



**HAL**  
open science

# Rôle des lymphocytes T CD4+ et des lymphocytes T régulateurs dans l'immunothérapie et la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer : études chez la souris

Cécile Toly Ndour

► **To cite this version:**

Cécile Toly Ndour. Rôle des lymphocytes T CD4+ et des lymphocytes T régulateurs dans l'immunothérapie et la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer : études chez la souris. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PA066126 . tel-00839313

**HAL Id: tel-00839313**

**<https://theses.hal.science/tel-00839313>**

Submitted on 27 Jun 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité Immunologie

Ecole Doctorale Physiologie et Physiopathologie

Présentée par

**Cécile TOLY NDOUR**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'Université Pierre et Marie CURIE

### **Rôle des lymphocytes T CD4+ et des lymphocytes T régulateurs dans l'immunothérapie et la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Etudes chez la souris.**

Soutenue le 11 mai 2012 devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur **Charles DUYCKAERTS** :

Madame le Docteur **Agnès LEHUEN** :

Monsieur le Docteur **José BOUCRAUT** :

Monsieur le Professeur **Roland LIBLAU** :

Monsieur le Docteur **Stéphane HUNOT** :

Monsieur le Docteur **Guillaume DOROTHEE** :

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Cette thèse a été menée sous la direction de :

Monsieur le Professeur **Pierre AUCOUTURIER** :

Directeur de thèse

Elle a été co-encadrée par le Docteur **Guillaume DOROTHEE**

## **TITRE**

Rôle des lymphocytes T CD4+ et des lymphocytes T régulateurs dans l'immunothérapie et la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Etudes chez la souris.

## **MOTS CLES**

Maladie d'Alzheimer, Immunothérapie, Lymphocytes T CD4+, Lymphocytes T régulateurs, Neuroinflammation, Neuroimmunologie

## **TITLE**

CD4+ T cells and regulatory T cell functions in immunotherapy and in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Studies in the mouse.

## **KEY WORDS**

Alzheimer's disease, Immunotherapy, CD4+ T cells, Regulatory T cells, Neuroinflammation, Neuroimmunology

## RESUME

L'accumulation des peptides A $\beta$ 40-42 au niveau cérébral est un élément physiopathologique majeur de la Maladie d'Alzheimer (MA) et une cible thérapeutique potentielle. A l'issue de résultats encourageants de vaccination par A $\beta$  dans des modèles murins de la MA, un essai clinique a été entrepris chez l'Homme. Mais il a dû être interrompu en raison de la survenue de méningo-encéphalites chez 6% des patients, supposées liées à une activation inappropriée de lymphocytes T. Une meilleure compréhension des réponses T CD4+ induites par la vaccination semble donc primordiale pour l'optimisation des stratégies vaccinales.

Nous avons cherché à identifier les facteurs génétiques qui pourraient avoir un rôle sur l'amplitude et la nature des réponses vaccinales T CD4+ anti-A $\beta$  chez la souris. Nous avons mis en évidence que l'amplitude de la réponse variait en fonction des haplotypes H-2 mais aussi de facteurs génétiques indépendants du CMH et liés à la capacité de générer des réponses T régulatrices (Tregs) anti-A $\beta$ .

De plus, l'analyse des réponses vaccinales dans un modèle murin de MA (souris APPPS1) semble suggérer qu'une réponse Treg inhiberait des réponses T CD4 effectrices anti-A $\beta$  spontanées.

Ces observations nous ont conduits à rechercher l'impact de ces réponses effectrices et régulatrices dans la physiopathologie de la maladie. En inactivant les cellules Tregs, nous avons pu mettre en évidence les fonctions anti-neuroinflammatoires et les effets bénéfiques de ces cellules sur la pathologie amyloïde et la cognition.

Ensemble, nos résultats suggèrent donc que les réponses Treg pourraient limiter l'efficacité vaccinale mais auraient une action neuroprotectrice dans la physiopathologie de la MA.

## ABSTRACT

Cerebral accumulation of aggregated A $\beta$ 40-42 peptides is among the major pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD). In spite of encouraging results of A $\beta$  vaccination in preclinical mouse models, the first human clinical trial had to be interrupted because of the occurrence of meningoencephalitis in 6% of the cases, supposedly related to inappropriate T cell responses. Thus, a better understanding of vaccination-induced anti-A $\beta$  CD4<sup>+</sup> T cell responses seems essential for the optimisation of future immunotherapeutic approaches.

We tried to identify the genetic factors that control the magnitude and the nature of vaccination-induced A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in mice. Both MHC-dependent and MHC-independent genetic factors are critical parameters. Among MHC-independent genetic factors, those that determine the individual propensity of generating A $\beta$ -specific regulatory T cell (Treg) responses are important.

Moreover, the vaccination-induced CD4<sup>+</sup> T cell responses analysis in an APPPS1 mouse model of AD suggest that Tregs may inhibit anti-A $\beta$  CD4<sup>+</sup> T cells responses that spontaneously arise in the course of AD.

These observations led us to evaluate the impact of CD4<sup>+</sup> effector and regulatory T cell responses in the pathophysiology of AD. Using Treg depletion experiments, we evidenced the anti-neuroinflammatory functions and beneficial effects of these cells on the amyloid pathology and cognition of APPPS1 mice.

Altogether, our results suggest that Treg responses may both limit vaccination efficacy and have a neuroprotective role in the course of AD.

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Pr Charles Duyckaerts qui me fait l'honneur de présider cette thèse.

Je remercie également de tout cœur le Dr Agnès Lehuen et le Dr José Boucraut pour avoir accepté d'évaluer mon travail et pour l'attention qu'ils ont su y porter.

Merci aussi au Pr Roland Liblau et au Dr Stéphane Hunot qui ont bien voulu examiner ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Pr Pierre Aucouturier pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je te suis gré de ton aide, merci aussi pour tout ce que tu m'as appris, tes conseils et ta gentillesse.

Je remercie aussi vivement le Dr Guillaume Dorothée pour sa présence et son encadrement au quotidien. J'ai beaucoup appris à tes côtés grâce aux discussions intéressantes que l'on a pu avoir. Je n'oublierai pas non plus les bons moments que l'on a pu partager.

Bien sûr, il me faut aussi dire merci à tout le reste de l'équipe pour leur contribution, de près ou de loin, à cette thèse : Thomas, Gabrielle, Martine, Dylla, Saci, Claude, Maria, Edmond, Antoine, Pauline .... Merci pour votre aide, pour les discussions scientifiques que l'on a pu échanger, pour la bonne humeur et pour votre soutien. Merci également à Tatiana et à Delphine pour leur disponibilité et leur aide précieuse à l'animalerie, ainsi qu'à Priska pour son sens logistique et son dynamisme.

Enfin, un énorme merci à ma mère, mon mari et ma fille pour leur compréhension, leur présence et leur amour. Vous m'avez permis de garder confiance tout au long de mon doctorat et encouragée, malgré le temps que j'ai pu perdre à vos dépens. Sans vous rien n'aurait été possible, et je vous en serai toujours reconnaissante.

A mes parents,

« La science restera toujours la satisfaction du plus haut désir de notre nature, la curiosité ;  
elle fournira à l'homme le seul moyen qu'il ait pour améliorer son sort. »

Ernest Renan.

Extrait de l'Avenir de la Science



# GLOSSAIRE

<b>Ac</b> : Anticorps	<b>LB</b> : Lymphocyte B
<b>ADN</b> : Acide desoxyribonucléique	<b>LT</b> : Lymphocyte T
<b>ADAS-Cog</b> : Alzheimer's disease Assessment Scale – Cognitive subscale	<b>LTP</b> : Long-term Potentiation
<b>Ag</b> : Antigène	<b>MA</b> : Maladie d'Alzheimer
<b>AMPA récepteur</b> : $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor	<b>MCI</b> : « Mild-cognitive Impairment »
<b>APP</b> : Amyloid precursor protein	<b>MDSCs</b> : Myeloid Derived Suppressor Cells
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>MMSE</b> : Mini Mental Status Examination
<b>BACE 1</b> : Beta-site APP Cleaving Enzyme 1 (beta-sécrétase)	<b>MO</b> : Moelle osseuse
<b>BCR</b> : B-cell receptor	<b>MP</b> : Maladie de Parkinson
<b>BDNF</b> : Brain-derived neurotrophic factor	<b>NMDA récepteur</b> : <i>N</i> -methyl-D-aspartate receptor
<b>BHE</b> : Barrière hémato-encéphalique	<b>OLS</b> : Organes lymphoïdes secondaires
<b>CCL</b> : CC Chemokine ligand	<b>OVA</b> : Ovalbumine
<b>CCR</b> : CC Chemokine receptor	<b>PAMPs</b> : Pathogen-Associated Molecular Pattern
<b>CD</b> : Cluster de différenciation	<b>PBS</b> : Phosphate Buffered Saline
<b>CFA</b> : Complete Freund Adjuvant	<b>PIB</b> : Composé B de Pittsburgh
<b>CMH</b> : Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>PLP</b> : Proteolipid protein
<b>CPA</b> : Cellule présentatrice d'Ag	<b>PRR</b> : Pattern Recognition receptor
<b>c.p.m</b> : Coups par minute	<b>PS1 (<i>PSENI</i>)</b> : Preseniline 1
<b>CXCL</b> : CXC chemokine ligand	<b>RAGE</b> : Receptor for Advanced Glycation Endproducts
<b>CXCR</b> : CXC chemokine receptor	<b>SI</b> : Système immunitaire
<b>DC</b> : Cellule dendritique	<b>SLA</b> : Sclérose latérale amyotrophique
<b>DNF</b> : Dégénérescences neuro-fibrillaires	<b>SNC</b> : Système nerveux central
<b>DAMPs</b> : Damage associated molecular pattern	<b>TCR</b> : T-cell Receptor
<b>EAE</b> : Encéphalomyélite autoimmune expérimentale	<b>TEP</b> : Tomographie à émission de positons
<b>Ig</b> : Immunoglobuline	<b>TGF</b> : Transforming Growth Factor
<b>IGF-1</b> : Insulin growth Factor I	<b>TLR</b> : Toll-like Receptor
<b>IL</b> : Interleukine	<b>TNF</b> : Tumor necrosis factor
<b>i.p.</b> : Intrapéritonéal	
<b>i.v.</b> : Intraveineux	
<b>LCR</b> : Liquide céphalo-rachidien	

# TABLE DES MATIERES

<b><u>PREAMBULE</u></b>	<b>4</b>
<b><u>INTRODUCTION GENERALE</u></b>	<b>6</b>
<b><u>I) La maladie d'Alzheimer : aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques</u></b>	<b>7</b>
<b><u>I.1 Définition</u></b>	<b>7</b>
<b><u>I.2 Epidémiologie et conséquences socioéconomiques</u></b>	<b>7</b>
<b><u>I.3 Histoire de la maladie</u></b>	<b>8</b>
<b><u>I.4 Diagnostic</u></b>	<b>9</b>
I.4.1 Neuropathologie	9
I.4.2 Diagnostic clinique	11
I.4.3 Imagerie	14
I.4.4 Biomarqueurs	15
<b><u>I.5 Etudes épidémiologiques : les facteurs de risque génétiques</u></b>	<b>16</b>
<b><u>I.6 Etudes épidémiologiques : les facteurs de risque environnementaux</u></b>	<b>18</b>
<b><u>II) Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer</u></b>	<b>20</b>
<b><u>II.1 Modèles animaux de la maladie d'Alzheimer</u></b>	<b>20</b>
II.1.1 Généralités	20
II.1.2 Modèles génétiquement modifiés	21
II.1.3. Méthodes d'étude de ces modèles	23
II.1.4 Limites des modèles animaux	26
<b><u>II.2 Origines et conséquences des lésions</u></b>	<b>27</b>
II.2.1 Pathologie amyloïde	27
II.2.2 Pathologie Tau	33

II.2.3	Autres lésions et perturbations métaboliques observées dans la MA	35
II.2.4	Conséquences des lésions sur les réseaux de neurones	36
<b>II.3</b>	<b><u>Hypothèses physiopathologiques</u></b>	<b>38</b>
II.3.1	Hypothèse amyloïde	38
II.3.2	Autres hypothèses	40
<b>III)</b>	<b><u>Thérapeutique de la maladie d'Alzheimer</u></b>	<b>42</b>
<b>III.1</b>	<b><u>Traitements actuels</u></b>	<b>42</b>
<b>III.2</b>	<b><u>Perspectives thérapeutiques (hors immunothérapie)</u></b>	<b>43</b>
<b>III.3</b>	<b><u>Immunothérapie</u></b>	<b>44</b>
III.3.1	Immunothérapie anti-A $\beta$ : leçons du passé et perspectives	44
III.3.2	Autres perspectives immunothérapeutiques	48
<b>IV)</b>	<b><u>Aspects neuroimmunologiques</u></b>	<b>50</b>
<b>IV.1</b>	<b><u>Physiologie des relations entre système nerveux central et système immunitaire</u></b>	<b>50</b>
IV.1.1	Du concept de site « immunoprivilégié » à celui de site « immunoparticulier »	50
IV.1.2	Immunosurveillance du système nerveux central	51
<b>IV.2</b>	<b><u>Réponse immune dans le SNC</u></b>	<b>57</b>
IV.2.1	Réponses innées	57
IV.2.2	Réponses adaptatives	59
<b>IV.3</b>	<b><u>Le système immunitaire dans la physiopathologie de la MA</u></b>	<b>61</b>
IV.3.1	Problématique	61
IV.3.2	Les données actuelles sur l'immunité dans la MA	74

<b><u>OBJECTIFS ET RESULTATS</u></b>	<b>82</b>
<b><u>I) Objectifs</u></b>	<b>83</b>
<b><u>I.1 Facteurs génétiques influençant la nature et l'amplitude des réponses vaccinales T CD4+ anti-A <math>\beta</math></u></b>	<b>83</b>
<b><u>I.2 Impact des réponses T CD4+ et plus particulièrement des réponses T régulatrices dans la physiopathologie de la MA</u></b>	<b>86</b>
<b><u>II) Résultats</u></b>	<b>89</b>
<b><u>II.1 ARTICLE 1 "MHC-independant genetic factors control the magnitude of CD4+ T cell responses to amyloid-<math>\beta</math> peptide in mice through regulatory T cell-mediated inhibition »</u></b>	<b>89</b>
II.1.1 Introduction	89
II.1.2 Article	91
II.1.3 Résultats complémentaires et discussion	101
<b><u>II.2 Impact des réponses T CD4+ sur la physiopathologie dans un modele murin de la MA</u></b>	<b>106</b>
II.2.1 Introduction	106
II.2.2 Matériels et méthodes	107
II.2.3 Résultats	111
II.2.4 Discussion et perspectives	130
<b><u>DISCUSSION GENERALE</u></b>	<b>136</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>148</b>

# **PREAMBULE**

Si les recherches visant à améliorer l'efficacité et l'innocuité des stratégies d'immunothérapie dans la maladie d'Alzheimer sont nombreuses, peu d'entre elles s'intéressent aux potentialités des réponses T CD4+. Les réponses T induites par la vaccination par A $\beta$  suscitent en effet peu d'intérêt, car elles ont été rendues responsables des effets secondaires de méningo-encéphalites observés chez certains patients. L'originalité de notre approche a été non pas d'écarter ces réponses mais de chercher à comprendre les facteurs pouvant influencer leur nature et leur amplitude, dans le but, à terme, d'optimiser leur induction. Ceci est un projet vaste et ambitieux. Aussi avons-nous choisi dans un premier temps de cibler nos recherches sur les facteurs génétiques liés à l'hôte, car ce paramètre, crucial, n'avait que peu été pris en considération dans les études précliniques antérieures.

Parmi ces facteurs, il est apparu que des mécanismes de régulation des réponses induites par la vaccination par A $\beta$  avaient des fonctions importantes. Nous nous sommes surtout intéressés aux populations T régulatrices de type Tregs, mettant sciemment de côté d'autres mécanismes de tolérance potentiellement impliqués.

Nous avons secondairement cherché à appréhender la fonction des cellules Tregs dans la physiopathologie dans un modèle murin de la maladie. Là encore, nous avons choisi de cibler particulièrement cette population cellulaire, non seulement du fait des résultats que nous avons obtenus dans un contexte de vaccination, mais aussi parce que les données de la littérature les positionnent comme dotées de fonctions importantes dans la physiopathologie d'autres maladies neurodégénératives. Il faut toutefois souligner que d'autres cellules possédant des fonctions immunorégulatrices jouent probablement aussi un rôle dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, et que nos travaux invitent à poursuivre les recherches dans cette voie, à la fois vaste et passionnante.

# **INTRODUCTION GENERALE**

# **I. La maladie d'Alzheimer : aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques**

## **I.1 Définition**

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative, qui touche irréversiblement différentes zones du cerveau impliquées dans l'apprentissage et la mémoire. Principale cause de démence des pays industrialisés, son incidence augmente rapidement, entraînant d'importantes conséquences socio-économiques. En France, comme dans de nombreux autres pays, mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie et apporter des solutions thérapeutiques efficaces sont devenus des priorités de Santé Publique.

## **I.2 Epidémiologie et conséquences socio-économiques**

D'une manière générale, il est très difficile de déterminer précisément l'incidence de cas de démences dans une population, du fait des difficultés diagnostiques de ces pathologies. Les données épidémiologiques de 2001 estimaient la prévalence de 24 millions de cas de démences dans le monde avec une incidence de 4.6 millions de nouveaux cas / an (Ferri et al., 2005). En France, la prévalence était évaluée à 754 000 cas avec une incidence de 220 000 nouveaux cas / an. Aux Etats-Unis, des études plus récentes estiment la prévalence de la MA en 2011 à une personne sur 8 âgée de plus de 65 ans (<http://www.alz.org>).

Par projection démographique, et en absence d'intervention, on attend en France une prévalence de plus de 1 million de cas de MA en 2040. Dans le monde, la prévalence des démences prédite pour 2020 est de plus de 40 millions, et de plus du double en 2040. Il semble donc impératif de déterminer des pistes de prévention, à partir des facteurs de risques modifiables identifiés et de trouver des thérapeutiques efficaces dans ces pathologies.

La MA évolue progressivement sur plusieurs années pour aboutir inéluctablement à un état de dépendance physique, sociale et intellectuelle qui nuit non seulement au patient mais



aussi à son entourage. Les retombées médicales et socio-économiques de cette pathologie sont donc énormes.

### **I.3 Histoire de la maladie**

En 1906, le neuropsychiatre allemand Aloïs Alzheimer décrit la maladie chez une patiente de 51 ans. Alzheimer corrèle les altérations cognitives et comportementales de la patiente avec la présence à l'autopsie de « foyers miliaires », agrégats de substance organique formant des plaques à l'extérieur des neurones, et des lésions des neurones eux-mêmes envahis de l'intérieur et jusqu'à l'extrémité de leur prolongement par des fibres microscopiques. Il caractérise ainsi les deux signes caractéristiques de la pathologie que sont les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (DNFs).

Plus de 80 ans après, des études au niveau moléculaire ont permis de montrer que les plaques amyloïdes sont des dépôts extracellulaires de peptides d'une quarantaine d'acides aminés («  $\beta$  protein » ensuite renommée peptide A $\beta$ ) (Glennner and Wong, 1984). Ces peptides ont aussi été isolés de cerveaux de patients présentant un syndrome de Down (ou trisomie 21), ce qui suggérait qu'ils étaient issus d'une protéine codée par un gène présent sur le chromosome 21 (Masters et al., 1985). Effectivement, la séquence codant ces peptides est peu après découverte sur ce chromosome, au sein d'un gène codant une protéine d'environ 700 acides aminés : l'Amyloid Precursor Protein (APP) (Goldgaber et al., 1987). En 1987, J Kang (Kang et al., 1987) montre que le peptide A $\beta$  résulte effectivement du clivage de l'APP. En 1991, les premières mutations sur le gène de l'APP sont décrites dans les formes familiales de la maladie (Hardy and Allsop, 1991).

En 1963, M Kidd (KIDD, 1963) montre que les fibrilles observées par Aloïs Alzheimer dans les neurones sont des filaments de 10 nm de diamètre appariés en hélice. Les DNFs sont ensuite décrites comme étant composées de formes hyperphosphorylées de la protéine Tau (Grundke-Iqbal et al., 1986).

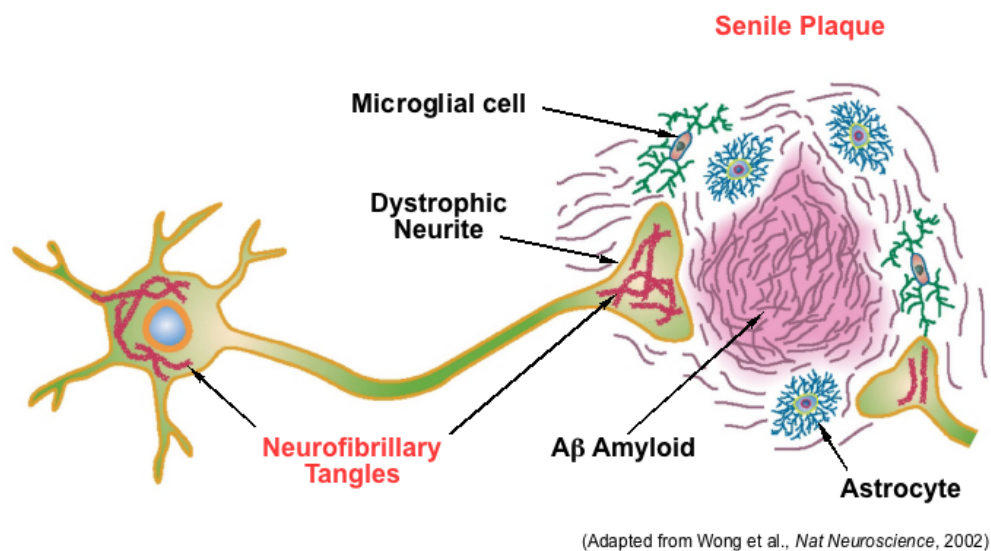
Ces découvertes des années 1980 initient des années de recherche intensive sur la MA, permettant d'apporter des connaissances nouvelles et approfondies sur le métabolisme de l'APP, la génération des peptides A $\beta$  et l'homéostasie de Tau.

## I.4 Diagnostic

Le diagnostic de certitude de la MA ne se fait que post-mortem, à l'autopsie où l'on retrouve les lésions neuropathologiques caractéristiques de la maladie.

Cliniquement, seul un diagnostic de « MA probable » peut être donné. Ce dernier implique actuellement plusieurs étapes : une première évaluation incluant l'histoire médicale du patient, une évaluation du statut mental, un examen clinique, des examens de neuroimagerie et enfin des tests biologiques.

### I.4.1 Neuropathologie

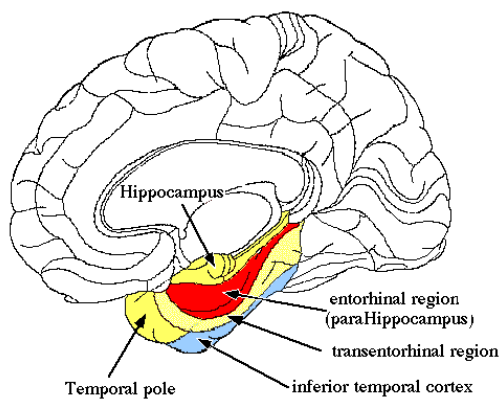


**Figure 1 : Lésions neuropathologiques présentes dans la maladie d'Alzheimer : plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires.**

Jusqu'en 1991, l'échelle diagnostique qui prévalait était celle établie par une institution américaine spécialisée dans la MA : le CERAD. Elle se basait uniquement sur la quantification des plaques amyloïdes. Cette échelle manquait de rigueur, car d'une part la présence de plaques n'est pas spécifique de la MA - elles sont présentes chez des sujets âgés ne présentant pas de syndrome démentiel - et d'autre part l'extension de la pathologie amyloïde n'est pas proportionnelle à l'étendue des signes cliniques.

Par le terme « pathologie amyloïde », on englobe un certain nombre de lésions phénotypiquement différentes les unes des autres mais toutes développées à la suite de

l'accumulation d'A $\beta$ . On distingue ainsi des dépôts diffus, des dépôts focaux et des dépôts stellaires. Certains dépôts sont entourés d'une « couronne » de neurites (dendrites et axones) et constituent ce que l'on appelle les plaques neuritiques. La grande majorité de ces lésions se situe dans la substance grise (cf figure 2). Chronologiquement, on peut distinguer 5 phases de dépôts en fonction des territoires atteints (Thal et al., 2002) : la 1ère implique l'isocortex, la 2ème l'hippocampe et le cortex entorhinal, la 3ème le striatum et les noyaux du diencephale, la 4ème divers noyaux du tronc cérébral et la 5ème les autres noyaux du tronc cérébral et le cervelet. Des dépôts amyloïdes se forment aussi au sein des parois des artères et des capillaires irriguant le cerveau et, à un moindre degré, au niveau du réseau veineux : ils sont ainsi responsables de lésions d'angiopathie amyloïde.



**Figure 2 : Zones cérébrales touchées par les lésions aux stades précoces de la MA**

De même, le terme « pathologie Tau » englobe les différents types de lésions engendrées par l'agrégation de protéines Tau hyperphosphorylées et la formation de dégénérescences neurofibrillaires (DNFs). Ces dernières ne sont pas spécifiques de la MA et sont retrouvées dans d'autres maladies neurodégénératives. Les DNFs s'accumulent dans le soma et les dendrites sous forme respectivement de « tangles » et de « neuropil threads ». On trouve aussi une accumulation de Tau dans les axones qui forment la « couronne » des plaques neuritiques. En 1991, H et E Braak (Braak and Braak, 1991) ont décrit l'évolution chronologique de la pathologie Tau au cours de la maladie. Ils distinguent 6 stades. Les cortex entorhinal et trans-entorhinal sont les premiers touchés (stades I et II), puis l'hippocampe (stades III et IV) et enfin l'isocortex (stade V et VI). Si les premiers stades peuvent relever du simple vieillissement « normal », à partir du stade IV la probabilité qu'il s'agisse d'un patient ayant souffert de MA est forte. Les stades I et II surviennent très tôt : une étude a en effet révélé la présence de lésions de ce type à l'âge moyen de 47 ans (Duyckaerts and Hauw, 1997). Le noyau basal de Meynert et le locus coeruleus innervant respectivement le cortex en

acétylcholine et en noradrénaline seraient atteints dès le stade I, expliquant en partie le déficit observé de ces neurotransmetteurs dans la MA (Sassin et al., 2000), (Grudzien et al., 2007) .

La symptomatologie et l'évolution clinique étant mieux corrélée à la pathologie Tau qu'à la pathologie amyloïde, en 1997, de nouveaux critères diagnostiques ont été établis : ceux du National Institute of Aging et du Reagan Institute (National Institute on Aging and Reagan Institute Working Group, 1997). Ils prennent en compte à la fois les paramètres cliniques, la pathologie Tau et la pathologie amyloïde. Ils sont désormais reconnus et adoptés par tous les spécialistes mondiaux à la place de l'ancienne classification du CERAD.

On distingue actuellement plusieurs formes clinico-pathologiques de la maladie. Elles diffèrent selon la nature des lésions prédominantes (plaques ou DNF), la manière dont la pathologie débute (lésions de l'hippocampe (dans la majorité des cas) ou lésions focales corticales), la forme (génétique ou sporadique) et la présence ou non de lésions associées (corps de Lewy, lésions vasculaires, sclérose de l'hippocampe, etc) (Duyckaerts et al., 2009). Ces différences neuropathologiques se traduisent par des présentations cliniques différentes : les mécanismes physiopathologiques sous-tendant ces différentes formes clinico-pathologiques pourraient être distincts (Murray et al., 2011).

## **I.4.2 Diagnostic clinique**

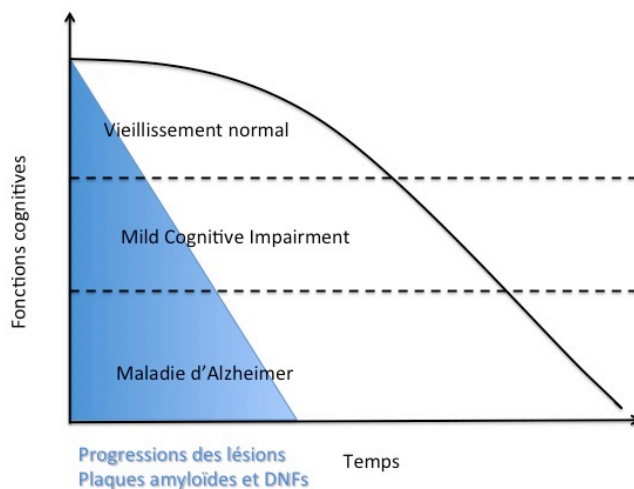
En neurologie, les symptômes observés sont en général liés à la topographie des lésions et non à la nature de ces dernières. Le diagnostic d'une maladie neurologique est donc particulièrement difficile. C'est pourquoi devant un syndrome clinique et / ou comportemental pouvant évoquer un cas de démence, plusieurs tests doivent être effectués pour permettre aux cliniciens de s'orienter vers une pathologie précise.

La notion de démence, telle que définie dans le « Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV » (DSM IV), est un syndrome qui peut être causé ou caractérisé par des déficits cognitifs multiples qui incluent des troubles de la mémoire et l'atteinte d'au moins un autre secteur cognitif, un déclin par rapport au fonctionnement antérieur et une perturbation des activités de vie quotidienne. L'ensemble de ces déficits ne doit pas pouvoir s'expliquer par un syndrome confusionnel.

Pour établir un diagnostic probable de MA, le « National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association » (NINCDS-ADRDA) a ajouté un certain nombre de critères: déficit d'au moins

deux fonctions cognitives, troubles progressifs de la mémoire et absence de troubles de la conscience. D'autres symptômes potentiellement présents, comme la désorientation spatiale, l'absence initiale de troubles du comportement et l'âge supérieur à 50 ans sont des éléments supplémentaires qui permettent d'augmenter la spécificité du diagnostic.

Ces critères du NINCDS-ADRDA sont cependant actuellement remis en cause : ils restent en effet peu spécifiques de la MA, et ne permettent qu'un diagnostic tardif. De plus en plus les cliniciens cherchent à se baser sur des critères cliniques plus précoces dans l'histoire naturelle de la maladie, dès le stade de la MA dite « prodromale » au cours de laquelle on observe déjà des troubles cognitifs légers (MCI, Mild Cognitive Impairment) (Dubois et al., 2007) (cf figure 3).



**Figure 3 : Progression clinique et neuropathologique au cours de la MA.** Adapté de Forlenza OV et al *BMC Medicine* 2010

Pendant le stade « MCI » qui en général n'excède pas 5 ans, le patient commence à se plaindre de troubles cognitifs sans que cela n'ait de réel retentissement sur son autonomie. Ces troubles concernent essentiellement la mémoire dite « épisodique », c'est-à-dire la mémoire qui sert à « encoder » les événements inscrits dans un contexte précis de lieu et de temps. Ils sont en rapport avec un dysfonctionnement de l'hippocampe et des structures temporelles internes, où ont lieu les processus d'« encodage » (processus de sélection et d'enregistrement des informations sensorielles qui entrent dans la mémoire). Cliniquement, ces troubles se manifestent par des questions répétitives, des oublis fréquents de faits récents ou d'actes à effectuer. D'autres symptômes peuvent être présents au cours de la MA comme une altération des fonctions exécutives, des troubles de l'orientation spatio-temporelle, des

troubles du langage, des troubles des praxies (difficulté à faire certains gestes complexes), des troubles des gnosies (difficultés à reconnaître des visages non familiers, des objets), etc. La gravité de ces symptômes peut être appréciée par un certain nombre de tests cliniques, qu'ils soient généraux, comme le MMSE (Mini Mental Status Examination) ou l'ADAS-Cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognitive Subscale), ou ciblés sur l'étude d'un trouble cognitif particulier (cf tableau 1).

Nom du test	Principe	Paramètres évalués
<b>MMSE (Mini Mental State Evaluation)</b>	18 items. Score sur 30 (si < 24: suspicion de démence). Intérêt pour le diagnostic et le suivi.	Fonctionnement cognitif global
<b>ADAS-Cog (Alzheimer's disease assessment scale, cognitive subsection)</b>	11 items Intérêt pour le diagnostic et le suivi.	Fonctionnement cognitif global
<b>Test du RL-RI16 ou épreuve des 5 mots</b>	Rappel libre / rappel indicé de mots	Mémoire épisodique (encodage et processus de rappel)
<b>Test du cadran de l'horloge Figure de Rey</b>	Reproduction de dessins géométriques simples ou complexes	Praxies visuo-constructives Fonctions exécutives
<b>Set-test d'Isaac Test de dénomination Test de pensée conceptuelle</b>	Test de la flexibilité mentale, de l'expression orale et de la compréhension	Mémoire sémantique Fonctions phasiques Fluence verbale
<b>Test de Benton Test d'Empan</b>	Exploration fine de la mémoire (reconnaissance de visages célèbres, mémoires de chiffres ...)	Gnosies visuelles Mémoire de travail visuelle
<b>Executions de geste sur ordre verbal</b>		Praxies gestuelles
<b>IADL (instrumental activities of daily living) PSMS (Physical Self-Maintenance Scale)</b>	Evaluation de la gêne occasionnée par les troubles cognitifs dans la vie courante	Echelles d'autonomie

**Tableau 1 : Principaux tests cliniques utilisés pour le diagnostic de MA.**

L'ensemble de ces tests ne permet cependant pas de diagnostiquer de manière certaine la MA. Seuls 70% des patients MCI amnésiques avec atteinte de la mémoire hippocampique évoluent vers une MA confirmée (Jicha et al., 2006). De plus la MA est souvent associée à des comorbidités : présence de corps de Lewy, lésions vasculaires, troubles psychiatriques... ce qui complexifie les symptômes et diminue la fiabilité de ces tests. Il semble donc

indispensable d'appuyer le diagnostic clinique avec d'autres éléments tels que l'imagerie ou la biologie.

### **I.4.3 Imagerie**

L'imagerie est une exploration complémentaire importante : elle permet en effet de localiser les lésions et de corroborer le diagnostic clinique. Dans le cadre de la MA, plusieurs examens de neuroimagerie peuvent s'avérer utiles.

L'IRM (imagerie par résonance magnétique nucléaire) est une bonne méthode d'analyse de la mort neuronale. Elle montre une atrophie de l'hippocampe, détectée très précocement, dès le stade « MCI » (Lehéricy et al., 2007).

La médecine nucléaire utilisant des radio-isotopes permet de visualiser des aspects fonctionnels des zones cérébrales. La scintigraphie cérébrale de perfusion (SPECT) met ainsi en évidence une hypoperfusion des régions temporo-pariétales.

La tomographie à émission de positons (TEP) utilisant du fluorodeoxyglucose (TEP-FDG) permet d'apprécier le métabolisme glucidique des neurones au repos. Il montre un hypométabolisme au niveau des régions temporales, pariétales et du cingulum postérieur. C'est un examen d'une très grande sensibilité mais relativement peu spécifique de la MA

En 2004, Klunk et coll (Klunk et al., 2004) utilisent pour la première fois le composé B de Pittsburgh (PIB) en TEP. Ce composé est un ligand qui se fixe aux dépôts fibrillaires amyloïdes. Ce nouveau type d'imagerie permet non seulement de localiser les dépôts amyloïdes mais aussi d'apporter une information quantitative sur leur nombre. La TEP-PIB est vite apparue comme dotée d'un intérêt diagnostique primordial. Il semble toutefois que 10 % des patients non déments soient positifs au PIB : la valeur prédictive positive de ce marqueur n'est donc pas absolue.

L'imagerie, associée à la clinique, permet souvent de faire le diagnostic différentiel de MA vis-à-vis d'autres types de démences. Cependant, il existe aussi des formes de MA avec des présentations cliniques atypiques. Les processus biologiques et les biomarqueurs trouvent alors pleinement leur place comme éléments diagnostiques.

#### **I.4.4 Biomarqueurs :**

Depuis les années 1990, de nombreuses études ont été lancées dans le domaine mais peu de marqueurs réellement discriminants en terme de sensibilité et de spécificité ont pu être mis en évidence dans le sang. Actuellement, aucun marqueur sérique n'est utilisé en « routine » pour le diagnostic de la MA. Des essais de mesure de différentes formes d'A $\beta$  dans le sang ont donné des résultats inconstants. Ces résultats décourageants sont probablement expliqués par le fait que l'A $\beta$  plasmatique dérive non seulement de l'A $\beta$  produit au niveau cérébral, mais aussi de celui produit au niveau d'autres tissus en périphérie (Mehta et al., 2000). Des approches protéomiques et multiplex ont permis la découverte d'autres candidats biomarqueurs potentiels. Ainsi 18 protéines ont été identifiées comme facteurs prédictifs d'évolution vers la MA chez des patients MCI, parmi lesquelles des cytokines et des chimiokines (Ray et al., 2007). Ces résultats n'ont toutefois pas été confirmés dans toutes les études ultérieures (Reddy et al., 2011).

Plusieurs molécules d'intérêt ont par contre pu être identifiées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Leur dosage simultané contribue au diagnostic de MA de manière effective. Dans le LCR d'individus normaux, A $\beta$ , Tau et différentes formes phosphorylées de Tau ont pu être mises en évidence (Seubert et al., 1992), (Vanmechelen et al., 2000). Comparés à ces individus, les patients atteints de MA ont des taux d'A $\beta$  fortement diminués (d'environ 50 %) alors que ceux de Tau et de Tau phosphorylée sur les résidus thréonine aux positions 181 et 231 sont augmentés d'un facteur 3 environ (Tapiola et al., 2009). Une étude multicentrique dans des cohortes de patients MCI a estimé la sensibilité et la spécificité de ces marqueurs, comme facteurs prédictifs d'évolution vers une MA, à respectivement 83% et 72% (Mattsson et al., 2009). Mais c'est le rapport A $\beta$ /Tau qui semble être le marqueur le plus discriminant aux stades précoces et peu symptomatiques (Fagan et al., 2007), (Li et al., 2007). Un score, le IATI (Innotest Amyloid Tau Index), prenant en compte à la fois les concentrations de Tau et d'A $\beta$ 42 est de plus en plus utilisé dans les études cliniques. Il est basé sur la comparaison entre la concentration d'A $\beta$ 42 mesurée et la référence relative d'A $\beta$ 42 calculée à partir des concentrations de Tau. Il présente l'avantage d'être d'interprétation très simple : un score <1 signe un profil pathologique, possiblement une MA.



## I.5 Etudes épidémiologiques et facteurs de risque génétiques

Les formes génétiques « monogéniques » de la MA concernent moins de 1% des cas. Trois gènes principaux ont été incriminés : le gène de l'*APP* (amyloid precursor protein) dans 9% des cas (Goate et al., 1991), le gène de la préséniline 1 (*PSEN1*) dans 69% des cas (Schellenberg et al., 1992) et le gène de la préséniline 2 (*PSEN2*) dans 2% des cas (Levy-Lahad et al., 1995). Un quatrième, *SORL1* (sortilin-related receptor), a aussi été décrit comme lié génétiquement à des formes tardives de MA monogénique (Rogaeva et al., 2007).

La plupart des mutations décrites sur le gène de l'*APP* sont situées à proximité de la séquence codant le peptide A $\beta$  : elles influent probablement sur les activités des différentes enzymes impliquées dans le processing de l'*APP* (alpha-, beta- ou gamma-sécrétases). D'autres mutations sont présentes dans la séquence codant le peptide A $\beta$  et jouent probablement directement sur la capacité d'agrégation du peptide A $\beta$ 42.

Les présénilines 1 et 2 (PS1 et 2) sont deux constituants du complexe gamma-sécrétase. Les mutations décrites se traduisent par un probable gain de fonction du complexe enzymatique, qui entraîne un clivage de l'*APP* déséquilibré vers la production d'A $\beta$ 42 par rapport aux autres espèces de peptides A $\beta$  (Qian et al., 1998).

La protéine *SORL1* est impliquée dans le processing et le transport intracellulaire de l'*APP*. Elle empêcherait la formation d'un complexe entre l'*APP* et la beta-sécrétase, et limiterait ainsi son clivage (Spoelgen et al., 2006). Les mutations décrites sur *SORL1* pourraient entraîner une perte de fonction et avoir pour conséquence une augmentation de la production des peptides A $\beta$ .

La découverte des mutations sur l'ensemble de ces gènes, dans les formes monogéniques de la MA, a grandement contribué à l'émission de l'hypothèse amyloïde. Selon celle-ci, c'est la pathologie amyloïde qui serait à l'origine des autres lésions et des troubles cognitifs observés dans la MA.

Par ailleurs, des mutations sur le gène codant la protéine Tau ont aussi été décrites mais elles ne donnent pas lieu à la MA. Elles sont associées à d'autres types de démences, communément regroupées sous le terme de « tauopathies ».

Les cas de MA « sporadiques », c'est-à-dire sans transmission Mendélienne évidente, restent de loin les plus fréquents. Sous cette forme, la MA touche principalement des sujets de

plus de 75 ans. Cependant, s'il est généralement admis qu'une maladie « tardive » a une composante génétique faible, des études sur des jumeaux di- et monozygotes ont établi un risque non négligeable attribuable aux déterminants génétiques dans la MA sporadique (supérieur à 60%) (Ashford and Mortimer, 2002). Elle apparaît comme une maladie multifactorielle dont la survenue serait la résultante d'une combinaison de nombreux facteurs environnementaux (pour une part d'environ 40%) et de facteurs génétiques complexes (pour une part d'environ 60 %).

En 1993, l'allèle *ApoE ε4* est identifié comme un facteur de risque de développer une MA sporadique (Corder et al., 1993). Les individus hétérozygotes pour l'allèle *ε4* ont en effet un risque relatif de faire une MA supérieur à 3, les individus homozygotes de presque 12. L'apolipoprotéine E (ApoE), produite par le foie, est un régulateur important du métabolisme des lipoprotéines plasmatiques. Elle est produite à des taux élevés dans le système nerveux central où elle est présente dans des structures « HDL (High Density Lipoprotein)-like » secrétées par les astrocytes (Kim et al., 2009). Il existe plusieurs hypothèses tentant d'expliquer comment l'apoE pourrait influencer la pathogénèse de la MA : en liant les peptides Aβ sous formes solubles, elle permettrait leur élimination et empêcherait leur agrégation (Kim et al., 2009). Elle aurait par ailleurs une activité anti-neuroinflammatoire en activant la signalisation via le LDL-R (Low Density Lipoprotein Receptor) (Pocivavsek et al., 2009). Cette activité serait variable selon les isoformes : celle de l'allèle *ε4* étant la plus faible (Vitek et al., 2009).

Entre 1993 et 2009, aucun autre gène de prédisposition n'a été identifié. A partir de 2009, grâce à la technique du Genome Wide Association Study (GWAS), étudiant les associations indirectes de polymorphismes non fonctionnels avec la maladie, d'autres gènes ont pu être mis en évidence. Cette technique, basée sur l'étude de centaines de milliers de « single nucleotide polymorphisms » (SNPs) par une technologie de type micropuce, est d'une très grande sensibilité car elle permet d'étudier des variations génétiques sur l'ensemble du génome humain. Les variations génétiques ainsi identifiées comme associées à la MA sporadique concernent les gènes *CLU* (clusterine ou apolipoprotéine J, odd ratio : 0.86), *CRI* (récepteur du complément 1 (fractions C3b/C4b), odd ratio : 1.21) et *PICALM* (phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein, odd ratio 0.86) (Harold et al., 2009), (Lambert et al., 2009). Les gènes *BINI* (bridging integrator 1), *EXOC3L2* (sialic acid binding Ig like lectin (CD33)), *MS4A4A* (membrane spanning 4A gene cluster), *CD2AP* (CD2 associated protein), *EPHA1* (ephrin receptor A1) et *ABCA7* (ATP binding cassette

transporter) ont secondairement aussi été rapportés comme facteurs de risque associés à la maladie (Seshadri et al., 2010), (Naj et al., 2011), (Hollingworth et al., 2011b). Il reste cependant encore à déterminer les allèles fonctionnels reliés à ces associations. Ensemble, ces gènes expliqueraient environ 50% des MA sporadiques (Hollingworth et al., 2011a). Les odd ratios de ces SNPs sont compris entre 1.1 et 1.2 : ce sont donc des facteurs de risque d'une bien moindre importance que l'allèle  $\epsilon 4$  de l'ApoE.

La découverte de l'implication de certains polymorphismes de ces gènes dans la MA reste cependant cohérente avec l'hypothèse amyloïde. *PICALM*, *BINI*, *CD33* et *CD2AP* sont en effet impliqués dans les mécanismes d'endocytose, phénomène indispensable à la production des peptides A $\beta$ . La clusterine et CR1 sont, comme l'ApoE, impliqués dans la voie de dégradation des peptides amyloïdes. Il faut aussi remarquer que 5 de ces loci « à risque » ont des fonctions dans le système immunitaire et l'inflammation (*CLU*, *CRI*, *ABCA7*, *CD33* et *EPHA1*) et que 3 ont un rôle dans le métabolisme des lipides (*ApoE*, *CLU* et *ABCA7*). Ces découvertes soulignent le fait que d'autres mécanismes, indirectement liés à la production ou à un défaut d'élimination des peptides A $\beta$ , pourraient être impliqués dans le processus pathologique.

Près de la moitié des cas de MA sporadiques reste encore inexpliquée : des analyses de type GWAS ou des méta-analyses encore plus étendues pourraient révéler l'implication d'autres gènes, mais ces techniques manquent de puissance pour révéler des variations rares. Des paramètres épigénétiques pourraient aussi jouer un rôle, comme semblent le suggérer des études sur des jumeaux monozygotes (Ketelaar et al., 2011).

## **I.6 Etudes épidémiologiques et facteurs de risque environnementaux**

Un certain nombre de facteurs environnementaux ont été rapportés comme pouvant limiter ou exacerber le risque de développer une MA. Des études épidémiologiques ont montré l'influence de l'âge, de l'histoire familiale et de blessures à la tête ayant entraîné une perte de conscience comme facteurs de risque de développer une MA.

D'autres études ont été entreprises pour rechercher des facteurs de risque modifiables. Des niveaux d'éducation élevés ont ainsi été associés à un moindre risque de développer la maladie (Bennett et al., 2003) et la notion de « réserve cérébrale » a été évoquée pour expliquer ces différences (Stern et al., 1994). Le concept de « réserve cérébrale » (paramètre

lié aux nombres de neurones et de connexions) suggère que certains individus auraient plus de capacités à tolérer les lésions qui se développent au niveau cérébral, sans pour autant présenter de symptômes cliniques. Il combine les bénéfices sur la cognition apportés par l'éducation, le travail et les activités mentales effectuées par un individu tout au long de sa vie. Les individus qui pratiquent un exercice physique régulier auraient aussi une pathologie amyloïde diminuée (Liang et al., 2010). L'obésité et la consommation d'alcool seraient deux facteurs de risque importants (Beydoun et al., 2008),(Anstey et al., 2009) et certaines pathologies seraient aussi associées à un risque plus élevé de développer une MA, tels l'accident vasculaire cérébral (Savva and Stephan, 2010), le diabète (Lu et al., 2009), l'hypertension artérielle (Qiu et al., 2005) et l'hypercholestérolémie (Anstey et al., 2008). Les études actuelles sur les effets des traitements anti-hypertenseurs ou anti-cholestérolémiant sur l'incidence de la MA n'ont cependant pas encore montré de résultats bénéfiques.

Globalement, un certain nombre de facteurs de risque modifiables se superpose et finalement, la meilleure prévention semble se résumer à un mode de vie sain en termes d'activités physiques, d'alimentation et d'« entraînement mental ». Cependant, l'ensemble des données sur les facteurs environnementaux a été considéré comme peu robuste par un groupe d'experts Américains qui a récemment conclu que l'on ne pouvait émettre de recommandations de prévention (Lancet Neurology, 2010).

## **II) Physiopathologie de la Maladie d'Alzheimer**

La physiopathologie de la MA n'est pas encore connue de manière précise. Elle repose sur des hypothèses établies d'après les données progressivement collectées chez l'Homme ou déduites d'études de modèles animaux.

Nous tâcherons d'abord de faire un état des lieux des modèles murins existants et détaillerons succinctement leurs modalités d'étude. Nous nous attarderons ensuite sur la description des mécanismes physiopathologiques identifiés comme ayant un rôle dans l'altération de l'homéostasie cérébrale au cours de la maladie. Enfin, nous terminerons par la présentation des différentes hypothèses physiopathologiques, toujours débattues à l'heure actuelle.

### **II.1 Modèles animaux de la maladie d'Alzheimer**

#### **II.1.1 Généralités**

Les maladies neurodégénératives liées à l'âge sont presque exclusivement humaines. Bien que certains primates et d'autres espèces de mammifères évoluées présentent des aspects similaires à l'Homme concernant le vieillissement cérébral, ils développent rarement les mêmes lésions neuropathologiques et surtout les mêmes phénotypes cliniques que ceux observés chez l'Homme. Certains primates, ours et chiens âgés peuvent développer une amylose cérébrale spontanée (Selkoe et al., 1987). Des DNFs ont aussi été observées chez les babouins (Schultz et al., 2001), les ours et les moutons âgés (Nelson et al., 1994). Une espèce de lémuriens (*Microcebus murinus*) peut développer une maladie avec des troubles cognitifs et comportementaux similaires à ceux observés dans la MA (Bons et al., 1992). Ces animaux présentent un processus neurodégénératif associant perte neuronale, atrophie cérébrale, accumulation de plaques amyloïdes, pathologie Tau et perte des neurones cholinergiques. Cependant, ce modèle « naturel » a aussi des limites car, si 20% de ces animaux développent la maladie, aucun élément ne permet de prédire lesquels. Aucune lésion spontanée de type amyloïde ou DNFs n'a été décrite chez les rongeurs ou d'autres espèces animales moins évoluées.

Les similitudes phénotypiques entre les formes familiales de la MA et les formes sporadiques, ainsi que le manque de modèles animaux naturels facilement utilisables a conduit au développement de modèles génétiquement modifiés, basés sur les mutations observées dans les formes familiales de la maladie (mutations sur l'APP et sur la PS1).

## II.1.2 Modèles génétiquement modifiés

*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* et le poisson zèbre se sont révélés être d'une grande utilité pour l'étude de la biologie cellulaire et des mécanismes moléculaires de la maladie. Ce sont des modèles de choix pour cribler de potentiels candidats-médicaments (Götz and Ittner, 2008). Mais le système nerveux simplifié de ces organismes et la distance phylogénétique de ces animaux à l'Homme limitent leur usage comme modèles de la maladie.

Les modèles murins génétiquement modifiés restent de loin les plus utilisés en recherche physiopathologique (Duyckaerts et al., 2008). De très nombreux modèles ont été développés : des souris simples transgéniques exprimant l'APP humaine mutée, des souris doubles transgéniques (APP et PS1 humaines mutées) et même des souris triples transgéniques (APP, PS1 et Tau humaines mutées).

Ces modèles développent une accumulation progressive d'A $\beta$  dans le parenchyme cérébral, formant des plaques diffuses et neuritiques dans des régions du cerveau similaires à celles touchées dans la maladie humaine. Ils présentent aussi pour la plupart, mais à des degrés variables, des lésions d'angiopathie amyloïde cérébrale. Au niveau neuropathologique, on observe une activation microgliale et astrocytaire, des signes de neuroinflammation et des lésions de stress oxydant. Les modèles simples et doubles transgéniques, contrairement au modèles triples transgéniques, ne présentent pas de DNFs spontanément et peu ou pas de mort neuronale. Cependant, on note des altérations cognitives (tests d'apprentissage), ainsi que des modifications électrophysiologiques (Long Term Potentiation) au niveau de l'hippocampe dans l'ensemble de ces modèles murins. Selon le nombre et la nature plus ou moins agressive de la (ou des) mutation(s) du (ou des) transgène(s), le délai d'apparition des lésions et des signes cliniques est très variable.

## **Modèles murins simples transgéniques**

L'APP murine diffère de seulement 17 aa par rapport à l'APP humaine. Trois de ces différences sont localisées dans la séquence d'A $\beta$  aux positions 5, 10 et 13. Contrairement à ce que l'on observe chez l'Homme, une augmentation de l'expression ou une duplication du gène de l'APP murine n'induit pas l'apparition de dépôts d'A $\beta$ . La transgénèse avec un gène humain muté est donc nécessaire.

Il existe actuellement plus de 25 mutations ou duplications génomiques de l'APP humaine décrites, souvent nommées par le lieu géographique où elles ont été identifiées : parmi celles-ci les mutations Swedish, London ou Indiana (K670N/M671L, V717I et V717F respectivement) ont été particulièrement utilisées pour la génération des souris transgéniques. Ces gènes humains mutés ont été micro-injectés chez la souris sous divers promoteurs : PDGF, Thy-1, Thy1.2 ou PrP, plus ou moins spécifiques des neurones. Tous permettent cependant une expression préférentielle - si ce n'est exclusive - dans le SNC.

Selon la nature et la cinétique d'apparition des lésions, on distingue des modèles avec des dépôts amyloïdes essentiellement au niveau du parenchyme (souris PDAPP (Games et al., 1995)), des modèles avec des dépôts importants au niveau vasculaire (souris APP23 (Sturchler-Pierrat et al., 1997) ), ainsi que des modèles « lents » (souris Tg2576 (Hsiao et al., 1996) premiers dépôts à l'âge de 9 mois) et des modèles « agressifs » (souris Tg CRND8 (Chishti et al., 2001), premiers dépôts à 5 mois mais tests comportementaux perturbés dès 11 semaines)).

## **Modèles murins doubles transgéniques**

Si plus de 170 mutations ont été décrites chez l'Homme sur les gènes des présénilines 1 et 2 dans les cas de formes familiales de la MA, l'expression des transgènes humains mutés seuls chez la souris, bien qu'augmentant la production d'A $\beta$ , n'induit pas de lésion évidente. Il semble cependant que certains transgènes perturbent l'homéostasie calcique, engendrent une atteinte du transport axonal et induisent une hyperphosphorylation de Tau (Duyckaerts et al., 2008).

La co-injection des transgènes APP et PS1 mutés rend la pathologie plus agressive avec des délais d'apparition plus précoce des plaques. Ainsi la première souris APPPS1 décrite présentait des dépôts amyloïdes dès l'âge de 4 mois (Holcomb et al., 1998). La souris APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>deltaE9</sup> est un modèle un peu plus agressif avec développement d'importantes

lésions d'angiopathie amyloïde (Garcia-Alloza et al., 2006). La souris APP PS1 de Mathias Jucker (Université de Tübingen, Allemagne) présente un tableau encore plus rapide du fait de l'utilisation d'une mutation très agressive sur le transgène de la PS1 : les premiers dépôts amyloïdes apparaissent dès l'âge de 6 semaines (Radde et al., 2006). Enfin, un modèle a été développé, contenant 5 mutations sur l'ensemble des deux transgènes (souris 5XFAD (Oakley et al., 2006)) : ces souris développent une perte neuronale importante.

### **Modèles murins triples transgéniques**

Comme nous l'avons vu, les mutations sur le gène Tau ne sont pas associées à des formes génétiques de MA, mais à des formes de démence fronto-temporale. Cependant, devant l'absence de DNFs dans les modèles simples et doubles transgéniques, des modèles triples transgéniques incluant des mutations de Tau humaine ont été générés. Parmi ceux-ci le plus étudié est le modèle 3xTg-AD (Oddo et al., 2003). Au départ, A $\beta$  s'accumule en intracellulaire, puis les premiers dépôts d'A $\beta$  apparaissent et enfin la pathologie Tau se développe. Si ce modèle présente l'ensemble des lésions existantes dans la MA, sa relevance, du fait de l'insertion de trois transgènes humains mutés, est tout de même incertaine. Les travaux s'y rapportant sont donc à considérer avec précaution.

### **II.1.3 Méthodes d'étude de ces modèles**

En dehors des études histologiques permettant d'apprécier l'intensité de la pathologie amyloïde, la pathologie Tau, le degré de neuroinflammation, la neurogénèse, les pertes synaptiques et neuronales, un certain nombre de « techniques » ont été développées autour de ces modèles animaux afin d'avoir un « read-out » plus fonctionnel.

Parmi celles-ci, nous nous attarderons plus particulièrement sur les techniques comportementales destinées à apprécier les déficits cognitifs, et sur l'électrophysiologie de l'hippocampe, véritable reflet de la plasticité synaptique.



### ***II.1.3.1 Tests comportementaux***

Ces tests permettent de mesurer différents types de mémoire liés au fonctionnement normal de l'hippocampe, notamment les capacités d'apprentissage, de mémoire spatiale et de reconnaissance d'objet. Nous n'en détaillerons que les plus importants :

- le Morris Water Maze (piscine de Morris) permet d'apprécier la mémoire de référence spatiale. Les souris sont entraînées dans une piscine circulaire remplie avec de l'eau rendue opaque. Une plateforme est cachée juste sous la surface de l'eau. Les souris nagent jusqu'à ce qu'elles trouvent la plateforme. De nombreux paramètres sont mesurés comme le délai de démarrage, le temps mis pour trouver la plateforme... Le test comprend deux phases : une phase d'acquisition suivi d'une phase de test inversée où la plateforme est placée du côté opposé.
- Le Y Maze (labyrinthe en Y) mesure la mémoire de travail spatial. Le labyrinthe, en forme de Y, est bloqué au niveau d'un bras le temps que la souris explore les deux autres bras pendant environ 15 minutes. Après plusieurs heures, la souris est remise dans le Y mais, cette fois, les trois bras sont accessibles. On mesure alors le temps que la souris passe à explorer le « nouveau bras » : plus il est important, meilleure est évaluée la mémoire de la souris.
- Le Barnes Maze (labyrinthe de Barnes). Ce test est à rapprocher du Morris Water Maze. Le labyrinthe est composé d'un plateau circulaire contenant un certain nombre de trous en périphérie. Une boîte est disposée sous un des trous. La souris est soumise à un stress auditif qui déclenche le besoin de se cacher. Elle explore donc les différents trous jusqu'à trouver la boîte. Là aussi, comme le Morris Water maze, un certain nombre de paramètres (latence, vitesse, nombre d'erreurs, etc) est mesuré. De même, le test se divise en deux phases : une phase d'apprentissage et une phase de test au cours de laquelle la boîte est retirée et le temps passé par la souris autour du trou où était préalablement disposé la boîte est mesuré.
- Le test de reconnaissance d'un nouvel objet. Les souris sont placées dans un enclos dans lequel elles sont en présence de 2 objets pendant une période définie. La souris est retirée puis remise dans l'enclos dans lequel un des deux objets a été remplacé par un nouvel objet. Le temps passé à explorer le nouvel objet est alors mesuré.

### ***II.1.3.2 Electrophysiologie de l'hippocampe :***

Certaines synapses dans la région CA1 de l'hippocampe jouent un rôle primordial dans l'établissement de la mémoire à long-terme. Des coupes d'hippocampe peuvent être effectuées et les neurones du CA1 étudiés *in vitro* avec des électrodes. D'autres techniques plus récentes permettent aussi d'étudier l'électrophysiologie de l'hippocampe *in vivo*. Le principe est le même et cible le phénomène de « long-term potentiation » (LTP). En effet, la stimulation rapide, intense et répétée des neurones présynaptiques sensibilise les synapses, si bien que pour un niveau de stimulation définie du neurone pré-synaptique, le potentiel d'action généré dans le neurone post-synaptique augmente : c'est le phénomène de LTP, qui peut durer plusieurs semaines. Il reflète la plasticité synaptique.

Ce processus met en jeu différents types de récepteurs au glutamate : les récepteurs AMPA et les récepteurs NMDA. Le glutamate, issu des terminaisons pré-synaptiques, active les récepteurs ionotropes AMPA sur le neurone post-synaptique, ce qui induit une entrée d'ions sodium et une dépolarisation de la membrane. En conséquence, les canaux calciques voltages-dépendant induisent un flux calcique dans la cellule post-synaptique. Le flux calcique est majoré par un effet direct du glutamate sur un autre récepteur ionotrope : le récepteur NMDA. Le calcium agit ensuite comme un second messenger pour activer des enzymes en cascade et des facteurs de transcription qui induisent des modifications biochimiques et structurales dans le neurone.

