



Mécanismes d'action des immunoglobulines intraveineuses dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer

Mémoire

Cassandra Ringuette Goulet

**Maîtrise en sciences pharmaceutiques
Maître ès sciences (M.Sc.)**

Québec, Canada

© Cassandra Ringuette Goulet, 2015

Résumé

Affectant près de 36 millions de personnes dans le monde, la maladie d'Alzheimer (MA) est une préoccupation grandissante de santé publique. La présence en *post-mortem* de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires constitue un trait caractéristique de la pathologie. Malgré les récents progrès en recherche, il n'existe toujours pas de traitement efficace pour cette maladie. Au cours des dernières années, les immunoglobulines intraveineuses (IgIV) ont démontré un certain potentiel thérapeutique pour la MA. Le présent travail vise à déterminer les mécanismes d'action par lesquels les IgIV exercent leurs effets bénéfiques dans un modèle murin de la MA. Globalement, mes travaux de recherche ont permis de constater l'absence d'effet des IgIV sur les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires et ont plutôt identifié l'inhibition de l'activation de la microglie comme mécanisme possible des IgIV, permettant ainsi une baisse de l'inflammation au cerveau et une augmentation de la neurogénèse.

Abstract

Affecting nearly 36 million people worldwide, Alzheimer's disease (AD) is a growing public health concern. AD is characterized by a progressive and irreversible slow deterioration of cognitive functions. The presence of postmortem amyloid plaques and neurofibrillary tangles is a hallmark of the disease. Despite recent advances in research, there is still no effective treatment for this disease. In recent years, intravenous immunoglobulin (IVIg) has shown some therapeutic potential for AD. The present work aims to determine the mechanisms of action by which IVIg exerts its beneficial effects in a mouse model of AD. Overall, my work has identified the inhibition of microglia activation as a possible mechanism of IVIg, allowing a decrease in brain inflammation and an increase in neurogenesis.

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	1
1.1.1 <i>Épidémiologie et manifestations cliniques</i>	1
1.1.2 <i>Étiologie</i>	5
1.1.2.1 Facteurs de risques.....	5
1.1.3 <i>Physiopathologie</i>	7
1.1.3.1 Plaques amyloïdes	8
1.1.3.2 Enchevêtrements neurofibrillaires.....	11
1.1.4 <i>Aspects neuroimmunologiques de la MA</i>	12
1.1.5 <i>Neurogénèse</i>	14
1.1.5.1 Généralités	14
1.1.5.2 Neurogénèse et MA.....	17
1.2 LES MODÈLES MURINS DE LA MA.....	18
1.3 LES AVENUES THÉRAPEUTIQUES	19
1.3.1 <i>Traitements pharmacologiques actuels</i>	19
1.3.2 <i>Immunothérapie</i>	21
1.3.2.1 Immunisation active.....	21
1.3.2.2 Immunisation passive.....	22
1.3.2.3 Mécanismes d'action.....	25
1.4 IMMUNOGLOBULINES INTRAVEINEUSES	27
1.4.1 <i>Généralités</i>	27
1.4.2 <i>Potentiel thérapeutique des IgIV dans le traitement de la MA</i>	29
1.4.3 <i>Problématique</i>	31
CHAPITRE 2 THÉMATIQUE DE RECHERCHE	33
2.1 OBJECTIF	33
2.2 HYPOTHÈSES	33
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE	35
3.1 ANIMAUX.....	35
3.2 TRAITEMENT AUX IGIV	35
3.3 PRÉPARATION DES TISSUS	36

3.4	ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	37
3.4.1	<i>Immunofluorescence</i>	37
3.4.2	<i>Immunobuvardage</i>	38
3.5	ANALYSE PROTÉOMIQUE.....	39
3.5.1	<i>Électrophorèse en deux dimensions</i>	39
3.5.2	<i>Analyse d'image</i>	40
3.5.3	<i>Digestion des protéines</i>	40
3.5.4	<i>Spectrométrie de masse</i>	40
3.5.5	<i>Analyses statistiques</i>	41
CHAPITRE 4	RÉSULTATS.....	43
4.1	ABSENCE D'EFFET DES IGIV SUR LES PATHOLOGIES AMYLOÏDE ET TAU	43
4.2	BAISSE DE L'ACTIVATION DE LA MICROGLIE EN PRÉSENCE D'IGIV	47
4.3	STIMULATION DE LA NEUROGÉNÈSE ADULTE CHEZ LA SOURIS 3xTG-AD TRAITÉE AUX IGIV	49
4.4	CARACTÉRISATION DU PROTÉOME CÉRÉBRAL DE SOURIS TRAITÉES AUX IGIV	53
CHAPITRE 5	DISCUSSION	59
CHAPITRE 6	CONCLUSION	69
BIBLIOGRAPHIE	71

Liste des tableaux

Tableau 1 Outil diagnostique de la MA	4
Tableau 2 Modèles murins de la MA.....	18
Tableau 3 Essais cliniques d'immunothérapies dans la MA de 2011 à 2014.....	25
Tableau 4 Résultats obtenus en spectrométrie de masse.....	56
Tableau 5 Protéines d'intérêt sélectionnées.....	57

Liste des figures

Figure 1 Pathologie amyloïde et tau	9
Figure 2 La neurogénèse adulte.....	16
Figure 3 Mécanismes d'action potentiels des anticorps spécifiques au peptide amyloïde	26
Figure 4 Provenance et structure biochimique des IgIV	28
Figure 5 Distribution annuelle d'IgIV par Héma-Québec entre 1999 et 2012	32
Figure 6 Quantification de la pathologie amyloïde	44
Figure 7 Structure de la protéine tau.....	45
Figure 8 Quantification de la pathologie tau	46
Figure 9 Caractérisation de la microglie	48
Figure 10 Expression de la neurogénèse dans la ZSG.....	51
Figure 11 Représentation schématique du principe de l'électrophorèse 2D.....	53
Figure 12 Électrophorèse 2D d'homogénats de cerveaux.....	54
Figure 13 Confirmation des résultats en protéomique	58

Liste des abréviations

A β	Amyloïde- β
AICD	Domaine intracellulaire de l'APP
APOE	Apolipoprotéine E
APP	Protéine précurseur du peptide A β
ARN	Acide ribonucléique
BACE	Enzyme de clivage du site β de APP
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DCX	Doublecortine
DSM-V	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V</i>
GD	Gyrus denté
HP	Hippocampe
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgIV	Immunoglobulines intraveineuses
IgG	Immunoglobuline G
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
kDa	Kilodalton
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MA	Maladie d'Alzheimer
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
pl	Point isoélectrique
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PS1/2	Préséniline 1/2
RMS	<i>Rostral migratory stream</i>
SNC	Système nerveux central
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP	Température pièce
VL	Ventricule latéral
ZSG	Zone sous-granulaire
ZSV	Zone sous-ventriculaire

Remerciements

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de mon projet de recherche ainsi qu'à la réussite de ces deux années.

Je remercie mes directeurs de recherche, Renée Bazin et Frédéric Calon, pour leur grande expertise, leur rigueur et le temps qu'ils ont bien voulu me consacrer. Vous m'avez offert un environnement de travail unique qui m'a permis d'apprendre et de grandir tant au niveau scientifique que personnel.

Plusieurs de mes collègues sont devenus plus que des voisins de labo mais de précieux amis. Jennifer Lemieux, Marie-Eve Rhéaume, Dominique Chabot, Isabelle Paré, Corinne Nadeau-Larochelle, Lee-Ann Mckinnon et Patrick Trépanier, merci pour vos conseils et pour toutes ces discussions scientifiques ou plus ou moins scientifiques que nous avons eues. De partager avec vous les angoisses et les bonheurs que les études graduées procurent aura été un véritable plaisir.

Je ne peux passer sous silence le travail exceptionnel de tous les assistants de recherche d'Héma-Québec. Merci pour votre support technique et votre grande disponibilité.

Merci à mes proches. Plus particulièrement, Samuel, Anne et Audrée, qui sans réellement savoir ce que je faisais, ont su me supporter dans les bons comme dans les moins bons moments.

Merci à ma mère pour son amour inconditionnel. Tes encouragements constants et sincères m'ont beaucoup motivé.

Finalement, un merci tout particulier à Benoit pour sa patience et sa compréhension. Merci d'avoir cru en mes capacités, ton support a su me rendre la tâche beaucoup plus facile.

Chapitre 1 Introduction

1.1 La maladie d'Alzheimer

Le 4 novembre 1906, lors de la 37^e Conférence des psychiatres allemands à Tübingen, le neurologue Alois Alzheimer expose pour la première fois le cas particulier d'Auguste D., une femme de 51 ans présentant des troubles de la mémoire, des hallucinations et une désorientation importante. La femme, hospitalisée de 1901 jusqu'à son décès en 1906, souffrait manifestement, malgré son jeune âge, de démence. Le Dr Alzheimer rapporte, dans un article paru en 1907, que l'autopsie du cerveau de sa patiente présente plusieurs anomalies telles que la présence de fibrilles extracellulaires et d'amas intracellulaires ainsi qu'une atrophie corticale générale et des changements athérosclérotiques (Alzheimer, 1907). Il s'agit en fait de la toute première description des plaques amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires, deux marqueurs post-mortem de la maladie. En reconnaissance de l'importance de ses travaux sur la caractérisation de la maladie, son patron Emil Kraepelin suggère dans son livre *Psychiatrie* que cette condition soit nommée maladie d'Alzheimer (MA) (Krapelin, 1910).

1.1.1 Épidémiologie et manifestations cliniques

La MA, la forme de démence la plus commune, est une maladie neurodégénérative se caractérisant par un déclin progressif et irréversible des fonctions cognitives. Avec une population qui se fait vieillissante, le nombre de personnes atteintes de la MA augmente à un rythme inquiétant. On estime à 36

millions le nombre de personnes dans le monde souffrant de cette maladie, dont 500 000 canadiens et ce chiffre devrait tripler d'ici 2050 (World Alzheimer report, 2009, Mayeux & Stern, 2012). L'*Alzheimer Association* rapporte qu'en 2013, la prévalence chez les américains âgés de 65 ans et plus était de 11% (2013 Alzheimer's disease facts and figures). Ainsi, une personne sur neuf, âgée de 65 ans et plus, vit avec la maladie (2013 Alzheimer's disease facts and figures) et cette proportion grimpe à une personne sur trois après l'âge de 85 ans (Hebert et al., 2013).

La MA affecte plusieurs aspects cognitifs en débutant généralement par des atteintes de la mémoire. Au stade précoce, les patients éprouvent de la difficulté à acquérir de nouvelles informations et la capacité d'apprentissage est altérée (Weintraub et al., 2012). Plus la maladie progresse, plus la mémoire à long terme est affectée et plus les souvenirs s'effacent. Au-delà des troubles de la mémoire, la MA se caractérise également par une variété de désordres comportementaux, tels qu'une désorientation marquée dans le temps et l'espace, une perte de jugement et de raisonnement, des troubles de l'humeur et des déficits langagiers (Lyketsos et al., 2000, Teng et al., 2007). Ils diffèrent grandement d'une personne à l'autre mais s'intensifient généralement avec la progression de la maladie. Ces symptômes ont une incidence sérieuse sur la capacité des patients à maintenir leurs activités quotidiennes et conduisent souvent à leur prise en charge par le système de santé (Hort et al., 2010). Cela entraîne un fardeau économique mondial important, évalué à 604 milliards de dollars US en 2010 dans le monde (Wimo et al., 2013).

Le *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* ou DSM, édité par l'Association américaine de psychiatrie, est le manuel de référence pour

diagnostiquer les désordres psychiatriques (McKhann et al., 2011, Chertkow et al., 2013). Le trouble neurocognitif majeur, tel que défini dans la cinquième édition du DSM (DSM-V), est un syndrome qui peut être caractérisé par des déficits cognitifs multiples qui incluent des troubles de la mémoire et l'atteinte d'au moins un autre domaine cognitif, un déclin général par rapport aux aptitudes cognitives antérieures et une perturbation des activités de la vie quotidienne. Le diagnostic probable de la MA, porté à l'aide du DSM-V, repose sur l'identification clinique de ces déficits cognitifs (Tableau 1) et sur les données paracliniques fournies par des examens complémentaires (examens cliniques, neuropsychologiques et biologiques, imagerie, etc.).

Tableau 1 Outil diagnostique de la MA

- A. Apparition de déficits cognitifs multiples, comme en témoignent à la fois :
1. une altération de la mémoire (altération de la capacité à apprendre des informations nouvelles ou à se rappeler les informations apprises antérieurement) ;
 2. une (ou plusieurs) des perturbations cognitives suivantes :
 - a. aphasie (perturbation du langage)
 - b. apraxie (altération de la capacité à réaliser une activité motrice malgré des fonctions motrices intactes)
 - c. agnosie (impossibilité de reconnaître ou d'identifier des objets malgré des fonctions sensorielles intactes)
 - d. perturbation des fonctions exécutives (faire des projets, organiser, ordonner dans le temps, avoir une pensée abstraite).
- B. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 sont tous les deux à l'origine d'une altération significative du fonctionnement social ou professionnel et représentent un déclin significatif par rapport au niveau de fonctionnement antérieur.
- C. L'évolution est caractérisée par un début progressif et un déclin cognitif continu.
- D. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 ne sont pas dus :
1. à d'autres affections du système nerveux central qui peuvent entraîner des déficits progressifs de la mémoire et du fonctionnement cognitif (par exemple : maladie cérébro-vasculaire, maladie de Parkinson, maladie de Huntington, hématorne sous-dural, hydrocéphalie à pression normale, tumeur cérébrale) ;
 2. à des affections générales pouvant entraîner une démence (par exemple : hypothyroïdie, carence en vitamine B12 ou en folates, pellagre, hypercalcémie, neurosyphilis, infection par le VIH) ;
 3. à des affections induites par une substance.
- E. Les déficits ne surviennent pas de façon exclusive au cours de l'évolution d'un syndrome confusionnel.
- F. La perturbation n'est pas mieux expliquée par un trouble de l'Axe I (par exemple : trouble dépressif majeur, schizophrénie).

Source : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V

Les patients ne survivent généralement que quatre à huit ans suivant le diagnostic posé en clinique (Helzner et al., 2008, Xie et al., 2008). Actuellement, ce diagnostic arrive tardivement dans l'évolution de la maladie, parfois jusqu'à dix ans après les premiers dommages dans le cerveau, ce qui limite grandement les interventions thérapeutiques possibles (Morris et al., 2009, Mintun et al., 2010).

1.1.2 Étiologie

La MA se présente sous deux formes, soit la forme familiale et la forme sporadique. Moins de 1% des cas sont attribuables à la forme familiale qui se manifeste plus précocement et qui est causée par des mutations dans les gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* (Goate et al., 1991, Levy-Lahad et al., 1995, Sherrington et al., 1995, 1996). Jusqu'à maintenant, 33 mutations dans 90 familles ont été détectées pour le gène *APP*, 185 mutations dans 405 familles ont été identifiées dans le cas de *PSEN1* et 13 mutations dans 22 familles ont été recensées pour *PSEN2* (www.molgen.vib-ua.be/ADMutations). Ces mutations, la plupart à haute pénétrance et héritées de façon autosomale dominante, mènent à une augmentation anormale de la quantité de peptides amyloïdes-bêta (A β) dans le cerveau, particulièrement dans sa forme à 42 acides aminés (Kumar-Singh et al., 2006, Bertram et al., 2009). La vaste majorité des patients est quant à elle atteinte de la forme sporadique de la maladie qui représente 99% de tous les cas et qui se manifeste de façon tardive, habituellement après l'âge de 65 ans. Malgré les progrès énormes dans la compréhension de cette maladie ces vingt dernières années, les causes exactes restent toujours inconnues.

1.1.2.1 Facteurs de risques

Âge

Bien que cela puisse sembler trivial, l'âge constitue le principal facteur de risque de la MA. L'incidence annuelle de la maladie augmente dramatiquement avec l'âge, passant de 53 nouveaux cas diagnostiqués par tranche de 1000 personnes à l'âge de 65 ans aux États-Unis, à 170 nouveaux cas entre l'âge de 75 et 84 ans, à 231

nouveaux cas à l'âge de 85 ans ou plus (Hebert et al., 2001). À partir de l'âge de 65 ans, l'incidence de la maladie double à tous les cinq ans (Corrada et al., 2008).

Génétique

Des efforts considérables ont été déployés au cours des dernières années afin d'identifier et de mieux comprendre l'implication de différents facteurs de risque ou de mutations génétiques dans la forme sporadique de la MA. La présence de l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE*, lequel code pour une protéine jouant un rôle crucial dans le transport du cholestérol, constitue un important facteur de risque génétique (Corder et al., 1993). La fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ dans la population générale est de 15% alors que chez les patients souffrant de la MA elle est de 40% (Farrer et al., 1997). Les individus portant un allèle $\epsilon 4$ sont donc de trois à quatre fois plus susceptibles de développer la MA (Bertram et al., 2008). Cet allèle, découvert en 1993 par Strittmatter et ses collègues, contribue à la pathologie de la MA, d'une part en modulant le métabolisme et l'agrégation du peptide $A\beta$ et, d'autre part, en régulant directement le métabolisme des lipides au cerveau et les fonctions synaptiques via les récepteurs *APOE* (Strittmatter et al., 1993, Deane et al., 2004, Belinson et al., 2008). Par ailleurs, de vastes études d'association pangénomique (GWAS) ont permis d'identifier au moins 10 loci jouant un rôle dans le développement de la MA. Ainsi, une variation dans les gènes *ABCA7*, *BIN1*, *CD2AP*, *CD33*, *CLU*, *CR1*, *MS4A4E*, *MS4A6A*, *PICALM* ou *TREM2* constituerait un facteur de risque pour la MA (www.alzgene.org, Harold et al., 2009, Lambert et al., 2009, Hollingworth et al., 2011, Jonsson et al., 2013). Il est intéressant de noter que plusieurs de ces gènes (*CD33*, *CR1*, *CLU*, *MS4AE4/6A* et *TREM2*) sont impliqués au niveau du système immunitaire et de l'inflammation (Jones et al., 2010, Guerreiro et al., 2013).

Autres

Des études épidémiologiques ont permis d'identifier plusieurs facteurs de risques non-génétiques. Ainsi, les études sur l'impact du diabète dans le développement de la MA ont permis d'établir un lien entre l'intolérance au glucose et l'incidence de la MA (Ahtiluoto et al., 2010, Cheng et Christmas, 2011). Les personnes ayant un diagnostic de diabète de type 2 courent de 1,5 à 2 fois plus le risque de développer la MA (Strachan et al., 2011) et 80% des patients atteints de la MA souffrent également de diabète (Janson et al., 2004). Par ailleurs, plusieurs études suggèrent qu'un indice de masse corporelle (IMC) élevé en milieu de vie est associé à un déclin des fonctions cognitives (Dahl et al., 2010; Hassing et al., 2010). De plus, la pratique d'une activité physique régulière est associée à une diminution du risque de développer la MA et à une prolongation de la survie des patients atteints de la maladie (Lindsay et al., 2002, Scarmeas et al., 2011). Certaines habitudes alimentaires ont également une influence sur la MA. Ainsi, un apport alimentaire riche en calories provenant de gras saturés aurait pour effet d'augmenter le risque de développer une déficience cognitive et la MA (Pedrini et al., 2009, Panott et Greenwood, 2007). Inversement, des effets neuroprotecteurs ont été attribués aux acides gras polyinsaturés de type oméga-3 (Calon et Cole, 2007, Cole et al., 2010). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que les désordres métaboliques et l'alimentation ont un rôle dans le développement de la MA et ajoutent une raison de plus pour soutenir les efforts actuels de sensibilisation à de saines habitudes de vie par la promotion de l'activité physique et d'une alimentation équilibrée.

1.1.3 Physiopathologie

La description faite, en 1907, par le neurologue Alzheimer d'une signature histopathologique particulière dans le cerveau d'une patiente a permis de caractériser pour la toute première fois la maladie de façon *post-mortem*. Encore aujourd'hui, la pathologie est définie par deux types de lésions, soit une accumulation anormale de peptides A β dans le cerveau qui forment les plaques amyloïdes et une conversion de la protéine tau soluble en une forme insoluble hyperphosphorylée qui donne naissance aux enchevêtrements neurofibrillaires (Hyman et al., 2013). À cela viennent s'ajouter d'autres anomalies telles qu'une inflammation importante au cerveau, des déficits synaptiques et une atrophie corticale (Querfurth & LaFerla, 2010).

1.1.3.1 Plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes sont localisées principalement dans l'hippocampe et dans les régions corticales (Gouras et al., 2000). Ces plaques se développent suite à l'agrégation d'un peptide de 36 à 43 acides aminés, appelé A β , issu du clivage successif de la protéine transmembranaire précurseur du peptide A β (APP), située sur le chromosome 21, par les enzymes β et γ -sécrétase (Selkoe, 1998, Evin et Weidemann, 2002, Haass et al., 2012) (Figure 1). Le peptide A β 1-40 est la forme la plus abondante alors que le peptide A β 1-42, plus hydrophobe, compose majoritairement les plaques amyloïdes (Jarrett et al., 1993, Iwatsubo et al., 1994). La formation de ces plaques débute par un changement de conformation du peptide A β , passant d'hélice alpha à feuillet bêta. La présence de ce feuillet bêta dans la structure du monomère faciliterait sa polymérisation en courts oligomères solubles. Ces derniers s'assembleraient pour former de larges fibrilles insolubles qui se déposeraient ensuite sous forme de plaques amyloïdes dans le cerveau

(Sandberg et al., 2010, Lee et al., 2011). L'accumulation anormale du peptide A β dans le cerveau peut être le résultat d'un déséquilibre entre le niveau de production et de clairance du peptide A β (Mawuenyega et al., 2010, Saido & Leissring, 2012).

