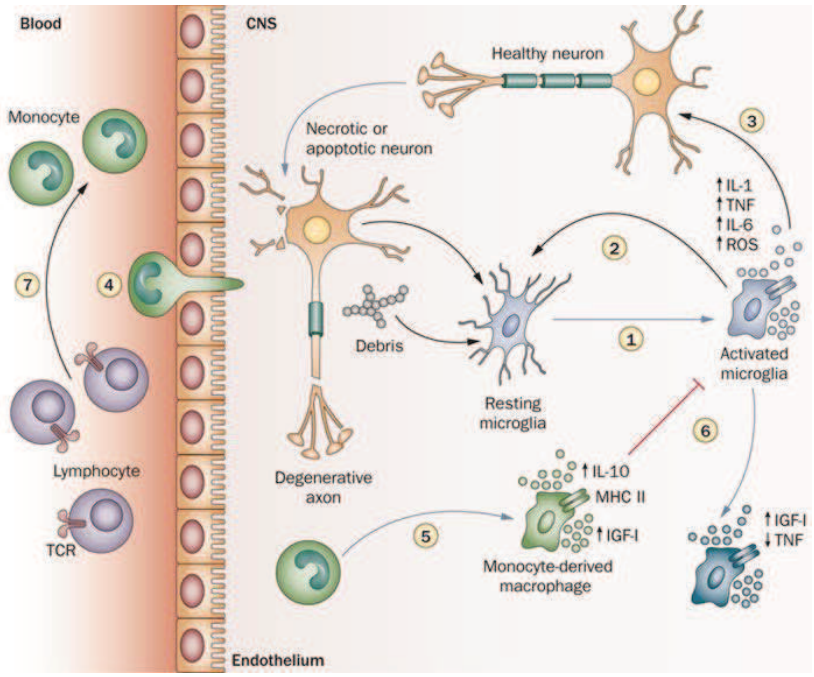

Figure 17 : *cellules immunitaires dans des conditions neuro-dégénératives (Schwartz and Shechter, 2010).*

Il faut rappeler que comme dans toute réponse inflammatoire, il faut une « résolution » de cette réponse pour ne pas qu'elle pérennise dans le temps, et devienne chronique et délétère pour l'organisme. Or il apparait que les cellules microgliales restent particulièrement activées dans le cadre de la MA et ne retournent pas à un état de repos. La microglie n'a pas seulement des fonctions neuroprotectrices, mais au contraire elle semble devenir dans certaines conditions une source de production de facteurs toxiques et devient par là-même une menace pour la survie tissulaire de l'hôte.

La microglie « sur-activée » dans le cadre de la MA, à travers une sur-production de cytokines pro-inflammatoires et de radicaux libres (espèces oxygénées réactives) et de protéines du complément, entraine à elle seule un cercle vicieux auto-suffisant et auto-amplifié de neurotoxicité (Schwartz and Shechter, 2010).

La microglie joue un rôle central dans la réponse cellulaire à des lésions pathologiques comme l'Aβ et les plaques neuritiques. En effet l'Aβ peut attirer et activer la microglie, entrainant la formation d'un « cluster » de cellules microgliales autour des dépôts d'Aβ dans le cerveau. De plus, la sécrétion d'espèces oxygénées réactives peut entrainer des dommages au niveau neuronal. Elles ont aussi la capacité de sécréter la chimiokine CCL2 (ou MCP-1) et CCL3 (MIP-1α) qui stimulent le passage des monocytes périphériques à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Lee et al., 2010b).

Pour conclure, il ne faut pas oublier non plus que nous sommes dans une pathologie du sujet âgé, et que la sénescence microgliale puisse s'ajouter et expliquer en partie un dysfonctionnement des cellules microgliales dans la MA (Malavolta et al., 2013).

II-2.1.2 Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SNC. On peut classiquement les classer en deux groupes en fonction de leur forme et de leur localisation (Figure 18) :

- **Les astrocytes fibreux** qui sont caractérisés par de longs prolongements cytoplasmiques (riches en gliofibrilles), en plus d'être lisses et peu ramifiés, avec une forme généralement radiaire ou « étoilée », on les retrouve surtout au niveau de la substance blanche.

- **Les astrocytes protoplasmiques** quant à eux sont retrouvés plutôt au niveau de la substance grise, et sont composés de prolongements assez courts, et ramifiés qui recouvrent la périphérie de fentes synaptiques.

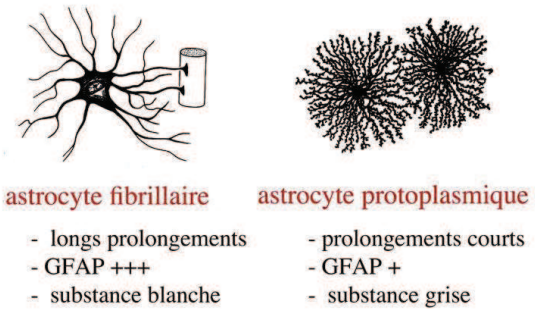

Figure 18 : *Représentation des deux principales catégories d'astrocytes retrouvés dans le SNC. (http://histoblog.viabloga.com)*

Les astrocytes jouent un rôle prépondérant dans la clairance du peptide Aβ et forme une barrière protectrice entre les dépôts amyloïdes et les neurones. Ils sont généralement considérés comme des cellules dynamiques qui sont activement impliquées dans les évènements inflammatoires et neurodégénératifs apparaissant dans la MA.

En effet le développement de plaques amyloïdes est associé avec une activation astrocytaire, ce qui peut vraisemblablement entrainer une RI caractérisée par la sécrétion de cytokines, de molécules neurotoxiques et l'activation de la cascade du système du complément.

Les astrocytes dans des conditions physiologiques ont plusieurs rôles importants, comme celui du maintien de l'homéostasie de l'environnement extracellulaire et la régulation du taux en neurotransmetteurs. Ils interviennent surtout dans la régulation du taux de glutamate par l'intermédiaire d'un transporteur (EAATs pour Excitatory Amino Acid Transporters, en particulier l'EAAT2), c'est un neurotransmetteur qui est connu pour être neurotoxique lorsqu'il est en trop forte quantité au niveau des fentes synaptiques. En outre, une perte de la protéine EAAT2 et un transport déficient en glutamate ont déjà été rapportés dans le cadre de la MA,

suggérant une fois de plus un rôle déterminant du glutamate dans la physiopathologie de la MA (Simpson et al., 2010).

Ils ont longtemps été perçu comme des cellules de soutien aux neurones (formant une sorte de « glue »), avant que l'on se rende compte des multiples fonctions qu'ils assurent, comme par exemple le support métabolique aux neurones (avec stockage du glucose) ou bien même le fait qu'ils soient capables de participer à part entière à la modulation de la transmission synaptique. Enfin, ils participent à la formation de la barrière hémato-encéphalique.

Une activation rapide des astrocytes apparait dans des conditions pathologiques, elle est associée à une augmentation de la synthèse d'un filament intermédiaire : la GFAP (pour Glial fibrillary acidic protein), ainsi qu'à une hypertrophie astrocytaire.

De manière similaire aux cellules microgliales, les astrocytes sécrètent une multitude de molécules pro-inflammatoires telles que des interleukines, des prostaglandines, des leucotriènes, des thromboxanes, des facteurs de coagulation, des facteurs du complément, des protéases et des inhibiteurs de protéases (Heneka et al., 2010, Lee et al., 2010b, Simpson et al., 2010).

II-2.1.3 Les neurones

Les neurones, unités fondamentales du tissu nerveux ont longtemps été considérés comme des acteurs passifs de l'inflammation cérébrale. Depuis le début des années 2000, des études montrent que les neurones sont capables de produire eux-mêmes certains médiateurs de l'inflammation. Les neurones semblent ainsi être une source de facteurs du complément, de la COX-2 et d'une large variété de cytokines telles que IL-1β, IL-6 et TNF-α (Griffin, 2006) conduisant à une exacerbation du processus inflammatoire et concourant à leur propre suicide.

II-2.1.4 Les cytokines et chimiokines

Les cytokines constituent un mode de communication entre les cellules. En effet, la réponse immunitaire résulte d'une interaction entre des lymphocytes T, des lymphocytes B et des cellules présentatrices d'antigènes(APC), avec en conséquence la prolifération lymphocytaire, la production d'anticorps, la différenciation de cellules

cytotoxiques, l'augmentation de l'activité des cellules phagocytaires et des cellules natural killer (NK) et l'accroissement de l'hématopoïèse. La communication entre ces différents types cellulaires est assurée à la fois par des contacts cellulaires et des facteurs solubles appelés cytokines.

Au-delà de leur rôle dans la réponse immunitaire, les cytokines sont, par définition, des protéines extracellulaires de communication entre les différentes cellules de l'organisme et aujourd'hui, le terme « cytokine » est utilisé comme un nom générique pour désigner un groupe varié de protéines et peptides, de poids moléculaire variable (6 à 50 kD), souvent glycosylés, qui agissent comme des médiateurs humoraux à des concentrations nano-, voire pico-molaires et qui, en condition soit normale, soit pathologique, modulent les activités fonctionnelles de cellules individuelles ou de tissus. La liste des cytokines dénombrées croit chaque année. À la différence des hormones, l'activité des cytokines est généralement locale, aussi bien autocrine que paracrine, ou s'effectue lors d'un simple contact membranaire (endocrine ou juxtacrine), créant ainsi un réseau de communication intercellulaire, avec des effets synergiques, antagonistes, pléiotropiques ou redondants.

Compte tenu de la découverte et de la caractérisation progressive des différentes cytokines tant sur le plan structurel que fonctionnel, leurs classifications varient selon :

- leur **fonction** (tumor necrosis factor [TNF]…) (classification fonctionnelle) ;
- leur **cellule productrice** (« monokine » [IL-1], « lymphokine » [IL-2]…) ;
- leur **cellule productrice et la cellule cible** (« interleukines » [IL-2, IL-6]) ;
- leur **séquence** ou leur **structure** (par exemple, IL-1α,β, ra : < 30 % d'acides aminés identiques mais ils ont la même structure 3-D) (classification structurale);
- la **séquence de leurs récepteurs** (classification selon les récepteurs) ;
- la **voie de signalisation activée** par leur récepteur (Janus kinase (Jak)/Stat, MAPK, smad, NF-κB…).

Les cytokines sont divisées en différents sous-groupes :

- **Les interleukines**

Les interleukines (IL-1 à IL-23), qui n'ont en commun que leur appellation, n'ayant ni parenté biochimique, ni spectre d'action unique, peuvent être impliquées

aussi bien dans la réponse immunitaire, que dans la stimulation de l'hématopoïèse ou dans les différentes étapes (initiation, amplification, contrôle) de l'inflammation.