Le phénomène de LTP peut être séparé en deux phases. La phase de LTP « précoce » implique une augmentation de la sensibilité de la synapse à un nouveau stimulus mais sans qu'il y ait induction de transcription de gènes. La phase de LTP « tardive » survient en cas de stimulation encore plus soutenue. Elle implique la transcription de gènes et la traduction d'ARNm. Elle aboutit à une augmentation du nombre de récepteurs AMPA sur le neurone post-synaptique, à une augmentation de la taille de la synapse ainsi qu'à la formation de nouvelles synapses entre les neurones pré- et post-synaptiques (Toni et al., 1999).

A l'inverse, une stimulation électrique lente et faible des neurones du CA1 de l'hippocampe entraîne un phénomène de « long-term depression » (LTD), signe d'une diminution de sensibilité des synapses à de nouveaux stimuli.

## II.1.4 Limite des modèles animaux

Si ces modèles reproduisent bien la pathologie amyloïde humaine, et présentent souvent des modifications électrophysiologiques et comportementales assimilables à celles observées chez l'Homme, ils diffèrent cependant sur de nombreux points qui en font des modèles imparfaits :

- La structure et les propriétés physicochimiques des dépôts amyloïdes semblent différentes entre l'Homme et la souris : ainsi les plaques retrouvées chez la souris APP23 sont totalement solubles dans du SDS, contrairement aux plaques de cerveaux humains, plus résistantes chimiquement et physiquement (Kuo et al., 2001). Une des explications possibles est l'absence de modifications post-traductionnelles chez la souris comme la dégradation N terminale, l'isomérisation, la formation de résidus pyroglutamyl, l'oxydation ... La capacité de fixation du PIB sur les dépôts chez la souris est plus de 500 fois inférieure à celle des plaques humaines (Klunk et al., 2005).
- Les lésions de type DNF n'existent que dans les modèles triples transgéniques. Or ces lésions sont d'une importance capitale dans la maladie humaine : elles sont, rappelons-le, les plus corrélées avec les manifestations cliniques.
- La perte neuronale est difficilement reproduite dans les modèles animaux. Elle n'est présente que dans des modèles très agressifs de la maladie.
- Les observations effectuées dans les différents modèles développés sont souvent hétérogènes et parfois mêmes contradictoires, complexifiant ainsi les interprétations et les extrapolations à l'Homme. Il semble donc important, dans des perspectives thérapeutiques, de confirmer des effets potentiels sur des modèles reproduisant plusieurs aspects de la physiopathologie (Jucker, 2010).

Malgré ces insuffisances, ils ont tout de même contribué à faire avancer notre compréhension de la MA. En effet, ces animaux peuvent être considérés comme de bons modèles d'amylose cérébrale. La relation entre pathologie amyloïde et déficits cognitifs est ainsi apparue difficile et complexe. Finalement, les données de la littérature ont permis de revenir sur l'hypothèse amyloïde, de la faire évoluer, de recentrer la recherche sur les cofacteurs pouvant contribuer à la toxicité d'A $\beta$  ou sur des localisations ou des conformations d'A $\beta$  « extraplaques » tels les oligomères ou l'A $\beta$  intracellulaire, comme nous le verrons par la suite. Elles ont aussi permis de redonner une place importante à la pathologie Tau.

Un autre modèle plus « physiologique » et de plus en plus utilisé comme modèle de MA précoce ou de MCI est le modèle de souris SAMP8 (« senescence-accelerated prone mouse strain 8 »). Ce modèle est basé sur le vieillissement accéléré : ces souris présentent une détérioration de l'apprentissage et de la mémoire, due à un stress oxydant important. Elles semblent aussi développer précocement des altérations du métabolisme de l'APP, une hyperphosphorylation de Tau et une diminution des taux d'acétylcholine dans le cerveau (Pallas et al., 2008).

## **II.2 Origines et conséquences des lésions**

### **II.2.1 Pathologie amyloïde**

Les peptides A $\beta$  sont issus du catabolisme d'une protéine transmembranaire : l'APP (amyloid precursor protein). Il existe 3 principales isoformes de l'APP longues de 695, 751 et 770 acides aminés (aa).

Les isoformes de 751 et 770 aa possèdent un domaine inhibiteur de protéase de type Kunitz (domaine KPI) et sont préférentiellement exprimées en dehors du cerveau, notamment sur les plaquettes et les leucocytes. Le domaine KPI permettrait de contrôler les événements protéolytiques survenant au niveau de la membrane cellulaire et de réguler ainsi la protéolyse de l'APP. Ces isoformes auraient un rôle dans l'hémostase (Van Nostrand et al., 1989), (Smith et al., 1990).

Les leucocytes et la microglie expriment aussi une isoforme particulière : la L-APP générée par le splicing de l'exon 15. Ce splicing crée un site de liaison pour des protéoglycanes de type chondroïtine sulfate. Il influe donc probablement sur le catabolisme de l'APP dans ces types cellulaires. Il permet aussi une interaction moléculaire entre APP et matrice extracellulaire, et pourrait indiquer un rôle de la L-APP dans la mobilité tissulaire de ces cellules (Li et al., 1999).

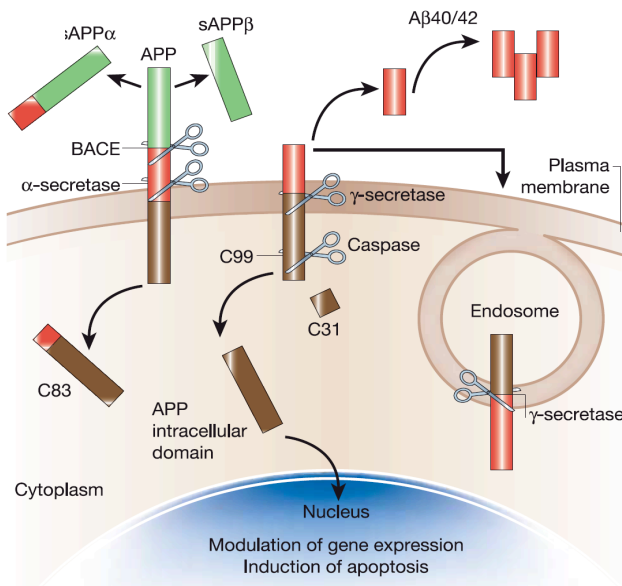
L'isoforme de 695 aa, sans domaine KPI, est fortement exprimée au niveau cérébral, particulièrement par les neurones. Elle est présente principalement au niveau des synapses, à la fois dans le système nerveux central et périphérique. Sa fonction n'est pas encore véritablement connue mais la séquence de la protéine étant très conservée au cours de l'évolution, elle est probablement importante. La délétion du gène n'est pas létale mais ceci s'explique probablement par le fait que d'autres protéines, comme APLP1 et APLP2,

pourraient avoir des fonctions redondantes (Wang et al., 2005). Des résultats récents suggèrent un rôle de l'APP dans la régression des « branches » des axones (« axonal pruning ») et dans la migration neuronale lors du développement (Nikolaev et al., 2009), (Young-Pearse et al., 2010). L'APP contribuerait aussi aux fonctions d'apprentissage et de mémoire (Ring et al., 2007). Enfin, les souris déficientes en APP et en son homologue l'APLP2 (APP like protein 2) montrent un défaut de développement et de fonctionnement des synapses à la jonction neuromusculaire (Wang et al., 2005).

De nombreux types cellulaires dans différents tissus de l'organisme produisent des peptides A $\beta$  40-42 issus du catabolisme de l'APP. Ces peptides sont retrouvés physiologiquement dans différents fluides physiologiques (LCR, plasma). L'origine de l'A $\beta$  circulant dans le plasma serait essentiellement son relargage par les plaquettes (Chen et al., 1995). L'accumulation tissulaire des peptides A $\beta$  et la formation de plaques extracellulaires semblent survenir presque exclusivement au niveau cérébral, suggérant que des facteurs spécifiques du système nerveux central (isoforme, enzymes, drainage particulier, etc) sont impliqués dans le développement de la pathologie amyloïde. Il faut aussi noter qu'on observe une accumulation d'A $\beta$  intracellulaire dans une pathologie particulière: la myosite à inclusion. Des dépôts d'A $\beta$  auraient aussi été observés dans la peau (Joachim et al., 1989).

Au niveau biochimique, la protéolyse de l'APP peut se faire à différents niveaux et met en jeu l'action séquentielle de plusieurs enzymes ou complexes enzymatiques appelés respectivement alpha-, beta- et gamma-secrétases. Trois enzymes avec une activité alpha secrétase ont été identifiées, toutes appartenant à la famille ADAM (ADAM9, 10 et 17). La beta-secrétase est aussi appelée BACE1. La gamma secrétase est un complexe d'enzymes composé des présénilines 1 et 2 (PS1 et 2), de la nicastrine, de PEN2 (presenilin enhancer 2) et de APH1 (anterior pharynx defective 1).

Le clivage de l'APP peuvent se faire selon 2 voies métaboliques distinctes: une voie amylogène, aboutissant à la génération des peptides A $\beta$ , et une voie non amylogène (cf figure 4).



**Figure 4 : Métabolisme de l'APP.** D'après Mattson M.P, *Nature*, 2004

Au cours de la voie non amylogène, l'alpha-sécrétase clive l'APP au niveau de son ectodomaine (en position 83): ceci aboutit à la génération d'un fragment extracellulaire dénommé sAPP $\alpha$  et à un fragment transmembranaire : le C83. La gamma-sécrétase peut alors cliver ce dernier, générant d'une part un fragment cytosolique dénommé AICD (APP IntraCellular Domain) et d'autre part de petits fragments de peptides d'environ 20-25 acides aminés comme P3, A $\beta$  17-40 ou A $\beta$  17-42.

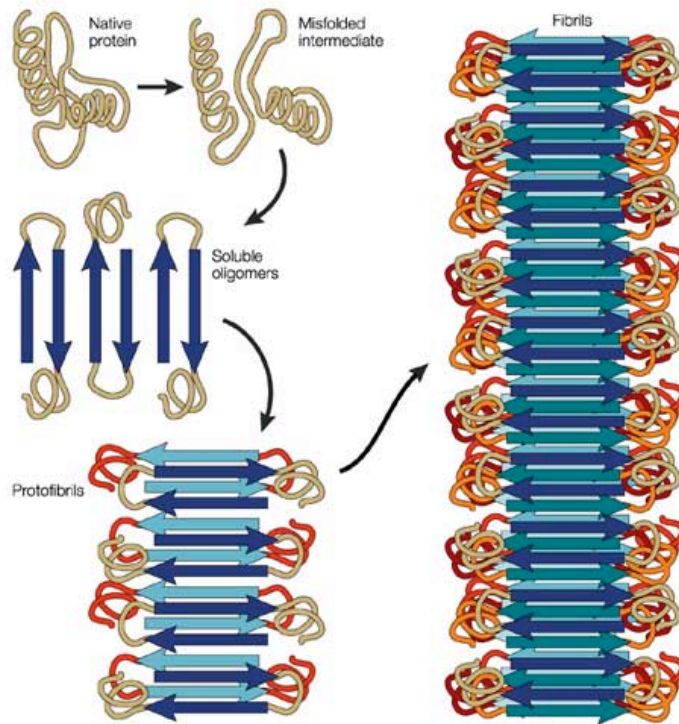
La voie amylogène implique les actions successives de la beta-sécrétase et de la gamma-sécrétase. La beta-sécrétase, en « compétition » avec l'alpha-sécrétase, clive l'APP au niveau de son ectodomaine (en position 99) et génère un fragment extracellulaire : le sAPP $\beta$ . Celui-ci peut ensuite être dégradé en plus petits fragments dont le fragment N-terminal : N-APP. Le domaine transmembranaire restant (C99) peut alors être clivé par la gamma-sécrétase. Un premier clivage dans un site au niveau de la zone transmembranaire côté cytosolique libère l'AICD (comme dans la voie non amylogène). Un second clivage peut ensuite avoir lieu à différents niveaux de la partie juxtamembranaire côté extracytosolique : celui-ci permet la production de peptides A $\beta$  de différentes tailles, pouvant se terminer au niveau des résidus 38, 39, 40, 42 ou 43 de l'extrémité C terminale. Les aa 1 à 28 de ces peptides, issus de la région juxtamembranaire, sont relativement hydrophiles alors que les aa 29 à 43, issus du domaine transmembranaire, sont globalement très hydrophobes. Le peptide A $\beta$ 1-40, le plus abondant dans les sécrétions, semble être l'espèce majoritairement retrouvée

dans les dépôts d'angiopathie amyloïde. Le peptide A $\beta$ 1-42 est, quant à lui, très agrégable; il est présent en grande quantité dans les plaques. En fait, les dépôts semblent contenir de nombreuses formes de peptides A $\beta$  : A $\beta$ 40, 42, 43 mais aussi des formes N-tronquées au niveau du 11ème aa (Liu et al., 2006a) et des formes démarrant à la position 3 avec une glutamine transformée en résidu pyroglutamate (Harigaya et al., 2000).

La compartimentalisation cellulaire des différentes étapes de clivage de l'APP n'est pas encore très claire, mais il est de plus en plus évident que les dernières étapes ont lieu au niveau des endosomes, la voie endo-lysosomale étant impliquée dans le « recyclage » de l'APP.

Le métabolisme physiologique de l'APP ferait intervenir les deux voies de dégradation, amylogène et non amylogène. Certains fragments générés par l'une ou l'autre de ces voies semblent effectivement posséder des fonctions physiologiques. L'AICD a des propriétés de facteur de transcription (Cao and Südhof, 2001) ainsi que des fonctions de régulation de l'homeostasie calcique et de contenu en ATP au niveau cellulaire (Hamid et al., 2007). sAPP $\alpha$  favorise la survie neuronale et la croissance des neurites (Turner et al., 2003). N-APP, en se liant à DR6 (Death Receptor 6), joue un rôle dans l' « élagage » des axones (axonal pruning) au cours du développement du système nerveux central (Nikolaev et al., 2009). A $\beta$ 42 aurait une fonction physiologique à faible concentration, dans la modulation des activités synaptiques (Kamenetz et al., 2003) et dans la survie neuronale (Plant et al., 2003).

Cependant la dérégulation du métabolisme de l'APP en faveur de la voie amylogène, serait responsable d'un déséquilibre dans la production de ces différents fragments. N-APP pourrait alors être responsable de mort neuronale par son action sur DR6 et l'AICD induire un processus inflammatoire et altérer la neurogénèse (Ghosal et al., 2010). Mais surtout, ce déséquilibre métabolique entraîne une hyperproduction des peptides A $\beta$  40-42. La capacité de dégradation des peptides A $\beta$  par les enzymes impliquées dans leur catabolisme (la neprilysine et l'insulin degrading enzyme (IDE)) est alors vite dépassée. Les peptides A $\beta$  vont alors former des dimères, puis des oligomères. Suite à une modification conformationnelle de leur structure tridimensionnelle, avec formation de feuillets  $\beta$ , les agrégats, suivant un phénomène de « nucléation », continuent d'augmenter en taille et finissent par précipiter sous formes de fibrilles amyloïdes (cf figure 5).



**Figure 5 : Formation des fibrilles amyloïdes.** D'après Soto C et al, *Nat Rev Neurosci* 2003

Dans les plaques amyloïdes, A $\beta$  est en fait présent sous différentes formes : agrégats non fibrillaires, structures fibrillaires et oligomères (Koffie et al., 2009). Ces différentes formes d'A $\beta$  semblent toutes être dotées de propriétés neurotoxiques.

Les peptides A $\beta$ , sous forme de plaques diffuses ou amyloïdes, sont capables d'induire une importante neuroinflammation. Ils semblent aussi pouvoir perturber la synchronie des signaux reçus par les neurones, diminuant ainsi leur capacité à intégrer et propager des informations (Stern et al., 2004). Les plaques amyloïdes exerceraient aussi leur toxicité en séquestrant en leur sein un certain nombre de protéines ayant des fonctions cellulaires essentielles (Olzscha et al., 2011).

Les formes oligomériques d'A $\beta$  paraissent être les plus neurotoxiques, et ce indépendamment de la présence de plaques et de la perte neuronale (Lesné et al., 2006). Dès 1998, des premiers travaux démontraient que des formes oligomériques solubles pouvaient altérer la plasticité synaptique en inhibant les LTP et en augmentant les LTD (Lambert et al., 1998). Les oligomères et même les dimères d'A $\beta$  agiraient via les récepteurs métabotropes du glutamate et les récepteurs NMDA présent sur les terminaisons post synaptiques (Shankar et



al., 2008). Récemment un autre mécanisme mettant en jeu la protéine prion (PrP) comme récepteur post-synaptique des oligomères d'A $\beta$  a été mis en évidence (Laurén et al., 2009). A $\beta$  sous forme d'oligomères peut aussi se fixer sur le récepteur RAGE (receptor for advanced glycation end products) et activer différentes MAP kinases dont l'effet se traduit non seulement par une diminution de la LTP au niveau des neurones (Origlia et al., 2008) mais aussi par une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires par la microglie (Fang et al., 2010). Il a aussi été montré que les peptides A $\beta$  pouvaient se lier au récepteur  $\alpha$ 7 nicotinergique avec une forte affinité et que cette interaction pouvait contribuer à l'atteinte cognitive (Dziewczapolski et al., 2009).

La présence fréquente d'un halo d'oligomères autour des plaques amyloïdes rend finalement difficile l'interprétation de la toxicité propre des formes fibrillaires. La fonction délétère principale des plaques pourrait n'être due qu'à leur capacité à fonctionner comme des « réservoirs » d'oligomères (Koffie et al., 2009).

Les études sont aussi controversées sur l'accumulation et la toxicité d'A $\beta$  au niveau intracellulaire. Chez l'Homme, divers travaux ont montré la présence de formes d'A $\beta$  intraneuronales à la fois dans le cerveau « normal » et dans la MA (LaFerla et al., 2007). La présence d'A $\beta$  intracellulaire ne semble pas corrélérer avec un risque accru de développer une amylose cérébrale ou des dégénérescences neurofibrillaires (Wegiel et al., 2007). Cependant, certains auteurs soulignent le fait que les anticorps et les prétraitements utilisés en histochimie lors de ces études ne permettraient pas de distinguer de manière certaine l'A $\beta$ 42 intracellulaire de l'APP (Aho et al., 2010). Dans les modèles murins de la maladie, les études, mieux documentées, mettent bien en évidence de l'A $\beta$  intracellulaire. Mais l'APP est très surexprimée dans ces animaux, et ce constat peut tout à fait n'être qu'artefactuel (Duyckaerts et al., 2009). Quant à la toxicité de l'A $\beta$  intracellulaire, elle n'a pu être mise en évidence que dans les modèles murins : dysfonctionnement du protéasome (Tseng et al., 2008), altération du métabolisme calcique (Caspersen et al., 2005) et perturbations de l'activité synaptique (Oddo et al., 2003).

L'angiopathie amyloïde, constituée principalement de dépôts de peptides A $\beta$ 40, peut causer hémorragie cérébrale, vascularite inflammatoire et lésions ischémiques. A $\beta$ 40 aurait aussi un rôle dans la dérégulation du flux sanguin cérébral : le peptide semble capable d'induire la production d'espèces réactives de l'oxygène par la NADPH oxydase, via un mécanisme faisant intervenir le récepteur scavenger CD36 (Park et al., 2011).

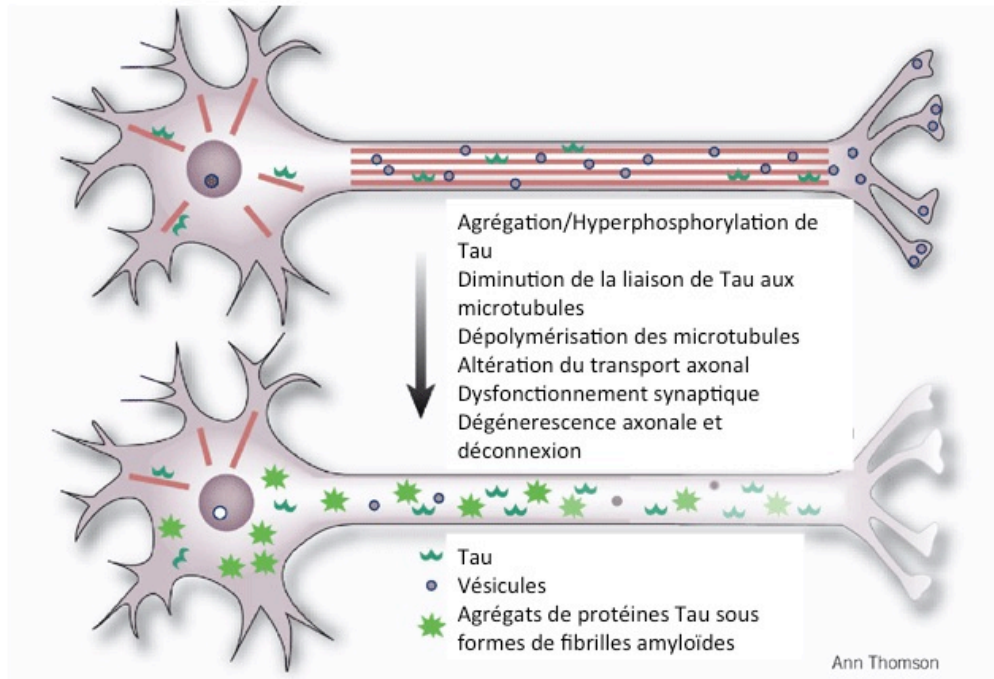
Il reste encore très difficile *in vivo* de différencier la toxicité des différentes formes d'A $\beta$ . De plus, un certain nombre d'autres molécules agissent comme des cofacteurs, tels les protéoglycanes et les glycosylaminoglycanes qui influent sur les propriétés amylogéniques d'A $\beta$  (van Horssen et al., 2003), ou encore la glutaminyl cyclase qui, en ajoutant un résidu pyroglutamate sur A $\beta$ , favoriserait son agrégation (Schilling et al., 2008). Tout cela complexifie grandement la physiopathologie de l'amylose cérébrale.

## II.2.2 Pathologie Tau

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) sont des structures intracellulaires composées principalement de protéines Tau hyperphosphorylées et agrégées. Tau contient un domaine carboxyterminal qui permet à la protéine de se lier aux microtubules grâce à la répétition de séquences « MTB ». Il existe 6 isoformes de la protéine, résultant d'un épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 et contenant 3 ou 4 répétitions MTB (isoformes 3R ou 4R respectivement). Tau est essentiellement présente dans les axones et, à un moindre degré, dans les dendrites. Sa fonction principale est de stabiliser les microtubules et de réguler le transport axonal. La protéine possède aussi un domaine lui permettant d'interagir avec un certain nombre de molécules, dont la Tyrosine kinase Fyn. L'interaction de Tau avec Fyn favoriserait la localisation de cette dernière au niveau des régions post-synaptiques où elle pourrait influencer sur le « signaling » du récepteur NMDA.

Tau possède 84 sites de phosphorylation potentiels. La phosphorylation des divers résidus de Tau module son activité par des mécanismes encore peu connus. Dans la MA, Tau est hyperphosphorylée et présente des sites de phosphorylation inhabituels, notamment sur les résidus Thr231 et Ser262. L'hyperphosphorylation de Tau favorise sa dissociation des microtubules, son autoagrégation et induit la formation de structures en filaments double hélice, contenant une forte proportion de feuillets  $\beta$  : les DNFs. Si de nombreuses kinases ont montré leur capacité à phosphoryler Tau *in vitro*, les mécanismes de la phosphorylation de Tau *in vivo* restent peu connus. Cependant, trois kinases ont particulièrement attiré l'attention : la GSK3 (glycogène synthase kinase 3), la CDK5 (cyclin-dépendant kinase 5) et la MARK (microtubule-affinity regulating kinase) dont l'inhibition pourrait constituer des pistes thérapeutiques intéressantes (Mazanetz and Fischer, 2007). Les DNFs semblent contenir toutes les isoformes de Tau, parfois N-tronquées. Elles sont souvent ubiquitinées. Des

formes de Tau hyperphosphorylées, mais sans formation de DNFs sont retrouvées chez l'individu sain (Matsuo et al., 1994).



**Figure 6 : Pathologie Tau.** Adapté de Trojanowski et al. *Nat Neurosci* 2005

Les données de la littérature suggèrent une forte influence de la pathologie Tau sur le dysfonctionnement neuronal (Arriagada et al., 1992). La perturbation du transport axonal de certaines molécules et d'organelles, dont les mitochondries, serait la principale cause du processus neurodégénératif observé dans la MA (cf figure 6). La perte synaptique, probablement consécutive au défaut de transport axonal, semble même précéder l'apparition des DNFs (Yoshiyama et al., 2007). Secondairement, l'accumulation des DNFs pourrait induire la mort neuronale par un effet physique direct. La séquestration, dans les DNFs, de protéines importantes sur le plan fonctionnel pourrait aussi être un mécanisme amplificateur de neurotoxicité. Enfin, il semble qu'il existe, comme pour A $\beta$ , des formes préfibrillaires de la protéine Tau dont la neurotoxicité dans la maladie est encore mal connue (Patterson et al., 2011).

Il faut ici rappeler que la formation des DNFs n'est pas spécifique de la MA puisqu'on les retrouve dans un ensemble de maladies que l'on appelle les « tauopathies ». Les causes

précises de leur formation restent cependant encore très floues, même si le stress oxydant et l'inflammation semblent être des facteurs contributifs (Andersen, 2004).

### **II.2.3 Autres lésions et perturbations métaboliques observées dans la MA**

Aloïs Alzheimer, dans sa description originale de la maladie, identifiait un troisième type de lésion qui provoqua pourtant initialement peu de considération de la part de la communauté scientifique. Les cerveaux des patients atteints de MA présentaient un nombre élevé de « granules lipoïdes » ou « inclusions adipeuses », ce qui suggérait un métabolisme lipidique aberrant (Foley, 2010). Par la suite, plusieurs études ont effectivement rapporté des altérations biochimiques dans la composition lipidique du tissu cérébral. Le cholestérol et les sphingolipides, via la formation de rafts lipidiques au niveau membranaire, ont un rôle dans la régulation du trafic et/ou de l'activité protéolytique de protéines liées à la membrane comme l'APP, BACE1 et les présénilines. Une altération de leur métabolisme pourrait ainsi favoriser la production de peptides A $\beta$  (Di Paolo and Kim, 2011). D'autres lipides membranaires, comme certains gangliosides, seraient capables de lier A $\beta$  et de modifier sa conformation, facilitant ainsi son agrégation (Yanagisawa, 2007).

Le réseau lysosomal englobant les voies d'endocytose et d'autophagie est aussi atteint très précocement dans la MA, avant même que les premiers dépôts amyloïdes apparaissent. Les origines de cette atteinte restent cependant indéterminées.

Le métabolisme calcique est perturbé dans la MA. Les concentrations en calcium intracellulaire sont élevées et cela retentit sur l'intégrité et la fonctionnalité de certaines organelles, dont les mitochondries. L'altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire induit une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène, sources de stress oxydant. La perméabilisation de la membrane mitochondriale peut aussi entraîner l'apoptose cellulaire. L'altération du métabolisme calcique semble aussi être un facteur favorisant la production d'A $\beta$ . A l'inverse, la fixation d'A $\beta$  sur divers récepteurs (NMDA, AMPA,  $\alpha$ 7nicotinergique, etc) entraîne l'accumulation de calcium intracellulaire. Ainsi, un « cercle vicieux » semble s'installer dans la pathologie (Demuro et al., 2010).

Un constat paradoxal est l'association observée entre neurodégénérescence et ré-entrée des neurones dans le cycle cellulaire. Les neurones sont des cellules post-mitotiques et la réinitialisation des cascades enzymatiques du cycle cellulaire a pour conséquence d'induire la

mort de la cellule. Ce phénomène semble relativement précoce dans la MA et apparaîtrait dans les mêmes régions anatomiques que celles touchées ensuite par les plaques amyloïdes. Des études *in vitro* semblent indiquer que les oligomères d'A $\beta$  pourraient être responsables de ce phénomène (Varvel et al., 2008) ; d'autres études suggèrent plutôt un rôle de la protéine Tau (Andorfer et al., 2005).

Dans la MA et dans ses modèles murins, on observe une diminution d'expression de certains facteurs neurotrophiques, dont le BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Li et al., 2009) et l'IGF-I (Insulin Growth Factor I) (Freude et al., 2009). Ces molécules, produites par les cellules gliales ou les neurones, permettent la survie et la croissance neuronale. Elles ont un rôle important dans la neurogénèse, qui semble aussi être perturbée dans la pathologie. Des études dans des modèles murins de la MA ont montré que les oligomères d'A $\beta$  pouvaient être responsables d'une diminution de production de BDNF (Peng et al., 2009).

Comme dans de nombreuses maladies neurodégénératives, on observe une réponse neuroinflammatoire soutenue dans la MA. Les études neuropathologiques montrent des stigmates de réponse inflammatoire chronique : morphologie amiboïde de la microglie, expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II sur la microglie, astroglie, présence de médiateurs de l'inflammation (cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) (Akiyama et al., 2000), chimiokines (CCL2), prostaglandines (PGE2), espèces réactives de l'oxygène et NO). L'environnement inflammatoire pourrait activer certaines kinases responsables de l'hyperphosphorylation de Tau (Ballatore et al., 2007). Mais, à l'inverse, peu d'études ont cherché à apprécier la capacité des DNFs à induire une inflammation. En revanche, de nombreuses données positionnent la pathologie amyloïde au centre du processus inflammatoire. Nous détaillerons plus précisément les mécanismes impliqués dans ce processus dans une partie spécifiquement consacrée à cela.

## **II.2.4 Conséquences des lésions sur les réseaux de neurones**

La majorité des neurones impliqués dans les processus cognitifs relarguent du glutamate ou du GABA. Nous avons déjà vu l'effet excitateur du glutamate sur les neurones post-synaptiques et son implication dans les phénomènes de LTP et de plasticité synaptique. Le GABA est impliqué dans une boucle de rétrocontrôle : sécrété par des interneurons sous l'effet du glutamate, il a un effet inhibiteur sur le neurone post-synaptique. Quant aux neurones libérant de la norépinéphrine, de la sérotonine et de l'acétylcholine, ils modulent en

amont l'activité des neurones glutamatergiques. Au cours de la MA, l'équilibre entre tous ces signaux est perturbé précocement dans l'hippocampe et le cortex.

Dans le cas où les signaux excitateurs prédominent, les synapses et les neurones peuvent dégénérer. Le vieillissement, en altérant le métabolisme glucidique et le fonctionnement mitochondrial, rendrait les neurones plus vulnérables au stress glutamatergique. Dans la MA, ce phénomène serait amplifié par les oligomères d'A $\beta$  qui peuvent augmenter la dépolarisation membranaire et induire un flux calcique exacerbé. En conséquence, des regroupements de neurones hyperactifs peuvent émerger autour des plaques au niveau du néocortex. Cependant, dans certaines zones cérébrales, les signaux inhibiteurs semblent prédominer. Ce phénomène semble être corrélé avec une diminution de l'activité des récepteurs NMDA et une altération de la plasticité synaptique (Palop et al., 2007). Des études chez la souris ont confirmé que certains neurones du cortex sont hypoactifs alors que ceux près des plaques sont hyperactifs (Busche et al., 2008). De ce constat a émergé une hypothèse basée sur l'excitotoxicité et la déplétion énergétique pour expliquer le processus de dégénérescence neuronale dans la MA (Mattson, 2004).

Les neurones les plus touchés par le processus neurodégénératif et la mort neuronale sont ceux situés dans la 2<sup>ème</sup> couche du cortex entorhinal, dans les couches pyramidales (dont le CA1 de l'hippocampe), et dans certaines aires des cortex temporaux, pariétaux et frontaux. Bien que la majorité des neurones concernés soient glutamatergiques, on observe aussi un dysfonctionnement des neurones cholinergiques se projetant vers le cortex depuis le proencéphale (Davies and Maloney, 1976), et des neurones noradrénergiques du locus coeruleus.

Les manifestations cliniques précoces seraient causées par le dysfonctionnement spécifique de certains réseaux de neurones. Le cerveau est organisé de manière à ce que l'élaboration de l'information soit efficiente et économique en terme de coût énergétique. Ainsi, au sein des réseaux de neurones, il existe des nœuds, appelés « connector hubs » par lesquels transite un nombre élevé de connexions. Un dysfonctionnement métabolique peut, en provoquant l'atteinte de certains de ces nœuds, affecter l'ensemble du réseau de neurones, ce qui va se traduire cliniquement par l'apparition de troubles cognitifs (He et al., 2009). Dans la MA, les nœuds touchés se situent dans le cingulaire postérieur et les cortex temporaux, pariétaux et préfrontaux. Par conséquent, on observe cliniquement des troubles de la mémoire épisodique et sémantique et une altération de l'élaboration de l'information visuo-spatiale. Mais la cause de l'atteinte sélective primaire de ces nœuds reste indéterminée. Les lésions

semblent ensuite se propager vers des régions nécessitant un niveau énergétique important et qui reçoivent des projections de neurones à partir de régions déjà touchées.

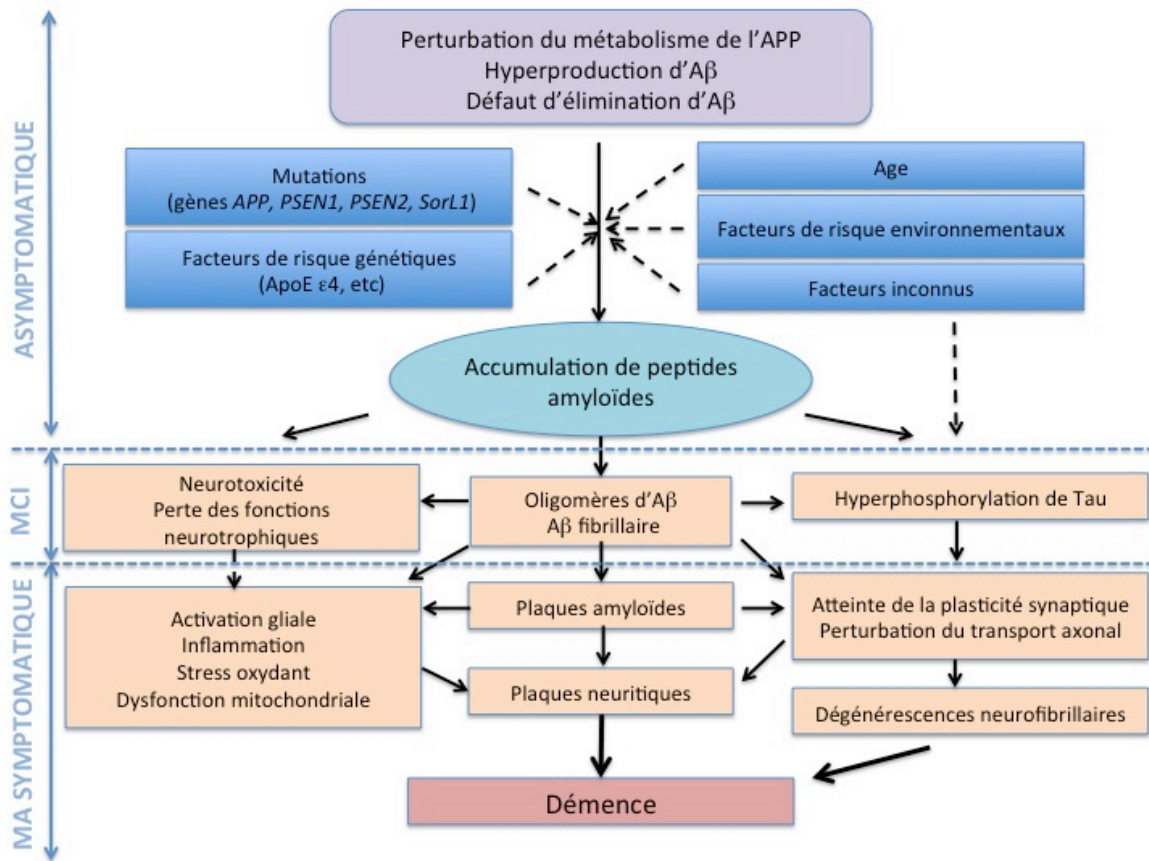
Il a été montré que les agrégats de Tau et d'A $\beta$ , une fois formés, pouvaient se propager de régions en régions cérébrales par un mécanisme proche de celui des prions (Meyer-Luehmann et al., 2006),(Clavaguera et al., 2009). Si les pathologies A $\beta$  et Tau ne se localisent pas tout à fait dans les mêmes zones du cerveau, il semble y avoir des interactions entre les deux voies. Les DNFs apparaissent initialement dans le subiculum et le cortex entorhinal (couches II, III et IV) et sont accompagnées de perte synaptique et neuronale. Les neurones de la couche II et III reçoivent des connexions du néocortex et se projettent ensuite vers les aires CA1 et CA3 de l'hippocampe. En conséquence, la perte des neurones du cortex entorhinal laisse l'hippocampe sans « input » du néocortex et peut modifier sa fonctionnalité. Les dépôts d'A $\beta$  sont précoces dans différentes régions du néocortex, notamment au niveau des nœuds du cortex postérieur médian et préfrontal. L'« encodage » de la mémoire dépend d'un équilibre dynamique entre l'activation de l'hippocampe et la désactivation du cortex postérieur médian. Les atteintes à la fois de l'hippocampe par les DNFs et des nœuds du cortex postérieur médian par la pathologie amyloïde, pourraient être responsables de la perte de cet équilibre dynamique et des défauts d'encodage observés chez les patients (Kapogiannis and Mattson, 2011).

## **II.3 Hypothèses physiopathologiques :**

### **II.3.1 Hypothèse amyloïde**

Les mécanismes physiopathologiques de la MA sont encore mal connus mais les études génétiques, biochimiques et neurobiologiques semblent indiquer que l'agrégation d'A $\beta$  joue un rôle central dans la pathologie, initiant la pathogénèse et altérant directement le fonctionnement cérébral (Hardy and Higgins, 1992), (Hardy and Selkoe, 2002).

Selon l'« hypothèse amyloïde », la production et l'agrégation des peptides A $\beta$ 40-42 seraient à l'origine d'une cascade d'évènements aboutissant à la formation des autres lésions, dont la pathologie Tau, à la dégénérescence neuronale et aux signes cliniques (cf figure 7).



**Figure 7 : Physiopathologie de la MA. Hypothèse basée sur la cascade amyloïde**  
Adapté de Forlenza OV et al. *BMC Medicine* 2010

Cette hypothèse est née de la découverte des mutations génétiques dans les formes familiales de la MA. Ces mutations surviennent essentiellement dans ou autour des sites de clivage des alpha-, beta- et gamma-secrétases. D'autres mutations, au sein de la séquence Aβ42, rendraient le peptide encore plus agrégable. Le syndrome démentiel observé chez les patients atteints du syndrome de Down, chez lesquels le gène de l'APP est présent en triple dose du fait de la trisomie 21, va aussi dans le sens d'un rôle princeps de la génération d'Aβ dans le processus physiopathologique. Enfin, les résultats encourageants obtenus par la vaccination par Aβ dans les modèles murins ont aussi été des arguments en faveur de cette hypothèse.

Plusieurs données supportent l'idée que la pathologie Tau serait, si ce n'est induite, du moins accentuée par la pathologie amyloïde. Dans les modèles murins surexprimant l'APP humaine mutée, on observe une hyperphosphorylation de Tau (Götz et al., 2004). Dans les modèles animaux transgéniques où il y a une coexpression d'Aβ et de Tau, la formation des oligomères d'Aβ précède et accentue la pathologie Tau (Götz et al., 2001), (King et al., 2006).



La progéniture issue du croisement de souris APP transgéniques avec des souris Tau transgéniques montre une exacerbation des DNFs mais pas de la pathologie amyloïde (Lewis et al., 2001). De même, l'injection intracraniale de peptides A $\beta$  dans des souris Tau transgéniques aggrave les DNFs (Götz et al., 2001). Les oligomères d'A $\beta$  pourraient favoriser le détachement de Tau des microtubules (King et al., 2006). De manière intéressante, une équipe a montré que d'autres protéines amylogènes, comme le peptide Bri qui s'agrège dans des formes de démences familiales danoises, est aussi capable d'induire des DNFs, suggérant que la formation de ces dernières pourrait résulter d'un mécanisme général dû à l'amylogénèse plutôt que d'un mécanisme spécifique de l'A $\beta$  (Coomaraswamy et al., 2010).

Ce qui semble aussi de plus en plus évident est qu'il existe une action toxique « synergique » d'A $\beta$  et de Tau. Ainsi, dans les modèles murins triples transgéniques, A $\beta$  et Tau ont tous les deux une action toxique sur la chaîne respiratoire mitochondriale, mais à différents niveaux : A $\beta$  bloque le complexe IV tandis que Tau entraîne un dysfonctionnement du complexe I (Rhein et al., 2009). Tau pourrait aussi médier la toxicité d'A $\beta$ . En effet, les souris Tau -/- semblent moins susceptibles à la neurotoxicité induite par A $\beta$  (Roberson et al., 2007). Ce mécanisme pourrait être expliqué par le fait que Tau, en altérant le transport axonal et en diminuant la localisation de la protéine kinase Fyn au niveau des dendrites, favoriserait la toxicité post-synaptique d'A $\beta$  (Ittner et al., 2010), (Roberson et al., 2011).

### **II.3.2 Autres hypothèses**

Si l'hypothèse amyloïde a toute sa valeur dans les formes monogéniques de la MA, elle doit être considérée plus prudemment en ce qui concerne les formes sporadiques.

La physiopathologie des formes de MA sporadiques semble en effet plus complexe : un dérèglement dans la production des formes solubles d'A $\beta$  et/ou un défaut dans leur élimination est assurément la cause de la pathologie amyloïde qui survient précocement. A $\beta$  sous forme fibrillaire et/ou oligomérique, ainsi que d'autres éléments issus du métabolisme de l'APP ont des propriétés neurotoxiques et délétères pour la plasticité synaptique (Shankar et al., 2008). Mais d'autres événements pourraient survenir parallèlement et de manière indépendante, et concourir à la pathologie Tau. La pathologie Tau serait ensuite responsable de mort neuronale et d'altérations cognitives, directement corrélées à la symptomatologie observée. Chronologiquement, si la présence d'oligomères et de plaques séniles semble

survenir assez tôt au cours de la pathologie, il faut aussi souligner que des altérations au niveau des axones ont été vues encore plus précocement. Des « renflements » (swelling) dans lesquels sont présentes des molécules associées aux microtubules, des organelles et des vésicules, seraient responsables d'une altération précoce du transport axonal ; ils pourraient peut-être même stimuler le catabolisme de l'APP selon la voie amylogène (Stokin et al., 2005). Ces altérations précoces au niveau axonal pourraient aussi activer des kinases de stress et initier une cascade biochimique aboutissant au déclenchement de la pathologie Tau (Falzone et al., 2009). Braak a même montré que les lésions neurofibrillaires pouvaient précéder de plus de 10 ans la pathologie amyloïde (Duyckaerts and Hauw, 1997).

Selon cette idée, une nouvelle hypothèse a émergé, selon laquelle la présence d'une altération pathologique initiale, encore non identifiée, serait responsable à la fois du déclenchement de la pathologie amyloïde et de la pathologie Tau (Small and Duff, 2008). Certaines études suggèrent qu'une atteinte vasculaire pourrait être un élément déclencheur de ces deux pathologies (Petrovitch et al., 2000), (De la Torre, 2000), (De la Torre, 2004). D'autres intègrent même le facteur de risque principal de la MA dans leur théorie : l'âge. Ainsi suite à une microlésion -possiblement de nature vasculaire- l'organisme touché par le vieillissement répondrait de manière inappropriée par une neuroinflammation exacerbée. Cette dernière serait capable d'induire d'un côté une hyperproduction d'A $\beta$  (Griffin et al., 1998) et de l'autre une altération globale du fonctionnement cérébral avec formation de DNFs, dysfonctionnement synaptique et pertes neuronales (Herrup, 2010).

Quoi qu'il en soit, en l'état actuel de nos connaissances, les deux éléments pathogéniques majeurs identifiés dans la MA restent A $\beta$  et Tau, et cibler l'un de ces deux éléments voire les deux simultanément paraît être la meilleure approche thérapeutique.

## **III Thérapeutique de la maladie d'Alzheimer**

Dans ce chapitre, après un bref rappel sur les traitements actuels et les voies de recherche, nous nous attarderons plus en détail sur l'immunothérapie et ses perspectives.

### **III.1 Traitements actuels**

Actuellement l'arsenal thérapeutique à disposition contre la MA est insuffisant. Les traitements n'offrent qu'un effet modeste, retardant simplement l'aggravation des signes cognitifs sans stopper le processus neurodégénératif.

Depuis le milieu des années 1990, des thérapeutiques ciblant l'inhibition de l'acétylcholinestérase sont disponibles. Ces médicaments permettent de pallier le dysfonctionnement des neurones cholinergiques observés dans la pathologie. Ils ont montré un effet bénéfique - quoique modeste - sur les symptômes de la maladie. Au sein de cette classe de médicaments, on distingue le donepezil (Aricept), la rivastigmine (Exelon) et la galantamine (Razadine), indiqués dans tous les stades de la MA.

Depuis 2003, une nouvelle classe de médicaments est apparue : les antagonistes du récepteur au NMDA. La mémantine a obtenu son autorisation de mise sur le marché pour le traitement des stades modérés à sévères de la MA. Elle empêche la fixation du glutamate sur son récepteur, inhibant ainsi son effet excitotoxique délétère pour le neurone post-synaptique. La mémantine améliore les performances cognitives des patients sur une période d'au moins 6 mois (Gauthier et al., 2008) et semble aussi avoir des effets sur la prévention et le traitement de l'agitation et des comportements agressifs que présentent souvent les patients lors de l'évolution de la maladie (Wilcock et al., 2008).

Un effet additif modeste des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et de la mémantine a été observé, amenant certains médecins à les prescrire en association dans les formes précoces de la maladie (Lopez et al., 2009).

## **III.2 Perspectives thérapeutiques hors immunothérapie**

L'objectif est de trouver un traitement qui ne fait pas que retarder l'aggravation des signes cognitifs mais qui modifie le développement de la maladie. Pour cela, le traitement doit agir sur un ou plusieurs des processus pathogènes et montrer un effet bénéfique sur la cognition. Voici quelques exemples de molécules en essai clinique :

- Les inhibiteurs de gamma-sécrétase. Mais du fait de l'implication de ce complexe enzymatique dans le clivage de nombreux autres substrats, des effets secondaires sont attendus. Le développement d'un médicament en phase III a ainsi dû être arrêté à cause d'une aggravation des symptômes chez les patients traités.
- Les inhibiteurs de beta-sécrétase. Cette enzyme ayant peu de substrats, son inhibition induirait moins d'effets secondaires que l'inhibition du complexe gamma sécrétase. La difficulté est que les molécules capables de lier le site actif de l'enzyme ne possèdent pas les propriétés nécessaires pour traverser la barrière hémato-encéphalique.
- Les inhibiteurs de la phosphorylation de Tau : le Lithium (inhibiteur de la kinase GSK3 $\beta$ ) a montré des effets bénéfiques dans la réduction de la pathologie Tau dans des modèles animaux de la MA (Leroy et al., 2010). Des essais avec le valproate de sodium, autre inhibiteur de la kinase GSK3 $\beta$ , ont débuté chez l'Homme.
- Les inhibiteurs de l'agrégation de Tau : des études préliminaires suggèrent que le bleu de méthylène pourrait avoir un effet dans ce processus (Hattori et al., 2008).

Très récemment, un agoniste des récepteurs nucléaires RXR, le bexarotène, a montré chez la souris des résultats très prometteurs. Par un mécanisme ApoE-dépendant, cette molécule semble induire une élimination rapide et franche des plaques amyloïdes (Cramer et al., 2012). Il faut cependant rester prudent avec ces résultats qui méritent d'être confirmés dans d'autres modèles animaux avant que la molécule puisse être testée chez l'Homme.

Aucun des médicaments actuellement en essai clinique ne semble être la molécule « miracle ». La question de la population de patients incluse dans ces essais, présentant une pathologie souvent déjà bien installée, est peut-être l'explication de ce manque actuel de réussite. Aussi a-t-on actuellement autorisé certains essais cliniques dès le stade prodromal de la maladie. La recherche s'active aussi sur les études de prévention, agissant sur les facteurs de risque modifiables de la MA.

## **III.3 Immunothérapie**

### **III.3.1 Immunothérapie anti-A $\beta$ : leçons du passé et perspectives**

#### ***III.3.1.1 L'essai AN1792***

Les premiers éléments en faveur d'une efficacité potentielle de l'immunothérapie sont apparus dès 1996 quand B. Solomon et coll. démontrent d'une part la capacité des anticorps (Ac) anti-A $\beta$  à inhiber la formation des fibrilles (Solomon et al., 1996) et d'autre part leur capacité à les désagréger *in vitro* (Solomon et al., 1997). Ces données ont conduit à des essais de vaccination dans des modèles murins de la MA avec de l'A $\beta$ 42 fibrillaire en présence d'adjuvant complet de Freund (CFA). Les souris immunisées ont montré une diminution significative de la pathologie amyloïde (Schenk et al., 1999) ainsi que des améliorations cognitives (Janus et al., 2000), (Morgan et al., 2000). Aucun signe de toxicité n'était évident chez les souris vaccinées.

Devant ces résultats prometteurs, en 2000, Elan/Wyeth lance une première étude clinique : l'essai AN1792. Le vaccin contient de l'A $\beta$ 42 pré-agrégé et un dérivé de type saponine comme adjuvant : le QS21, connu pour être un adjuvant fort avec des propriétés proches de celle du CFA. L'essai de phase I démarre alors sur 80 patients pour permettre d'apprécier à la fois l'antigénicité et la toxicité de la formulation. 53% des patients répondent en produisant des Ac et aucun effet indésirable n'est alors relevé. En fin de phase I, un émulsifiant, le polysorbate 80 est ajouté dans la formulation pour augmenter l'effet adjuvant et, espère-t-on, augmenter l'antigénicité. 372 patients sont ensuite inclus dans l'essai de phase II. Ce dernier est rapidement interrompu devant la survenue de méningoencéphalites chez 6% des patients traités. Des études neuropathologiques sur quelques cas de patients inclus dans l'essai et secondairement autopsiés révèlent, de manière inconstante, une élimination importante des plaques amyloïdes, comme observé dans les études précliniques, et confirment la validité de cette approche chez l'Homme (Nicoll et al., 2003). La microglie réagit en immunohistochimie avec les Ac anti-A $\beta$ , ce qui laisse supposer qu'elle a pu phagocyter des peptides A $\beta$ . Mais l'angiopathie amyloïde persiste (Boche et al., 2008) et les effets sur la pathologie Tau, bien qu'existants, restent modérés (Serrano-Pozo et al., 2010).

Ces études mettent aussi en évidence, chez deux patients ayant développé une méningoencéphalite, la présence d'infiltrats de lymphocytes T au niveau des leptoméniges (Ferrer et al., 2004), (Nicoll et al., 2003). Les infiltrats semblent se localiser surtout autour de vaisseaux particulièrement touchés par l'angiopathie amyloïde et ne sont pas retrouvés dans le cortex. Les cerveaux présentent aussi une raréfaction des fibres de myéline et une augmentation importante du nombre de macrophages (Boche and Nicoll, 2008).

Les patients vaccinés semblent présenter un nombre plus élevé de microhémorragies et de microlésions vasculaires comparés aux patients contrôles. L'immunisation a pu avoir eu pour conséquences, en solubilisant les plaques, d'augmenter la filtration d'A $\beta$  depuis le parenchyme vers les espaces périvasculaires. En se réagréant à ce niveau, les peptides A $\beta$  ont pu aggraver l'angiopathie amyloïde et majorer l'atteinte vasculaire. Ces lésions, sources de rupture de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique ont pu ensuite faciliter le passage de cellules lymphoïdes et/ou myéloïdes périphériques dans le système nerveux central (SNC) et ont peut-être ainsi contribué au développement de méningo-encéphalites.

Une étude des réponses T générées chez les patients vaccinés au cours de la phase I et de la phase II de l'essai AN1792 a mis en évidence une évolution de la nature des réponses d'un profil « Th2 » vers un profil « Th1 » lors de l'ajout du polysorbate 80 à la formulation (Pride et al., 2008). Rappelons que les réponses Th1 et Th2 correspondent à deux types de réponses T CD4+ effectrices. Elles diffèrent par le type de cytokines produites ainsi que par la nature des cellules avec lesquelles le LT CD4+ interagit. Les réponses Th1 impliquent la production d'IFN $\gamma$  et une coopération cellulaire entre T CD4+ et macrophages, elles sont plutôt pro-inflammatoires. Les réponses Th2 se traduisent par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 et une coopération avec d'autres types cellulaires, comme les mastocytes au niveau tissulaire. Plus récemment ont été découverts les lymphocytes Th17, qui produisent de l'IL-17 et de l'IL-22, interagissent avec les polynucléaires neutrophiles et semblent posséder un potentiel très inflammatoire. Ils sont impliqués dans un certain nombre de pathologies auto-immunes et notamment dans la sclérose en plaques, tout comme les lymphocytes Th1. Les LT CD4+ peuvent aussi se montrer « anti-inflammatoires » en sécrétant des cytokines comme l'IL-10 et le TGF $\beta$  et en interagissant avec les cellules présentatrices d'Ag et les lymphocytes activés. C'est le cas notamment des cellules T régulatrices sur lesquelles nous reviendrons plus tard.

Le développement d'une réponse Ac après vaccination par AN1792 est inconstante mais quand elle existe, elle semble associée à un effet clinique significatif, bien que modeste (Hock et al., 2003). Cependant, l'étude histopathologique de 8 patients de la cohorte de 80

patients de la phase I a montré que le taux d'Ac anti-A $\beta$  semblait corrélérer avec l'élimination des plaques mais pas avec l'amélioration des fonctions cognitives (Holmes et al., 2008). Le suivi clinique de 129 patients de la phase II semble suggérer une légère amélioration clinique chez les vaccinés et plus particulièrement chez les répondeurs Ac (différences dans les tests de « disability assessment for dementia scale » et dans le test de « dependence scale » mais pas dans les tests cliniques plus classiques MMSE et Adas-Cog) (Vellas et al., 2009).

Il faut toutefois rester prudent devant ces résultats car ils proviennent de patients inclus dans la phase II qui a été brutalement arrêtée et non configurée pour faire des analyses d'efficacité.

Si les résultats de ce premier essai vaccinal restent mitigés, ils ont ouvert la voie à de nouvelles approches pour optimiser l'efficacité et limiter la toxicité de l'immunothérapie. Ces dernières sont basées essentiellement sur l'immunothérapie passive (développement d'Ac monoclonaux notamment), ou sur l'immunothérapie active mais ciblée uniquement sur la réponse humorale.

### ***III.3.1.2 Perspectives***

#### **III.3.1.2.1 Immunothérapie passive**

Le bapineuzumab, premier Ac monoclonal développé dirigé contre A $\beta$ , a donné des résultats peu probants en phase II. Dans le sous-groupe des patients non porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  de l'ApoE, une légère amélioration clinique (scores MMSE et ADAS-Cog) a été observée. Les patients traités auraient aussi une atrophie cérébrale moins importante et une fixation du PIB en TEP diminuée comparativement aux sujets contrôles. Mais cette thérapie ne semble pas non plus dénuée d'effets secondaires puisqu'environ 10% des patients ont développé des oedèmes vasogéniques, parfois symptomatiques (Kerchner and Boxer, 2010).

Devant ces résultats mitigés, certains ont avancé comme explication le fait que cet Ac, dirigé contre la partie N-terminale d'A $\beta$ <sub>42</sub>, ne reconnaissait pas les formes oligomériques d'A $\beta$  (Mamikonyan et al., 2007). Ainsi, la firme Lilly a développé le solanezumab qui reconnaît la partie médiane d'A $\beta$  et serait capable de lier les formes solubles du peptide. Les données des essais précliniques chez la souris tendent aussi à montrer que cet Ac serait moins à risque d'induire des oedèmes vasogéniques que le bapineuzumab. Mais l'essai clinique de phase II n'a pas montré d'effets cliniques notables. La phase III se poursuit actuellement (Imbimbo et al., 2012). De nombreuses compagnies pharmaceutiques se sont aussi lancées

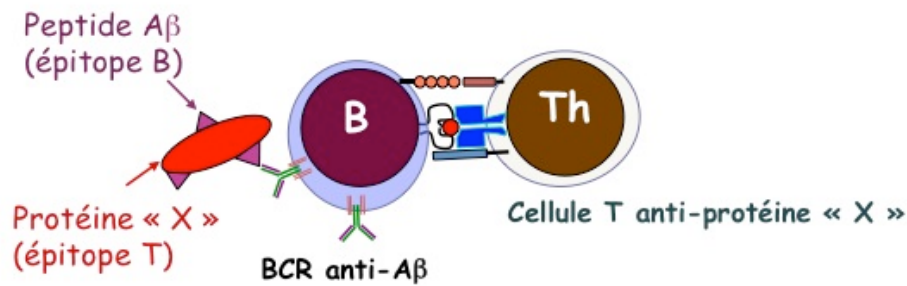
dans le développement de leur propre Ac monoclonal, reconnaissant différents épitopes de l'A $\beta$  au niveau N-terminal, C-terminal ou dans la partie centrale et liant différentes formes du peptide (monomère, oligomère et fibrille) avec des affinités variables.

Une autre stratégie d'immunothérapie passive est l'injection intraveineuse d'IgIV, un pool d'Ac « naturels » issus de plusieurs milliers de sérums humains, et qui présente l'avantage de contenir des Ac de toute nature dirigée contre toutes les formes d'A $\beta$ . Les IgIV ont démontré leur capacité d'interaction avec l'oligomérisation et la formation de fibrilles d'A $\beta$  ainsi que leur potentiel neuroprotecteur (Du et al., 2003). Une étude sur 8 patients présentant un stade modéré de la maladie a montré une amélioration cognitive au bout de 6 mois de traitement. Mais cet effet ne semble pas perdurer à l'arrêt du traitement (Relkin et al., 2009).

### **III.3.1.2.2 Immunothérapie active**

A la suite des effets secondaires de méningoencéphalites lors de l'essai AN1792, la seconde génération de vaccins anti-A $\beta$  a été développée dans le but d'éviter l'induction de réponses T anti-A $\beta$ , jugées délétères. A cette fin, différentes stratégies ont été entreprises. Il faut ici rappeler quelques notions d'immunologie. Pour produire des Ac dirigés contre un antigène (Ag) donné, les lymphocytes B, qui expriment un récepteur spécifique de cet Ag (BCR, B Cell Receptor), doivent être capables de le reconnaître au niveau d'un de ses déterminants (structure tridimensionnelle) appelé épitope B. Mais bien souvent, le signal de reconnaissance BCR/Ag ne suffit pas. La cellule B doit être capable de présenter un morceau de l'Ag (épitope T) - qu'elle aura préalablement endocyté et dégradé - associé une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) à un lymphocyte T CD4+ spécifique de l'Ag. C'est uniquement après contact entre ces deux types cellulaires que le lymphocyte B sera capable de proliférer et de se différencier en cellules plasmocytaires sécrétrices d'Ac. Ainsi pour induire une réponse Ac efficace, il faut, sur une même molécule, avoir à la fois un épitope B et un épitope T. Les firmes pharmaceutiques, se fondant sur des études dans les modèles pré-cliniques ont ainsi développé des candidats vaccins à partir d'une molécule « hybride », conjuguant la partie N terminale d'A $\beta$  (qui contiendrait des épitopes B mais pas d'épitope T) à une séquence protéique n'appartenant pas à A $\beta$  et contenant un épitope T relatif à un autre Ag (cf figure 8).