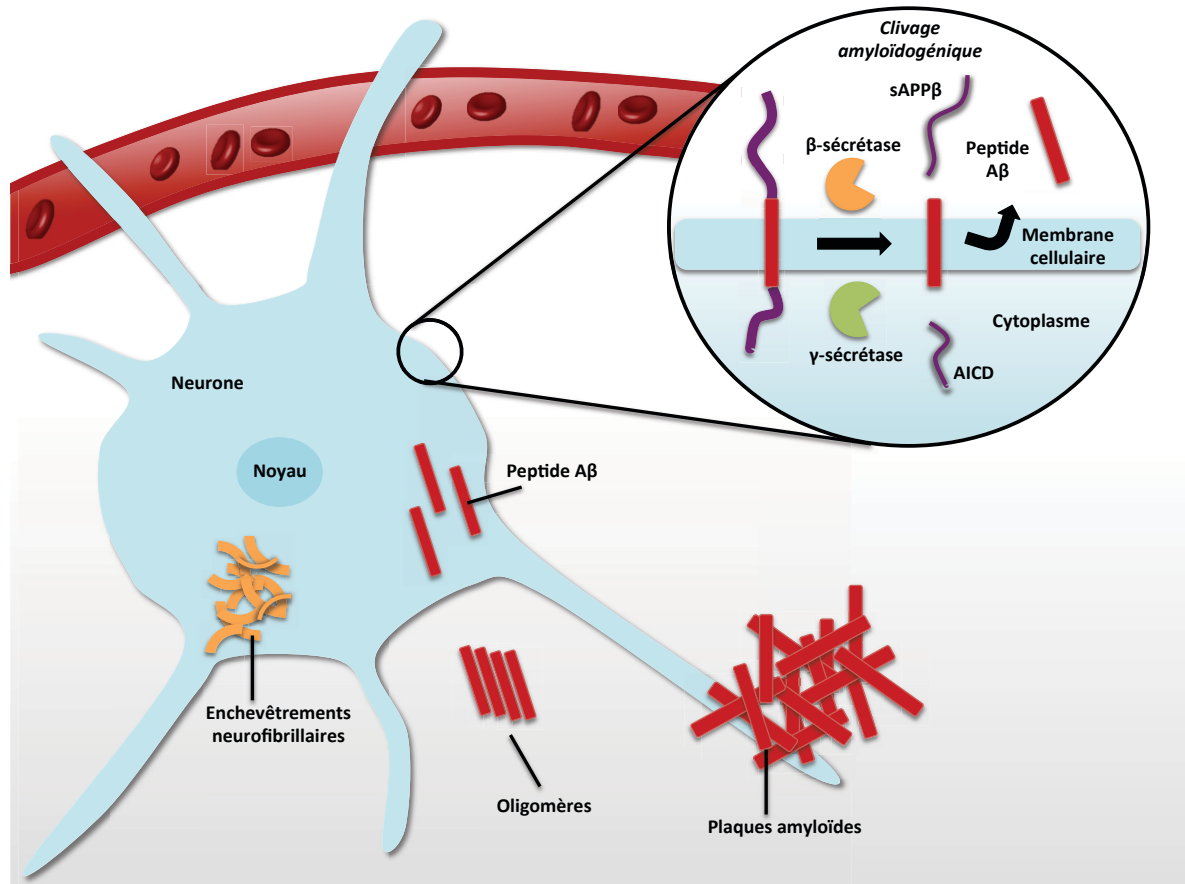


Figure 1 Pathologie amyloïde et tau

Le clivage par les enzymes β et γ -sécrétase à l'intérieur de la séquence du peptide A β initie le métabolisme de la voie amyloïdogénique. Le fragment sAPP β est libéré dans l'espace extracellulaire tandis que le fragment AICD est translocalisé au noyau et module l'expression de plusieurs gènes comme GSK36, p53 et la néprilysin.

Parmi les nombreux facteurs impliqués dans la MA, l'agent toxique dominant semble être le peptide A β (Hardy et al., 2009, Mohamed et al., 2011). Cette théorie est appuyée par plusieurs observations. D'abord, la surexpression de la protéine

APP chez les gens souffrant de trisomie 21 entraîne le développement précoce d'une neuropathologie similaire à la MA (Sanchez et al., 2011). Ensuite, les mutations causant la forme familiale de la maladie ont été identifiées dans le gène *APP* ainsi que dans une enzyme responsable de son clivage. L'hypothèse de la cascade amyloïde vient structurer ces observations. Formulée par Hardy et Higgins en 1992, elle suggère que le déséquilibre entre la production et l'élimination du peptide A β mène à l'accumulation de celui-ci dans le cerveau sous forme de plaques et que ce phénomène constitue l'évènement central à l'origine de la MA (Hardy & Higgins, 1992). Cette hypothèse a été légèrement modifiée au fil des années en raison d'une corrélation imparfaite entre la perte de capacités cognitives et l'abondance des plaques amyloïdes (Price et al., 2009, Savva et al., 2009). En effet, chez plusieurs modèles murins transgéniques APP, la perte neuronale et les déficits cognitifs surviennent avant la formation de plaques amyloïdes (Mucke et al., 2000, Cheng et al., 2007). Des recherches récentes soutiennent que la neurotoxicité ne serait pas attribuable aux plaques amyloïdes directement comme le pensaient Hardy et Higgins, mais serait plutôt due au peptide A β sous sa forme oligomérique soluble (Glabe et al., 2006, Noguchi et al., 2009, Benilova et al., 2012). D'ailleurs, le niveau d'oligomères dans cortex frontal de patients souffrant de la MA s'est révélé être 70 fois plus élevé que chez des individus sains (Gong et al., 2003). En assumant que la neurotoxicité se mesure en terme de mort neuronale et de perte synaptique, une vaste gamme d'oligomères a été identifiée comme neurotoxique (Bitan et al., 2003, Cleary, 2005, Lashuel et al., 2006). Ainsi, plusieurs études, menées dans différents modèles animaux ainsi que chez des patients atteints de la MA, ont montré que les déficits mémoires sont causés par la présence d'oligomères d'A β dans le cerveau (Lesné et al., 2006, Oddo et al., 2006, Cheng et al., 2007, Shankar et al., 2008). Les synapses et plus particulièrement les compartiments post-synaptiques seraient les principales cibles

de la toxicité d'A β (Selkoe, 2002). En effet, on rapporte que les oligomères d'A β induisent une diminution de la densité d'épines dendritiques, altèrent la plasticité synaptique et interfèrent avec la mémoire (Klyubin et al., 2008, Shankar et al., 2006). Cependant, les mécanismes d'action exacts par lesquels les oligomères d'A β causent des déficits synaptiques ne sont encore que partiellement connus (Benilova et al., 2012).

1.1.3.2 Enchevêtrements neurofibrillaires

La protéine tau est associée à plusieurs maladies neurodégénératives appelées taupathies (Iqbal et al., 2005). Le gène *tau* est situé sur le chromosome 17 et son ARN messager est épissé de façon alternative pour former six isoformes différents contenant tous un domaine liant les microtubules et 85 sites de phosphorylation (Hanger et al., 2007). La protéine aurait entre autres comme fonction de stabiliser les axones via sa liaison à la tubuline, principale composante des microtubules (Hanger et al., 2009) et de participer à la neurotransmission en régulant la distribution de molécules de signalisation synaptiques à l'intérieur des neurones (Morris et al., 2011). En condition pathologique, la protéine tau est hyperphosphorylée (10 moles de phosphate/molécule ou plus) ce qui diminue drastiquement son affinité pour les microtubules (Bramblett et al., 1993, Alonso et Martinez, 2004) et entraîne son dépôt dans le cytosol des neurones affectés sous forme de fibrilles. Cette accumulation serait particulièrement marquée dans les dendrites et interférerait avec la transmission neuronale (Hoover et al., 2010).

Chez les patients souffrant de la MA, l'apparition ainsi que la localisation de la pathologie tau dans le cerveau suit un patron relativement similaire. Elle apparaît

d'abord dans le cortex entorhinal et transentorhinal puis se propage vers l'hippocampe et l'isocortex (Braak & Braak, 1995). Les mécanismes d'action exacts par lesquels ce déplacement s'opèrerait ne sont que partiellement connus. L'équipe du Dr Duff a montré que la pathologie tau initiée dans le cortex entorhinal diffuserait vers d'autres zones d'un neurone à l'autre le long des circuits synaptiques (Liu et al., 2012). L'analyse de la pathologie tau chez les patients diagnostiqués avec la MA révèle une corrélation significative avec le déclin cognitif et les symptômes cliniques (Tremblay et al., 2007, Savva et al., 2009, Nelson et al., 2012).

La compréhension de la pathologie Alzheimer est encore aujourd'hui limitée. La relation entre les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires a donné lieu, au fil du temps, à de nombreux débats dans la communauté scientifique. L'hypothèse qui supporte le mieux les connaissances actuelles stipule que l'accumulation du peptide A β précèderait la pathologie tau et favoriserait son apparition (Gotz et al., 2001, Oddo et al., 2003, King et al., 2006).

1.1.4 Aspects neuroimmunologiques de la MA

L'immunité innée est traditionnellement reconnue comme la toute première ligne de défense de l'organisme. Il a été établi, au début des années 2000, que l'immunité innée est non seulement sollicitée en contexte d'infection, mais également lors de stress et de dommages cellulaires (Shi et al., 2003, Seong et Matzinger, 2004). La réponse immune passe par la création d'un milieu hostile nécessaire mais qui peut se révéler dangereux pour les cellules environnantes de l'hôte.

Supportant difficilement les conséquences d'une réponse immunitaire agressive, le cerveau est un organe qui bénéficie d'un environnement immunologiquement privilégié. Ainsi, la barrière hémato-encéphalique (BHE) sépare physiquement le cerveau du reste de l'organisme. Les cellules endothéliales qui constituent la BHE présentent des caractéristiques particulières : elles sont unies les unes aux autres par des jonctions serrées étanches, elles possèdent une activité de pinocytose presque nulle et n'expriment que peu de molécules d'adhérence à l'état basal (Bailey et al., 2006). Cette structure préserve ainsi l'homéostasie du système nerveux central (SNC) nécessaire à une activité neuronale coordonnée et adéquate. De ce fait, il n'existe qu'une très faible infiltration leucocytaire au sein du SNC sain. Les principales cellules effectrices de l'immunité innée du SNC sont les cellules microgliales, des macrophages résidents du cerveau d'origine myéloïde (Gehrmann et al., 1995). La microglie assure une surveillance immunitaire dynamique et participe à la maintenance tissulaire du parenchyme cérébral.

Les dommages tissulaires causés par les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires stimulent une réponse inflammatoire chronique dans le cerveau des patients souffrants de la MA. Ce phénomène peut être observé par le recrutement en quelques jours de cellules microgliales aux alentours de plaques amyloïdes nouvellement formées (Meyer-Luehmann et al. 2008, Yan et al. 2009). Ces dépôts inertes de protéines anormales activent la microglie ce qui induit un changement de phénotype fonctionnel permettant la phagocytose des débris. L'internalisation de peptides A β ainsi que leur présence dans les lysosomes de la microglie ont été observées (Bolmont et al., 2008). L'activation chronique de la microglie enclenche une cascade d'évènements pro-inflammatoires qui convergent vers la transcription d'une variété de gènes

inflammatoires codant pour des molécules telles que des cytokines, des chimiokines, des molécules du complément et des molécules d'adhésion (Rogers et al., 2007). Ainsi, certains modèles murins de la MA (Tg2576, APP^{swe}/PS1^{dE9}), tout comme les patients diagnostiqués avec la MA, affichent un niveau accru d'interféron (IFN)- γ , de *tumor necrosis factor* (TNF)- α , d'interleukine (IL)-1 β et -6 (Wyss-Coray, 2006, Heneka et al., 2007).

1.1.5 Neurogénèse

1.1.5.1 Généralités

Jusqu'à la fin du 20^e siècle, le cerveau était considéré comme un organe dépourvu de capacité régénératrice. Joseph Altman fut le premier scientifique à mettre en lumière l'existence d'une prolifération neuronale dans le cerveau de rats (Altman, 1962, 1965) Toutefois, il aura fallu attendre en 1992 les travaux de Gage et ses collaborateurs chez l'humain pour s'en convaincre (Gage et al., 1992). La neurogénèse chez le mammifère adulte se limite à deux régions cérébrales, soit la zone sous-ventriculaire (ZSV), située sous les parois des ventricules latéraux, et la zone sous-granulaire (ZSG), localisée dans le gyrus denté de l'hippocampe (Figure 2). Ces niches germinatives abritent des cellules souches qui se divisent de façon asymétrique pour donner, d'une part, une nouvelle cellule souche et, d'autre part, une cellule progénitrice, vouée à se différencier en neuroblaste. Les neuroblastes produits dans la ZSV migrent vers le bulbe olfactif en empruntant le courant rostral de migration, tandis que ceux produits dans la ZSG migrent vers la région CA1 de l'hippocampe (Ma et al., 2009a). Une fois parvenu à destination, le neuroblaste se différencie en neurone fonctionnel, capable de propager un potentiel d'action, de

former des synapses et de s'intégrer dans une voie neuronale pré-existante (Van Praag et al., 2002). Les neurones immatures vont exprimer une variété de facteurs en fonction de leur stade de développement (Figure 2). L'expression de DCX et PSA-NCAM exclusivement dans les neurones nouvellement formés en font des marqueurs de neurogénèse idéaux (Couillard-Despres et al., 2005). Spalding et al. ont montré que, chez l'humain, près de 700 nouveaux neurones sont générés par jour dans l'hippocampe, ce qui correspond à un taux de renouvellement annuel de 1,75% (Spalding et al., 2013). Bien que les implications fonctionnelles précises de la neurogénèse font toujours l'objet d'intenses recherches, il est devenu de plus en plus évident qu'elle contribue aux fonctions cognitives. En effet, plusieurs études utilisant l'irradiation ou la modification génétique pour atténuer la neurogénèse chez des rongeurs ont montré une diminution de la capacité d'apprentissage et un déficit de la mémoire spatiale et de travail (Snyder et al., 2005, Winocur et al., 2006, Deng et al., 2010).

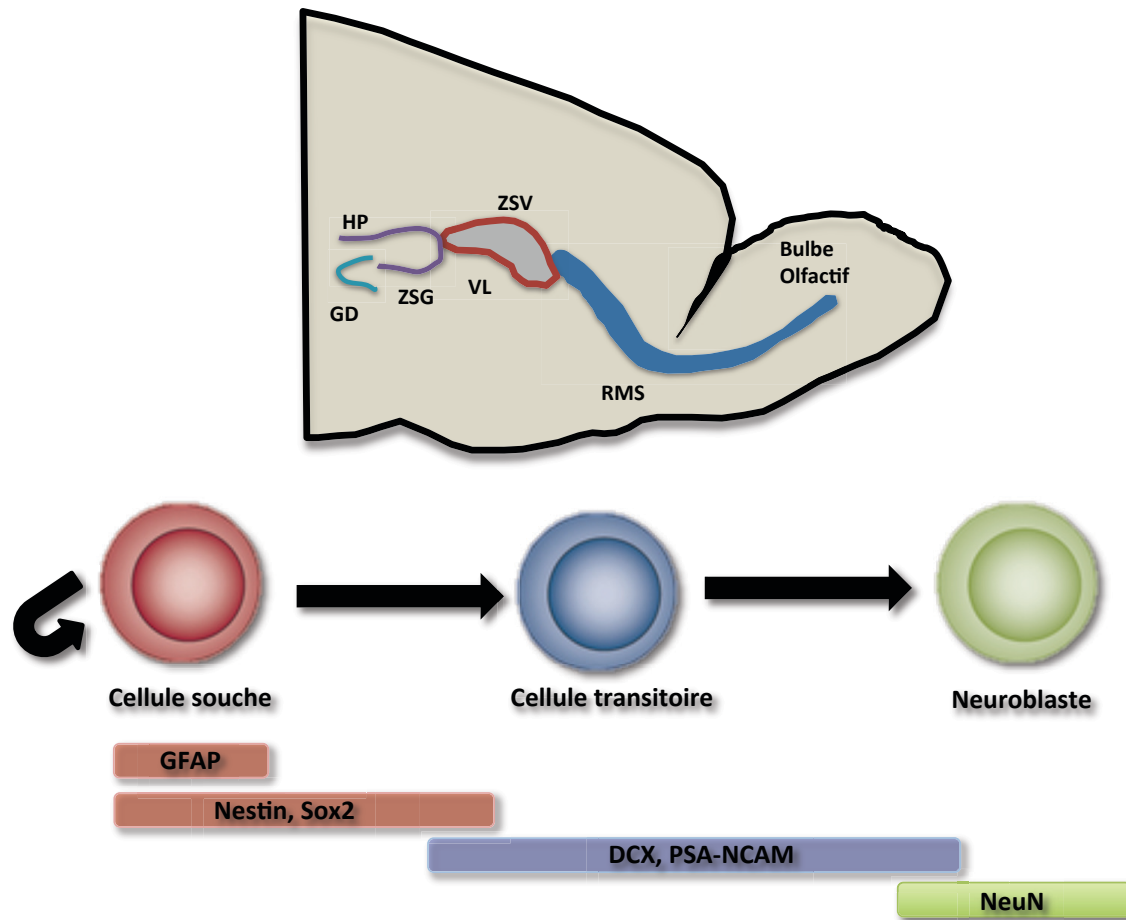


Figure 2 La neurogénèse adulte

Représentation de la structure du cerveau murin en coupe horizontale. La prolifération dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) a lieu dans la paroi interne du ventricule latéral (VL), où les cellules souches se divisent pour générer les cellules transitoires, qui, à leur tour, donnent naissance à des neuroblastes qui vont voyager via le courant de migration rostrale (RMS) vers leur destination finale dans le bulbe olfactif. La prolifération dans la zone sous-granulaire (ZSG) s'opère dans le gyrus dentelé (GD) et les neuroblastes produits vont, quant à eux, coloniser l'hippocampe (HP). Différents facteurs sont exprimés successivement par les cellules tout au long de leur différentiation. Abréviations : DCX : doublecortine, GFAP : Glial fibrillary acidic protein NeuN : Neuronal Nuclei PSA-NCAM : polysialic acid-neuronal cell adhesion molecule

1.1.5.2 Neurogénèse et MA

Au cours des dernières années, un nombre important d'études ont mis en évidence une altération marquée de la neurogénèse adulte chez différents modèles transgéniques de la MA. En raison de la diversité des paramètres expérimentaux utilisés d'une étude à l'autre, il existe des divergences importantes dans la littérature. Une minorité d'études menées dans des modèles animaux (PS1(A246E), J20, SAMP8) supportent une augmentation du nombre de nouveaux neurones (Chevalier et al., 2005, Lopez et al., 2007, Gang et al., 2011) alors que la vaste majorité des études (PS1(M146V), 3xTg-AD, APP^{swe}/PS1^{dE9}) rapportent une diminution de la neurogénèse (Choi et al., 2008, Blanchard et al., 2010, Demars et al., 2010, Faure et al., 2011, Hamilton et al., 2012, Shruster et Offen, 2014). Des résultats contradictoires sont également observés chez les patients souffrant de la MA. Jin et al. ont observé, chez 14 patients, une augmentation de l'expression de doublecortine (DCX), TUC-4 et PSA-NCAM, des marqueurs de neurogénèse indiquant la présence de neurones immatures nouvellement formés (Jin et al., 2004). Suite à ces travaux, il a été proposé que la neurogénèse agirait à titre de mécanisme compensatoire visant à remplacer les neurones perdus au cours de la maladie. Au contraire, d'autres études montrent plutôt une diminution des cellules progénitrices dans la ZSV, soutenant l'hypothèse que la baisse de la neurogénèse contribuerait aux déficits cognitifs observés dans la MA (Ziabreva et al., 2006, Crews et al., 2010). D'ailleurs, la stimulation de la neurogénèse permettrait d'atténuer les déficits cognitifs chez la souris transgénique (Chadwick et al., 2011, Shruster et Offen, 2014).

1.2 Les modèles murins de la MA

Les modèles murins de la MA ont un rôle essentiel à jouer à la fois dans notre compréhension de la pathogenèse mais aussi dans le développement et la validation de différentes stratégies thérapeutiques. La MA est une maladie complexe qui se manifeste par une variété de désordres et pour laquelle les causes exactes, sans doute multiples, demeurent encore à ce jour méconnues. Par conséquent, l'élaboration d'un modèle animal mimant fidèlement la maladie représente un défi de taille. Les souris transgéniques actuellement disponibles développent des caractéristiques neuropathologiques retrouvées dans la MA, telles une accumulation du peptide A β , une perte neuronale, une pathologie tau et/ou des troubles cognitifs. Cependant, aucun modèle n'est en mesure jusqu'à maintenant de récapituler simultanément à lui seul l'ensemble des aspects de la maladie. Une brève description des principaux modèles utilisés en recherche se trouve dans le Tableau 2.