- **Les interférons**

Les interférons (IFN) de type I (= α, ß) et de type II (= γ) regroupent des cytokines qui ont en commun leur activité antivirale.

- **Les colony-stimulating factors (CSF)**

Les colony-stimulating factors (CSF : G-CSF, M-CSF, GM-CSF, EPO…) sont des facteurs directement impliqués dans l'hématopoïèse et dans la modulation des fonctions des cellules matures auxquelles ils ont donné naissance.

- **La famille du tumor necrosis factor (TNF)**

La famille du (TNF regroupe de nombreuses molécules apparentées biochimiquement, sécrétées (TNF-α et -β ou Lymphotoxine-α, nerve growth factor) ou constituants membranaires (CD27L, CD30L, CD40L).

- **La famille du TGF**

La famille du TGF (TGF-ß, activine, inhibine, BMP…) et les nombreux facteurs de croissance (PDGF, FGF, EGF, TGF…) n'étaient pas considérés à l'origine comme des cytokines, car leur production est constitutive et leurs cibles ne sont pas des cellules hématopoïétiques ; leurs propriétés sont souvent si proches des cytokines qu'ils sont désormais considérés comme des cytokines à part entière.

- **Les cytokines**

Des cytokines qui n'appartiennent pas à des sous-groupes et qui conservent leur nom initial (par exemple, migration inhibitory factor [MIF], leukemia inhibitory factor [LIF], oncostatine M, endothéline, etc.).

- **Les chémokines**

Les chémokines (ou chimiokines), (CCL1-28, CXCL1-16…), peuvent être considérées comme un grand sous-groupe de cytokines (environ 50 chémokines identifiées) caractérisées par leur poids moléculaire entre 6 et 15 kD, la position des deux premiers résidus cystéine (entre 20 et 70 % d'homologie dans la séquence

d'acides aminés) et la reconnaissance de récepteurs possédant sept hélices transmembranaires couplés à une protéine G (R7G) (plus de 15 récepteurs caractérisés). En fonction du nombre d'acides aminés séparant les deux premiers des quatre résidus de cystéine conservés, les chémokines sont regroupées en quatre sous-familles : CC (résidus de cystéines adjacents), CXC, CX3C (résidus de cystéines séparés par un ou trois acides aminés quelconques) et XC (chémokines où manquent les première et troisième cystéines). A noter qu'une cellule peut produire diverses chémokines, que les récepteurs aux chémokines peuvent interagir avec diverses chémokines et qu'une chémokine peut avoir divers récepteurs, ce qui conduit à la redondance et à la complexité de cette famille chimiotactique.

Les effets des cytokines passent par l'interaction avec un récepteur spécifique et l'activation de signaux de transduction. Selon leur structure et leur ligand, il existe plusieurs types de récepteurs avec leurs voies de signalisation respectives (Figure 19) [pour revue (Baraut et al., 2012)] :

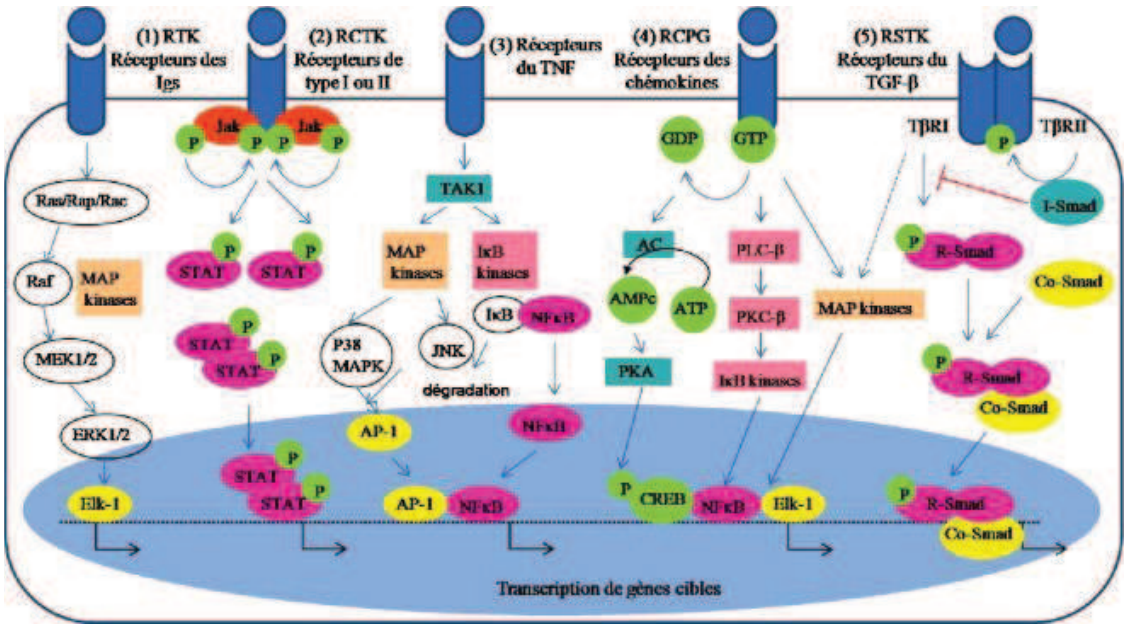

Figure 19: *Les voies de signalisation des différents groupes de récepteurs des cytokines et leurs principales cytokines associées [d'après Baraut (Baraut et al., 2012)]*

Au cours de la MA, diverses études se sont intéressées au rôle du chimiotactisme dans la MA, étant donné le potentiel de modulation de la réponse du système immunitaire et donc du contrôle de la neuroinflammation que cela peut apporter. Elles ont pu démontrer que plusieurs chimiokines et récepteurs aux chimiokines étaient surexprimés (Ruan et al., 2010), (Tableau 2). D'un point de vue histopathologique, il a été retrouvé une augmentation des taux de CCL2/MCP-1 autour des plaques séniles (Ishizuka et al., 1997) et des récepteurs CCR3 et CCR5 à la surface de la microglie réactive dont le ligand CCL5 est également surexprimé (Xia and Hyman, 1999). Un élément en faveur de l'implication des astrocytes dans la composante inflammatoire est l'augmentation d'expression de CCL4/MIP-1β dans les astrocytes réactifs autour des plaques amyloïdes (Xia et al., 1998) associée à une augmentation des taux de CXCL10 et de son récepteur CXCR3 (Xia et al., 2000).

Cette production des chimiokines joue un rôle important dans le recrutement des astrocytes et cellules microgliales autour des plaques amyloïdes. Ce qui explique pourquoi un certain nombre d'études *in vitro* ont cherché à identifier les profils d'expression de ces molécules sur des cultures exposées à l'Aβ, surtout quand on sait que ces deux types cellulaires sont connus pour être les acteurs principaux d'une neuroinflammation délétère, et exacerbée. Avoir une meilleure connaissance de tous ces mécanismes permettrait d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques. Ainsi, pour compléter les données histopathologiques, des cellules microgliales issues d'autopsie de patients atteints de MA et exposées à l'Aβ ont montré une augmentation des taux d'IL-8, CCL2/ MCP-1 et CCL3/MIP-1α (Lue et al., 2001).

Beaucoup d'informations sur le chimiotactisme dans la MA ont été apportées *via* des études réalisant des manipulations génétiques sur des gènes codant pour une chimiokine donnée, en la sur-exprimant dans un modèle de souris transgénique exprimant la MA ou encore en la supprimant et en observant les effets par la suite de manière indirecte sur la progression de la pathologie (impact sur la charge amyloïde ou le déclin cognitif) sur le plus ou moins long terme.

En effet, la surexpression de **CCL2** (encore appelée MCP-1 pour Monocyte chemotactic protein-1) a montré une accumulation accélérée (plus précoce) et accrue de dépôts amyloïdes avec une accumulation microgliale importante, s'accompagnant de déficits cognitifs de type altérations de l'apprentissage spatial dans un modèle murin APPswe après croisement avec une souris $CCL2^{+/+}$ (Yamamoto et al., 2005). CCL2 est une chimiokine exprimée principalement par les astrocytes activés, elle est responsable en partie de la

chimiotaxie des macrophages périphériques/cellules microgliales au niveau du cerveau (Kiyota et al., 2009b). On la retrouve en forte concentration autour des plaques séniles, présence qui semble être délétère du moins à un certain stade de la MA pour l'organisme.

A l'inverse, l'absence d'expression de **CCL2** (par l'intermédiaire d'un adénovirus associé hybride (AAV1/2) exprimant un gène CCL2 dominant négatif) dans un modèle de souris APP/PS1 réduit au contraire à la fois l'astrogliose et la microgliose, la production d'oligomères, de fibrilles et améliore l'apprentissage spatiale (Kiyota et al., 2009a).

Par ailleurs, l'absence d'expression des récepteurs **CCR2** augmente la production du peptide Aβ et les processus inflammatoires (El Khoury and Luster, 2008), ceci s'explique par l'absence totale d'activation de la microglie autour des plaques amyloïdes, et l'échec d'une clairance du peptide Aβ, ce qui montre la nécessité du balance entre CCL2 et CCR2, d'un bon équilibre entre les deux afin d'éviter tout effet délétère.

Concernant **CCL5** (anciennement « RANTES»), elle est une des deux chimiokines exprimée constitutivement par les neurones. Elle est considérée comme étant un médiateur cellulaire crucial entre les neurones et la microglie, cette dernière exprimant son récepteur : le CX3CR1. Elle semble aussi jouer un rôle dans la neuroprotection, et il a été suggéré qu'augmenter son signal pourrait protéger de la neurotoxicité microgliale dans des modèles de la maladie de Parkinson, ou dans un modèle transgénique de la sclérose latérale amyotrophique. Son expression est diminuée dans le cerveau de modèles murins développant la MA (Duan et al., 2008, Ruan et al., 2010).

Peu de choses sont connues concernant la chimiokine **CCL4** et la MA, mais il a été montré au sein du laboratoire une augmentation de son expression au niveau des astrocytes (données non publiées) et nous avons voulu voir dans notre modèle de BHE si on avait une influence d'un traitement Aβ sur son expression.

CXCL10 (ou encore « IP-10 ») est exprimé dans un cerveau « normal » par une sous-population astrocytaire, et semble être augmenté chez les patients atteints de la MA, et retrouvé surtout autour des plaques amyloïdes. Cette chimiokine a un rôle dans l'apoptose neuronale et pourrait intervenir dans la mort neuronale retrouvée dans la MA (Ruan et al., 2010).

Enfin, il a été montré que l'absence d'expression du CX3CR1 (son ligand est le **CXC3CL1** ou la « Fractalkine ») dans un modèle triple transgénique murin de la MA (3xTg : APP/PS1/tauP301L) préviendrait la mort neuronale, en plus de provoquer une diminution de l'activation microgliale et par là, une diminution des dépôts amyloïdes (Fuhrmann et al., 2010, Lee et al., 2010a).