**Figure 8** : Nouvelles stratégies d'immunisation active : privilégier la réponse anticorps et éviter l'induction d'une réponse T anti-A $\beta$

## III.3.2 Autres perspectives immunothérapeutiques

### III.3.2.1 Immunothérapie anti-Tau

Récemment, il a été montré que l'immunisation active, par un peptide phospho-Tau, d'une souris transgénique pour la protéine Tau humaine mutée (souris Tg JNPL3 P301L) pouvait réduire la quantité de formes agrégées de Tau dans le cerveau et améliorer les fonctions cognitives (Troquier et al., 2012), (Asuni et al., 2007). Il semble difficile de concevoir que des Ac puissent éliminer une protéine qui s'accumule à l'intérieur des cellules. Cependant, l'expansion de la pathologie Tau pourrait passer par une phase extracellulaire, comme le suggèrent à la fois des études in vitro (Frost et al., 2009) et in vivo (Clavaguera et al., 2009). Ce constat pourrait justifier l'intérêt de cette approche nouvelle qui semble prometteuse.

### ***III.3.2.2 Immunothérapie par stimulation du système immunitaire inné :***

L'idée est ici d'influer sur les fonctions de la microglie et des macrophages pour faciliter l'élimination des plaques et des DNFs. En effet, si la microglie résidente paraît perdre ses capacités de phagocytose d'A $\beta$  au cours de l'évolution de la pathologie, les macrophages périphériques infiltrants semblent être plus efficaces pour éliminer les plaques (Jucker and Heppner, 2008), (Butovsky et al., 2007), (El Khoury et al., 2007). Un certain nombre d'approches ciblent donc cette population et cherchent à faciliter l'entrée des précurseurs périphériques de phagocytes mononucléés dans le SNC (stimulation avec du CpG (Scholtzova et al., 2009), blocage de la voie de signalisation du TGF $\beta$  (cytokine inhibant leur entrée en conditions physiologiques) (Town et al., 2008), transfert de cellules monocytaires manipulées in vitro (transfectées pour la neprilysine, enzyme dégradant l'A $\beta$ ) (Lebson et al., 2010). Une autre approche vise à modifier le phénotype de la microglie : l'effet bénéfique observé sur la pathologie amyloïde et les troubles cognitifs de l'acétate de glatiramère, copolymère utilisé dans la sclérose en plaques pour ses propriétés immunomodulatrices (Frenkel et al., 2005), serait dû à son action directe sur la microglie, lui donnant un phénotype de « cellules dendritiques like » (expression de CD11c) capables de sécréter de l'IGF1 et d'induire la neurogénèse (Butovsky et al., 2006).

L'ensemble de ces approches immunothérapeutiques est intéressant car elles présentent l'avantage de pouvoir être combinées. Beaucoup de paramètres sont encore à explorer et à prendre en compte si l'on veut optimiser l'approche vaccinale dans la MA. Il s'agit en premier lieu de comprendre le comportement du système immunitaire au cours de la physiopathologie de la maladie : réagit-il face à l'apparition des lésions ? Contribue-t-il à la neurodégénérescence ? Exerce-t-il un effet neuroprotecteur ? ou n'a-t-il aucun effet ? Avant d'étudier les données de la littérature sur le sujet, il convient de rappeler les relations physiologiques qui existent entre le système immunitaire et le système nerveux central.

## **IV) Aspects neuroimmunologiques**

### **IV.1 Physiologie des relations entre système nerveux central et système immunitaire**

#### **IV.1.1 Du concept de site « immunoprivilégié » à celui de site « immunoparticulier »**

Dès la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, Paul Ehrlich observe que des colorants intravitaux, de nature hydrosolubles, injectés en périphérie diffusent dans tous les organes sauf le cerveau. Le système nerveux central (SNC) apparaît dès lors comme un organe particulier, séparé anatomiquement du reste du corps. Nous savons désormais que cette particularité est due à l'existence d'une barrière hémato-encéphalique (BHE) qui limite l'accès des molécules solubles et des leucocytes au SNC. D'autres éléments, comme l'absence d'un système lymphatique conventionnel, la faible expression des molécules de CMH-I et II et l'existence d'une production locale de facteurs immunosuppresseurs renforce vite le concept que le SNC est un site « immunoprivilégié » (Galea et al., 2007).

Les travaux de Medawar en 1948 sur le rejet de greffe apportent cependant les premiers éléments démontrant qu'une réponse immunitaire peut avoir lieu dans le SNC (Medawar, 1948). Ces expériences montrent que des greffes de peau dans le cerveau d'animaux naïfs n'induisent pas de réponse immune. Mais si les animaux sont exposés en périphérie aux antigènes du greffon avant la greffe, les cellules du système immunitaire, « éduquées », sont capables de rejeter le greffon au niveau cérébral. La mise en évidence, par la suite, de la présence de cellules du système immunitaire au sein du parenchyme cérébral au cours de différentes infections (méningites bactériennes, infections virales, fongiques ou parasitaires) a aussi permis de montrer qu'une réponse immunitaire adaptative pouvait s'y développer. Le fait que des individus immunodéprimés aient du mal à contrôler des pathogènes pouvant être naturellement présents à l'état latent dans le cerveau (toxoplasme, polyomavirus JC, cytomegalovirus) laisse aussi supposer qu'il existe des mécanismes d'« immunosurveillance » du SNC, efficaces chez les sujets immunocompétents.

Cependant une réponse immune dans le SNC peut aussi être délétère pour l'hôte. La réponse inflammatoire peut en effet s'avérer dangereuse : l'œdème entraîne une compression de l'organe du fait de la présence de l'os rigide qui l'entoure. Les neurones ont des capacités de renouvellement limitées et une réponse inflammatoire excessive peut nuire à leur fonction et leur survie. Il est donc compréhensible que les mécanismes d'induction et de développement d'une réponse immune dans le SNC y soient particulièrement contrôlés.

## **IV.1.2 Immunosurveillance du système nerveux central**

### ***IV.1.2.1 Rappels anatomiques***

Le système nerveux central (SNC) est organisé en différents compartiments : le parenchyme cérébral, les ventricules - contenant le liquide céphalo-rachidien produit au niveau des plexus choroïdes - et les méninges. Parmi les méninges, on distingue la dure-mère, au contact de l'os, l'arachnoïde contenant les vaisseaux sanguins et la pie-mère au contact du parenchyme cérébral. Le LCR produit par les plexus choroïdes diffuse au niveau des espaces sous-arachnoïdiens qui entourent la pie-mère et le parenchyme.

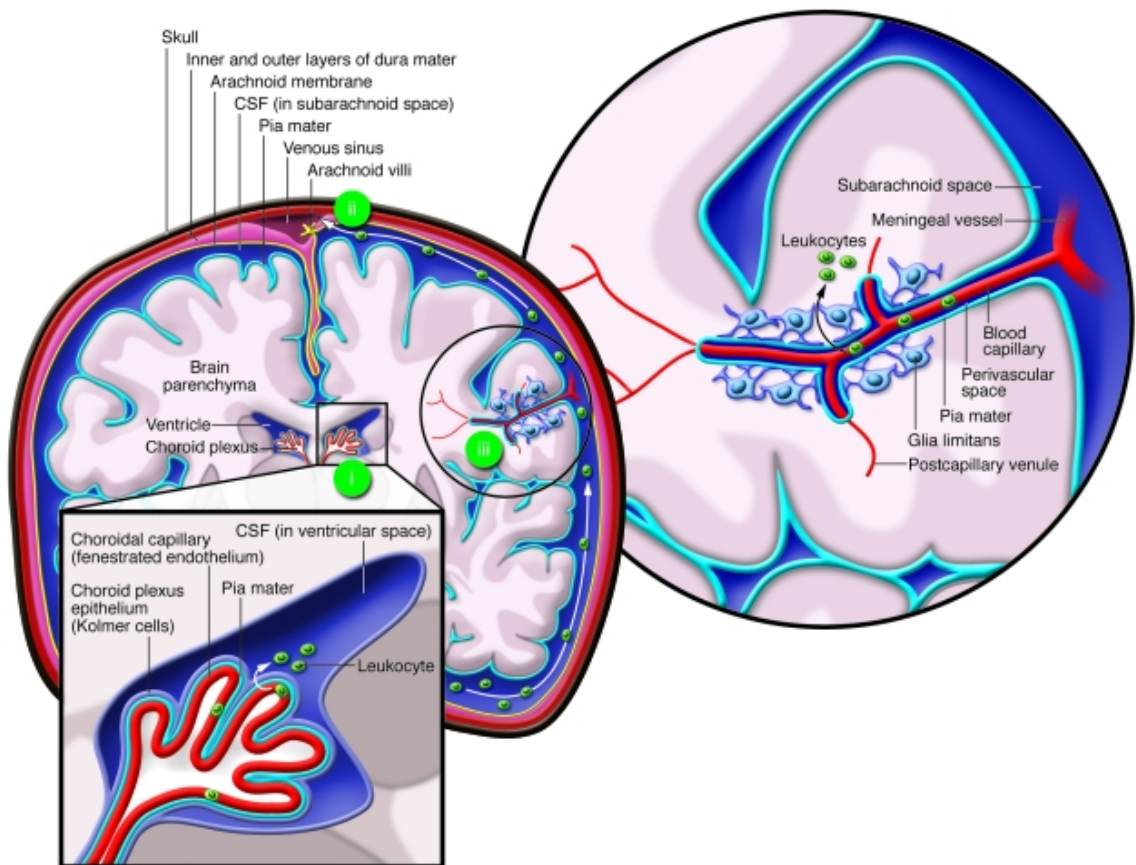
### ***IV.1.2.2 Les « barrières »***

Plusieurs « barrières » empêchent l'entrée de molécules et de cellules dans le parenchyme cérébral (cf figure 9) :

- La barrière hémato-encéphalique se situe entre l'endothélium vasculaire des capillaires et des veinules post-capillaires et le parenchyme cérébral. Les cellules endothéliales qui la constituent présentent des caractéristiques particulières : elles ne possèdent qu'une faible activité de pinocytose, n'expriment que peu de molécules d'adhérence à l'état basal et élaborent un réseau complexe de jonctions serrées entre elles. Après la membrane basale vasculaire interne, on retrouve une media composée de cellules musculaires lisses et de péricytes puis une membrane basale externe. Au delà de celle-ci, se trouve l'espace péri-vasculaire (espace de Virchow-Robin) contenant le liquide interstitiel, des cellules mésothéliales et des cellules macrophagiques. Cet espace est bordé de l'autre côté par la pie-mère puis par la « glia limitans », constituée d'une membrane basale, de pieds astrocytaires et de quelques pieds de cellules microgliales juxtavasculaires. Au niveau de cette

barrière se surajoute une barrière que l'on pourrait qualifier d' « immuno-encéphalique » : en effet les cellule endothéliales, les astrocytes et les neurones expriment Fas-ligand de manière constitutive. Cette molécule de surface, en se liant au récepteur Fas exprimé sur les lymphocytes activés, est capable d'induire l'apoptose de ces derniers (Choi and Benveniste, 2004).

Autour des ventricules, on distingue des structures un peu particulières : les organes circum-ventriculaires (épiphyse, glande pinéale, etc). Ils sont dépourvus de BHE. Ceci permet à ces zones du cerveau de pouvoir « analyser » la concentration en certaines molécules circulantes ou à l'inverse de déverser aisément dans le sang certaines substances neuroendocrines. Isolés des zones cérébrales voisines, ces organes sont entourés et séparés du LCR par les cellules épendymaires et par des cellules qui possèdent des jonctions serrées très étanches: les tanicytes.



**Figure 9 Anatomie du cerveau** D'après Wilson EH et al, *J Clin Invest*, 2010

- La barrière hémato-méningée se situe entre le sang et le LCR. Elle peut être subdivisée en deux parties. Au niveau des vaisseaux méningés, elle est peu perméable et est constituée par des cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées et par la pie-mère. Au niveau des ventricules cérébraux, les capillaires sanguins forment des invaginations, constituant les plexus choroïdes. L'endothélium vasculaire y est fenestré, ce qui permet des échanges assez aisés entre le sang et le stroma des plexus choroïdes. Un second niveau de barrière, plus étanche, est formé par les cellules épithéliales et leurs jonctions serrées qui séparent le stroma des plexus choroïdes et le LCR.

- La barrière méningo-encéphalique se situe entre le LCR et le liquide interstitiel du parenchyme cérébral. Elle est constituée par la pie-mère, barrière relativement imperméable, au niveau de l'espace sous-arachnoïdien et par les cellules épendymaires au niveau des cavités intracérébrales.

### ***IV.1.2.3 Les cellules résidentes du SNC :***

#### **IV.1.2.3.1 La microglie : la sentinelle**

Malgré des études controversées tout au long du XX<sup>ème</sup> siècle sur sa nature et son origine (mésodermique ou ectodermique), il a finalement été démontré que la microglie dérivait des progéniteurs myéloïdes embryonnaires du sac vitellin. Ce type cellulaire semble s'individualiser très tôt lors du développement et présenterait ensuite toute au long de la vie de fortes capacités d'auto-renouvellement et de prolifération (Ginhoux et al., 2010).

Les cellules microgliales représentent plus de 10% des cellules du SNC. Elles ne sont pas quiescentes : elles scannent continuellement le micro-environnement avec leurs ramifications, s'assurant ainsi de l'absence d'altérations de l'homéostasie cérébrale (Nimmerjahn et al., 2005).

On peut assimiler la biologie de ces cellules à celle des macrophages, dont les statuts d'activation ont été étudiés dans le détail. On distingue en effet les macrophages de type M1, spécialisés dans l'élimination des pathogènes, et les macrophages de type M2, impliqués dans le processus de réparation et de remodelage tissulaire (Geissmann et al., 2010). Les cellules microgliales semblent aussi capables de polariser leur état d'activation pour exercer des réponses effectrices appropriées aux différentes atteintes de l'intégrité du tissu cérébral (Ransohoff and Perry, 2009).

La microglie est un élément majeur dans le déclenchement de l'inflammation en cas d'altération de l'homéostasie cérébrale, comme nous le verrons par la suite.

#### **IV.1.2.3.2 Autres cellules myéloïdes du SNC**

En plus de la microglie, seule cellule myéloïde située derrière la barrière hémato-encéphalique, le SNC contient d'autres phagocytes mononucléés localisés au niveau des méninges, des espaces périvasculaires et des plexus choroïdes (Ransohoff and Cardona, 2010).

On distingue ainsi :

- Les macrophages des plexus choroïdes. Ils possèdent un phénotype proche de celui des cellules dendritiques car ils expriment à la fois des molécules de CMH-II mais aussi des molécules de co-stimulation permettant l'activation de lymphocytes T CD4+ via la présentation d'Ag issus de la circulation sanguine. Ils permettraient la restimulation et le passage de LT CD4+ mémoires à travers la barrière hémato-méningée.
- Les macrophages méningés. Ils sont localisés au niveau de l'espace sous-arachnoïdien. Ils expriment le CMH-II constitutivement et joueraient un rôle dans la présentation d'Ag issus du SNC aux LT CD4+ présents dans le LCR.
- Les macrophages périvasculaires : ils sont présents dans l'espace périvasculaire entre les vaisseaux et la membrane basale de la « glia limitans » formée par les astrocytes. Ils pourraient restimuler les LT CD4+ effecteurs extravasés à travers les jonctions serrées des vaisseaux sanguins et favoriser leur passage dans le parenchyme cérébral.

L'ensemble de ces phagocytes joue probablement un rôle important dans l'immunosurveillance du SNC par les lymphocytes T CD4+ mémoires. Ils auraient aussi une fonction-clé lors des phases effectrices des réponses adaptatives dirigées contre un Ag présent au niveau du SNC.

Dans les plexus choroïdes, les méninges et le LCR on trouve aussi quelques cellules dendritiques. Elles présentent un phénotype de cellules dendritiques immatures, produiraient de l'Il-10 et ne semblent pas exprimer de molécules de costimulation, ce qui suggère un rôle plutôt immunosuppresseur de ces populations cellulaires (Serot et al., 2000). Le parenchyme cérébral, lui, semble dénué de cellules dendritiques à l'état basal.

### **IV.1.2.3.3 Les astrocytes**

Les astrocytes sont des cellules d'origine neuro-ectodermique dont les fonctions sont essentiellement de nature neurotrophique (sécrétion et recyclage des neurotransmetteurs, régulation du métabolisme énergétique, remodelage synaptique, modulation du stress oxydant, etc). Récemment est apparu le concept que les astrocytes pouvaient également participer à la surveillance de l'intégrité du parenchyme cérébral. En effet, ces cellules expriment un certain nombre de récepteurs capables de reconnaître divers signaux de danger. Après activation, les astrocytes peuvent sécréter des médiateurs solubles pro-inflammatoires comme CCL2, IL-6, CXCL10 ou BAFF qui contribuent ensuite à la neuroinflammation et à la réponse immunitaire innée. Secondairement, la prolifération des astrocytes peut permettre de confiner la lésion et de restaurer l'homéostasie cérébrale (Farina et al., 2007).

### ***IV.1.2.4 Le système de drainage « antigénique »***

Le déclenchement d'une réponse immune adaptative implique le drainage des antigènes (Ag) et des cellules présentatrices d'Ag (CPA) à partir de l'organe lésé, le long de vaisseaux lymphatiques vers les ganglions régionaux. C'est ensuite au niveau de ces ganglions (organes lymphoïdes secondaires) que les Ag sont présentés aux LT et aux LB naïfs. L'activation, la prolifération puis la différenciation des lymphocytes spécifiques de l'Ag s'y succèdent, aboutissant à la génération de cellules effectrices et de cellules mémoires. Ces cellules quittent ensuite le ganglion et recirculent dans l'ensemble de l'organisme. Les LT effecteurs vont pouvoir retourner exercer leurs fonctions effectrices sur le site de la lésion. Parmi les cellules mémoires, on distingue les LT mémoires centraux, qui restent présents de nombreuses années et « scannent » les CPA des organes lymphoïdes secondaires prêts à réagir en cas de nouvelle rencontre avec l'Ag, et les LT mémoires effecteurs, qui jouent le même rôle mais recirculent dans les tissus. L'ensemble de ces mécanismes est essentiel pour assurer l'immunosurveillance d'un organe.

Le SNC ne possède pas de système de drainage lymphatique « conventionnel ». Mais il existe un drainage particulier de cet organe. Ainsi, le fluide interstitiel et les molécules solubles présentes dans le milieu extracellulaire du parenchyme cérébral sont drainés le long de la membrane basale des capillaires et des artères, au niveau de l'espace périvasculaire. Le drainage se poursuit ensuite vers les ganglions cervicaux (Cserr et al., 1992). Ce système de



drainage ne permet que le passage de molécules solubles et ne peut donc être emprunté par les cellules dendritiques, d'ailleurs absentes du parenchyme dans des conditions normales. Il explique en partie la formation des lésions d'angiopathie amyloïde dans la MA: le peptide A $\beta$ , drainé, présent en forte concentration au niveau périvasculaire, s'insolubilise et se dépose au niveau de la paroi des capillaires sanguins.

Un autre système de drainage du SNC est celui du LCR vers les ganglions cervicaux. Le LCR, produit par les plexus choroïdes, circule à travers les ventricules vers les espaces sous-arachnoïdiens. Il est résorbé à plusieurs niveaux. Une des voies de résorption majeures implique un passage à travers le plateau cribriforme vers les vaisseaux lymphatiques de la muqueuse nasale. Ces derniers drainent ensuite le LCR vers les ganglions cervicaux (Johnston et al., 2004). Le LCR est aussi résorbé en grande partie au niveau des villi arachnoïdiens et des granulations directement dans le flux sanguin. Les Ag et les cellules dendritiques présentes dans le LCR peuvent ainsi aussi migrer vers la rate.

Les ganglions cervicaux et la rate semblent donc être les deux sites potentiels où peuvent être initiées des réponses adaptatives dirigées contre des Ag du SNC. A l'état « basal », les ganglions cervicaux seraient plutôt tolérogènes. En effet, il a été montré qu'après injection d'ovalbumine (OVA) dans le striatum de souris sauvages, les cellules de leurs ganglions cervicaux, injectées par voie intraveineuse dans des souris naïves, étaient capables de transférer un état de tolérance vis-à-vis de l'OVA (Wenkel et al., 2000).

#### ***IV.1.2.5 L'immunosurveillance par les lymphocytes T périphériques***

La migration de cellules périphériques vers le SNC est, nous l'avons vu, très finement contrôlée par les différentes barrières qui protègent le parenchyme cérébral.

Le LCR semble être un lieu très important dans le cadre de l'immunosurveillance par les LT CD4. Les LT CD4+ mémoires constituent en effet plus de 80% des cellules présentes dans le LCR d'individus sains (Engelhardt and Ransohoff, 2005). Elles traversent assez facilement l'endothélium fenestré puis, probablement après reconnaissance d'Ag circulants présentés par les macrophages des plexus choroïdes, elles pénètrent à travers l'épithélium et ses jonctions serrées par des mécanismes de type diapédèse. Les LT CD4+ mémoires semblent circuler en « flux continu » dans le LCR, permettant ainsi le passage de nombreux lymphocytes de spécificités différentes (Engelhardt and Ransohoff, 2005). Une fois dans le LCR, ces cellules peuvent « scanner » les macrophages méningés et les cellules dendritiques

leur présentant cette fois des Ag issus du parenchyme cérébral. En absence de neuroinflammation, les LT CD4, polarisés vers un phénotype Th2, pourraient alors sécréter un certain nombre de facteurs comme l'IL-4 et l'IGF-1 (Derecki et al., 2010). En agissant sur la composition moléculaire du milieu méningé, ces cellules pourraient favoriser la production de facteurs neurotrophiques par les neurones, influencer sur le phénotype microglial et augmenter la neurogénèse, contribuant ainsi au bon fonctionnement cognitif (Schwartz and Shechter, 2010a). Cette découverte rejoint le concept d' « auto-immunité protectrice » développé par M Schwartz et J Kipnis, selon lequel les LT reconnaissant des Ag du soi prendraient part à l'homéostasie tissulaire (Schwartz and Kipnis, 2011).

Dans des conditions physiologiques, les LT CD4+ qui patrouillent dans le LCR ne pénètrent pas dans le parenchyme. On retrouve cependant des lymphocytes T, majoritairement de type CD8, en très faible quantité à l'état basal dans le parenchyme cérébral (Loeffler et al., 2011). On ne connaît pas encore très bien le mécanisme d'entrée de ces cellules, ni si elles sont spécifiques ou non d'Ag cérébraux. La fonction de ces cellules reste encore très mystérieuse. Des populations de lymphocytes mémoires spécifiques vis-à-vis de pathogènes ayant infecté le cerveau semblent capables de persister à long terme dans le parenchyme cérébral et d'assurer localement une protection contre une éventuelle réinfection (Wakim et al., 2010). Il semble même que des lymphocytes spécifiques de pathogènes présents uniquement en périphérie puissent se localiser au niveau des plexus choroïdes, des leptoméniges et du parenchyme, permettant ainsi d'empêcher l'extension de l'infection dans le SNC (Kwok et al., 2002).

## **IV.2 Réponse immune dans le SNC**

### **IV.2.1 Réponses innées**

Un certain nombre de signaux peuvent induire une activation des cellules microgliales. Ils ont tous en commun de signifier une menace pour l'intégrité structurale et fonctionnelle du SNC. On peut citer par exemple l'apparition de facteurs qui ne sont pas habituellement en contact avec la microglie (constituants plasmatiques (fibrinogène), structures microbiennes), la présence de constituants intracellulaires en forte concentration dans le milieu extracellulaire ou encore la présence de molécules dans des configurations fonctionnelles particulières (complexes immuns) ou structurellement anormales (agrégats protéiques). Ces « menaces »

sont détectées grâce à des récepteurs sur la microglie. Parmi ceux-ci, on trouve les « Pattern Recognition Receptor » (PRR) capables de reconnaître des molécules de type « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMPs) ou de type « Danger Associated Molecular Patterns » (DAMPs) exprimés respectivement sur des pathogènes ou sur des composants cellulaires dont la présence signe l'atteinte de l'intégrité tissulaire (Matzinger, 2002). L'interaction PAMPs/PRR ou DAMPs/PRR permet d'activer la microglie et d'induire la réponse immunitaire innée, qui est notamment responsable de la réaction inflammatoire.

A l'état basal, les neurones exercent sur la microglie une action inhibitrice, par contact cellulaire (interactions CD200/CD200R et CD22/CD45) ou à distance (interactions CX3CL1 (forme sécrétée)/ CX3CR1 et ICAM5 (forme soluble) /LFA1) (Ransohoff and Cardona, 2010). La microglie peut s'activer en l'absence de ces signaux inhibiteurs, c'est-à-dire dans les cas où il existe une atteinte neuronale. Elle exprime aussi des récepteurs aux neurotransmetteurs qui pourraient moduler ses fonctions (Färber et al., 2005).

Les fonctions effectrices de la microglie en termes de production de cytokines, de chimiokines, de facteurs neurotrophiques, d'espèces réactives de l'oxygène ou de dérivés nitrés, ainsi qu'en termes de propriétés de phagocytose semblent varier selon la nature du stimulus. Elles peuvent aussi être modulées lors de la phase effectrice de la réponse immune par l'interaction avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs ou mémoires. Il a en effet été montré que ces derniers étaient capables de diminuer la réponse inflammatoire, en agissant notamment sur l'inflammasome (complexe multi-protéique responsable de l'activation de caspases et de production d'IL1-β) (Guarda et al., 2009). La microglie exprime aussi certains récepteurs aux cytokines ; son activité peut être modulée par l'environnement cytokinique.

L'action de la microglie est souvent bénéfique dans un contexte de lésions du SNC sur un mode « aigu ». En effet, c'est la cellule qui va initier la réponse immunitaire innée. Elle permet d'induire l'inflammation. Cependant, après endocytose de l'antigène, la microglie ne semble pas capable, contrairement aux cellules dendritiques, de migrer vers les ganglions lymphatiques qui drainent le tissu lésé. Elle ne peut donc pas induire de réponse immune adaptative. Par contre, elle peut présenter in situ l'Ag aux lymphocytes T et contribuer à l'élimination de la cause de la rupture de l'intégrité du cerveau.

La réponse inflammatoire intense initiée par la microglie peut secondairement favoriser l'entrée de cellules myéloïdes périphériques dans le SNC. Cette entrée, inhibée à l'état basal par le TGFβ, est possible grâce à la production de CCL2 par les cellules gliales. Les cellules myéloïdes CCR2<sup>+</sup> peuvent alors traverser la barrière hémato-encéphalique, se différencier en macrophages et contribuer à la réponse immunitaire innée.

En présence d'une inflammation du SNC, le nombre de cellules dendritiques présentes dans le LCR augmente. On observe aussi l'apparition de cellules dendritiques dans le parenchyme (Fischer and Reichmann, 2001), y compris dans des contextes de maladies neurodégénératives (Rosicarelli et al., 2005). L'origine de ces cellules reste controversée : se différencient-elles in situ à partir de la microglie, migrent-elles à partir du pool présent dans les méninges et les plexus choroïdes, ou encore depuis de la périphérie ?

Des expériences d'inoculations intracérébrales ou intrathécales d'agents infectieux ont démontré une différence de « réactivité » des cellules dendritiques selon leur localisation. En effet, on observe une absence de réponse immune lorsque les pathogènes sont injectés dans le parenchyme, contrastant avec la forte réponse immune induite s'ils sont inoculés dans le LCR (Matyszak and Perry, 1997). Les cellules dendritiques présentes dans le LCR seraient donc capables de migrer et initier une réponse T dans les ganglions cervicaux alors que les cellules dendritiques présentes dans le parenchyme dans un contexte de neuro-inflammation n'auraient qu'une fonction de réactivation locale des cellules T (Pashenkov and Link, 2002).

Rappelons aussi que l'Ag peut atteindre les ganglions cervicaux et la rate selon les systèmes de drainage un peu particuliers que nous avons vu. Dans ces organes lymphoïdes secondaires, l'Ag peut être endocyté localement par les cellules dendritiques et être présenté aux LT CD4+ naïfs.

## **IV.2.2 Réponses adaptatives**

Nous avons vu qu'à l'état basal, le microenvironnement des ganglions cervicaux est plutôt tolérogène. Il est fort probable qu'en présence d'une forte inflammation cérébrale et de signaux de danger, des réponses effectrices de type Th1 Th2 ou Th17 puissent tout de même y être induites.

Il faut aussi rappeler que de nombreux pathogènes, même s'ils sont neurotropes, ont une phase de dissémination systémique avant de gagner le SNC. On peut donc imaginer qu'une réponse adaptative contre le pathogène puisse être initiée dans des ganglions périphériques.

Une fois la réponse adaptative initiée, les LT CD4+ effecteurs vont recirculer et se diriger vers les tissus lésés par un mécanisme que l'on appelle le « homing ». La voie d'entrée principale des LT CD4+ activés dans le SNC est la barrière hémato-encéphalique, au niveau des veinules post-capillaires. Les mécanismes de la traversée de cette barrière ont été bien étudiés dans un modèle murin de la sclérose en plaques : l'encéphalomyélite auto-immune

expérimentale (EAE). L'étude par microscopie intravitale à deux photons des comportements de deux populations de LT CD4, l'une spécifique d'un Ag cérébral (Myelin Basic protein, MBP) et l'autre non (ovalbumine OVA), a permis de mettre en évidence des différences entre ces deux populations (Kawakami and Flügel, 2010). Les deux types de lymphocytes effectuent des mouvements de « crawling » le long des vaisseaux méningés. Le passage à travers l'endothélium peut ensuite se faire, via des mécanismes d'extravasation encore peu définis, mettant en jeu des molécules d'adhérence, des récepteurs de chimiokines, des intégrines et des protéines couplées aux protéines G. Les lymphocytes, quelle que soit leur spécificité antigénique, arrivent donc dans l'espace périvasculaire. Après une nouvelle phase de « crawling », caractérisée par des contacts plus ou moins longs avec les macrophages périvasculaires, seuls les lymphocytes spécifiques de l'Ag cérébral semblent capables de s'activer (expression de marqueurs d'activation et relargage de cytokines) et d'entrer dans le parenchyme cérébral à travers la pie-mère et la glia limitans (Kawakami and Flügel, 2010). Reboldi et coll. ont montré que des LT autoréactifs pouvaient aussi entrer dans le parenchyme cérébral à travers les plexus choroïdes. Ce mécanisme paraît jouer un rôle important dans l'initiation de l'EAE mais relatif dans les stades ultérieurs de la pathologie (Reboldi et al., 2009).

Une fois dans le parenchyme, les LT peuvent se comporter de deux manières différentes : la plupart est très mobile, scannant les cellules présentatrices d'Ag localement. Mais une partie des cellules semble stationnaire, elles sont probablement en cours d'interaction avec des CPA leur présentant un Ag spécifique. Les LT CD4<sup>+</sup> peuvent alors s'activer, produire des cytokines pro-inflammatoires et induire la symptomatologie de l'EAE (Kawakami and Flügel, 2010).

Ces mécanismes, ici étudiés dans l'EAE, sont probablement similaires dans le cadre d'infections du SNC par des pathogènes, même si les cellules effectrices peuvent différer (LT CD8<sup>+</sup> et virus neurotropes par exemple). Dans ces deux cas, l'initiation de la réponse adaptative a eu lieu au niveau périphérique par immunisation avec des antigènes du SNC émulsifiés dans du CFA (EAE) ou par une phase de dissémination du pathogène depuis sa voie d'entrée dans l'organisme.

Mais dans le cadre de pathologies se développant spontanément au sein du SNC, sans passage périphérique, comme c'est le cas pour les tumeurs cérébrales ou la plupart des maladies neurodégénératives, l'initiation d'une réponse immune adaptative, si elle existe spontanément, met probablement en jeu des mécanismes différents. Ces pathologies sont d'autant plus complexes qu'elles ne peuvent être « combattues » par le système immunitaire

que si ce dernier est capable de reconnaître les signaux de danger et le « soi modifié », outrepassant ainsi les mécanismes de tolérance préexistants.

## **IV.3 Le système immunitaire dans la physiopathologie de la MA**

### **IV.3.1 Problématique**

#### ***IV.3.1.1 Le cas particulier des maladies neurodégénératives***

Les maladies neurodégénératives sont souvent caractérisées par des lésions qui touchent spécifiquement certaines régions cérébrales, sièges d'une réaction neuroinflammatoire et de mort neuronale. La conséquence de ces lésions peut apparaître sous forme de démence, comme dans la MA, la maladie de Creutzfeld-Jacob (MCI) ou la maladie d'Huntington (MH), ou sous des formes touchant les fonctions motrices comme dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou encore la maladie de Parkinson (MP). Les étiologies de ces pathologies sont diverses et souvent mal connues, mais elles ont souvent pour point commun une accumulation de protéines du « soi » mal conformées dans ou autour des neurones (protéine A $\beta$  et protéine Tau dans la MA,  $\alpha$ -synucléine dans la MP, protéine prion dans la MCI, Huntingtine dans la MH, mSOD dans la SLA, etc).

Dans ces pathologies, si la neuroinflammation signe bien le déclenchement d'une réponse innée dans le parenchyme cérébral, le déclenchement d'une réponse adaptative semble plus incertain. En effet, nous avons vu que l'environnement des ganglions cervicaux était plutôt « tolérogène » à l'état basal. De plus, il n'y a pas à proprement parler d'Ag « étranger » puisque la pathologie provient d'une mauvaise conformation d'une protéine du soi. Il est cependant envisageable que des cellules présentatrices d'Ag de type cellules dendritiques, recrutées par l'inflammation, puissent phagocyter les protéines mal conformées, acquérir un phénotype activé, et soient ensuite capables d'induire une réponse T CD4+ dirigée contre ces protéines dans les organes lymphoïdes secondaires. De même le drainage de l'Ag mal conformé jusqu'aux ganglions cervicaux et la rate, pourrait induire une réponse lymphocytaire B, car ces cellules reconnaissent des structures tridimensionnelles natives, et la structure formée par les protéines du soi mal conformées peut être reconnue comme du non-soi.

Dans le cadre de la MA, le peptide A $\beta$  est présent en périphérie : dans les tissus et sous forme circulante. Il ne semble pas être dans une conformation perçue comme « dangereuse » et ne paraît donc pas induire d'inflammation. Ainsi, il semble très probable que l'organisme ait développé des mécanismes de « tolérance » vis-à-vis d'A $\beta$ , comme pour tout Ag du soi, afin d'éviter le développement de pathologies auto-immunes.

#### ***IV.3.1.2 La tolérance immunitaire***

La tolérance des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vis-à-vis d'un Ag peut être induite par différents mécanismes :

- La sélection négative au niveau du thymus, lieu de l'ontogénie des lymphocytes T (tolérance « centrale »). C'est dans cet organe que sont générés et sélectionnés les LT « naïfs » en fonction d'une part de la capacité de leur TCR (issu d'un réarrangement clonal) à reconnaître les molécules de CMH du soi (sélection positive) et d'autre part de leur capacité à ne pas reconnaître les Ag du soi (sélection négative). Lors de cette dernière étape, le LT reconnaissant avec une forte affinité un Ag du soi reçoit un signal d'apoptose et subit une « délétion clonale » (Kappler et al., 1987).
- La génération de lymphocytes T régulateurs dans le thymus (« Tregs naturels » ou nTregs). Dans le cas où la reconnaissance de l'Ag du soi se fait avec une affinité moindre, le LT au cours de son développement peut, non plus subir l'apoptose, mais se différencier en lymphocyte T régulateur. Ces lymphocytes T se caractérisent par l'expression constitutive de différents marqueurs comme le CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2) le GITR (Glucocorticoid Induced TNF Receptor) ou encore le CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4). Ils expriment le facteur de transcription Foxp3, nécessaire à la fois à leur développement, leur maintenance et leur fonction (Fontenot et al., 2003).
- La génération de lymphocytes T régulateurs en périphérie (« Tregs induits » ou iTregs). Une fois mûres, les LT CD4<sup>+</sup> dits « naïfs », qui n'ont pas encore rencontrés l'antigène, sortent du thymus et passent dans le flux sanguin. Ils vont ensuite « patrouiller » dans les organes lymphoïdes secondaires à la recherche d'une cellule dendritique leur présentant l'Ag dont ils sont spécifiques. Le cas échéant, le LT pourra alors proliférer et se différencier en cellule effectrice (généralement une cellule auxiliaire (« helper ») Th). Mais les LT CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent aussi, lors de la

reconnaissance de l'Ag, se différencier en iTregs. En présence d'un microenvironnement « tolérogène » comme de fortes concentrations de TGF $\beta$  ou d'IL-10 (Chen et al., 2003), ou si la cellule présentant l'Ag exprime un phénotype immature avec une faible expression de molécules de costimulation (Wing et al., 2006), le facteur de transcription Foxp3 peut être induit dans le LT CD4. Les iTregs sont présents en forte quantité dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Ces iTregs peuvent être spécifiques d'un Ag du soi, mais ils peuvent aussi être induits en présence d'un allo-Ag ou d'un xéno-Ag.

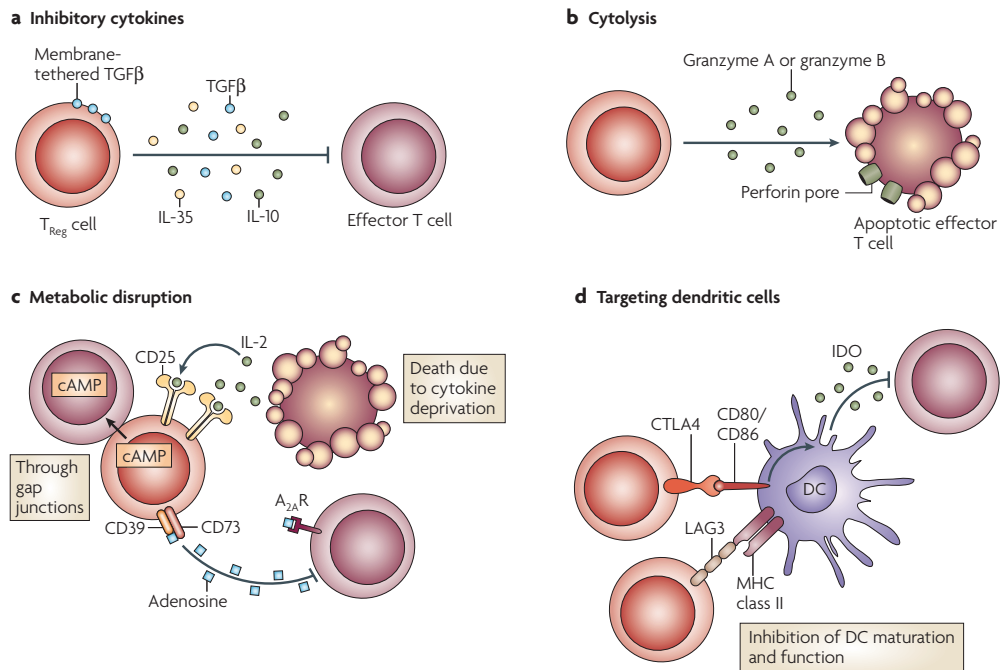
Les nTregs et iTregs agissent en périphérie pour réguler la réponse immune par différents mécanismes (cf figure 10).

En établissant des contacts cellulaires avec des cellules impliquées dans la réponse immunitaire (cellules dendritiques et LT effecteurs principalement), ils peuvent inhiber leurs fonctions. Ainsi CTLA-4, analogue de CD28, reconnaît les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 exprimées sur les cellules dendritiques : les Tregs peuvent ainsi induire l'inhibition de la sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques, ce qui limite l'expansion des LT (Dejean et al., 2009). Par ce même mécanisme, les Tregs peuvent aussi induire l'expression d'une enzyme (IDO) dans la cellule dendritique, ce qui aboutit à la génération de métabolites pro-apoptotiques responsables de la suppression des cellules effectrices (Fallarino et al., 2003).

Les Tregs peuvent également agir par la sécrétion de facteurs solubles, comme les cytokines immuno-suppressives IL-10, IL-35 ou TGF $\beta$ , cette dernière pouvant aussi agir par contact cellulaire en restant fixée à la membrane. Ils peuvent de plus inhiber la prolifération des LT effecteurs par compétition métabolique, en captant toute l'IL-2 présente dans le milieu grâce à leur forte expression du CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de haute affinité pour l'IL-2) (Vignali et al., 2008). Plus récemment des mécanismes de suppression par cytolysse ont été décrits : que l'action cytolytique étant dirigée contre les cellules T effectrices (Gondek et al., 2005) ou contre les cellules présentatrices d'Ag (Boissonnas et al., 2010). Enfin d'autres mécanismes ciblant la cellule dendritique ou les LT effecteurs ont également été mis en évidence : le récepteur LAG3 exprimé par les Tregs inhiberait la maturation des cellules dendritiques (Liang et al., 2008), la neuropiline 1 favoriserait des interactions prolongées avec les cellules dendritiques au détriment des cellules naïves (Sarris et al., 2008) et l'expression par les Tregs des ectoenzymes CD39 et CD73, générant de l'adénosine



péricellulaire permettrait d'inhiber directement les cellules T effectrices via l'activation du récepteur à l'adénosine A<sub>2A</sub>R (Deaglio et al., 2007).



**Figure 10 : Principaux mécanismes d'action des Tregs.** D'après Vignali et al, *Nat Rev Immunol* 2008

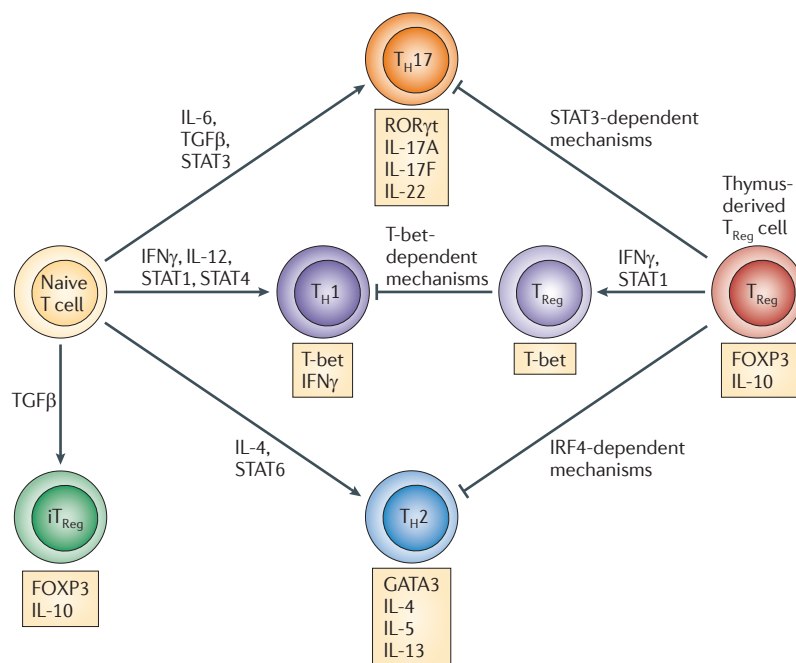
Par ailleurs, les Tregs semblent aussi capables de cibler les populations de monocytes/macrophages en favorisant leur activation vers un phénotype « alternatif » caractérisé par des fonctions essentiellement anti-inflammatoires et phagocytaires, primordiales pour la réparation tissulaire (Tiemessen et al., 2007).

Si ces nombreux mécanismes d'action ont été étudiés en détail, il reste tout de même une controverse sur la spécificité antigénique de l'action suppressive des Tregs. L'activation des Tregs semble bien dépendre d'un mécanisme spécifique de l'Ag mais de nombreuses études ont mis en évidence une action suppressive « bystander » de ces cellules au cours de la phase effectrice (Thornton and Shevach, 2000), (Li et al., 2006).

Les mécanismes d'action multiples que nous avons décrits sont probablement utilisés par des sous-populations différentes de Tregs. Il semble effectivement qu'il existe une spécialisation des populations Tregs selon leur localisation. Si les Tregs sont situés majoritairement dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS), ils sont aussi présents en forte quantité dans les tissus non-lymphoïdes même en l'absence d'inflammation (Sather et

al., 2007). On distingue des différences phénotypiques entre ces deux sous-populations de Tregs, ceux des organes lymphoïdes expriment des marqueurs plutôt caractéristiques de cellules « naïves » (CD62L+ CCR7+), alors que ceux qui migrent dans les tissus non lymphoïdes expriment fortement le CD44 (CD44hi) et semblent se comporter plutôt comme des cellules effectrices ou mémoires. Les fonctions exercées par ces deux sous-populations de Tregs sont probablement différentes : les Tregs présents dans les OLS agiraient principalement par des mécanismes mettant en jeu CTLA-4. Ils auraient un rôle important au cours de l'initiation des réponses adaptatives vis-à-vis d'un pathogène, permettant, en limitant la prolifération des LT effecteurs dans le ganglions, de favoriser la migration de ces derniers vers le site d'infection (Lund et al., 2008). Les Tregs présents ou recrutés dans les tissus non lymphoïdes joueraient quant à eux plutôt un rôle dans le contrôle de la réponse inflammatoire au niveau du site lésé (Campbell and Koch, 2011).

Au niveau fonctionnel, plusieurs études ont montré que les Tregs pouvaient utiliser des facteurs de transcription associés à un certain type de différenciation « Th » pour assurer le retour à l'homéostasie tissulaire au cours de réponses immunes orientées Th1 Th2 ou Th17 (cf figure 11).



**Figure 11 : Différenciation fonctionnelle des cellules Th et Treg.** D'après Campbell et al. *Nat Rev Immunol* 2011

Ainsi T-bet est le facteur de transcription principal contrôlant la différenciation, la migration et la fonction des cellules Th1. Des nTregs exprimant Tbet s'accumulent au site inflammatoire au cours de réponses de nature Th1 et semblent importants pour réguler la prolifération des cellules effectrices de type Th1 (Koch et al., 2009). La même chose a été montré avec le facteur de transcription IRF4 et les réponses de type Th2 (Zheng et al., 2009) ainsi qu'avec STAT3 et les réponses de type Th17 (Chaudhry et al., 2009).

Les iTregs semblent également présenter une importante plasticité au niveau fonctionnel. Un certain nombre de cytokines telles l'IL-1, l'IL-6 ou l'IL-12 peuvent induire la diminution de l'expression de Foxp3 et la reconversion de cellules iTregs en cellules effectrices pro-inflammatoires. La constatation de ce phénomène a remis en cause l'utilité des thérapeutiques utilisant des iTregs (Sakaguchi et al., 2008). La stabilité de l'expression du marqueur Foxp3 dépend de l'état de méthylation du locus : ainsi un statut de faible déméthylation des séquences non codantes de Foxp3 est associé à un phénotype instable (Floess et al., 2007). Des travaux récents dans un modèle de réaction du greffon contre l'hôte chez la souris ont démontré que des cellules dendritiques de la rate, en présence de TGF $\beta$ , pouvaient induire des iTregs spécifiques d'Ag. La majorité des iTregs ainsi induits ont un statut de déméthylation important du locus Foxp3, comparable à celui présent dans les nTregs. Ces iTregs semblent capables de persister pendant une longue période en conservant leurs propriétés immunosuppressives (Sela et al., 2011). La déméthylation du locus Foxp3 stabiliserait la cellule Treg en tant que cellule dotée de propriétés immunosuppressives, et ce même si elle devait secondairement perdre de manière transitoire l'expression de Foxp3 (Miyao et al., 2012). Ces résultats ont relancé l'espoir suscité par l'emploi de thérapeutiques utilisant les iTregs dans un certain nombre de pathologies.

D'autres populations lymphocytaires peuvent aussi exercer des fonctions régulatrices et anti-inflammatoires et semblent notamment avoir un rôle protecteur dans l'EAE telles les cellules T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> de type Tr1 (productrices d'IL-10) ou Th3 (productrices de TGF $\beta$ ) (Jadidi-Niaragh and Mirshafiey, 2011), les cellules NK (Zhang et al., 1997) ou encore les cellules NK-T (Singh et al., 2001). Leur implication dans les autres maladies neurodégénératives n'a pas été encore vraiment étudiée.

Indépendamment des systèmes de tolérance impliquant les lymphocytes, l'organisme a développé d'autres mécanismes pour réguler les réponses inflammatoires trop fortes. Parmi ceux-ci, les MDSCs (Myeloid-derived suppressor cells) jouent un rôle important. Ces cellules forment un ensemble hétérogène, qui comprend des progéniteurs de cellules myéloïdes et des cellules myéloïdes immatures. Elles sont présentes dans la moelle osseuse, mais sont très peu

nombreuses voire absentes des organes lymphoïdes secondaires à l'état basal. Dans certaines conditions pathologiques, notamment dans les cancers, les MDSCs peuvent s'accumuler dans la tumeur et les ganglions drainants où elles ont une forte capacité à inhiber les réponses T. On retrouve aussi ces cellules en grande quantité dans les organes lymphoïdes secondaires dans certaines maladies infectieuses (infection à *Mycobacterium tuberculosis*) et dans certaines maladies auto-immunes. Dans l'EAE, ces cellules semblent augmenter en proportion dans le parenchyme cérébral, parallèlement à l'inflammation (Zhu et al., 2007). Chez la souris, les MDSCs expriment les marqueurs Gr1 et CD11b. Chez l'Homme elles sont CD11b+ CD14- CD33+ (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Elles exercent leurs fonctions suppressives sur les LT par l'expression de deux enzymes : l'arginase 1 et iNOS (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Ces cellules inhibent les réponses T par la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène et de peroxy-nitrite qui, en modifiant biochimiquement le TCR, empêche la reconnaissance de l'Ag (Nagaraj et al., 2007). Les MDSCs pourraient aussi favoriser la différenciation de novo de iTregs (Huang et al., 2006). Ces cellules pourraient avoir un rôle physiologique en limitant le développement de réponses immunes excessives. En se différenciant rapidement en cellules matures, elles n'auraient alors qu'une action suppressive transitoire. Mais dans les cas d'inflammation chronique, comme dans le cancer ou dans certaines infections, leur présence prolongée maintiendrait un environnement immunosuppresseur potentiellement délétère (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

Les mécanismes de tolérance développés par l'organisme sont donc nombreux, complexes et finement régulés pour permettre le maintien de l'homéostasie tissulaire. Cependant, dans certaines pathologies chroniques, comme certaines infections, les cancers ou les maladies neurodégénératives, ces mécanismes vont certes permettre de limiter le processus inflammatoire mais peuvent aussi, en inhibant la réponse immune, empêcher l'élimination de la cause de l'inflammation.

#### ***IV.3.1.3 Réponses effectrices et régulatrices dans les maladies neurodégénératives***

Dans le cadre des maladies neurodégénératives, de nombreuses questions restent posées : une réponse immune adaptative se développe-t-elle spontanément contre les protéines mal

conformées ? Des mécanismes de tolérance existent-ils ? Quelles sont les conséquences de ces réponses effectrices et/ou tolérogènes sur la physiopathologie de la maladie ?

Des lymphocytes T ont été détectés en faible quantité dans le parenchyme cérébral de quasiment toutes les maladies neurodégénératives. La mort neuronale observée dans ces pathologies semble dépendre d'un dialogue complexe entre les neurones, qui produisent des protéines mal conformées, et la microglie. Les LT, en modulant ce dialogue, pourraient promouvoir neuroprotection ou neurotoxicité.

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est caractérisée par une faiblesse et une atrophie musculaire consécutives à l'atteinte des neurones moteurs du tronc cérébral, de la moelle épinière et du cortex cérébral. Des modèles murins transgéniques de la maladie ont été développés, basés sur l'expression de la SOD1 mutée (mSOD exprimant des mutations caractérisées dans les formes monogéniques humaines). Dans la maladie humaine ainsi que dans les modèles murins, on observe au niveau des lésions une accumulation de microglie activée, de lymphocytes T et de cellules dendritiques. L'expression de CCL2, facteur chimio-attractant à la fois des monocytes et des lymphocytes T y est forte (Appel et al., 2010). Afin de déterminer le rôle bénéfique ou délétère des LT, Beers et coll. et Chiu et coll. ont étudié la pathologie chez des souris dépourvues de LT ou dépourvues de LT CD4+ (Beers et al., 2008), (Chiu et al., 2008). De manière inattendue, ils ont constaté que, chez ces souris, la pathologie est exacerbée. La phase initiale relativement lente de la maladie est absente. Le transfert adoptif de LT effecteurs restaure cette phase initiale et prolonge la survie des souris (Banerjee et al., 2008). L'effet neuroprotecteur des T CD4+ semble s'exercer sur la microglie : ils permettraient, en effet, de favoriser un état d'activation « alternatif », anti-inflammatoire, de type M2. Une étude récente dans un modèle murin et chez des patients atteints de SLA, a démontré que cette action pouvait être médiée par des Tregs aux stades précoces de la maladie (Beers et al., 2011). D'autres auteurs ont démontré le rôle délétère du transfert adoptif de cellules monocytaires dérivées de la moelle osseuse de type M2 chez des souris mSOD. Ces cellules iraient se localiser dans la rate où elles empêcheraient le développement d'une réponse effectrice adaptée (Vaknin et al., 2011). Parallèlement, ces mêmes auteurs montrent que les patients atteints de SLA ont un taux circulant de MDSCs deux fois plus importants que des sujets sains de même âge. Ils suggèrent ainsi que des mécanismes immunosuppresseurs périphériques pourraient intervenir dans la physiopathologie de cette maladie et limiter le développement d'une réponse T potentiellement efficace.

La maladie de Parkinson (MP) est une autre maladie neurodégénérative qui se caractérise cliniquement par des tremblements, de la rigidité et un ralentissement moteur. Le processus

neurodégénératif atteint la substance noire et les neurones dopaminergiques des faisceaux nigro-striés. La présence de corps de Lewy intracytoplasmiques, contenant des protéines mal conformées ( $\alpha$ -synucléine nitrée) est aussi un élément caractéristique de la pathologie. La découverte que des neurotoxines (dont la méthylphényltetrahydropyridine, MPTP) pouvaient reproduire les symptômes de la maladie a permis le développement de modèles murins. Chez les patients atteints de MP ainsi que dans les modèles murins de la maladie, on observe une infiltration de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> au niveau des lésions (Brochard et al., 2009). Ces cellules T semblent participer au processus neurodégénératif : les souris SCID et *RAG1* <sup>-/-</sup> dépourvues de LT et de LB ainsi que les souris *TCR $\beta$*  <sup>-/-</sup>, dépourvues de LT, sont en effet en partie résistantes à l'action neurotoxique de la MPTP sur les neurones dopaminergiques (Benner et al., 2008), (Brochard et al., 2009). De plus le transfert adoptif de LT de souris immunisées avec de l' $\alpha$ -synucléine nitrée accélère la mort des neurones dopaminergiques induites par la MPTP (Benner et al., 2008). L'étude plus poussée des différentes sous-populations lymphocytaires potentiellement incriminées dans cette sensibilité à l'action neurotoxique de la MPTP, a permis de montrer le rôle délétère des LT CD4<sup>+</sup> par des mécanismes impliquant des signaux de mort cellulaire de type Fas /FasL (Brochard et al., 2009). On ne peut affirmer que l'effet délétère de ces LT CD4<sup>+</sup> est Ag-spécifique. Cependant, il semble que les ganglions cervicaux des souris traitées par la MPTP contiennent de l' $\alpha$ -synucléine nitrée et que des réponses Ac et probablement des réponses T spécifiques y soient naturellement induites (Benner et al., 2008). En revanche, de manière non Ag-spécifique, le transfert adoptif de Tregs dans des souris ayant reçu de la MPTP se traduit par un effet neuroprotecteur dû à des mécanismes encore peu définis, impliquant peut-être une interaction avec la microglie (Reynolds et al., 2007). *In vitro*, les Tregs semblent capables d'inhiber la production microgliale d'espèces réactives de l'oxygène induite par l' $\alpha$ -synucléine nitrée (Reynolds et al., 2009).

Le système immunitaire est donc impliqué dans la physiopathologie de certaines maladies neurodégénératives, comme nous venons de le voir pour la SLA et la MP. Les cellules Tregs semblent avoir un effet global neuroprotecteur, qui a été confirmé dans un certain nombre d'autres pathologies du SNC comme dans un modèle d'accident vasculaire cérébral (Liesz et al., 2009). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer l'action neuroprotectrice des Tregs dans ces modèles : leur effet sur l'orientation « anti-inflammatoire » de la microglie, l'inhibition de réponses effectrices pro-inflammatoires de type Th1 ou Th17 potentiellement délétères, et une action neurotrophique directe par

production de BDNF. Les relations système immunitaire / SNC semblent en fait relativement complexes : les neurones sont en effet eux même dotés de propriétés immunomodulatrices et pourraient induire des Tregs à partir de populations T CD4+ encéphalitogènes (Liu et al., 2006b). Il est donc crucial de prendre en compte les dialogues entre neurones, cellules gliales et LT dans leur ensemble.

D'autres auteurs soulignent cependant le rôle bénéfique de LT effecteurs « autoréactifs » vis-à-vis des Ag du SNC. Ainsi dans un modèle d'axotomie, le transfert adoptif de LT spécifiques d'Ag du SNC favorise la survie neuronale après lésion du nerf optique (Moalem et al., 1999). De même, l'immunisation de souris avec des Ag du SNC avant d'effectuer une lésion du nerf optique permet d'induire un effet neuroprotecteur sans développement de manifestations auto-immunes (Fisher et al., 2001). La nature des cellules responsables de cet effet reste controversée : certaines études semblent indiquer un rôle des LT Th1 (Kipnis et al., 2002b) alors que d'autres mettent en avant l'action de molécules solubles secrétées par des LT Th2 (Wolf et al., 2002). De ces constatations est né le concept d'« auto-immunité protectrice » développé par M Schwartz et J Kipnis (Kipnis et al., 2002a) que nous avons déjà évoqué dans le cadre de l'immunosurveillance. Selon ce concept, des LT qui reconnaissent des Ag du SNC sont dotés de propriétés neuroprotectrices. Cette réponse T serait finement régulée, notamment par les nTregs. Un défaut dans cette régulation pourrait entraîner la survenue de manifestations auto-immunes. A l'inverse, un excès de régulation pourrait inhiber l'auto-immunité protectrice nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire (Kipnis et al., 2002a). Un des mécanismes expliquant l'effet neuroprotecteur des LT autoréactifs pourrait être le recrutement de cellules monocytaires périphériques dans le SNC. Ces dernières viendraient seconder la microglie confinée dans des fonctions « neurotoxiques » et permettraient de réguler l'inflammation in situ (Schwartz and Shechter, 2010b). Les LT autoréactifs semblent aussi avoir un rôle dans la cognition : en effet, les souris ne possédant pas d'immunité adaptative montrent des déficits cognitifs et la repopulation de souris immunodéficientes avec des LT restaure leurs fonctions cognitives (Brynskikh et al., 2008). Les LT responsables de cette action bénéfique sur les fonctions cognitives semblent se localiser au niveau méningé où ils régulent le phénotype des cellules myéloïdes méningées grâce à l'IL-4 qu'ils produisent. Ils favorisent aussi la sécrétion de BDNF par les astrocytes (Derecki et al., 2010). Les LT seraient également impliqués dans la neurogénèse à l'âge adulte : en effet la neurogénèse est altérée chez les souris immunodéficientes et ne peut être améliorée par l'« enrichissement environnemental » contrairement à ce que l'on observe chez les souris sauvages. La neurogénèse est restaurée et facilitée après transfert de LT spécifiques

d'un Ag cérébral. Ces LT semblent aussi jouer un rôle dans la plasticité de l'hippocampe et l'apprentissage ainsi que dans la production de BDNF au niveau du gyrus denté (Ziv et al., 2006). Une étude plus poussée a ensuite montré, grâce à des expériences d'élimination et de transfert de différentes populations lymphocytaires, que c'étaient les LT CD4+ qui possédaient cette fonction de contrôle de la neurogénèse hippocampique. Ni la spécificité vis-à-vis d'un Ag cérébral ni la localisation cérébrale de ces cellules ne semblent requises pour assurer cet effet. Les auteurs proposent que l'activité systémique des LT CD4+ suffirait à maintenir la plasticité cellulaire dans l'hippocampe à l'âge adulte (Wolf et al., 2009a). Ces mêmes auteurs ont ensuite cherché à comprendre le lien entre l'activation du système immunitaire périphérique et la biologie des précurseurs neuronaux : ils ont pu montrer que le taux de glucocorticoïdes présents dans l'hippocampe dépendait de l'état inflammatoire périphérique et influait sur la neurogénèse (Wolf et al., 2009b). Plus récemment, des études génétiques effectuées sur des souris « outbred » ont démontré une corrélation entre la capacité de prolifération des cellules de l'hippocampe et le ratio de LT CD8/CD4+ circulants. Ces travaux ont confirmé l'hypothèse d'un rôle des LT CD4+ dans la neurogénèse (Huang et al., 2010).