Tableau 2 Modèles murins de la MA

Souris	Génotype	Promoteur	Plaques amyloïdes	Enchevêtrements neurofibrillaires	Neuroinflammation	Perte neuronale	Déficits cognitifs
APP/PS1 Borchelt et al. 1997 Dolansur et al. 2006 Ferguson et al. 2013	APP ^{swe} (K595N/M596L) PS1(A246E)	-	X		X		X
APP23 Sturchler-Pierrat et al. 1997	APP ^{swe} (K670N/M671L)	Thy1	X		X		
Tg2576 Hsiao et al. 1996	APP ^{swe} (K670N/M671L)	HCMV	X		X		
PDAPP Games et al. 1995	APP770 (V717F)	PDGF- β	X				
3xTgAD Oddo et al. 2003	APP ^{swe} (K670N/M671L) tau (P301L) PS1(M146V)	Thy1.2	X	X	X		X
5xFAD Oakley et al. 2006 Grand et al. 2013	APP ^{swe} (K670N/M671L) APP (I716V) APP(V717I) PS1(M146L/L286V)	Thy1	X		X		X

Actuellement, le modèle murin triple transgénique 3xTg-AD s'impose comme modèle de référence (Bilkei-Gorzo, 2013). Dans le but de se rapprocher le plus possible de la neuropathologie humaine, Oddo et ses collaborateurs ont choisi de co-injecter deux transgènes humains soit APPswedish et tau (P301L), tous deux sous le contrôle du promoteur Thy1.2, dans une souris PS1(M146V) knock in (Oddo et al., 2003a). Bien qu'il n'ait jamais été démontré qu'une mutation de tau soit impliquée dans la MA, l'ajout de ce transgène permet d'obtenir un modèle murin triple transgénique présentant à la fois des plaques amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires. Il s'agit du seul modèle murin présentement disponible arborant simultanément les deux pathologies. La souris 3xTg-AD présente aussi d'autres caractéristiques majeures associées à la MA comme les troubles cognitifs, la neuroinflammation, la réduction du volume vasculaire, la baisse de neurogénèse et les déficits synaptiques (Oddo et al., 2003, Bourasset et al., 2009, Hamilton et al., 2010, Filali et al., 2012, Bories et al., 2012).

1.3 Les avenues thérapeutiques

Avec une incidence qui augmente de façon vertigineuse, la MA représente un enjeu économique et social important mais aussi un défi thérapeutique majeur. L'absence de marqueurs biologiques fiables et spécifiques ainsi que l'ignorance des causes menant à l'initiation de la dégénérescence constituent des obstacles majeurs à la découverte de traitements efficaces.

1.3.1 Traitements pharmacologiques actuels

Jusqu'à maintenant, peu de médicaments sont offerts aux personnes souffrant de la MA. Les traitements actuellement disponibles pour les stades modéré à sévère de la MA comprennent essentiellement deux classes de médicaments. Les systèmes de neurotransmetteurs basés sur l'acétylcholine et le glutamate sont particulièrement perturbés lors de la MA. L'acétylcholine est un neurotransmetteur excitateur synthétisé à partir de la choline, libéré dans la fente synaptique puis hydrolysé par une enzyme, l'acétylcholinestérase, située dans la membrane post-synaptique (Scarpini et al., 2003). Un trouble de la neurotransmission cholinergique causé par une carence en acétylcholine est observé chez les patients atteints de MA (Arendt et al., 1992, Mesulam, 2013). Ainsi, la première classe inclut les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase comme le donepezil (Aricept®; Pfizer), la galantamine (Razadyne®; Johnson & Johnson) et la rivastigmine (Exelon®; Novartis) qui permettent de pallier le dysfonctionnement des neurones cholinergiques observé dans la pathologie. En inhibant la digestion enzymatique, la concentration et la durée d'action de l'acétylcholine dans la fente synaptique sont augmentées, rendant meilleure l'activation des récepteurs cholinergiques (muscariniques et nicotiniques). Bien que limitée, l'efficacité de ces médicaments sur les symptômes cognitifs et les troubles de l'humeur a été démontrée (Aisen et al., 2012; Gauthier et al., 2012). Les récepteurs NMDA, activés par le glutamate, permettent l'influx des ions calcium dans la cellule. Toutefois, l'hyperactivation de ces récepteurs entraîne un processus dégénératif aboutissant à l'apoptose (Lipton, 2006). La deuxième classe comprend donc les antagonistes de récepteurs NMDA comme la mémantine (Namenda®; Forest) qui empêche la fixation du glutamate sur son récepteur, inhibant ainsi son effet excitotoxique délétère pour le neurone post-synaptique. La mémantine améliore modestement les performances cognitives des patients (Gauthier et al., 2008, Hellweg et al., 2012, Wilkinson et al., 2014) 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). Toutefois, ces médicaments n'exercent qu'un effet symptomatique dont bénéficient une minorité de patients traités. Aucun traitement disponible n'est en mesure de ralentir la progression de la maladie.

1.3.2 Immunothérapie

Vu l'importance du rôle joué par le peptide A β dans le développement de la MA, son élimination constitue une voie thérapeutique de choix. Les récents succès de l'immunothérapie dans le domaine du cancer ainsi que l'absence de molécule pharmacologique efficace pour le traitement de la MA, font en sorte que l'immunothérapie contre le peptide A β est actuellement l'un des meilleurs espoirs thérapeutiques.

1.3.2.1 Immunisation active

L'immunisation active consiste à injecter un antigène chez le patient dans le but que celui-ci développe une réponse immunitaire débouchant sur la production d'anticorps spécifiques. Ainsi, en 1999, Schenk et al. ont rapporté que l'immunisation active répétée avec le peptide A β chez la souris transgénique APP/PS1 a permis une réduction des niveaux d'A β dans le cerveau et une amélioration des fonctions cognitives (Schenk et al., 1999). Depuis, ces résultats ont été reproduits dans plusieurs modèles murins (Janus et al., 2000, Morgan et al., 2000, Dodart et al., 2002, Maier et al., 2006). Chez l'homme, une première étude clinique de phase IIa dans laquelle des patients atteints de la MA ont reçu le

vaccin AN-1792 (Elan/Wyeth), un peptide A β 42 synthétique combiné à l'adjuvant QS-21, a été mise sur pied en 2001. Les patients ont reçu de une à trois doses du vaccin et 19% ont produit des anticorps contre le peptide A β . Toutefois, l'étude a été interrompue un an plus tard lorsque quatre participants ont développé des effets secondaires sévères (Orgogozo et al., 2003, Gilman et al., 2005). Au total, 6% des 298 patients traités ont souffert de méningo-encéphalite. L'immunisation aurait induit une réponse auto-immune puissante contre le peptide A β endogène entraînant l'infiltration de lymphocytes T CD4+ dans le cerveau (Nicoll et al., 2003). Enfin, malgré la diminution du niveau d'A β 1-42 au cerveau chez 82% des patients, l'analyse des performances cognitives n'a pas permis de conclure à une diminution de la progression de la maladie chez les patients ayant reçu le vaccin (Holmes et al., 2008, Zotova et al., 2013). Quelques années plus tard, les scientifiques ont mis au point des vaccins de seconde génération. Ainsi, puisque l'épitope activant les T CD4+ est situé dans la portion C-terminale d'A β , ces nouveaux vaccins sont constitués uniquement de la portion N-terminale du peptide. Pfizer teste actuellement en étude clinique de phase II le vaccin ACC-001 (Ryan et Grundman, 2009). Un autre vaccin, le CAD106, développé par Novartis Pharmaceuticals et constitué de plusieurs copies du fragment A β 1-6, s'est montré sécuritaire et bien toléré en phase I (Winblad et al., 2012, Kingwell, 2012). Une étude clinique de phase II vérifiant son efficacité s'est terminée en 2012 et les résultats seront connus prochainement.

1.3.2.2 Immunisation passive

L'immunisation passive, jugée moins risquée et mieux contrôlable que l'immunisation active, consiste à injecter par voie intraveineuse des anticorps

monoclonaux spécifiques à A β afin de capturer et éliminer le peptide. *In vitro*, les anti-A β ont la capacité non seulement d'inhiber la cytotoxicité des agrégats d'A β mais également de les dissoudre (Solomon et al., 1997). *In vivo*, plusieurs études précliniques menées dans différents modèles murins de la MA ont montré que l'injection d'anti-A β permet de réduire la charge cérébrale d'A β ainsi que d'améliorer certaines fonctions cognitives (Bard et al., 2000, DeMattos et al., 2001, Kotilinek et al., 2002, Lombardo et al., 2003, Wilcock et al., 2004, Asami-Odaka et al., 2005, Lee et al., 2006). Toutefois, l'immunisation passive chez la souris induit certains effets secondaires sérieux comme l'apparition de microhémorragies (Wilcock et al., 2004, 2009, Li et al., 2012).

Chez l'humain, plusieurs études cliniques de phase I/II/III ont déjà été réalisées avec une demi-douzaine de formulations différentes et cinq sont toujours en cours (Tableau 3). Le Bapineuzumab (Pfizer, Johnson & Johnson) a été le premier anticorps à être utilisé en immunothérapie passive chez les patients souffrant de la MA. Il s'agit d'une version humanisée de l'anticorps murin 3D6 spécifique au fragment N-terminal d'A β (A β 1-5) qui possède une mutation dans la région Fc réduisant l'activation des fonctions effectrices du système immunitaire. Lors d'une première étude clinique de phase II, 124 patients diagnostiqués avec la MA ont été traités à toutes les 13 semaines sur une période de 18 mois avec le Bapineuzumab. Aucune amélioration significative des fonctions cognitives n'a été rapportée. De plus, 12 des 124 patients ont développé un œdème cérébral vasogénique (Salloway et al., 2009). Dans une plus petite étude réalisée au Royaume-Uni et en Finlande, une réduction significative des dépôts d'A β a été mesurée par imagerie chez les patients après 78 semaines de traitement (Rinne et al., 2010). Deux autres études cliniques de phase III ont débuté en 2007 auprès de 2452 patients diagnostiqués au stade léger à modéré de la maladie

(NCT00575055, NTC00574132). Une des deux études comprenait uniquement des patients porteurs de l'allèle ApoE ϵ 4. Malheureusement, les résultats n'ont montré aucun bénéfice cognitif ou fonctionnel et ont entraîné l'abandon des autres essais en cours (Salloway et al., 2014).

Le solanezumab (Eli Lilly & Co.), un anticorps monoclonal humanisé ciblant une région centrale du peptide A β (A β 13-28), offre plusieurs avantages comparativement à son concurrent, le Bapineuzumab. D'abord, le solanezumab reconnaît spécifiquement la forme monomérique soluble du peptide A β alors que le bapineuzumab se lie aux plaques amyloïdes (Seubert et al., 2008). De plus, contrairement au bapineuzumab, aucun oedème cérébral vasogénique n'a été rapporté (Siemers et al., 2008, 2010). Deux études cliniques de phase III, appelées EXPEDITION-1 ET -2, ont été menées chez 2052 patients diagnostiqués au stade léger à modéré de la maladie sur une période de 80 semaines (NTC00905372, NTC00904683). L'analyse des résultats ne révèle aucune amélioration cognitive ou fonctionnelle (Doody et al., 2014). Toutefois, lorsque les résultats des deux études cliniques sont combinés, on constate un ralentissement de 34% du déclin cognitif et une amélioration des fonctions exécutives chez un sous-groupe de patients, soit ceux qui sont au stade léger de la maladie (Doody, 2012, Tayeb et al., 2013). L'an dernier, Eli Lilly & Co. a démarré l'étude EXPEDITION 3, comprenant uniquement des patients à un stade léger (n=2100) afin de confirmer les résultats obtenus précédemment (NTC01900665). En parallèle, le Solanezumab a été sélectionné pour une étude préventive de phase II/III chez 210 volontaires asymptomatiques et porteurs d'une mutation dans les gènes *APP*, *PS1* ou *PS2* (NTC01760005).

Tableau 3 Essais cliniques d'immunothérapies dans la MA de 2011 à 2014

	Produit	Épitope	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Résultats
Immunisation active	AN1792 (Elan/Wyeth)	Aβ1-42	PHASE 2														Interruption. Baisse 82% d'Aβ. Pas d'impact sur les fonctions cognitives.
	CAD106 (Novartis)	Aβ1-7											PHASE 2				À venir
	Vanitude cridificar (Pfizer)	Aβ1-17											PHASE 2				À venir
	Affitope AD02 (Affiris AG)	N-terminal												PHASE 2			À venir
Immunisation passive	Bapineuzumab (Pfizer)	Aβ1-5											PHASE 2/3				Absence d'effet bénéfique. Interruption des études.
	Ponezumab (Pfizer)	Aβ33-40											PHASE 1/2				Absence d'effet bénéfique. Interruption des études.
	Solanezumab (Eli Lilly)	Aβ13-28											PHASE 2/3				Absence d'effet bénéfique. Ralentissement du déclin cognitif dans un sous-groupe
	Crenezumab (Genentech)	Oligomères												PHASE 2			À venir
	Gantenerumab (Hoffmann-La Roche)	Aβ3-12 et Aβ18-27												PHASE 2/3			Diminution de la charge amyloïde.

1.3.2.3 Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action par lesquels l'immunothérapie permettrait de diminuer la charge amyloïde au cerveau ont donné lieu à plusieurs hypothèses et font encore à ce jour l'objet d'intenses recherches. Le premier mécanisme à avoir été proposé fait appel au rôle traditionnel d'opsonisation des anticorps et consiste à recouvrir les plaques amyloïdes d'anticorps. Les anticorps stimuleraient, via les récepteurs Fc, l'activité phagocytaire de la microglie ce qui permettrait de dégrader les plaques (Bard et al., 2000, 2003, Wilcock et al., 2004, Dickstein et al., 2006). D'ailleurs, l'augmentation du nombre de cellules microgliales activées a été observée dans le cerveau des patients atteints de la MA (Yan et al. 2009). Un deuxième mécanisme d'action reposerait sur la séquestration du peptide Aβ soluble dans le cerveau, neutralisant ainsi sa toxicité synaptique (Yamada et al.,

2009, Takamura et al., 2012). Ces deux premières approches impliquent une entrée substantielle d'IgG dans le cerveau. Bien que plusieurs études valident l'aptitude des IgG à entrer dans le cerveau (Wilcock et al., 2004, Magga et al., 2010, Paquin Proulx et al., 2012, St-Amour et al., 2013), la quantité minimale nécessaire à atteindre des cibles thérapeutiques au cerveau demeure inconnue. Le troisième mécanisme possible suggère que la liaison des anticorps injectés par voie intraveineuse aux peptides A β en circulation génère un gradient qui briserait l'équilibre entre les compartiments sanguin et cérébral, favorisant ainsi l'efflux des peptides A β du cerveau vers le sang (DeMattos et al., 2001, 2002, Deane et al., 2003, Lemere et al., 2003). Toutefois, l'augmentation de peptides A β observée dans la circulation suite à l'injection d'anticorps pourrait aussi être expliquée par une diminution de la clairance du peptide (Levites et al., 2006) (Figure 3). Ces mécanismes d'action ne sont toutefois pas mutuellement exclusifs et différents anticorps pourraient utiliser un ou plusieurs de ces mécanismes.

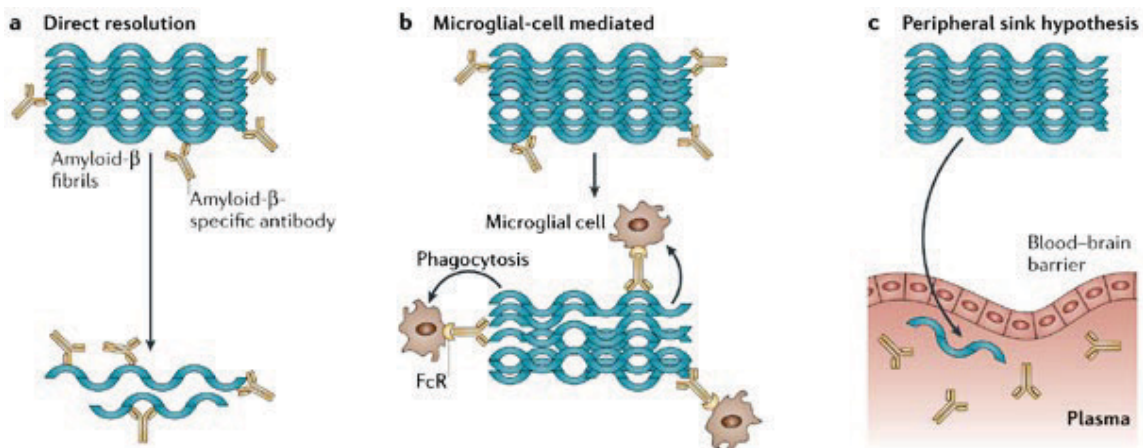


Figure 3 Mécanismes d'action potentiels des anticorps spécifiques au peptide amyloïde

Il existe trois mécanismes d'action possibles par lesquels les anticorps spécifiques au peptide A β pourraient réduire la charge amyloïde au cerveau : a) les anticorps se lient au peptide A β l'empêchant de former des plaques, b) la phagocytose des plaques est induite par la liaison des anticorps aux cellules microgliales via leur

FcR c) les anticorps lient le peptide A β en circulation favorisant un efflux du peptide dans le cerveau vers le sang. Adapté de Weiner et al., 2006.

1.4 Immunoglobulines intraveineuses

1.4.1 Généralités

Les immunoglobulines intraveineuses (IgIV) sont des préparations thérapeutiques d'immunoglobulines G (IgG) issues du fractionnement industriel de plasma provenant de plusieurs milliers de dons de sang. Le produit final est composé de 90 à 99% d'IgG monomériques, de 1 à 10% de dimères d'IgG et de traces d'IgA et d'IgM (Siegel et al., 2011). Les IgIV constituent donc un mélange hétérogène d'anticorps polyclonaux humains dont la spécificité représente l'historique immunologique des donneurs. La structure de base des IgIV est illustrée dans la Figure 4. Les principales fonctions effectrices des IgIV passent par leur liaison aux récepteurs Fc γ (Fc γ R) (Ravetch et al., 2001).

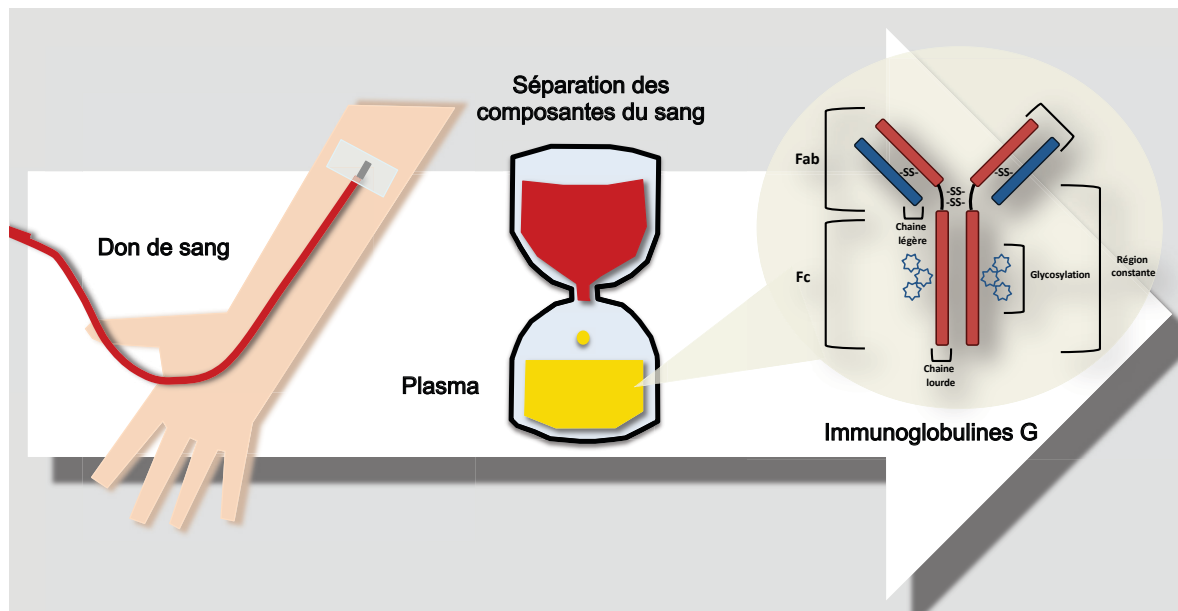


Figure 4 Provenance et structure biochimique des IgIV

Les IgIV sont isolées du plasma de plusieurs milliers de donneurs de sang sains. Les IgIV sont composées de deux chaînes légères identiques (23kD) et de deux chaînes lourdes identiques (50-70kD). Les chaînes lourdes et légères, d'une part, et les deux chaînes lourdes, d'autre part, sont maintenues ensemble par des ponts-disulfures inter-chaînes ainsi que des liaisons non-covalentes. Des motifs oligosaccharidiques sont attachés au domaine CH2 de la plupart des immunoglobulines. La digestion par la papaine casse la molécule d'immunoglobuline au niveau de la région charnière avant le pont disulfure inter-chaîne conduisant à la formation de 2 fragments, soit le Fab et le Fc.