Etant donné que les chimiokines peuvent se lier à plusieurs récepteurs, et que ces derniers possèdent plusieurs ligands, des études ultérieures sont nécessaires pour mieux définir les cocktails chimioattractants bénéfiques ou délétères dans la MA. A titre d'exemple, la chimiokine CCL5 (RANTES) se lie au moins aux récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5, tandis que le seul récepteur CCR3 se lie aux chimiokines CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL24 et CCL26 (Ruan et al., 2010).

Receptors	Expression in AD	Ref	Chemoattractants	Expression in AD	Ref
FPRL1	Elevated in microglia	(11)	Abeta	amyloid deposits	
CCR1	Present in neurons and dystrophic neuritis associated with amyloid plaques	(63)	CCL3/MIP-1alpha	Elevated in brain microvessels and peripheral T lymphocytes	(48, 49)
			CCL5/RANTES	Elevated in brain microvessels	(52)
CCR2	Elevated in PBMC[1]	(64)	CCL2/MCP-1	Elevated in senile plaques, neurons, astrocytes, microglia, microvessels, serum and csf[2]	(29-31, 34, 35)
CCr3	Elevated in microglia associated with Abeta deposits	(47)	CCL3/MIP-1alpha	Elevated in brain microvessels and peripheral T lymphocytes	(48, 49)
			CCL4/MIP-1beta	Present in a subpopulations of reactive astrocytes spread in ad brain	(47)
			CCL5/RANTES	Elevated in brain microvessels	(52)
CCR5	Elevated in some microglia associated with amyloid plaques; elevated in PBMC[1]	(47, 64)	CCL3/MIP-1alpha	Elevated in brain microvessels and peripheral T lymphocytes	(48, 49)
			CCL4/MIP-1beta	Present in a subpopulations of reactive astrocytes spread in ad brain	(47)
			CCL5/RANTES	Elevated in brain microvessels	(52)
CCR10			CCL27/ILC	Elevated in ad brain	(62)
CXCR2	Elevated in a subpopulation of neuritic plaques and peripheral t lymphocytes	(78, 80)	CXCL1/GROalpha	Elevated in ad brain	(70)
			CXCL8/IL-8	Elevated in neurons, brain microvessels and csf[2]	(30, 34, 59)
CXCR3	Expressed by neurons	(81, 82)	CXCL10/IP-10	Elevated in astrocyte associated with amyloid plaques; increased in csf[2] of mild ad but decreased with the progression of ad	(34, 81, 84)
CXCR4	Elevated in AD brain	(62)	CXCL12/SDF-1	Decreased in plasma	(94)
CX3CR1	Expressed by neurons and microglia	(96, 97)	CX3CL1/ fractalkine	Decreased in brain of young app transgenic mice;elevated in the plasma which negatively correlated with the severity of cognitive impairment	(100)

Abbreviations: [1]peripheral blood mononuclear cell, [2]cerebrospinal fluid

Tableau 2 : *Tableau récapitulatif des différentes chimiokines et récepteurs associés ayant un rôle dans la MA (Ruan et al., 2010).*

Durant la MA, la production de cytokines par les astrocytes et la microglie (et dans une moindre mesure par les neurones) se retrouve fortement augmentée autour des plaques séniles (Heneka and O'Banion, 2007). Elles vont moduler l'intensité et la durée de la réponse immune (Tuppo and Arias, 2005). Quatre cytokines pro-inflammatoires sont produites de

façon importante dans le SNC de patients atteints de MA, à savoir le TNFα, l'IL-1β, l'IL-6 et le TGFβ (Wyss-Coray, 2006, Rojo et al., 2008).

De même, le système du complément se retrouve sur-activé dans la MA. En effet, les composants C1 à C9 et leurs ARNm sont surexprimés dans les cerveaux des patients atteints de MA (Yasojima et al., 1999) et en particulier autour des plaques séniles (Terai et al., 1997). Il a été également montré dans le cortex entorhinal et l'hippocampe, une augmentation de 80 fois de l'ARNm de C1q (Yasojima et al., 1999). Sachant que C1q est capable d'induire la production massive d'EORs dans les neurones en culture, il devient probable que le système du complément participe de manière active aux dommages neuronaux observés dans la MA (Luo et al., 2003).

Une étude a également montré que C1q pouvait interagir directement avec l'Aβ42 (Tacnet-Delorme et al., 2001) et que le complexe C1q-Aβ42 stimulait la phagocytose par les macrophages. Il semblerait donc que le système du complément, et en particulier C1q, soit un modulateur important de l'inflammation induite par l'Aβ, la formation des plaques séniles et la phagocytose de l'Aβ.

II-2.1.5 Les cyclooxygénases

Les cyclooxygénases (COX) sont des enzymes bien connues en pharmacologie, notamment pour être la cible des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). En effet elles sont responsables du clivage de **l'acide arachidonique** (= acide gras retrouvé au niveau des membranes cellulaires) **en prostaglandines** (PG) qui jouent un rôle crucial dans l'inflammation, et en **thromboxane** (rôle dans l'homéostasie) (Garavito and DeWitt, 1999).

A ce jour, nous connaissons 3 isoformes de cyclooxygénases : COX-1, COX-2 et COX-3 (Hyde and Missailidis, 2009). Les COX diffèrent par leur profil d'expression et leur localisation dans les cellules humaines.

En effet, alors que COX-1 est retrouvée de manière ubiquitaire et produite constitutivement par la majorité des cellules et des tissus pour maintenir un niveau basal de prostaglandines et réguler les mécanismes homéostatiques comme par exemple la production de mucus protecteur par les prostaglandines au niveau de l'épithélium gastrique, et de thromboxane dans les plaquettes sanguines, effets qui expliquent certains effets indésirables des AINS, qui en bloquant cette enzyme, entrainent une augmentation de l'acidité gastrique

(par baisse de production du mucus) avec un risque d'entrainer un ulcère gastrique duodénal, et une fluidification sanguine (ils sont utilisés parfois comme antiagrégants plaquettaires).

Tandis que COX-2 étant une forme inductible, elle reste absente dans des conditions physiologiques normales (sauf au niveau rénal). Son induction est stimulée par une grande variété de stimuli associés à la réponse inflammatoire tels que les cytokines, les facteurs de croissance ou les promoteurs de tumeurs (Morita, 2002, Patrignani et al., 2005).

Quant à la cyclooxygénase la plus récemment décrite, COX-3, dont le gène est commun à COX-1, elle aurait une activité enzymatique potentiellement moins importante mais serait impliquée également dans la production de prostaglandines, et participerait ainsi à la régulation de la douleur et de la fièvre (Chandrasekharan et al., 2002).

II-2.1.6 Les radicaux libres

Les radicaux libres dont les espèces oxygénées réactives (EORs) sont aussi impliqués dans la régulation du processus inflammatoire (Kehrer, 1993).

Ces EORs sont des molécules dérivant de molécules oxygénées possédant un électron non-apparié, leur conférant une très grande réactivité, notamment une activité bactéricide prononcée. Parmi les principaux EORs, nous pouvons citer : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$, ou le monoxyde d'azote NO. La principale source d'EORs est obtenue par la chaine respiratoire mitochondriale, mais en conditions physiologiques leurs taux sont maintenus à des niveaux non toxiques.

Cependant dans certaines conditions on peut avoir apparition d'un stress oxydatif, qui résulte d'une rupture de l'équilibre entre la capacité du système biologique chargé de d'éliminer les intermédiaires réactifs et de réparer les dommages cellulaires et la production d'EORs.

Ce déséquilibre conduisant à une production d'EORs trop importante est observé dans certaines pathologies inflammatoires comme la sclérose latérale amyotrophique et dans d'autres maladies neurodégénératives dont la MA (Lee et al., 2010b).

II-2.2 Les acteurs périphériques de l'inflammation

La présence de cellules du système immunitaire périphérique au niveau du parenchyme cérébral (des lymphocytes T) a été montré pour la première fois en 1988 par Rogers (Luber-Narod and Rogers, 1988), remettant ainsi en cause le dogme comme quoi le

SNC était épargné d'un point de vue immunologique. C'est la première fois que l'on a pu se rendre compte que des cellules du SI périphérique pouvaient passer la barrière hémato-encéphalique dans certaines conditions (Luber-Narod and Rogers, 1988, Togo et al., 2002).

Ce phénomène a pu être redémontré plusieurs fois dans des modèles d'irradiation à forte dose de la moelle osseuse (=MO) chez la souris, avec transplantation dans la foulée de cellules de MO d'une souris transgénique exprimant la GFP (=Green Fluorescent protein), avec passage de ces cellules à travers la BHE (Simard and Rivest, 2004, Simard et al., 2006). Toutefois ce modèle a reçu plusieurs critiques, car l'irradiation à elle seule pouvait entrainer une rupture de la BHE et expliquer le passage de cellules périphériques.

D'autres études ont par la suite montré que des cellules myéloïdes périphériques seraient même plus efficaces pour phagocyter les dépôts d'Aβ que les cellules résidentes et en particulier la microglie (Fisher et al., 2010, Rezai-Zadeh et al., 2011), d'où l'intérêt de mieux connaitre les mécanismes sous-jacents au chimiotactisme des cellules du SI périphérique, ceci afin de promouvoir leur passage à travers la BHE de manière régulée, et d'éliminer au mieux les plaques amyloïdes, tâche que la microglie sénescente n'arrive plus à accomplir correctement (Malavolta et al., 2013).

II-3 Traitements à visée anti-inflammatoire testés dans la MA

II-3.1 Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Les AINS constituent une classe thérapeutique très répandue et largement utilisée à travers le monde. Il existe deux classes d'AINS : à savoir les AINS non sélectifs et les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 (les coxibs). Les inhibiteurs non sélectifs incluent l'aspirine, l'ibuprofène, le naproxène, le piroxicam, l'indométacine et le sulindac.

Ils possèdent une activité anti-inflammatoire, antalgique, et antipyrétique.
L'action commune des AINS est d'inhiber l'une des deux enzymes COX-1 et/ou COX-2, responsables de la dégradation de l'acide arachidonique; il s'ensuit une diminution de la synthèse des PG.

Plusieurs études épidémiologiques avaient suggérées que l'usage sur le long terme d'AINS pouvait protéger contre l'apparition et le développement d'une MA. Et ces effets protecteurs étaient fortement dépendants de la durée du traitement et du génotype ApoE de l'individu.

Une méta-analyse avait montré que des sujets ayant pris des AINS pendant au moins 2 ans et plus avaient un risque diminué de développer une MA comparé à ceux qui en avaient pris pendant moins de 2 ans. Cet effet de la durée du traitement pourrait impliquer le fait que l'utilisation chronique d'AINS serait bénéfique à des stades pro-dromaux ou à des niveaux très précoces de la MA.