L'ensemble de ces études montre bien qu'il existe un dialogue entre le système immunitaire et le SNC. Ce dialogue peut avoir lieu au niveau des méninges ou de l'hippocampe mais les cellules T, bien que présentes, sont rares à l'état basal dans ces localisations anatomiques. Le SNC semble également réagir à des médiateurs solubles, relargués par les cellules T et/ou d'autres leucocytes en périphérie.

#### ***IV.3.1.4 Facteurs solubles : échange entre le SNC et le système immunitaire périphérique***

Le SNC communique avec la périphérie grâce à des facteurs solubles. Nous avons déjà vu le rôle que pouvaient avoir les chimiokines produites au niveau du SNC pour permettre l'entrée des cellules mononuclées dans le parenchyme cérébral.

A l'inverse, les cellules du système immunitaire (SI) périphérique peuvent influencer sur le SNC par les médiateurs qu'elles produisent. Les cytokines et les médiateurs de l'inflammation produits en périphérie peuvent, après passage dans le sang, agir sur l'endothélium vasculaire cérébral et les macrophages périvasculaires. Ils peuvent aussi avoir une action directe sur le parenchyme cérébral au niveau des organes circumventriculaires



(Perry et al., 2007). Ainsi, l'inflammation périphérique pourrait concourir à la pathogénèse des maladies neurodégénératives. Plusieurs études ont pu montrer son rôle délétère sur les troubles cognitifs, la neuroinflammation, le processus neurodégénératif et même sur les troubles neuropsychiatriques observés dans certaines maladies neurodégénératives, dont la MA (Perry et al., 2007), (Holmes et al., 2003), (Holmes et al., 2011).

Le vieillissement est aussi associé à une modification de la composition du milieu « systémique » et certaines molécules présentes en grande concentration (dont des chimiokines telle CCL11) auraient un effet négatif sur la neurogénèse et les fonctions cognitives (Villeda et al., 2011).

#### ***IV.3.1.5 Maladies neurodégénératives et immunosénescence***

Un des points communs des maladies neurodégénératives, dans leurs formes sporadiques, est que leur facteur de risque principal est l'âge. L'âge entraîne par lui-même un déclin des fonctions cognitives mais il altère aussi les fonctions du système immunitaire : c'est l'immunosénescence. Nous avons vu les interconnexions importantes qui existaient entre système immunitaire et SNC et l'hypothèse d'une contribution de l'immunosénescence dans l'émergence des maladies neurodégénératives a été proposée. Le vieillissement entraîne une perte de régulation des mécanismes de réparation et de maintien de l'homéostasie tissulaire, aboutissant à une augmentation du stress oxydant, à l'apparition de lésions de l'ADN et à l'accumulation de molécules non dégradées qui deviennent potentiellement toxiques. Au niveau cérébral, l'augmentation des concentrations en calcium et l'augmentation de la toxicité médiée par le glutamate sont notamment des éléments qui contribuent au dysfonctionnement cognitif. En parallèle, l'immunosénescence, en limitant les fonctions de l'immunité adaptative dans la neurogénèse hippocampique, concourt aussi au processus de vieillissement cérébral (Ron-Harel and Schwartz, 2009).

D'un point de vue systémique, l'immunosénescence se traduit également par un état d'inflammation chronique à bas bruit que Franceschi et coll ont appelé « inflamm-aging » (Franceschi et al., 2000). Cet état semble lié à une augmentation de l'activation des cellules phagocytaires mononucléées concomitante à un déclin de l'immunité adaptative. Les altérations du fonctionnement du système adaptatif semblent en partie liées à la diminution du nombre de cellules avec l'âge. Ainsi le thymus, organe permettant le renouvellement du pool de LT naïfs, s'atrophie avec l'âge. On constate une diminution du répertoire T passant de  $10^8$

clones chez l'adulte jeune à  $10^6$  chez le sujet âgé (Goronzy and Weyand, 2005). Dans la moelle osseuse, le compartiment hématopoïétique diminue et est remplacé par du tissu adipeux : ceci se traduit par une diminution des progéniteurs de la lignée B (Allman and Miller, 2005). En périphérie, on observe une diminution de la diversité du répertoire B et une augmentation du taux d'auto-Ac (Weksler, 2000) associés à un risque accru de lymphoprolifération B maligne (Weksler and Szabo, 2000).

Une modification de l'architecture des organes lymphoïdes secondaires est aussi observée : elle consiste en une diminution de la cellularité lymphocytaire et une diminution de la capacité à répondre à la stimulation par un Ag. Le déclin dans la capacité de réponse des T CD4<sup>+</sup> naïfs semble plutôt lié à l'âge des cellules elles-mêmes qu'à celui de l'individu. En effet les divisions homéostatiques des cellules naïves seraient délétères pour leur fonctionnalité (Swain et al., 2005). La fonction auxiliaire des cellules T CD4<sup>+</sup> pour le « help » aux cellules B semble aussi diminuée (Swain et al., 2005). Par contre, les cellules mémoires semblent peu touchées par les phénomènes d'immunosénescence (Kovaiou et al., 2005).

Au cours du vieillissement, on observe également une augmentation du nombre et de l'activité des cellules suppressives périphériques (Tregs et MDSCs) (Ron-Harel and Schwartz, 2009). La densité des cellules présentatrices d'Ag dans les tissus diminue avec l'âge. Elles expriment plus faiblement les molécules de CMH-II (Herrero et al., 2001).

Mais malgré l'augmentation de ces fonctions suppressives, l'effet global dû au « relâchement » du rétro-contrôle de l'immunité adaptative sur l'immunité innée (Guarda et al., 2009) induit l'hyperactivation de certaines réponses pro-inflammatoires. Et la production exacerbée de certaines cytokines pro-inflammatoires contribue grandement à la pathogénie dans les maladies neurodégénératives.

La sénescence du système immunitaire a d'autant plus de conséquences sur le SNC que, nous l'avons vu, ces deux systèmes sont étroitement intriqués et engagent un dialogue permanent pour maintenir l'homéostasie cérébrale. Ces constatations motivent les perspectives immunothérapeutiques dans les maladies neurodégénératives. En effet, stimuler correctement le système immunitaire pour pouvoir bénéficier à la fois de ses fonctions neuroprotectrices et de la spécificité antigénique de son action permettrait d'éliminer les protéines mal conformées du SNC tout en restaurant les fonctions cognitives.

## IV.3.2 Les données actuelles sur l'immunité dans la MA

### IV.3.2.1 Réponse « innée » dans la MA

La microglie exprime un certain nombre de récepteurs capables de détecter les peptides A $\beta$ . Ces récepteurs appartiennent à la famille des « Pattern Recognition Receptor » (PRR) déjà évoqués précédemment. Parmi les PRR capables de reconnaître A $\beta$  sous forme agrégée, on trouve des récepteurs membranaires, les « Toll-like receptor » (TLR) dont TLR4 associé à CD14 et MD2 sur la microglie, TLR2 (Tahara et al., 2006) et l'hétérodimère TLR4/TLR6 en présence de CD36 (Stewart et al., 2010). Les peptides A $\beta$  se fixent aussi sur le récepteur de type scavenger RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), dont l'expression est augmentée sur les cellules gliales, les neurones et l'endothélium vasculaire dans un environnement pro-oxydant, comme c'est le cas dans la MA. Le récepteur NALP3 est un PRR intracellulaire de la famille des NLRs (NOD-Like Receptors). Dans la microglie, les oligomères et les fibrilles d'A $\beta$  induisent des lésions lysosomales et stimulent NALP3, présent dans le cytosol. La mise en jeu de NALP3 induit l'activation de caspases, la production d'IL1 $\beta$  et l'apoptose cellulaire (Halle et al., 2008). A $\beta$  pourrait aussi activer la microglie via le récepteur purinergique P2X7 (Sanz et al., 2009).

Les plaques amyloïdes semblent également capables d'activer le système du complément. Les anaphylatoxines C5a et C3a générées au cours de son activation peuvent attirer et activer la microglie et les macrophages autour des plaques, et la fixation du C3b sur A $\beta$  favoriserait son élimination par phagocytose (Maier et al., 2008).

La diminution de la « régulation » de la microglie par les neurones, du fait de la perte neuronale, concourt aussi à l'activation des cellules microgliales. Parmi ces mécanismes, le signaling induit par la fixation de la fractalkine (CX3CL1) sécrétée par les neurones sur son récepteur microglial (CX3CR1) semble jouer un rôle important. Ainsi, les modèles murins de la maladie dépourvus de récepteur CX3CR1 présentent une altération de l'activation microgliale, qui se traduit par une diminution de leur recrutement autour des plaques et une diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (CCL2 et TNF $\alpha$ ). Paradoxalement, la microglie de ces souris possède des propriétés de phagocytose et de production d'IL-1 $\beta$  augmentées (Lee et al., 2010).

Il semble en fait que l'activation de la microglie passe par plusieurs étapes. Dans un premier temps, des capacités accrues de phagocytose permettraient de limiter l'extension de la

pathologie amyloïde, ayant ainsi un effet bénéfique sur la pathologie. Mais ces fonctions phagocytaires seraient très rapidement perdues au profit d'une forte production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Cette hyperproduction de médiateurs de l'inflammation entretiendrait un processus inflammatoire chronique contribuant au processus neurodégénératif et à la mort neuronale. De plus, dans un tel contexte, les astrocytes « réactifs » ne seraient plus capables de remplir leurs fonctions métaboliques et neurorégulatrices (Steele and Robinson, 2012). Les astrocytes semblent aussi être partie prenante du processus neuroinflammatoire car ils expriment aussi des PRR capables de reconnaître les peptides A $\beta$ , comme TLR2, TLR4 ou RAGE, ainsi que des récepteurs aux facteurs du complément. Ils peuvent aussi sécréter en excès des neurotrophines telle S100 $\beta$  aussi appelée facteur d'extension des neurites. Ils favoriseraient ainsi la formation de neurites dystrophiques autour des plaques (Mrak et al., 1996).

L'hyperproduction de CCL2 par les cellules gliales entraînerait le recrutement de leucocytes circulants (monocytes et lymphocytes). Dans la MA, ce recrutement de cellules périphériques reste controversé, du fait de la difficulté à pouvoir différencier la microglie des macrophages infiltrants. Un biais expérimental peut être introduit par l'irradiation, employée dans les études utilisant des chimères de moelle osseuse pour tenter de répondre à cette question. En altérant la BHE, l'irradiation favorise en effet l'entrée des cellules depuis la périphérie. Plusieurs études ont cependant pu mettre en évidence un rôle bénéfique du CCL2 (et donc potentiellement d'un recrutement de cellules périphériques) dans la MA: des modèles murins CCR2-KO présentent en effet une pathologie amyloïde exacerbée (El Khoury et al., 2007) et des troubles cognitifs plus sévères que les souris contrôles (Naert and Rivest, 2011).

D'autres auteurs ont utilisé un modèle de souris APPPS1 exprimant un gène suicide dans lequel la thymidine kinase (TK) de l'herpes virus (HSV) est régulée par le gène du CD11b (Simard et al., 2006). Ils ont ainsi montré que l'injection de ganciclovir dans les ventricules cérébraux élimine uniquement la population CD11b située en dehors de la barrière hémato-encéphalique. Devant une augmentation importante de la taille et du nombre de plaques amyloïdes, les auteurs ont conclu que les macrophages recrutés depuis la périphérie jouaient un rôle très important pour éliminer les plaques et/ou limiter la formation des dépôts. Ces résultats corroboraient d'autres données suggérant que la microglie phagocytait peu les dépôts amyloïdes (Stalder et al., 2001). Cependant trois ans plus tard, d'autres travaux utilisant un modèle similaire mais non identique de souris HSV-TK pour détruire les cellules CD11b<sup>+</sup> montraient que, dans leur modèle, les macrophages mais aussi la microglie étaient

éliminés par le traitement au ganciclovir et que ce dernier n'avait aucun effet sur la taille ou le nombre des plaques (Grathwohl et al., 2009). La fonction de la microglie et des phagocytes recrutés dans l'élimination des plaques amyloïdes devenait à nouveau source de controverse.

Plus récemment, d'autres travaux ont à nouveau souligné l'importance du couple CCR2/CCL2 dans l'élimination des peptides A $\beta$ . En accord avec les résultats précédents, les cerveaux des souris avec une microglie non fonctionnelle ou dépourvue de phagocytes dérivés de la moëlle osseuse dans le parenchyme ne montraient pas de variation ni du nombre de plaques ni du taux d'A $\beta$  cérébral. En revanche, la restriction du déficit en CCR2 aux macrophages périvasculaires se traduisait par un défaut d'élimination d'A $\beta$  et une augmentation de l'angiopathie amyloïde (Mildner et al., 2011). Ainsi, à travers l'ensemble de ces études dans les modèles murins, il semble que les différents types de phagocytes mononucléés présents dans le SNC aient des capacités variables à éliminer le peptide A $\beta$ .

#### ***IV.3.2.2 Inflammation périphérique dans la MA***

Nous l'avons vu, la microglie peut être sensible à l'état inflammatoire périphérique de l'organisme et le processus neurodégénératif peut être accéléré en présence d'inflammation systémique.

Les patients atteints de MA semblent être dans un état d'« hyper-inflammation » périphérique comparé à des sujets de même âge : des analyses sur les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) ont montré une tendance de ces cellules à produire un excès d'IL1 $\beta$  et d'IL-6 (Reale et al., 2005).

Des investigations à visée épidémiologique ont documenté un effet protecteur de l'exposition à des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens sur le délai d'apparition de la maladie (In t' Veld et al., 2001). Cependant, de manière décevante, les essais cliniques débutés ultérieurement n'ont pas pu montrer d'effet de ces médicaments sur la progression d'une MA déjà établie (Firuzi and Praticò, 2006).

### ***IV.3.2.3 Réponses immunitaires « adaptatives » dans la MA***

#### **IV.3.2.3.1 Réponses lymphocytaires T**

La présence de LT dans le cerveau des patients atteints de MA suggère que le système immunitaire adaptatif n'est pas complètement « aveugle » aux événements physiopathologiques. Ces cellules sont essaimées de manière éparse dans le parenchyme et ne sont probablement que le reflet d'une immunosurveillance accrue, induite par la neuroinflammation intense qui se développe. Il faut tout de même remarquer que le nombre de LT dans le parenchyme semble varier considérablement d'un individu à l'autre. Et selon les patients, leur distribution est inégale : chez certains, ils s'accumulent essentiellement dans l'hippocampe, l'amygdale et le cortex entorhinal. Les LT ne colocalisent pourtant pas avec les dépôts amyloïdes ou les DNFs. On n'observe pas non plus de corrélation entre le nombre de lymphocytes T et le stade de la maladie (stades de Braak et Braak). Les 2/3 des LT présents dans le parenchyme semblent être CD8+ et 1/3 être CD4+, de phénotype mémoire CD45RO+, n'exprimant ni le marqueur d'activation CD25 ni le marqueur de prolifération Ki67. (Togo et al., 2002). Dans les modèles murins de la maladie une augmentation du recrutement de cellules T a aussi été constatée.

Un certain nombre de travaux soulignent le rôle bénéfique que certaines cytokines pourraient jouer dans la physiopathologie de la MA. Ainsi l'IL-4 permettrait de diminuer la micro- et l'astrogliose, d'inhiber l'agrégation d'A $\beta$ , d'augmenter la neurogénèse et d'améliorer l'apprentissage spatial (Kiyota et al., 2010). L'IL-10 semble dotée de propriétés comparables et permet aussi l'amélioration des fonctions cognitives dans un modèle murin de la maladie (Kiyota et al., 2011). Le TGF $\beta$  semble lui aussi posséder des fonctions neuroprotectrices (Tesseur et al., 2006). L'IFN $\gamma$  permet une activation optimale de la microglie et favorise la phagocytose d'A $\beta$  en activant la cascade du complément. Il permet aussi le recrutement de monocytes périphériques dans le parenchyme (Chakrabarty et al., 2010).

Cependant, aucun de ces travaux n'a pu mettre en évidence de mécanisme spécifiquement dirigé contre A $\beta$ . La question même de l'existence d'une réponse adaptative anti-A $\beta$  spontanée reste entière. En 1996, une première étude n'a pas permis de mettre en évidence de réponse T vis-à-vis des peptides de l'APP chez les patients atteints de MA (Trieb et al., 1996). Cependant, en 2003, Monsonego et coll. mettent au point un protocole plus sensible avec

double stimulation des lymphocytes par de fortes concentrations d'A $\beta$  et en présence de faibles doses d'IL-2 à une des étapes. Ils arrivent ainsi à mettre en évidence une prolifération accrue des LT en présence d'A $\beta$  chez les patients et les sujets âgés (Monsonogo et al., 2003). D'autres auteurs montreront ensuite qu'en stimulant des PBMCs en présence d'A $\beta$ , les LT CD4+ des patients atteints de MA expriment, en plus grande proportion, le marqueur de prolifération Ki67 (Saresella et al., 2011b). Les LT CD4+ de ces patients expriment aussi en plus grande fréquence le facteur de transcription ROR $\gamma$  et les cytokines IL-21 et IL-22. Un biais « Th17 » semble donc exister chez ces patients, même si la spécificité anti-A $\beta$  de ces LT CD4+ Th17 n'a pas été clairement démontrée. Les LT CD4+ qui répondent à l'A $\beta$  chez les patients atteints de MA expriment en forte proportion des marqueurs de cellules effectrices mémoires, contrairement aux sujets contrôles de même âge (Saresella et al., 2011a). Ceci laisse supposer l'existence d'une réponse T anti-A $\beta$  spontanée chez les patients.

#### **IV.3.2.3.2 Réponses humorales**

Un certain nombre d'études ont mis en évidence la présence d'Ac « naturels » dirigés contre les formes « amyloïdes » du peptide A $\beta$ . En effet, le sérum humain semble contenir des Ac qui reconnaissent les structures fibrillaires amyloïdes dans leur ensemble (épitope conformationnel) que celles-ci soient composées de chaîne légère d'immunoglobuline, de protéines SAA, de préalbumine ou de peptides A $\beta$ . Ces Ac ne reconnaissent pas les protéines correspondantes dans leur forme native non fibrillaire. Ils semblent capables d'inhiber la formation des fibrilles *in vitro* et même de les éliminer *in vivo* dans un modèle expérimental d'amylose AL (à chaînes légères d'Ig) (O'Nuallain et al., 2006). Dans la maladie d'Alzheimer, des autoanticorps naturels anti-A $\beta$  pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie: on en retrouve fixés sur les plaques amyloïdes (Kellner et al., 2009).

D'autres auteurs ont constaté que des Ac reconnaissant la partie C terminale d'A $\beta$ , masquée lors du processus d'oligomérisation et de formation des fibrilles, étaient présents en plus faible quantité chez les patients atteints de MA que chez les sujets sains de même âge (Weksler et al., 2002). Ces Ac, qui reconnaissent donc principalement les monomères, les dimères et les trimères d'A $\beta$ , semblent capables de diminuer la toxicité du peptide mais ne permettent pas l'élimination des dépôts amyloïdes. L'administration de ce type d'Ac induit une amélioration des performances cognitives dans des modèles murins de la maladie (Dodel et al., 2011).

Les techniques de détection des Ac diffèrent d'une étude à l'autre : O'Nuallain et coll. utilisent des colonnes d'affinité contenant des fibrilles de différentes protéines amyloïdes. Kellner et coll. détectent les Ac anti-A $\beta$  dans le sérum des patients à l'aide de techniques d'immunohistochimie : ils ne mettent ainsi en évidence que les Ac capables de fixer des dépôts amyloïdes. Dodel et coll. utilisent une colonne d'affinité contenant de l'A $\beta$ 1-40 : ceci favorise la mise en évidence des Ac reconnaissant des formes mono- et/ou oligomériques d'A $\beta$ . Ces différences techniques peuvent ainsi expliquer la diversité des résultats obtenus. Il émerge cependant, de l'ensemble des données, la notion que des Ac circulants sont capables de reconnaître A $\beta$  dans ses différentes formes à la fois chez les sujets « sains » et les patients atteints de MA.

Récemment, des auteurs ont mis au point une technique ELISA permettant de quantifier les Ac totaux anti-oligomères d'A $\beta$  présents dans le sérum humain grâce à un traitement préalable des échantillons à l'acide (Britschgi et al., 2009). Cette étape permet en effet la dissociation des complexes Ag-Ac. Ainsi, il a été mis en évidence que la fraction totale des IgG anti-oligomères était plus importante chez les patients au stade MCI évoluant vers une MA que chez les patients au stade MCI qui restaient cliniquement stables (Storace et al., 2010).

En utilisant la même technique, notre équipe a montré que le taux des Ac totaux anti-oligomères d'A $\beta$  différait selon la forme clinico-pathologique de la maladie : ainsi les patients avec un forme « typique » de MA avaient des taux plus élevés que les patients qui présentaient une forme atypique de MA (atrophie corticale postérieure). Ces données suggèrent que des réponses anticorps anti-A $\beta$  différentielles pourraient contribuer à moduler la présentation clinique de la maladie (Dorothee G et al., Arch Neurol, 2012).

Le système immunitaire des patients semble donc réagir face à la pathologie, notamment vis-à-vis de la formation des dépôts amyloïdes. Les modalités d'induction d'une réponse adaptative anti-A $\beta$  restent cependant obscures. Les mécanismes de tolérance, s'ils existent, n'ont pas non plus été étudiés de manière approfondie. Dans les modèles murins de la MA, aucune étude, pour le moment, ne relate l'existence d'une réponse immunitaire adaptative anti-A $\beta$  spontanée. Des expériences d'immunisation par A $\beta$  suggèrent cependant l'existence d'un certain état de tolérance vis-à-vis d'A $\beta$  dans les modèles APP transgéniques (Monsonogo et al., 2001).



#### ***IV.3.2.4 Immunosénescence et MA:***

Dans des modèles murins de la MA, des études sur des souris âgées ont mis en évidence que la microglie perdait progressivement ses fonctions, subissant, avec l'âge, une diminution d'un facteur 2 à 5 de l'expression des récepteurs scavengers liant les peptides A $\beta$  (SRA, CD36 et RAGE) et des enzymes capables de les dégrader (neprilysine, insulin degrading enzyme (IDE), etc). Par contre, la microglie produit des quantités au moins deux fois plus importantes de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ . Ainsi, si initialement la microglie semble jouer un rôle neuroprotecteur grâce à sa forte propension à dégrader l'A $\beta$ , avec le vieillissement et/ou l'évolution de la pathologie, son phénotype se modifie et son action devient délétère à travers les médiateurs qu'elle relargue, qui favorisent la neuroinflammation et la neurodégénérescence (Hickman et al., 2008).

Les fonctions du système immunitaire adaptatif semblent aussi particulièrement altérées chez les patients atteints de MA, si on les compare aux sujets de même âge. L'environnement inflammatoire présent en périphérie chez les patients semble influencer sur le phénotype et la fonctionnalité des LT CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  : ils expriment notamment moins fortement la molécule PD1. L'interaction PD1 sur les LT CD4<sup>+</sup> avec PDL1 sur les CPA, qui a un rôle physiologique important dans les processus de maintien de la tolérance vis-à-vis des autoAg et de régulation de l'inflammation, semble donc défectueuse chez les patients atteints de MA (Saresella et al., 2011b). Une autre étude semble cependant indiquer une activité suppressive accrue des Tregs chez les patients atteints de maladies neurodégénératives (MA et MP) par rapport aux sujets sains de même âge (Rosenkranz et al., 2007).

Les LT CD4<sup>+</sup> des patients expriment aussi en plus grande fréquence le marqueur d'immunosénescence KLRG1 comparativement aux sujets contrôles (Pellicanò et al., 2012).

Les réponses Ac anti-A $\beta$  spontanées, que nous avons vues comme probablement dotées de propriétés neuroprotectrices, semblent diminuer avec l'âge et l'évolution de la maladie (Britschgi et al., 2009), rendant probablement ainsi les sujets âgés plus susceptibles à l'amylose cérébrale.

Le vieillissement semble donc être un frein au développement d'une réponse immunitaire innée efficace. Il limite aussi probablement la réponse adaptative spontanée. Dans ce contexte, les perspectives thérapeutiques de vaccination apparaissent comme une alternative de choix, car réintroduire l'A $\beta$  en présence d'adjuvants de vaccination permettrait, en

(re)stimulant le système immunitaire adaptatif de manière appropriée, d'empêcher la pathologie amyloïde de se développer.

# **OBJECTIFS ET RESULTATS**

## **I) Objectifs**

Mon travail s'est articulé autour de deux thématiques principales. La première a concerné l'étude des facteurs génétiques qui peuvent influencer sur la nature et l'amplitude des réponses vaccinales T CD4+ anti-A $\beta$  chez la souris. La seconde a consisté à évaluer, dans un modèle murin de la MA, l'impact des réponses T CD4+ et plus particulièrement des réponses T régulatrices dans la physiopathologie.

### **I.1 Facteurs génétiques influençant la nature et l'amplitude des réponses vaccinales T CD4+ anti-A $\beta$**

Au cours de l'introduction, nous avons vu que les traitements actuels de la MA étaient peu efficaces, et que parmi les perspectives thérapeutiques, l'immunothérapie anti-A $\beta$  faisait partie de celles qui apportaient les résultats les plus encourageants. Dans plusieurs modèles murins, la vaccination par A $\beta$  a permis une diminution franche de la pathologie amyloïde ainsi que des améliorations indiscutables sur le plan cognitif. Chez l'Homme, les résultats ont été mitigés. Les patients ont développé des réponses vaccinales très hétérogènes. Une réduction du nombre de plaques amyloïdes a toutefois été observée chez certains malades. En revanche, sur le plan clinique, les effets n'ont été que très modestes.

L'essai AN1792 a aussi mis en évidence les difficultés de la vaccination contre un Ag du soi et les risques de rupture de tolérance que cela entraîne. Ainsi 6% des patients ont développé une méningo-encéphalite, probablement d'origine auto-immune. Les études neuropathologiques ont semblé incriminer les lymphocytes T dans ces effets secondaires. Aussi, les essais cliniques se sont recentrés sur l'immunothérapie passive ou sur la vaccination mais en engageant exclusivement la réponse humorale. Cette approche a cependant des limites car elle ne cible pas toutes les formes d'A $\beta$ , et notamment les formes oligomériques les plus toxiques. Son efficacité est très faible et elle ne paraît pas non plus dénuée d'effets secondaires.

Dans le contexte de la MA, il nous semble essentiel de ne pas écarter tout le volet de la réponse immunitaire que constituent les réponses T CD4+. Ces cellules sont de véritables « chefs d'orchestre » des réponses immunes, nécessaires au développement de réponses B et T CD8+ efficaces mais aussi capables d'interagir in situ avec les cellules gliales (microglie et

astrocytes) et les neurones. Elles peuvent aussi influencer directement la neurogénèse et la cognition.

De plus, plusieurs travaux chez la souris ont démontré que les LT CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  pouvaient contribuer à l'élimination des plaques. Certains suggèrent que le transfert adoptif de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th2 serait bénéfique (Ethell et al., 2006). Ces cellules pourraient agir sans infiltrer le parenchyme cérébral, par un mécanisme périphérique faisant peut-être intervenir le GM-CSF, cytokine importante pour l'homéostasie des phagocytes mononucléés (microglie, monocytes et macrophages) (Cao et al., 2009). D'autres travaux, dans un modèle murin de la maladie surexprimant de l'IFN $\gamma$  au niveau cérébral et immunisé avec de l'A $\beta$  42 émulsifiée dans du CFA en présence de toxine pertussique (fragilisant la BHE et permettant l'entrée des cellules dans le SNC), suggèrent que des LT CD4<sup>+</sup> peuvent entrer dans le parenchyme cérébral, se localiser autour des plaques, activer la microglie et favoriser l'élimination de plaques (Fisher et al., 2010). Les LT CD4<sup>+</sup> semblent donc avoir un réel potentiel thérapeutique.

Il s'agit dès lors de déterminer les facteurs qui déterminent les caractères bénéfiques ou délétères des réponses vaccinales T CD4<sup>+</sup> pour le patient. Ceci permettra d'optimiser l'efficacité vaccinale et de limiter les effets secondaires. Dans ce contexte, la composition (nature des adjuvants) et la voie d'administration du vaccin sont des paramètres importants à étudier car ils conditionnent la nature des réponses effectrices T CD4<sup>+</sup> induites contre A $\beta$ . Un certain nombre de travaux dans ce domaine ont ainsi déjà montré le rôle bénéfique des LT CD4<sup>+</sup> de type Th2.

En revanche, peu de travaux se sont attachés à déterminer les facteurs liés à l'hôte. La majorité des études effectuées dans les modèles murins ont été réalisées dans un seul fond génétique : la souris C57BL/6, alors qu'on sait, par expérience, que les facteurs génétiques sont une source très importante de variation dans la nature, l'amplitude et l'efficacité des réponses vaccinales.

Nous avons ainsi cherché à déterminer les facteurs génétiques qui pouvaient avoir un effet sur l'amplitude de la réponse vaccinale anti-A $\beta$ . Nous nous sommes dans un premier temps focalisés sur le rôle du CMH de type II (H-2 chez la souris) car il conditionne le développement des réponses T CD4<sup>+</sup>. En effet, contrairement aux lymphocytes B qui reconnaissent l'Ag dans une conformation « native », les LT CD4<sup>+</sup> ne reconnaissent qu'un épitope antigénique, issu de l'apprêtement intracellulaire de la protéine antigénique, présenté sur une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Chez l'Homme, le CMH est dénommé HLA (Human Leucocyte Antigen). Le CMH-II correspond

aux molécules HLA-DP, -DQ et -DR. Seules les cellules dites présentatrices d'Ag (CPA) sont capables d'endocyter l'antigène, de le dégrader en peptides et de présenter les complexes CMH-II-peptide aux LT CD4+. Parmi les CPA, on retrouve les lymphocytes B mais surtout des cellules de la lignée myéloïde dont les macrophages, les cellules dendritiques et la microglie.

Seul un petit nombre de peptides, d'une taille comprise entre 15 et 25 acides aminés, issus de la dégradation intracellulaire d'une protéine antigénique, sont capables de se fixer sur les molécules de CMH-II. Ces dernières possèdent une poche, dénommée sillon, dans laquelle s'insère le peptide. L'interaction entre les deux molécules n'est stable que grâce à l'établissement de liaisons hydrogènes entre différents acides aminés dans des positions bien précises (notion de résidus d'ancrage). Ainsi pour chaque protéine antigénique, un nombre restreint de peptides peut être présenté sur une molécule de CMH-II donnée. De plus, ce nombre de peptides varie selon la nature des allèles HLA que possède l'individu. Chaque individu dispose de 6 à 8 molécules de CMH-II différentes (2 molécules HLA-DP, 2 molécules HLA-DQ et entre 2 et 4 molécules HLA-DR). Nous comprenons bien alors pourquoi chaque individu répond différemment à la vaccination par une protéine donnée. Ces différences de réponses ne peuvent être qu'accentuées dans le cas du peptide A $\beta$ , qui ne possède que 42 acides aminés.

Ces problématiques n'ont que peu été étudiées chez la souris car les lignées de souris utilisées en recherche expérimentale sont généralement de type « inbred », c'est-à-dire que toutes les souris d'une même lignée, à force de croisements répétés entre elles, sont génétiquement identiques (syngéniques). Une lignée de souris peut ainsi être assimilée à un individu unique sur le plan génétique. La réponse vaccinale dans une lignée donnée peut ainsi être complètement différente de celle observée dans une autre lignée, et la variabilité inter-individuelle qui sera observée chez l'homme ne peut donc pas être appréhendée lors d'expériences sur une seule lignée murine syngénique.

L'originalité de notre travail a été de travailler dans 5 lignées différentes de souris sauvages (souris C57BL/6, SJL/J, CBA/J, BALB/c et DBA/1). La comparaison des réponses vaccinales dans ces lignées nous a permis d'appréhender l'impact des variabilités génétiques individuelles sur les réponses T CD4+ induites après vaccination par le peptide A $\beta$ .

La comparaison des réponses vaccinales entre les souris C57BL/6 et les souris B6.H-2<sup>s</sup>, qui possèdent le fond génétique C57BL/6, à l'exception du locus H-2 qui provient des souris SJL/J, nous a permis d'étudier l'influence des facteurs génétiques indépendants du CMH. Grâce à l'utilisation d'un Ac monoclonal anti-CD25 (clone PC61) permettant

d'inactiver les lymphocytes T régulateurs, nous avons pu étudier plus spécifiquement l'impact des facteurs génétiques individuels sur la capacité à générer des réponses Treg anti-A $\beta$  et leurs conséquences sur l'amplitude des réponses vaccinales T CD4+ anti-A $\beta$ .

## **I.2 Impact des réponses T CD4+ et plus particulièrement des réponses T régulatrices dans la physiopathologie de la MA**

Nous avons détaillé dans l'introduction le rôle joué par le système immunitaire dans la physiopathologie de certaines maladies neurodégénératives (SLA, MP, etc). L'utilisation de modèles murins de ces maladies a été d'une aide précieuse dans la compréhension de ces mécanismes. Les réponses T CD4+ semblent avoir une action tantôt bénéfique tantôt délétère. Dans la SLA, les réponses effectrices ont un effet neuroprotecteur, alors qu'elles aggravent la pathologie dans la MP (Beers et al., 2008), (Brochard et al., 2009). Mais dans les deux maladies, les réponses T régulatrices semblent capables de ralentir le processus neurodégénératif, probablement grâce à leur effet anti-inflammatoire (Beers et al., 2011), (Reynolds et al., 2007).

Dans la MA, peu d'études rapportent un rôle du système immunitaire adaptatif dans la physiopathologie de la maladie. Chez les patients, plusieurs études documentent l'existence de réponses T et Ac anti-A $\beta$  spontanées (Monsonogo et al., 2003), (O'Nuallain et al., 2006). Ces réponses, d'intensité variable selon les individus, semblent exister aussi chez les sujets âgés non déments. L'interprétation de ces données est particulièrement difficile : il ne semble pas y avoir de lien entre intensité de la réponse effectrice anti-A $\beta$  spontanée et susceptibilité ou résistance à la maladie. A $\beta$  étant un Ag du soi, il existe aussi probablement des mécanismes régulateurs qui peuvent avoir un impact sur les réponses effectrices spontanées. Les résultats obtenus chez la souris dans la première partie de notre travail semblent effectivement montrer l'implication des cellules Tregs.

Sur le plan physiopathologique, plusieurs hypothèses peuvent toutefois être émises. Un défaut de réponse effectrice et /ou une augmentation de la réponse régulatrice spontanée dirigée contre A $\beta$ , potentiellement accentués par l'immunosénescence, pourrait favoriser l'amylose cérébrale et la survenue de la maladie chez certains individus âgés. A l'inverse, l'accumulation d'A $\beta$  au niveau cérébral et l'inflammation qui s'y développe pourraient

induire et/ou modifier la réponse adaptative anti-A $\beta$  chez les patients. Enfin, il est possible que les cellules T CD4+ aient, dans leur ensemble, une action neuroprotectrice et ce, indépendamment de l'existence d'une réponse spécifique contre A $\beta$ . Cette dernière hypothèse pourrait mettre en jeu des mécanismes de type « auto-immunité protectrice » ou des mécanismes impliquant des cellules T régulatrices. Les études entreprises chez l'Homme ne permettent pas actuellement d'apporter des réponses claires à ces questions. Il n'y a pas non plus eu d'études approfondies sur le sujet dans les modèles murins de la MA.

Dans la seconde partie de nos travaux, nous avons donc cherché à étudier l'impact des réponses T CD4+ sur les différents paramètres physiopathologiques caractéristiques de la MA (pathologie amyloïde, neuroinflammation, modification de la plasticité synaptique, altérations des fonctions cognitives, etc) dans un modèle murin de la maladie. Nous avons obtenu certains résultats et des expériences complémentaires sont actuellement en cours pour confirmer ces données et approfondir l'étude des mécanismes impliqués dans les effets observés. Ces travaux feront prochainement l'objet d'un article.

Le modèle de MA que nous avons utilisé est une souris double transgénique : la souris APPPS1 (mutations *APP swe / PSI L166P* sous le promoteur Thy1) développée par l'équipe de Mathias Jucker (Radde et al., 2006). Du fait d'une mutation très agressive sur le transgène *PSI*, les premiers dépôts amyloïdes dans le cortex sont visibles dès l'âge de 6 semaines. La pathologie amyloïde atteint l'hippocampe à l'âge de 2-3 mois dans le gyrus denté et de 4-5 mois dans le CA1. On observe très précocement des signes de neuroinflammation (astrogliose et microgliose autour des plaques), ainsi qu'une hyperphosphorylation de Tau mais pas de DNF. Le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 est élevé, ce qui se traduit par un faible nombre de lésions d'angiopathie amyloïde. Il ne semble pas y avoir d'accumulation intracellulaire d'A $\beta$  dans les neurones (Radde et al., 2006). A l'âge de 8 mois, la perte neuronale est infime au niveau cortical mais quantifiable au niveau de l'hippocampe (gyrus denté) (Rupp et al., 2011). Au même âge, on détecte une altération de la plasticité synaptique (LTP *in vivo*) (Gengler et al., 2010) ainsi qu'une diminution de la neurogénèse hippocampique (Ermini et al., 2008). Des déficits cognitifs (tests d'apprentissage) sont également mesurables à 8 mois (Radde et al., 2006).

Nous avons choisi d'étudier ce modèle car il présente l'avantage de développer une pathologie amyloïde précoce et robuste, de pouvoir être analysé sur le plan électrophysiologique et d'offrir un « read-out » clinique relativement aisé à l'aide de divers tests comportementaux.



Sur la base des résultats obtenus dans la première partie de notre travail, qui suggéraient l'existence de réponses Tregs spontanées dirigées contre A $\beta$ , et nous appuyant sur les données de la littérature, impliquant ces cellules dans d'autres maladies neurodégénératives, nous avons décidé de nous focaliser sur l'étude du rôle de cette population cellulaire dans la physiopathologie de la MA. L'approche expérimentale choisie à consister à inactiver temporairement mais précocement les réponses T régulatrices dans les souris APPPS1, à l'aide de l'Ac monoclonal anti-CD25 décrit précédemment (clone PC61). Ce traitement a un effet inhibiteur sur l'ensemble des populations Tregs, ce qui peut avoir des conséquences non seulement sur les mécanismes de tolérance vis-à-vis d'A $\beta$  mais aussi sur l'ensemble des fonctions des cellules Tregs, y compris celles potentiellement impliquées dans la régulation de l'homéostasie cérébrale. Nous avons ainsi analysé l'impact de l'inactivation temporaire mais précoce des réponses Tregs sur la pathologie amyloïde, la réponse adaptative spontanée à A $\beta$ , la neuroinflammation, la plasticité synaptique (électrophysiologie de l'hippocampe) et les fonctions cognitives (tests comportementaux).

## **II) Résultats**

### **II.1 Article 1 : « MHC-Independent Genetic Factors Control the Magnitude of CD4+ T Cell Responses to Amyloid- $\beta$ Peptide in Mice through Regulatory T Cell-Mediated Inhibition »**

#### **II.1.1 Introduction**

Afin de caractériser les paramètres génétiques qui contrôlent l'amplitude de la réponse T CD4+ après immunisation par A $\beta$  chez la souris, nous avons choisi de travailler sur 5 lignées de souris « inbred ». Ces lignées de souris expriment chacune un haplotype H-2 différent, à savoir : H-2<sup>b</sup> pour les souris C57BL/6, H-2<sup>d</sup> pour les souris BALB/c, H-2<sup>s</sup> pour les souris SJL/J, H-2<sup>q</sup> pour les souris DBA/1 et H-2<sup>k</sup> pour les souris CBA/J.

Ces souris ont été immunisées dans le coussinet plantaire avec une solution Tris HCl (à pH physiologique) d'A $\beta$ 42 émulsionnée dans de l'adjuvant complet de Freund (CFA, contenant un composé huileux et des mycobactéries inactivées à la chaleur). Dix jours plus tard, les LT CD4+ des ganglions drainants ont été isolés et triés, puis restimulés in vitro en présence de CPA et de concentrations variables d'A $\beta$ 42. L'amplitude des réponses vaccinales a ensuite été évaluée par la mesure de la réponse proliférative à J4, après 16h d'incorporation de méthyl thymidine tritiée et/ou par la mesure de la proportion de cellules sécrétrices d'IFN $\gamma$  24h après stimulation (ELISPOT).

Les réponses T CD4+ anti-A $\beta$ 1-42 obtenues ont été comparées entre les 5 fonds génétiques. Nous avons aussi prélevé le sérum des souris J21 après un rappel vaccinal et comparé les réponses anticorps (IgG totales).

Nous avons cherché à identifier le ou les épitopes T CD4+ dérivés du peptide A $\beta$ 42 pour chacun des 5 haplotypes H-2. L'amplitude des réponses vaccinales T CD4+ anti-A $\beta$  des souris ont été analysées en fonction des différences quantitatives et qualitatives (immunogénicité) des épitopes restreints aux différents allèles du H-2.

Afin de déterminer un éventuel effet de facteurs génétiques indépendants du CMH sur

l'amplitude des réponses vaccinales T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$ , nous avons immunisés parallèlement des souris C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), SJL/J (H-2<sup>s</sup>) et B6H2s. Les animaux B6H2s sont des souris C57BL/6 congéniques pour l'haplotype H-2<sup>s</sup>. Ainsi, chez ces souris, l'épitope restreint à I-A<sup>s</sup> est présenté dans le fond génétique C57BL/6. L'utilisation de souris F1 (C57BL6 x SJL/J), nous a de plus permis de déterminer si les effets de ces facteurs génétiques indépendants du CMH étaient dominants ou récessifs sur celui du H-2.

Les cellules Tregs jouent un rôle clé dans le contrôle des réponses immunitaires vis-à-vis des Ag du soi. Aussi avons-nous cherché à étudier si ces cellules jouaient un rôle dans le contexte de la vaccination par A $\beta$ . Des expériences à l'aide d'un Ac anti-CD25 (clone PC61) permettant d'éliminer et d'inactiver transitoirement les cellules Tregs, qui expriment fortement le récepteur à l'IL-2 (CD25), nous ont permis d'étudier le rôle de ces cellules dans la modulation des réponses T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  dans les fonds C57BL/6 et SJL/J. Les LT effecteurs activés exprimant également le marqueur CD25, bien que moins fortement, l'anticorps PC61 a été administré 4 jours avant l'immunisation par A $\beta$ 42 afin d'éviter un effet important sur les cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> activées après vaccination. Nous avons vérifié que ce traitement permettait de supprimer l'effet inhibiteur des Tregs sur la réponse vaccinale, sans perturber le développement de la réponse effectrice. Afin d'établir si les effets observés dépendent ou non de la nature de l'Ag, l'impact de l'inactivation des Tregs sur les réponses vaccinales T + dirigées contre un autre Ag du SNC (Proteolipid Protein (PLP)) ou contre un Ag exogène (Ovalbumine (OVA)) a également été analysé.

Enfin, dans le but de déterminer les conséquences des réponses Tregs sur les réponses vaccinales T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  dans le contexte de la maladie, des expériences similaires d'inactivation des cellules Tregs avant vaccination par A $\beta$  ont été réalisées dans les souris APPPS1. La spécificité antigénique des effets observés a comme précédemment été évaluée en analysant l'influence des réponses Tregs sur les réponses vaccinales anti-PLP et anti-OVA dans le contexte la maladie.

L'ensemble de ces données devrait nous permettre d'évaluer, chez la souris, l'impact des facteurs génétiques indépendants du CMH, notamment ceux impliqués dans la capacité à générer des réponses Tregs, sur les réponses vaccinales T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$ . Ces études pourraient contribuer à une meilleure compréhension de la régulation des réponses T anti-A $\beta$  au cours de la maladie et devraient ouvrir de nouvelles perspectives dans l'optimisation de la vaccination par A $\beta$  chez les patients atteints de MA.

## II.1.2 Article



This information is current as  
of February 11, 2012

### **MHC-Independent Genetic Factors Control the Magnitude of CD4<sup>+</sup> T Cell Responses to Amyloid- $\beta$ Peptide in Mice through Regulatory T Cell-Mediated Inhibition**

Cécile Toly-Ndour, Gabrielle Lui, Maria Manuel Nunes,  
Martine Bruley-Rosset, Pierre Aucouturier and Guillaume  
Dorothee

*J Immunol* 2011;187:4492-4500; Prepublished online 26  
September 2011;

doi:10.4049/jimmunol.1003953

<http://www.jimmunol.org/content/187/9/4492>

---

# MHC-Independent Genetic Factors Control the Magnitude of CD4<sup>+</sup> T Cell Responses to Amyloid- $\beta$ Peptide in Mice through Regulatory T Cell-Mediated Inhibition

Cécile Toly-Ndour, Gabrielle Lui, Maria Manuel Nunes, Martine Bruley-Rosset, Pierre Aucouturier, and Guillaume Dorothée

Accumulation of amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) is considered the triggering factor of pathogenic lesions in Alzheimer's disease (AD), and vaccines targeting A $\beta$  are promising therapeutic options. However, the occurrence of meningoencephalitis attributed to T cell responses in 6% of A $\beta$ -immunized patients underscores the need for a better understanding of T cell responses to A $\beta$ . We characterized the parameters controlling the magnitude of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in mice. T cell responsiveness to A $\beta$ 1-42 was highly heterogeneous between mouse strains of different H-2 haplotypes, with SJL/J (H-2<sup>s</sup>) mice displaying a strong response, mainly specific for A $\beta$ 10-24, and C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) mice displaying a weak response to A $\beta$ 16-30. Surprisingly, C57BL/6 mice congenic for the H-2<sup>s</sup> haplotype (B6.H-2<sup>s</sup>), which display a "permissive" MHC class II allele for presentation of the immunodominant A $\beta$ 10-24 epitope, showed a very weak CD4<sup>+</sup> T cell response to A $\beta$ , suggesting that MHC-independent genes downmodulate A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in C57BL/6 background. Vaccine-induced CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$  were significantly enhanced in both C57BL/6 and B6.H-2<sup>s</sup> mice upon depletion of regulatory T cells (Tregs), whereas Treg-depleted SJL/J mice displayed unaltered A $\beta$ -specific T cell responses. Finally, Treg depletion in C57BL/6 transgenic APPPS1 mice, a mouse model of AD, results in enhanced vaccine-induced CD4<sup>+</sup> T cell responses in AD compared with wild-type animals. We concluded that the magnitude of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses is critically controlled in both physiological and pathological settings by MHC-independent genetic factors that determine the overall potency of A $\beta$ -specific Treg responses. *The Journal of Immunology*, 2011, 187: 4492–4500.

**A**lzheimer's disease (AD) is a severe neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of memory and cognitive functions. Accumulation of amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ), both as soluble oligomers and as compact fibrillar aggregates in neuritic plaques and diffuse deposits, seems to play a key role in initiating the pathogenic events in AD. Active immunization against A $\beta$  has emerged as a promising therapeutic strategy that can prevent A $\beta$  deposition and reverse cognitive decline in murine models (1–3). However, an A $\beta$  vaccination trial (AN1792) in human AD patients was prematurely interrupted due to the occurrence of meningoencephalitis in 6% of the cases, supposedly related to inappropriate activation of A $\beta$ -specific T cells (4, 5). In contrast, although Ab responses may control A $\beta$  plaque burden (6), data suggest that A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses can reverse cognitive decline and synaptic loss in AD

mice (7, 8). Altogether, these preclinical and clinical studies suggest that A $\beta$ -specific T cell responses display multiple functions with complex outcomes, which could be either detrimental or beneficial, depending on the modulation of the reactivity and functionality of A $\beta$ -specific Th cells.

T cell reactivity to A $\beta$  varies significantly among individuals bearing different MHC haplotypes. Differing levels of A $\beta$ -specific T cell responses have been observed in PBMCs of human subjects, and were specific for various A $\beta$ -derived epitopes restricted to distinct HLA-DR alleles (9, 10). Similarly, distinct T cell epitopes have been identified in SJL (H-2<sup>s</sup> haplotype) and C57BL/6 mice (H-2<sup>b</sup>), which differ significantly in their propensity to develop A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses (11). Thus, both mouse and human studies suggest an association between MHC class II (MHC-II) alleles and A $\beta$  immunogenicity. However, it is not known whether additional genetic parameters critically influence the magnitude of A $\beta$ -specific T cell responses.

In this study, we examined whether non-MHC genetic factors modulate the strength of CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$ . The comparative study of these responses in mice with different H-2 haplotypes or congenic at the H-2 locus indicated that the magnitude of A $\beta$ -specific T cell responses induced by vaccination is genetically determined by both MHC-dependent and -independent factors. Among the latter, the intrinsic ability to develop A $\beta$ -specific regulatory T cell (Treg) responses varies between individuals and is a crucial parameter modulating CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$  in both nonpathological conditions and in the course of AD.

## Materials and Methods

### Mice

C57BL/6 (H-2<sup>b</sup> haplotype), BALB/c (H-2<sup>d</sup>), SJL/J (H-2<sup>s</sup>), DBA/1 (H-2<sup>q</sup>), and CBA/J mice (H-2<sup>k</sup>) were purchased from Elevage Janvier (Le Genest

INSERM, Unité Mixte de Recherche S 938, Laboratoire Système Immunitaire et Maladies Conformationnelles, Hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris, France; and Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 6, Centre de Recherche Saint-Antoine, Hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris, France

Received for publication December 3, 2010. Accepted for publication August 25, 2011.

This work was supported by grants from Association France Alzheimer, Fondation de France, Université Pierre et Marie Curie, and INSERM.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Guillaume Dorothée and Prof. Pierre Aucouturier, INSERM, Unité Mixte de Recherche S 938, Laboratoire Système Immunitaire et Maladies Conformationnelles, Hôpital Saint-Antoine, 184 Rue du Faubourg Saint-Antoine, F-75012 Paris, France. E-mail addresses: guillaume.dorothee@inserm.fr and pierre.aucouturier@inserm.fr

Abbreviations used in this article: AD, Alzheimer's disease; A $\beta$ , amyloid- $\beta$  peptide; APP, amyloid precursor protein; DLN, draining lymph node; MHC-II, MHC class II; PLP, proteolipid protein; RT, room temperature; Teff, effector T cell; Treg, regulatory T cell; wt, wild-type.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

Saint Isle, France). C57BL/6 mice congenic for the H-2<sup>s</sup> haplotype (strain B6.SJL-H2<sup>s</sup> C3<sup>e</sup>/1CyJ) were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). APPS1 transgenic mice (Thy1-APP<sup>KM670/671NL</sup>; Thy1-PS1<sup>L166P</sup>) on the C57BL/6 background (12) were kindly provided by Prof. Mathias Jucker (Hertie Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Tübingen, Germany). Animals were bred and maintained under strictly monitored specific pathogen-free conditions. Experiments were conducted in compliance with the French legislation and European Union recommendations.

### Ags

All peptides were purchased from GeneCust (Dudelange, Luxembourg). Human Aβ1-42 peptide was dissolved at 40 mg/ml in DMSO and stored at -20°C. Overlapping Aβ-derived 15-mer peptides were dissolved at 3 mM in DMSO, before final dilution at 5 or 15 μM in RPMI 1640 medium for *in vitro* T cell stimulation. OVA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), OVA peptides (Ova<sup>233-248</sup>, PFASGTMSMLVLLPDE and Ova<sup>323-339</sup>, ISQAVHAAHAEINEAGR), and proteolipid protein (PLP) peptides (PLP<sup>139-151</sup>, HCLGKWLGHDPDKF and PLP<sup>178-191</sup>, NTWTTQCQSIAPPSK) were dissolved at 25, 1, and 2.5 mg/ml, respectively, in distilled water, and aliquots were stored at -20°C.

### Immunization

Before immunization, Aβ1-42 and PLP peptides were extemporaneously diluted to 2 mg/ml in 12.5 mM Tris-HCl (pH 7.4). Six- to eight-week-old mice were immunized by footpad injections with 100 μg Aβ1-42, 50 μg PLP peptides, or 1.25 mg OVA emulsified in an equal volume of CFA. In some experiments, mice were boosted 2 wk later with 60 μg Aβ1-42 emulsified in an equal volume of IFA.

### *In vivo* depletion/inactivation of CD25<sup>+</sup> Tregs

At day 4 before immunization, mice received an *i.p.* injection of ~150 μg anti-CD25-depleting mAb (clone PC61). To assess depletion efficiency, Tregs were quantified in blood samples the day before immunization by a combination of intracellular and surface staining using PE-conjugated anti-Foxp3 (FJK-16S; eBioscience, San Diego, CA) and biotinylated anti-CD25 (7D4; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) Ab, followed by allophycocyanin-conjugated streptavidin (BD Biosciences). Fluorescence data were collected on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

### T cell isolation

Ten days after the last immunization, popliteal and inguinal draining lymph nodes (DLNs) were harvested and mashed into single-cell suspensions. When indicated, CD4<sup>+</sup> T cells were purified using the negative CD4<sup>+</sup> T cell Dynal isolation kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). For each sample, the purity of the CD4<sup>+</sup> T cell population was assessed by labeling with PE-Cy5 anti-βTCR (H57-597), FITC anti-CD4 (L3T4 GK1.5), allophycocyanin anti-CD8 (53-6.7), and PE anti-CD19 Ab (1D3) (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry. Purified populations contained >90% CD4<sup>+</sup> T cells.

### T cell proliferation

For T cell-proliferation assays, splenocytes from nonimmunized syngeneic mice were used as APCs. RBCs were lysed in Tris-buffered ammonium chloride, and splenocytes were treated with mitomycin (50 μg/ml final) for 40 min at 37°C, followed by extensive washing. A total of 2 × 10<sup>5</sup> DLN-derived cells or 0.8–1 × 10<sup>5</sup> DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells was stimulated with 1 × 10<sup>5</sup> syngeneic APCs/well, in the presence of 5 or 15 μM peptides. For measurement of Ag-induced T cell proliferation, cells were pulsed at day 3 with 1 μCi [<sup>3</sup>H]thymidine/well, and [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was measured 16 h later.

### ELISPOT

Nitrocellulose-based 96-well plates (Millipore, Billerica, MA) were coated with 0.25 μg/50 μl/well of anti-mouse IFN-γ mAb (BD Biosciences) for 2 h at 37°C. Plates were washed and blocked with RPMI 1640 medium containing 10% FCS for ≥2 h at 37°C. DLN-derived cells or purified CD4<sup>+</sup> T cells from individual mice were seeded at 2 × 10<sup>5</sup> or 0.8–1 × 10<sup>5</sup> cells/well, respectively, and stimulated with mitomycin-treated syngeneic splenocytes (2 × 10<sup>5</sup> cells/well) in the presence of 5 or 15 μM antigenic peptides or with 0.4 mg/ml Con A as both a positive control and an internal reference of cell viability for normalization of data. Plates were incubated at 37°C (5% CO<sub>2</sub>) for 24 h, washed with PBS-0.05% Tween 20, and incubated for 2 h at 37°C with 0.05 μg/50 μl/well biotinylated anti-mouse IFN-γ mAb (BD Biosciences). After washing, alkaline phosphatase-conjugated streptavidin was added and incubated for 90 min (Roche,

Basel, Switzerland) (75 mU/100 μl/well) and then washed, and IFN-γ-secreting cells were visualized using NBT/bromo-chloro-indolyl phosphate substrate (Promega). Spots were counted using an automated ELISPOT plate reader. Data were expressed as the number of IFN-γ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells per 10<sup>3</sup> Con A-reactive CD4<sup>+</sup> T cells.

### ELISA

To measure serum anti-Aβ Ab titers in immunized mice, flat-bottom Nunc MaxiSorp ELISA plates were coated overnight at 4°C with Aβ1-42 peptide (1 μg/ml in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> [pH 8.3]). Plates were then washed twice with PBS-0.05% Tween 20 and blocked with PBS-1% BSA for 2 h at room temperature (RT). After two washes, plates were incubated for 2 h at RT with serum samples diluted at 1:1000, 1:3000, 1:9,000, 1:27,000, 1:81,000, and 1:243,000 in blocking buffer. The Aβ1-17-specific mAb 6E10 (0.01 and 1 μg/ml) (Sigma-Aldrich) was used as a positive reference sample. Plates were washed and incubated for 90 min at RT with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG Ab (Amersham, Little Chalfont, U.K.) and then revealed with *O*-phenylenediamine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate (Sigma-Aldrich). Results were expressed as relative OD = experimental OD/reference OD for 6E10 mAb in the same plate.

### FACS analysis

Single-cell suspensions were prepared from inguinal and popliteal lymph nodes and incubated for 15 min with FcR-blocking Ab (2.4G2; BD Biosciences) to avoid nonspecific staining. PE-Cy5-conjugated anti-TCRβ (H57-597), FITC-conjugated anti-CD4 (L3T4), biotinylated anti-CD25 (7D4), and allophycocyanin-conjugated streptavidin (all from BD Biosciences) were used for cell-surface staining. For intranuclear staining, cells were fixed, permeabilized, and incubated with PE-conjugated anti-Foxp3 (FJK-16S; eBioscience), according to the manufacturer's protocol. Stained cells were analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson) flow cytometer, and data were processed with FlowJo software (Tree Star).

### Western blot analysis

Murine thymus or brain samples were homogenized in 300 or 500 μl lysis buffer (250 mM NaCl, 5 mM EDTA acid, 0.1% Nonidet P-40, 50 mM HEPES supplemented with 10 mM DTT, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 50 μg/ml phenylmethyl sulfonyl fluoride, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate), respectively, using Polytron 3100 homogenizer (Kinematica, Lucerne, Switzerland). After incubation for 30 min in lysis buffer, homogenates were centrifuged for 10 min at 4°C (14,000 rpm), supernatants containing the total protein extract were harvested, and protein concentrations were determined using the Bradford assay (BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific, Waltham, MA). One hundred micrograms of total protein extracts was loaded on 10% SDS-PAGE gel, separated by electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membrane (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.). After blocking in PBS + 5% nonfat dry milk, membrane was incubated overnight with anti-amyloid precursor protein (APP) mouse Ab (22C11; Millipore). HRP-conjugated goat anti-mouse Ab (GE Healthcare) was used as a secondary Ab and incubated for 1 h at RT. Western blot was revealed by ECL using ultra-sensitive luminol substrate (SuperSignal West Femto Substrate; Thermo Scientific). Equal loadings were confirmed by stripping the membrane and reblotting with a specific Ab to β-actin (AC-15; Sigma-Aldrich). Densitometric quantification of bands was carried out using MultiGauge software (Fujifilm, Tokyo, Japan).