Les IgIV ont d'abord été utilisées comme une thérapie de remplacement de défense immunitaire chez les patients ayant un diagnostic d'immunodéficience primaire ou secondaire (Lemieux et al., 2005). Administrées à des doses allant jusqu'à 0,6 g/kg de poids corporel, les IgIV fournissent une défense contre de potentiels agents infectieux chez des patients dépourvus d'anticorps ou possédant des anticorps dysfonctionnels (Lemieux et al., 2005). Il y a maintenant plus de trente ans, la découverte des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives des IgIV a permis d'étendre leur utilisation à plusieurs maladies auto-immunes telles que le thrombocytopénie immune, le syndrome de

Guillain-Barré et la maladie de Kawasaki (Gelfand et al., 2012). Dans les dernières années, les IgIV ont connu une hausse de popularité pour le traitement expérimental de nombreuses maladies pour lesquelles elles ne sont toutefois pas encore approuvées par les organismes réglementaires (Santé Canada, FDA et l'Agence médicale européenne) (Leong et al., 2008, Frauger et al., 2011). Dans ces cas, les effets bénéfiques des IgIV ne reposent que sur des observations cliniques effectuées sur un nombre limité de patients.

1.4.2 Potentiel thérapeutique des IgIV dans le traitement de la MA

Le sérum provenant d'individu en bonne santé contiendrait des auto-anticorps dirigés contre le peptide A β (Geylis et al., 2005). Ces anticorps seraient en mesure de se lier aux peptides et de ce fait, certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'ils pourraient contrôler la charge amyloïde cérébrale (Kellner et al., 2009). Cependant, une baisse d'anti-A β a été observée dans le sérum des patients souffrant de la MA (Du et al., 2001, Weksler et al., 2002) et la réactivité de ces auto-anticorps diminue avec l'âge et la progression de la maladie (Britschgi et al., 2009). Ainsi, la présence d'anti-A β dans la préparation d'IgIV a été utilisée initialement pour mettre de l'avant son potentiel thérapeutique (Dodel et al., 2002, Bach et al., 2012, Smith et al., 2013). De plus, une étude de la Fondation *Alzheimer's Drug Discovery*, utilisant des données médicales sur 20 millions de personnes, associe la prise d'IgIV à une baisse de 42% du risque de développer la MA sur cinq ans (Fillit et al., 2009).

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* montrent que les IgIV réduisent l'agrégation des peptides A β , modulent la réponse neuro-inflammatoire et améliorent les fonctions

cognitives (Dodel et al., 2002, Magga et al., 2010, Puli et al., 2012, Sudduth et al., 2013, Gong et al., 2013). En 2004, une première étude pilote, effectuée chez cinq patients souffrant de la MA à un stade léger à modéré qui ont reçu 0,4g/kg d'IgIV sur une période de six mois, a montré une baisse de la concentration du peptide A β dans le liquide céphalorachidien (LCR) ainsi qu'une amélioration cognitive chez quatre d'entre eux (Dodel et al., 2004). Ces résultats ont été corroborés par une autre étude pilote de 18 mois chez huit patients où l'on a observé une augmentation d'anti-A β dans le sérum, une diminution du niveau de peptides A β dans le LCR et une stabilisation des fonctions cognitives (Relkin et al., 2009).

Devant ces résultats prometteurs, les trois géants pharmaceutiques Baxter, Grifols et Octapharma ont soumis leur préparation commerciale d'IgIV respective à des études standardisées. Ainsi, Baxter a débuté en 2006 un essai clinique de phase II chez 24 patients qui ont reçu 0,2 à 0,8 g/kg d'IgIV (Gammagard®) à toutes les deux ou quatre semaines. Des tests cognitifs et de l'imagerie par résonance magnétique ont été pratiqués à tous les 3 mois pour évaluer l'état des patients. Après 18 mois de traitement, les IgIV semblent ralentir significativement le déclin cognitif et retarder l'atrophie cérébrale (Relkin et al., *AAN*2010). Puis, toujours chez les mêmes patients, trois ans de traitement ont permis de montrer que les IgIV sont en mesure de stabiliser les fonctions cognitives et de ce fait, de possiblement freiner la progression de la maladie (Relkin et al., *AAIC*2012). Par conséquent, deux études cliniques de phase III ont été démarrées (NCT00818662, NCT01524887). Pilotée avec la collaboration de l'*Alzheimer's disease cooperative study*, la première étude a comparé, sur 18 mois de traitement, 0,2 et 0,4 g/kg d'IgIV ou le placebo chez 390 patients. L'analyse des données n'a montré aucune différence significative entre le traitement et le placebo. Toutefois, il semblerait que les patients porteurs de l'allèle ApoE ϵ 4 répondraient de façon plus favorable au

traitement (Relkin, *AAIC*2013). Devant ces résultats négatifs, Baxter a annoncé en mai 2013, via un communiqué de presse, l'abandon de la deuxième étude clinique, qui devait se terminer en 2015, chez 530 patients répartis dans plusieurs pays. De son côté, Octapharma s'est engagé en 2008 dans un essai clinique de phase II afin de tester l'efficacité de sa préparation d'IgIV Octagam®. Bien que les conclusions n'aient montré aucune amélioration de l'état des patients (Dodel et al., 2013), une deuxième étude de phase II est actuellement en cours chez 50 patients atteints de trouble cognitif léger (NTC01300728). Les résultats préliminaires montrent une amélioration cognitive ainsi qu'un ralentissement de l'atrophie cérébrale chez les patients traités aux IgIV (Kile et al., *AAN*2013). Enfin, Grifols Biologicals a démarré en 2012 une étude clinique de phase II/III comprenant 350 patients avec sa préparation d'IgIV Gamunex® qui est toujours en cours (NTC01561053).

1.4.3 Problématique

La consommation annuelle en IgIV a fait un bon spectaculaire au cours des dernières années (Figure 5). La découverte de nouvelles applications thérapeutiques n'est pas étrangère à cette augmentation et pourrait avoir des conséquences négatives sur la disponibilité des IgIV. De plus, la quantité d'IgIV requise pour le traitement d'une maladie, telle la MA qui touche des milliers de personnes, dépasserait amplement la capacité actuelle d'approvisionnement en plasma. Cette menace de pénurie fait pression sur un fournisseur tel qu'Héma-Québec qui ne collecte que 12% du plasma nécessaire à préparer la quantité d'IgIV consommée annuellement au Québec et, par conséquent, se retrouve dépendant du marché international. Malgré les résultats ambivalents des dernières

études cliniques, les IgIV continuent de représenter un espoir thérapeutique intéressant pour la MA. L'absence de consensus sur les mécanismes d'action des IgIV vient s'ajouter à la problématique. Il apparaît donc impératif de mieux comprendre les mécanismes d'action afin de faire une meilleure utilisation du produit et éventuellement de développer des équivalents synthétiques.

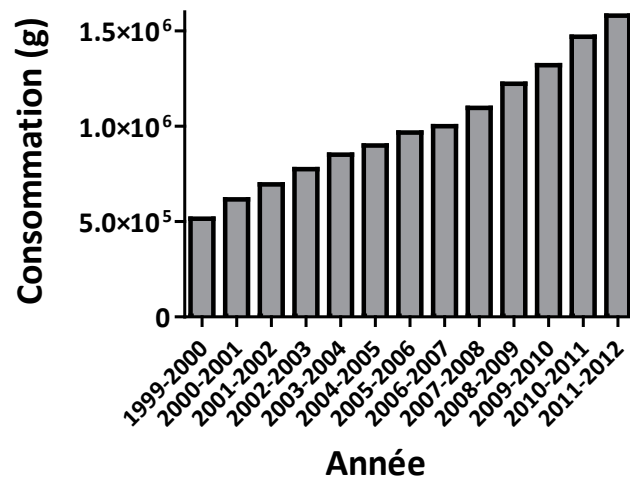


Figure 5 Distribution annuelle d'IgIV par Héma-Québec entre 1999 et 2012

Source : Héma-Québec, Rapport annuel 2012

Chapitre 2 Thématique de recherche

2.1 Objectif

L'augmentation de la consommation en IgIV accroît les risques de pénurie de ce produit pour lequel il n'existe encore aucun substitut pour le traitement des immunodéficiences. Son utilisation dans le cadre d'essais cliniques chez les patients diagnostiqués avec la MA a montré des effets bénéfiques intéressants. De plus, des résultats encourageants ont été observés lors de travaux antérieurs dans l'équipe des Drs Calon et Bazin (St-Amour et al., 2014). Ainsi, l'objectif de mon projet de maîtrise est d'explorer les mécanismes d'action potentiels des IgIV chez la souris transgénique 3xTg-AD, un modèle murin de la MA qui, une fois identifiés, pourraient servir de base dans le développement éventuel d'un équivalent thérapeutique.

2.2 Hypothèses

L'accumulation du peptide A β constitue une composante pathologique importante dans la MA. Des études effectuées dans notre laboratoire ont montré une baisse du ratio A β 42/A β 40 soluble de 22% ainsi que de la concentration d'oligomères de 56 KDa d'A β (A β *56) de plus de 60% chez la souris 3xTg-AD suite au traitement aux IgIV (St-Amour et al., 2014). Puisque les peptides A β sont les précurseurs des plaques amyloïdes, nous posons comme première hypothèse que des souris 3xTg-AD traitées aux IgIV verront le nombre et la taille de leurs plaques amyloïdes diminués dans le cerveau.

En périphérie, les IgIV ont des effets anti-inflammatoires reconnus. Ils ont la capacité de se lier à certains récepteurs inhibiteurs exprimés à la surface de cellules comme les macrophages et d'inhiber leur activation. Puisqu'il existe des cellules apparentées aux macrophages dans le système nerveux central, nous posons comme seconde hypothèse que les IgIV pourraient agir via un mécanisme semblable dans le cerveau.

La neurogénèse est altérée chez les patients souffrant de la MA (Crews et al., 2010) ainsi que chez la souris transgénique 3xTg-AD (Hamilton et al., 2012). Puisqu'il a été rapporté récemment dans la littérature que les IgIV ont la capacité de stimuler la neurogénèse chez la souris APP/PS1 (Puli et al., 2012), nous posons comme troisième hypothèse que cet effet sera également reproduit chez notre modèle de souris 3xTg-AD.

Finalement, puisque les IgIV sont des préparations d'immunoglobulines hautement hétérogènes et que plusieurs mécanismes moléculaires interviennent dans la MA, nous posons comme quatrième hypothèse que les IgIV pourraient interagir avec certaines protéines impliquées dans la MA.

Chapitre 3 Méthodologie

3.1 Animaux

Les souris triple transgéniques 3xTg-AD (n=37) ainsi que les souris contrôles (C57Bl/6x129/Sv) (n=38) étaient produites et hébergées à l'animalerie du Centre de Recherche du CHU de Québec. Les deux groupes contenaient autant de mâles que de femelles. Toutes les manipulations effectuées étaient approuvées par le Comité de Protection des Animaux de l'Université Laval.

3.2 Traitement aux IgIV

Les IgIV (Gamunex 10%) étaient obtenues de la compagnie Grifols Canada Ltd (Mississauga, Canada). Parmi les différentes préparations d'IgIV disponibles sur le marché, Gamunex offre celle qui contient le plus d'IgG (>99%) ainsi que la demi-vie la plus longue (37,5 jours). La MA étant une condition directement reliée au vieillissement, le traitement des souris n'était effectué qu'à partir de l'âge de 13 mois. À cet âge, la neuropathologie est bien installée et serait équivalente aux premiers stades de la maladie (trouble cognitif léger) (Oddo et al., 2003). Les souris âgées de 13 mois avaient reçu deux injections intraperitonéales par semaine de 1,5 g/kg d'IgIV sur une période de trois mois. Les préparations commerciales d'IgIV utilisent la glycine comme diluant afin de prévenir l'agrégation des immunoglobulines. Étant donné qu'il n'existe pas de contrôle protéique inerte pour les IgIV, la glycine (0,2 g/kg, 0.2M, pH 4.25) était utilisée comme contrôle négatif. Le traitement des souris a été réalisé par Isabelle St-Amour dans le cadre de ses travaux de doctorat.

3.3 Préparation des tissus

Les souris étaient sacrifiées à l'âge de 16 mois sous anesthésie (xylazine/ketamine, 8/140 mg/kg) par perfusion intracardiaque avec 50 mL de PBS contenant des inhibiteurs de protéases (Complete™, Roche, Indianapolis, IN) et de phosphatases (1 mM de sodium vanadate et sodium pyrophosphate, 50 mM de fluorure de sodium). Le cerveau des souris était récupéré et les deux hémisphères étaient séparés. Le premier hémisphère était post-fixé avec de la paraformaldéhyde (PFA) 4% fraîchement préparée et déposé dans une solution de sucrose 20%. L'hémisphère était fractionné en coupes de 25 µm à l'aide d'un microtome et conservé à -20°C dans un liquide cryoprotecteur pour des analyses histologiques. Le deuxième hémisphère était disséqué (cortex et hippocampe) et conservé à -80°C. Ces manipulations ont été réalisées par Isabelle St-Amour dans le cadre de ses travaux de doctorat. Le tissu congelé était homogénéisé dans huit volumes de PBS (10mM potassium/sodium, 136mM NaCl, pH 7,4) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete™), des inhibiteurs de phosphatases (1 mM de sodium vanadate et sodium pyrophosphate, 50 mM fluorure de sodium) ainsi que 10 µg/ml de pepstatin A. Les échantillons étaient soniqués à 3 reprises à intensité maximale pendant 10 x 1 seconde et centrifugés à 100 000g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant, contenant majoritairement des protéines cytosoliques, forme ainsi la fraction soluble. Le culot généré était à son tour homogénéisé dans un tampon de lyse (25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), puis soniqué à 3 reprises à intensité maximale pendant 10 x 1 seconde et centrifugé à 100 000g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant qui contient des protéines membranaires forme la fraction membranaire. Les

fractions soluble et membranaire étaient conservées à -80°C pour des analyses en immunobuvardage et en électrophorèse en deux dimensions.

3.4 Analyses biochimiques

3.4.1 Immunofluorescence

Des lavages avec une solution de PBS (10mM potassium/sodium, 136mM NaCl, pH 7,4) étaient faits entre chacune des étapes décrites ci-après. Les coupes de 25 µm provenant de souris 3xTg-AD ou NonTg, traitées au IgIV ou avec la solution contrôle, étaient incubées pendant 15 minutes dans du peroxyde d'hydrogène 3% et bloquées dans du PBS contenant 5% sérum de cheval (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) et 0,4% Triton X-100 pendant 2h à température pièce (TP). Ensuite, les coupes étaient incubées pendant 18h ou 48h à TP dans la solution de blocage avec les anticorps primaires : souris anti-A β (1:1000, Covance Research Products, Princeton, NJ), lapin anti-Iba1 (1:1000; Wako, Richmond, VA), chèvre anti-DCX (1 :1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, TX). La détection était réalisée en incubant les coupes pendant 2h à TP avec l'anticorps secondaire approprié dans une solution de PBS 1% sérum de cheval et 0,4% Triton X-100. Les coupes étaient disposées sur des lames, recouvertes de Mowiol et scellées avec une lamelle. Les lames étaient visualisées grâce à un microscope à fluorescence *EVOS FL Auto Cell Imaging System* (Life Technologies, Carlsbad, CA). Les images étaient analysées avec le logiciel *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

3.4.2 Immunobuvardage

Vingt microgrammes de protéines par échantillon provenant soit de la fraction soluble ou membranaire étaient dilués dans du tampon Laemmli (4% SDS, 250 mM tris-HCl, 10% glycerol, 0.1% bleu de bromophenol, 2% β -mercaptoethanol) et chauffés à 95°C pendant 5 min. Les protéines étaient séparées selon leur poids moléculaire sur un gel de polyacrylamide (10%) par électrophorèse. Les protéines étaient transférées sur une membrane de PVDF 0,45 μ m (Millipore, Billerica, États-Unis) qui a ensuite été bloquée dans du PBS-Tween 5% lait. Trois lavages de 10 min avec une solution de PBS-Tween (PBS, 0,1% Tween 20) étaient faits entre chacune des étapes décrites ci-après. Les membranes étaient incubées pendant 18h avec les anticorps primaires : 6E10 (anti-A β) (1:1000), anti-GFAP (1:50000, Abcam, Cambridge, MA), souris anti-tau humain (Tau13, 1:5000, Covance Research Products, Princetown, NJ), souris anti-phospho tau (PHF-1, 1:500), souris anti-phospho tau (AT270, 1:5000, Pierce, Rockford, IL), souris anti-tau (CP13, 1:5000), chèvre anti-DCX (1:1000), anti-PSA-NCAM (1:1000, Millipore, Billerica, MA), anti-SOX2 (1:1000, Millipore, Billerica, MA), anti-BDNF (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, TX), lapin anti-Septin3 (1:20000, Novus Biologicals, Oakville, ON), souris anti-Drebrin (1:500, Progen, Heidelberg, Allemagne), lapin anti-YKL40 (1:10000, Lifespan Biosciences, Inc., Seattle, WA) et lapin anti-visinine (1:40000, Genetex, San Antonio, TX). L'anticorps primaire anti-actine produit chez la souris (1:40000, Applied Biological Materials, Richmond, BC, Canada) était utilisé comme contrôle. La détection était réalisée en incubant les membranes pendant 2h dans une solution de PBS-Tween supplémenté de 1% d'albumine bovine (BSA) avec l'anticorps secondaire approprié couplé à la

horseradish peroxidase (HRP) suivi de la solution chimiluminescente ECL™ Prime (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Les bandes étaient visualisées avec le *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare, Baie d'Urfe, Québec). L'analyse quantitative était réalisée avec le logiciel *Molecular Imaging Software* (Carestream Health, Rochester, NY) qui permet d'attribuer une densité optique (D.O.) relative à chacune des bandes.

3.5 Analyse protéomique

3.5.1 Électrophorèse en deux dimensions

Les protéines étaient précipitées avec la trousse *2D clean-up* (GE Healthcare) afin de soustraire les substances qui pourraient interférer avec la focalisation isoélectrique puis diluées dans le tampon T8 (7M Urée, 2M Thio-urée, 3% CHAPS, 20 mM DTT, 5 mM TCEP). Pour la première dimension (séparation selon le point isoélectrique), 200 µg étaient déposés sur des bandes de 24 cm d'*Immobiline Dry Strip* (GE Healthcare) de pH 4-7. La focalisation isoélectrique s'est faite avec l'appareil *IPGPhor* (GE Healthcare) selon les instructions du fabricant. La deuxième dimension (séparation selon le poids moléculaire) s'est effectuée sur un gel de polyacrylamide de 12% dans l'appareil *Ettan Dalt twelve System* (GE Healthcare). Pour chaque condition, quatre gels 2D étaient faits en parallèle. Les gels étaient colorés avec le *SYPRO® Ruby Protein Gel Stain* (Life Technologies Inc.) et photographiés avec le *ProXpress scanner* (Perkin Elmer). Toutes les manipulations ont été effectuées en collaboration avec Gina Racine de la Plateforme de protéomique du Centre de recherche en infectiologie du CHU de Québec.

3.5.2 Analyse d'image

La détection des spots, le calcul de leur volume ainsi que l'analyse statistique de ceux-ci étaient réalisés en utilisant le logiciel *Progenesis Same Spots software* (Nonlinear Dynamics). Pour chaque spot, le volume relatif est exprimé en moyenne \pm SEM. Toutes les analyses ont été effectuées sous la supervision de Gina Racine de la Plate-forme de protéomique du Centre de recherche en infectiologie du CHU de Québec.

3.5.3 Digestion des protéines

Les spots d'intérêts étaient extraits du gel par Gina Racine en utilisant l'appareil *ProXcision_Spot cutter* (Perkin Elmer), conservés dans 1% d'acide acétique puis soumis à une digestion enzymatique avant l'analyse en spectrométrie de masse. La digestion était réalisée avec l'appareil *MassPrep liquid handling robot* (Waters, Milford, CU) selon les instructions du fabricant.

3.5.4 Spectrométrie de masse

Les analyses en spectrométrie de masse étaient effectuées à la Plate-forme de protéomique du Centre de génomique de Québec, situé au Centre de recherche du CHU de Québec. L'analyse des échantillons était exécutée par le spectromètre de masse *TripleTOF 5600 plus* (AB SCIEX, Concord, Canada), un appareil couplé à un système de séparation des peptides HPLC et à une source nanospray. Une fois reçus, les résultats étaient analysés à l'aide du logiciel *Scaffold3* (Mascot, OR).

3.5.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques étaient effectuées avec le logiciel Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne avec l'erreur type de la moyenne (SEM). Les différences statistiques ont été déterminé en utilisant l'analyse de variance à un facteur (ANOVA) et le test post-hoc Fisher pour la comparaison entre les groupes. Le seuil statistique était fixé à $p < 0,05$.

Chapitre 4 Résultats

4.1 Absence d'effet des IgIV sur les pathologies amyloïde et tau

Nous avons posé comme première hypothèse que des souris 3xTg-AD traitées aux IgIV verront le nombre et taille de leurs plaques amyloïdes diminués dans le cerveau. Afin de démontrer cette hypothèse, la pathologie amyloïde a d'abord été visualisée dans le cortex en immunofluorescence sur des coupes de cerveaux de souris 3xTg-AD traitées aux IgIV (1,5g/kg) ou avec la solution contrôle (glycine) (Figure 6). L'anticorps 6E10, qui cible la portion A β (acides aminés 1 à 16) de la protéine précurseur APP, a été utilisé comme marqueur des plaques amyloïdes. On observe un marquage intracellulaire qui correspond à la protéine APP située dans la membrane des cellules ainsi qu'un marquage extracellulaire qui correspond au peptide A β libéré par le clivage amyloïdogénique et agrégé pour former les plaques amyloïdes (Figure 6A). Afin de mesurer l'étendue de la pathologie et de vérifier l'impact d'un traitement aux IgIV sur celle-ci, un décompte et un calcul de l'espace occupé par ces plaques ont été réalisés sur 10 coupes par souris (n=6-8) (Figure 6B). De plus, une quantification de l'amyloïde totale contenue dans le cerveau des souris a été faite par immunobuvardage avec l'anticorps 6E10 sur des extraits d'homogénats de cortex dans la fraction soluble (n=19-25) (Figure 6C). Contrairement à notre hypothèse de départ, le nombre de plaques, l'aire occupée par ces plaques ainsi que la quantification dans le cortex n'ont pas été significativement altérés par le traitement aux IgIV.