Malgré cela, l'ensemble des études cliniques avec des AINS (aussi bien non sélectifs que les inhibiteurs sélectifs de COX-2) effectuées sur le long terme chez des patients atteints de la MA (légère à modérée) durant ces dernières années ont montré des résultats décevants.

Des études testant le rofecoxib, le naproxène ou le diclofénac n'ont pas permis de ralentir la progression du déclin cognitif chez des patients atteints de forme légère à modérée de la MA, il en est de même avec le célécoxib, le dapsone, l'hydroxychloroquine et le nimésulide.

En revanche, l'indométacine pourrait retarder le déclin cognitif chez les patients mais des effets indésirables notamment gastro-intestinaux limitent sérieusement son usage (Tabet and Feldman, 2002).

Une autre étude de prévention primaire (ADAPT) par l'usage de naproxène, célécoxib *versus* placebo a été initiée chez des sujets sains d'un point de vue cognitif mais ayant des antécédents familiaux de premier degré de démence. Malheureusement cette étude a été suspendue de manière prématurée à cause d'événements indésirables cardiaques et cérébro-vasculaires, et ce après une période de traitement moyenne de 2 ans (Breitner et al., 2011).

Il faut quand même signaler qu'une étude se déroulant sur le long terme (4 ans) a montré de manière surprenante que des sujets préalablement exposés au naproxène étaient protégés par l'apparition d'une MA de 67% par rapport au placébo (Breitner et al., 2009).

Toutes ces études cliniques semblent montrer que l'effet protecteur des AINS ne semble pas passer *via* les voies COX-1 et COX-2 (Lee et al., 2010b).

Malgré cela, les AINS ne sont pas à l'heure actuelle considérés comme étant une option thérapeutique à envisager sérieusement pour les patients atteints de la MA, à cause de leur mauvaise tolérance, et leur absence d'effet significatif (Tayeb et al., 2012), la balance bénéfices/risques leur est défavorable.

II-3.2 Les glucocorticoïdes

D'autres études utilisant des anti-inflammatoires stéroïdiens cette fois-ci ont également été réalisées. La majorité de ces études a montré des effets décevants des glucocorticoïdes sur l'évolution de la MA.

Ainsi, un traitement à la prednisolone pendant 16 semaines n'a montré aucun effet comparé à un groupe recevant un placebo (Aisen, 2000). En revanche, des personnes non démentes traitées par corticothérapie à la prednisolone pour différentes pathologies ont vu leur taux d'Aβ significativement diminué au niveau du liquide cérébrospinal (Tokuda et al., 2002).

De plus, de fortes doses de corticostéroïdes (dexamethasone) diminuent le taux des cytokines inflammatoires sur des cultures cellulaires intoxiquées par de l'Aβ (Previti et al., 2006).

Bien qu'il a été montré qu'une administration intrathécale de corticoïdes a entrainé une diminution des taux de facteurs inflammatoires, ainsi qu'un ralentissement de l'évolution de la MA (Alisky, 2008). Les bénéfices modérés d'une corticothérapie restent malheureusement fortement controversés de part le mode d'administration invasif (injection intrathécale) et leurs effets secondaires bien connus (ostéoporose, fonte musculaire, diabète et hypertension, etc...) dus à un traitement au long court. La corticothérapie ne semble donc pas être un traitement de premier choix dans la MA.

II-3.3 Les anti-TNFα

Une autre cible thérapeutique à explorer concerne un autre facteur inflammatoire : le TNFα, qui semble jouer un rôle central dans la neuroinflammation observée dans la MA, ce qui en fait une cible de choix.

La principale molécule ciblant le TNFα est l'etanercept, une protéine de fusion se liant au ligand empêchant ainsi sa fixation sur son récepteur. L'etanercept est un anti-TNFα utilisé principalement dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde ainsi que dans d'autres pathologies inflammatoires.

Une étude pilote a montré que l'administration intraspinale d'etanercept provoque une amélioration rapide et significative de l'apprentissage, de la mémorisation et du comportement (Tobinick et al., 2006, Tobinick and Gross, 2008). Ces résultats encourageants demandent à être confirmés par une étude à plus grande échelle et à plus long terme, bien que le mode d'administration invasif ne soit pas le plus approprié chez des personnes âgées.

II-3.4 Les anti-NF-κB

Des études montrent que l'expression de NF-κB est augmentée dans le cerveau de patients atteints de MA autour des plaques neuritiques et de manière précoce (Kaltschmidt et al., 1997).

Récemment, une étude pré-clinique a été réalisée sur des souris APPswePS1dE9 recevant une injection quotidienne par voie intrapéritonéale d'un inhibiteur du NF-κB, le pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). Les résultats ont montré que l'inhibition de NF-κB par le PDTC induisait une suppression de l'induction des précurseurs de la COX-2 et du TNFα, améliorait l'astrogliose mais pas la charge amyloïde, avec notamment une augmentation des taux d'Aβ42 (Zhang et al., 2009). Ces résultats suggèrent que la neuroinflammation médiée par le facteur NF-κB pourrait être impliquée dans la clairance de l'Aβ.

Très récemment, une étude a testé l'effet du Celastrol, un inhibiteur naturel du facteur NF-κB (extrait de la plante Tripterygium wilfordii), sur un modèle murin transgénique APPswe/PS1. Les résultats spectaculaires montrent une diminution de l'ordre de 50% (traitement aiguë) et 60% (traitement chronique) des taux d'Aβ40 et 42 chez les souris traitées par le Celastrol (Paris et al., 2010). Cet inhibiteur agirait de manière indirecte en réduisant le taux d'expression de BACE1 et donc en diminuant le clivage de l'APP (diminution des APP-CTFβ et sAPPβ). Il aurait été intéressant de vérifier l'effet sur les facteurs inflammatoires, la gliose et les capacités mnésiques.

Ces études ciblant NF-κB présentent des résultats différents sur la charge amyloïde, mais confirment l'importance de ce facteur de transcription dans la physiopathologie de la MA, que ce soit dans la neuroinflammation ou dans la production de l'Aβ. Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires afin de vérifier les répercussions d'une modulation de la voie NF-κB, car les gènes contrôlés par ce facteur de transcription sont très nombreux et comportent notamment des facteurs impliqués dans la clairance de l'Aβ dont les métalloprotéinases-1, -3 et –9 (Bond et al., 2001).

II-3.5 Les anti-PPARs

Sachant que la voie COX-1/COX-2 ne semble pas celle être impliquée dans la neuroprotection *via* les AINS, il est utile de s'intéresser à leur propriété activatrice des

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (=PPARγs), ce qui concerne surtout les molécules : indométacine, naproxène et l'ibuprofène (Lee et al., 2010b).

Les PPARs sont des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires (notamment activés par des hormones) et à la famille des facteurs de transcription, dont l'activité est régulée par des métabolites stéroïdiens et lipidiques. Ils sont impliqués dans le contrôle de la différenciation des adipocytes, le stockage des lipides, l'homéostasie du glucose dans les tissus adipeux, le cerveau, le placenta et la peau.

Les récepteurs PPARγ sont faiblement exprimés de manière constitutive dans des conditions physiologiques. En revanche, une étude récente a montré des taux d'ARNm élevés chez les patients MA, suggérant leurs implications dans la physiopathologie de la MA. Un rôle dans le contrôle de la réponse inflammatoire a également été proposé puisque l'activation de ces récepteurs induit dans les cellules microgliales une inhibition de la production de cytokines, de l'expression de iNOS (isoforme inductible de la NO synthase), de la production de NO, cela vient de la capacité des PPARs d'inhiber les gènes pro-inflammatoires à travers le blocage du facteur de transcription NFκB. Il a été aussi montré que les agonistes des récepteurs PPARs seraient capables d'inhiber l'activation microgliale engendrée par les dépôts amyloïdes, prévenant alors la mort neuronale au niveau de l'hippocampe et du cortex (Kummer and Heneka, 2008). Devant ces effets bénéfiques, plusieurs études pré/et –cliniques ont été envisagées.

Parmi ces études, la rosiglitazone (agoniste PPARγs), une molécule connue pour être utilisée comme anti-diabétique, et possédant des propriétés anti-inflammatoires, a été testé et a montré un effet modeste sur les capacités cognitives des sujets ne portant pas l'allèle ApoE 4, et aucun effet voire un déclin chez les porteurs de l'allèle ApoE 4. Cette absence de réponse significative peut aussi être expliquée par le fait que la rosiglitazone ne passe pas la barrière hématoencéphalique. La différence de réponses liée à la présence ou l'absence d'ApoE 4 n'est pas encore élucidée (Risner et al., 2006).

Le traitement par le pioglitazone (agoniste PPARγs) a montré, dans une étude pilote, des effets bénéfiques sur les capacités cognitives et fonctionnelles, ainsi qu'une stabilisation de la maladie chez des patients diabétiques et atteints de MA (Sato et al., 2011).

Ces résultats confirment l'implication des PPARs dans la physiopathologie de la MA, agissant à la fois sur la neuroinflammation mais aussi en stimulant la clairance amyloïde, ce qui renforce l'intérêt d'une stratégie thérapeutique utilisant les agonistes des PPARs.

III. La barrière hématoencéphalique (BHE)

III-1 Structure et fonctions de la BHE

La BHE est une barrière de diffusion essentielle au bon fonctionnement du SNC. Elle possède deux fonctions principales : protection du cerveau contre les composés toxiques circulant au niveau sanguin, et préservation de l'homéostasie du SNC.

La BHE diffère des autres barrières endothéliales par l'absence de « fenestration », la présence de jonctions serrées plus extensives et un transport vésiculaire plus « clairsemé ».

Les jonctions serrées (composées par des protéines telles que la claudine, l'occludine et les molécules de jonction d'adhésion) des cellules endothéliales limitent le flux para-cellulaire de molécules hydrophiles à travers la BHE. Au contraire, des petites substances lipophiles telles que l'O_2 et le CO_2 diffusent librement au travers des membranes plasmiques suivant leur gradient de concentration.

Les nutriments ainsi que le glucose (le principal substrat énergétique du cerveau) et les acides aminés entrent au niveau du cerveau *via* des transporteurs, tandis que l'endocytose dépendante de récepteurs permet le passage de plus grosses molécules comme l'insuline, la leptine.

En plus des cellules endothéliales, la BHE est composée par la membrane basale de capillaires, de pieds astrocytaires entourant les vaisseaux sanguins, et de péricytes entre les cellules endothéliales (Figure 20). Les péricytes sont des cellules musculaires lisses enchâssées dans la membrane basale, elles sont indispensables au bon fonctionnement, au développement ainsi qu'à l'intégrité de la BHE, et elles participent à la régulation du flux sanguin cérébral (de par leurs propriétés contractiles), ainsi qu'à la perméabilité de la BHE. Elles représentent une source de cellules pluripotentes (Bonkowski et al., 2011).