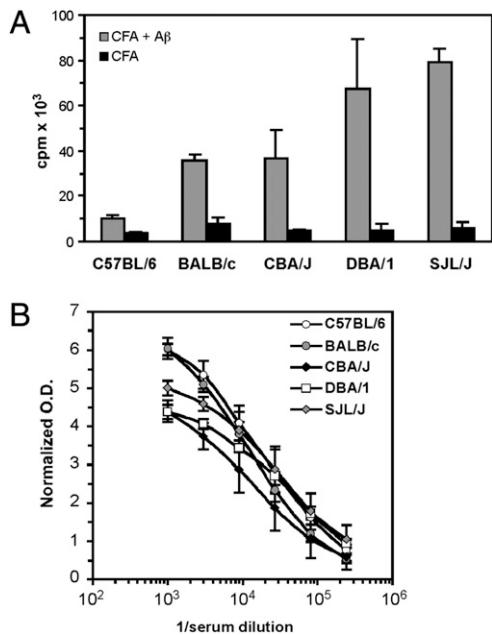
### Statistical analysis

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

## Results

### *Heterogeneity of Aβ-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses between mouse strains relates to the variety and strength of Aβ-derived epitopes restricted to MHC-II alleles*

To assess CD4<sup>+</sup> T cell reactivity to Aβ in different MHC contexts and genetic backgrounds, C57BL/6, BALB/c, DBA/1, CBA/J, and SJL/J mice, expressing H-2<sup>b</sup>, H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>q</sup>, H-2<sup>k</sup>, or H-2<sup>s</sup> haplotypes, respectively, were immunized with Aβ1-42 in CFA, and DLN-derived cells were analyzed for *in vitro* T cell proliferation induced by Aβ1-42. Responses were highly heterogeneous, with C57BL/6 mice (H-2<sup>b</sup>) displaying the lowest response and SJL/J mice (H-2<sup>s</sup>) exhibiting the strongest response (Fig. 1A). Of note,



**FIGURE 1.** A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell and Ab responses in mice with different H-2 haplotypes and genetic backgrounds. *A*, C57BL/6, BALB/c, DBA/1, CBA/J, and SJL/J mice, expressing haplotypes H-2<sup>b</sup>, H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>k</sup>, H-2<sup>k</sup>, and H-2<sup>s</sup>, respectively, were immunized by footpad injection with CFA or CFA + A $\beta$ 1-42 and then boosted 2 wk later with IFA with or without A $\beta$ 1-42. DLN-derived cells were harvested on day 10 after boost and stimulated with mitomycin-treated syngeneic splenocytes in the presence of 15  $\mu$ M A $\beta$ 1-42. T cell proliferation was measured 72 h later by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation. Results are from one representative experiment of two (mean  $\pm$  SD; three mice/group). *B*, Ab responses to A $\beta$ 1-42 were determined by ELISA at day 21 after boost, as described in *Materials and Methods*. Comparison of Ab titers, corresponding to the dilution yielding a relative OD of 2, using the Kruskal–Wallis test, did not reveal significant differences ( $p > 0.05$ ). Data are expressed as normalized OD (mean  $\pm$  SD; three mice/group). Results are from one representative experiment of two.

all five mouse strains raised comparable ELISA titers of anti-A $\beta$  Abs, indicating that differences in T cell responses did not have a significant impact on the levels of A $\beta$ -specific B cell responses (Fig. 1*B*).

To identify the A $\beta$ -derived CD4<sup>+</sup> T cell epitopes in each of these H-2 haplotypes, we analyzed T cell proliferation induced by nine overlapping A $\beta$ -derived 15-mer peptides. Although responses to 15-mer peptides were relatively low in most mouse strains, class II-restricted epitopes could be identified in four of the five tested strains. C57BL/6 mice (H-2<sup>b</sup>) displayed a weak, but reproducible, T cell proliferation to A $\beta$ 16-30 (Fig. 2), as previously described (11). In contrast, lymphocytes derived from SJL mice (H-2<sup>s</sup>) displayed a strong proliferative response to A $\beta$ 10-24 and the flanking peptides A $\beta$ 7-21 and A $\beta$ 13-27 (Fig. 2), in accordance with a previous report (11). Lymphocytes from immunized CBA/J (H-2<sup>k</sup>) and DBA/1 (H-2<sup>q</sup>) mice also proliferated in response to A $\beta$ 10-24 and the flanking peptides, although the response was weaker than that of SJL/J lymphocytes. A slight T cell proliferation was also observed with CBA/J-derived lymphocytes in response to A $\beta$ 19-33, suggesting that this peptide constitutes another subdominant H-2<sup>k</sup>-restricted epitope (Fig. 2). Although a strong proliferation was observed with BALB/c lymphocytes in response to A $\beta$ 1-42 (Figs. 1*A*, 2), none of the 15-mer peptides from our library induced a significant T cell proliferation, suggesting that H-2<sup>d</sup>-restricted A $\beta$ -derived epitopes cannot be efficiently presented to CD4<sup>+</sup> T cells unless they are processed from

a longer peptide. Complementary experiments indicated that at least one H-2<sup>d</sup>-restricted epitope is located within A $\beta$ 1-30 and that A $\beta$ 7-21 may constitute one weak epitope (data not shown), in line with previous reports (13–15). Altogether, these data identified distinct H-2-restricted A $\beta$ -derived epitopes with remarkably heterogeneous potencies for inducing CD4<sup>+</sup> T cell-proliferative responses in the corresponding mouse strains.

#### *MHC-independent genetic factors dominantly inhibit CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$ in C57BL/6 mice*

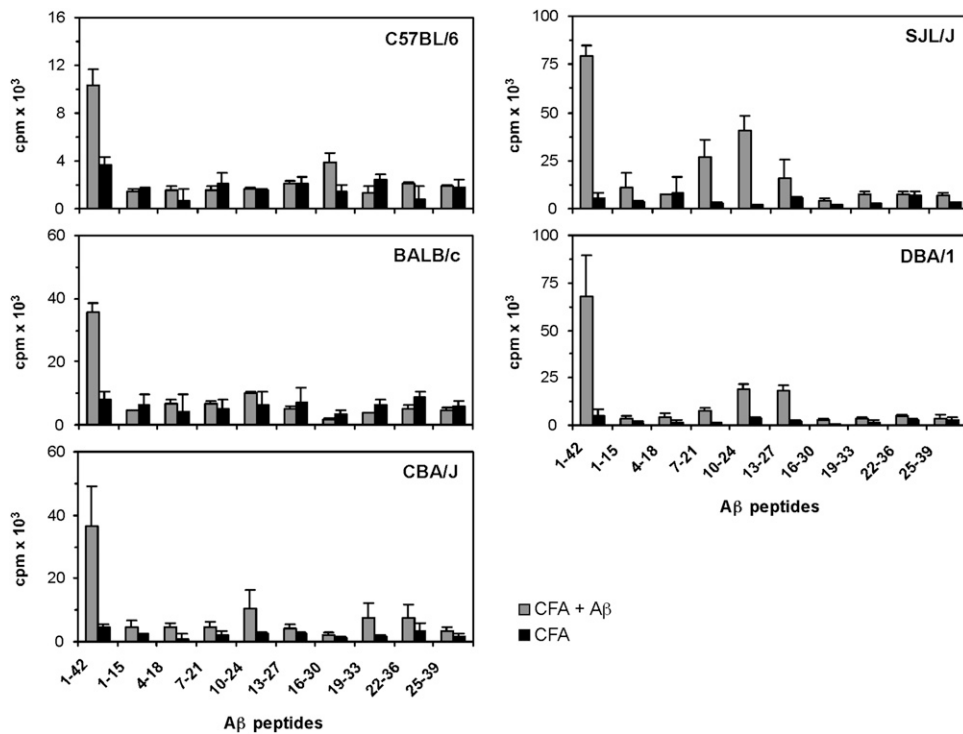
To determine whether the weak CD4<sup>+</sup> T cell responsiveness to A $\beta$  in C57BL/6 mice is exclusively due to poor immunogenicity of I-A<sup>b</sup>-restricted epitope(s), we compared A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), SJL/J (H-2<sup>s</sup>), and congenic B6.H-2<sup>S</sup> mice. The B6.H-2<sup>S</sup> mice allow the presentation, on the C57BL/6 background, of the I-A<sup>s</sup>-restricted epitope A $\beta$ 10-24 of known high immunogenicity in SJL/J mice. Unexpectedly, CD4<sup>+</sup> T cells from A $\beta$ -immunized B6.H-2<sup>S</sup> mice proliferated only slightly in response to A $\beta$ 1-42, much more weakly than did SJL/J-derived CD4<sup>+</sup> T cells, and with a similar magnitude as C57BL/6-derived lymphocytes. In addition, very little significant proliferation could be reproducibly measured in B6.H-2<sup>S</sup>-derived CD4<sup>+</sup> T cells in response to the I-A<sup>s</sup>-restricted epitope A $\beta$ 10-24 (Fig. 3*A*). Thus, C57BL/6 mice expressing an H-2 haplotype permissive for the presentation of the potentially immunogenic epitope A $\beta$ 10-24 remain unable to develop a robust CD4<sup>+</sup> T cell proliferative response to A $\beta$ .

To determine whether different in vitro secondary proliferative responses correlate with actual differences in the in vivo expansion of A $\beta$ -specific effector T cells (Teffs), the latter were directly quantified ex vivo by ELISPOT assay. In line with proliferation data, immunized SJL/J mice displayed twice as many DLN-derived A $\beta$ -specific IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells than did C57BL/6 mice (Fig. 3*B*). All of these effectors were specific for A $\beta$ 10-24 in SJL/J mice, whereas A $\beta$ 16-30-specific effectors from immunized C57BL/6 mice were barely detectable by ELISPOT. Finally, A $\beta$ -specific IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells from immunized C57BL/6  $\times$  SJL/J F1 mice were mostly specific for A $\beta$ 10-24, but the overall number of effectors specific for A $\beta$  was reduced to the same level as in parental C57BL/6 mice.

Altogether, these data suggested that MHC-independent genetic factors dominantly downmodulate A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in C57BL/6 mice.

#### *Preferential development of A $\beta$ -specific Treg responses in C57BL/6 genetic background*

Because Tregs play a key role in controlling immunological responsiveness to self-Ags, we analyzed their potential implication in the differential regulation of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in C57BL/6 and SJL/J genetic backgrounds. We compared the impact of Treg depletion on the magnitude of CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$ . To achieve transient depletion/inactivation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, mice were injected i.p. with anti-CD25 mAb (clone PC61) and immunized 4 d later with A $\beta$ 1-42, as described above. Flow cytometry analysis of popliteal and inguinal lymph node cells indicated that PC61 treatment induced the depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teffs in both C57BL/6 and SJL/J genetic backgrounds in naive animals (i.e., before vaccination) (Fig. 4*A*, 4*B*). Without PC61 treatment, the frequency of both Tregs and Teffs significantly increased in both mouse strains upon vaccination with CFA + A $\beta$ . PC61 treatment before immunization impaired vaccination-induced expansion of Tregs, but it did not alter the expansion of Teffs in both C57BL/6 and SJL/J genetic backgrounds (Fig. 4*A*, 4*B*). The extent of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in DLNs was quantified by



**FIGURE 2.** CD4<sup>+</sup> T cell epitope mapping of A $\beta$ 1-42 in different H-2 haplotypes. C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), BALB/c (H-2<sup>d</sup>), DBA/1 (H-2<sup>q</sup>), CBA/J (H-2<sup>k</sup>), and SJL/J (H-2<sup>s</sup>) mice were immunized by footpad injection with CFA or CFA + A $\beta$ 1-42 and then boosted 2 wk later with IFA with or without A $\beta$ 1-42. DLN-derived cells were harvested on day 10 after boost and stimulated with mitomycin-treated syngeneic splenocytes in the presence of 15  $\mu$ M of A $\beta$ 1-42 or a library of nine overlapping A $\beta$ -derived 15-mer peptides. T cell proliferation was measured 72 h later by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation. Results are from one representative experiment of two (mean  $\pm$  SD; three mice/group). The y-axis scale for each mouse strain was defined considering A $\beta$ 1-42-induced proliferation as a maximum.

ELISPOT 10 d after immunization. Transient Treg depletion in C57BL/6 mice induced a 2.2-fold increase in the number of A $\beta$ 1-42-specific IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells induced by vaccination. Similarly, A $\beta$ 16-30-specific IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells increased 2.8-fold following Treg depletion (Fig. 4C). Similarly to C57BL/6 mice, Treg depletion in B6.H-2<sup>s</sup> mice induced 3.4- and 2.6-fold increases in the numbers of vaccine-induced IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> effectors responding to A $\beta$ 1-42 and A $\beta$ 10-24, respectively. Interestingly, in contrast to C57BL/6 and B6.H-2<sup>s</sup> mice, SJL/J mice showed no increase in the numbers of A $\beta$ 1-42- or A $\beta$ 10-24-specific IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> effectors following Treg depletion (Fig. 4C). These data suggested that although A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses are naturally downmodulated by Tregs in the C57BL/6 background, SJL/J mice do not develop a measurable Treg-mediated spontaneous inhibition of CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$ .

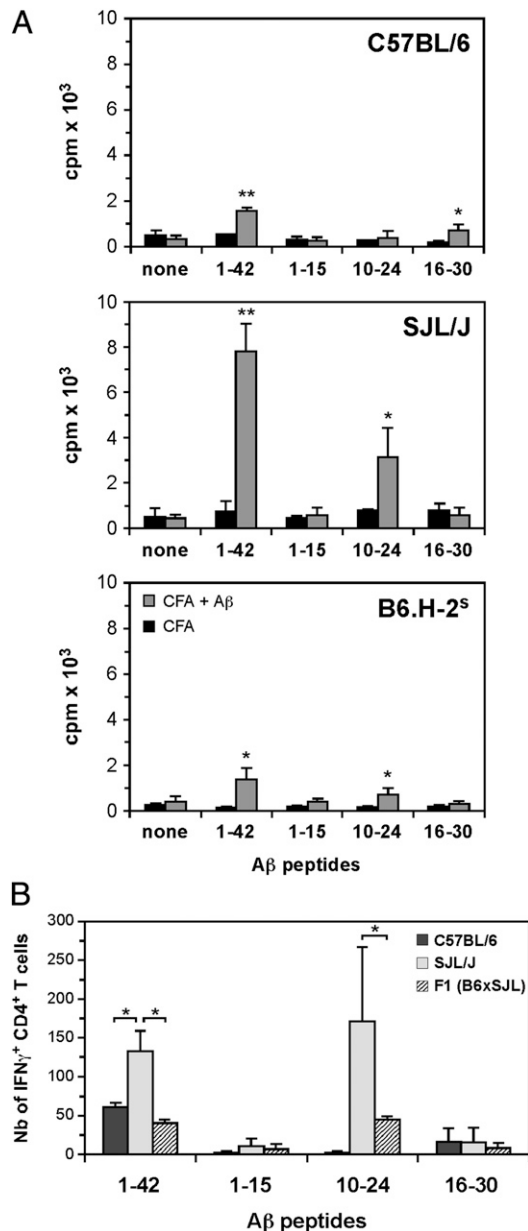
To determine whether the differential Treg-mediated inhibition in C57BL/6 and SJL/J backgrounds applies to any T cell response to self-Ags, we analyzed the impact of Treg depletion on PLP-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in C57BL/6, SJL/J, and B6.H-2<sup>s</sup> mice. Transient Treg depletion before immunization with either H-2<sup>b</sup>-restricted (PLP<sup>178-191</sup>) or H-2<sup>s</sup>-restricted (PLP<sup>139-151</sup>) peptides significantly increased PLP-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in C57BL/6 and SJL/J background, respectively (Fig. 5A). To further assess the pattern of Treg-mediated inhibition in C57BL/6 and SJL/J backgrounds, we also analyzed the impact of Treg depletion on CD4<sup>+</sup> T cell responses to OVA, used as a model non-self Ag, in C57BL/6, SJL/J, and B6.H-2<sup>s</sup> mice. Similarly to PLP, transient Treg depletion before immunization with OVA increased the numbers of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells detected by ELISPOT in response to full-length OVA in all three strains, the I-A<sup>b</sup>-restricted epitope OVA<sup>323-339</sup> in C57BL/6 mice, and to the I-A<sup>s</sup>-restricted epitope OVA<sup>233-248</sup> in

SJL/J and B6.H-2<sup>s</sup> mice (Fig. 5B). Of note, although Treg depletion enhanced OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in all three strains, the increase was less in SJL/J background than C57BL/6 background. Thus, the differential Treg-mediated inhibition of A $\beta$ -specific T cell responses in C57BL/6 and SJL/J genetic backgrounds is not general to any self or non-self Ag and is restricted, at least in part, to certain antigenic specificities. Because A $\beta$  is generated by proteolytic cleavage of APP, APP protein expression in the thymus of C57BL/6 and SJL/J mice was analyzed by Western blot. No difference in APP expression was observed between C57BL/6 and SJL/J mice, although the expression was very faint in the thymus (Fig. 5C, 5D). As expected, brain samples used as positive controls displayed a very strong expression of the lowest m.w. isoform of APP (Fig. 5C). Altogether, these data suggested that MHC-independent genetic factors modulating A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses include the propensity to develop Treg-mediated inhibitory responses to A $\beta$ , which varies critically between individuals of different genetic backgrounds.

#### *Treg responses downmodulate the magnitude of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in C57BL/6 APPPS1 mice*

To assess the impact of Treg-mediated inhibition on CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$  in the context of AD, we analyzed the effect of Treg depletion in 4-mo-old A $\beta$ -depositing double-transgenic APPPS1 C57BL/6 mice. Similarly to results in C57BL/6 and SJL/J mice (Fig. 4A, 4B), flow cytometry analysis of DLN-derived cells indicated that PC61 induced the depletion of both CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells in naive APPPS1 mice and wild-type (wt) littermates. PC61 treatment before immunization impaired vaccination-induced expansion of Tregs, but did not alter the expansion of T cells, in both wt and APPPS1 mice (Fig. 6A). Control PBS-injected APPPS1 mice and





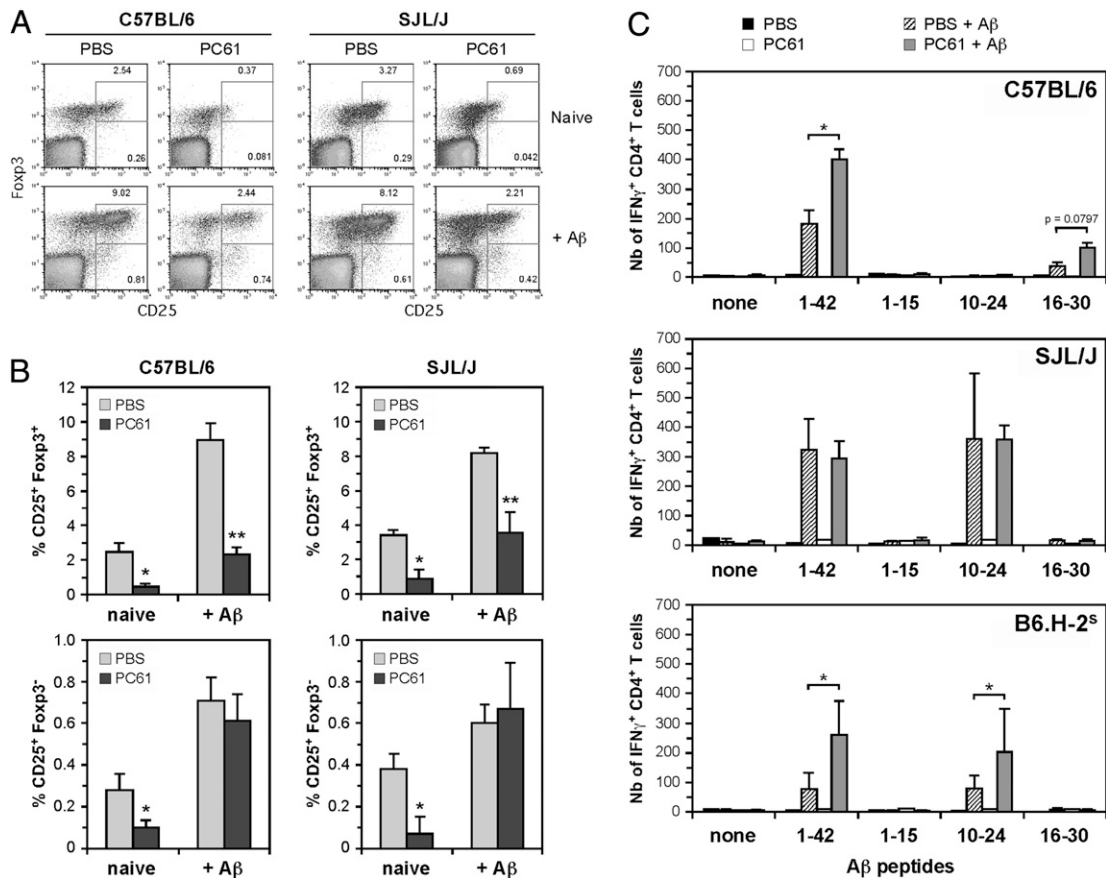
**FIGURE 3.** MHC-independent genetic factors dominantly modulate the magnitude of CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$ . *A*, CD4<sup>+</sup> T cell proliferation to A $\beta$ -derived peptides in C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), SJL/J (H-2<sup>s</sup>), and B6.H-2<sup>s</sup> (H-2<sup>s</sup>-congenic C57BL/6) mice. Mice were immunized by footpad injection with CFA or CFA + A $\beta$ 1-42. DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells were isolated (see *Materials and Methods*) on day 10 and stimulated with mitomycin-treated syngeneic splenocytes in the presence (5  $\mu$ M) of A $\beta$ 1-42, I-A<sup>s</sup>-restricted epitope A $\beta$ 10-24, I-A<sup>b</sup>-restricted epitope A $\beta$ 16-30, or A $\beta$ 1-15 peptide used as a negative control. Proliferation was measured 3 d later. Results are from one representative experiment of four (mean  $\pm$  SD; three to five mice/group). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, Mann-Whitney  $U$  test. The  $p$  values are for differences between CFA- and CFA + A $\beta$ -treated animals. *B*, Ex vivo quantification of A $\beta$ -specific IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells. C57BL/6, SJL/J, and (C57BL/6  $\times$  SJL/J) F1 mice were immunized by footpad injection with CFA or CFA + A $\beta$ 1-42. DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells were isolated on day 10, and the numbers of IFN- $\gamma$ -producing T cells specific for A $\beta$ 1-42, I-A<sup>s</sup>-restricted epitope A $\beta$ 10-24, or I-A<sup>b</sup>-restricted epitope A $\beta$ 16-30 were determined by ELISPOT assay. A $\beta$ 1-15 peptide was used as a negative control. Data are expressed as numbers of IFN- $\gamma$ + CD4<sup>+</sup> T cells/10<sup>3</sup> Con A-reactive CD4<sup>+</sup> T cells, as described in *Materials and Methods*. Results are from one representative experiment of three (mean  $\pm$  SD; three mice/group). \* $p$  < 0.05, Mann-Whitney  $U$  test.

wt littermates displayed similar numbers of A $\beta$ 1-42- or A $\beta$ 16-30-specific IFN- $\gamma$ + CD4<sup>+</sup> T cells in response to A $\beta$  vaccination (Fig. 6*B*). As expected, transient Treg depletion before immunization in wt littermates induced a 2.9-fold increase in the number of A $\beta$ 1-42-specific IFN- $\gamma$ + CD4<sup>+</sup> T cells, but no significant difference in the number of A $\beta$ 16-30-specific IFN- $\gamma$ + CD4<sup>+</sup> T cells was observed. Interestingly, Treg depletion in APPPS1 mice induced a stronger enhancement of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses, with 5.9- and 3.1-fold increases in the numbers of A $\beta$ 1-42- and A $\beta$ 16-30-specific IFN- $\gamma$ + CD4<sup>+</sup> effectors, respectively (Fig. 6*B*). Although the difference in A $\beta$ 1-42-specific IFN- $\gamma$ -producing cells between Treg-depleted wt and APPPS1 mice did not reach statistical significance, a trend ( $p = 0.08$ ) was observed toward enhanced A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in APPPS1 mice compared with wt mice. In contrast, transient Treg depletion before immunization with either H-2<sup>b</sup>-restricted epitope PLP<sup>178-191</sup> or full-length OVA increased PLP- or OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses similarly in both wt and APPPS1 mice, respectively (Fig. 6*C*, 6*D*). Altogether, these data suggested that APPPS1 C57BL/6 mice spontaneously develop CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$ , the expansion of which is prevented through Treg-mediated inhibition.

## Discussion

The present study demonstrated that the magnitude of CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$  vary according to genetic factors that include non-MHC elements. Our data indicated that the heterogeneity of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses is related, at least in part, to qualitative and quantitative differences in A $\beta$ -derived epitopes restricted to various MHC-II alleles. Importantly, MHC-independent genetic factors that determine the overall potency of individuals to develop A $\beta$ -specific Treg responses play a critical role in the modulation of CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$ . Such Treg-mediated inhibitory responses completely downmodulate A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses that spontaneously arise in the course of AD in a mouse model and prevent their expansion upon A $\beta$  vaccination.

In line with previous reports identifying A $\beta$ -derived T cell epitopes (11, 13–15), dominant CD4<sup>+</sup> T cell epitopes in SJL/J, C57BL/6, and BALB/c mice were found in A $\beta$ 10-24, A $\beta$ 16-30, and A $\beta$ 1-30 peptides, respectively. Although A $\beta$ 10-24 elicited a strong I-A<sup>s</sup>-restricted CD4<sup>+</sup> T cell response in SJL/J mice, the same epitope induced a much weaker response when presented in the H-2<sup>q</sup> haplotype (DBA/1 mice), although the overall magnitude of CD4<sup>+</sup> T cell responses to full-length A $\beta$ 1-42 was similar in both strains. Thus, similar A $\beta$ -derived epitopes display qualitative differences in various MHC contexts. Quantitative differences in the number of A $\beta$ -derived epitopes restricted to various MHC-II alleles were also observed. Although A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in SJL/J, C57BL/6, and DBA/1 mice were each targeted to a unique epitope, located between residues 10 and 24, 16 and 30, and 10 and 27, respectively, CD4<sup>+</sup> T cells proliferated in response to both A $\beta$ 10-24 and A $\beta$ 19-33 in CBA/J mice. In humans, differing levels of CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$  have been observed in PBMCs and were specific for various A $\beta$ -derived epitopes restricted to different HLA-DR alleles, with the DRB1\*1501 allele being highly immunogenic (9, 10). Altogether, these studies indicated that the MHC genotype is an important parameter modulating CD4<sup>+</sup> T cell reactivity to A $\beta$ . Importantly, the impact of MHC on T cell-related immunogenicity may be more stringent for small Ags compared with large-protein Ags. Indeed, the reduced spectrum of epitopes processed from short antigenic peptides, such as A $\beta$ 1-42, likely decreases the probability of gener-



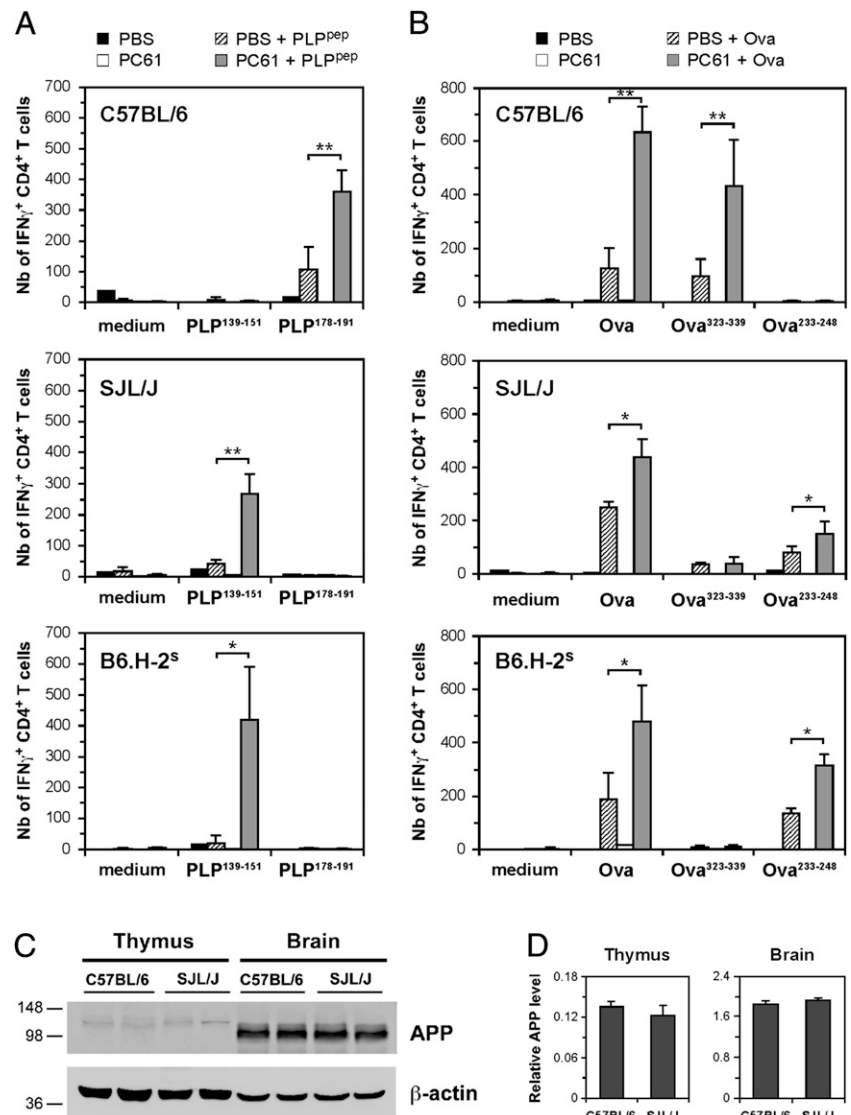
**FIGURE 4.** Preferential development of A $\beta$ -specific Treg responses in C57BL/6 genetic background. *A* and *B*, PC61 treatment selectively inhibits vaccination-induced expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fc $\gamma$ R3<sup>+</sup> Tregs but not CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fc $\gamma$ R3<sup>-</sup> T cells in both C57BL/6 and SJL/J genetic backgrounds. Animals were injected i.p. with anti-CD25-depleting mAb (PC61) or PBS and then left untreated or immunized on day 4 with CFA + A $\beta$ 1-42. DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells were isolated 10 d later, and the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fc $\gamma$ R3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fc $\gamma$ R3<sup>-</sup> cells was determined by flow cytometry. *A*, Dot plots for one representative animal in each experimental group. *B*, Mean  $\pm$  SD for three to five animals/group. Gated on TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, Mann-Whitney *U* test. The *p* values are for differences between PBS- and PC61-treated animals. *C*, Impact of transient Treg depletion on the magnitude of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses. C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), SJL/J (H-2<sup>s</sup>), and B6.H-2<sup>s</sup> mice were injected i.p. with anti-CD25-depleting mAb (PC61) or PBS 4 d before footpad immunization with CFA or CFA + A $\beta$ 1-42. DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells were isolated on day 10, and the numbers of IFN- $\gamma$ -producing T cells specific for A $\beta$ 1-42, I-A<sup>s</sup>-restricted epitope A $\beta$ 10-24, I-A<sup>b</sup>-restricted epitope A $\beta$ 16-30, or A $\beta$ 1-15 peptide used as a negative control were quantified ex vivo by ELISPOT assay. Data are expressed as numbers of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells/10<sup>3</sup> Con A-reactive CD4<sup>+</sup> T cells. Results are from one representative experiment of three (mean  $\pm$  SD; three to five mice/group). \* $p$  < 0.05, Mann-Whitney *U* test.

ating diverse immunodominant epitopes restricted to various MHC alleles. Hence, MHC genotype has to be taken into particular consideration when evaluating the pathophysiological impact of T cell responses induced by A $\beta$  vaccination.

In addition to the impact of MHC, our study demonstrated that MHC-independent genes control the magnitude of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in mice through Treg-mediated inhibition. H-2<sup>s</sup>-restricted CD4<sup>+</sup> T cell responses of similar A $\beta$  specificities were differentially regulated in C57BL/6 and SJL/J backgrounds. The very mild T cell response to A $\beta$  observed in B6.H-2<sup>s</sup> mice, which display the potentially highly A $\beta$ -immunogenic H-2<sup>s</sup> allele in the context of C57BL/6 genetic background, indicated that MHC-independent genetic features in C57BL/6 background prevent the expansion of A $\beta$ -specific T cell responses. Analysis of (C57BL/6  $\times$  SJL/J) F1 mice, which display the H-2<sup>s</sup> allele in the context of a 1/1 mix genetic background, further suggested that MHC-independent genes that downmodulate A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in C57BL/6 mice are dominant over SJL/J-derived genetic factors. Conversely, a report by Monsonego et al. (11) showed that although NOD mice display an A $\beta$ -immunogenic MHC context and genetic background, NOD.H-2<sup>b</sup> congenic mice are unable to mount T cell responses to A $\beta$ , highlighting the poor

A $\beta$  immunogenicity of the H-2<sup>b</sup> haplotype. Hence, both MHC-independent genetic features and MHC haplotype critically control the magnitude of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses. The MHC-independent dominant inhibitory effect in C57BL/6 mice is related to the propensity for developing Treg-mediated inhibitory responses to A $\beta$ , which varies critically between individuals of different genetic backgrounds. Such Treg-mediated inhibitory responses may have an important implication in the context of AD, because they strongly downmodulate the expansion of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses that spontaneously arise in the course of AD in APPS1 mice. Interestingly, increased suppressive activity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs has been described in AD patients, but its pathophysiological significance remains to be assessed (16). Genetic background- and sex-related differences in the numbers and functional properties of Tregs were previously reported in mice. Increased frequency of Tregs in male SJL mice compared with female SJL mice, as well as their preferential secretion of IL-10, may contribute to skewed development of Th2-type immune responses (17). Of note, C57BL/6 male and female mice did not show differences in Treg numbers (17). Other studies indicated that BALB/c mice displayed increased frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs compared with C57BL/6 mice, although Tregs

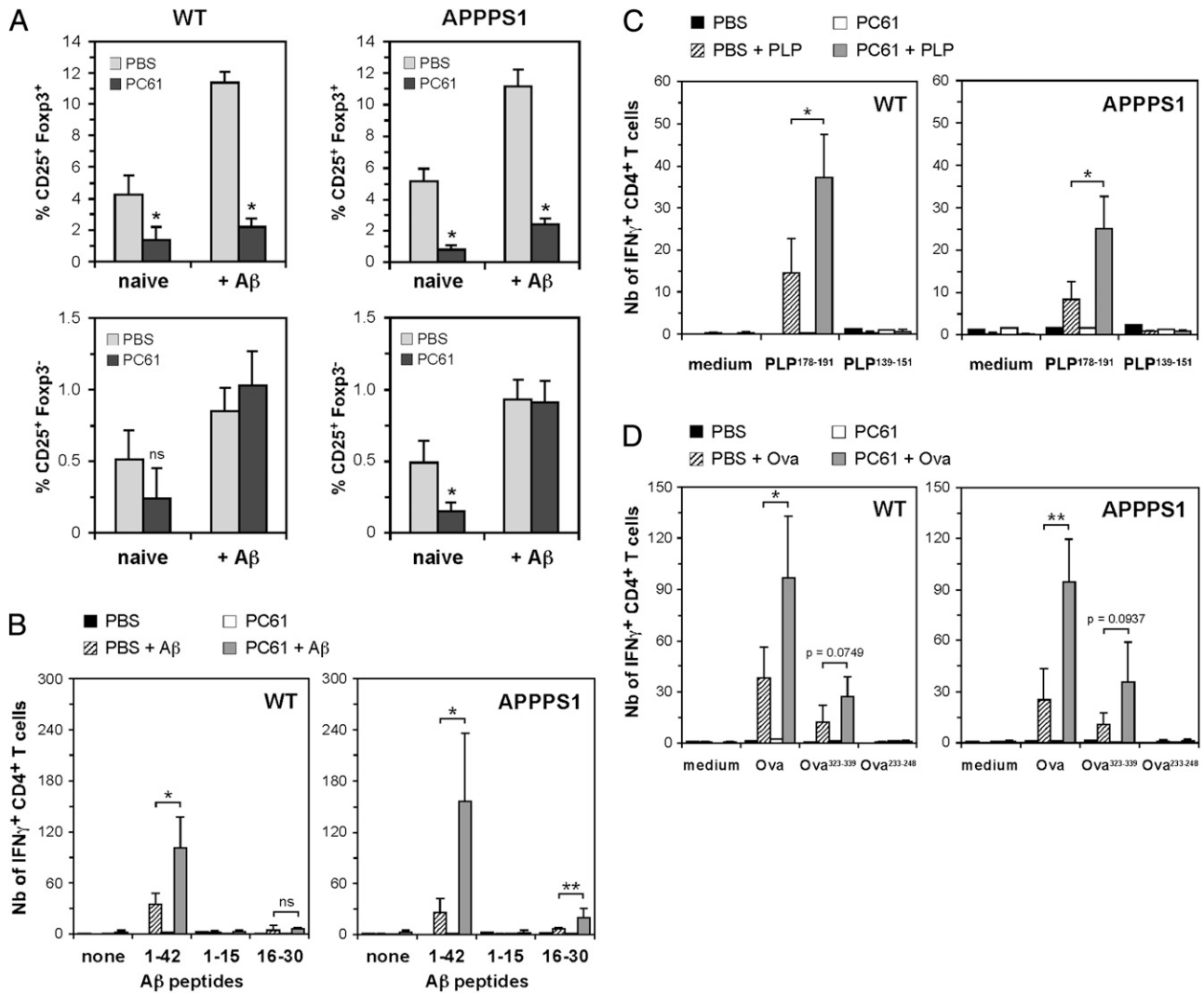
**FIGURE 5.** Preferential Treg-mediated inhibition of A $\beta$ -specific T cell responses in C57BL/6 genetic background is not general to any Ag but does not rely on altered APP expression in the thymus. *A*, Impact of transient Treg depletion on the magnitude of PLP-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses. C57BL/6, SJL/J, and B6.H-2<sup>s</sup> mice were injected i.p. with anti-CD25-depleting mAb (PC61) or PBS 4 d before footpad immunization with CFA, CFA + PLP<sup>178–191</sup> (C57BL/6 mice), or CFA + PLP<sup>139–151</sup> (SJL/J and B6.H-2<sup>s</sup> mice). DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells were isolated on day 10, and the numbers of IFN- $\gamma$ -producing T cells specific for either H-2<sup>b</sup>-restricted epitope PLP<sup>178–191</sup> or H-2<sup>s</sup>-restricted epitope PLP<sup>139–151</sup> were quantified ex vivo by ELISPOT assay. *B*, Impact of transient Treg depletion on the magnitude of OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses. Mice were treated as described in *A*, before footpad immunization with CFA or CFA + OVA. Numbers of IFN- $\gamma$ -producing T cells specific for OVA, H-2<sup>b</sup>-restricted epitope Ova<sup>323–339</sup>, or H-2<sup>s</sup>-restricted epitope Ova<sup>233–248</sup> were quantified in DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells on day 10 by ELISPOT assay. Data in *A* and *B* are expressed as numbers of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells/10<sup>3</sup> Con A-reactive CD4<sup>+</sup> T cells. Results are from one representative experiment of two (mean  $\pm$  SD; three mice/group). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, Mann-Whitney *U* test. *C*, Western blot analysis of APP protein expression in the thymus of C57BL/6 and SJL/J mice. Whole brain protein extracts were used as a positive control, and  $\beta$ -actin served as a loading control. *D*, Densitometric quantification, relative to  $\beta$ -actin, of gel shown in *C*. Values are mean  $\pm$  SD.



from both strains are phenotypically and functionally similar (18). However, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells from BALB/c and C57BL/6 mice differ in their susceptibility to Treg-mediated inhibition (18). Interestingly, transient Treg depletion in BALB/c mice induced a notable increase in the numbers of vaccine-induced A $\beta$ 1–42- or A $\beta$ 7–21-specific IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> effectors, suggesting that Treg-mediated inhibition of CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$  is not restricted to C57BL/6 mice (data not shown). Whether similar quantitative and qualitative differences in Treg responses are also genetically regulated in humans remains to be determined. Functional polymorphisms in the *FOXP3/Scurfin* gene have been associated with altered susceptibility to autoimmune diseases, including type 1 diabetes (19), systemic lupus erythematosus (20), psoriasis (21), autoimmune thyroid diseases (22), and primary biliary cirrhosis (23). Thus, genetic polymorphisms in genes involved in Treg development and function may translate into altered potencies of developing Treg responses in humans. Finally, in contrast to its effect on A $\beta$ -specific T cell responses, transient Treg depletion increases the number of vaccination-induced PLP-specific or OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cells in both C57BL/6 and SJL/J genetic backgrounds. Hence, background-related differential Treg-mediated inhibition is not general to any self or non-self Ag, but instead is restricted, at least in part, to certain antigenic specificities, including A $\beta$ . The differential effect of Tregs on A $\beta$ -reactive

T cells was not related to differences in thymic expression of APP in C57BL/6 and SJL/J mice. Further experiments will be needed to decipher the mechanistic explanation of this phenomenon.

Although severe complications observed in a limited proportion of AN1792-vaccinated patients were attributed to proinflammatory T cell responses, preclinical murine models did not show evidence of T cell-related side effects. The results of our study shed new light on the retrospective understanding of this discrepancy between preclinical and clinical settings. The critical impact of both the MHC and the dominant background-related Treg-mediated inhibition of CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$  may explain, at least in part, the occurrence of meningoencephalitis in a fraction of AN1792 patients and underscores the need to develop appropriate preclinical murine models to accurately evaluate the potential impact of vaccine-induced A $\beta$ -specific T cell responses. Transgenic AD mice on the SJL background, which would allow the presentation of the I-A<sup>s</sup>-restricted strong T cell epitope A $\beta$ 10–24 without significant A $\beta$ -specific Treg-mediated inhibition, may constitute such a relevant preclinical model. The yet unexplained complications of AN1792 led pharmaceutical companies to totally dismiss T cell responses to A $\beta$  and design strategies focused exclusively on A $\beta$ -specific Abs. However, experimental results in mouse models, as well as recent clinical trial data, challenge the efficiency of such approaches and highlight possible associated



**FIGURE 6.** Treg responses strongly downmodulate Aβ-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in C57BL/6 APPS1 mice. *A*, PC61 treatment selectively inhibits vaccination-induced expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs but not CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Tregs in both WT and APPS1 mice. Four-month-old animals were injected i.p. with anti-CD25-depleting mAb (PC61) or PBS and then left untreated or immunized on day 4 with CFA + Aβ1-42. DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells were isolated 10 d later, and the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> cells was determined by flow cytometry. Mean ± SD values for three to five animals/group. Gated on TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells. \**p* < 0.05, Mann-Whitney *U* test. The *p* values are for differences between PBS- and PC61-treated animals. *B*, Four-month-old C57BL/6 APPS1 mice or littermate controls were injected i.p. with anti-CD25-depleting mAb (PC61) or PBS 4 d before footpad immunization with CFA or CFA + Aβ1-42. DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells were isolated on day 10, and the numbers of IFN-γ-producing Tregs specific for Aβ1-42, I-A<sup>b</sup>-restricted epitope Aβ16-30, or Aβ1-15 peptide used as a negative control were quantified ex vivo by ELISPOT assay. *C*, Impact of transient Treg depletion on the magnitude of PLP-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses. Four-month-old APPS1 mice or littermate controls were injected i.p. with PC61 or PBS and then immunized 4 d later with CFA or CFA + PLP<sup>178-191</sup>. DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells were isolated on day 10, and the numbers of IFN-γ-producing Tregs specific for H-2<sup>b</sup>-restricted epitope PLP<sup>178-191</sup> were quantified ex vivo by ELISPOT assay. H-2<sup>s</sup>-restricted epitope PLP<sup>139-151</sup> was used as a negative control. *D*, Impact of transient Treg depletion on the magnitude of OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses. Mice were treated as described in *C*, before footpad immunization with CFA or CFA + OVA. Numbers of IFN-γ-producing Tregs specific for OVA, H-2<sup>b</sup>-restricted epitope Ova<sup>323-339</sup>, or H-2<sup>s</sup>-restricted epitope Ova<sup>233-248</sup> were quantified in DLN-derived CD4<sup>+</sup> T cells on day 10 by ELISPOT assay. *B-D*, Data are expressed as numbers of IFN-γ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells/2 × 10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. Results are from one representative experiment of two (mean ± SD; three mice/group). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, Mann-Whitney *U* test.

side effects (24–26). A follow-up study on a group of AN1792 patients suggested that the level of vaccine-induced Abs correlated with the clearance of amyloid plaques but not with clinical response (27). In our study, it is worth noting that Aβ-specific Ab responses were only mildly affected by genetic background, as opposed to T cell responses to Aβ. In parallel, several reports suggested that CD4<sup>+</sup> T cells may mediate neuroprotective responses in various neurodegenerative conditions, including AD (7, 8, 28–30). Interestingly, previous reports in an optic nerve-injury model suggested that the ability to spontaneously manifest such T cell-dependent protective responses under neurode-

generative conditions may be restricted by naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. Furthermore, this effect of Tregs was not uniform, and their expression in different individuals seemed to be genetically determined (31), reminiscent of our findings.

In conclusion, our study demonstrated that Aβ-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses are critically modulated by MHC-independent genetic factors that determine the propensity to develop Treg-mediated inhibitory responses to Aβ. These data underscore the need to reassess the roles, both pathogenic and/or beneficial, of different T cell subsets in both the pathophysiology and immunotherapy of AD. In this context, extensive analyses aimed at

deciphering the impact of Tregs on the neuropathological and clinical parameters of AD in APPS1 mice are underway.

## Acknowledgments

We thank Mathias Jucker for generously providing the APPS1 mice and for helpful discussions, Claude Carnaud for helpful comments and discussion and for critical reading of the manuscript, Thomas Chaigneau for technical support, and Delphine Muller and Tatiana Ledent for assistance with mouse husbandry.

## Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

- Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, et al. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173–177.
- Janus, C., J. Pearson, J. McLaurin, P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, M. A. Chishti, P. Horne, D. Heslin, J. French, et al. 2000. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 979–982.
- Morgan, D., D. M. Diamond, P. E. Gottschall, K. E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, P. Jantzen, G. DiCarlo, D. Wilcock, et al. 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 982–985.
- Nicoll, J. A., D. Wilkinson, C. Holmes, P. Steart, H. Markham, and R. O. Weller. 2003. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat. Med.* 9: 448–452.
- Ferrer, I., M. Boada Rovira, M. L. Sánchez Guerra, M. J. Rey, and F. Costa-Jussà. 2004. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 14: 11–20.
- Kellner, A., J. Matschke, C. Bernreuther, H. Moch, I. Ferrer, and M. Glatzel. 2009. Autoantibodies against beta-amyloid are common in Alzheimer's disease and help control plaque burden. *Ann. Neurol.* 65: 24–31.
- Cao, C., G. W. Arendash, A. Dickson, M. B. Mamcarz, X. Lin, and D. W. Ethell. 2009. Abeta-specific Th2 cells provide cognitive and pathological benefits to Alzheimer's mice without infiltrating the CNS. *Neurobiol. Dis.* 34: 63–70.
- Ethell, D. W., D. Shippy, C. Cao, J. R. Cracchiolo, M. Runfeldt, B. Blake, and G. W. Arendash. 2006. Abeta-specific T-cells reverse cognitive decline and synaptic loss in Alzheimer's mice. *Neurobiol. Dis.* 23: 351–361.
- Monsonogo, A., V. Zota, A. Karni, J. I. Krieger, A. Bar-Or, G. Bitan, A. E. Budson, R. Sperling, D. J. Selkoe, and H. L. Weiner. 2003. Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 112: 415–422.
- Zota, V., A. Nemirovsky, R. Baron, Y. Fisher, D. J. Selkoe, D. M. Altmann, H. L. Weiner, and A. Monsonogo. 2009. HLA-DR alleles in amyloid beta-peptide autoimmunity: a highly immunogenic role for the DRB1\*1501 allele. *J. Immunol.* 183: 3522–3530.
- Monsonogo, A., J. Imitola, S. Petrovic, V. Zota, A. Nemirovsky, R. Baron, Y. Fisher, T. Owens, and H. L. Weiner. 2006. Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 5048–5053.
- Radde, R., T. Bolmont, S. A. Kaeser, J. Coomaraswamy, D. Lindau, L. Stoltze, M. E. Calhoun, F. Jäggi, H. Wolburg, S. Gengler, et al. 2006. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 7: 940–946.
- Cribbs, D. H., A. Ghochikyan, V. Vasilevko, M. Tran, I. Petrushina, N. Sadzikava, D. Babikyan, P. Kesslak, T. Kieber-Emmons, C. W. Cotman, and M. G. Agadjanyan. 2003. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int. Immunol.* 15: 505–514.
- Agadjanyan, M. G., A. Ghochikyan, I. Petrushina, V. Vasilevko, N. Movsesyan, M. Mkrtichyan, T. Saing, and D. H. Cribbs. 2005. Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from beta-amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. *J. Immunol.* 174: 1580–1586.
- Kutzler, M. A., C. Cao, Y. Bai, H. Dong, P. Y. Choe, V. Saulino, L. McLaughlin, A. Whelan, A. Y. Choo, D. B. Weiner, and K. E. Ugen. 2006. Mapping of immune responses following wild-type and mutant ABeta42 plasmid or peptide vaccination in different mouse haplotypes and HLA Class II transgenic mice. *Vaccine* 24: 4630–4639.
- Rosenkranz, D., S. Weyer, E. Tolosa, A. Gaenslen, D. Berg, T. Leyhe, T. Gasser, and L. Stoltze. 2007. Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J. Neuroimmunol.* 188: 117–127.
- Hussain, S., S. J. Kirwin, and S. A. Stohman. 2011. Increased T regulatory cells lead to development of Th2 immune response in male SJL mice. *Autoimmunity* 44: 219–228.
- Chen, X., J. J. Oppenheim, and O. M. Howard. 2005. BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+CD25- responder T cells than C57BL/6 mice. *J. Leukoc. Biol.* 78: 114–121.
- Bassuny, W. M., K. Ihara, Y. Sasaki, R. Kuromaru, H. Kohno, N. Matsuura, and T. Hara. 2003. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 55: 149–156.
- Lin, Y. C., J. H. Lee, A. S. Wu, C. Y. Tsai, H. H. Yu, L. C. Wang, Y. H. Yang, and B. L. Chiang. 2011. Association of single-nucleotide polymorphisms in FOXP3 gene with systemic lupus erythematosus susceptibility: a case-control study. *Lupus* 20: 137–143.
- Gao, L., K. Li, F. Li, H. Li, L. Liu, L. Wang, Z. Zhang, T. Gao, and Y. Liu. 2010. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. *J. Dermatol. Sci.* 57: 51–56.
- Ban, Y., T. Tozaki, T. Tobe, Y. Ban, E. M. Jacobson, E. S. Concepcion, and Y. Tomer. 2007. The regulatory T cell gene FOXP3 and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: an association analysis in Caucasian and Japanese cohorts. *J. Autoimmun.* 28: 201–207.
- Park, O., I. Grishina, P. S. Leung, M. E. Gershwin, and T. Prindiville. 2005. Analysis of the Foxp3/scurfin gene in Crohn's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1051: 218–228.
- Pfeifer, M., S. Boncristiano, L. Bondolfi, A. Stalder, T. Deller, M. Staufenbiel, P. M. Mathews, and M. Jucker. 2002. Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science* 298: 1379.
- Thakker, D. R., M. R. Weatherspoon, J. Harrison, T. E. Keene, D. S. Lane, W. F. Kaemmerer, G. R. Stewart, and L. L. Shafer. 2009. Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 4501–4506.
- Salloway, S., R. Sperling, S. Gilman, N. C. Fox, K. Blennow, M. Raskind, M. Sabbagh, L. S. Honig, R. Doody, C. H. van Dyck, et al; Bapineuzumab 201 Clinical Trial Investigators. 2009. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 73: 2061–2070.
- Holmes, C., D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R. W. Jones, R. Bullock, S. Love, J. W. Neal, et al. 2008. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372: 216–223.
- Schwartz, M., and R. Shechter. 2010. Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* 6: 405–410.
- Butovsky, O., M. Koronyo-Hamaoui, G. Kunis, E. Ophir, G. Landa, H. Cohen, and M. Schwartz. 2006. Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11784–11789.
- Fisher, Y., A. Nemirovsky, R. Baron, and A. Monsonogo. 2010. T cells specifically targeted to amyloid plaques enhance plaque clearance in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 5: e10830.
- Kipnis, J., H. Avidan, R. R. Caspi, and M. Schwartz. 2004. Dual effect of CD4+CD25+ regulatory T cells in neurodegeneration: a dialogue with microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(Suppl. 2): 14663–14669.

### II.1.3 Résultats complémentaires et conclusion

Notre article documente le rôle des facteurs génétiques dépendants et indépendants du CMH sur l'amplitude des réponses T CD4<sup>+</sup> induites après vaccination par A $\beta$ 42.

Nos résultats montrent que, selon les fonds génétiques, la réponse proliférative des LT CD4<sup>+</sup> vis-à-vis d'A $\beta$ 42 est très variable : elle est la plus faible chez les souris C57BL/6 et la plus forte chez les souris SJL/J. Le nombre d'épitopes restreints au CMH-II au sein du peptide de 42 aa diffère aussi dans les 5 lignées étudiées et les réponses prolifératives vis-à-vis de ces épitopes sont d'intensité très variables. Ainsi A $\beta$ 10-24, restreint au CMH-II des souris SJL/J (I-A<sup>S</sup>) paraît être un épitope fort mais à l'inverse, A $\beta$ 16-30, restreint au CMH-II des souris C57BL/6 (I-A<sup>b</sup>) semble être un épitope faible. Ces différences de réponses prolifératives sont à rapprocher des résultats obtenus chez l'Homme chez qui plusieurs épitopes restreints à différents allèles HLA-DR ont pu être identifiés. HLA-DRB1\*1501 est ainsi apparu comme étant très immunogène (Zota et al., 2009).

Les importantes différences mises en évidence en terme d'amplitude des réponses T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  dans les 5 fonds génétiques ne s'accompagnent toutefois pas de différences en terme de réponses Ac. Toutes les souris semblent en effet répondre à la vaccination en produisant un taux comparable d'IgG anti-A $\beta$ .

La faible réponse proliférative induite après vaccination chez les souris B6.H-2<sup>S</sup>, qui permettent la présentation d'un épitope fort (A $\beta$ 10-24) restreint à I-A<sup>S</sup> dans le fond C57BL/6 a souligné le rôle important de facteurs indépendants du CMH dans le contrôle de l'amplitude des réponses T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$ vaccinales. Les souris F1 (C57BL/6 x SJL/J) immunisées par A $\beta$  répondent faiblement en terme d'expansion in vivo de cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices (technique ELISPOT), ce qui semble indiquer un rôle dominant de ces facteurs indépendants du CMH. Le H-2 paraît cependant avoir aussi un impact important puisqu'à l'inverse, alors que les souris NOD semblent être un fond génétique répondant bien à la vaccination par A $\beta$ , les souris NOD.H-2<sup>b</sup>, congéniques pour l'haplotype H-2<sup>b</sup> faiblement immunogène, sont incapables de répondre (Monsonogo et al., 2006).

Les expériences d'inactivation des réponses Tregs avant vaccination par injection intrapéritonéale d'Ac anti-CD25 (clone PC61) suggèrent que les réponses T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  seraient naturellement fortement régulées par des réponses Tregs dans le fond C57BL/6. En revanche, chez les souris SJL/J, on ne détecte pas ou peu d'inhibition des réponses T

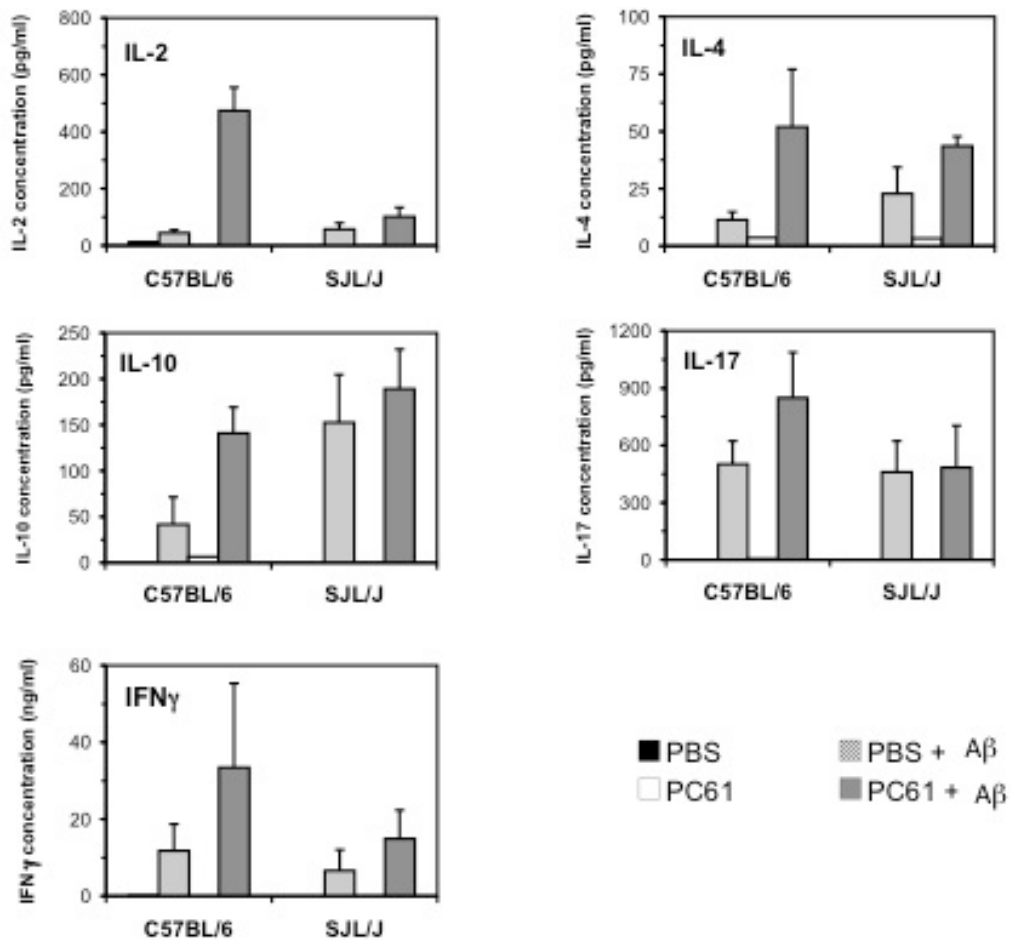
CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  par des réponses Tregs.

Par contre, si on immunise ces souris avec OVA ou PLP, les réponses T CD4<sup>+</sup> effectrices vaccinales semblent être pareillement contrôlées par des réponses Tregs dans les 2 fonds génétiques. Les différences de régulation des réponses effectrices observées vis-à-vis d'A $\beta$  entre les souris C57BL/6 et SJL/J, ne relèveraient donc pas d'un mécanisme général à tous les Ag du soi ou du non-soi mais ne pourraient concerner que quelques spécificités antigéniques.

Les différences observées en terme de régulation des réponses effectrices anti-A $\beta$  dans les deux fonds génétiques pourraient faire intervenir des facteurs impliqués dans la capacité à générer des réponses Tregs vis-à-vis d'A $\beta$ . Cependant, les isoformes de 751 et 770 aa de l'APP sont exprimées de manière similaire dans le thymus des souris C57BL/6 et des souris SJL/J suggérant que la génération de nTregs est possible dans les deux fonds génétiques. Les différences observées pourraient aussi être dues à des facteurs impliqués dans la survie des Tregs et le maintien de leur activité suppressive en périphérie. Des travaux récents documentent par exemple le rôle des cellules dendritiques dans l'homéostasie des Tregs (Darrasse-Jèze et al., 2009).