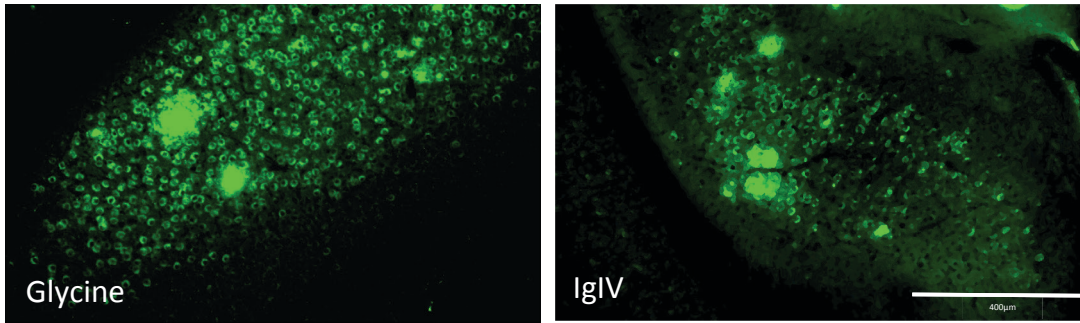
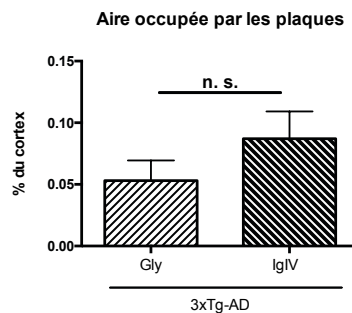
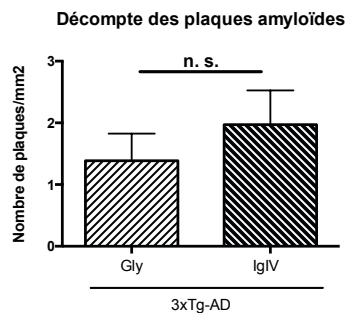
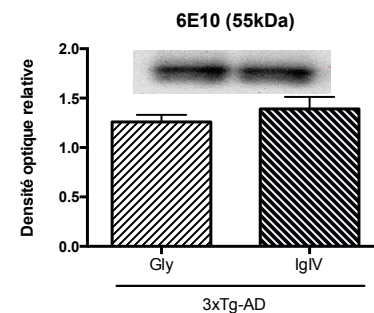
A**B****C**

Figure 6 Quantification de la pathologie amyloïde

A Image représentative du marquage des plaques amyloïdes dans le cortex par immunofluorescence avec l'anticorps 6E10 (spécifique aux acides aminés 1 à 16 de la protéine APP) sur des coupes de cerveaux de 25 µm de souris 3xTg-AD ($n=11$) âgées de 16 mois traitées aux IgIV ou avec la solution contrôle. Grossissement 10X. **B** Le nombre et l'aire des plaques ont été quantifiés dans le cortex. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 6 souris Gly et 8 souris IgIV. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison statistique. n.s., non significatif. **C** Concentration d'amyloïde totale dans les homogénats de cortex fraction soluble déterminée par immunobuvardage avec l'anticorps 6E10. Les résultats de D.O. relatives exprimés en moyenne \pm SEM de 19 souris Gly et 25 souris IgIV proviennent de l'analyse de souris individuelles et sont représentatifs de l'ensemble des résultats. Le test de Student non-apparié a été utilisé pour la comparaison statistique. * $P < 0.05$.

La protéine tau contient plusieurs sites de phosphorylation et une vaste gamme d'anticorps ont été produits afin de cibler l'une ou l'autre des ces phosphorylations. Ceux utilisés dans le cadre de mes travaux sont identifiés à la Figure 7.

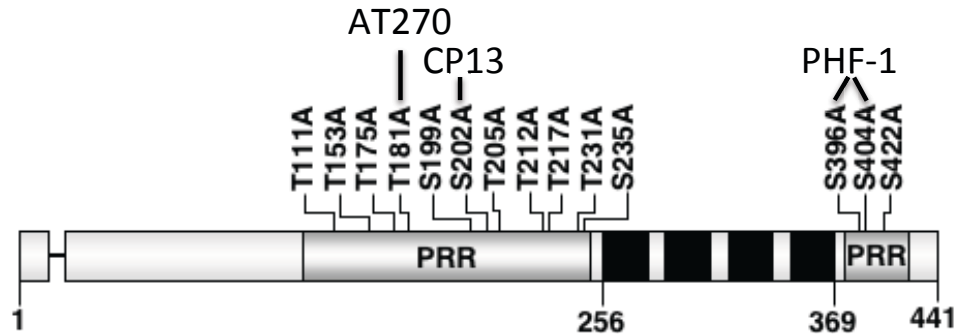


Figure 7 Structure de la protéine tau

La protéine tau est constituée de 441 acides aminés. Elle contient quatre domaines de liaisons aux microtubules (carrés noirs) et deux régions riches en prolines (PRR). Les principaux sites de phosphorylation se retrouvant sur des thréonine (T) et des sérines (S) sont indiqués sur la figure. Les anticorps spécifiques à certaines de ces phosphorylations sont identifiés.

Afin de déterminer si les IgIV ont un effet sur la pathologie tau, une composante neuropathologie importante de la MA, une quantification des phosphorylations p-ser 396/404, p-thr 181 et p-ser 202 a été réalisée par immunobuvardage (Figure 8A-B-C). Globalement, on observe un niveau de phosphorylation de la protéine tau chez les souris 3xTg-AD nettement supérieur (>50%) à celui des souris NonTg (Figure 8A-B-C). Bien qu'il n'y ait pas d'effet statistiquement significatif du traitement, on peut tout de même observer une tendance à la baisse du niveau de la phosphorylation p-ser 202 chez la souris 3xTg-AD traitée aux IgIV ($p=0,0571$) (Figure 8C). Nous nous sommes également intéressé au niveau d'expression de la protéine tau totale humaine. Pour ce faire, l'anticorps Tau13, qui ne reconnaît que la protéine tau humaine, a été utilisé. Ainsi, seule la protéine tau exprimée par la souris 3xTg-AD, qui possède une mutation (P301L) pour le gène humain tau, est

reconnue par l'anticorps (Figure 8D). Aucune modulation de la protéine totale n'a été observée chez la souris 3xTg-AD suite à un traitement aux IgIV.

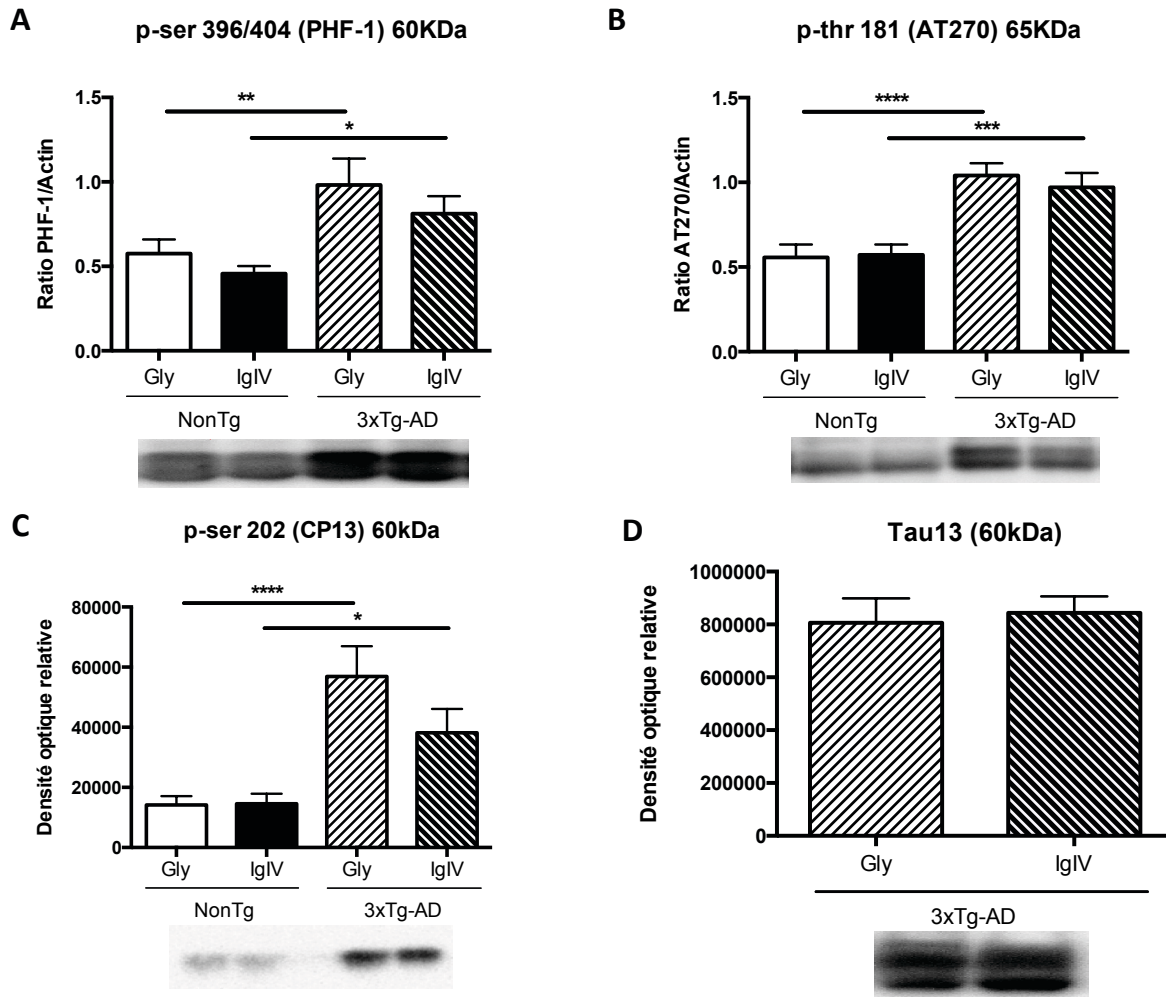


Figure 8 Quantification de la pathologie tau

Concentration de différentes phosphorylations de la protéine tau (A-B-C) ainsi que de tau humain total (D) déterminée par immunobuvardage dans des homogénats de cortex fraction soluble de souris 3xTg-AD âgées de 16 mois traitées aux IgIV ou avec la solution contrôle. Les résultats exprimés en moyenne +/- SEM de 19 souris Gly et 25 souris IgIV proviennent de l'analyse de souris individuelles et sont représentatifs de l'ensemble des résultats. Le test de l'ANOVA à 1 facteur a été utilisé pour la comparaison statistique. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

En résumé, le traitement aux IgIV ne semble pas affecter la pathologie amyloïde, ni la pathologie tau, contrairement à notre hypothèse de départ.

4.2 Baisse de l'activation de la microglie en présence d'IgIV

Notre seconde hypothèse veut que les IgIV produisent des effets anti-inflammatoires sur la microglie, qui représente le penchant cérébral des macrophages que l'on retrouve en périphérie. Nous avons donc effectué des analyses de la microglie chez la souris 3xTg-AD, afin d'explorer cette possibilité. La microglie activée au sein du tissu cérébral lésé est identifiée par des changements morphologiques et fonctionnels. Non-activée, la cellule est ramifiée et possède plusieurs prolongements cytoplasmiques tandis que lorsqu'elle est activée, la microglie perd ses ramifications et adopte une forme plutôt amiboïde (Suzumura et al., 1991). La microglie a été visualisée par immunofluorescence dans la région du cortex sur les coupes de cerveau de souris 3xTg-AD (Figure 9A, panneaux de gauche). L'anticorps utilisé cible la protéine cytosolique Iba1 qui est exprimée dans le cerveau uniquement par les cellules microgliales et les monocytes sanguins qui peuvent infiltrer le cerveau. L'analyse des images révèle un changement de conformation de certaines cellules microgliales (voir flèches) passant de ramifiées à amiboïdes. Nous observons également une concentration des cellules de morphologie amiboïde en un point précis qui pourrait être interprétée comme une migration des cellules microgliales vers un site de lésion.

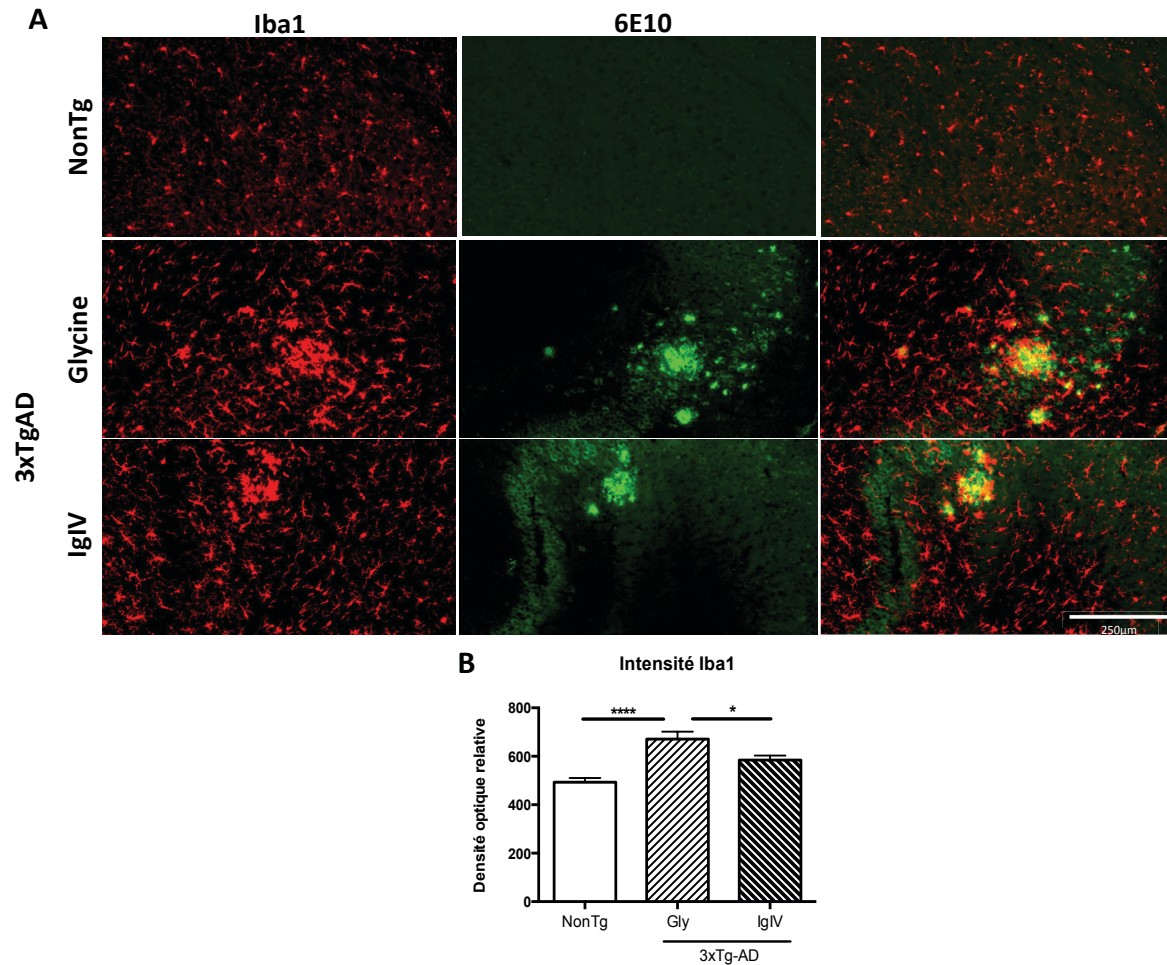


Figure 9 Caractérisation de la microglie

A Double marquage en immunofluorescence avec les anticorps Iba1 et 6E10 permettant de mettre en évidence l'activation et la co-localisation de la microglie et des plaques amyloïdes. La flèche 1 montre une cellule microgliale de morphologie ramifiée tandis que la flèche 2 montre une cellule de morphologie amiboïde. *B* Mesure de l'intensité du marquage Iba1 par le logiciel ImageJ réalisée chez la souris contrôle et la souris 3xTg-AD. L'augmentation de la présence de la microglie chez la souris transgénique est partiellement rétablie par le traitement aux IgIV. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 9 souris Gly et 11 souris IgIV. Le test de l'ANOVA à un facteur a été utilisé pour la comparaison statistique. Grossissement 20X. * $P < 0.05$ **** $P < 0.0001$.

Les plaques amyloïdes, reconnues comme une substance à éliminer par la microglie, pourraient constituer ce site de lésion. Ainsi, les plaques amyloïdes ont

été marquées à l'aide de l'anticorps 6E10 (Figure 9A panneau du centre). Ensuite, nous avons examiné la relation entre la position des plaques amyloïdes et des cellules microgliales de morphologie amiboïde. Nos observations montrent, en effet, qu'il y a colocalisation entre les deux marquages (Figure 9A, panneaux de droite). Ainsi, les plaques amyloïdes provoqueraient l'activation et la migration des cellules microgliales chez la souris 3xTg-AD.

Tel que mentionné plus haut, la protéine cytoplasmique Iba1 est exprimée au cerveau uniquement par les cellules microgliales et il a été montré que son expression est augmentée en fonction de l'activation de la microglie (Ito et al., 2001, Imai & Kohsaka, 2002). Nous avons donc quantifié, à l'aide du logiciel *ImageJ*, l'intensité du marquage Iba1 chez les souris 3xTg-AD et NonTg afin de confirmer qu'il y a une augmentation d'activité de la microglie chez la souris 3xTg-AD. Nos résultats révèlent effectivement une hausse chez la souris 3xTg-AD comparativement à la NonTg. De plus, on observe que cette hausse est partiellement rétablie avec le traitement aux IgIV (Figure 9B). Globalement, ces résultats nous suggèrent que les plaques amyloïdes entraînent l'activation de la microglie, qui se traduit par un changement de morphologie et une migration des cellules autour des plaques, et que cette activation est significativement diminuée suite à un traitement aux IgIV.

4.3 Stimulation de la neurogénèse adulte chez la souris 3xTg-AD traitée aux IgIV

Se basant sur une étude antérieure (Puli et al., 2012), notre troisième hypothèse veut que les IgIV aient la capacité de stimuler la neurogénèse. Afin de vérifier cette

hypothèse, une analyse de la neurogénèse a été réalisée dans l'hippocampe de nos souris, soit le siège de la neurogénèse adulte dans le cerveau.

D'abord, la neurogénèse a été visualisée en immunofluorescence avec l'anticorps DCX qui est spécifique aux neurones immatures (Figure 10A). La neurogénèse étant un phénomène qui régresse avec l'âge, notre contrôle positif provient d'un cerveau d'une jeune souris mâle sacrifiée à l'âge de 3 mois. La neurogénèse dans l'hippocampe ne s'opère que strictement dans la ZSG. Ainsi, la présence de cellules positives pour le marqueur DCX uniquement dans cette zone confirme la spécificité du marquage. On observe une légère diminution de la quantité du marquage chez la souris NonTg et une diminution marquée chez la souris 3xTg-AD par rapport au contrôle positif (Figure 10A). Le décompte des cellules DCX positives dans la ZSG, réalisé à l'aide du logiciel *ImageJ*, confirme nos observations (Figure 10B). En parallèle, une quantification de la protéine DCX a été faite par immunobuvardage. Les résultats montrent une diminution de la quantité de DCX chez les souris 3xTg-AD par rapport à la souris NonTg traitées à la solution contrôle (Figure 10C). Contrairement à ce qu'on a pu observer en histologie, cette baisse est rétablie par le traitement aux IgIV.