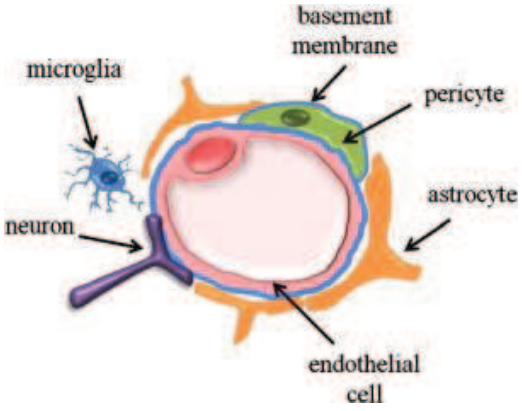

Figure 20 : *schéma de l'unité neurovasculaire composée par les cellules endothéliales, la membrane basale, les astrocytes, la microglie, les neurones et les péricytes (Cardoso et al., 2010).*

III-2 Les différents modèles de BHE

Des modèles de BHE sont largement été utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour tester la perméabilité des capillaires cérébraux et étudier la pénétration de molécules au niveau cérébral. La majorité des modèles utilisés en recherche fondamentale sur la BHE ou visant à étudier la pénétration de molécules au niveau du SNC est constituée par des cultures cellulaires.

Beaucoup de modèles de BHE sont constitués par une monocouche de cellules endothéliales immortalisées (les cellules endothéliales primaires entrainant un coût non négligeable, elles demandent aussi plus de temps et sont plus difficiles techniquement à cultiver). Plus récemment, d'autres sont fabriqués sur un modèle de co-culture, avec la cohabitation de cellules endothéliales et de cellules astrocytaires, et parfois de péricytes. Il a été montré à plusieurs reprises que la présence de cellules astrocytaires, et de péricytes en plus des cellules endothéliales augmentent de manière significative la résistance des modèles de BHE, ainsi que son intégrité. Cet effet a été retrouvé de manière optimale avec les co-cultures de cellules endothéliales et d'astrocytes (Hatherell et al., 2011).

Un des gros problèmes actuels qui se pose est que beaucoup de ces modèles sont obtenus à partir de cellules animales (en particulier des cellules endothéliales bovines et de rat) et non pas humaines, et qu'ils sont pour la plupart incomplets car ils ne présentent pas la majorité des acteurs cellulaires de la BHE (Toth et al., 2011).

Il existe principalement deux méthodes (non exhaustives) pour évaluer l'intégrité et la fonctionnalité d'un modèle de BHE en recherche fondamentale à ce jour, à savoir la mesure de la résistance électrique trans-membranaire (TEER) (qui évalue donc la résistance de la

BHE, chez l'homme la TEER au niveau des capillaires cérébraux excède les 1000Ω.cm²) ainsi que le passage d'un composé fluorescent (comme par exemple la fluorescéine) à travers la BHE, testant ainsi sa perméabilité. Un « bon » modèle de BHE doit répondre à ces différents critères, et s'approcher au maximum de la configuration anatomique retrouvée *in vivo*. [pour revue : Veszelka et al., 2011].

III-3 La BHE et la maladie d'Alzheimer

Il est maintenant bien connu que la BHE se retrouve altérée non seulement avec l'âge, mais encore plus dans le cas de maladies neurodégénératives, notamment dans la MA.

Plusieurs facteurs vont participer activement à l'altération de la BHE, parmi lesquels ; le stress oxydant, les facteurs vasculaires, enfin et surtout les facteurs inflammatoires (Popescu et al., 2009), entrainant un changement dans le mode de transport de l'Aβ par deux mécanismes : une augmentation de son entrée par le transporteur « receptor for advanced glycation end products » (RAGE) dont l'expression est augmentée, (Deane et al., 2003) et une diminution de son élimination par les low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 1 (LRP1) dont l'expression est au contraire diminuée dans la MA (Deane et al., 2005), entrainant pour conséquence son accumulation dans le SNC.

Cette altération de la clairance de l'Aβ par dysfonctionnement de la BHE a fait naitre « la théorie vasculaire » de la MA. C'est à la fois l'implication de facteurs de risques vasculaires (comme l'hypertension, le diabète, l'obésité) mais aussi/ou un dommage vasculaire initial médié par un trouble cérébro-vasculaire (ischémie, AVC) qui entraine une diminution de la perfusion cérébrale, et un dysfonctionnement de la BHE, ce qui se traduit par une hypoxie cérébrale et une accumulation de nombreuses neurotoxines dans le cerveau. On se retrouve donc dans une situation où l'on a à la fois une augmentation de la production d'Aβ (par un mauvais clivage de l'APP), et une diminution de sa clairance au niveau cérébral (la BHE étant défaillante), l'Aβ se retrouve donc à une concentration élevée (avec production d'oligomères toxiques), entrainant un dysfonctionnement neuronal et une aggravation du dysfonctionnement de la BHE chez les patients, permettant une amyloïdose exacerbée, libre de se propager au niveau cérébral.

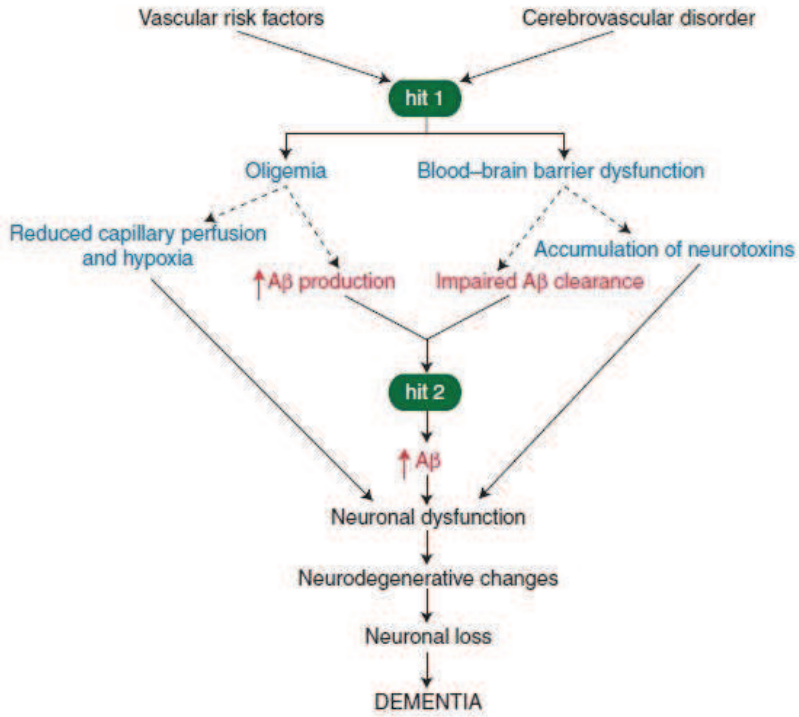

Figure 21 : *schéma récapitulatif de la théorie vasculaire dans la MA (Sagare et al., 2012)*

On observe au niveau de la BHE dans le cas de la MA un changement dans l'expression de plusieurs transporteurs spécifiques permettant le passage de nutriments, de pompes ioniques, de transporteurs ABC, et des récepteurs stimulant le passage de peptides et de protéines, y compris les échanges cerveau->sang et sang->cerveau d'Aβ.

On peut citer parmi ceux-ci plus particulièrement le transporteur GLUT-1 qui permet le passage spécifique de glucose (qui est la principale source d'énergie du cerveau). Son expression dans le cas de la MA est diminuée, entrainant une diminution de l'apport de glucose au niveau cérébral (pour revue [(Sagare et al., 2012)]).

Il existe aussi une communication importante des signaux inflammatoires entres les tissus périphériques et le SNC à travers la BHE *via* un transport actif de cytokines, entrainant non seulement une réponse impliquant le nerf vague ce qui permettrait la mise en place d'un relais d'informations périphériques comme l'hyperalgésie ou la fièvre. Les cytokines peuvent aller directement activer des cellules cibles du SNC (dont la microglie) dans des zones ou les cellules endothéliales ne présentent pas de jonctions serrées (les organes circumventriculaires). Mais elles pourraient aussi stimuler la production de cytokines par la BHE qui pourra les libérer au niveau du parenchyme cérébral. Enfin ces cytokines peuvent

aussi être transportées *via* des leucocytes qui eux même vont infiltrer la BHE (Quan and Herkenham, 2002).

Ces mécanismes d'échanges et de communication entre périphérie et SNC participent activement au recrutement périphérique des cellules immunitaires. En effet, le passage des chimiokines ou de leurs signaux à travers la BHE va permettre par chimiotactisme de recruter notamment les phagocytes responsables de l'élimination de l'Aβ, ou encore la migration de lymphocytes T4 (Hickman and El Khoury, 2010). Cependant, il reste beaucoup d'inconnus moléculaires et cellulaires sur la communication entre le SNC et la périphérie dans le contexte dégénératif Alzheimer. Ainsi, il est intéressant d'explorer cette communication plus en profondeur, de manière à isoler une signature chimiotactique qui permettrait un passage régulé de cellules du SI périphérique de manière à ce qu'elles viennent apporter un soutien aux cellules microgliales résidentes, en phagocytant les plaques amyloïdes plus efficacement.

ETUDE EXPERIMENTALE

I- Objectifs

Etant données les interactions cellulaires et moléculaires entre les PBMCs et des cellules du SNC, au niveau de la BHE, il nous a paru intéressant d'étudier durant mon stage de 6 mois de Master 2 Recherche le profil d'expression des chimiokines entre la périphérie et le SNC dans un modèle intégré, incluant la majorité des acteurs cellulaires (astrocytes, microglie, neurones, cellules endothéliales, cellules immunitaires périphériques). Pour répondre à cet objectif principal, nous avons mis au point dans un premier temps un modèle de BHE humaine en utilisant la lignée de cellules endothéliales développée par Weksler et al. (Weksler et al., 2005). Dans un second temps, nous avons étudié l'expression de cinq facteurs chimiotactiques décrits dans la MA : CCL2 (ou MCP-1), CCL5 (ou Rantes), CXCL10 (ou IP-10), CX3CL1 (ou fractalkine) et CCL4 (MIP-1β). L'analyse a été réalisée dans le modèle BHE exposé ou non à la toxicité du peptide β-amyloïde (Aβ42) au niveau de la lignée H4, neurogliome humain pour mimer le parenchyme cérébral.

II- Matériels et méthodes

II-1 Réactifs

Tous les produits chimiques entrant dans la composition des tampons proviennent de chez Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France) ainsi que l'histopaque®-1077, le new born calf serum, le peptide Aβ-42, la phytohémagglutinine (PHA), le paraformaldéhyde (PFA), le diméthylsulfoxide HybriMax® stérile (DMSO), le fluorure de sodium (NaF), le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), le triton X-100, les cocktails d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases, l'acide ascorbique, le human basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), l'hydrocortisone et le dextran-Fluorescein-isothiocyanate (FD4) et le bleu de trypan.