Dans l'article, nous avons montré que les Tregs contrôlent différemment l'amplitude des réponses vaccinales anti-A $\beta$  selon le fond génétique. Afin de déterminer si les Tregs influent également sur la nature des réponses T effectrices anti-A $\beta$  induites par la vaccination, nous avons quantifié *in vitro*, après restimulation en présence de CPA et de peptide A $\beta$ 42, les cytokines secrétées par les LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir des ganglions drainants des souris traitées ou non par Ac anti-CD25 (PC61) et immunisées. Des dosages par tests ELISA sur des surnageants de culture prélevés à J1, J2 et J3 après stimulation montrent que l'inactivation des cellules Tregs ne semble pas influencer sur la nature de la réponse vaccinale induite (cf figure 12). Les réponses cytokiniques sont en effet proportionnellement identiques que les Tregs aient ou non été inactivés. Les LT CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  effecteurs induits dans les fonds C57BL/6 et SJL/J sont majoritairement orientés vers un profil Th1. L'utilisation de l'adjuvant complet de Freund dans la formulation de notre vaccin explique probablement l'orientation des réponses effectrices vers ces réponses de type pro-inflammatoires. De même, concernant la réponse Ac nos résultats montrent que la déplétion des Tregs ne fait qu'augmenter la quantité d'IgG anti-A $\beta$  circulantes sans modifier la proportion des différentes sous-classes (données non montrées). Les réponses Tregs semblent donc moduler essentiellement l'amplitude des réponses vaccinales T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  et non leur différenciation fonctionnelle, du moins dans

un contexte de vaccination avec un adjuvant fort.



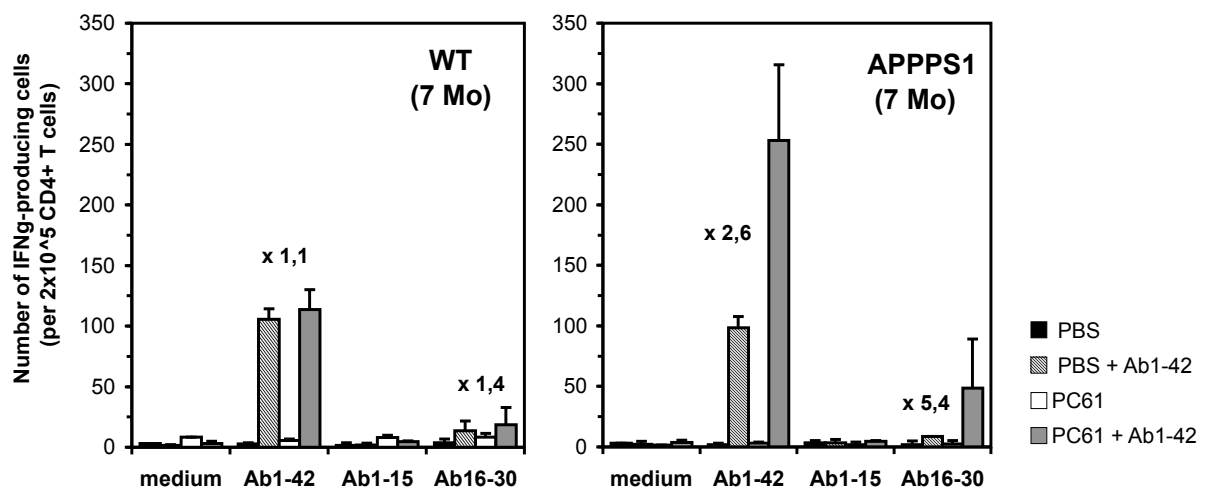
**Figure 12: Impact de l'inactivation des cellules T régulatrices sur la nature de la réponse vaccinale T CD4+ anti-Aβ.** L'Ac anti-CD25 (clone PC61) a été injecté en i.p. afin d'inactiver les cellules Tregs 4 jours avant l'immunisation par Aβ42 dans le coussinet plantaire. 10 jours après l'immunisation, les LT CD4+ des ganglions drainants ont été triés et restimulés en présence de CPA et de 5μM d'Aβ42. La quantité de cytokines produites dans le surnageant de culture a été déterminée par technique ELISA à J2 pour l'IL-2, l'IL-17 et l'IFNγ, et à J3 pour l'IL-4 et l'IL-10 (moyenne +/- SD; 3-5 souris par groupe).

L'ensemble de nos résultats soulève des points importants à prendre en compte dans un contexte immunothérapeutique. Outre le CMH, des facteurs génétiques indépendants, comme la capacité à pouvoir générer des réponses Tregs contrôlant les réponses effectrices T CD4+ anti-Aβ, semblent avoir un impact crucial sur l'amplitude de la réponse vaccinale T CD4+ anti-Aβ chez la souris. Par extrapolation, on peut supposer que ces mêmes facteurs



pourraient être corrélés chez l'Homme à l'efficacité thérapeutique ou, au contraire au risque de développer des effets secondaires de type méningo-encéphalites. Nous n'avons pas observé ce type d'effets chez les souris que nous avons utilisées mais il faut rester prudent avec l'extrapolation de ces résultats à l'Homme, car d'une part nous n'avons étudié que 5 fonds génétiques différents (ce qui est infime comparé à la diversité génétique humaine), et d'autre part il semble exister des différences en terme de sensibilité à l'encéphalite entre les deux espèces animales.

Dans un modèle murin de la MA (souris APPPS1 sur le fonds C57BL/6), l'administration d'Ac anti-CD25 avant la vaccination se traduit par un effet encore plus marqué d'augmentation des réponses T CD4+ anti-A $\beta$  comparativement aux souris sauvages. Cet effet n'est pas retrouvé dans les expériences d'immunisation avec de l'OVA ou de la PLP. Ceci suggère que les souris APPPS1 développeraient spontanément des réponses T CD4+ anti-A $\beta$ , dont l'expansion serait contrôlée par des cellules Tregs. En accord avec cette hypothèse, nous avons constaté que les souris APPPS1 plus âgées (7 mois au lieu de 4 mois) répondaient encore plus fortement à la vaccination que les souris contrôles lorsqu'on administrait de l'Ac anti-CD25 4 jours avant l'immunisation (cf figure 13).



**Figure 13: Impact de l'inactivation des Tregs sur la réponse vaccinale des souris APPPS1 âgées de 7 mois.** L'Ac anti-CD25 (clone PC61) a été injecté en i.p. afin d'inactiver les cellules Tregs 4 jours avant l'immunisation par A $\beta$ 42 dans le coussinet plantaire. 10 jours après l'immunisation, les LT CD4+ des ganglions drainants ont été triés et restimulés en présence de CPA et de 5 $\mu$ M de différents peptides d'A $\beta$ . La proportion de LT produisant de l'IFN $\gamma$  a été appréciée par technique ELISPOT, après 16h de restimulation in vitro (moyennes $\pm$  SD; 3 souris par groupe).

Ainsi, ce phénomène semble s'amplifier avec l'évolution de la maladie : l'accumulation croissante d'A $\beta$ 42 pourrait être source d'une augmentation des réponses effectrices spontanées dirigées contre A $\beta$ , mais ces dernières resteraient toujours sous le contrôle de réponses Tregs.

Ces données laissent entrevoir un possible rôle des cellules Tregs et d'éventuelles réponses effectrices anti-A $\beta$  spontanées dans la physiopathologie de la maladie. C'est ce que nous avons tâché d'étudier dans la seconde partie de notre travail.

## **II.2 Impact des réponses T CD4+ sur la physiopathologie dans un modèle murin de la MA**

**« Les cellules T régulatrices modulent la neuroinflammation et ralentissent la progression de la maladie dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer »**

C.Toly-Ndour, S.Aid, T.Chaigneau, C.Rovira, J.Mariani, M.Holzenberger, P.Aucouturier, G.Dorothee.

### **II.2.1 Introduction**

Afin de caractériser le rôle des réponses T CD4+ et des réponses Tregs dans la physiopathologie de la MA, nous avons choisi d'éliminer et/ou d'inactiver les cellules Tregs à un stade précoce grâce à l'injection intrapéritonéale (i.p.) d'Ac anti-CD25 (clone PC61).

Notre modèle murin développe ses premières plaques dès l'âge de 6 semaines dans le cortex, aussi avons-nous choisi d'administrer l'Ac anti-CD25 dès la 5<sup>ème</sup> semaine de vie. Cette injection précoce devrait permettre d'empêcher le développement spontané d'une réponse Treg spécifique d'A $\beta$  ou du moins d'en limiter les effets. Des études préliminaires nous ont permis de montrer que le nombre de cellules Tregs restait fortement diminué pendant plus d'un mois après une injection unique de PC61. La durée de l'efficacité du traitement est donc au moins égale à un mois, sans oublier que l'effet de cet Ac passe également par sa capacité à inactiver les Tregs, en complément de leur élimination par apoptose (McNeill et al., 2007). Nous avons choisi de faire une seconde injection à la 9<sup>ème</sup> semaine de vie afin que les souris soient maintenues dans un environnement appauvri en cellules Tregs pendant plus de 8 semaines, c'est-à-dire au moins jusqu'à l'âge de 3 mois, période à laquelle la pathologie amyloïde est déjà bien développée.

Nous avons dans un premier temps étudié l'impact de l'inhibition des réponses Tregs

sur la pathologie amyloïde et la neuroinflammation à différents stades de la maladie. Les âges de 4 et 7 mois nous ont paru pertinents. A 4 mois, la neuroinflammation est déjà détectable et la pathologie amyloïde commence à envahir l'hippocampe des souris APPPS1. A 7 mois, la neuroinflammation s'est intensifiée et est devenue chronique, et la pathologie amyloïde s'est considérablement étendue.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Saba Aïd (équipe du Dr M Holzenberger, CDR St Antoine), nous avons par ailleurs étudié l'impact de l'inactivation des réponses Tregs sur les fonctions cognitives des souris APPPS1 (tests du labyrinthe de Barnes à 7 et 9 mois). Enfin, l'effet de l'élimination des Tregs sur la plasticité synaptique (électrophysiologie de l'hippocampe à 8-9 mois) a été analysé en collaboration avec le Dr Catherine Rovira et le Pr Jean Mariani (UMR 7102, Jussieu).

## **II.2.2 Matériels et méthodes**

### ***II.2.2.1 Animaux***

Les souris APPPS1 (*Thy1-APP swe / Thy1-PS1 L166P*) nous ont été données par le Pr Mathias Jucker (Université de Tübingen, Allemagne). Nous avons utilisé des souris APPPS1 hétérozygotes dans l'ensemble de nos expériences. La réalisation du phénotype lymphocytaire a été effectuée sur des souris mâles issues du croisement entre des souris mâles APPPS1 hétérozygotes et des souris femelles *Foxp3EGFP* homozygotes. Ces animaux ont été élevés dans des conditions sanitaires strictes (animalerie EOPS (Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques) du CDR St Antoine (PHEA)).

### ***II.2.2.2 Inactivation in vivo des cellule Tregs CD25+***

Les souris ont reçu deux injections intra-péritonéales d'ascite de souris contenant plusieurs µg d'Ac anti-CD25 (clone PC61 (rat)) à 5 et 9 semaines de vie. Pour s'assurer de l'efficacité du traitement, les Tregs ont été quantifiés 4 et 28 jours après la 1<sup>ère</sup> administration de l'Ac, et 4 et 28 jours après la 2<sup>nde</sup> administration de l'Ac dans des échantillons de sang. Cette quantification a été effectuée grâce à un immunomarquage de surface anti-CD25 (clone 7D4) et, après fixation et perméabilisation des cellules, grâce à un marquage intranucléaire anti-Foxp3 (Clone FJK-16S). Les échantillons ont ensuite été analysés sur un FACSCalibur et

les données ont été intégrées grâce au logiciel FlowJo.

### ***II.2.2.3 Histologie***

#### **II.2.2.3.1 Immunomarquage anti-CD3**

Les souris ont été anesthésiées (mélange Kétamine-Xylazine injecté à dose létale par voie i.p.) et perfusées avec du PBS afin de laver les vaisseaux et les capillaires cérébraux de toutes les cellules circulantes. Après sacrifice, les 2 hémisphères cérébraux ont été séparés puis découpés frontalement en 3 parties : antérieure, médiane et postérieure (cervelet). Chacune des parties ainsi isolée a été immergée dans du liquide cryoservateur (Tissue Tek) et conservée à -80°C. Les parties médianes ont ensuite été coupées à nouveau frontalement en 3 séries non continues (espacées de 100µm). Chaque série contenait 8 coupes de 10 microns d'épaisseur. Elles se situaient au niveau du lobe temporal médian qui contient l'hippocampe. Les coupes ont ensuite été séchées 2h à température ambiante puis fixées à l'acétone à 4°C pendant 15 minutes. Après saturation à l'albumine bovine (PBS 1X-Tween 0,1% - BSA 5%), les coupes ont été marquées avec un Ac de lapin anti-CD3 (clone SP7, 5µg/ml), dilution 1/200ème) puis la révélation a été effectuée avec un Ac de chèvre anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488. Le dénombrement des cellules CD3 positives a ensuite été effectué grâce à un microscope à fluorescence équipé d'une caméra (Olympus BX61) sur 3 coupes de 3 séries différentes pour chacune des souris étudiée.

#### **II.2.2.1.2 Immunomarquage anti-A $\beta$**

Le prélèvement des cerveaux et la réalisation des coupes ont été effectués selon le même principe que décrit précédemment pour le marquage anti-CD3. Les coupes ont ensuite été immunomarquées avec un Ac de souris anti-A $\beta$  humain (clone BAM10) puis la révélation a été effectuée avec un Ac de chèvre anti-souris couplé à l'Alexa 594. Nous avons ensuite quantifié l'aire cérébrale atteinte par la pathologie A $\beta$  grâce au logiciel ImageJ.

### ***II.2.2.2 ELISA anti-A $\beta$ 42***

Nous avons utilisé une technique ELISA développée par Invitrogen. Après sacrifice des souris, chaque cerveau a été pesé puis placé dans 4 ml d'une solution de guanidine HCl 5 M Tris 50mM afin de permettre la dénaturation des protéines. Les cerveaux ont ensuite été broyés (Polytron) et des aliquots de 1ml ont été congelés à -80°C. Les échantillons ont été dilués au 1/50<sup>ème</sup> dans une solution froide de PBS 5% BSA 0.03% Tween 20 et l'extraction des protéines a été réalisée après centrifugation pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines, a ensuite été soigneusement décanté et conservé à 4°C le temps de la réalisation du dosage. Le kit fournissait des plaques prêtes à l'emploi, contenant des puits dans le fond desquels des anticorps dirigés contre la partie N-terminale d'A $\beta$ 42 avaient préalablement été fixés. Une gamme d'étalonnage a été effectuée en 8 points par dilution de raison 2 d'un étalon de 1 ng/ml. 50  $\mu$ l d'étalon ou de serum à différentes dilutions (1/20<sup>ème</sup>, 1/40<sup>ème</sup> et 1/80<sup>ème</sup>), puis 50  $\mu$ l d'Ac de détection (Ac de lapin dirigé contre la partie C-terminale du peptide A $\beta$ 42) ont été déposés. Après 3h d'incubation à température ambiante sous agitation, 4 lavages ont été effectués et 100  $\mu$ l d'une solution d'Ac de révélation prête à l'emploi ont été ajoutés (Ac anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase HRP). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et 4 lavages, 100  $\mu$ l de substrat (tetramethylbenzidine TMB) ont été déposés. Les plaques ont été placées à l'abri de la lumière. La réaction a été arrêtée 10 minutes après par ajout de solution Stop. La densité optique a été mesurée à 450 nm (référence à 750 nm).

### ***II.2.2.3 Immunomarquage et analyse par cytométrie en flux***

#### **II.2.2.3.1 Phénotype des cellules lymphoïdes et myéloïdes périphériques**

Des suspensions cellulaires ont été préparées à partir des différents organes lymphoïdes étudiés (ganglions périphériques, rate, moelle osseuse). Après blocage des récepteurs Fc (Ac 2.4G2), des immunomarquages de surface avec des Ac couplés à des fluochromes (Ac anti-CD4, anti-CD25 et anti-CD44) ont été réalisés chez les souris Foxp3-EGFP APPPS1+ ou APPPS1-. Dans les souris APPPS1 traitées par double injection de PC61 et leurs contrôles, un immunomarquage de surface anti-CD4 et anti-CD8 a été effectué sur les cellules des ganglions cervicaux, suivi de la fixation / perméabilisation des cellules et d'un

marquage intra-nucléaire anti-Foxp3 et anti-Ki67. Les échantillons ont été analysés sur un FACSCalibur ou un LSRII et les données ont été intrégréées grâce au logiciel FlowJo.

#### **II.2.2.3.2 Immunomarquage des phagocytes mononucléés du cerveau**

Après anesthésie (par injection i.p. de kétamine-Xylazine à dose létale), les souris ont été perfusées par du PBS afin d'éliminer les cellules circulantes présentes dans les vaisseaux irriguant le cerveau. Les cerveaux ont été collectés, découpés en petits morceaux en milieu HBSS (Hank's Balanced Saline Solution) puis incubés 1h à 37°C en présence de collagénase (1mg/ml) et de DNase (1mg/ml). La réaction de digestion a été arrêtée par ajout d'EDTA (10mM) dans le milieu. Les cellules, ainsi libérées de la matrice extracellulaire, ont ensuite été remises en suspension. Elles ont été filtrées puis lavées en PBS BSA 0.5% à plusieurs reprises. Un gradient de Percoll (37%-70%), a ensuite permis d'isoler les cellules myéloïdes et lymphoïdes du reste des cellules gliales et neuronales. Après blocage des récepteurs Fc (2.4G2), nous avons effectué un immunomarquage (Ac anti-CD45, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-TREM2 et anti-Gr1) et analysé le phénotype des cellules myéloïdes par cytométrie en flux (FACS : BD LSRII, logiciel d'analyse : Flowjo).

#### ***II.2.2.4 Extraction d'ARN, RT-PCR quantitative et PCR Array***

Après sacrifice, chaque cerveau de souris a été placé dans 5 ml de Trizol puis broyé (Polytron), aliquoté (par 1 ml) et rapidement congelé à -80°C. Après extraction phénol-chloroforme, les ARN de chaque échantillon ont été purifiés sur colonne (Qiagen Mini-Kit), quantifiés et leur intégrité a été vérifiée par migration sur gel d'agarose (présence de bandes correspondant à la taille des ARN ribosomiaux 18S et 28S). Après une étape de « reverse-transcription » (RT) (RT2 First Strand Kit, SA Biosciences), les ADN complémentaires (ADNc) obtenus ont été dosés et répartis à raison de 200 ng/ puits dans des plaques 96 puits (PCR Array) construites à façon (SA Biosciences). Chacun des puits de ces plaques contenait des amorces permettant l'amplification spécifique d'un gène. Un mélange contenant enzyme, tampon et le fluorophore SYBR Green (composé se liant aux acides nucléiques double brin) a été ajouté dans chaque puits. La réaction de PCR quantitative et la mesure de la fluorescence ont été effectuées sur un Light Cycler (Abiprism 7300).

### ***II.2.2.5 Tests comportementaux***

Le comportement des souris a été analysé grâce au test du labyrinthe de Barnes. Le labyrinthe est composé d'un plateau circulaire contenant un certain nombre de trous. Une boîte (refuge) est disposée sous un des trous. La souris, soumise à un stress auditif, explore les différents trous du labyrinthe jusqu'à trouver la boîte pour s'y cacher. Plusieurs paramètres sont mesurés : la latence (temps mis à trouver le trou), la vitesse, la distance totale parcourue, le nombre d'erreurs commis par la souris et la précision. Ce dernier paramètre est un score composite prenant en compte à la fois le nombre de « mauvais » trous visités mais aussi leur distance par rapport au trou sous lequel se trouve la boîte. Le test se décompose en 2 parties : une phase d'apprentissage (évaluant la mémoire d'acquisition) pendant laquelle la souris est soumise 4 fois par jour pendant 4 jours à la même expérience, la boîte étant laissée au même endroit; et une phase de test (évaluant la mémoire de référence spatiale) où la boîte est retirée et le comportement de la souris vis-à-vis du trou où était préalablement disposé la boîte est mesuré.

## **II.2.3 Résultats**

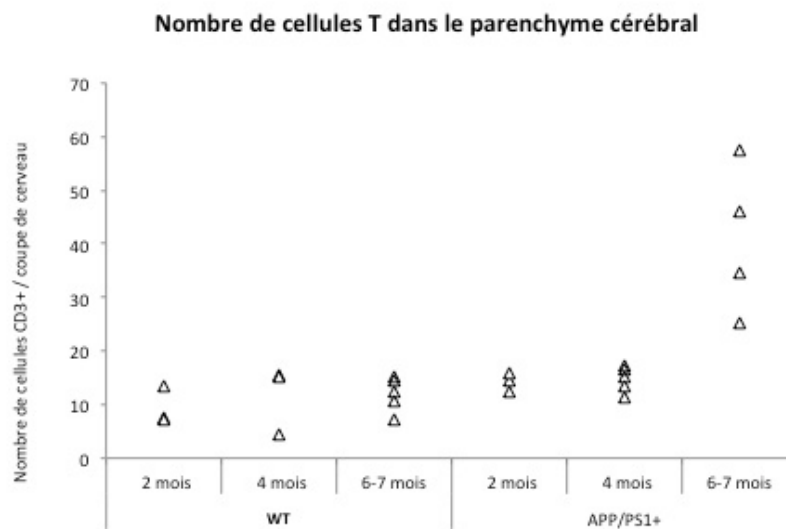
### ***II.2.3.1 Les souris APPPS1 montrent une augmentation du recrutement des cellules T dans le parenchyme cérébral.***

Il est maintenant bien établi que l'amylose cérébrale présente dans les modèles murins de la MA est source d'inflammation et d'activation de l'immunité innée. Ce qui a été moins bien étudié, c'est si le système immunitaire adaptatif est lui aussi mis à contribution. Nous avons donc recherché des signes d'activation lymphocytaire à différents stades de la maladie *in situ*, dans le cerveau, ainsi que dans les organes lymphoïdes secondaires.

Nous avons ainsi effectué une étude comparative du recrutement de cellules T dans le cerveau des souris APPPS1 et des souris sauvages. Les résultats indiquent que celui-ci augmente fortement avec l'âge chez les souris APPPS1, au contraire des souris sauvages pour lesquelles l'augmentation reste modérée (cf figure 14). Le nombre moyen de cellules T par coupes de cerveau au niveau du lobe temporal médian passe en effet de 15 à 40 entre 2 et 7 mois chez les souris APPPS1. Dès l'âge de 2 mois, les cerveaux des souris APPPS1 semblent



contenir une plus grande quantité de cellules T comparativement aux cerveaux des souris sauvages. La différence est particulièrement marquée à 7 mois. Ainsi le recrutement des cellules T au niveau du parenchyme cérébral augmente de manière importante relativement tardivement, à un stade où la neuroinflammation et la pathologie amyloïde sont déjà bien développées. Parmi les cellules T recrutées au niveau cérébral on trouve une proportion importante de T CD8+ (2/5<sup>ème</sup>) mais aussi des cellules T CD3+ non CD8+ (3/5<sup>ème</sup>) qui comprennent probablement un fort contingent de cellules CD4+. La proportion relative de ces populations lymphocytaires est sensiblement la même à 4 et à 7 mois (résultats non montrés). Ces résultats confirment ce qui a déjà été décrit chez l'Homme (Togo et al., 2002). Ils peuvent être le signe du développement d'une réponse immune in situ et/ou d'une augmentation de l'immunosurveillance du SNC consécutive à la réaction neuroinflammatoire.



**Figure 14 : Recrutement des lymphocytes T dans le parenchyme cérébral des souris sauvages (WT) et des souris APPPS1 en fonction de l'âge.**

Immunofluorescence sur coupes de cerveaux (coupes frontales au niveau du lobe temporal médian qui contient l'hippocampe). Marquage anti-CD3 (clone SP7) et dénombrement des cellules DAPI+ CD3+. (n= 3-5 souris par groupe).

Afin de déterminer si le recrutement de lymphocytes T CD4+ dans le parenchyme cérébral est associé à une activation du système immunitaire adaptatif en périphérie, nous avons choisi de phénotyper les cellules T CD4+ par cytométrie en flux, dans les organes

lymphoïdes secondaires (ganglions et rate). Précédemment, notre article avait suggéré le développement d'une réponse T CD4<sup>+</sup> effectrice spontanée fortement régulée par une réponse Treg chez les souris APPPS1. Dans le but de caractériser simultanément et aisément les réponses T CD4<sup>+</sup> effectrices et les cellules Tregs, l'étude phénotypique a été réalisée sur des souris APPPS1 Foxp3-EGFP, chez lesquelles les cellules Foxp3<sup>+</sup> (Tregs) sont facilement identifiables par l'expression de la protéine fluorescente GFP. Nous avons procédé au marquage des suspensions cellulaires des différents organes étudiés avec un mélange contenant des Ac anti-CD4, des Ac anti-CD25 et des Ac anti-CD44

Nos résultats montrent que ni la proportion en cellules T CD4<sup>+</sup> totales ni la proportion de cellules Tregs parmi les cellules T CD4<sup>+</sup> ne diffèrent dans les organes lymphoïdes des souris APPPS1 et des souris sauvages contrôles, quel que soit leur âge (4 ou 7 mois) (données non montrées).

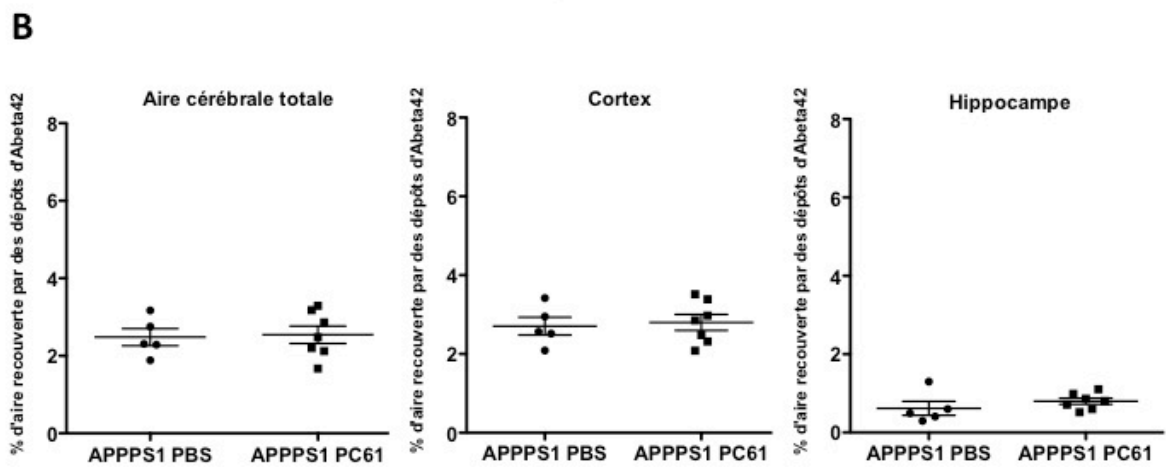
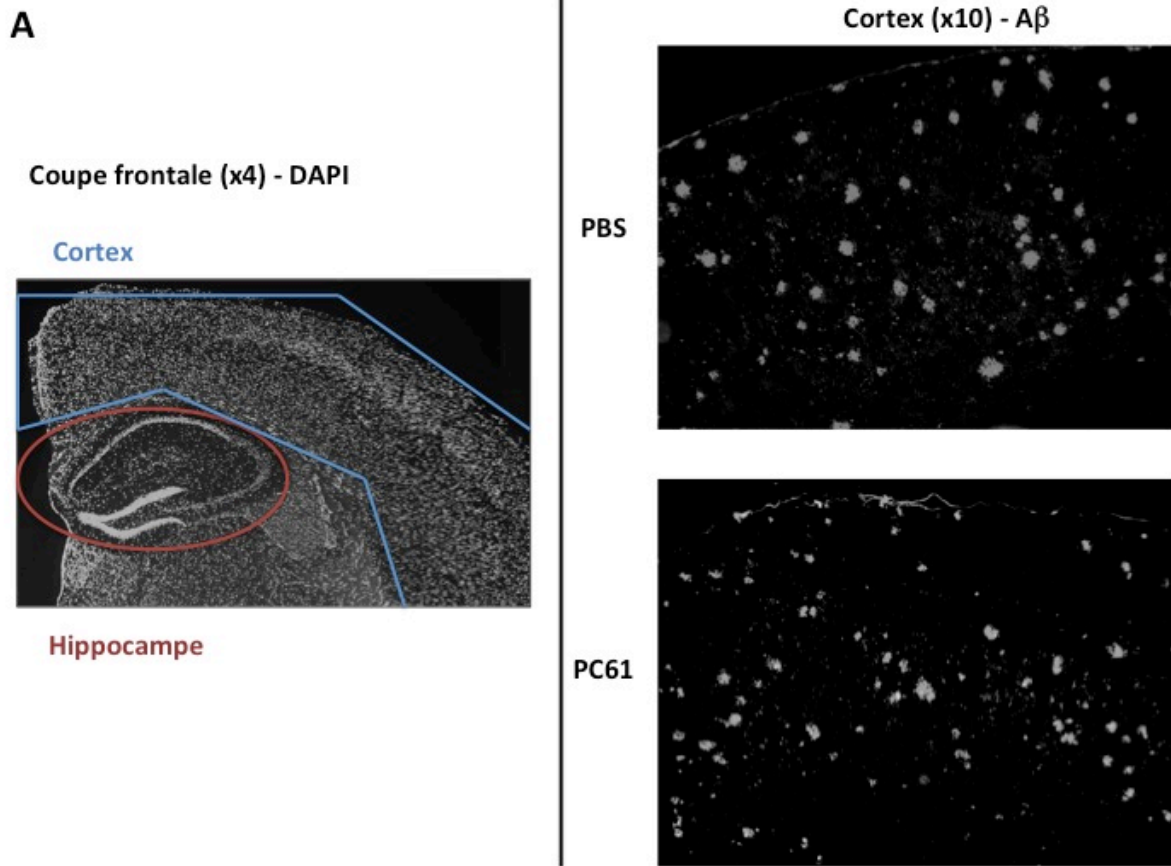
Chez les souris APPPS1 et chez les souris contrôles, les cellules T CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> sont présentes en proportion comparable dans la rate et dans les ganglions, à 4 et 7 mois.

Nous n'avons ainsi pas pu déceler de différences phénotypiques majeures sur les populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> présentes dans les organes lymphoïdes secondaires des souris APPPS1 comparativement aux souris sauvages. Une étude plus fine du phénotype des populations de LT CD4<sup>+</sup> présentes dans les ganglions cervicaux et au niveau cérébral permettrait peut-être d'apporter des éléments plus discriminants.

### ***II.2.3.2 Impact des réponses Tregs sur la pathologie amyloïde***

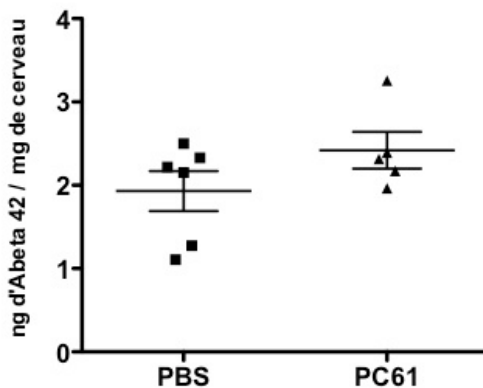
Nous avons cherché à apprécier les conséquences de l'inactivation des cellules T régulatrices par injection de PC61 sur la pathologie amyloïde. Nous avons effectué un marquage anti-A $\beta$  sur les coupes de souris APPPS1 et quantifié l'aire cérébrale atteinte par la pathologie amyloïde. Au cours de notre analyse, nous avons distingué l'aire corticale et l'aire hippocampique du fait du développement séquentiel de la pathologie amyloïde (atteinte du cortex puis de l'hippocampe) dans notre modèle murin.

A 4 mois, il ne semble pas y avoir de différences significatives chez les souris traitées, par PC61, que ce soit au niveau du cortex ou de l'hippocampe (cf figure 15).



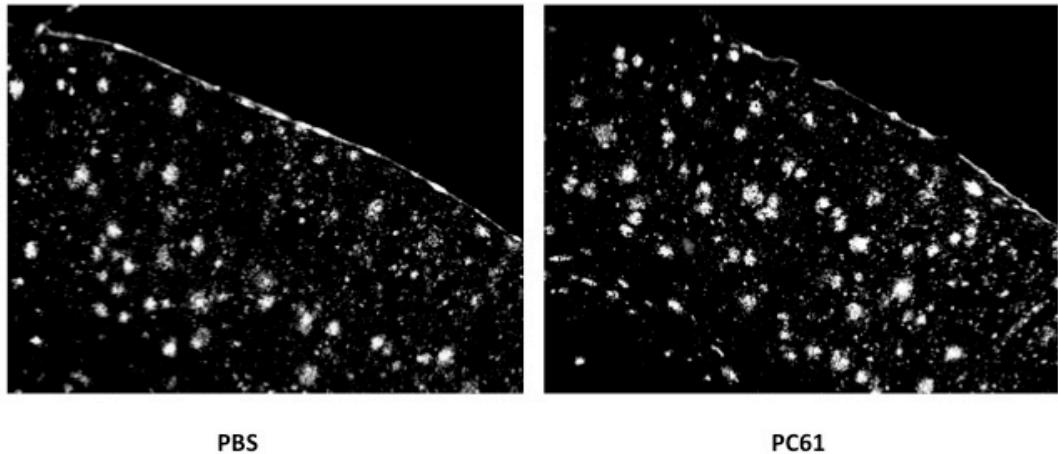
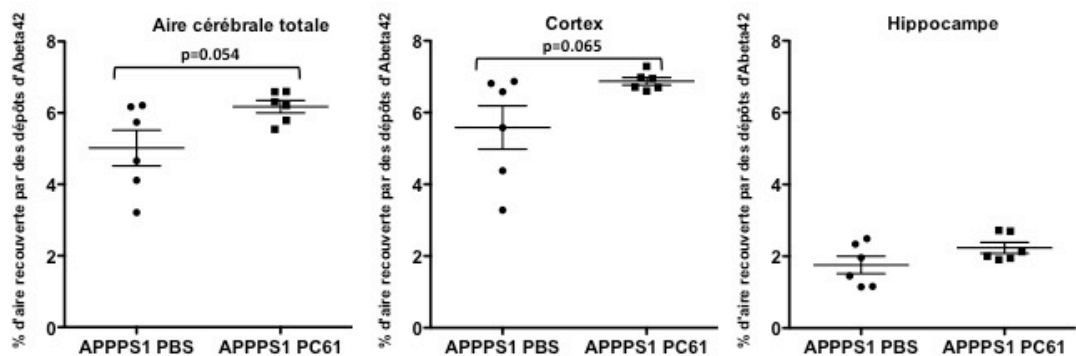
**Figure 15 :** Quantification de la pathologie amyloïde dans des souris APPS1 traitées par double injection de PBS ou d'Ac anti-CD25 (PC61). Souris âgées de 4 mois. A) Exemple de coupe de cerveau étudiée (coupe frontale du lobe temporal médian englobant la structure hippocampique, marquage des noyaux cellulaires au DAPI, grossissement x4) et images représentatives de l'immunomarquage anti-Abeta dans le cortex des souris traitées par double injection d'Ac anti-CD25 (PC61) ou de PBS (grossissement x10) B) Quantification de la pathologie amyloïde (Logiciel ImageJ) chez les souris traitées par Ac anti-CD25 et PBS. N=6 souris/ groupe, moyenne +/- s.e.m

Le dosage par technique ELISA de la quantité totale d'A $\beta$ 42 intracérébrale à l'âge de 4 mois n'a pas montré de différence significative entre les souris traitées par PC61 et celles ayant reçu du PBS, suggérant que l'inactivation des cellules Tregs n'a pas non plus d'effet sur l'accumulation des formes monomériques ou oligomériques d'A $\beta$  à ce stade de la maladie (cf figure 16).



**Figure 16 : Quantification du taux d'A $\beta$ 42 total dans les cerveaux de souris APPPS1 traitées par double injection de PBS ou de PC61. Souris âgées de 4 mois. Technique ELISA (Invitrogen) N=5 souris/groupe. Moyenne +/-s.e.m**

En revanche, à l'âge de 8 mois, on observe chez les souris traitées par PC61 une tendance à développer une pathologie amyloïde plus prononcée ( $p=0.054$ ). Cette tendance concerne essentiellement les dépôts amyloïdes corticaux (cf figure 17). Elle semble se traduire essentiellement par une augmentation du nombre de plaques, car la taille moyenne de ses dernières ne semble pas différer entre les souris APPPS1 traitées et non traitées (résultats non montrés).

**A****B**

**Figure 17 : Quantification de la pathologie amyloïde chez les souris APPS1 traitées par double injection de PBS ou de PC61. Souris âgées de 8 mois.** A) Images représentatives de l'immunomarquage anti-A $\beta$  dans le cortex des souris traitées par double injection d'Ac anti-CD25 (PC61) ou de PBS (grossissement x10) B) Quantification de la pathologie amyloïde (Logiciel ImageJ) chez les souris traitées par double injection d'Ac anti-CD25 (PC61) ou de PBS. N=6 souris/groupe moyenne +/- s.e.m

L'inactivation précoce des cellules T régulatrices chez les souris APPS1 semble donc avoir un effet accélérateur sur le développement de la pathologie amyloïde. Cet effet reste toutefois modéré et tardif, puisque des différences ne sont décelables qu'à l'âge de 8 mois. Il serait intéressant de regarder si ces différences s'accroissent encore à des âges plus avancés.

Les Tregs semblent donc ici avoir un rôle plutôt bénéfique en limitant le développement de la pathologie amyloïde. Les mécanismes impliqués dans cet effet pourraient mettre en jeu les propriétés anti-inflammatoires des cellules Tregs. En effet, certains travaux relatent qu'une augmentation de la neuroinflammation pourrait favoriser

l'exacerbation de la pathologie amyloïde (Yamamoto et al., 2005). Nous avons donc cherché à apprécier l'impact du traitement par Ac anti-CD25 sur la neuroinflammation.

### ***II.2.3.3 Impact des réponses Tregs sur la neuroinflammation***

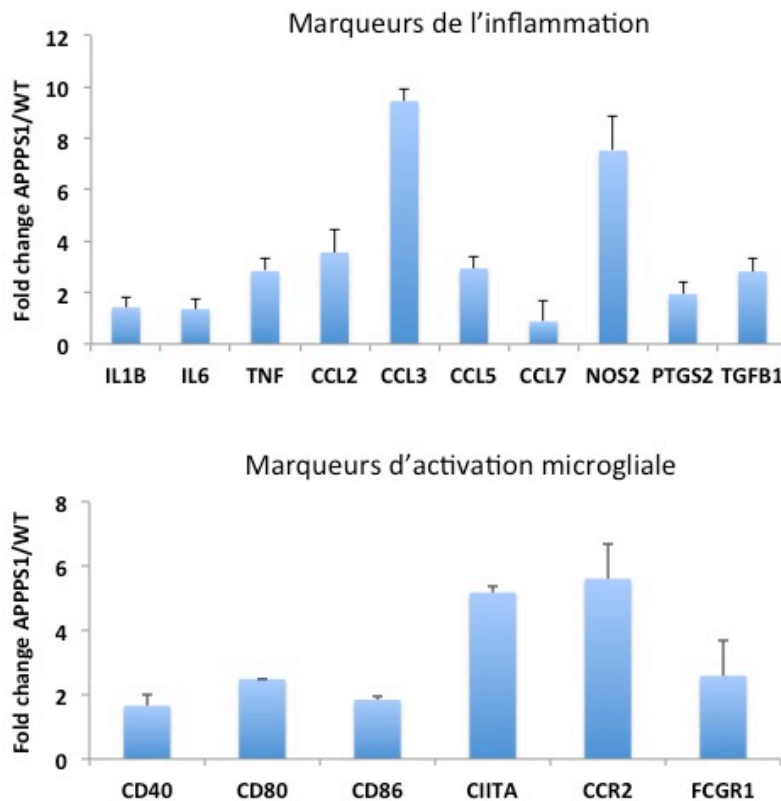
Nous avons opté pour une approche large, afin de pouvoir identifier des paramètres d'intérêt, modifiés au niveau cérébral suite à la double injection d'Ac anti-CD25. Pour cela nous avons décidé de quantifier les variations d'expression de plusieurs gènes (au niveau ARNm) à l'aide de plaques de RT-PCR quantitatives fabriquées à façon (PCR Array, SA Biosciences). Nous avons choisi d'étudier plus particulièrement un certain nombre de gènes impliqués dans les réponses immunitaires innées et adaptatives, à savoir : des récepteurs de l'immunité innée, des cytokines, des chimiokines, des médiateurs de l'inflammation, des marqueurs d'activation microgliale et des facteurs de transcription impliqués dans l'orientation des réponses T CD4+ effectrices. Nous nous sommes aussi intéressés à certains gènes impliqués dans la modulation de l'homéostasie cérébrale, comme des facteurs neurotrophiques ou des marqueurs de mort cellulaire (cf tableau 2).

Paramètre étudié	Gènes concernés
Inflammation	IL-1beta, IL-6, TNF $\alpha$ , CCL-2 (MCP-1), CCL3 (MIP1- $\alpha$ ), CCL5, (RANTES), CCL7 (MCP-3), NOS2 (iNOS), PTGS2 (Cox2)
Récepteurs de l'immunité innée	CD36, RAGE, CD14, TLR4, TLR2
Activation microgliale et macrophagique	CD40, CD80, CD86, CIITA, CCR2, FC $\gamma$ R1
Activation astrocytaire	TGF $\beta$
Présence et nature des réponses T CD4	CD3 $\epsilon$ , CD40L, IL-12A, IL-12B, IL-23A (p19), IL-27B, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-17A, IL-21, IL-22, , IL2R $\alpha$ (CD25), IL-10, TGF $\beta$ , CTLA-4 T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ C, Foxp3
Facteurs neurotrophiques	BDNF, IGF1
Mort cellulaire	Caspase 3
Gènes dits de « Ménage »	HPRT1, GAPDH

**Tableau 2 : Liste des gènes dont l'expression intracérébrale a été étudiée par PCR Array (RT-PCR quantitative)**

Pour comparer les profils d'expression génique dans nos différentes souris, nous avons utilisé la méthode des  $\Delta\Delta Ct$ . Le Ct est le cycle d'amplification de la PCR à partir duquel on arrive à détecter la présence d'ADNc pour un gène donné, Il correspond à l'apparition d'une fluorescence quantifiable, émise par le SYBR Green dans le puits. Par soustraction entre le Ct d'un gène d'intérêt et le Ct du gène de l'HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase, gène dit de « ménage » dont l'expression est ubiquitaire, constitutive et peu influencée par l'environnement), nous avons calculé des  $\Delta Ct$ . Ensuite, en comparant les  $\Delta Ct$  des souris APPPS1 par rapport aux  $\Delta Ct$  des souris sauvages nous avons obtenu des  $\Delta\Delta Ct$ . Ces  $\Delta\Delta Ct$  ont été transformés en facteur d'expression (« fold change », FC) par la formule mathématique suivante :  $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . L'utilisation d'un second gène de ménage, la GAPDH, nous a permis de contrôler les résultats obtenus avec le gène de l'HPRT.

Dans un premier temps, nous avons cherché à valider notre système en comparant les profils d'expression génique des souris APPPS1 âgées de 3 mois à ceux des souris sauvages de même âge. Chez les souris APPPS1, nous avons pu déceler une augmentation importante de l'expression de gènes impliqués dans la neuroinflammation : tels  $TNF\alpha$  (facteur 2.8), CCL2 (MCP-1, facteur 3.6), CCL3 (MIP1- $\alpha$ , facteur 9.5) et CCL5 (RANTES, facteur 2.9) (cf figure 18). De même, certains gènes dont l'expression est corrélée à l'activation microgliale sont surexprimés chez les souris APPPS1 : la molécule de co-stimulation CD80 (facteur 2.5) et le transactivateur du CMH de classe II (CIITA), qui permet l'expression du CMH-II à la surface de la microglie (facteur 5.2). CCR2 est également surexprimé (facteur 5.6), ce qui, corrélé à la surexpression de CCL2, pourrait être le signe d'un recrutement des cellules myéloïdes périphériques dans le parenchyme cérébral. Le  $TGF\beta$ , cytokine régulatrice produite en grande quantité par les astrocytes réactifs et ayant des fonctions plutôt anti-inflammatoires est aussi surexprimé chez les souris APPPS1 (facteur 2.8).



**Figure 18** : L'expression de marqueurs de la réaction neuroinflammatoire et de l'activation microgliale est augmentée dans le cerveau des souris APPPS1 par rapport aux souris sauvages. Facteurs d'expression (fold change) (ARNm) des marqueurs de l'inflammation et des marqueurs d'activation microgliale dans le parenchyme cérébral des souris APPPS1 par comparaison aux souris sauvages. PCR Array SA Biosciences. RT PCR quantitative sur extraits totaux de cerveau. Souris âgées de 3 mois. N=2 souris/ groupe.

Les ARNm de NOS2 (iNOS, NO synthase inductible) sont présents en plus forte quantité chez les souris APPPS1 que chez les souris sauvages (facteurs (fold change) de 7.5). Par une expérience de RT-PCR quantitative indépendante, nous avons secondairement constaté que NOX2 (NADPH oxydase, enzyme microgliale impliquée dans la production de radicaux libres) était aussi surexprimée (facteur 2.1) (résultats non montrés). Il semble donc qu'un stress oxydant important se développe chez les souris malades.

L'ensemble de nos résultats est en accord avec ceux obtenus dans différentes études d'expression génique et/ou protéique effectuées dans d'autres modèles murins de la maladie, ainsi que chez des patients atteints de MA.

En revanche, nous n'avons pas observé de variations au niveau de l'expression des gènes impliqués dans les réponses effectrices T CD4+. Beaucoup d'ADNc étaient

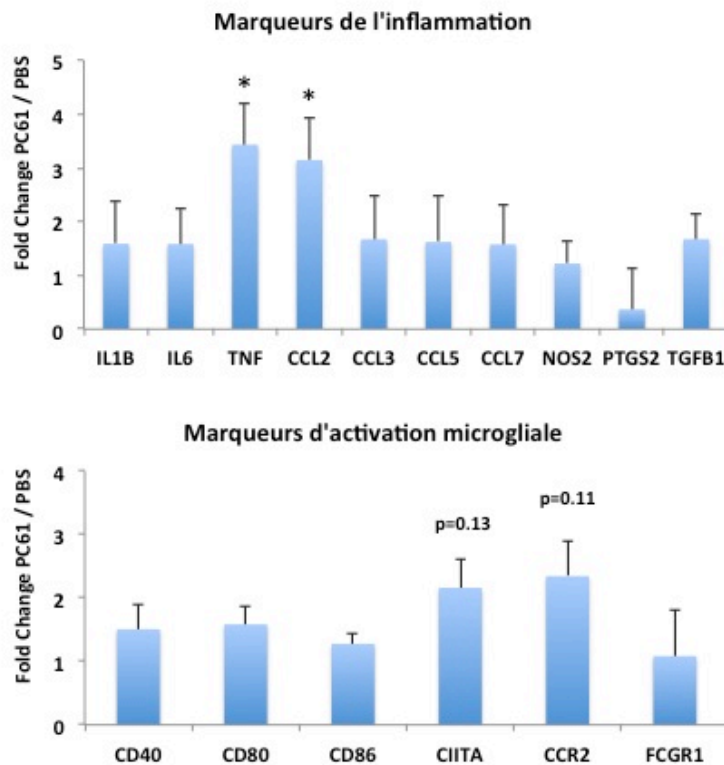


indétectables (IFN $\gamma$ , T-bet, CD40L, IL-17, IL-10, etc) et d'autres à la limite de la détection (CD3 $\epsilon$ , IL-12 $\beta$ , etc), suggérant que cette technique manque de sensibilité pour apprécier des variations d'expression génique au sein de types cellulaires faiblement représentés au niveau cérébral. Il serait toutefois intéressant de pouvoir isoler ces cellules afin de les étudier plus en détails.

Nous n'avons pas non plus mis en évidence de différences d'expression du gène de la caspase 3, enzyme impliquée dans l'apoptose, ni de ceux codant les facteurs neurotrophiques BDNF et IGF-1. Si l'expression de ces derniers apparaît diminuée dans certains modèles murins de la MA, ceci ne semble pas être le cas dans notre modèle. Il est aussi possible que des différences d'expression génique de ces marqueurs ne soient visibles qu'à des stades plus tardifs de la maladie chez les souris APPPS1.

L'ensemble de ces données confirme la validité de notre modèle quant à l'étude de la réaction neuroinflammatoire et de l'activation microgliale et/ou macrophagique au cours de la maladie.

Nous avons donc entrepris d'analyser les profils d'expression génique à 4 mois dans le cerveau des souris APPPS1 traitées ou non par double injection d'Ac anti-CD25. Nos résultats ont mis en évidence la surexpression de plus d'un facteur 3 des ARNm du CCL2 et du TNF $\alpha$ , deux gènes fortement impliqués dans les processus inflammatoires ( $p < 0.05$ , test de Mann-Whitney) (cf figure 19).



**Figure 19 : Surexpression des ARNm de CCL2 et du TNF $\alpha$  dans le cerveau des souris APPS1 traitées par double injection d'Ac anti-CD25 (PC61).** Facteur d'expression (fold change) des ARNm de chimiokines et cytokines proinflammatoire dans le parenchyme cérébral des souris APPS1 traitées par double injection de PC61 par rapport aux souris APPS1 ayant reçu une double injection de PBS. Souris âgées de 4 mois. PCR Array SA Biosciences. RT PCR quantitative sur extraits totaux de cerveau. N=6 souris/ groupe.

\* p<0.05 (test de Mann-Whitney (sur les  $\Delta$ Ct))

CCL2 ou MCP-1 est une chimiokine impliquée dans le recrutement des cellules myéloïdes et lymphoïdes de la périphérie vers le SNC. Elle semble initialement contribuer à l'élimination des plaques. Mais, présente en forte concentration, elle pourrait prendre part à une réaction inflammatoire chronique et se révéler neurotoxique. La cytokine TNF $\alpha$  semble aussi présenter cette dualité d'action. Il est ainsi difficile de conclure sur les conséquences de l'augmentation d'expression du TNF $\alpha$  et de CCL2 après double injection d'Ac anti-CD25. Il semble que l'inactivation des Tregs se traduise par une augmentation de la neuroinflammation mais devant la dualité d'action des cytokines et des chimiokines augmentées, on ne peut prédire si l'effet global sera bénéfique ou délétère.

Les résultats montrent aussi une tendance à l'augmentation de l'expression des ARNm de CCR2 (Fold Change à 2.3, p = 0.11) et de CIITA (Fold Change à 2.2, p = 0.13) chez les

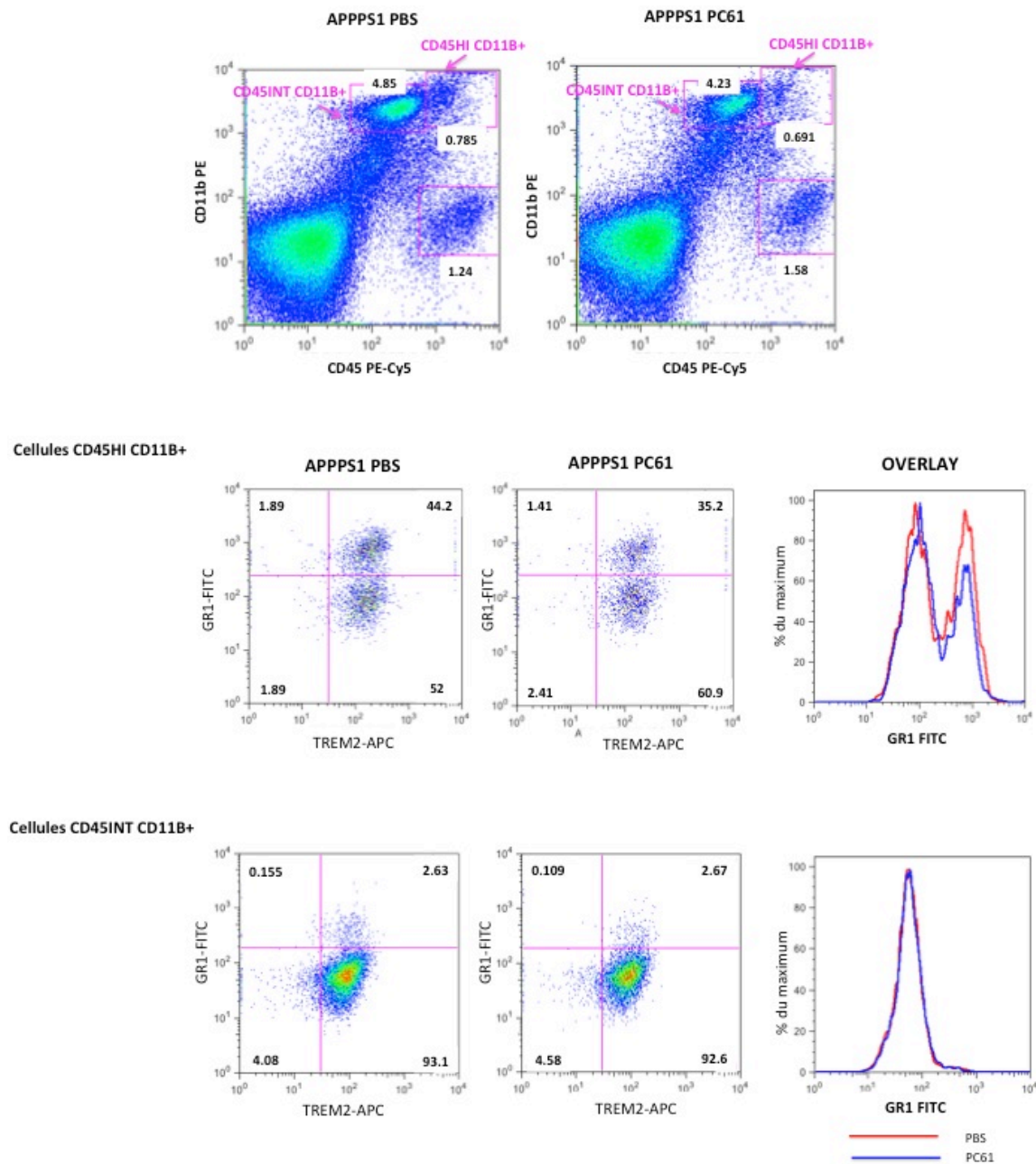
souris APPPS1 traitées comparées aux souris APPPS1 non traitées. Ces données vont aussi dans le sens d'une augmentation de la neuroinflammation au niveau cérébral puisque nous l'avons vu, CCR2 est exprimé sur les cellules myéloïdes recrutées dans le parenchyme cérébral en cas de neuroinflammation et CIITA est un marqueur d'activation microgliale qui permet l'expression du CMH-II sur la microglie.

La réaction neuroinflammatoire semble donc plus importante chez les souris traitées par Ac anti-CD25 que chez les souris non traitées. Nous avons cherché à évaluer si ceci était corrélé à des modifications du phénotype des phagocytes mononucléés présents dans le parenchyme cérébral.

Nous n'avons pas observé de différences dans la proportion de cellules CD11b+ CD45hi (macrophages recrutés), de cellules CD11b+ CD45int (microglie résidente) ou encore de cellules CD11c+ CD45+ (cellules dendritiques) entre les souris APPPS1 traitées et non traitées. En revanche, il semble que la proportion de cellules CD45hi CD11b- augmente légèrement chez les souris traitées par PC61 (1.58% versus 1.24% chez les souris non traitées). Cette population regroupe des cellules leucocytaires recrutées depuis la périphérie et comprend probablement des lymphocytes T mais peut-être aussi d'autres types cellulaires qu'il serait intéressant de phénotyper (cellules NK, etc).

TREM-2 (Microglia-associated triggering receptor expressed on myeloid cells 2) est un récepteur fortement exprimé par la microglie à l'état basal. Son absence d'expression est associée à une diminution des fonctions de phagocytose et une augmentation de la transcription de cytokines pro-inflammatoires (Neumann and Takahashi, 2007). Nous n'avons observé aucune différence d'expression de ce récepteur sur l'ensemble des cellules CD45+CD11b+ entre les souris APPPS1 traitées et non traitées (cf figure 24).

La double expression de CD11b et de Gr-1 caractérise les MDSC (myeloid derived suppressor cell). Ces cellules, dont le nombre augmente dans les tumeurs et les tissus inflammés constituent une population hétérogène qui présente des propriétés immunosuppressives marquées vis-à-vis des réponses lymphocytaires T. Nous avons cherché à étudier l'expression de Gr1 sur les cellules CD11b+ CD45hi, assimilées aux cellules macrophagiques d'origine périphérique recrutées au niveau du SNC, et sur les cellules CD11b+ CD45int, assimilées aux cellules microgliales résidentes. Nos résultats montrent que la proportion des cellules macrophagiques d'origine périphérique qui expriment Gr-1 (cellules « MDSC-like ») est moindre dans le cerveau des souris APPPS1 traitées que dans celui des souris non traitées (cf figure 20).



**Figure 20** : La proportion de cellules myéloïdes CD11b+ CD45hi Gr1+ est diminuée dans le parenchyme cérébral des souris APPS1 traitées par double injection de PC61 (Ac anti-CD25). Après perfusion par du PBS afin d'éliminer les leucocytes présents dans les capillaires, les cerveaux des souris ont été digérés par de la collagénase (1mg/ml en HBSS) et de la DNase (1mg/ml en HBSS) pendant 1h à 37°C. Après inactivation enzymatique, les suspensions cellulaires issues des cerveaux de souris appartenant à un même groupe expérimental, ont été poolées. Les cellules myéloïdes ont ensuite été isolées sur gradient de Percoll, et phénotypées par cytométrie en flux. Immunomarquage anti-CD45 PE-Cy5, anti-CD11b PE, anti-Gr1 FITC, anti-TREM2 APC. Pool de 5 cerveaux par conditions expérimentales.

Ainsi, les cellules Tregs semblent capables de moduler le micro-environnement supprimeur du SNC en modifiant la proportion et/ou le phénotype des cellules myéloïdes recrutées dans le parenchyme cérébral depuis la périphérie.

L'ensemble de nos résultats montre que le traitement par double injection d'Ac anti-CD25 chez les souris APPPS1 aggrave la pathologie amyloïde et induit une augmentation de la neuroinflammation. Parmi les propriétés immunosuppressives des cellules Tregs, l'inhibition des réponses T CD4+ effectrices est aussi un paramètre important. L'inactivation des cellules Tregs pourrait en effet favoriser le développement de réponses T CD4+ effectrices spontanées au cours de la maladie. Ces dernières, selon leur nature, pourraient aussi contribuer aux effets observés sur la pathologie amyloïde et la neuroinflammation.