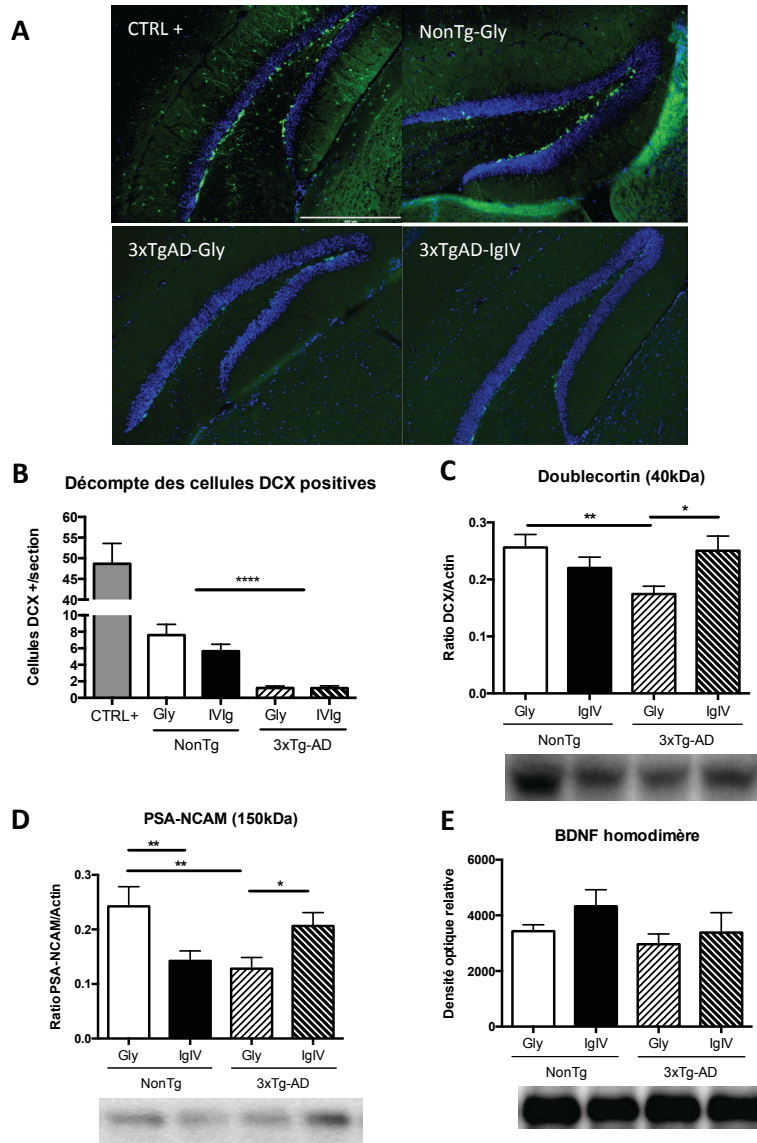


Figure 10 Expression de la neurogénèse dans la ZSG

A Image représentative du marquage de neurogénèse dans la ZSG sur des coupes de cerveaux de 25 μm de souris NonTg et 3xTg-AD ($n=11$) âgées de 16 mois déterminé par immunofluorescence. Les neurones immatures, mis en évidence par l'anticorps DCX (vert), sont alignés le long de la ZSG du gyrus dentelé. Le noyau des cellules a été coloré en bleu (DAPI). Grossissement 10X. Barre = 400 μm **B** Diminution du nombre de cellules exprimant le marqueur DCX chez la souris 3xTg-AD. Le test de l'ANOVA à un facteur a été utilisé pour la comparaison statistique. **C-D** Quantification de la neurogénèse dans les homogénats d'hippocampe fraction soluble et membranaire par immunobuvardage

avec les anticorps DCX et PSA-NCAM. La diminution de l'expression de DCX et PSA-NCAM chez la souris 3xTg-AD est compensée par le traitement aux IgIV. **E** Quantification du facteur neurotrophique BDNF dans les fractions soluble et membranaire d'hippocampe par immunobuvardage. Les résultats exprimés en moyenne +/- SEM de 19 souris Gly et 25 souris IgIV proviennent de l'analyse de souris individuelles et sont représentatifs de l'ensemble des résultats. Le test de l'ANOVA à un facteur a été utilisé pour la comparaison statistique. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$.

Dans le but de confirmer ces résultats, nous avons refait un immunobuvardage, mais cette fois-ci avec l'anticorps PSA-NCAM exprimé lui aussi par les neurones immatures. Des résultats similaires ont été obtenus. En effet, la baisse de la neurogénèse observée chez la souris 3xTg-AD est corrigée par le traitement aux IgIV (Figure 10D). Toutefois, contrairement à nos attentes, on observe une baisse de l'expression de PSA-NCAM chez les souris NonTg traitées aux IgIV par rapport aux mêmes souris traitées à la glycine.

Enfin, le facteur neurotrophique *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) contrôle et stimule la neurogénèse (Zigova et al., 1998, Benraiss et al., 2001, Pencea et al., 2001, Bath et al., 2012). Afin de vérifier si le mécanisme d'action des IgIV se situe au niveau de BDNF, une quantification par immunobuvardage du facteur neurotrophique a été effectuée (Figure 10E). Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative de la quantité de BDNF dans le cerveau des souris traitées ou non avec les IgIV.

En conclusion, nos résultats ont révélé une réduction de la quantité de la protéine DCX exprimée dans l'hippocampe chez la 3xTg-AD qui est corrigée par le traitement aux IgIV. Cet effet bénéfique des IgIV n'est cependant pas attribuable à une modulation de la neurotrophine BDNF.

4.4 Caractérisation du protéome cérébral de souris traitées aux IgIV

Afin de mieux connaître les interactions entre les IgIV et le protéome cérébral des souris traitées nous avons utilisé une approche protéomique qui emploie les techniques de l'électrophorèse 2D (Figure 11) et la spectrométrie de masse.

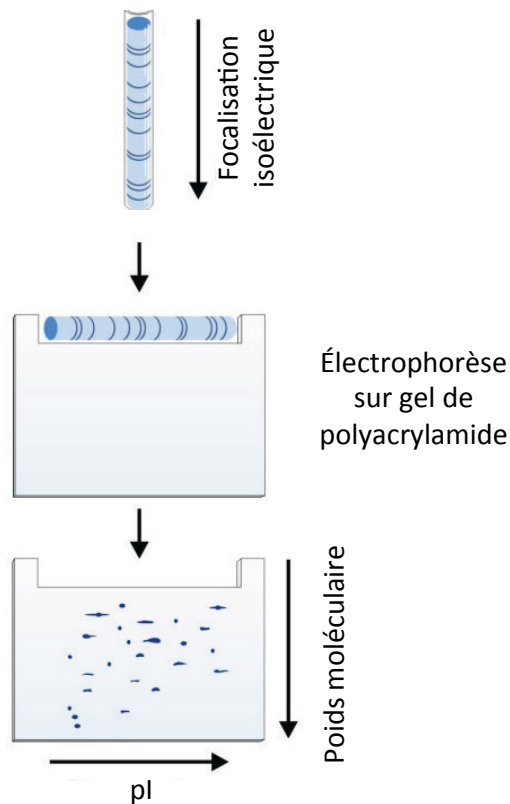


Figure 11 Représentation schématique du principe de l'électrophorèse 2D

Une fois la migration des protéines achevée dans la première dimension selon le pI par focalisation isoélectrique, on effectue une migration perpendiculaire à la première selon le poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les protéines, séparées selon ces deux critères, se répartissent donc dans un système à deux coordonnées permettant une résolution de haute qualité.

Les protéines totales extraites de l'hippocampe de souris NonTg, 3xTg-AD-Gly et 3xTg-AD-IgIV (n=3) ont été séparées selon leur point isoélectrique (pI) avec gradient de pH 4-7 en première dimension puis selon leur poids moléculaire à l'aide d'un gel 12% acrylamide en deuxième dimension. La Figure 12 montre le patron d'expression du protéome des souris NonTg, 3xTg-AD-Gly et 3xTg-AD-IgIV.

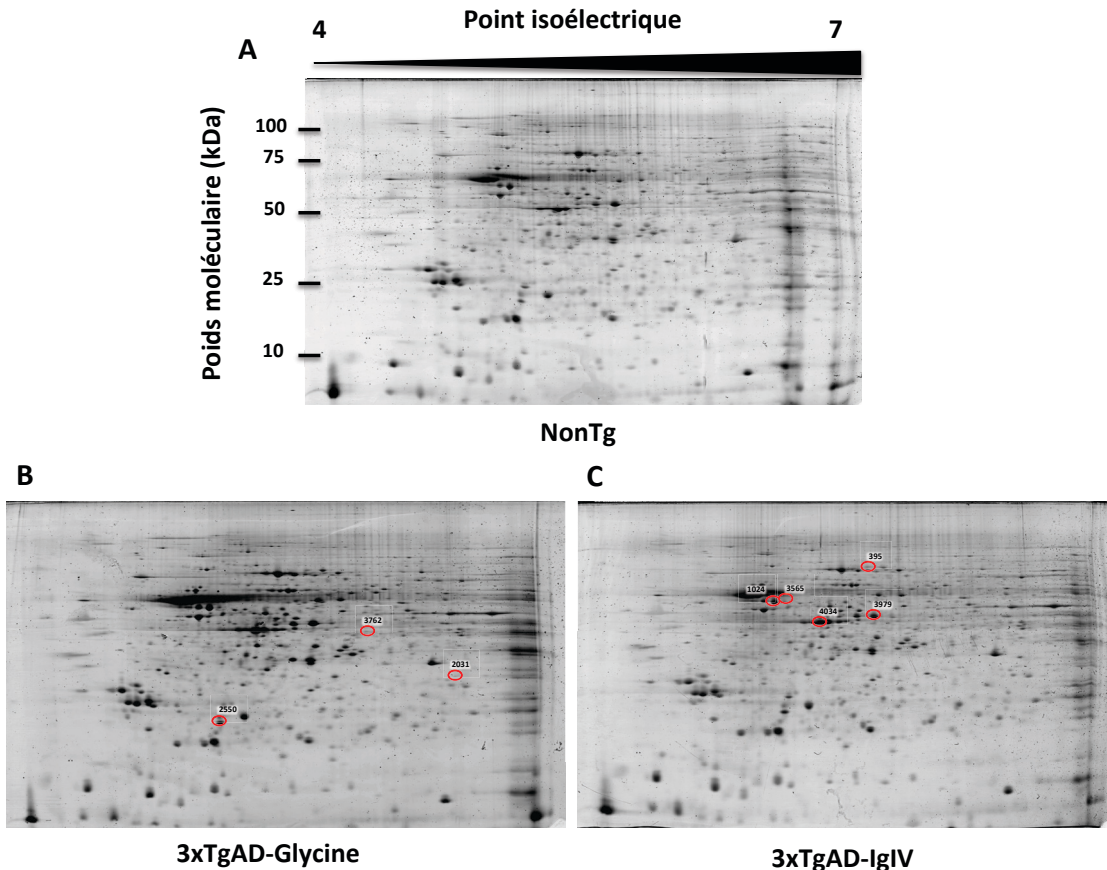


Figure 12 Électrophorèse 2D d'homogénats de cerveaux

Patron d'expression des protéines totales de l'hippocampe de souris NonTg et 3xTg-AD traitées avec la solution contrôle ou les IgIV suite à leur migration d'abord selon leur point isoélectrique (pH4-7), puis selon leur poids moléculaire (gel 12% acrylamide). Les protéines se répartissent à l'intérieur du gel selon les deux dimensions. Les spots dont le volume est augmenté chez la souris 3xTg-AD versus NonTg sont identifiés en B (comparaison A/B) alors que les spots chez la souris 3xTg-AD dont le volume est diminué avec le traitement aux IgIV sont identifiés en C (comparaison B/C).

Le but étant d'identifier des spots qui diffèrent d'une condition à l'autre, les gels ont été comparés et analysés avec le logiciel *Progenesis Same Spots*. Dans un premier temps, tous les gels de mêmes conditions (n=3) ont été superposés pour former une seule image, le bruit de fond a été supprimé et un total de 1921 spots a été répertorié. Ensuite, le logiciel analyse la disposition (coordonnées géographiques) de chacun des spots à travers le gel, l'intensité de ceux-ci et calcul également leur volume. Enfin, *Progenesis Same Spots* compare d'une condition à l'autre les informations recueillies sur chaque spot. Il en résulte que trois spots (#2031, 2550, 3762) ont un volume plus important chez les souris 3xTg-AD versus les souris NonTg (Figure 12B) alors que cinq spots (#395, 1024, 3565, 3979, 4034) ont un volume plus faible chez les souris 3xTg-AD traitées aux IgIV par rapport à celles traitées à la glycine (Figure 12C). Ces 8 spots ont été découpés puis analysés en spectrométrie de masse. Cette technique a permis de révéler l'identité des nombreuses protéines probables contenues dans chacun des spots (Tableau 4).

Tableau 4 Résultats obtenus en spectrométrie de masse

# spot	Protéine	Point isoélectrique (pI)	Poids moléculaire (kDa)	Nombre de peptide unique	Pourcentage de séquence couverte
Hausse chez les 3xTgAD					
3762	KCRB_MOUSE Creatine kinase B-type [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,4	43	10	35,20%
	AATM_MOUSE Aspartate aminotransferase, mitochondrial [Mus musculus (Mouse) [10090]]	9,0	47	17	34,40%
	AATC_MOUSE Aspartate aminotransferase, cytoplasmic [Mus musculus (Mouse) [10090]]	7,1	46	10	22,30%
2031	Q505N7_MOUSE Sulfurtransferase [Mus musculus (Mouse) [10090]]	6,1	33	9	22,60%
	A0ZNJ2_MOUSE 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [Mus musculus (Mouse) [10090]]		35	4	20,10%
	ECH1_MOUSE Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial [Mus musculus (Mouse) [10090]]	7,6	36	4	13,50%
2550	LGUL_MOUSE Lactoylglutathione lyase [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,2	21	18	53,80%
	RB11B_MOUSE Ras-related protein Rab-11B [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,6	24	6	28,00%
	PGR1_MOUSE Membrane-associated progesterone receptor component 1 [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,0	22	4	20,00%
	RHOB_MOUSE Rho-related GTP-binding protein RhoB [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,1	22	4	17,90%
	Q50HX0_MOUSE RAB14 protein [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,9	24	3	15,80%
	RAB7A_MOUSE Ras-related protein Rab-7a [Mus musculus (Mouse) [10090]]	6,4	23	3	15,00%
	RAB5C_MOUSE Ras-related protein Rab-5C [Mus musculus (Mouse) [10090]]	8,6	23	2	10,60%
	Q0PD42_MOUSE Rab13 [Mus musculus (Mouse) [10090]]	9,5	23	2	9,41%
Baisse avec le traitement IgIV					
3565	ATPB_MOUSE ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,2	56	26	51,60%
	VIME_MOUSE Vimentin [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,0	54	15	35,00%
	ATX10_MOUSE Ataxin-10 [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,1	54	10	23,20%
	AINX_MOUSE Alpha-internexin [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,4	56	8	17,10%
	SSDH_MOUSE Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial [Mus musculus (Mouse) [10090]]	8,5	56	3	6,69%
	GABT_MOUSE 4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial [Mus musculus (Mouse) [10090]]	8,4	56	2	4,00%
1024	ATPB_MOUSE ATP synthase subunit beta, mitochondrial [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,2	56	55	84,10%
	ANXA7_MOUSE Annexin A7 [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,9	50	9	19,20%
	VIME_MOUSE Vimentin [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,0	54	5	12,20%
	GABT_MOUSE 4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial [Mus musculus (Mouse) [10090]]	8,4	56	4	9,40%
	R1PL1_MOUSE RILP-like protein 1 [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,1	47	4	7,14%
	SSDH_MOUSE Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial [Mus musculus (Mouse) [10090]]	8,5	56	2	4,59%
4034	Q3UG50_MOUSE Putative uncharacterized protein [Mus musculus (Mouse) [10090]] Succinyl-CoA ligase	6,6	42	2	80,00%
	A2ALV3_MOUSE Endophilin-A1 [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,3	40	21	47,80%
	NDRG2_MOUSE Protein NDRG2 [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,2	41	7	21,80%
	CN37_MOUSE 2,3-cyclic-nucleotide-phosphodiesterase [Mus musculus (Mouse) [10090]]	9,1	47	6	13,60%
3979	KCRB_MOUSE Creatine kinase B-type [Mus musculus (Mouse) [10090]]	5,4	43	36	79,50%
	CN37_MOUSE 2,3-cyclic-nucleotide 3-phosphodiesterase [Mus musculus (Mouse) [10090]]	9,1	47	18	35,20%
	Q8BUM1_MOUSE Putative uncharacterized protein [Mus musculus (Mouse) [10090]] Succinyl-CoA ligase	6,6	45	5	18,90%
	F6Y6L6_MOUSE Cathepsin D (Fragment) [Mus musculus (Mouse) [10090]]	6,7	45	4	16,50%

Parmi l'ensemble des protéines identifiées, certaines d'entre elles ont retenu plus particulièrement notre attention de par leur nombres de peptide unique et leur pourcentage de séquence couverte, soit l'ATP synthase, la vimentin, l'actin, l'endophilin-A1, la TDP-43, la creatine kinase, la Rab11, la lactoglutathione lyase, la RhoB et la Rab14 (Tableau 5). Le pourcentage de séquence couverte permet de connaître le ratio de peptides détectés par le spectromètre de masse contenus dans une protéine donnée. Le nombre de peptides unique nous renseigne sur le nombre de peptides uniques détectés par l'appareil qui sont contenus dans une protéine donnée. C'est donc sur ces deux critères que notre niveau de confiance quant à l'identification d'une protéines est basé.

Une confirmation par immunobuvardage de la modulation de certaines de ces protéines soit par les transgènes soit par les IgIV a été réalisée (Figure 13). Seulement une des sept protéines dosées, soit la vimentin, s'est révélée être modulée par le traitement aux IgIV. En effet, on observe une stabilité de l'expression des protéines Rab11, Rab14, RohB, Endophilin-A1, ATP synthase et creatine kinase selon les différentes conditions tandis qu'on dénote une baisse de la quantité de vimentin chez la souris 3xTg-AD traitée aux IgIV (Figure 13).

Tableau 5 Protéines d'intérêt sélectionnées

# Spot	Identifiant	Protéine	Point Isoélectrique (pI)	Poids moléculaire (kDa)	Nombre de peptides uniques	Pourcentage de la séquence couverte
Augmentation de l'expression chez les 3xTgAD						
#3762	KCRB	Creatine kinase B-type	5,4	43	10	35,20%
#2550	RB11B	Ras-related protein Rab-11	5,6	24	6	28,00%
	LGUL	Lactoylglutathione lyase	5,2	21	18	53,80%
	RHOB	Rho-related GTP-binding protein RhoB	5,1	22	4	17,90%
	Q50HX0	RAB14 protein	5,9	24	3	15,80%
Diminution de l'expression avec le traitement IgIV						
#3565	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	5,2	56	26	51,60%
#1024	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	5,2	56	55	84,10%
	VIME	Vimentin	5,0	54	5	12,20%
#4034	Q3UGS0	Putative uncharacterized protein : Actin	6,6	42	2	80,00%
	A2ALV3	Endophilin-A1	5,3	40	21	47,80%
#3979	Q8BUM1	Putative uncharacterized protein : TDP-43	6,6	45	5	18,90%

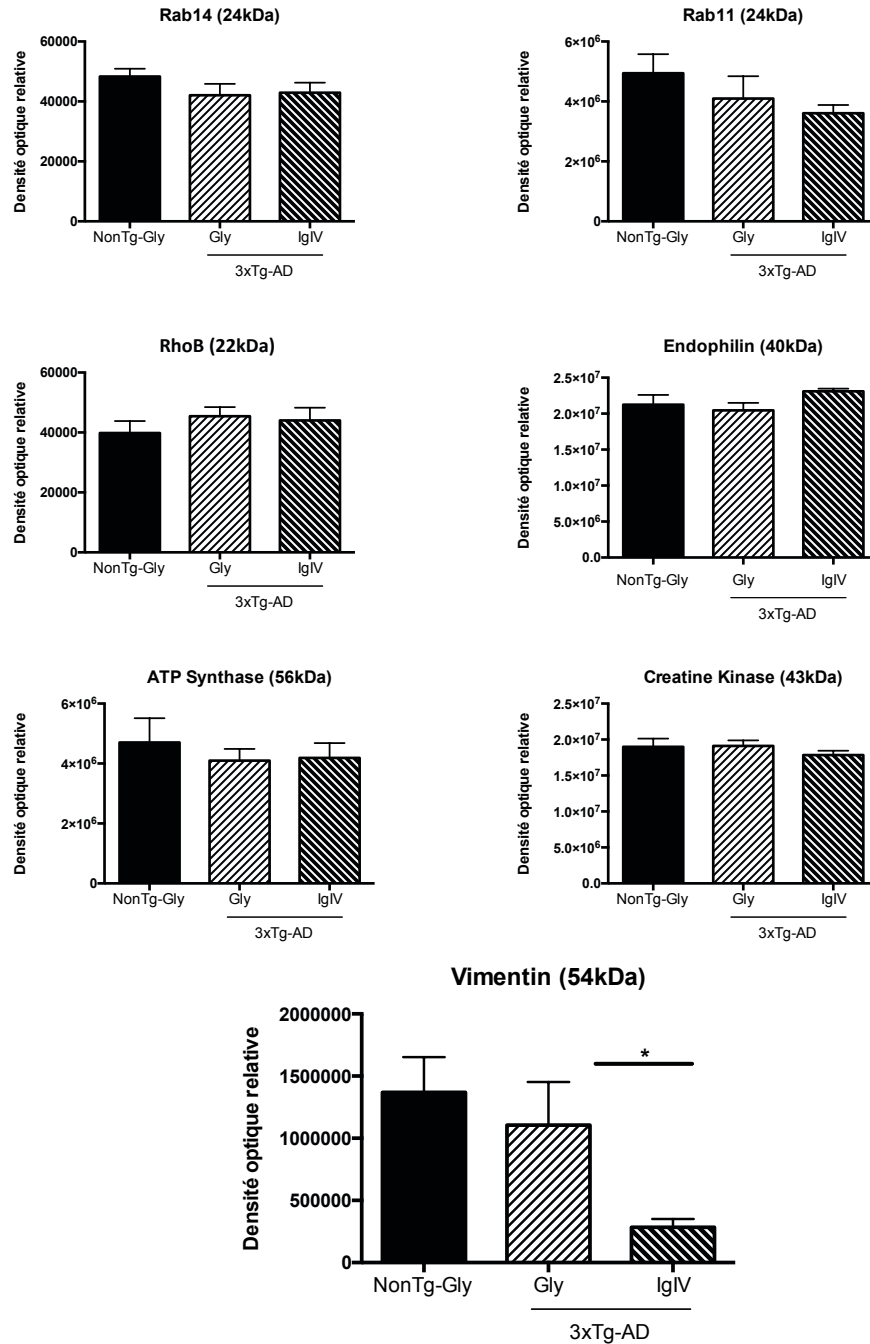


Figure 13 Confirmation des résultats en protéomique

Quantification par immunobuvardage de différentes protéines identifiées par spectrométrie de masse. Les résultats exprimés en moyenne +/- SEM de 8 souris NonTg-Gly et 10 souris 3xTgAD de chaque groupe proviennent de l'analyse de souris individuelles et sont représentatifs de l'ensemble des résultats. Le test de l'ANOVA à un facteur a été utilisé pour la comparaison statistique. *P < 0.05.