Les milieux de culture RPMI 1640, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), le sérum de veau fœtal (FBS), la solution de pénicilline (5000 unités)/streptomycine (5000 µg) (PS), la L-Glutamine (200 mM), le concentré lipidique (« Chemically Defined Lipid Concentrate), la solution de trypsine-EDTA (0,05%), le Quant-it protein assay, la colle ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI proviennent de chez FisherScientific (Illkirch, France). Le milieu « Endothelial Basal Medium-2 » (EBM-2) provient de chez Lonza (Amboise, France), et le collagène de type I « Cultrex® Rat Collagen I lower viscosity » de

chez R&D Systems (Lille, France). La solution d'HEPES 1M et le sérum « Fetal Bovine Serum "Gold" » pour le milieu EBM-2 proviennent de chez PAA Laboratories / GE Healthcare Europe GmbH (Velizy-Villacoublay, France) et l'albumine « Bovine Serum Albumine IgG free (BSA) » de chez Jackson ImmunoResearch (Distributeur Beckman-Coulter, Villepinte/Roissy CDG, France).

Les kits pour le dosage des chimiokines X-MAP® proviennent de chez Millipore (Molsheim, France).

II-2 Culture cellulaire

Deux lignées cellulaires humaines sont utilisées : une lignée cellulaire H4 obtenue à partir d'un neurogliome humain (ATCC® HTB-148™, Manassas en Virginie, USA) ainsi qu'une lignée de cellules endothéliales humaines : les cellules hCMEC/D3 provenant de l'équipe du Dr P-O Couraud (Institut Cochin à Paris, France ; agrément « Material Transfer Agreement », US Patent Inserm n°60/631230).

Ces cellules H4 sont cultivées dans des flasks T-75 dans 15 mL de milieu de culture contenant : du milieu DMEM, 10% de FBS et 1% PS. Pour les cellules hCMEC/D3, le milieu contient : du milieu EBM-2, 5% FBS « Gold », 1% PS, 1,4 µM d'hydrocortisone, 5 $\mu g.mL^{-1}$ d'acide ascorbique, 1% de concentré lipidique, 10 mM d'HEPES et 1 $ng.mL^{-1}$ de bFGF. Les boîtes de culture sont placées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO_2. Concernant la culture des cellules hCMEC/D3, les flasks T-75 sont préalablement coatés avec du collagène de type I à 150$\mu g.mL^{-1}$ pendant 1h à 37°C.

Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont lavées deux fois avec 5 mL de PBS 1X stérile (Phosphate Buffer Saline, NaCl 154 mM, KH_2PO_4, 1,543 mM, $Na_2HPO_4,7H_20$ 2,7 mM, pH 7.2) puis dissociées dans 4 mL de trypsine EDTA 1X pendant 5 minutes. Un volume de 5 mL de milieu de culture est ensuite ajouté afin de stopper l'action de la trypsine et les cellules sont alors centrifugées pendant 10 minutes à 1500 tours par minute, à température ambiante. Par la suite, un comptage cellulaire est réalisé en utilisant une cellule de Malassez et du bleu de trypan, les cellules sont réensemencées à une densité de 150 000 cellules H4/ T-75 et 500 000 cellules hCMEC/D3/ T-75 (volume final 15 mL). Ces deux lignées ont été utilisées pour le modèle de BHE humaine et pour l'immunofluorescence.

II-3 Extraction des PBMCs

L'étude porte sur un total de 16 patients, dans le cadre d'un PHRC dirigé par le professeur Marc Paccalin (Centre Mémoire de Ressources et de Recherche, étude CYTOCOGMA 2009-2013). Après information et consentement éclairé, les patients atteints de la MA étaient inclus. Le diagnostic de MA était porté selon les critères NINCDS-ADRDA. Le MMSE (Mini Mental State Examination) à l'inclusion devait être compris entre 10 et 26 : ≤10 stade sévère, [11-19] stade modéré, ≥20 (stade léger). Le MMSE est un test neuropsychologique universel permettant de tester rapidement les fonctions cognitives. Il ne s'agit pas d'un test diagnostique, mais en revanche il précise le stade de la maladie.

Les prélèvements sanguins des patients sont effectués à J5 par rapport au montage initial de la BHE décrit ci-dessous. Ces prélèvements sont faits dans des tubes héparinés puis sont directement transportés au laboratoire dans un délai inférieur à une heure pour réaliser l'extraction des PBMCs. Le sang est dilué au demi avec du PBS 1X stérile dans un Falcon de 50 mL, puis mélangé par retournement, et ensuite déposé en surface avec précaution sur un gradient de Ficoll (1/3 d'histopaque®-1077 pour 2/3 de sang dilué). Après une centrifugation à 2500 rpm à 4°C pendant 20 min, les PBMCs sont prélevées au niveau d'un anneau blanchâtre contenant les cellules mononuclées, situé en dessous du surnageant constitué par le plasma et le PBS. Les PBMCs sont récupérées d'abord dans 2 mL de PBS, complétés à 30 mL de PBS pour laver et éliminer l'histopaque®-1077. Le tube Falcon est ensuite centrifugé à 1500 tours par minute à 4°C pendant 5 min. Le surnageant est ensuite éliminé par aspiration, puis le culot est remis en suspension avec 1 mL de PBS, complétés à 20 mL de PBS pour laver, puis il est à nouveau centrifugé à 1500 rpm pendant 5min. Cette étape de lavage est renouvelée deux fois. Après la dernière centrifugation, le culot est remis en suspension dans 1 mL de milieu de culture (RPMI 1640/PS 1% /sérum veau fœtal (cal serum) 10%/ PHA 20µg/mL). Ensuite les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de KOVA en diluant au 1/10ème la suspension cellulaire dans du bleu acétique (Bleu de méthylène 50 mg, Acide acétique glacial 2 mL QSP 100 mL d'eau distillée). Enfin les PBMCs sont ensemencées à la densité de 500 000 cellules/500µL pendant 24h avant d'être transférées dans les inserts au contact des cellules hCMEC/D3.

II-4 Mise en place du modèle de BHE humaine

Le montage de la BHE commence par l'ensemencement des cellules H4 au fond des boites 12 puits (Transwell Permeable Supports de chez Corning) à la densité de 10 000 cellules/puits dans 1mL de milieu H4 complet ainsi qu'au niveau de la face externe de l'insert (3200 cellules/5 mL de milieu). Pour l'ensemencement sur la face externe de l'insert, l'insert est déposé sur un Falcon de 15 mL contenant 5 mL de la suspension cellulaire H4 puis l'ensemble est retourné dans un pot stérile pendant 24h dans un incubateur, comme le montre la figure 21 ci-dessous :

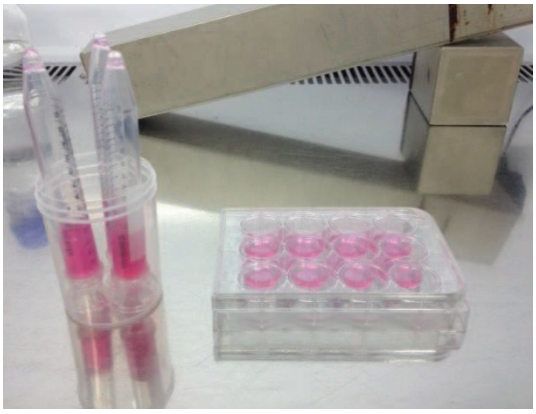

Figure 21 : *disposition des inserts pour l'ensemencement des cellules H4 pendant 24h sur la face externe de l'insert*

Le lendemain **J0**, les inserts sont remis dans les puits de la boîte 12 puits ensemencés la veille avec des cellules H4. Les cellules hCMEC/D3 sont à leur tour ensemencées à raison de 45 000 cellules/puits dans 500 µL de milieu complet comme préconisé par les auteurs (Weksler et al., 2005). Les milieux sont changés à **J1**, puis tous les deux/trois jours.

A **J4**, l'Aβ1-42 est agrégé pendant 48h à 37°C après reconstitution dans de l'eau distillée stérile selon les recommandations du fournisseur. A J6, la solution d'Aβ1-42 agrégé est diluée à 20µM final dans le milieu H4 sans sérum et déposé sur le tapis de cellules H4. A **J5** nous obtenons les prélèvements sanguins des patients atteints de la MA à partir desquels sont extraits les PBMCs selon la méthode décrite précédemment, puis ces PBMCs sont incubés pendant 24h en présence de PHA dans leur milieu de culture. A **J6**, nous récupérons les PBMCs des patients, après une centrifugation à 1500 rpm pendant 5 min et on les remet en suspension dans 500 µL de milieu de culture des cellules hCMEC/D3 puis on les dépose dans

l'insert au contact des cellules endothéliales. Le modèle BHE est incubé pendant 48h avant la récupération des milieux et des lysats cellulaires à **J8**.

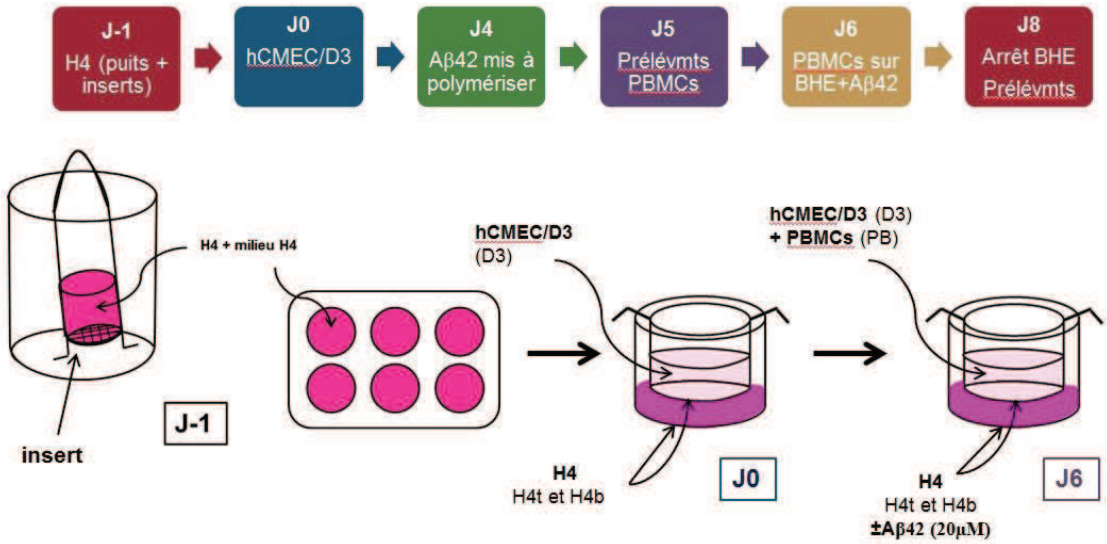

Figure 22 : *schéma chronologique du montage de la BHE*

II-5 Récupération des milieux et lyse cellulaire

A J8, les milieux de culture hCMEC/D3 (=M1, et qui contiennent les PBMCs) ainsi que les milieux de culture H4 (=M2) sont isolés dans des cônes et stockés rapidement à -80°C. Le culot des PBMCs est repris avec 80 µL de tampon de lyse préparé extemporanément (Tris-HCL 50 mM, NaCl 50mM pH 6,8 complété avec du Triton X-100 à 1%, du NaF à 50 mM, du PMSF à 1mM ainsi que 10µL/mL de cocktails d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases).