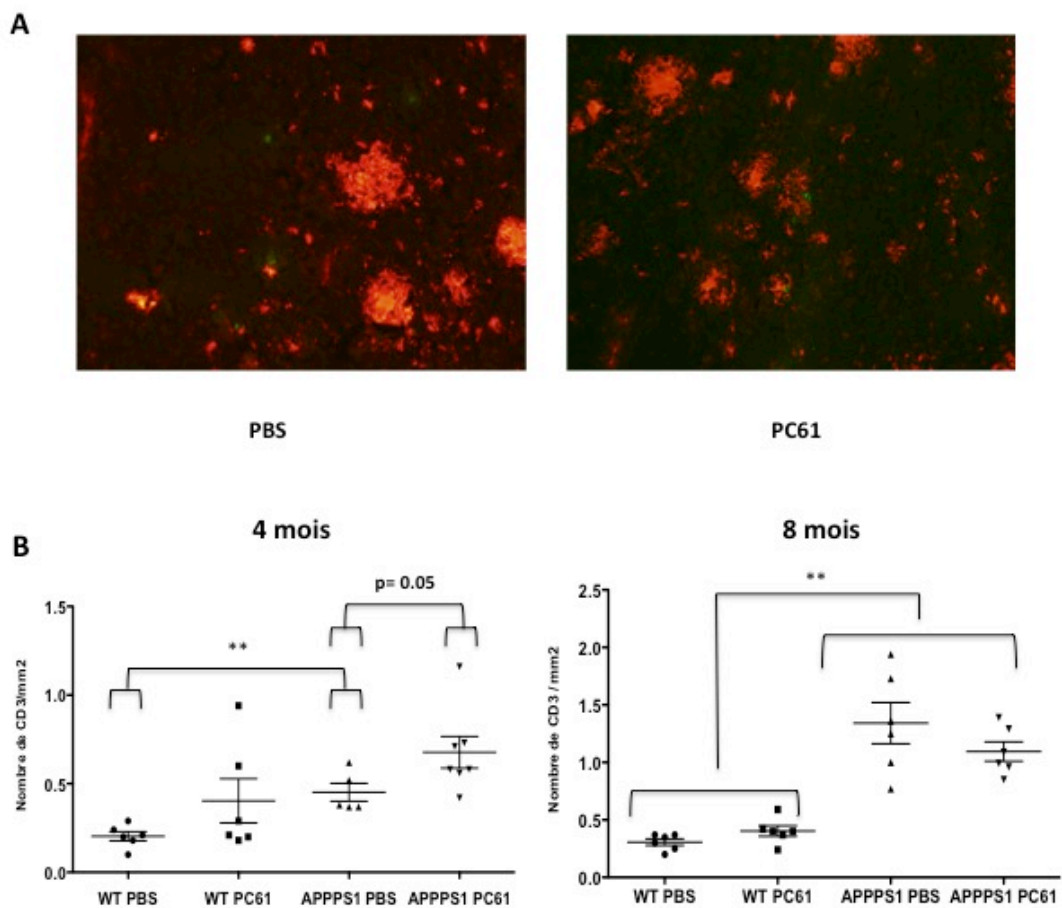
#### ***II.2.3.4 Impact des réponses Tregs sur les réponses T CD4+ effectrices anti-A $\beta$ spontanées***

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si le traitement par l'Ac anti-CD25 favorisait le recrutement des LT dans le parenchyme cérébral. Les cellules T ont ainsi été dénombrées dans le parenchyme cérébral et leur densité / mm<sup>2</sup> a été calculée (cf figure 18). Une attention particulière a été portée au niveau de leur localisation par rapport aux plaques.

Nos résultats chez les souris âgées de 4 mois confirment l'augmentation observée précédemment du nombre de LT / mm<sup>2</sup> chez les souris APPPS1 par comparaison avec les souris sauvages ( $p < 0.05$  (test de Mann-Whitney)) (cf figure 18B).

Le traitement par double injection d'Ac anti-CD25 (PC61) semble aussi tendre à induire une augmentation du recrutement des cellules T dans le parenchyme cérébral ( $p=0.051$ , test de Mann-Whitney) à 4 mois. Cet effet, bien que moins marqué, semble aussi présent chez les souris sauvages suggérant qu'il n'est pas nécessairement spécifique d'A $\beta$ . Dans le cerveau des souris APPPS1, les lymphocytes T ne colocalisent pas forcément dans des zones proches des plaques où ils auraient pu interagir avec des cellules microgliales présentant l'Ag. Ceci semble aussi en faveur d'un recrutement de cellules T indépendamment de leur spécificité antigénique vis-à-vis d'A $\beta$ , bien qu'on ne puisse exclure que ces LT interagissent avec des cellules microgliales ayant capté de l'A $\beta$  présent localement sous forme soluble.

Chez les souris âgées de 8 mois, l'augmentation du recrutement des LT semble avoir persisté chez les souris sauvages mais s'est estompée et est devenue non significative chez les souris APPPS1. L'impact des cellules Tregs sur le recrutement intracérébral de LT chez les souris malades ne serait donc que transitoire et visible essentiellement aux stades précoces de la pathologie. Il est probable que dans les stades avancés de la maladie, la neuroinflammation soit tellement intense qu'elle induise un recrutement important de cellules T dans le parenchyme cérébral, indépendamment de tout contrôle par les cellules Tregs.



**Figure 21 : Le traitement par Ac anti-CD25 favorise le recrutement intracérébral des LT chez les souris sauvages et chez les souris APPPS1 aux stades précoces de la maladie. A :** Immunomarquage anti-CD3 (vert) et anti-Abeta (rouge) dans le cerveau des souris APPPS1 traitées par Ac anti-CD25 (PC61) ou par PBS. Images représentatives (grossissement x40). **B)** Quantification de la densité de lymphocytes T dans le parenchyme cérébral. Souris âgées de 4 mois (panel gauche) et de 8 mois (panel droit). N=6 souris/groupe, moyenne +/- s.e.m. \*\* p <0.01 (test de Mann-Whitney)

Ces premiers résultats semblent suggérer que les cellules Tregs contribuent à moduler le recrutement intracérébral de LT. Ils pourraient ainsi jouer un rôle clé dans la régulation de l'immunosurveillance locale.

Nous avons secondairement cherché à déterminer si le traitement par Ac anti-CD25 permettait de démasquer une réponse T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  spontanée en périphérie. Des expériences préliminaires, effectuées sur les LT CD4<sup>+</sup> de la rate de souris APPPS1 âgées de 8 mois n'ont pas permis de mettre en évidence une réponse proliférative dirigée contre A $\beta$  (résultats non montrés). Il est toutefois concevable qu'à 8 mois, les souris traitées aient eu le temps de développer et/ou de restaurer une réponse Treg spécifique d'A $\beta$ , car l'effet du traitement par double injection de PC61 à 5 et 9 semaines n'est que transitoire. Cette réponse pourrait masquer les réponses effectrices anti-A $\beta$  spontanées. Des expériences complémentaires sont donc en cours sur des souris APPPS1 âgées de 4 mois traitées par PC61 chez lesquelles les propriétés immunosuppressives des cellules Tregs devraient encore être amoindries.

#### ***II.2.3.5 Impact des réponses Tregs sur les fonctions cognitives***

L'impact de l'inactivation des cellules Tregs sur les fonctions cognitives des souris APPPS1 a été analysé à l'aide du test du labyrinthe de Barnes (Barnes Maze).

L'inactivation des cellules Tregs semblant aggraver la pathologie amyloïde et la neuroinflammation, nous avons cherché à déterminer si cet effet était associé à une augmentation et/ou une apparition plus précoce des déficits cognitifs chez les souris APPPS1. Les fonctions cognitives des souris ont ainsi été évaluées à 2 temps différents. Les premiers tests ont été effectués à l'âge de 7 mois, soit un peu plus précocement que l'âge auquel apparaissent les premiers troubles cognitifs dans le modèle APPPS1. La seconde série de tests a été effectuée à l'âge de 9 mois, âge auquel les déficits cognitifs sont déjà bien établis chez les souris malades.

A 7 mois, au cours de la phase d'apprentissage, des différences significatives apparaissent entre le comportement des souris APPPS1 et des souris sauvages, mais aussi entre le comportement des souris APPPS1 traitées et des souris APPPS1 non traitées (cf figure 25). En effet, les souris APPPS1 (traitées ou non traitées) ont un temps de latence plus important avant de trouver le trou leur permettant d'échapper au stress auditif que les souris

sauvages. Ceci s'explique probablement par le fait qu'elles vont moins vite que ces dernières. Mais les souris APPPS1 non traitées ne se comportent pas différemment des souris sauvages en terme de nombre d'erreurs et en terme de précision. Par contre les souris APPPS1 traitées font plus d'erreurs et sont moins précises que les souris sauvages et que les souris APPPS1 non traitées (ANOVA unidirectionnelle avec mesures répétées,  $p < 0.05$ ) (cf figure 22A).

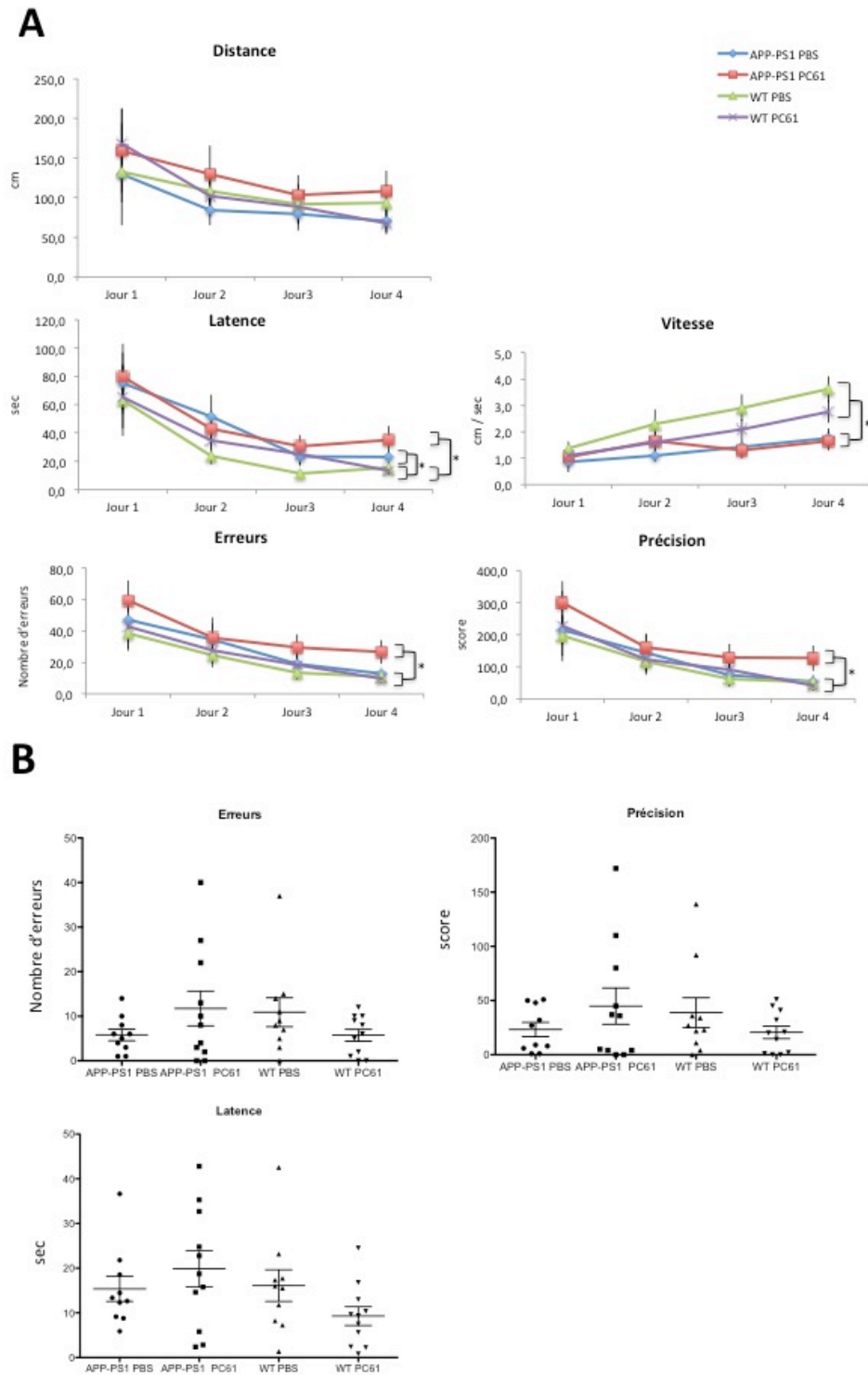
En revanche, la phase de « probe test » ne montre pas de différences significatives entre les souris (cf figure 22B).

Ainsi l'inactivation des cellules Tregs chez les souris APPPS1 semble accélérer l'apparition des troubles de la mémoire d'acquisition, décelables dès 7 mois chez les animaux traités alors qu'ils sont indétectables au même âge chez les souris non traitées. En revanche, l'inactivation des cellules Tregs ne paraît pas avoir d'impact significatif sur la mémoire de référence spatiale à cet âge.

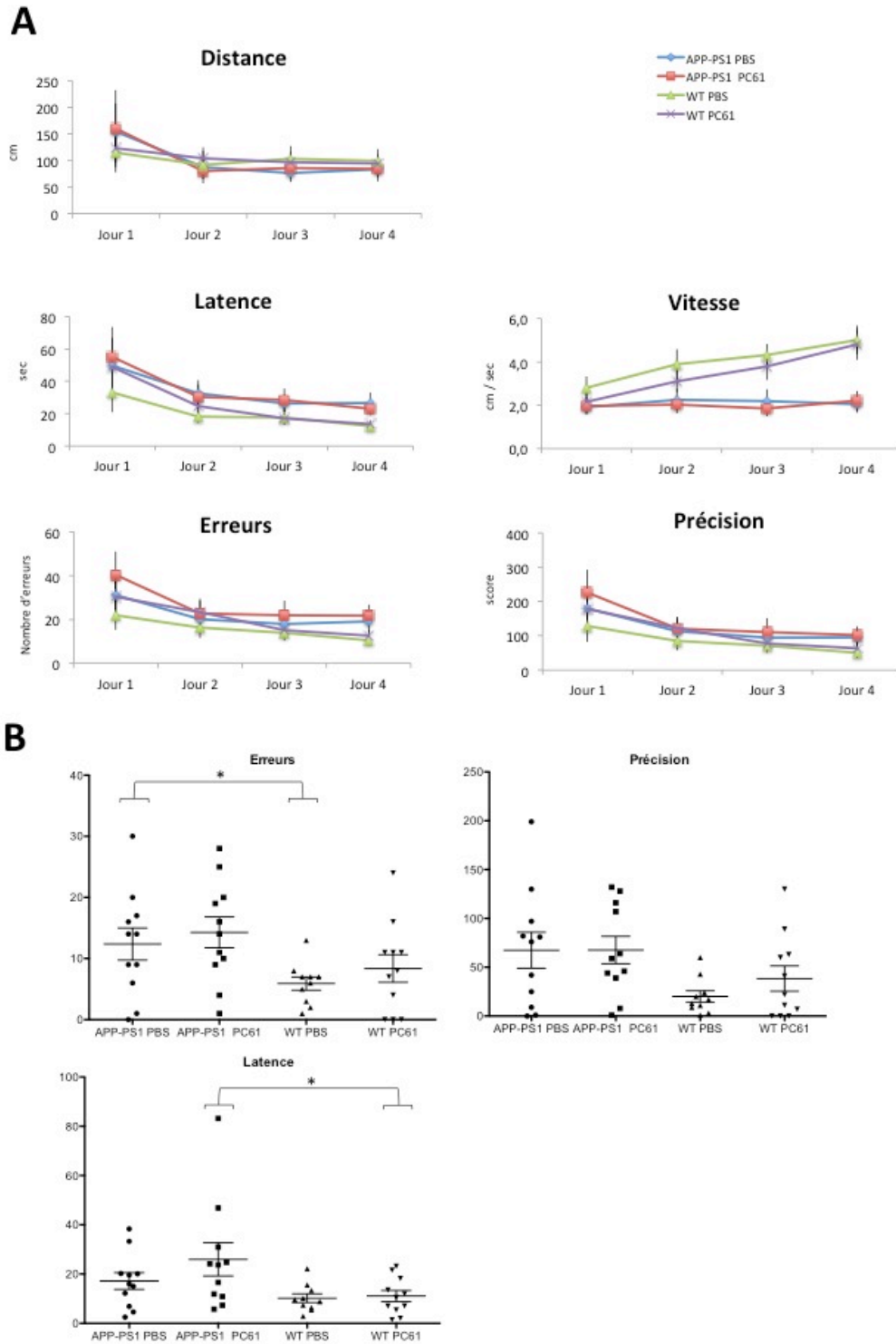
A 9 mois, deux groupes de souris semblent s'individualiser de manière plus distincte que ce soit au niveau de la phase d'apprentissage ou de la phase de test. Les souris sauvages, qu'elles soient ou non traitées, consistent l'un de ses groupes. Les souris APPPS1 composent l'autre groupe. Ces dernières font plus d'erreurs et sont moins précises que le groupe des souris sauvages. Le traitement n'a aucun effet (cf figure 23). A 9 mois, la pathologie a donc pris le pas sur l'effet du traitement.

L'inactivation des cellules Tregs semble donc induire une altération plus précoce de la mémoire d'acquisition mais ne paraît pas aggraver l'intensité des déficits cognitifs.





**Figure 22 : Les souris APPPS1 traitées par double injection d'Ac anti-CD25 (PC61) montrent une altération de la mémoire d'acquisition à 7 mois. Labyrinthe de Barnes. Souris âgées de 7 mois. A) Phase d'apprentissage. Moyennes +/- s.e.m, 6 souris par groupe \*  $p < 0.05$  (ANOVA unidirectionnelle avec mesures répétées). B) Phase de test (probe-test) Moyennes +/- s.e.m, 6 souris par groupe**



**Figure 23 :** A 9 mois, les souris APPPS1 traitées par double injection d'Ac anti-CD25 développent une altération de la mémoire d'acquisition et une altération de la mémoire de référence spatiale comparables aux souris APPPS1 ayant reçu du PBS. Labyrinthe de Barnes. Souris âgées de 9 mois. A) Phase d'apprentissage. Moyennes  $\pm$  s.e.m, 6 souris par groupe B) Phase de test (probe test) Moyennes  $\pm$  s.e.m, 6 souris par groupe \*  $p < 0.05$  (test de Student).

## II.2.4 Discussion et perspectives

L'ensemble de nos résultats montre que l'inactivation des cellules Tregs induit une aggravation de la pathologie amyloïde, une augmentation de la neuroinflammation, et une accélération de l'apparition des troubles de la mémoire d'acquisition chez les souris APPPS1.

La réaction neuroinflammatoire exacerbée induite par l'inactivation des cellules Tregs semblent être au cœur de l'aggravation des processus physiopathologiques observée. En étudiant l'expression de différents gènes impliqués dans la réaction neuroinflammatoire au niveau cérébral, nous avons mis en évidence une surexpression de CCL2 dans le cerveau des souris APPPS1 traitées. Cette chimiokine peut être sécrétée par les cellules gliales (microglie et astrocytes) et par les neurones. Plusieurs travaux ont montré son importance dans des modèles murins de la MA : les souris CCR2-KO développent une pathologie amyloïde exacerbée et des troubles cognitifs plus sévères que les souris sauvages (El Khoury et al., 2007), (Naert and Rivest, 2011). Le recrutement de cellules myéloïdes CCR2+ issues de la périphérie et/ou de l'espace périvasculaire dans le parenchyme cérébral pourrait en effet permettre, grâce à la phagocytose des fibrilles d'A $\beta$ , de limiter le développement de la pathologie amyloïde. Les troubles cognitifs s'en trouveraient aussi diminués. Mais CCL2 peut aussi, en forte concentration, induire un état d'activation inappropriée de la microglie avec perte de ses fonctions phagocytaires et augmentation de sa capacité à produire des médiateurs neurotoxiques (Yamamoto et al., 2005). CCL2 pourrait également, en favorisant l'endocytose d'A $\beta$  par la microglie, induire l'oligomérisation intracellulaire du peptide suivie de sa sécrétion et concourir ainsi à une aggravation de la pathologie (Kiyota et al., 2010).

Le gène du TNF $\alpha$  est aussi surexprimé dans les souris APPPS1 traitées par PC61. Des études de souris déficientes en TNF-RI et TNF-RII (récepteurs du TNF $\alpha$ ) chez lesquelles une augmentation de la pathologie amyloïde est observée (Montgomery et al., 2011) suggèrent que le TNF $\alpha$  peut avoir un rôle protecteur dans la pathologie. Mais bloquer son action de manière chronique à l'aide d'inhibiteurs permet de réduire la pathologie amyloïde dans un modèle murin de la maladie (McAlpine et al., 2009).

Ainsi, malgré un effet initial bénéfique, ces deux molécules pro-inflammatoires, produites en quantité importante et de manière chronique, pourraient devenir néfastes et participer à l'aggravation de l'amylose cérébrale. C'est effectivement ce que suggèrent nos résultats dans les souris APPPS1 traitées car l'augmentation de l'expression de CCL2 et de

TNF $\alpha$  est associée à une augmentation de la pathologie amyloïde. Il est aussi intéressant de souligner que l'inflammation au niveau cérébral pourrait être un facteur aggravateur, voire initiateur de la phosphorylation et de l'agrégation de Tau, comme cela a été suggéré dans un modèle d'EAE (Schneider et al., 2004). Il est ainsi probable que l'action anti-neuroinflammatoire des Tregs ait aussi des conséquences sur la pathologie Tau.

Ces résultats mériteraient cependant d'être confirmés au niveau protéique car nos données se fondent pour le moment uniquement sur des variations d'expression génique au niveau ARNm. Des immunomarquages anti-Iba1 et anti-GFAP seront aussi nécessaires pour apprécier les relations entre cet environnement proinflammatoire et l'état d'activation des cellules gliales. L'identification de la ou des cellule(s) hyperproductrice(s) de ces cytokines pourra permettre une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu.

Dans ce contexte, nous nous sommes aussi intéressés au phénotype des cellules CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> présentes dans le parenchyme cérébral à l'âge de 4 mois (cellules de la lignée macrophagique, vraisemblablement recrutées depuis la périphérie et/ ou l'espace périvasculaire). Un pourcentage plus faible de ces cellules exprime la molécule Gr1 chez les souris APPPS1 traitées par rapport aux souris APPPS1 non traitées (36% versus 46%). Les Tregs pourraient ainsi moduler de manière directe ou indirecte le phénotype et les fonctions de ces cellules de type « MDSC » en agissant in situ, ou en périphérie avant qu'elles ne soient recrutées dans le parenchyme cérébral. Par ce biais, les Tregs pourraient contrôler l'état inflammatoire du cerveau. L'effet observé de l'inactivation des Tregs sur la proportion de MDSCs pourrait aussi être lié à l'augmentation de la production de médiateurs proinflammatoires localement.

Des données complémentaires obtenues au laboratoire montrent que dans les ganglions cervicaux, Gr-1 est peu fréquemment exprimé par les cellules CD11b<sup>+</sup> (moins de 2% des cellules l'expriment). Il ne semble pas y avoir de différence d'expression de ce marqueur entre les souris APPPS1 traitées et non traitées. L'état inflammatoire périphérique apprécié par le taux de TNF $\alpha$  circulant est comparable entre les souris APPPS1 traitées et non traitées à 4 et 7 mois (résultats non montrés). L'inactivation des cellules Tregs ne semble donc pas avoir d'impact majeur ni sur la proportion de MDSCs parmi les cellules CD11b<sup>+</sup> des ganglions cervicaux, ni sur la quantité de médiateurs solubles de l'inflammation présents en périphérie. Elle pourrait cependant avoir des conséquences sur d'autres types cellulaires, comme les macrophages localisés au niveau méningé ou au niveau des espaces périvasculaires, ainsi que sur le taux d'autres médiateurs solubles de l'inflammation qu'il reste encore à identifier.

Nos données montrent aussi que la double injection d'Ac anti-CD25 induit un recrutement plus important de cellules T dans le parenchyme cérébral des souris APPPS1 et des souris sauvages âgées de 4 mois. Cet effet relève probablement d'un mécanisme général de perte de la régulation de l'entrée des cellules dans le SNC suite à l'inactivation des cellules Tregs. Il a en effet été suggéré que les Tregs pouvaient avoir une influence sur la circulation des cellules T effectrices dans l'organisme, et notamment sur l'entrée de cellules potentiellement auto-aggressives dans certains tissus (Schneider et al., 2004). Il est possible que, malgré ses particularités (barrières), cela soit également le cas pour le tissu cérébral. Nous avons par ailleurs pu constater qu'au même âge, dans les ganglions cervicaux des souris traitées, près de 5% des cellules T CD4+ et 4 % des cellules T CD8+ exprimaient le marqueur de prolifération Ki67 comparé à seulement 2,3 et 2,5 % respectivement dans les ganglions des souris non traitées (résultats non montrés). Ces pourcentages, similaires chez les souris APPPS1 et chez les souris sauvages, témoignent aussi en faveur d'une fonction générale de régulation de l'homéostasie des réponses adaptatives par les Tregs. Ces derniers pourraient donc agir à la fois sur la capacité proliférative des cellules T effectrices dans les organes lymphoïdes secondaires et sur leur circulation dans les tissus.

A 8 mois, le recrutement de cellules T dans le parenchyme cérébral a augmenté chez les souris APPPS1 comparativement aux souris âgées de 4 mois, mais l'effet du traitement par Ac anti-CD25 a disparu. Ceci pourrait s'expliquer par un état d'inflammation tellement intense dans le cerveau des souris APPPS1 âgées de 8 mois que le recrutement des lymphocytes dans le parenchyme cérébral ne serait plus contrôlé par les cellules Tregs. L'étude précise du phénotype des cellules T recrutées dans le cerveau des souris APPPS1 pourrait apporter des éléments supplémentaires concernant leur nature et leur état d'activation. La question de la spécificité de ces cellules reste aussi entière : l'augmentation du recrutement pourrait être le témoin du développement d'une réponse immune adaptative dirigée contre un (ou des) Ag cérébral (aux), ou juste dû à une augmentation de l'immunosurveillance locale.

Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de réponse proliférative T CD4+ dirigée contre A $\beta$ 42 dans la rate des souris APPPS1 âgées de 8 mois. Ces données ne sont toutefois pas complètement contradictoires avec les résultats que nous avons précédemment obtenus dans un contexte de vaccination chez les souris APPPS1. Rappelons effectivement qu'une réponse Treg forte semblait « museler » une réponse effectrice spontanée. Il peut ainsi aisément se concevoir que cela génère des difficultés à la mettre en évidence. Il serait intéressant de réitérer ce test de prolifération en optimisant les conditions de stimulation

(plusieurs restimulations, ajout d'IL-2 dans le milieu de culture, etc) afin de permettre la détection de faible quantité de LT CD4+ effecteurs.

Parallèlement à ces expériences de prolifération, nous nous sommes intéressés à l'expression du marqueur de prolifération Ki67 dans les cellules T CD4+ Foxp3+ et Foxp3- des ganglions cervicaux des souris APPPS1 et des souris sauvages. Nous n'avons pas non plus pu mettre en évidence de différences significatives d'expression de ce marqueur entre ces souris, ni à 4 mois ni à 8 mois. Mais là encore, les limites de sensibilité de ce test ne permettent pas d'affirmer l'absence de réponse T CD4+ + effectrice chez ces souris.

Dans la littérature, les données concernant le développement de réponses adaptatives spontanées anti-A $\beta$  sont assez peu documentées. A notre connaissance, aucun travail n'a vraiment étudié le sujet dans les modèles murins de MA. Chez l'Homme, des réponses T CD4+ anti-A $\beta$  semblent exister à la fois chez les patients atteints de MA et chez les sujets âgés non malades (Monsonogo et al., 2003). Pour certains auteurs, les réponses T anti-A $\beta$  paraissent être augmentées chez les patients (Lanuti et al., 2012), pour d'autres elles seraient diminuées (Trieb et al., 1996). La question de l'impact de ces réponses dans la physiopathologie de la maladie reste donc entière et des explorations plus approfondies sur le sujet sont actuellement en cours dans notre laboratoire, à la fois chez l'Homme et chez la souris.

Les effets constatés au niveau biologique chez les souris APPPS1 traitées se traduisent cliniquement par des altérations plus précoces des fonctions cognitives au niveau de la mémoire d'acquisition. Ces souris font en effet plus d'erreurs et sont moins précises que les souris APPPS1 non traitées à l'âge de 7 mois. Cet effet s'estompe à 9 mois, probablement parce que chez les souris non traitées, l'effet neuroprotecteur et anti-inflammatoire des Tregs devient inefficace face aux processus physiopathologiques qui continuent de progresser.

Une collaboration avec le Dr C Rovira dans l'équipe du Pr J Mariani nous a permis de nous intéresser aux modifications de l'électrophysiologie de l'hippocampe, reflet de la plasticité synaptique, chez les souris APPPS1 et sauvages, traitées et non traitées. Peu de données existent à l'heure actuelle dans le modèle murin que nous utilisons ; seule une étude de la LTP *in vivo* semble montrer des déficits de LTP au niveau de la région CA1 (Corne D'Ammon) de l'hippocampe chez les souris APPPS1 à l'âge de 8 mois (Gengler et al., 2010). Nous avons donc entrepris d'explorer l'électrophysiologie de l'hippocampe au même âge, toujours dans le CA1, mais cette fois *in vitro*, sur des tranches de cerveau.

Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les souris APPPS1 et les souris sauvages en terme de LTP précoce. Au niveau de la PPF (paired pulse facilitation), qui permet d'évaluer l'activité pré-synaptique (libération de neurotransmetteurs), l'analyse statistique montre une tendance ( $p=0.06$ ) à son augmentation chez les souris APPPS1 traitées comparées aux souris APPPS1 non traitées et aux souris sauvages (résultats non montrés). Ces résultats ne vont pas dans le sens de ceux obtenus au même âge à la fois en terme de LTP *in vivo* et en terme de déficits cognitifs, mais il faut ici rappeler que nous travaillons sur des tranches de cerveau et que les différences peuvent être marquées entre ce qui est observé *in vitro* et *in vivo*.

Dans le cadre de la LTP *in vivo* pratiquée dans ce même modèle de souris, une augmentation transitoire de la PPF avait aussi été observée, mais à l'âge de 6 mois. La PPF se normalisait ensuite à 8 mois avant de diminuer à 15 mois. La LTP ne commençait à diminuer qu'à partir de 8 mois. Cette augmentation transitoire de la PPF pourrait refléter le développement de mécanismes compensateurs pour permettre de conserver un certain niveau d'activité neuronale chez les souris. Les analyses de l'électrophysiologie de l'hippocampe *in vitro* ont probablement été effectuées trop précocement. Il serait donc intéressant de réitérer cette expérience à un âge plus tardif quand la pathologie amyloïde sera bien installée au niveau de l'hippocampe. On pourra alors à ce moment-là espérer voir les mécanismes compensateurs s'estomper et des différences apparaître au niveau de la LTP *in vitro* entre les souris APPPS1 et les souris sauvages.

Il faudra donc attendre les résultats des nouvelles expériences à un âge plus tardif pour pouvoir interpréter les données électrophysiologiques dans notre modèle expérimental dans leur intégralité.

En conclusion, l'ensemble de nos données tend à montrer que les Tregs auraient un effet neuroprotecteur au cours de la MA. Ceci rejoint les conclusions d'autres auteurs qui ont pu montrer un rôle bénéfique de cette population lymphocytaire dans la SLA ou la MP (Beers et al., 2011), (Reynolds et al., 2007). Là aussi, l'effet observé ne semble pas être spécifique d'un Ag particulier mais relève probablement de fonctions régulatrices « générales » des Tregs. L'action anti-neuroinflammatoire des Tregs joue vraisemblablement un rôle aux stades précoces de la pathologie. Mais elle pourrait n'être que transitoire car vite « noyée » devant la quantité de médiateurs pro-inflammatoires produits par les cellules gliales au fur et à mesure que la pathologie amyloïde évolue. Cet effet paraît cependant suffisant pour permettre de retarder la survenue des troubles cognitifs. Les mécanismes précis de cette activité anti-

neuroinflammatoire restent encore à préciser : il semble que les Tregs soient capables de moduler le phénotype des cellules myéloïdes recrutées au niveau du SNC. Ils auraient aussi un rôle dans le contrôle de l'entrée des lymphocytes dans le tissu cérébral. Mais exercent-ils des propriétés neuroprotectrices par d'autres mécanismes? Ils pourraient aussi agir directement par la sécrétion de médiateurs solubles comme l'IL-10, ou encore sur les processus de neurogénèse. Nous n'avons pas mis en évidence de différence d'expression génique du BDNF chez les souris APPPS1 traitées, mais une étude plus précise des précurseurs neuronaux localisés au niveau du gyrus denté devrait permettre d'apporter des éléments de réponse supplémentaires sur ce sujet.

L'ensemble de nos données positionne donc les Tregs comme des cellules ayant des fonctions neuroprotectrices importantes permettant de contrôler la réaction neuroinflammatoire et l'amylose cérébrale dans un modèle murin de MA. Nos travaux suggèrent ainsi le potentiel thérapeutique de stratégies innovantes d'immunothérapie basées sur la manipulation des réponses Tregs chez les patients atteints de MA.



# **DISCUSSION GENERALE**

Les objectifs de mon travail étaient doubles : d'une part étudier l'influence des facteurs génétiques sur l'amplitude de la réponse vaccinale et d'autre part analyser l'impact des réponses T CD4+ sur la physiopathologie de la maladie. Nous commencerons par discuter les résultats impliquant le rôle des LT CD4+ dans la physiopathologie de la maladie avant de revenir sur les perspectives d'optimisation de l'immunothérapie dans la MA.

Au préalable, il convient d'avoir un regard critique sur les limites du modèle murin que nous avons utilisé. Chaque modèle murin a en effet des spécificités qui font qu'il peut se comporter différemment face à un traitement. Il paraît donc important de confirmer des résultats dans au moins 2 modèles différents. Celui que nous avons utilisé est un modèle double transgénique très agressif de la maladie. La mutation *PS1 L166P* favorise une forte production de peptides A $\beta$ 42 aux dépens de la forme de 40 acides aminés. En conséquence, les plaques qui se forment seraient particulièrement compactes et condensées et relativement résistantes aux effets de la vaccination (Nemirovsky et al., 2012). Il est ainsi possible qu'il soit particulièrement difficile de mettre en évidence des effets thérapeutiques sur la pathologie amyloïde dans ce modèle murin.

Par ailleurs, la mutation sur le gène de la PS1 peut avoir une influence sur de nombreux systèmes. En effet, la PS1 est une enzyme du complexe gamma-sécrétase, qui possède plusieurs substrats, dont Notch, impliqué dans les processus de décision concernant le devenir des cellules. Même si le transgène de la PS1 mutée n'est exprimé que dans le SNC, il peut avoir des conséquences sur l'homéostasie cérébrale.

Il serait donc utile de confirmer nos résultats dans un modèle simple transgénique, comme la souris APP23 ou Tg2576, afin de s'assurer que la mutation sur la PS1 n'induit pas de biais dans nos résultats. L'utilisation de ce second modèle pourrait même faciliter l'interprétation de certains résultats, notamment ceux issus des expériences d'électrophysiologie de l'hippocampe, pour lesquels il est établi que la PS1 mutée a un impact indépendamment de la pathologie amyloïde (Auffret et al., 2010). L'utilisation d'un modèle simple transgénique, qui développe une pathologie amyloïde plus lente avec des plaques moins compactes, devrait aussi permettre de mettre plus facilement en évidence de potentiels effets thérapeutiques sur la pathologie amyloïde.

Notre modèle murin exprime ses transgènes sous le contrôle d'un promoteur de type Thy-1. L'expression du gène codant Thy-1 est régulée différemment chez la souris selon les tissus. Il est essentiellement exprimé dans le SNC et le thymus. Ainsi on pouvait craindre une expression des transgènes, et notamment de la PS1 mutée, au niveau des lymphocytes. L'expression de Thy-1 dans les thymocytes est conditionnée par la présence d'un enhancer spécifique situé dans le 3<sup>ème</sup> intron du gène. L'expression dans les neurones implique par contre des éléments situés dans la seconde partie du 1<sup>er</sup> intron (Vidal et al., 1990). Ainsi par le biais de manipulation génétique le promoteur utilisé dans nos souris permettrait une expression spécifique dans le SNC (Caroni, 1997). La souris « Brainbow » développée par Jean Livet utilise le même promoteur Thy-1 que celui utilisé dans nos souris APPPS1. Chez cette souris, par le biais d'un mécanisme assez complexe de recombinaisons de type Cre/Lox, les cellules porteuses du transgène expriment une ou plusieurs protéines fluorescentes et prennent donc différentes couleurs (Livet et al., 2007). Les lymphocytes ne sont pas fluorescents, ce qui confirme que le promoteur utilisé ne permet pas d'expression des transgènes dans ces cellules (communication personnelle). Nos résultats en termes de réponse vaccinale anti-OVA et de phénotypes lymphocytaires sont aussi rassurants sur les capacités fonctionnelles des LT présents dans les souris APPPS1.

Dans les objectifs de mon travail, à propos de l'étude du rôle des LT CD4+ dans la physiopathologie de la maladie, nous avons évoqué trois types d'interactions possibles entre le système immunitaire adaptatif et la maladie d'Alzheimer.

La première s'appuyait sur l'hypothèse qu'un système immunitaire sénescé pouvait favoriser le développement de l'amylose cérébrale. Nous n'avons pas pu étudier cette hypothèse car le modèle murin que nous avons utilisé est un modèle agressif, qui développe une pathologie amyloïde très tôt, alors que le système immunitaire des souris n'est pas encore touché par l'immunosénescence. Il serait intéressant d'étudier tout de même l'impact de l'immunosénescence sur la physiopathologie de la maladie. La génération de chimères hématopoïétiques avec des moelles osseuses de souris jeunes et de souris âgées ou des expériences de parabiose pourraient être des moyens de répondre à ces questions.

La seconde interaction évoquée impliquait que la pathologie amyloïde pouvait avoir une influence sur la réponse T CD4+ anti-A $\beta$ . Nous n'avons pour le moment pas réussi à démontrer de manière claire l'existence d'une réponse T CD4+ anti-A $\beta$  spontanée dans notre modèle murin, même si plusieurs arguments suggèrent son existence (réponses vaccinales augmentées après inactivation des Tregs, etc). Le projet de notre équipe est de développer une

souris transgénique (Tg) pour un TCR dirigé contre un épitope T CD4+ d'Aβ restreint par le CMH-II. Tous les lymphocytes T CD4+ de cette souris seront donc spécifiques d'un épitope unique d'Aβ. Par des expériences de transfert adoptif de quantités physiologiques de cellules naïves TCR-Tg avant la formation des premiers dépôts amyloïdes chez les souris APPPS1, nous pourrions étudier de manière très précise et très sensible la présence et la nature des réponses T CD4+ spécifiques d'Aβ qui se développent spontanément au cours de la maladie. Le statut d'activation, la différenciation fonctionnelle (Th1, Th2, Th17, iTreg) ainsi que la localisation et la prolifération in vivo des cellules Tg pourront aussi être aisément analysés par cytométrie de flux.

Il faut ici rappeler que jusqu'alors, aucune étude ne s'était intéressée à étudier les aspects fonctionnels du système immunitaire adaptatif dans des modèles murins de la MA. Chez l'Homme, nous l'avons vu, les données sont assez contradictoires. Quasiment toutes les études semblent indiquer la présence d'une réponse T CD4+ anti-Aβ et d'une réponse Ac chez les patients. Mais elles ne s'accordent pas sur les différences d'intensité de ces réponses lorsqu'on les compare avec celles présentes chez des sujets sains de même âge. Elles paraissent tantôt plus fortes, tantôt au contraire plus faibles, probablement à cause de la grande diversité de techniques différentes utilisées dans ces travaux. Ceci nous laisse à penser que si différences il y a, elles doivent être très faibles.

Cette conclusion n'est pas surprenante si l'on se remémore les premières expériences de Medawar, qui montraient que le système immunitaire adaptatif était capable de réagir en ne rejetant un greffon au niveau cérébral que s'il avait été préalablement « sensibilisé » en périphérie. C'est le cas dans la plupart des infections à tropisme cérébral, parce qu'elles passent d'abord par une phase périphérique. Mais dans les maladies neurodégénératives telle que la MA, les lésions cérébrales se développent « in situ ». Le système immunitaire adaptatif n'est donc pas dans les conditions optimales pour qu'une réponse systémique puisse être initiée, malgré l'existence de systèmes de drainage du SNC vers des organes lymphoïdes secondaires. C'est donc essentiellement le système immunitaire inné qui est mis à contribution dans ces pathologies, réagissant probablement même de manière exacerbée.

De plus, dans ces maladies les lésions sont constituées par des protéines du soi modifiées ; les mécanismes de tolérance sont donc probablement très importants. C'est effectivement ce que suggèrent nos résultats chez la souris. Il est cependant difficile d'extrapoler ces données à l'Homme et ceci pour plusieurs raisons : d'abord nous sommes dans un système « inbred » et nous avons vu que le fond génétique C57BL/6 développait des

mécanismes de tolérance relativement important vis-à-vis d'A $\beta$ . Peut-être que l'étude de souris SJL/J APPPS1 donnerait de tout autres résultats. Ensuite, il faut le rappeler, les modèles murins sont essentiellement des modèles d'amylose cérébrale. Le transgène est exprimé uniquement au niveau du SNC alors que chez l'Homme, A $\beta$  peut être produit par de nombreuses autres cellules de l'organisme, comme les plaquettes, et donc se retrouver en plus grande quantité sous forme circulante.

Le troisième type d'interactions évoqué dans la partie « objectifs » de cette thèse, avançait l'idée que les LT CD4+ pourraient avoir des fonctions de maintien de l'homéostasie cérébrale à travers des mécanismes indépendants de leur spécificité antigénique vis-à-vis d'A $\beta$ .

Nos travaux montrent un rôle bénéfique des Tregs sur la pathologie amyloïde et sur les fonctions cognitives. Ces résultats rejoignent ce qui a déjà été décrit dans d'autres maladies neurodégénératives comme la MP et la SLA. Ils positionnent les Tregs comme des cellules importantes dans l'homéostasie cérébrale de par leurs fonctions anti-inflammatoires et peut-être à travers d'autres mécanismes d'action qui restent encore à préciser. Ces données, obtenues après administration à deux reprises d'Ac anti-CD25, mériteraient cependant d'être confirmées dans un modèle de souris où l'inactivation des Tregs pourra être induite plus spécifiquement, en ciblant le facteur de transcription Foxp3, comme chez les souris DEREK ou Foxp3-DTR. L'utilisation de ces souris permettra aussi d'apprécier les fonctions des Tregs à divers stades de la pathologie. Nos résultats mettent en évidence un rôle de ces cellules aux stades précoces. Qu'en sera-t-il si les Tregs sont inactivés à des stades plus tardifs, au moment où la neuroinflammation est déjà intense ?

L'ensemble de nos données ne s'inscrit pas, à première vue, dans le concept d'« auto-immunité protectrice » développé par M Schwartz et J Kipnis. En effet, bien que l'administration d'Ac anti-CD25 entraîne une augmentation du recrutement de cellules T dans le parenchyme, l'effet global observé n'est pas neuroprotecteur, et les fonctions cognitives ne sont pas améliorées, au contraire. Il est toutefois possible que l'inactivation des cellules Tregs ait une influence sur la polarisation des cellules T CD4+ mémoires recrutées dans les espaces méningés. Ces cellules ont en effet été décrites comme ayant des fonctions-clés dans l'homéostasie cérébrale et dans le concept d'auto-immunité protectrice (Derecki et al., 2010).

Par ailleurs, il faut peut-être différencier les situations où le SNC subit une agression sur un mode aigu - comme dans les accidents vasculaires cérébraux, les modèles d'axotomie ou les modèles de lésions du nerf optique - où la réponse Treg peut s'avérer délétère car

inhibitrice d'une réponse effectrice bénéfique, et les modèles de neuroinflammation chronique - comme les maladies neurodégénératives - où les Tregs ont cette fois une action anti-inflammatoire protectrice. La tremblante expérimentale murine (maladie à prion) semble faire défaut à cette règle. Les données de notre laboratoire montrent en effet un rôle plutôt délétère des Tregs dans cette maladie. Mais la physiopathologie de la tremblante est très différente de celles des autres maladies neurodégénératives comme la MA, la MP ou la SLA puisqu'elle implique un agent pathogène et une phase de dissémination lymphoïde périphérique avant que le SNC ne soit atteint. Il est ainsi concevable que l'action des Tregs en périphérie favorise l'invasion du SNC par le prion (Sacquin et al., 2008).

Suite à nos résultats, nous avons entrepris des expériences de transfert de Treg afin d'observer l'effet que pourrait avoir, non plus l'inactivation mais l'augmentation des cellules Tregs. Nous avons fait le choix de comparer les effets du transfert i.v. de 100 000 cellules Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>) issues de souris APPPS1 âgées de 9 mois avec ceux du transfert de la même quantité de Tregs mais issues de souris sauvages du même âge. Dans les Tregs issus des souris APPPS1, la proportion et/ou l'activité suppressive des cellules Tregs vis-à-vis d'A $\beta$  pourrait être augmentée, comparativement aux Tregs issues des souris sauvages. La seule différence significative observée entre les souris dans lesquelles des cellules Tregs ont été transférées et les souris contrôles (PBS) est la diminution d'un facteur 2 de l'expression de NOX2 (NADPH oxydase microgliale impliquée dans le stress oxydant). Cette différence est retrouvée à la fois avec les Tregs issus de souris APPPS1 et avec les Tregs issus de souris sauvages.

Ces résultats mériteraient toutefois d'être confirmés. Nous avons certes constaté que NOX2 était surexprimé (ARNm) chez les souris APPPS1 comparativement aux souris sauvages. Mais nous n'avons pas identifié d'augmentation supplémentaire de l'expression de NOX2 chez les souris dont les Tregs avaient été inactivés. Ceci pourrait toutefois être le signe d'un contrôle du stress oxydant par les cellules de l'immunité. L'effet du transfert de Tregs serait ici bénéfique car NOX2, en entraînant la surproduction de radicaux libres par la microglie, joue assurément un rôle délétère dans la MA (Zekry et al., 2003).

Ces expériences de transfert de Tregs présentent toutefois le risque d'être biaisées car nous ne contrôlons pas le degré de méthylation du locus Foxp3 des cellules transférées. Nous avons trié les cellules Tregs sur leur expression élevée du marqueur CD25. Il est fort probable, d'une part que l'expression du marqueur Foxp3 dans les Tregs prélevés soit instable dans certaines cellules, et d'autre part que dans le lot de cellules transférées il y ait eu des cellules T CD4<sup>+</sup> effectrice activées.

Devant ce risque de biais, nous avons choisi de mener en parallèle une autre stratégie, visant elle aussi à augmenter la réponse Treg : l'administration régulière de faibles doses d'IL-2. Ce traitement a en effet montré dans une étude clinique, qu'il limitait les risques de réaction du greffon contre l'hôte par un mécanisme impliquant l'augmentation de l'expansion des cellules Tregs (Koreth et al., 2011). On peut ainsi supposer que dans notre modèle, favoriser naturellement le développement de réponses Tregs pourra avoir un effet anti-neuroinflammatoire et permettra de ralentir la maladie.

Parallèlement à nos études chez des souris dans lesquelles les réponses Tregs avaient été inactivées, nous avons entrepris des croisements entre des souris APPPS1 et des souris CD3 $\epsilon$  KO (Malissen et al., 1995). Ces croisements nous ont permis d'obtenir des souris malades dépourvues de LT. Des résultats préliminaires sur la quantification de l'expression d'un certain nombre de gènes dans le SNC semblent indiquer que les souris APPPS1 CD3 KO exprimeraient plus fortement la cytokine TNF $\alpha$  et la chimiokine CCL2 que les souris APPPS1 CD3 $^{+/+}$ . Ces résultats sont à confirmer sur un plus grand nombre de souris. L'appréciation de l'intensité de la pathologie amyloïde et les analyses comportementales et électrophysiologiques n'ont pas encore pu être entreprises, mais au vu des résultats de RT-PCR quantitative, si l'on se reporte à notre expérience, il semble probable que les LT aient des fonctions globales anti-inflammatoires et neuroprotectrices chez les souris APPPS1. Ces fonctions pourraient être portées par les cellules Tregs, que nous avons étudiées, mais aussi par d'autres populations régulatrices telles les lymphocytes Tr1, les lymphocytes Th3 ou même les NK-T. Des expériences sont aussi prévues sur des souris APPPS1 CMH-II KO, dépourvues de LT CD4 $^{+}$  afin de différencier les rôles joués respectivement par les LT CD4 $^{+}$  et les LT CD8 $^{+}$ .

L'utilisation de ces modèles murins (CD3 KO, CMH-II KO, etc) se heurte cependant aussi à un risque de biais. De plus en plus, les molécules du système immunitaire sont décrites comme ayant un rôle physiologique dans l'homéostasie du SNC. Ceci concerne les molécules du CMH-I classique et non classique mais aussi certaines molécules du complexe CD3 (Boulanger and Shatz, 2004). Ainsi, CD3 $\zeta$  est exprimé au niveau de l'hippocampe et semble être impliqué dans la plasticité synaptique (Huh et al., 2000). La molécule CD3 $\epsilon$  est exprimée au niveau du cervelet (Nakamura et al., 2007). L'étude des souris APPPS1 CD3 $\epsilon$  KO sur le plan électrophysiologique et comportemental risque donc de donner des résultats difficiles à

interpréter car un défaut physiologique des fonctions de la molécule dans le SNC ne pourra pas être exclu.

L'optimisation de la vaccination, par le contrôle des réponses T CD4<sup>+</sup> effectrices induites par l'immunisation, nous paraît être une stratégie très prometteuse au vu des résultats obtenus dans les modèles murins. Cette approche présente l'avantage de cibler A $\beta$  et si l'on se base sur l'hypothèse amyloïde, elle pourrait permettre d'éliminer l'élément pathogénique majeur de la maladie. Elle apporte ainsi des espoirs de guérison, à condition que le traitement soit entrepris à temps. L'efficacité démontrée de cette approche dans les modèles murins peut être expliquée par le fait qu'apporter l'Ag (A $\beta$ ) en périphérie permettrait de stimuler correctement un système immunitaire aveugle ou devenu tolérant à l'accumulation de peptides du soi mal conformés dans le cerveau. Nous rejoignons là encore les observations de Medawar qui mettaient en évidence le rôle clé de la sensibilisation du système immunitaire en périphérie pour permettre le développement d'une réponse immunitaire adaptative efficace dans le SNC.

L'immunothérapie dans les maladies neurodégénératives conformationnelles est en fait un concept assez récent. Développer un vaccin contre une protéine du soi « anormal » est complexe car cela nécessite d'une part de casser la tolérance naturelle vis-à-vis du soi et d'autre part d'éviter des effets secondaires d'auto-immunité. Le challenge n'est pas facile d'autant plus que les facteurs génétiques de l'hôte sont sources d'une grande variabilité inter-individuelle. Les effets secondaires de méningo-encéphalites de l'essai AN1792, ont été attribués, peut-être un peu trop rapidement, à une réponse T délétère. Il faut toutefois considérer que ces effets n'ont concerné que 6% des patients. On peut supposer que ces derniers possédaient un terrain génétique propice au développement de manifestations auto-immunes suite à la vaccination. Quoiqu'il en soit, les essais actuels se sont recentrés sur l'immunothérapie passive ou sur l'induction d'une réponse humorale seule.

Les Ac semblent a priori capables d'efficacité sur le plan biologique, bien que les mécanismes d'action mis en jeu ne soient pas complètement connus. La simple question de l'entrée des Ac dans le SNC reste entière : la BHE est en effet peu perméable au passage des Ac. Une hypothèse a été émise suggérant un effet « peripheral sink » : selon ce mécanisme, la formation de complexes immuns avec les Ac présents en périphérie entraînerait une diminution de la concentration d'A $\beta$  libre circulant, créant ainsi un gradient de diffusion entre plasma et cerveau et facilitant l'élimination des formes présentes au niveau cérébral. Cependant, une étude a pu montrer sur des coupes histologiques de cerveaux de souris



PDAPP traitées avec des injections intrapéritonéales d'Ac monoclonaux anti-A $\beta$ , que certains Ac étaient capables d'entrer dans le SNC, d'opsoniser des plaques et d'induire leur élimination par les phagocytes présents in situ (Bard et al., 2000). Il faut tout de même souligner que dans cette même étude, tous les Ac ne semblaient pas posséder ces propriétés. Les auteurs n'ont pas cherché à comprendre le mécanisme d'entrée des Ac à travers la BHE. La propriété la plus importante pour assurer l'efficacité de ces Ac semble être non pas leur affinité vis-à-vis d'A $\beta$ , mais leur capacité à lier les récepteurs Fc (Bard et al., 2003). Il est ainsi possible que les Ac se fixent en périphérie sur des populations de monocytes/macrophages secondairement recrutés dans le cerveau. La présence probable de microtraumatismes de la BHE engendrés par les lésions d'angiopathie amyloïde pourrait aussi contribuer à l'entrée des Ac dans le parenchyme cérébral. Si ces résultats avec les Ac monoclonaux sont prometteurs, ils posent encore de nombreuses questions mécanistiques qui mériteraient d'être résolues.

Il faut aussi être prudent avec l'immunothérapie fondée uniquement sur la réponse Ac. L'immunothérapie passive nécessite des injections répétées, coûteuses et n'exclut pas, in fine, que le patient se mette à produire des Ac anti-Ac monoclonaux, diminuant ainsi leur efficacité. Elle peut ne pas cibler toutes les formes d'A $\beta$  : formes oligomériques (Mamikonyan et al., 2007), formes N-tronquées ou formes présentant des modifications post-traductionnelles (pyroglutamate, etc). La conséquence, en augmentant la proportion de ces formes, toxiques, peut être un effet inverse de celui escompté. Elle peut aussi être restrictive car elle se limite à l'isotype de l'Ac monoclonal administré. Enfin, elle n'est pas non plus dénuée de risques (oedèmes vasogéniques et risque d'hémorragie cérébrale) (Thakker et al., 2009).

Les réponses T CD4<sup>+</sup> sont importantes car ces cellules sont les véritables « chefs d'orchestre » de la réponse immune, conditionnant son orientation fonctionnelle et nécessaires au développement de réponses B et CD8<sup>+</sup> efficaces. Spécialisés dans la coopération cellulaire, ces lymphocytes sont aussi capables d'agir sur certaines cellules et processus physiologiques grâce aux cytokines et aux molécules qu'ils produisent. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent ainsi interagir avec les cellules gliales et les neurones. Un certain nombre de travaux ont démontré chez la souris le potentiel thérapeutiques des LT CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  (Monsonogo et al., 2006), (Ethell et al., 2006), (Cao et al., 2009).

L'immunisation active semble donc nettement supérieure en termes de capacités thérapeutiques comparativement à l'immunothérapie passive ou reposant uniquement sur des

anticorps. Le problème majeur réside dans le contrôle de la « qualité » des réponses T induites après vaccination par A $\beta$ .

A $\beta$  étant un peptide de 42 acides aminés, le CMH de classe II est un facteur génétique a priori important à prendre en compte. Chez la souris, il conditionne assurément l'amplitude de la réponse vaccinale. Des travaux précédents ont effectivement montré des différences de réponses vaccinales T CD4<sup>+</sup> et Ac anti-A $\beta$  dans des souris « humanisées », c'est-à-dire transgéniques pour les HLA classe II humains (Das et al., 2003). Chez l'Homme, en comparant les haplotypes HLA de 133 patients de l'essai AN1792, certains auteurs ont aussi mis en évidence une variabilité de réponse proliférative T selon le polymorphisme du CMH de classe II (Zota et al., 2009). Ils ont par ailleurs construit un modèle murin de la maladie transgénique pour HLA-DRB1\*1501, un allèle de la molécule HLA-DR identifié comme étant source d'une forte immunogénicité vis-à-vis d'A $\beta$ . Dans ce modèle, des immunisations répétées par A $\beta$  ont conduit à l'élimination des plaques du parenchyme et à une diminution de l'activation microgiale, corrélant ainsi force de la réponse avec efficacité vaccinale.

A travers nos résultats, des facteurs génétiques de l'hôte, indépendants du CMH-II et relatifs à la propension à pouvoir développer une réponse Treg anti-A $\beta$ , sont apparus comme ayant aussi un impact primordial sur l'amplitude de la réponse vaccinale. Ces facteurs semblent exercer un effet dominant dans le fond C57BL/6 et sont donc au moins aussi importants à prendre en compte que le CMH-II. Ils pourraient être dus à des polymorphismes au niveau de gènes impliqués dans les fonctions générales des cellules Treg comme le gène *Foxp3*. Cependant, nos résultats semblent indiquer que ces facteurs dépendent aussi de la nature de l'Ag, puisque les effets observés dans la souris C57BL/6 pour A $\beta$  ne le sont pas avec d'autres Ag comme OVA ou la PLP. L'identification, probablement complexe, de ces facteurs apporterait cependant une aide précieuse dans la compréhension des mécanismes de tolérance vis-à-vis d'A $\beta$ . Leur extrapolation à l'Homme pourrait permettre d'identifier les patients susceptibles de bien ou, au contraire, de ne pas répondre à la vaccination.

La présence d'un effet suppresseur important des cellules T régulatrices sur la réponse vaccinale pourrait être une limite à l'efficacité de la vaccination. Cet effet semble s'opposer à l'action anti-inflammatoire et neuroprotectrice des Tregs au décours de la maladie.

D'un point de vue thérapeutique, notre projet d'essayer d'augmenter la réponse Treg par administration de faible dose d'IL-2 peut paraître paradoxal au vu des résultats que nous avons obtenus dans nos expériences d'immunisation. Ces deux approches auraient effectivement un effet antagoniste si elles devaient être utilisées conjointement, mais elles

peuvent tout à fait être efficaces séparément. Le traitement par faible dose d'IL-2 présente l'inconvénient de traiter uniquement un symptôme, il ne cible pas les peptides A $\beta$ , contrairement à la vaccination.

Inactiver les Tregs, même temporairement, au moment de la vaccination peut permettre d'augmenter l'efficacité vaccinale mais cela peut aussi s'avérer dangereux car, nous l'avons vu, ceci pourrait favoriser la survenue de manifestations auto-immunes de type méningo-encéphalites chez l'Homme, même si ces effets n'ont pas été observés chez la souris. Il semble donc pertinent de contrôler aussi la nature des réponses vaccinales induites. Les Tregs ne semblent pas modifier la nature de la réponse vaccinale, du moins en présence d'un adjuvant fort. Mais cette dernière pourrait être influencée par d'autres facteurs génétiques, comme semble l'indiquer une variation dans la proportion des différentes sous-classes d'IgG anti-A $\beta$  induites par la vaccination dans les différents fonds génétiques murins étudiés (résultats non montrés). La nature de la réponse vaccinale dépend surtout de la formulation du vaccin et de sa voie d'administration. Ainsi, en jouant sur les adjuvants de vaccination (Wang et al., 2007) et sur les voies d'administration, voie nasale (Maier et al., 2006) ou voie transcutanée (Nikolic et al., 2007) par exemple, on pourra privilégier des réponses T CD4+ effectrices plutôt orientées vers un profil « Th2 » qui semblent bénéfiques et moins à risque d'induire des méningoencéphalites.

La stratégie de notre équipe est encore différente. Elle repose sur le transfert adoptif de cellules, toujours à l'aide de la souris transgénique pour un TCR dirigé contre un épitope T CD4+ d'A $\beta$  que nous développons actuellement. Après isolement des LT naïfs de notre souris TCR Tg, nous pourrions les différencier in vitro par stimulation avec des splénocytes chargés par A $\beta$  en présence d'un cocktail de cytokines et d'Ac anti-cytokines (IL-12 + anti-IL4 pour la différenciation Th1, IL-4 + anti-IL12 pour Th2, TGF $\beta$  + IL-6 pour Th17, et TGF $\beta$  + acide rétinoïque + IL-2 pour les iTreg). Nous pourrions ensuite transférer ces LT effecteurs dans des souris APPPS1 âgées de 4 semaines (avant la formation des premiers dépôts amyloïdes) ou dans des souris âgées de 4 mois possédant déjà une pathologie amyloïde bien développée. Nous pourrions analyser l'effet du transfert adoptif des différentes sous-populations de LT effecteurs anti-A $\beta$  sur le recrutement des cellules T dans le cerveau, la pathologie amyloïde, la neuroinflammation, les troubles cognitifs et l'électrophysiologie de l'hippocampe. Nous surveillerons aussi l'apparition de signes d'auto-immunité (comportement, troubles moteurs, perte de poids, etc).