Les cellules H4 sous l'insert et les cellules hCMEC/D3 sont récupérées à l'aide d'un tips contenant 80µL de tampon de lyse. Tous les lysats cellulaires sont stockés dans la glace.

Les lysats cellulaires y compris ceux des PBMCs sont ensuite passés aux ultrasons (Branson Sonifier 450, duty cycle : 20, output control : 2 ; pendant 10 secondes) puis centrifugés à 15000*g* pendant 15 min à 4°C. Les surnageants sont prélevés et un aliquot est utilisé pour le dosage des protéines par la technique Quant-it protein. Les échantillons sont ensuite stockés à -80°C.

Cette étude aura aussi pour but d'analyser ultérieurement l'expression de facteurs chimiotactiques par RT-qPCR. Pour chaque patient, nous avions donc 4 BHE dont deux étaient réservées à l'extraction de l'ARN total en utilisant le kit « SV Total RNA Isolation »

(Proméga, Charbonnieres, France). Selon les recommandations du fournisseur, 175 µL du tampon RNAse lysis buffer étaient utilisés pour chaque type cellulaire et les échantillons ont été stockés rapidement à -80°C. L'analyse transcriptionnelle prévue au départ dans mon projet de master 2R n'a pas été réalisée pour des raisons financières.

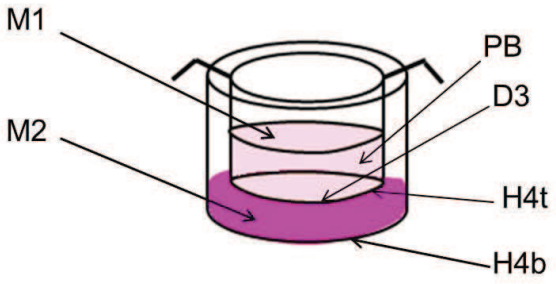

Figure 23 : *schéma des différents prélèvements effectués à partir du modèle de BHE.*

II-6 Dosage des protéines

Pour chaque échantillon cellulaire, un dosage des protéines est réalisé en utilisant la technique Quant-it Protéin selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons sont dilués au 1/200ème et la lecture de l'intensité de fluorescence est obtenue grâce à l'appareil Qubit®. Les résultats sont directement affichés en µg/mL par rapport à une gamme.

II-7 Test de perméabilité de la BHE

Le but de ce test est d'évaluer l'étanchéité de notre modèle *in vitro* de BHE. Nous avons testé trois conditions : un puits coaté au collagène de type I comme contrôle (car pas de cellules), un puits BHE en présence d'Aβ42, et un puits BHE sans l'Aβ42. Une solution contenant 50 mg de Dextran-FITC 4D dans 1,5 mL de HBSS (KCl 0.4g/L ; KH_2PO_4 0.06g/L ; NaCl 8g/L ; $NaHCO_3$ 0.35g/L ; Na_2HPO_4 0.048g/L, D-Glucose 1g/L ; $CaCl_2$ 0.14g/L ; $MgCl_2$, $6H_2O$ 0.1 g/L ; $MgSO_4$, $7H_2O$ 0.1g/L) est préparée et 500 µL sont déposés dans chaque insert. Une cinétique permet de suivre le passage du dextran-FITC 4D en faisant des prélèvements de 50 µL au niveau de l'insert puis dans le fond des puits aux temps 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1h, 2h puis 3h. Ces prélèvements sont déposés sur une plaque de 96 puits Nunc® noire à fond transparent pour la mesure de l'intensité de fluorescence en fixant λEx à 485 nm et λEm à 515 nm (Varioskan Flash®, Fisher ThermoScientific).

II-8 Immunofluorescence

Les suspensions cellulaires sont ensemencées puis incubées à 37°C pendant 48 heures, à la densité de 100 000 cellules/puits dans des boîtes 6 puits, dans lesquelles ont été préalablement déposés 3 coverslips (14 mm, Menzel Gläser) par puits. Au temps souhaité, le milieu de culture est aspiré puis les cellules sont fixées avec 1,5 mL/puits de PFA à 4% pendant 15 minutes à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés 2 fois 5 min avec 1 mL/puits de PBS stérile. Ensuite, 1mL de PBS/Triton 0.3%/BSA 5% sont, ajoutés pendant 1h à température ambiante pour assurer le blocage et la perméabilisation. 30µL de l'anticorps (Ac) primaire dilué dans son tampon de dilution (PBS/Triton 0.3%/BSA 1%) sont déposés sur un parafilm étiré sur le couvercle d'une grande boîte de pétrie et le coverslip est incubé dans cette goutte d'AcI (Tableau 3) à 4°C en chambre froide pendant une nuit.

Le lendemain, les coverslips sont déposés dans des boîtes 6 puits pour effectuer deux lavages au PBS sous agitation orbitale pendant 5 min (1mL/puits de PBS). Puis, ils sont à nouveau incubés pendant 1h dans 30µL d'AcII (dilué dans du PBS/Triton 0.3%/BSA 1%) déposés sur du parafilm comme pour l'AcI dans une chambre humide à température ambiante et à l'abri de la lumière (Tableau 3). Puis on effectue deux lavages de 5 min au PBS, puis deux lavages à l'eau UHQ sous agitation orbitale. Enfin le montage se termine en utilisant la colle ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (qui permet le marquage des noyaux). Les lames sont incubées 24h à l'abri de la lumière, avant d'être observées et stockées à 4°C. L'observation est réalisée en utilisant un microscope à épifluorescence (Caméra DP-70, Olympus BX51). Les images sont fusionnées en utilisant le logiciel Adobe Photoshop CS3.

Tableau 3 : liste des anticorps I et II utilisés

	Cible	Fournisseur	Référence	Nature	Origine	Couplage	dilution
Anticorps primaires	**GFAP**	Thermofisher	PA1-10004	Polyclonal IgY	Poulet	-	1/100
	NSE	Abcam	Ab53025	Polyclonal IgG	Lapin	-	1/50
	Iba1	Abcam	Ab5076-100	Polyclonal IgG	Chèvre	-	1/50
	Facteur de von-Willebrand	Millipore	AB7356	Polyclonal	Lapin	-	1/50
Anticorps secondaires	**Anti-IgG de poulet**	Abcam	AB6873	Polyclonal IgY	Chèvre	FITC	1/50
	Anti-IgG de lapin	Dakocytomation	R0156	Polyclonal IgG	Cochon	TRITC	1/20
	Anti-IgG de lapin	Jackson IR	711-545-152	IgG	Âne	Alexa fluor 488	1/50
	Anti-IgG de chèvre	Jackson IR	705-096-147	IgG	Âne	FITC	1/50

II-9 La technique X-MAP®Luminex®

Le dosage des chimiokines CCL2, CCL4, CCL5, CXCL10, CX3CL1 est réalisé par la technique du X-MAP® Luminex® qui correspond à un ELISA en multiplex. Le dosage est réalisé sur une plaque de 96 puits. En premier lieu, les puits sont d'abord remplis par 200 µL de tampon de lavage et la plaque est agitée pendant 10 minutes à 450 rpm (Titrimax, Fisher, France.) Le tampon de lavage est ensuite enlevé par retournement de la plaque sur du papier absorbant.

Une gamme étalon est préparée (standards compris entre 3,2 et 50 000 pg/mL) en diluant le standard dans un tampon de dosage fourni dans le kit en suivant les recommandations du fournisseur (Millipore, France). Un volume final de 25 µL de chaque standard est déposé sur la plaque. Pour le point 0 de la gamme étalon, on utilise 25 µL de tampon « assay buffer ». Les contrôles (QC1 et QC2) ainsi que les échantillons sont déposés à leur tour sur la plaque suivant un plan de plaque préalablement défini. Le milieu de culture de chaque type cellulaire ainsi que le tampon de lyse sont déposés pour évaluer l'autofluorescence de ces milieux. Chaque échantillon est déposé en duplicate. Après avoir

déposé tous nos échantillons, 25µL d'assay buffer est ajouté dans tous les puits. Enfin, la solution contenant les billes magnétiques couplées aux Acs de capture est préparée à partir de chaque solution contenant les billes anti-chimiokines commandées et livrées dans le kit. Le mix préparé est déposé à raison de 25µL dans chaque puits. Après ces étapes, la plaque est alors recouverte d'un film protecteur, puis elle est incubée sous agitation à 750 rpm à 4°C durant toute la nuit à l'abri de la lumière.

Le lendemain, après avoir déposé la plaque sur son support magnétique (ce qui permet aux billes, donc aux couples anticorps-chimiokines de se fixer autour des puits), on enlève le volume dans chaque puits. Tous les puits sont alors lavés deux fois avec 200 µL de tampon de lavage. Une agitation de 2min à 450 rpm est effectuée entre chaque lavage. Ensuite, 25µL d'Acs de détection biotinylés sont déposés dans chaque puits, puis et la plaque est incubée une heure à température ambiante sous agitation à 750 rpm, à l'abri de la lumière. Enfin, 25µL de streptavidine-phycoérythrine sont ajoutés dans chaque puits, et une incubation de 30 min sous agitation à température ambiante, toujours en l'absence de lumière est respectée. La plaque est ensuite lavée deux fois avec 200 µL de tampon de lavage puis on ajoute 150 µL de liquide de gaine dans chaque puits, avant de remettre en suspension les billes magnétiques avec une agitation à 450 rpm pendant 5 minutes (à TA) et de porter la plaque au lecteur.

La plaque est placée dans l'appareil Luminex-200®, et on utilise le logiciel Luminex xPONENT®. Pour chaque dosage, l'appareil doit lire au moins 50 billes en 60 secondes, et ainsi l'intensité de fluorescence moyenne est affichée (Median fluorescence intensity = MFI). Ces valeurs sont par la suite converties en pg/mL par le logiciel qui applique l'équation de la courbe (sigmoïde 5 paramètres log) de chaque gamme étalon pour chaque chimiokine étudiée. La sensibilité des chimiokines CCL2, CCL4, CCL5, CXCL10, CX3CL1 est de 1,9 ; 0,7 ; 1,2 ; 8,6 ; 22,7 pg/mL, respectivement. Pour les milieux de culture, les résultats sont donnés en pg/mL et pour les lysats cellulaires en pg/mg protéines.

II-10 Analyse statistique

Les résultats sont analysés avec le logiciel GraphPad Prism® en appliquant un test non paramétrique pour échantillons appariés entre deux groupes, soit le Wilcoxon pour échantillons appariés. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

III- Résultats

III-1 Caractérisation des lignées cellulaires par immunofluorescence

Concernant la lignée hCMEC/D3, nous avons étudié l'expression du facteur de Von Willebrand (vWF) comme marqueur des cellules endothéliales ainsi que l'expression de l'actine 2 alpha appelée « alpha smooth muscle actin » (αSMA) et présente dans les péricytes au niveau de la BHE afin de tester la pureté de cette lignée. Sur la figure 24 ci-dessous, le facteur vWF exprimé dans le cytoplasme des cellules hCMEC/D3 permet de voir que ces cellules peuvent prendre soit une forme assez effilée typique des cellules endothéliales mais aussi un aspect plus étalé mettant en évidence un large corps cellulaire et quelques pseudopodes. Le marquage de la lignée avec l'anticorps anti- αSMA a permis de montrer que la lignée hCMEC/D3 ne contient pas de péricytes souvent présents au contraire dans les cultures primaires.

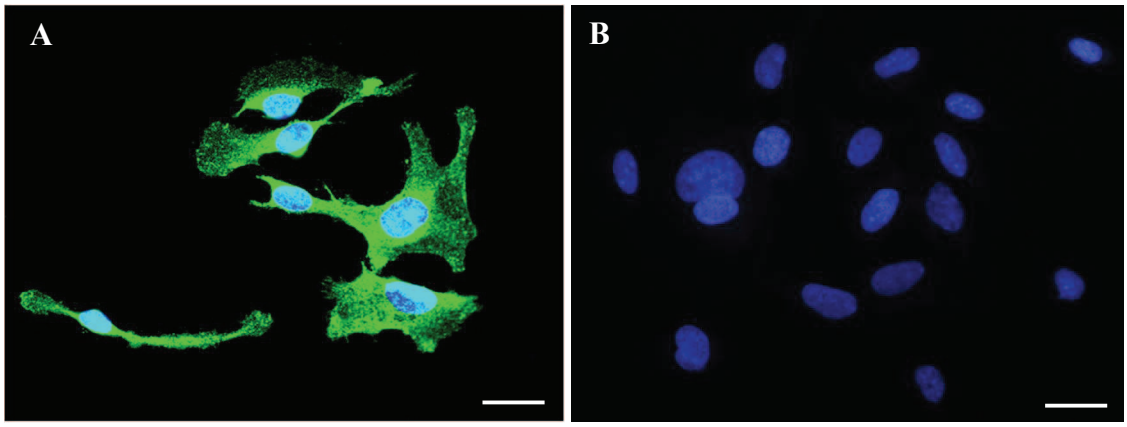

Figure 24 : *Immunofluorescence des facteurs vWF (image A) et αSMA (image B) dans les cellules de la lignée hCMEC/D3. Après fixation par du PFA à 4%, les cellules sont incubées avec les anticorps I toute la nuit en chambre humide à 4°C. Le lendemain, les cellules sont lavées et incubées avec les anticorps II correspondants couplés au FITC. Les coverslips sont ensuite fixés sur une lame de verre avec la colle contenant le marqueur nucléaire DAPI (en bleu sur les images). La barre d'échelle représente 1,37 µm.*

Il était aussi important pour nous de caractériser les différents types cellulaires composant la lignée H4 (issue d'un neurogliome humain) car ces informations étaient absentes dans la littérature. Pour cela, nous avons incubé les cellules H4 avec différents anticorps I dirigés contre des marqueurs spécifiques d'un type cellulaire dont la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein / marqueur astrocytaire), l'IBA1 (Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1 / marqueur de la microglie activée), et NSE (Neuron Specific Enolase / marqueur

neuronal). Les co-marquages n'ont pas été réalisés à cause des espèces communes pour les anticorps I ou les réactions croisées observées avec certains anticorps II. Sur la figure 25, nous présentons donc ici les marquages séparés de la GFAP (image A), l'IBA1 (image B) et NSE (image C).

Alors que GFAP et NSE sont exprimés dans le cytoplasme avec une couronne périnucléaire très nette, le marqueur IBA1 reste localisé en cluster au niveau membranaire, dessinant un pourtour ponctué assez typique. Il faut noter aussi la taille cellulaire quasi deux fois plus petite pour les cellules positives pour NSE que celle des cellules exprimant la GFAP ou IBA1. Ces cellules de type neuronal formaient aussi des clones très distincts les uns des autres alors que les cellules de type astrocytaire ou microglial restaient isolées ou en petits groupes.

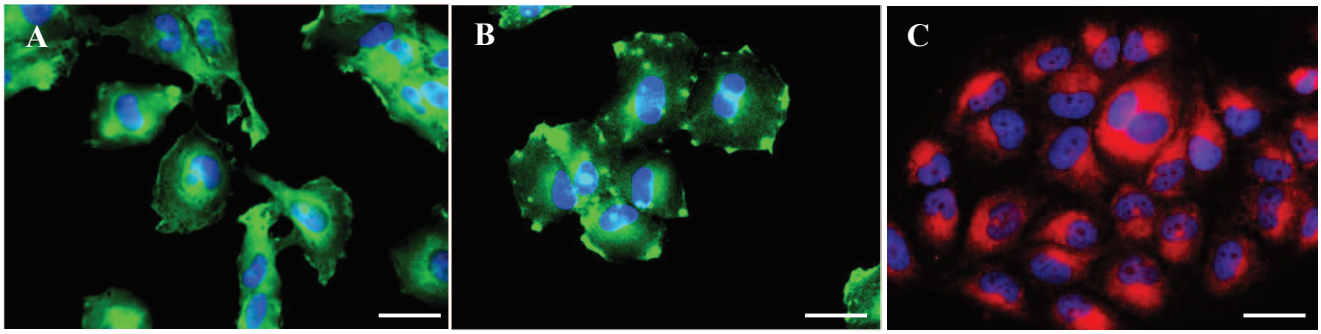

Figure 25 : *Immunofluorescence des marqueurs GFAP (image A), IBA1 (image B) et NSE (image C) dans les cellules de la lignée H4. Après fixation par du PFA à 4%, les cellules sont incubées avec les anticorps I toute la nuit en chambre humide à 4°C. Le lendemain, les cellules sont lavées et incubées avec les anticorps II correspondants couplés au FITC (images A et B) ou au TRITC (image C). Les coverslips sont ensuite fixés sur une lame de verre avec la colle contenant le marqueur nucléaire DAPI (en bleu sur les images). La barre d'échelle représente 10 µm pour les images A et B et 5 µm pour l'image C.*

III-2 Test de perméabilité du modèle de BHE

Nous avons effectué trois types d'expériences afin d'évaluer l'étanchéité du modèle de BHE. **La première expérience** avait pour but d'évaluer le temps nécessaire au passage du dextran FITC 4D à travers un insert seulement coaté. Sur la figure 26A, nous observons que le maximum est passé après 2h. Nous avons donc retenu ce temps maximal pour étudier le passage du dextran FITC 4D à travers le modèle de BHE.

La seconde expérience nous a permis de déterminer la densité cellulaire des H4 à ensemencer sous l'insert afin d'avoir une barrière la plus étanche possible. La densité cellulaire de la lignée hCMEC/D3 (45 000 cellules/insert à J0) était conforme à celle déjà

publiée (Weksler et al., 2005). Comme le montre le graphe 4A, la densité cellulaire des H4 à 3200 cellules sous l'insert à J-1 (densité D2 sur le graphe) permet de limiter le passage du dextran FITC 4D puisqu'après 2h, 7,12% de dextran FITC 4D était retrouvé dans le milieu HBSS au fond du puits alors que la densité D1 deux fois plus faible laissait passer 26,54% de dextran FITC 4D. Nous avons retenu cette densité D2 pour la suite de nos expériences.

La troisième expérience devait d'abord nous aider à confirmer la première expérience concernant la perméabilité de notre BHE, mais aussi de tester l'éventuel effet d'un traitement Aβ42 (20µM) des cellules H4 sur l'étanchéité du modèle BHE. Les résultats ne montrent pas de différence sur le passage du dextran FITC 4D à 2h entre les puits traités ou non par l'Aβ42 pendant 48h (27,24% et 29.01% avec et sans Aβ42, respectivement). Toutefois, le pourcentage de fluorescence enregistrée à 2h au fond du puits à J9 (29,01%) est plus élevé qu'à J7 (7,12%). Le traitement entre J7 et J9 se fait dans un milieu sans sérum avec ou sans Aβ42, ce qui peut expliquer cette augmentation (Figure 26B).

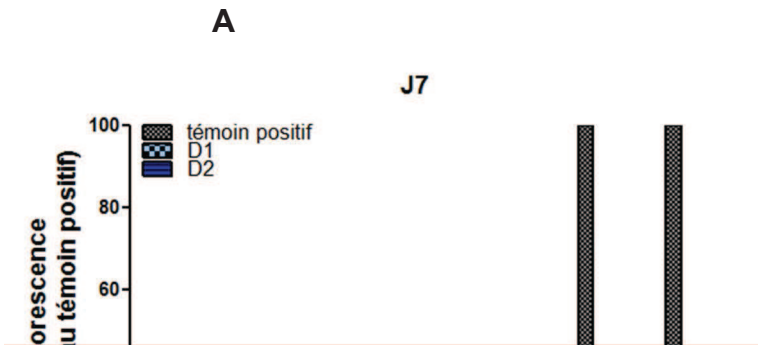

Figure 26 : *Test de perméabilité du modèle BHE. Un volume de 500 µL d'une solution de dextran-FITC 4D (50 mg / 1,5 mL HBSS) est déposée au-dessus de l'insert. Une cinétique de prélèvements sur 2 heures a permis de suivre le passage du dextran FITC 4D. Les résultats sont représentés sur le graphe A à J7 (D1 : 1600 et D2 : 3200 cellules H4/insert à J0) et le graphe B à J9, jours correspondants respectivement au début du traitement de la lignée H4 par Aβ42 (20µM) ou son véhicule H_2O et 48h après dans un milieu sans sérum. Un insert seulement coaté avec le collagène I est utilisé comme témoin positif pour évaluer le 100% de passage de la molécule fluorescente. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin positif. La lecture de l'intensité de fluorescence a été réalisée grâce à un lecteur de plaques en fixant λEx à 485 nm et λEm à 515 nm (Varioskan, ThermoFisher).*