Cette stratégie nous semble optimale car d'une part elle permet l'activation de cellules *in vitro*, dans des conditions s'affranchissant de tous les mécanismes de tolérance qui peuvent exister *in vivo*, et d'autre part elle présente l'avantage de pouvoir être ajustée, en jouant sur la proportion des différentes sous-populations effectrices transférées. Tout comme la vaccination, elle assure, par la persistance de cellules mémoires, une efficacité continue. Elle a déjà fait preuve de son efficacité potentielle dans diverses pathologies chez la souris, et même chez l'Homme (Chhabra, 2011). Notre équipe a notamment démontré que le transfert adoptif de cellules T transgéniques pour un TCR reconnaissant un épitope de la Prp présenté par le CMH-II permettait de conférer une protection partielle contre la tremblante expérimentale murine (Iken et al., 2011). Ces données justifient les potentialités thérapeutiques de cette approche dans les maladies neurodégénératives. Mais cette stratégie possède tout de même quelques limites, notamment un risque de manifestations auto-immunes si les LT porteurs du TCR transgénique expriment un autre TCR endogène (Bendle et al., 2010) ou des risques de perte d'efficacité par des mécanismes de type AICD (activation induced cell death) (Chhabra, 2011).

En conclusion, les relations entre système immunitaire et SNC sont complexes. La communauté scientifique s'y intéresse de plus en plus car elles semblent prendre une part active aux mécanismes physiopathologiques des maladies neurodégénératives, dont la MA. Le rôle joué par les cellules T régulatrices dans ces pathologies paraît particulièrement important. Par ailleurs, l'efficacité de la vaccination dans les modèles murins de la MA a suscité de véritables espoirs qui n'ont malheureusement pas été concrétisés dans les essais cliniques. L'optimisation des approches immunothérapeutiques chez l'Homme est donc un véritable challenge que beaucoup essaient de relever. Parallèlement à cela, des efforts considérables sont faits sur la recherche de tests clinico-biologiques permettant d'établir un diagnostic précoce de la maladie afin d'augmenter les chances d'efficacité. Coupler plusieurs approches thérapeutiques, ciblant divers processus physiopathologiques, et administrées à un stade précoce de la maladie, pourrait bien être la clé de la réussite dans le traitement de la MA.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## A

- Aho, L., Pikkarainen, M., Hiltunen, M., Leinonen, V., and Alafuzoff, I. (2010). Immunohistochemical visualization of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta in extra- and intracellular compartments in the human brain. *J. Alzheimers Dis.* *20*, 1015–1028.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., et al. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *21*, 383–421.
- Allman, D., and Miller, J.P. (2005). B cell development and receptor diversity during aging. *Curr. Opin. Immunol.* *17*, 463–467.
- Andersen, J.K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* *10 Suppl*, S18–25.
- Andorfer, C., Acker, C.M., Kress, Y., Hof, P.R., Duff, K., and Davies, P. (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J. Neurosci.* *25*, 5446–5454.
- Anstey, K.J., Lipnicki, D.M., and Low, L.-F. (2008). Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis. *Am J Geriatr Psychiatry* *16*, 343–354.
- Anstey, K.J., Mack, H.A., and Cherbuin, N. (2009). Alcohol consumption as a risk factor for dementia and cognitive decline: meta-analysis of prospective studies. *Am J Geriatr Psychiatry* *17*, 542–555.
- Appel, S.H., Beers, D.R., and Henkel, J.S. (2010). T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening? *Trends Immunol.* *31*, 7–17.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., and Hyman, B.T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* *42*, 631–639.
- Ashford, J.W., and Mortimer, J.A. (2002). Non-familial Alzheimer's disease is mainly due to genetic factors. *J. Alzheimers Dis.* *4*, 169–177.
- Asuni, A.A., Boutajangout, A., Quartermain, D., and Sigurdsson, E.M. (2007). Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J. Neurosci.* *27*, 9115–9129.
- Auffret, A., Gautheron, V., Mattson, M.P., Mariani, J., and Rovira, C. (2010). Progressive age-related impairment of the late long-term potentiation in Alzheimer's disease presenilin-1 mutant knock-in mice. *J. Alzheimers Dis.* *19*, 1021–1033.

## B

- Ballatore, C., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 663–672.

- Banerjee, R., Mosley, R.L., Reynolds, A.D., Dhar, A., Jackson-Lewis, V., Gordon, P.H., Przedborski, S., and Gendelman, H.E. (2008). Adaptive immune neuroprotection in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *PLoS ONE* 3, e2740.
- Bard, F., Barbour, R., Cannon, C., Carretto, R., Fox, M., Games, D., Guido, T., Hoenow, K., Hu, K., Johnson-Wood, K., et al. (2003). Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2023–2028.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., et al. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* 6, 916–919.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Zhao, W., Wang, J., and Appel, S.H. (2008). CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15558–15563.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Zhao, W., Wang, J., Huang, A., Wen, S., Liao, B., and Appel, S.H. (2011). Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134, 1293–1314.
- Bendle, G.M., Linnemann, C., Hooijkaas, A.I., Bies, L., de Witte, M.A., Jorritsma, A., Kaiser, A.D.M., Pouw, N., Debets, R., Kieback, E., et al. (2010). Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat. Med.* 16, 565–570, 1p following 570.
- Benner, E.J., Banerjee, R., Reynolds, A.D., Sherman, S., Pisarev, V.M., Tsiperson, V., Nemachek, C., Ciborowski, P., Przedborski, S., Mosley, R.L., et al. (2008). Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. *PLoS ONE* 3, e1376.
- Bennett, D.A., Wilson, R.S., Schneider, J.A., Evans, D.A., Mendes de Leon, C.F., Arnold, S.E., Barnes, L.L., and Bienias, J.L. (2003). Education modifies the relation of AD pathology to level of cognitive function in older persons. *Neurology* 60, 1909–1915.
- Beydoun, M.A., Beydoun, H.A., and Wang, Y. (2008). Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 9, 204–218.
- Boche, D., and Nicoll, J.A.R. (2008). The role of the immune system in clearance of Abeta from the brain. *Brain Pathol.* 18, 267–278.
- Boche, D., Zotova, E., Weller, R.O., Love, S., Neal, J.W., Pickering, R.M., Wilkinson, D., Holmes, C., and Nicoll, J.A.R. (2008). Consequence of Abeta immunization on the vasculature of human Alzheimer's disease brain. *Brain* 131, 3299–3310.
- Boissonnas, A., Scholer-Dahirel, A., Simon-Blancal, V., Pace, L., Valet, F., Kissenpfennig, A., Sparwasser, T., Malissen, B., Fetler, L., and Amigorena, S. (2010). Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 32, 266–278.
- Bons, N., Mestre, N., and Petter, A. (1992). Senile plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate, *Microcebus murinus*. *Neurobiol. Aging* 13, 99–105.

- Boulanger, L.M., and Shatz, C.J. (2004). Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 521–531.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259.
- Britschgi, M., Olin, C.E., Johns, H.T., Takeda-Uchimura, Y., LeMieux, M.C., Rufibach, K., Rajadas, J., Zhang, H., Tomooka, B., Robinson, W.H., et al. (2009). Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 12145–12150.
- Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthet, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J.-M., et al. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 119, 182–192.
- Brynskikh, A., Warren, T., Zhu, J., and Kipnis, J. (2008). Adaptive immunity affects learning behavior in mice. *Brain Behav. Immun.* 22, 861–869.
- Busche, M.A., Eichhoff, G., Adelsberger, H., Abramowski, D., Wiederhold, K.-H., Haass, C., Staufenbiel, M., Konnerth, A., and Garaschuk, O. (2008). Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321, 1686–1689.
- Butovsky, O., Koronyo-Hamaoui, M., Kunis, G., Ophir, E., Landa, G., Cohen, H., and Schwartz, M. (2006). Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11784–11789.
- Butovsky, O., Kunis, G., Koronyo-Hamaoui, M., and Schwartz, M. (2007). Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. *Eur. J. Neurosci.* 26, 413–416.

## C

- Campbell, D.J., and Koch, M.A. (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 119–130.
- Cao, C., Arendash, G.W., Dickson, A., Mamcarz, M.B., Lin, X., and Ethell, D.W. (2009). Abeta-specific Th2 cells provide cognitive and pathological benefits to Alzheimer's mice without infiltrating the CNS. *Neurobiol. Dis.* 34, 63–70.
- Cao, X., and Südhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115–120.
- Caroni, P. (1997). Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J. Neurosci. Methods* 71, 3–9.
- Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J.W., Xu, H.W., Stern, D., McKhann, G., and Yan, S.D. (2005). Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *Faseb J.* 19, 2040–2041.
- Chakrabarty, P., Ceballos-Diaz, C., Beccard, A., Janus, C., Dickson, D., Golde, T.E., and Das, P. (2010). IFN-gamma promotes complement expression and attenuates amyloid plaque deposition in amyloid beta precursor protein transgenic mice. *J. Immunol.* 184, 5333–5343.



- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326, 986–991.
- Chen, M., Inestrosa, N.C., Ross, G.S., and Fernandez, H.L. (1995). Platelets are the primary source of amyloid beta-peptide in human blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213, 96–103.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.
- Chhabra, A. (2011). TCR-engineered, customized, antitumor T cells for cancer immunotherapy: advantages and limitations. *ScientificWorldJournal* 11, 121–129.
- Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., et al. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J. Biol. Chem.* 276, 21562–21570.
- Chiu, I.M., Chen, A., Zheng, Y., Kosaras, B., Tsiftoglou, S.A., Vartanian, T.K., Brown, R.H., Jr, and Carroll, M.C. (2008). T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 17913–17918.
- Choi, C., and Benveniste, E.N. (2004). Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 44, 65–81.
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., et al. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* 11, 909–913.
- Coomaraswamy, J., Kilger, E., Wölfling, H., Schäfer, C., Kaeser, S.A., Wegenast-Braun, B.M., Hefendehl, J.K., Wolburg, H., Mazzella, M., Ghiso, J., et al. (2010). Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7969–7974.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
- Cramer, P.E., Cirrito, J.R., Wesson, D.W., Lee, C.Y.D., Karlo, J.C., Zinn, A.E., Casali, B.T., Restivo, J.L., Goebel, W.D., James, M.J., et al. (2012). ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear  $\beta$ -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science* (New York, N.Y.).
- Cserr, H.F., Harling-Berg, C.J., and Knopf, P.M. (1992). Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathol.* 2, 269–276.

## D

- Darrasse-Jèze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., et al. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 206, 1853–1862.

- Das, P., Chapoval, S., Howard, V., David, C.S., and Golde, T.E. (2003). Immune responses against Abeta1-42 in HLA class II transgenic mice: implications for Abeta1-42 immune-mediated therapies. *Neurobiol. Aging* 24, 969–976.
- Davies, P., and Maloney, A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.
- De la Torre, J.C. (2000). Critically attained threshold of cerebral hypoperfusion: the CATCH hypothesis of Alzheimer's pathogenesis. *Neurobiol. Aging* 21, 331–342.
- De la Torre, J.C. (2004). Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurol* 3, 184–190.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204, 1257–1265.
- Dejean, A.S., Beisner, D.R., Ch'en, I.L., Kerdiles, Y.M., Babour, A., Arden, K.C., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 504–513.
- Demuro, A., Parker, I., and Stutzmann, G.E. (2010). Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 285, 12463–12468.
- Derecki, N.C., Cardani, A.N., Yang, C.H., Quinnes, K.M., Cihfield, A., Lynch, K.R., and Kipnis, J. (2010). Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J. Exp. Med.* 207, 1067–1080.
- Di Paolo, G., and Kim, T.-W. (2011). Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 284–296.
- Dodel, R., Balakrishnan, K., Keyvani, K., Deuster, O., Neff, F., Andrei-Selmer, L.-C., Röske, S., Stürer, C., Al-Abed, Y., Noelker, C., et al. (2011). Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 31, 5847–5854.
- Du, Y., Wei, X., Dodel, R., Sommer, N., Hampel, H., Gao, F., Ma, Z., Zhao, L., Oertel, W.H., and Farlow, M. (2003). Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Brain* 126, 1935–1939.
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., et al. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6, 734–746.
- Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 118, 5–36.
- Duyckaerts, C., and Hauw, J.J. (1997). Prevalence, incidence and duration of Braak's stages in the general population: can we know? *Neurobiol. Aging* 18, 362–369; discussion 389–392.
- Duyckaerts, C., Potier, M.-C., and Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115, 5–38.

Dziewczapolski, G., Glogowski, C.M., Masliah, E., and Heinemann, S.F. (2009). Deletion of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor gene improves cognitive deficits and synaptic pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *29*, 8805–8815.

## E

El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S.E., Means, T.K., Terada, K., Geula, C., and Luster, A.D. (2007). *Ccr2* deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med.* *13*, 432–438.

Engelhardt, B., and Ransohoff, R.M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* *26*, 485–495.

Ermini, F.V., Grathwohl, S., Radde, R., Yamaguchi, M., Staufenbiel, M., Palmer, T.D., and Jucker, M. (2008). Neurogenesis and alterations of neural stem cells in mouse models of cerebral amyloidosis. *Am. J. Pathol.* *172*, 1520–1528.

Ethell, D.W., Shippy, D., Cao, C., Cracchiolo, J.R., Runfeldt, M., Blake, B., and Arendash, G.W. (2006). Abeta-specific T-cells reverse cognitive decline and synaptic loss in Alzheimer's mice. *Neurobiol. Dis.* *23*, 351–361.

## F

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

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 1206–1212.

Falzone, T.L., Stokin, G.B., Lillo, C., Rodrigues, E.M., Westerman, E.L., Williams, D.S., and Goldstein, L.S.B. (2009). Axonal stress kinase activation and tau misbehavior induced by kinesin-1 transport defects. *J. Neurosci.* *29*, 5758–5767.

Fang, F., Lue, L.-F., Yan, S., Xu, H., Luddy, J.S., Chen, D., Walker, D.G., Stern, D.M., Yan, S., Schmidt, A.M., et al. (2010). RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* *24*, 1043–1055.

Färber, K., Pannasch, U., and Kettenmann, H. (2005). Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *29*, 128–138.

Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* *28*, 138–145.

Ferrer, I., Boada Rovira, M., Sánchez Guerra, M.L., Rey, M.J., and Costa-Jussá, F. (2004). Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* *14*, 11–20.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* *366*, 2112–2117.

Firuzi, O., and Praticò, D. (2006). Coxibs and Alzheimer's disease: should they stay or should they go? *Ann. Neurol.* *59*, 219–228.

Fischer, H.G., and Reichmann, G. (2001). Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J. Immunol.* *166*, 2717–2726.

Fisher, J., Levkovitch-Verbin, H., Schori, H., Yoles, E., Butovsky, O., Kaye, J.F., Ben-Nun, A., and Schwartz, M. (2001). Vaccination for neuroprotection in the mouse optic nerve: implications for optic neuropathies. *J. Neurosci.* *21*, 136–142.

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

Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.-D., Bopp, T., Schmitt, E., et al. (2007). Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* *5*, e38.

Foley, P. (2010). Lipids in Alzheimer's disease: A century-old story. *Biochim. Biophys. Acta* *1801*, 750–753.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). *Foxp3* programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.

Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., and De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *908*, 244–254.

Frenkel, D., Maron, R., Burt, D.S., and Weiner, H.L. (2005). Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears beta-amyloid in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* *115*, 2423–2433.

Freude, S., Hettich, M.M., Schumann, C., Stöhr, O., Koch, L., Köhler, C., Udelhoven, M., Leiser, U., Müller, M., Kubota, N., et al. (2009). Neuronal IGF-1 resistance reduces Aβ accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *Faseb J.* *23*, 3315–3324.

Frost, B., Jacks, R.L., and Diamond, M.I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.* *284*, 12845–12852.

## G

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 162–174.

Galea, I., Bechmann, I., and Perry, V.H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* *28*, 12–18.

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

- Garcia-Alloza, M., Robbins, E.M., Zhang-Nunes, S.X., Purcell, S.M., Betensky, R.A., Raju, S., Prada, C., Greenberg, S.M., Bacskai, B.J., and Frosch, M.P. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APP<sub>swe</sub>/PS1<sub>dE9</sub> mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* *24*, 516–524.
- Gauthier, S., Loft, H., and Cummings, J. (2008). Improvement in behavioural symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease by memantine: a pooled data analysis. *Int J Geriatr Psychiatry* *23*, 537–545.
- Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D.A., Mowat, A.M., and Randolph, G.J. (2010). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 453–460.
- Gengler, S., Hamilton, A., and Hölscher, C. (2010). Synaptic plasticity in the hippocampus of a APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease is impaired in old but not young mice. *PLoS ONE* *5*, e9764.
- Ghosal, K., Stathopoulos, A., and Pimplikar, S.W. (2010). APP intracellular domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation. *PLoS ONE* *5*, e11866.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* *330*, 841–845.
- Glennner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *120*, 885–890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., and James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* *349*, 704–706.
- Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U., and Gajdusek, D.C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* *235*, 877–880.
- Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* *174*, 1783–1786.
- Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2005). T cell development and receptor diversity during aging. *Curr. Opin. Immunol.* *17*, 468–475.
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P301 $\tau$  transgenic mice induced by A $\beta$  42 fibrils. *Science* *293*, 1491–1495.
- Götz, J., and Ittner, L.M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 532–544.
- Götz, J., Streffer, J.R., David, D., Schild, A., Hoernkli, F., Pennanen, L., Kurosinski, P., and Chen, F. (2004). Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol. Psychiatry* *9*, 664–683.

Grathwohl, S.A., Kälin, R.E., Bolmont, T., Prokop, S., Winkelmann, G., Kaeser, S.A., Odenthal, J., Radde, R., Eldh, T., Gandy, S., et al. (2009). Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat. Neurosci.* *12*, 1361–1363.

Griffin, W.S., Sheng, J.G., Royston, M.C., Gentleman, S.M., McKenzie, J.E., Graham, D.I., Roberts, G.W., and Mrak, R.E. (1998). Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a "cytokine cycle" in disease progression. *Brain Pathol.* *8*, 65–72.

Grudzien, A., Shaw, P., Weintraub, S., Bigio, E., Mash, D.C., and Mesulam, M.M. (2007). Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *28*, 327–335.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *83*, 4913–4917.

Guarda, G., Dostert, C., Staehli, F., Cabalzar, K., Castillo, R., Tardivel, A., Schneider, P., and Tschopp, J. (2009). T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature* *460*, 269–273.

## H

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., and Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* *9*, 857–865.

Hamid, R., Kilger, E., Willem, M., Vassallo, N., Kostka, M., Bornhövd, C., Reichert, A.S., Kretschmar, H.A., Haass, C., and Herms, J. (2007). Amyloid precursor protein intracellular domain modulates cellular calcium homeostasis and ATP content. *J. Neurochem.* *102*, 1264–1275.

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

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

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

Harigaya, Y., Saido, T.C., Eckman, C.B., Prada, C.M., Shoji, M., and Younkin, S.G. (2000). Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *276*, 422–427.

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskva, V., Dowzell, K., Williams, A., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *41*, 1088–1093.

- Hattori, M., Sugino, E., Minoura, K., In, Y., Sumida, M., Taniguchi, T., Tomoo, K., and Ishida, T. (2008). Different inhibitory response of cyanidin and methylene blue for filament formation of tau microtubule-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *374*, 158–163.
- He, Y., Wang, J., Wang, L., Chen, Z.J., Yan, C., Yang, H., Tang, H., Zhu, C., Gong, Q., Zang, Y., et al. (2009). Uncovering intrinsic modular organization of spontaneous brain activity in humans. *PLoS ONE* *4*, e5226.
- Herrero, C., Marqués, L., Lloberas, J., and Celada, A. (2001). IFN-gamma-dependent transcription of MHC class II IA is impaired in macrophages from aged mice. *J. Clin. Invest.* *107*, 485–493.
- Herrup, K. (2010). Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J. Neurosci.* *30*, 16755–16762.
- Hickman, S.E., Allison, E.K., and El Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* *28*, 8354–8360.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J.R., Tracy, J., Signorell, A., Müller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., et al. (2003). Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* *38*, 547–554.
- Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med.* *4*, 97–100.
- Hollingworth, P., Harold, D., Jones, L., Owen, M.J., and Williams, J. (2011a). Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges. *Int J Geriatr Psychiatry* *26*, 793–802.
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.-C., Carrasquillo, M.M., Abraham, R., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvina, V., et al. (2011b). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *43*, 429–435.
- Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jones, R.W., Bullock, R., Love, S., Neal, J.W., et al. (2008). Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* *372*, 216–223.
- Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Culliford, D., and Perry, V.H. (2011). Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology* *77*, 212–218.
- Holmes, C., El-Okli, M., Williams, A.L., Cunningham, C., Wilcockson, D., and Perry, V.H. (2003). Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* *74*, 788–789.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* *274*, 99–102.

Huang, B., Pan, P.-Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., and Chen, S.-H. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 66, 1123–1131.

Huang, G.-J., Smith, A.L., Gray, D.H.D., Cosgrove, C., Singer, B.H., Edwards, A., Sims, S., Sim, S., Parent, J.M., Johnsen, A., et al. (2010). A genetic and functional relationship between T cells and cellular proliferation in the adult hippocampus. *PLoS Biol.* 8, e1000561.

Huh, G.S., Boulanger, L.M., Du, H., Riquelme, P.A., Brotz, T.M., and Shatz, C.J. (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290, 2155–2159.

## I

Iken, S., Bachy, V., Gourdain, P., Lim, A., Grégoire, S., Chaigneau, T., Aucouturier, P., and Carnaud, C. (2011). Th2-polarised PrP-specific transgenic T-cells confer partial protection against murine scrapie. *PLoS Pathog.* 7, e1002216.

Imbimbo, B.P., Ottonello, S., Frisardi, V., Solfrizzi, V., Greco, A., Seripa, D., Pilotto, A., and Panza, F. (2012). Solanezumab for the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Expert Rev Clin Immunol* 8, 135–149.

In t' Veld, B.A., Ruitenber, A., Hofman, A., Launer, L.J., van Duijn, C.M., Stijnen, T., Breteler, M.M., and Stricker, B.H. (2001). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 345, 1515–1521.

Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., et al. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387–397.

## J

Jadidi-Niaragh, F., and Mirshafiey, A. (2011). Regulatory T-cell as orchestra leader in immunosuppression process of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33, 545–567.

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

Jicha, G.A., Parisi, J.E., Dickson, D.W., Johnson, K., Cha, R., Ivnik, R.J., Tangalos, E.G., Boeve, B.F., Knopman, D.S., Braak, H., et al. (2006). Neuropathologic outcome of mild cognitive impairment following progression to clinical dementia. *Arch. Neurol.* 63, 674–681.

Joachim, C.L., Mori, H., and Selkoe, D.J. (1989). Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature* 341, 226–230.



Johnston, M., Zakharov, A., Papaiconomou, C., Salmasi, G., and Armstrong, D. (2004). Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species. *Cerebrospinal Fluid Res* 1, 2.

Jucker, M. (2010). The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. *Nat. Med.* 16, 1210–1214.

Jucker, M., and Heppner, F.L. (2008). Cerebral and peripheral amyloid phagocytes--an old liaison with a new twist. *Neuron* 59, 8–10.

## K

Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925–937.

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

Kapogiannis, D., and Mattson, M.P. (2011). Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 10, 187–198.

Kappler, J.W., Roehm, N., and Murrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49, 273–280.

Kawakami, N., and Flügel, A. (2010). Knocking at the brain's door: intravital two-photon imaging of autoreactive T cell interactions with CNS structures. *Semin Immunopathol* 32, 275–287.

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

Kerchner, G.A., and Boxer, A.L. (2010). Bapineuzumab. *Expert Opin Biol Ther* 10, 1121–1130.

Ketelaar, M., Hofstra, R., and Hayden, M. (2011). What monozygotic twins discordant for phenotype illustrate about mechanisms influencing genetic forms of neurodegeneration. *Clin. Genet.*

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

Kim, J., Basak, J.M., and Holtzman, D.M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63, 287–303.

King, M.E., Kan, H.-M., Baas, P.W., Erisir, A., Glabe, C.G., and Bloom, G.S. (2006). Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid. *J. Cell Biol.* 175, 541–546.

Kipnis, J., Mizrahi, T., Hauben, E., Shaked, I., Shevach, E., and Schwartz, M. (2002a). Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15620–15625.

- Kipnis, J., Mizrahi, T., Yoles, E., Ben-Nun, A., Schwartz, M., and Ben-Nur, A. (2002b). Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. *J. Neuroimmunol.* *130*, 78–85.
- Kiyota, T., Ingraham, K.L., Swan, R.J., Jacobsen, M.T., Andrews, S.J., and Ikezu, T. (2011). AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther.*
- Kiyota, T., Okuyama, S., Swan, R.J., Jacobsen, M.T., Gendelman, H.E., and Ikezu, T. (2010). CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *Faseb J.* *24*, 3093–3102.
- Klunk, W.E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D.P., Bergström, M., Savitcheva, I., Huang, G., Estrada, S., et al. (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.* *55*, 306–319.
- Klunk, W.E., Lopresti, B.J., Ikonomic, M.D., Lefterov, I.M., Koldamova, R.P., Abrahamson, E.E., Debnath, M.L., Holt, D.P., Huang, G., Shao, L., et al. (2005). Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain. *J. Neurosci.* *25*, 10598–10606.
- Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* *10*, 595–602.
- Koffie, R.M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K.W., Mielke, M.L., Garcia-Alloza, M., Micheva, K.D., Smith, S.J., Kim, M.L., Lee, V.M., et al. (2009). Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 4012–4017.
- Koreth, J., Matsuoka, K., Kim, H.T., McDonough, S.M., Bindra, B., Alyea, E.P., 3rd, Armand, P., Cutler, C., Ho, V.T., Treister, N.S., et al. (2011). Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2055–2066.
- Kovaiou, R.D., Weiskirchner, I., Keller, M., Pfister, G., Cioca, D.P., and Grubeck-Loebenstein, B. (2005). Age-related differences in phenotype and function of CD4+ T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4+ T cells. *Int. Immunol.* *17*, 1359–1366.
- Kuo, Y.M., Kokjohn, T.A., Beach, T.G., Sue, L.I., Brune, D., Lopez, J.C., Kalback, W.M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., et al. (2001). Comparative analysis of amyloid-beta chemical structure and amyloid plaque morphology of transgenic mouse and Alzheimer's disease brains. *J. Biol. Chem.* *276*, 12991–12998.
- Kwok, L.-Y., Miletic, H., Lütjen, S., Soltek, S., Deckert, M., and Schlüter, D. (2002). Protective immunosurveillance of the central nervous system by Listeria-specific CD4+ and CD8+ T cells in systemic listeriosis in the absence of intracerebral Listeria. *J. Immunol.* *169*, 2010–2019.

## L

- LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 499–509.

- Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *41*, 1094–1099.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 6448–6453.
- Lancet Neurology (2010). Alzheimer's disease prevention: a reality check. *Lancet Neurol* *9*, 643.
- Lanuti, P., Ciccocioppo, F., Bonanni, L., Marchisio, M., Lachmann, R., Tabet, N., Pierdomenico, L., Santavenere, E., Catinella, V., Iacone, A., et al. (2012). Amyloid-specific T-cells differentiate Alzheimer's disease from Lewy body dementia. *Neurobiology of Aging*.
- Laurén, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., and Strittmatter, S.M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* *457*, 1128–1132.
- Lebson, L., Nash, K., Kamath, S., Herber, D., Carty, N., Lee, D.C., Li, Q., Szekeres, K., Jinwal, U., Koren, J., et al. (2010). Trafficking CD11b-positive blood cells deliver therapeutic genes to the brain of amyloid-depositing transgenic mice. *J. Neurosci.* *30*, 9651–9658.
- Lee, S., Varvel, N.H., Konerth, M.E., Xu, G., Cardona, A.E., Ransohoff, R.M., and Lamb, B.T. (2010). CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am. J. Pathol.* *177*, 2549–2562.
- Lehéricy, S., Marjanska, M., Mesrob, L., Sarazin, M., and Kinkingnehun, S. (2007). Magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. *Eur Radiol* *17*, 347–362.
- Leroy, K., Ando, K., Héraud, C., Yilmaz, Z., Authalet, M., Boeynaems, J.-M., Buée, L., De Decker, R., and Brion, J.-P. (2010). Lithium treatment arrests the development of neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice with advanced neurofibrillary pathology. *J. Alzheimers Dis.* *19*, 705–719.
- Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* *440*, 352–357.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., and Wang, K. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* *269*, 973–977.
- Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* *293*, 1487–1491.
- Li, G., Peskind, E.R., Millard, S.P., Chi, P., Sokal, I., Yu, C.-E., Bekris, L.M., Raskind, M.A., Galasko, D.R., and Montine, T.J. (2009). Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. *PLoS ONE* *4*, e5424.

- Li, G., Sokal, I., Quinn, J.F., Leverenz, J.B., Brodey, M., Schellenberg, G.D., Kaye, J.A., Raskind, M.A., Zhang, J., Peskind, E.R., et al. (2007). CSF tau/Abeta42 ratio for increased risk of mild cognitive impairment: a follow-up study. *Neurology* 69, 631–639.
- Li, J., Bracht, M., Shang, X., Radewonuk, J., Emmell, E., Griswold, D.E., and Li, L. (2006). Ex vivo activated OVA specific and non-specific CD4+CD25+ regulatory T cells exhibit comparable suppression to OVA mediated T cell responses. *Cell. Immunol.* 241, 75–84.
- Li, Q.X., Fuller, S.J., Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1999). The amyloid precursor protein of Alzheimer disease in human brain and blood. *J. Leukoc. Biol.* 66, 567–574.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.* 180, 5916–5926.
- Liang, K.Y., Mintun, M.A., Fagan, A.M., Goate, A.M., Bugg, J.M., Holtzman, D.M., Morris, J.C., and Head, D. (2010). Exercise and Alzheimer's disease biomarkers in cognitively normal older adults. *Ann. Neurol.* 68, 311–318.
- Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T., and Veltkamp, R. (2009). Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat. Med.* 15, 192–199.
- Liu, K., Solano, I., Mann, D., Lemere, C., Mercken, M., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2006a). Characterization of Abeta11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated Abeta species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 112, 163–174.
- Liu, Y., Teige, I., Birnir, B., and Issazadeh-Navikas, S. (2006b). Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat. Med.* 12, 518–525.
- Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450, 56–62.
- Loeffler, C., Dietz, K., Schleich, A., Schlaszus, H., Stoll, M., Meyermann, R., and Mittelbronn, M. (2011). Immune surveillance of the normal human CNS takes place in dependence of the locoregional blood-brain barrier configuration and is mainly performed by CD3(+)/CD8(+) lymphocytes. *Neuropathology* 31, 230–238.
- Lopez, O.L., Becker, J.T., Wahed, A.S., Saxton, J., Sweet, R.A., Wolk, D.A., Klunk, W., and Dekosky, S.T. (2009). Long-term effects of the concomitant use of memantine with cholinesterase inhibition in Alzheimer disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 80, 600–607.
- Lu, F.-P., Lin, K.-P., and Kuo, H.-K. (2009). Diabetes and the risk of multi-system aging phenotypes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 4, e4144.
- Lund, J.M., Hsing, L., Pham, T.T., and Rudensky, A.Y. (2008). Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 320, 1220–1224.

## M

- Maier, M., Peng, Y., Jiang, L., Seabrook, T.J., Carroll, M.C., and Lemere, C.A. (2008). Complement C3 deficiency leads to accelerated amyloid beta plaque deposition and neurodegeneration and modulation of the microglia/macrophage phenotype in amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.* *28*, 6333–6341.
- Maier, M., Seabrook, T.J., Lazo, N.D., Jiang, L., Das, P., Janus, C., and Lemere, C.A. (2006). Short amyloid-beta (Abeta) immunogens reduce cerebral Abeta load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an Abeta-specific cellular immune response. *J. Neurosci.* *26*, 4717–4728.
- Malissen, M., Gillet, A., Ardouin, L., Bouvier, G., Trucy, J., Ferrier, P., Vivier, E., and Malissen, B. (1995). Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *Embo J.* *14*, 4641–4653.
- Mamikonyan, G., Necula, M., Mkrtychyan, M., Ghochikyan, A., Petrushina, I., Movsesyan, N., Mina, E., Kiyatkin, A., Glabe, C.G., Cribbs, D.H., et al. (2007). Anti-A beta 1-11 antibody binds to different beta-amyloid species, inhibits fibril formation, and disaggregates preformed fibrils but not the most toxic oligomers. *J. Biol. Chem.* *282*, 22376–22386.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *82*, 4245–4249.
- Matsuo, E.S., Shin, R.W., Billingsley, M.L., Van de Voorde, A., O'Connor, M., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1994). Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* *13*, 989–1002.
- Mattson, M.P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* *430*, 631–639.
- Mattsson, N., Zetterberg, H., Hansson, O., Andreasen, N., Parnetti, L., Jonsson, M., Herukka, S.-K., van der Flier, W.M., Blankenstein, M.A., Ewers, M., et al. (2009). CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *Jama* *302*, 385–393.
- Matyszak, M.K., and Perry, V.H. (1997). Dendritic cells in inflammatory responses in the CNS. *Adv. Exp. Med. Biol.* *417*, 295–299.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* *296*, 301–305.
- Mazanetz, M.P., and Fischer, P.M. (2007). Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* *6*, 464–479.
- McAlpine, F.E., Lee, J.-K., Harms, A.S., Ruhn, K.A., Blurton-Jones, M., Hong, J., Das, P., Golde, T.E., LaFerla, F.M., Oddo, S., et al. (2009). Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology. *Neurobiol. Dis.* *34*, 163–177.
- McNeill, A., Spittle, E., and Bäckström, B.T. (2007). Partial depletion of CD69<sup>low</sup>-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61. *Scand. J. Immunol.* *65*, 63–69.

Medawar, P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 29, 58–69.

Mehta, P.D., Pirttilä, T., Mehta, S.P., Sersen, E.A., Aisen, P.S., and Wisniewski, H.M. (2000). Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 57, 100–105.

Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A.L., et al. (2006). Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313, 1781–1784.

Mildner, A., Schlevogt, B., Kierdorf, K., Böttcher, C., Erny, D., Kummer, M.P., Quinn, M., Brück, W., Bechmann, I., Heneka, M.T., et al. (2011). Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 31, 11159–11171.

Miyao, T., Floess, S., Setoguchi, R., Luche, H., Fehling, H.J., Waldmann, H., Huehn, J., and Hori, S. (2012). Plasticity of foxp3(+) T cells reflects promiscuous foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* 36, 262–275.

Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I.R., and Schwartz, M. (1999). Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* 5, 49–55.

Monsonogo, A., Imitola, J., Petrovic, S., Zota, V., Nemirovsky, A., Baron, R., Fisher, Y., Owens, T., and Weiner, H.L. (2006). Aβ-induced meningoencephalitis is IFN-γ-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Aβ in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 5048–5053.

Monsonogo, A., Maron, R., Zota, V., Selkoe, D.J., and Weiner, H.L. (2001). Immune hyporesponsiveness to amyloid beta-peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10273–10278.

Monsonogo, A., Zota, V., Karni, A., Krieger, J.I., Bar-Or, A., Bitan, G., Budson, A.E., Sperling, R., Selkoe, D.J., and Weiner, H.L. (2003). Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 112, 415–422.

Montgomery, S.L., Mastrangelo, M.A., Habib, D., Narrow, W.C., Knowlden, S.A., Wright, T.W., and Bowers, W.J. (2011). Ablation of TNF-RI/RII expression in Alzheimer's disease mice leads to an unexpected enhancement of pathology: implications for chronic pan-TNF-α suppressive therapeutic strategies in the brain. *Am. J. Pathol.* 179, 2053–2070.

Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., et al. (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 982–985.

Mrak, R.E., Sheng, J.G., and Griffin, W.S. (1996). Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 273–279.

Murray, M.E., Graff-Radford, N.R., Ross, O.A., Petersen, R.C., Duara, R., and Dickson, D.W. (2011). Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *Lancet Neurol* 10, 785–796.

## N

Naert, G., and Rivest, S. (2011). CC chemokine receptor 2 deficiency aggravates cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 31, 6208–6220.

Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D.L., Schneck, J., and Gabrilovich, D.I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* 13, 828–835.

Naj, A.C., Jun, G., Beecham, G.W., Wang, L.-S., Vardarajan, B.N., Buross, J., Gallins, P.J., Buxbaum, J.D., Jarvik, G.P., Crane, P.K., et al. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 43, 436–441.

Nakamura, K., Hirai, H., Torashima, T., Miyazaki, T., Tsurui, H., Xiu, Y., Ohtsuji, M., Lin, Q.S., Tsukamoto, K., Nishimura, H., et al. (2007). CD3 and immunoglobulin G Fc receptor regulate cerebellar functions. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5128–5134.

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

Nelson, P.T., Greenberg, S.G., and Saper, C.B. (1994). Neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of sheep. *Neurosci. Lett.* 170, 187–190.

Nemirovsky, A., Shapiro, J., Baron, R., Kompaniets, A., and Monsonogo, A. (2012). Active A $\beta$  vaccination fails to enhance amyloid clearance in a mouse model of Alzheimer's disease with A $\beta$ 42-driven pathology. *Journal of Neuroimmunology*.

Neumann, H., and Takahashi, K. (2007). Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis. *J. Neuroimmunol.* 184, 92–99.

Nicoll, J.A.R., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., and Weller, R.O. (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat. Med.* 9, 448–452.

Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D.M., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457, 981–989.

Nikolic, W.V., Bai, Y., Obregon, D., Hou, H., Mori, T., Zeng, J., Ehrhart, J., Shytle, R.D., Giunta, B., Morgan, D., et al. (2007). Transcutaneous beta-amyloid immunization reduces cerebral beta-amyloid deposits without T cell infiltration and microhemorrhage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2507–2512.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318.

## O

O’Nuallain, B., Hrcic, R., Wall, J.S., Weiss, D.T., and Solomon, A. (2006). Diagnostic and therapeutic potential of amyloid-reactive IgG antibodies contained in human sera. *J. Immunol.* 176, 7071–7078.

Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer’s disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* 26, 10129–10140.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer’s disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.

Olzscha, H., Schermann, S.M., Woerner, A.C., Pinkert, S., Hecht, M.H., Tartaglia, G.G., Vendruscolo, M., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U., and Vabulas, R.M. (2011). Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell* 144, 67–78.

Origlia, N., Righi, M., Capsoni, S., Cattaneo, A., Fang, F., Stern, D.M., Chen, J.X., Schmidt, A.M., Arancio, O., Yan, S.D., et al. (2008). Receptor for advanced glycation end product-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to amyloid-beta-mediated cortical synaptic dysfunction. *J. Neurosci.* 28, 3521–3530.

## P

Pallas, M., Camins, A., Smith, M.A., Perry, G., Lee, H., and Casadesus, G. (2008). From aging to Alzheimer’s disease: unveiling “the switch” with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J. Alzheimers Dis.* 15, 615–624.

Palop, J.J., Chin, J., Roberson, E.D., Wang, J., Thwin, M.T., Bien-Ly, N., Yoo, J., Ho, K.O., Yu, G.-Q., Kreitzer, A., et al. (2007). Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer’s disease. *Neuron* 55, 697–711.

Park, L., Wang, G., Zhou, P., Zhou, J., Pitstick, R., Previti, M.L., Younkin, L., Younkin, S.G., Van Nostrand, W.E., Cho, S., et al. (2011). Scavenger receptor CD36 is essential for the cerebrovascular oxidative stress and neurovascular dysfunction induced by amyloid-beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5063–5068.

Pashenkov, M., and Link, H. (2002). Dendritic cells and immune responses in the central nervous system. *Trends Immunol.* 23, 69–70; author reply 70.

Patterson, K.R., Remmers, C., Fu, Y., Brooker, S., Kanaan, N.M., Vana, L., Ward, S., Reyes, J.F., Philibert, K., Glucksman, M.J., et al. (2011). Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 286, 23063–23076.



Pellicanò, M., Larbi, A., Goldeck, D., Colonna-Romano, G., Buffa, S., Bulati, M., Rubino, G., Iemolo, F., Candore, G., Caruso, C., et al. (2012). Immune profiling of Alzheimer patients. *J. Neuroimmunol.* *242*, 52–59.

Peng, S., Garzon, D.J., Marchese, M., Klein, W., Ginsberg, S.D., Francis, B.M., Mount, H.T.J., Mufson, E.J., Salehi, A., and Fahnstock, M. (2009). Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *29*, 9321–9329.

Perry, V.H., Cunningham, C., and Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 161–167.

Petrovitch, H., White, L.R., Izmirlian, G., Ross, G.W., Havlik, R.J., Markesbery, W., Nelson, J., Davis, D.G., Hardman, J., Foley, D.J., et al. (2000). Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS. Honolulu-Asia aging Study. *Neurobiol. Aging* *21*, 57–62.

Plant, L.D., Boyle, J.P., Smith, I.F., Peers, C., and Pearson, H.A. (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J. Neurosci.* *23*, 5531–5535.

Pocivavsek, A., Burns, M.P., and Rebeck, G.W. (2009). Low-density lipoprotein receptors regulate microglial inflammation through c-Jun N-terminal kinase. *Glia* *57*, 444–453.

Pride, M., Seubert, P., Grundman, M., Hagen, M., Eldridge, J., and Black, R.S. (2008). Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis. *Neurodegener Dis* *5*, 194–196.

## Q

Qian, S., Jiang, P., Guan, X.M., Singh, G., Trumbauer, M.E., Yu, H., Chen, H.Y., Van de Ploeg, L.H., and Zheng, H. (1998). Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates Abeta1-42/43 expression. *Neuron* *20*, 611–617.

Qiu, C., Winblad, B., and Fratiglioni, L. (2005). The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia. *Lancet Neurol* *4*, 487–499.

## R

Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S.A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M.E., Jäggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., et al. (2006). Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* *7*, 940–946.

Ransohoff, R.M., and Cardona, A.E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* *468*, 253–262.

Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 119–145.

- Ray, S., Britschgi, M., Herbert, C., Takeda-Uchimura, Y., Boxer, A., Blennow, K., Friedman, L.F., Galasko, D.R., Jutel, M., Karydas, A., et al. (2007). Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat. Med.* *13*, 1359–1362.
- Reale, M., Iarlori, C., Gambi, F., Lucci, I., Salvatore, M., and Gambi, D. (2005). Acetylcholinesterase inhibitors effects on oncostatin-M, interleukin-1 beta and interleukin-6 release from lymphocytes of Alzheimer's disease patients. *Exp. Gerontol.* *40*, 165–171.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., and Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* *10*, 514–523.
- Reddy, M.M., Wilson, R., Wilson, J., Connell, S., Gocke, A., Hynan, L., German, D., and Kodadek, T. (2011). Identification of candidate IgG biomarkers for Alzheimer's disease via combinatorial library screening. *Cell* *144*, 132–142.
- Relkin, N.R., Szabo, P., Adamiak, B., Burgut, T., Monthe, C., Lent, R.W., Younkin, S., Younkin, L., Schiff, R., and Weksler, M.E. (2009). 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* *30*, 1728–1736.
- Reynolds, A.D., Banerjee, R., Liu, J., Gendelman, H.E., and Mosley, R.L. (2007). Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *J. Leukoc. Biol.* *82*, 1083–1094.
- Reynolds, A.D., Stone, D.K., Mosley, R.L., and Gendelman, H.E. (2009). Nitrated {alpha}-synuclein-induced alterations in microglial immunity are regulated by CD4+ T cell subsets. *J. Immunol.* *182*, 4137–4149.
- Rhein, V., Song, X., Wiesner, A., Ittner, L.M., Baysang, G., Meier, F., Ozmen, L., Bluethmann, H., Dröse, S., Brandt, U., et al. (2009). Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 20057–20062.
- Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietrzik, C.U., Filippov, M.A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C.B., Korte, M., et al. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J. Neurosci.* *27*, 7817–7826.
- Roberson, E.D., Halabisky, B., Yoo, J.W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., Wu, T., Hamto, P., Devidze, N., Yu, G.-Q., et al. (2011). Amyloid- $\beta$ /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *31*, 700–711.
- Roberson, E.D., Scarce-Lavie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.-Q., and Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* *316*, 750–754.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J.H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C.T., Cheng, R., Hasegawa, H., et al. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.* *39*, 168–177.

Ron-Harel, N., and Schwartz, M. (2009). Immune senescence and brain aging: can rejuvenation of immunity reverse memory loss? *Trends Neurosci.* *32*, 367–375.

Rosenkranz, D., Weyer, S., Tolosa, E., Gaenslen, A., Berg, D., Leyhe, T., Gasser, T., and Stoltze, L. (2007). Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J. Neuroimmunol.* *188*, 117–127.

Rosicarelli, B., Serafini, B., Sbriccoli, M., Lu, M., Cardone, F., Pocchiari, M., and Aloisi, F. (2005). Migration of dendritic cells into the brain in a mouse model of prion disease. *J. Neuroimmunol.* *165*, 114–120.

Rupp, N.J., Wegenast-Braun, B.M., Radde, R., Calhoun, M.E., and Jucker, M. (2011). Early onset amyloid lesions lead to severe neuritic abnormalities and local, but not global neuron loss in APPS1 transgenic mice. *Neurobiol. Aging* *32*, 2324.e1–6.

## S

Sacquin, A., Bergot, A.S., Aucouturier, P., and Bruley-Rosset, M. (2008). Contribution of antibody and T cell-specific responses to the progression of 139A-scrapie in C57BL/6 mice immunized with prion protein peptides. *J. Immunol.* *181*, 768–775.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* *133*, 775–787.

Sanz, J.M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L., and Di Virgilio, F. (2009). Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression. *J. Immunol.* *182*, 4378–4385.

Saresella, M., Calabrese, E., Marventano, I., Piancone, F., Gatti, A., Alberoni, M., Nemni, R., and Clerici, M. (2011a). Increased activity of Th-17 and Th-9 lymphocytes and a skewing of the post-thymic differentiation pathway are seen in Alzheimer's disease. *Brain Behav. Immun.* *25*, 539–547.

Saresella, M., Calabrese, E., Marventano, I., Piancone, F., Gatti, A., Farina, E., Alberoni, M., and Clerici, M. (2011b). A potential role for the PD1/PD-L1 pathway in the neuroinflammation of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*.

Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* *28*, 402–413.

Sassin, I., Schultz, C., Thal, D.R., Rüb, U., Arai, K., Braak, E., and Braak, H. (2000). Evolution of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes in the basal nucleus of Meynert. *Acta Neuropathol.* *100*, 259–269.

Sather, B.D., Treuting, P., Perdue, N., Miazgowicz, M., Fontenot, J.D., Rudensky, A.Y., and Campbell, D.J. (2007). Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J. Exp. Med.* *204*, 1335–1347.

Savva, G.M., and Stephan, B.C.M. (2010). Epidemiological studies of the effect of stroke on incident dementia: a systematic review. *Stroke* *41*, e41–46.

Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L., and Alonso, M.E. (1992). Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* *258*, 668–671.

- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* *400*, 173–177.
- Schilling, S., Zeitschel, U., Hoffmann, T., Heiser, U., Francke, M., Kehlen, A., Holzer, M., Hutter-Paier, B., Prokesch, M., Windisch, M., et al. (2008). Glutaminy cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Aβ and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat. Med.* *14*, 1106–1111.
- Schneider, A., Araújo, G.W., Trajkovic, K., Herrmann, M.M., Merkler, D., Mandelkow, E.-M., Weissert, R., and Simons, M. (2004). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Biol. Chem.* *279*, 55833–55839.
- Scholtzova, H., Kascsak, R.J., Bates, K.A., Boutajangout, A., Kerr, D.J., Meeker, H.C., Mehta, P.D., Spinner, D.S., and Wisniewski, T. (2009). Induction of toll-like receptor 9 signaling as a method for ameliorating Alzheimer's disease-related pathology. *J. Neurosci.* *29*, 1846–1854.
- Schultz, C., Hubbard, G.B., Tredici, K.D., Braak, E., and Braak, H. (2001). Tau pathology in neurons and glial cells of aged baboons. *Adv. Exp. Med. Biol.* *487*, 59–69.
- Schwartz, M., and Kipnis, J. (2011). A conceptual revolution in the relationships between the brain and immunity. *Brain Behav. Immun.* *25*, 817–819.
- Schwartz, M., and Shechter, R. (2010a). Protective autoimmunity functions by intracranial immunosurveillance to support the mind: The missing link between health and disease. *Mol. Psychiatry* *15*, 342–354.
- Schwartz, M., and Shechter, R. (2010b). Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* *6*, 405–410.
- Sela, U., Olds, P., Park, A., Schlesinger, S.J., and Steinman, R.M. (2011). Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice. *J. Exp. Med.* *208*, 2489–2496.
- Selkoe, D.J., Bell, D.S., Podlisny, M.B., Price, D.L., and Cork, L.C. (1987). Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* *235*, 873–877.
- Serot, J.M., Béné, M.C., Foliguet, B., and Faure, G.C. (2000). Monocyte-derived IL-10-secreting dendritic cells in choroid plexus epithelium. *J. Neuroimmunol.* *105*, 115–119.
- Serrano-Pozo, A., William, C.M., Ferrer, I., Uro-Coste, E., Delisle, M.-B., Muraige, C.-A., Hock, C., Nitsch, R.M., Masliah, E., Growdon, J.H., et al. (2010). Beneficial effect of human anti-amyloid-beta active immunization on neurite morphology and tau pathology. *Brain* *133*, 1312–1327.
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A.L., Ikram, M.A., DeStefano, A.L., Gudnason, V., Boada, M., Bis, J.C., Smith, A.V., Carassquillo, M.M., Lambert, J.C., et al. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *Jama* *303*, 1832–1840.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., and Swindlehurst, C. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* *359*, 325–327.

Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* *14*, 837–842.

Simard, A.R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.-P., and Rivest, S. (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* *49*, 489–502.

Singh, A.K., Wilson, M.T., Hong, S., Olivares-Villagómez, D., Du, C., Stanic, A.K., Joyce, S., Sriram, S., Koezuka, Y., and Van Kaer, L. (2001). Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* *194*, 1801–1811.

Small, S.A., and Duff, K. (2008). Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* *60*, 534–542.

Smith, R.P., Higuchi, D.A., and Broze, G.J., Jr (1990). Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* *248*, 1126–1128.

Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D., and Hanan-Aharon, E. (1997). Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 4109–4112.

Solomon, B., Koppel, R., Hanan, E., and Katzav, T. (1996). Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 452–455.

Spoelgen, R., von Arnim, C.A.F., Thomas, A.V., Peltan, I.D., Koker, M., Deng, A., Irizarry, M.C., Andersen, O.M., Willnow, T.E., and Hyman, B.T. (2006). Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme. *J. Neurosci.* *26*, 418–428.

Stalder, M., Deller, T., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (2001). 3D-Reconstruction of microglia and amyloid in APP23 transgenic mice: no evidence of intracellular amyloid. *Neurobiol. Aging* *22*, 427–434.

Steele, M.L., and Robinson, S.R. (2012). Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *33*, 423.e1–423.e13.

Stern, E.A., Bacskai, B.J., Hickey, G.A., Attenello, F.J., Lombardo, J.A., and Hyman, B.T. (2004). Cortical synaptic integration in vivo is disrupted by amyloid-beta plaques. *J. Neurosci.* *24*, 4535–4540.

Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T.K., Tang, M.X., Wilder, D., and Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *Jama* *271*, 1004–1010.

Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W.A., et al. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* *11*, 155–161.

Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Bruschi, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S., et al. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* *307*, 1282–1288.

Storage, D., Cammarata, S., Borghi, R., Sanguineti, R., Giliberto, L., Piccini, A., Pollero, V., Novello, C., Caltagirone, C., Smith, M.A., et al. (2010). Elevation of {beta}-amyloid 1-42 autoantibodies in the blood of amnesic patients with mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* *67*, 867–872.

Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 13287–13292.

Swain, S., Clise-Dwyer, K., and Haynes, L. (2005). Homeostasis and the age-associated defect of CD4+ T cells. *Semin. Immunol.* *17*, 370–377.

## T

Tahara, K., Kim, H.-D., Jin, J.-J., Maxwell, J.A., Li, L., and Fukuchi, K. (2006). Role of toll-like receptor signalling in A $\beta$  uptake and clearance. *Brain* *129*, 3006–3019.

Tapiola, T., Alafuzoff, I., Herukka, S.-K., Parkkinen, L., Hartikainen, P., Soininen, H., and Pirttilä, T. (2009). Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch. Neurol.* *66*, 382–389.

Tesseur, I., Zou, K., Esposito, L., Bard, F., Berber, E., Can, J.V., Lin, A.H., Crews, L., Tremblay, P., Mathews, P., et al. (2006). Deficiency in neuronal TGF- $\beta$  signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *J. Clin. Invest.* *116*, 3060–3069.

Thakker, D.R., Weatherspoon, M.R., Harrison, J., Keene, T.E., Lane, D.S., Kaemmerer, W.F., Stewart, G.R., and Shafer, L.L. (2009). Intracerebroventricular amyloid- $\beta$  antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 4501–4506.

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

Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* *164*, 183–190.

Tiemessen, M.M., Jagger, A.L., Evans, H.G., van Herwijnen, M.J.C., John, S., and Taams, L.S. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 19446–19451.

Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., Oda, T., Tsuchiya, K., and Kosaka, K. (2002). Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* *124*, 83–92.

Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R., and Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* *402*, 421–425.

Town, T., Laouar, Y., Pittenger, C., Mori, T., Szekely, C.A., Tan, J., Duman, R.S., and Flavell, R.A. (2008). Blocking TGF- $\beta$ -Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat. Med.* *14*, 681–687.

Trieb, K., Ransmayr, G., Sgonc, R., Lassmann, H., and Grubeck-Loebenstien, B. (1996). APP peptides stimulate lymphocyte proliferation in normals, but not in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 17, 541–547.

Troquier, L., Caillierez, M., Burnouf, S., Fernandez-Gomez, F.J., Grosjean, M.J., Zommer, N., Sergeant, N., Schraen-Maschke, S., Blum, D., and Buee, L. (2012). Targeting phospho-Ser422 by active Tau immunotherapy in the THY-Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Current Alzheimer Research*.

Tseng, B.P., Green, K.N., Chan, J.L., Blurton-Jones, M., and LaFerla, F.M. (2008). Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol. Aging* 29, 1607–1618.

Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., and Abraham, W.C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 70, 1–32.

## V

Vaknin, I., Kunis, G., Miller, O., Butovsky, O., Bukshpan, S., Beers, D.R., Henkel, J.S., Yoles, E., Appel, S.H., and Schwartz, M. (2011). Excess circulating alternatively activated myeloid (M2) cells accelerate ALS progression while inhibiting experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE* 6, e26921.

Van Horsen, J., Wesseling, P., van den Heuvel, L.P.W.J., de Waal, R.M.W., and Verbeek, M.M. (2003). Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol* 2, 482–492.

Van Nostrand, W.E., Wagner, S.L., Suzuki, M., Choi, B.H., Farrow, J.S., Geddes, J.W., Cotman, C.W., and Cunningham, D.D. (1989). Protease nexin-II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid beta-protein precursor. *Nature* 341, 546–549.

Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Davidsson, P., Van Kerschaver, E., Van Der Perre, B., Sjögren, M., Andreasen, N., and Blennow, K. (2000). Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci. Lett.* 285, 49–52.

Varvel, N.H., Bhaskar, K., Patil, A.R., Pimplikar, S.W., Herrup, K., and Lamb, B.T. (2008). Abeta oligomers induce neuronal cell cycle events in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 28, 10786–10793.

Vellas, B., Black, R., Thal, L.J., Fox, N.C., Daniels, M., McLennan, G., Tompkins, C., Leibman, C., Pomfret, M., and Grundman, M. (2009). Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders. *Curr Alzheimer Res* 6, 144–151.

Vidal, M., Morris, R., Grosveld, F., and Spanopoulou, E. (1990). Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *Embo J.* 9, 833–840.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.

Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., et al. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90–94.

Vitek, M.P., Brown, C.M., and Colton, C.A. (2009). APOE genotype-specific differences in the innate immune response. *Neurobiol. Aging* 30, 1350–1360.

## W

Wakim, L.M., Woodward-Davis, A., and Bevan, M.J. (2010). Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 17872–17879.

Wang, C.Y., Finstad, C.L., Walfield, A.M., Sia, C., Sokoll, K.K., Chang, T.-Y., Fang, X.D., Hung, C.H., Hutter-Paier, B., and Windisch, M. (2007). Site-specific UB1Th amyloid-beta vaccine for immunotherapy of Alzheimer's disease. *Vaccine* 25, 3041–3052.

Wang, P., Yang, G., Mosier, D.R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y.-D., Zhao, N.-M., Dominguez, B., Lee, K.-F., Gan, W.-B., et al. (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J. Neurosci.* 25, 1219–1225.

Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Mazur-Kolecka, B., Imaki, H., Wegiel, J., Mehta, P.D., Silverman, W.P., Reisberg, B., et al. (2007). Intraneuronal Aβ immunoreactivity is not a predictor of brain amyloidosis-beta or neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol.* 113, 389–402.

Weksler, M.E. (2000). Changes in the B-cell repertoire with age. *Vaccine* 18, 1624–1628.

Weksler, M.E., Relkin, N., Turkenich, R., LaRusse, S., Zhou, L., and Szabo, P. (2002). Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp. Gerontol.* 37, 943–948.

Weksler, M.E., and Szabo, P. (2000). The effect of age on the B-cell repertoire. *J. Clin. Immunol.* 20, 240–249.

Wenkel, H., Streilein, J.W., and Young, M.J. (2000). Systemic immune deviation in the brain that does not depend on the integrity of the blood-brain barrier. *J. Immunol.* 164, 5125–5131.

Wilcock, G.K., Ballard, C.G., Cooper, J.A., and Loft, H. (2008). Memantine for agitation/aggression and psychosis in moderately severe to severe Alzheimer's disease: a pooled analysis of 3 studies. *J Clin Psychiatry* 69, 341–348.

Wing, K., Fehérvári, Z., and Sakaguchi, S. (2006). Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int. Immunol.* 18, 991–1000.

Wolf, S.A., Fisher, J., Bechmann, I., Steiner, B., Kwidzinski, E., and Nitsch, R. (2002). Neuroprotection by T-cells depends on their subtype and activation state. *J. Neuroimmunol.* 133, 72–80.

Wolf, S.A., Steiner, B., Akpinarli, A., Kammertoens, T., Nassenstein, C., Braun, A., Blankenstein, T., and Kempermann, G. (2009a). CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J. Immunol.* 182, 3979–3984.



Wolf, S.A., Steiner, B., Wengner, A., Lipp, M., Kammertoens, T., and Kempermann, G. (2009b). Adaptive peripheral immune response increases proliferation of neural precursor cells in the adult hippocampus. *Faseb J.* *23*, 3121–3128.

## Y

Yamamoto, M., Horiba, M., Buescher, J.L., Huang, D., Gendelman, H.E., Ransohoff, R.M., and Ikezu, T. (2005). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 in beta-amyloid precursor protein transgenic mice show accelerated diffuse beta-amyloid deposition. *Am. J. Pathol.* *166*, 1475–1485.

Yanagisawa, K. (2007). Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1768*, 1943–1951.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* *53*, 337–351.

Young-Pearse, T.L., Suth, S., Luth, E.S., Sawa, A., and Selkoe, D.J. (2010). Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development. *J. Neurosci.* *30*, 10431–10440.

## Z

Zekry, D., Epperson, T.K., and Krause, K.-H. (2003). A role for NOX NADPH oxidases in Alzheimer's disease and other types of dementia? *IUBMB Life* *55*, 307–313.

Zhang, B., Yamamura, T., Kondo, T., Fujiwara, M., and Tabira, T. (1997). Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J. Exp. Med.* *186*, 1677–1687.

Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.-T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* *458*, 351–356.

Zhu, B., Bando, Y., Xiao, S., Yang, K., Anderson, A.C., Kuchroo, V.K., and Khoury, S.J. (2007). CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* *179*, 5228–5237.

Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J., and Schwartz, M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat. Neurosci.* *9*, 268–275.

Zota, V., Nemirovsky, A., Baron, R., Fisher, Y., Selkoe, D.J., Altmann, D.M., Weiner, H.L., and Monsonego, A. (2009). HLA-DR alleles in amyloid beta-peptide autoimmunity: a highly immunogenic role for the DRB1\*1501 allele. *J. Immunol.* *183*, 3522–3530.