Chapitre 5 Discussion

Notre compréhension de la MA, encore aujourd'hui très limitée, empêche le développement de stratégies thérapeutiques efficaces. Récemment, la communauté scientifique a vu en les IgIV un traitement pharmacologique de choix suite aux travaux précliniques *in vivo* confirmant leur efficacité à atténuer certains aspects de la MA (Dodel et al., 2004, Relkin et al., 2008, Magga et al., 2010, Puli et al., 2012, Sudduth et al., 2013, St-Amour et al., 2014). Ce projet de maîtrise a été initié dans le but d'explorer les mécanismes d'action des IgIV afin de prévenir le risque d'une éventuelle pénurie qui serait liée à son utilisation à grande échelle pour traiter la MA.

La présence d'anticorps polyclonaux spécifiques au peptide A β dans les préparations d'IgIV suggère que leurs effets bénéfiques pourraient être reliés à une atténuation de la pathologie amyloïde (Smith et al., 2014). Il a été montré, dans notre équipe, qu'un traitement chronique aux IgIV chez la souris 3xTg-AD conduit à une réduction de 22% du ratio A β 42/A β 40 soluble ainsi que d'une diminution d'A β *56 de plus de 60% (St-Amour et al., 2014). Ainsi, puisque les plaques amyloïdes résulte d'une accumulation du peptide A β dans le cerveau et que cette accumulation serait freinée par les IgIV, nous nous attendions à observer également un effet des IgIV sur les plaques amyloïdes. Cependant, selon les résultats obtenus dans le cadre de mes travaux, les IgIV n'affectent ni le nombre ni la taille des plaques amyloïdes présentes dans le cortex des souris 3xTg-AD. Ces résultats ont été corroboré par une étude effectuée dans notre laboratoire sur la souris 3xTg-AD ayant subi un traitement similaire qui montre que les IgIV n'ont aucun impact sur l'A β insoluble ainsi que sur les plaques amyloïdes mais seulement sur l'A β soluble (St-Amour et al., 2014). L'absence d'effet des IgIV sur

les plaques amyloïdes a également été rapportée *ex vivo* sur des coupes de cerveau provenant de souris APP/PS1 (Magga et al., 2010) et *in vivo* chez la souris transgénique APdE9 traitée sur une période de 3 et de 8 mois (Puli et al., 2012). De plus, les effets bénéfiques des IgIV sur la pathologie amyloïde observés dans différentes études cliniques ne sont pas associés directement aux plaques amyloïdes mais bien aux peptides A β (Dodel et al., 2004). Ces évidences nous suggèrent donc que les IgIV procureraient leurs effets bénéfiques en agissant directement sur le peptide A β , bien avant que celui-ci ne s'agrège sous forme de plaques. L'importance de traiter précocement les patients atteints de la MA, avant même l'apparition des plaques amyloïdes, est donc renforcée par ces résultats. Dans le contexte où il s'agit d'une maladie qui nécessite plusieurs décennies de dommages neuronaux avant de voir apparaître les premiers symptômes cliniques, une intervention précoce permettrait sans doute d'améliorer l'effet thérapeutique des IgIV (Grundman et al., 2013, Relkin et al., 2014). D'ailleurs, le groupe DIAN (Dominantly Inherited Alzheimer's Network) a démarré un essai clinique chez des volontaires asymptomatiques à risque de développer la MA dans le but de déterminer si un traitement hâtif serait en mesure de freiner la maladie (Bateman et al., 2012). Dans le cadre de mes travaux, les souris ont débuté leur traitement aux IgIV à l'âge de 10 mois. Il est donc probable qu'à ce moment le processus de formation de plaques dans leur cerveau soit déjà bien enclenché, limitant le potentiel thérapeutique des IgIV. Ainsi, il serait intéressant de traiter les souris plus précocement afin de vérifier si la formation et l'abondance des plaques amyloïdes en sont affectés. D'autre part, la faible quantité d'anti-A β contenue dans les préparations d'IgIV pourrait expliquer l'absence d'effet sur les plaques amyloïdes. Une solution pour pallier à cette rareté serait d'enrichir les préparations d'IgIV en anti-A β (Loeffler, 2014). La forme la plus toxique d'A β étant l'oligomère (Lesné et al., 2006, Oddo et al., 2006, Cheng et al., 2007, Shankar et al., 2008),

l'enrichissement des anticorps spécifiques à cette conformation serait une stratégie à adopter.

Malgré la présence d'anticorps spécifiques à la protéine tau dans la préparation d'IgIV (Smith et al., 2013, 2014), les analyses biochimiques effectuées n'ont révélé aucun effet du traitement sur la pathologie tau. Ces résultats ont également été rapportés par St-Amour et collaborateurs (St-Amour et al., 2014). On peut donc se demander si, comme dans le cas des plaques amyloïdes, au moment où l'on débute le traitement aux IgIV, la pathologie n'est pas déjà trop avancée.

Les plaques amyloïdes sont connues comme étant un déclencheur de l'inflammation au cerveau. En corrélation avec la pathologie, on dénote une augmentation de l'inflammation, mesurée en post-mortem par IL-1b, TNF-a et des molécules du complément, dans le cerveau de patients atteints de la MA (McGeer & McGeer, 2002). Chez la souris 3xTg-AD, on observe une augmentation du nombre de cellules microgliales et de l'expression de TNF-a dans le cerveau par rapport aux souris contrôles (Janelins et al., 2005). De plus, l'apparition de l'inflammation chez ces souris coïncide avec la survenue des déficits cognitifs (Oddo et al., 2003, Billings et al., 2005). Une fois activée, la microglie entreprend la phagocytose des plaques amyloïdes et sécrète une variété de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1b, TNF-a et IL-6 (Sheng et al., 1997, Wegiel et al., 2003). À long terme, l'inflammation devient chronique et endommage les neurones environnants. Mes travaux ont permis de mettre en évidence la présence de cellules microgliales affichant une morphologie amiboïde autour des dépôts extracellulaires d'A β chez la souris 3xTg-AD, confirmant l'activation de la microglie en présence des plaques amyloïdes. L'augmentation de l'activation de la microglie chez la souris 3xTg-AD est partiellement corrigée par le traitement aux IgIV,

puisque qu'on observe une baisse du marqueur Iba1 dans le groupe traité. Ainsi, nos résultats suggèrent que les IgIV seraient en mesure d'inhiber en partie l'activation de la microglie et de ce fait, de possiblement diminuer l'inflammation cérébrale. D'ailleurs, St-Amour et al. ont montré que le débalancement du ratio de cytokines pro/anti-inflammatoire IL-5/IL-10 et IL-12/IL-10 est partiellement rétabli par le traitement aux IgIV chez la souris 3xTgAD (St-Amour et al., 2014). Il serait donc intéressant de mesurer dans notre modèle le niveau d'inflammation (IL-1b, TNF-a, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-12) pré- et post-traitement.

Un mécanisme possible impliquerait les récepteurs FcγR, exprimés à la surface des cellules microgliales et auxquels les IgIV ont la capacité de se lier. Les FcγR humains possèdent des fonctions régulatrices sur les cellules immunitaires qui les expriment (Ravetch et al., 2001). Le FcγRIIb, exprimé à la surface de différents leucocytes, possède un motif de signalisation intracellulaire ITIM qui inhibe l'activation cellulaire. Ce récepteur inhibiteur est identifié en périphérie comme étant impliqué dans les effets anti-inflammatoires des IgIV (Samuelsson et al., 2001, Ott et al., 2001, Crow et al., 2003). En effet, les IgIV augmenteraient l'expression de FcγRIIb à la surface des macrophages favorisant ainsi l'inhibition de son activation (Samuelsson et al., 2001). Cependant, ce mécanisme d'action a été remis en question par Nagelkerke et al. qui a récemment découvert que le FcγRIIb n'est pas régulée à la hausse dans les macrophages humains en réponse aux IgIV. Toutefois, ces macrophages répondent très bien au traitement IgIV en étant inhibé dans leur fonction de phagocytose (Nagelkerke et al., 2014). D'autre part, l'augmentation de C5a dans le cerveau de souris Tg2576 médiée par l'injection d'IgIV procurerait des effets neuroprotecteurs en améliorant la plasticité synaptique et les fonctions cognitives (Gong et al., 2013). Les IgIV auraient la capacité non seulement d'augmenter l'expression de la molécule C5a du

complément mais aussi de s'y lier (Arumugam et al., 2007). La liaison IgIV-C5a permettrait de contrer la capacité de C5a à augmenter l'expression du récepteur activateur FcγRIII et à réprimer l'expression du récepteur inhibiteur FcγRIIb à la surface des macrophages, menant ainsi à un état anti-inflammatoire (Konrad et al., 2006). Il est donc possible de penser qu'une fois dans le cerveau, les IgIV exerceraient leur effet anti-inflammatoire en inhibant l'activation de la microglie via le récepteur FcγRIIb. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si ce phénomène s'opère au niveau de la microglie des souris 3xTg-AD traitées aux IgIV en mesurant par immunobuvardage le niveau d'expression cérébrale de FcγRIIb et de C5a.

La prolifération des cellules souches neuronales dans la ZSG est finement régulée par un ensemble de stimuli physiologiques et semble sensible aux différentes pathologies neurodégénératives (Li et al., 2004, Zhao et al., 2008). Plusieurs études ont montré une baisse de neurogénèse chez la souris 3xTg-AD (Rodriguez et al., 2008, Blanchard et al., 2010, Hamilton et al., 2010). Cette diminution, observée également lors de mes travaux avec les marqueurs de neurogénèse DCX et PSA-NCAM en immunobuvardage, a été corrigée complètement par le traitement aux IgIV. Une étude menée par Puli et collaborateurs chez la souris APP/PS1 a permis de tirer des conclusions similaires (Puli et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que l'inflammation induite par la microglie dans le cerveau a la capacité d'influencer la neurogénèse (Monje et al., 2003, Ekdahl et al., 2009, Sierra et al., 2014). En effet, un milieu pro-inflammatoire diminue significativement la prolifération neuronale dans l'hippocampe. Au contraire, l'inhibition de l'activation de la microglie restaure le niveau de neurogénèse (Ekdahl et al., 2003). Ainsi, les propriétés anti-inflammatoires des IgIV permettraient non seulement de limiter les dommages neuronaux engendrés par la sur-activation de la microglie mais également de favoriser la prolifération de cellules souches neuronales. Il faut

toutefois rappeler que cette correction de la neurogénèse chez les souris traitées aux IgIV n'est observée qu'en immunobuvardage. En effet, les résultats obtenus par décompte des cellules DCX positives en histologie n'a pas permis de tirer les mêmes conclusions. L'évaluation de la neurogénèse par histologie en utilisant d'autres marqueurs tels que SOX2 et Ki67 devrait être envisagée.

Les résultats obtenus suggèrent qu'il ne s'agit non pas des anticorps spécifiques contenus dans les IgIV mais bien leur caractère anti-inflammatoire qui serait à la source des effets bénéfiques rapportés dans les études pré-cliniques et cliniques. Puisqu'un environnement peu inflammatoire restreint les dommages causés par l'activation des cellules microgliales et favorise la neurogénèse, une thérapie anti-inflammatoire pourrait être substitué à l'utilisation des IgIV dans le contexte de la MA. D'ailleurs, une étude chez la souris Tg2576 a montré que certains anti-inflammatoires non-stéroïdiens (meclofène, fenoprofène, sulindac, diclofenac, ibuprofène, flurbiprofène et indométhacine) pourraient diminuer les niveaux d'A β 42 dans le cerveau (Eriksen et al., 2003; Hirohata et al., 2008). Toutefois, les études cliniques employant les AINS, les anti-inflammatoires stéroïdiens ou l'aspirine entrepris chez des patients affectés par la MA aboutissent à des résultats contradictoires (Meinert et al., 2009, Breitner et al., 2011, Jaturapatporn et al., 2012).

Dans le cadre d'une approche plus exploratoire des mécanismes d'action des IgIV, nous avons procédé à l'analyse du protéome cérébral des souris 3xTg-AD. La protéomique est une science qui étudie le protéome, c'est à dire l'ensemble des protéines d'un organe comme par exemple le cerveau. L'avantage d'une telle approche repose sur la possibilité d'identifier, de caractériser et de quantifier ces protéines à un moment donné et sous des conditions précises.

Dans un premier temps, le protéome des souris NonTg a été comparé à celui des souris 3xTg-AD. Nous nous attendions à observer une différence reliée au produit des trois transgènes humains (APP^{swe}, PS1M146V, P301L) que portent la souris 3xTg-AD. Cependant, l'analyse en spectrométrie de masse a plutôt identifié une augmentation de l'expression des cinq protéines suivantes chez la souris transgénique : créatine kinase, Rab11, lactoylglutathione lyase, RhoB et Rab14. 1) La créatine kinase est une enzyme mitochondriale impliquée dans la formation de l'ATP. Une étude protéomique menée par Takano et collaborateurs a également identifié une augmentation de l'expression de la protéine créatine kinase chez la souris APP(E693) (Takano et al., 2012). 2) Rab11 est une GTPase impliquée dans la régulation du transport vésiculaire. Rab11 a la capacité de se lier aux protéines PS1-2 (constituants de la γ -sécrétase) (Dumanchin et al., 1999) et participe au recyclage de l'enzyme β -sécrétase (Udayar et al., 2013) ce qui suggère qu'elle aurait un rôle dans le clivage amyloïdogénique. 3) La lactoylglutathione lyase est une enzyme qui permet la détoxification du méthylglyoxal, un déchet métabolique qui serait impliqué dans la pathogenèse de la MA (Chen et al., 2006). Malgré une surexpression de la protéine dans les stades précoces et intermédiaires de la MA (Kuhla et al., 2007), la déplétion en glutathion, son co-facteur, dans le cerveau des patients paralyse son efficacité (Pocernich et Butterfield, 2012). 4) RohB est une GTPase dont l'expression est fortement induite par le vieillissement et l'apparition de dommages au cerveau (Schwarze et al., 2002, Erdö et al., 2004). 5) Rab14 est une GTPase impliquée dans le trafic de vésicules synaptiques.

En somme, il s'agit, dans la majorité des cas, de protéines ayant déjà été identifiées comme étant sur-exprimées chez les patients et/ou des modèles murins atteints de troubles neurodégénératifs, ce qui renforce les similitudes entre notre

modèle, la souris 3xTg-AD, et la neuropathologie humaine. Une analyse plus approfondie de l'importance de ces protéines ainsi que du rôle qu'elles jouent dans la MA devra être faite.

Dans un deuxième temps, le protéome des souris 3xTg-AD non-traitées a été comparé à celui des souris 3xTg-AD traitées aux IgIV. L'analyse en spectrométrie de masse a révélé une diminution de cinq protéines, soit ATP synthase, actin, endophilin-A1, TDP-43 et vimentin, suite au traitement au IgIV. 1) L'ATP synthase est une protéine membranaire qui, comme son nom l'indique, a pour fonction de synthétiser l'ATP. Le peptide A β serait en mesure de lier l'ATP synthase à la surface des neurones et de réguler son activité (Xing et al., 2012). De plus, il a été montré que contrairement aux plaques amyloïdes, le peptide A β induit une baisse de l'expression de l'ATP synthase à la surface des neurones (Schmidt et al., 2008). Comme nous observons une baisse de l'ATP synthase chez la souris traitée, on peut penser que contrairement aux résultats obtenus par St-Amour et al., le traitement aux IgIV administré dans le cadre de mes travaux n'a pas parvenu à diminuer le niveau de peptides A β dans le cerveau des souris. 2) L'actine est une protéine ubiquitaire qui forme les microfilaments du cytosquelette. Largement utilisée dans la communauté scientifique comme protéine de référence en immunobuvardage, la diminution de son expression suite au traitement IgIV remet en question son utilisation dans le cadre de mes travaux. 3) Endophilin-A1 est une protéine cytoplasmique qui régule entre autres la formation de vésicules synaptiques. Il a été montré que l'endophilin-A1 active le clivage amyloïdogénique de la protéine APP (Schabel et al., 2006). 4) La protéine TDP-43 lie l'ADN et l'ARN et est impliquée dans la régulation de la transcription et le métabolisme de l'ARN (Lagier-Tourenne et al., 2010). Des analyses post mortem ont permis d'identifier la présence de la protéine TDP-43 dans le cerveau de patient ayant souffert de la MA

(Tremblay et al., 2011). 5) La vimentine est une protéine appartenant à la famille des filaments intermédiaires dont l'expression est augmentée chez les patients souffrant de la MA (Porchet et al., 2003, Castano et al., 2013). Cette augmentation serait observée au niveau des neurones résident dans les zones particulièrement touchées par la maladie comme l'hippocampe et résulterait d'un mécanisme de réponse aux dommages (Levin et al., 2009, Lucotte et al., 2014). De plus, la vimentine serait impliqué dans l'activation de la microglie. En effet, la délétion de la protéine compromet l'activation de la microglie *in vitro* (Jiang et al., 2014). Il s'agit de la seule protéine pour laquelle une confirmation de sa diminution en immunobuvardage chez la souris traitée a été observée. Ainsi, la diminution de la concentration de cette protéine dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD traitées aux IgIV suggère que le traitement réduirait les dommages neuronaux causés par la MA et participerait au contrôle de l'activation de la microglie.

En somme, ces différentes protéines sont impliquées, de près ou de loin, dans la pathogenèse de la MA. Ainsi, nos résultats, qui montrent une réduction de l'expression de ces protéines chez la souris traitée, renforcent le potentiel thérapeutique des IgIV.

Chapitre 6 Conclusion

L'objectif principal de ce mémoire était d'explorer les mécanismes d'action impliqués dans les effets bénéfiques que procurent les IgIV dans la MA. Mes travaux ont permis de montrer que les IgIV n'ont pas d'effet direct sur les pathologies amyloïde soluble et tau et que leur cible serait plutôt les cellules microgliales. Le caractère immunomodulateur des IgIV aurait pour conséquence l'inhibition de l'activation de la microglie. En générant un environnement anti-inflammatoire dans le cerveau, les IgIV favoriseraient la reprise de la neurogénèse contribuant ainsi au remplacement de neurones endommagés par la maladie. Des efforts de recherche sont encore nécessaires afin de mieux comprendre comment les IgIV interagissent les cellules microgliales. Mes travaux ont également permis d'identifier différentes protéines modulées par les IgIV qui pourraient être impliquées dans leurs mécanismes d'action. Globalement, ces résultats suggèrent que la microglie modulée par les IgIV pourrait être une éventuelle cible thérapeutique pour la MA et proposent par conséquent que le contrôle de l'activation de la microglie ainsi que la stimulation de la neurogénèse par voie pharmacologique pourrait être utilisée comme une alternative aux IgIV.

BIBLIOGRAPHIE

Ahtiluoto, S., Polvikoski, T., Peltonen, M., Solomon, A., Tuomilehto, J., Winblad, B., Sulkava, R., Kivipelto, M. Diabetes, Alzheimer disease, and vascular dementia: a population-based neuropathologic study. *Neurol* 2010; 75(13): 1195-1202.

Aisen, PS., Cummings, J. and Schneider, LS. Symptomatic and nonamyloid/tau based pharmacologic treatment for Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(3): a006395.

Alonso, M., Martinez, A. GSK-3 inhibitors: discoveries and developments. *Curr Med Chem* 2004; 11(6): 755-763.

Altman, J. Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Exp Neurol* 1962; 5 : 302-318.

Altman, J. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neur* 1965; 124 : 319-336.

Alzheimer, A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und phychish - Gerichtliche Medizin* 1907; 64: 146-148.

Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2013; 9(2): 208–245.

Arendt, T., Bruckner, M.K., Lange, M. and Bigl, V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development -A study of molecular forms. *Neurochem Int* 1992; 21(3): 381-396.

Asami-Odaka, A., Obayashi-Adachi, Y., Matsumoto, Y., et al. Passive immunization of the Abeta42(43) C-terminal-specific antibody BC05 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 2005; 2(1): 36–43.

Bach, JP., Dodel, R. Naturally occurring autoantibodies against β -Amyloid. *Adv Exp Med Biol* 2012; 750: 91-99.

Bachstetter, AD., Morganti, JM., Jernberg, J., Schlunk, A., Mitchell, SH., Brewster, KW., et al. Fractalkine and CX(3)CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 2011; 32: 2030–2044.

Bailey, SL., Carpentier, PA., McMahon, EJ., Begolka, WS., Miller, SD. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol* 2006; 26: 149-188.

Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, RL., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 2000; 6: 916–9.

Bath, KG., Akins, MR. and Lee, FS. BDNF control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Psychobiol* 2012; 54: 578–589.

Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. The toxic Ab oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 2012; 15: 349–357.

Benraiss, A., Chmielnicki, E., Lerner, K., Roh, D., Goldman, SA. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* 2001; 21(17): 6718–6731.

Belinson, H., Lev, D., Masliah, E. & Michaelson, D. M. Activation of the amyloid cascade in apolipoprotein E4 transgenic mice induces lysosomal activation and neurodegeneration resulting in marked cognitive deficits. *J. Neurosci* 2008; 28: 4690–4701.

Bertram, L. & Tanzi, R. E. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta- analyses. *Nature Rev. Neurosci* 2008; 9: 768–778.

Bertram L. Alzheimer's disease genetics current status and future perspectives. *Int Rev Neurobiol* 2009; 84: 167-84.

Bhaskar K., Konerth M., Kokiko-Cochran O. N., Cardona A., Ransohoff R. M., Lamb B. T. (2010). Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* 2010; 68(1): 19-31.

Bitan, G., Vollers, SS., Teplow, DB. Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid beta-protein oligomerization. *J Biol Chem* 2003; 278: 34882–9.

Bilkei-Gorzo, A. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol & Therapeu* 2014; 142(2): 244-257.

Billings, LM., Oddo, S., Green, KN., McLaugh, JL., and LaFerla, FM. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 2005; 45: 675–688.

Blanchard J, Wanka L, Tung YC, Cárdenas-Aguayo Mdel C, LaFerla FM, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Pharmacologic reversal of neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting A β and tau pathologies in 3xTg-AD mice. *Acta Neuropathol* 2010; 120(5): 605-621.

Borchelt, DR., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, MK., Gonzales, V., Jenkins, NA., Copeland, NG., Price, DL., Sisodia, SS. Accelerated amyloid de- position in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 1997; 19: 939-945.

Bourasset, F., M. Ouellet, C. Tremblay, C. Julien, T.M. Do, S. Oddo, F. Laferla, and F. Calon. Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacol* 2009; 56: 808-813.

Braak, H., and E. Braak. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 271-278.

Bramblett, GT., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, SE., Trojanowski, JQ., Lee, VM. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 1993; 10: 1089-1099.

Britschgi, M., Olin, CE., Johns, HT., Takeda-Uchimura, Y., LeMieux, MC., Rufibach, K., Rajadas, J., Zhang, H., Tomooka, B., Robinson, WH., Clark, CM., Fagan, AM., Galasko, DR., Holtzman, DM., Jutel, M., Kaye, JA., Lemere, CA., Leszek, J., Li, G., Peskind, ER., Quinn, JF., Yesavage, JA., Ghiso, JA., Wyss-Coray, T. Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 12145-50.

Bories, C., Guitton, M.J., Julien, C., Tremblay, C., Vandal, M., Msaid, M., De Koninck, Y. and Calon, F. Sex-dependent alterations in social behaviour and cortical synaptic activity coincide at different ages in a model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012; 7: e46111.

Bolmont, T., Haiss, F., Eicke, D., Radde, R., Mathis, CA., Klunk, WE., Kohsaka, S., Jucker, M., Calhoun, ME. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci* 2008; 28: 4283–4292.

Calon, F., Cole, G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007 ; 77: 287-293.

Castano, EM., Maarouf, CL., Wu, T., Leal, MC., Whiteside, CM., Lue, LF., Kokjohn, TA., Sabbagh, MN., Beach, TG., and Roher, AE. Alzheimer disease periventricular white matter lesions exhibit specific proteomic profile alterations. *Neurochem Int* 2013; 62: 145-156.

Chadwick, W., Mitchell, N., Carroll, J., Zhou, Y., Park, SS., Wang, L., Becker, KG., Zhang, Y., Lehrmann, E., Wood, WH. 3rd, Martin, B., Maudsley, S. Amitriptyline-mediated cognitive enhancement in aged 3×Tg Alzheimer's disease mice is associated with neurogenesis and neurotrophic activity. *PLoS One* 2011; 6(6): e21660.

Chafekar, SM., Bass, F., Scheper, W. Oligomer-specific Aβ toxicity in cell models is mediated by selective uptake. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782: 523-531.

Chevalier, NL., Soriano, S., Kang, DE., et al. Perturbed neurogenesis in the adult hippocampus associated with presenilin-1 A246E mutation. *Am J Pathol* 2005; 167: 151–159.

Chen, K., Maley, J., Yu, P. H. Potential implications of endogenous aldehydes in beta-amyloid misfolding, oligomerization and fibrillogenesis. *J Neurochem* 2006; 99: 1413–1424.

Cheng, IH., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, JJ., Gerstein, H., Bien-Ly, N., Puolivali, J., Lesne, S., Ashe, KH., Muchowski, PJ., and Mucke, L. Accelerating

amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* 2007; 282: 23818-23828.

Cheng, MJ., Christmas, C. Special considerations with the use of intravenous immunoglobulin in older persons. *Drugs Aging* 2011; 28: 729–36.

Chertkow, H., Feldman, HH., Jacova, C. and Massoud, F. Definitions of dementia and predementia states in Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment: consensus from the Canadian conference on diagnosis of dementia. *Alzheimers Res Ther* 2013; 5: S2.

Choi, SH., Veeraraghavalu, K., Lazarov, O., Marler, S., Ransohoff, RM., Ramirez, JM., Sisodia, SS. Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. *Neuron* 2008; 59: 568-580.

Cleary, JP. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 2005; 8: 79–84.

Cole, GM., Ma, QL., Frautschy, SA. Dietary fatty acids and the aging brain. *Nutr Rev* 2010 ; 68(2): S102-III.

Corder, EH., Saunders, AM., Strittmatter, WJ., Schmechel, DE., Gaskell, PC., Small, GW., Roses, AD., Haines, JL., Pericak-Vance, MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921–923.

Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H.-G. and Aigner, L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 1–14.

Crews, L., Adame, A., Patrick, C., Delaney, A., Pham, E., Rockenstein, E., Hansen, L., Masliah, E. Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *J Neurosci* 2010; 30: 12252-12262.

Crow, AR., Song, S., Freedman, J., et al. IVIg-mediated amelioration of murine ITP via FcγRIIB is independent of SHIP 1, SHP-1, and Btk activity. *Blood* 2003; 102: 558-560.

Dickstein, DL., Biron, KE., Ujii, M., Pfeifer, CG., Jeffries, AR., Jefferies, WA. Abeta peptide immunization restores blood-brain barrier integrity in Alzheimer disease. *FASEB J* 2006; 20: 426–433.

Deane, R. et al. LRP/amyloid β -peptide interaction mediates differential brain efflux of A β isoforms. *Neuron* 2004; 43: 333–344.

Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, RK., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, AM., Armstrong, DL., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D., Zlokovic, B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 2003; 9: 907-913.

Demars, M., Hu, YS., Gadadhar, A., Lazarov, O. Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res* 2010; 88: 2103-2117.

DeMattos, RB., Bales, KR., Cummins, DJ., Dodart, JC., Paul, SM., Holtzman, DM. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8850-8855.

DeMattos, RB., Bales, KR., Cummins, DJ., Paul, SM., and Holtzman, DM. Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 2002; 295: 2264-2267.

Deng, W., Saxe, MD., Gallina, IS., Gage, FH. Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci* 2009; 29: 13532–13542.

Deng, W., Aimone, JB., Gage, FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 2010, 11: 339-350.

Dodart, JC., Bales, K., Gannon, K., Greene, S., DeMattos, R., Mathis, C., DeLong, C., Wu, S., Wu, X., Holtzman, DM., Paul, S. Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nature Neurosci* 2002; 5: 452–457.

Dodel, R.C., Y. Du, C. Depboylu, H. Hampel, L. Frolich, A. Haag, U. Hemmeter, S. Paulsen, S.J. Teipel, S. Brettschneider, A. Spottke, C. Nolker, H.J. Moller, X. Wei, M. Farlow, N. Sommer, and W.H. Oertel. Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75: 1472-1474.

Dodel, R., Hampel, H., Depboylu, C., Lin, S., Gao, F., Schock, S., Jackel, S., Wei, X., Buerger, K., Hoft, C., Hemmer, B., Moller, HJ., Farlow, M., Oertel, WH., Sommer, N., and Du, Y. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002; 52: 253-256.

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5), American Psychiatric Association, ISBN-13: 9780890425558.

Doody, RS. Report from the Alzheimer's Disease Cooperative Study. Oral presentation at the Annual Meeting of American Neurological Association, Boston, Oct. 2012

Doody, RS., Thomas, RG., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, PS., Siemers, E., Liu-Seifert, H., Mohs, R. Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee; Solanezumab Study Group. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2014; 370(4): 311-321.

Dodel, R., Rominger, A., Bartenstein, P., Barkhof, F., Blennow, K., Forster, S., Winter, Y., Bach, JP., Popp, J., Alferink, J., Wiltfang, J., Buerger, K., Otto, M., Antuono, P., Jacoby, M., Richter, R., Stevens, J., Melamed, I., Goldstein, J., Haag, S., Wietek, S., Farlow, M. and Jessen, F. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol* 2013; 12(3): 233-243.

Dodel, R., Hampel, H., Depboylu, C., Lin, S., Gao, F., Schock, S., Jäckel, S., Wei, X., Buerger, K., Höft, C., Hemmer, B., Möller, HJ., Farlow, M., Oertel, WH., Sommer, N. and Du, Y. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002; 52: 253-256.

Du, Y., Dodel, R., Hampel, H., et al. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology* 2001; 57: 801-805.

Du, Y., Wei, X., Dodel, R., Sommer, N., Hampel, H., Gao, F., Ma, Z., Zhao, L., Oertel, WH. and Farlow, M. Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Brain* 2003; 126: 1935-1939.

Evin, G., Weidemann, A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* 2002; 23: 1285-97.

Ekdahl, CT., Kokaia, Z., Lindvall, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neurosci* 2009; 158: 1021-1029.

Erdö, F., Trapp, T., Mies, G. & Hossmann, KA. Immunohistochemical analysis of protein expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *Acta Neuropathol* 2004; 107: 127-136.

Farrer, LA., Cupples, LA., Haines, JL., Hyman, B., Kukull, WA., Mayeux, R., Myers, RH., Pericak-Vance, MA., Risch, N., van Duijn, CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 1997; 278(16): 1349-1356.

Faure, A., Verret, L., Bozon, B., El Tannir El Tayara, N., Ly, M., Kober, F., Dhenain, M., Rampon, C., Delatour, B. Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2011; 32(3): 407-418.

Fillit, H., G. Hess, J. Hill, P. Bonnet, and C. Toso. IV immunoglobulin is associated with a reduced risk of Alzheimer disease and related disorders. *Neurology*. 2009; 73: 180-185.

Filali, M., R. Lalonde, P. Theriault, C. Julien, F. Calon, and E. Planel. Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behav Brain Res* 2012 ; 234: 334-342.

Frauger, E., Grassi, J., Pradel, V., Bornet, C., Rouby, F., Delorme, J., Ousset, S., Braguer, D., Azulay, JP., Penot-Ragon, C., Harle, JR., Bongrand, MC., Weiller, PJ., Pouget, J., Michel, G., Micallef, J., Reynier, JP., Tardieu, S., Vanelle, P., Blin, O. Immunoglobulin Study Group. Use of intravenous immunoglobulins in clinical

practice: data from three French university hospitals. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25(6): 753-761.

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., Guido, T., Hagopian, S., Johnson-Wood, K., Khan, K., Lee, M., Leibowitz, P., Lieberburg, I., Little, S., Masllah, E., McConlogue, L., Montoya-Zavala, M., Mucke, L., Paganini, L., Pennlman, E., Power, M., Shenk, D., Seubert, P., Snyder, B., Soriano, F., Tan, H., Vitale, J., Wadsworth, S., Wolozin, B., Zhao, J. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373: 523-527.

Gauthier, S., Patterson, C., Chertkow, H., Gordon, M., Herrmann, N., Rockwood, K., Rosa-Neto, P. and Soucy, JP. Recommendations of the 4th Canadian Consensus Conference on the Diagnosis and Treatment of Dementia (CCCDTD4). *Can Geriatr J* 2012; 15: 120-126.

Gauthier, S., Loft, H., Cummings, J. Improvement in behavioural symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease by memantine: a pooled data analysis. *Int J Geriatr Psychiatry* 2008; 23(5): 537-545.

Gang, B., Yue, C., Han, N., Xue, H., Li, B., Sun, L., Li, X., Zhao, Q. Limited hippocampal neurogenesis in SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2011; 1389: 183-193.

Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, GW. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Rev* 1995; 20(3): 269–287.

Geylis, V., Kourilov, V., Meiner, Z., et al. Human monoclonal antibodies against amyloid-beta from healthy adults. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 597–606.

Gelfand, EW. Intravenous immune globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *N Engl J Med* 2012; 367(21): 2015-2025.

Gilman, S., Koller, M., Black, RS. et al. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 2005; 64(9): 1553–1562.

Glabe, CG. Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem* 2008; 283: 29639–29643.

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

Gong, B. et al. IVIG immunotherapy protects against synaptic dysfunction in Alzheimer's disease through complement anaphylatoxin C5a-mediated AMPA-CREB-C/EBP signaling pathway. *Mol Immuno* 2013; 56: 619–629.

Gong, Y., Chang, L., Viola, KL., Lacor, PN., Lambert, MP., Finch, CE., Krafft, GA., Klein, WL. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10417-10422.

Gotz, J., Chen, F., Van Dorpe, J., Nitsch, RM. Formation of neurofibrillary tangles in P301 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 2001; 293: 1491–1495.

Gouras, GK., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, JP., Haroutunian, V., Buxbaum, JD., Xu, H., et al. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 2000; 156: 15-20.

Grundman, M., A. DiBernardo, N. Raghavan, M. Krams, and E. Yuen. 2012: a watershed year for Alzheimer's disease research. *J Nutr Health Aging* 2013; 17: 51-53.

Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, JS., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, JC., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., Powell, J., St George-Hyslop, P., Singleton, A. and Hardy, J. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013; 368:117-127.

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. and Sisodia, S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(5): a006270.

Hamilton, A., Holscher, C. The effect of ageing on neurogenesis and oxidative stress in the APP(swe)/PS1(deltaE9) mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2012; 1449(17): 83-93.

Hamilton, LK., Aumont, A., Julien, C. et al. Widespread deficits in adult neurogenesis precede plaque and tangle formation in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 2010; 32: 905–920.

Hanger, DP., Anderton, BH. and Noble, W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*. 2009; 15: 112-119.

Hanger, DP., Byers, HL., Wray, S., Leung, KY., Saxton, MJ., Seereeram, A., Reynolds, CH., Ward, MA. and Anderton, BH. Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem*. 2007; 282(32): 23645-23654.

Hardy, J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal., *J Neurochem* 2009; 110: 1129-1134.

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

Harold, D., R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, M.L. Hamshere, J.S. Pahwa, V. Moskvina, K. Dowzell, A. Williams, N. Jones, C. Thomas, A. Stretton, A.R. Morgan, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M.K. Lupton, C. Brayne, D.C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, K. Morgan, K.S. Brown, P.A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A.D. Smith, S. Love, P.G. Kehoe, J. Hardy, S. Mead, N. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, B. Schurmann, H. van den Bussche, I. Heuser, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frolich, H. Hampel, M. Hull, D. Rujescu, A.M. Goate, J.S. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J.C. Morris, K. Mayo, K. Sleegers, K. Bettens, S. Engelborghs, P.P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, G. Livingston, N.J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C.E. Shaw, M. Tsolaki, A.B. Singleton, R. Guerreiro, T.W. Muhleisen, M.M. Nothen, S. Moebus, K.H. Jockel, N. Klopp, H.E. Wichmann, M.M. Carrasquillo, V.S. Pankratz, S.G. Younkin, P.A. Holmans, M. O'Donovan, M.J. Owen, and J. Williams. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009; 41: 1088-1093.

Hassing, LB., Dahl, AK., Thorvaldsson, V., Berg, S., Gatz, M., Pedersen, NL., Johansson, B. Overweight in midlife and risk of dementia: a 40-year follow-up study. *Int J Obes* 2009; 33(8): 893-898.

Hebert, LE., Weuve, J., Scherr, PA., Evans, DA. Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurol* 2013; 80: 1778–1783.

Hebert, LE., Scherr, PA., McCann, JJ., Beckett, LA., Evans, DA. Is the risk of developing Alzheimer's disease greater for women than for men? *Am J Epidemiol* 2001; 153(2): 132-6.

Heneka, MT., O'Banion, MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 2007; 184(1–2): 69–91.

Hellweg, R., Wirth, Y., Janetzky, W., Hartmann, S. Efficacy of memantine in delaying clinical worsening in Alzheimer's disease (AD): responder analyses of nine clinical trials with patients with moderate to severe AD. *Int J Geriatr Psychiatry* 2012; 27: 651-656.

Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, JC., Carrasquillo, MM., Abraham, R., Hamshere, ML., Pahwa, JS., Moskvina, V., Dowzell, K., Jones, N., Stretton, A., Thomas, C., Richards, A., Ivanov, D., Widdowson, C., Chapman, J., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, MK., Brayne, C., Rubinsztein, DC., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Brown, KS., Passmore, PA., Craig, D., et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2011; 43: 429-435.

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

Hort, J., O'Brien, JT., Gainotti, G., Pirttila, T., Popescu, BO., Rektorova, I., Sorbi, S., Scheltens, P. EFNS Scientist Panel on Dementia. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2010; 17(10): 1236-48.

Hoover, BR., Reed, MN., Su, J., Penrod, RD., Kotilinek, LA., Grant, MK., Pitstick, R., Carlson, GA., Lanier, LM., Yuan, LL., et al. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 2010 ; 68 : 1067–1081.

Hyman, BT., Phelps, CH., Beach, TG., Bigio, EH., Cairns, NJ., Carrillo, MC., Dickson, DW., Duyckaerts, C., Frosch, MP., Masliah, E., Mirra, SS., Nelson, PT.,

Schneider, JA., Thal, DR., Thies, B., Trojanowski, JQ., Vinters, HV., Montine, TJ. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2012; 8(1): 1-13.

Imai, Y. & Kohsaka, S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: Role of Iba1. *Glia.* 2002 ; 40: 164–174.

Ito D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., Fukuuchi, Y. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke.* 2001; 32(5): 1208-1215.

Iqbal, K., Alonso, AC., Chen, S., et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1739: 198-210.

Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., Ihara, Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 1994; 13(1): 45-53.

Janelins, MC., Mastrangelo, MA., Oddo, S., LaFerla, FM., Federoff, HJ., and Bowers, WJ. Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation* 2005; 2: 23.

Janson, J. et al. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 2004; 53: 474–481.

Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, PM., Jiang, Y., Schmidt, SD., Chishti, MA., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, HT., Nixon, RA., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, PE., St George-Hyslop, P., Westaway, D. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000; 408: 979-982.

Jarrett, JT., Berger, EP., and Lansbury, PTJ. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem* 1993; 32: 4693-4697.

Jaturapatporn, D., Isaac, MG., McCleery, J. and Tabet, N. 2012. Aspirin, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2:CD006378.

Jiang, SX., Slinn, J., Aylsworth, A., Hou, ST. Vimentin participates in microglia activation and neurotoxicity in cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2012 Aug; 122(4): 764-74.

Jin, K., Peel, AL., Mao, XO., Xie L, Cottrell BA, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 343–347.

Jones, L. et al. Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 2010; 5: e13950.

Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., I. Jonsdottir, P.V. Jonsson, J. Snaedal, S. Bjornsson, J. Huttenlocher, A.I. Levey, J.J. Lah, D. Rujescu, H. Hampel, I. Giegling, O.A. Andreassen, K. Engedal, I. Ulstein, S. Djurovic, C. Ibrahim-Verbaas, A. Hofman, M.A. Ikram, C.M. van Duijn, U. Thorsteinsdottir, A. Kong, and K. Stefansson. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013; 368:107-116.

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

Kile, S., et al. Initial Findings of a Randomized Double-Blinded Placebo-Controlled Study of Intravenous Immunoglobulin in Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer Disease. *AAN* 2013; Abstract P01-013

King, ME., Kan, HM., Baas, PW., Erisir, A., Glabe, CG., Bloom, GS. Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid. *J Cell Biol* 2006; 175(4): 541-546.

Kingwell, K. Alzheimer disease: Amyloid- β immunotherapy CAD106 passes first safety test in patients with Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2012; 8(8): 414.

Kotilinek, LA., Bacskai, B., Westerman, M., et al. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002; 22(15): 6331–6335.

Kraepelin E, 1910 Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte Band II Klinische Psychiatrie 8th edition

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

Kuhla, B., Boeck, K., Schmidt, A., Ogunlade, V., Arendt, T., Munch, G., Luth, H. J. Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging* 2007; 28 : 29–41.

Kumar-Singh, S., Theuns, J., Van Broeck, B., Pirici, D., Vennekens, K., Corsmit, E., Cruts, M., Dermaut, B., Wang, R., Van Broeckhoven, C. Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A β 42 and decreased A β 40. *Hum Mutat* 2006; 27: 686-695.

Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., and Cleveland, DW. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 2010; 19: R46-64.

Lambert, JC., et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2009; 41:1094-1099.

Lashuel, HA., Lansbury, PT Jr. Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Q Rev Biophys* 2006; 39: 167–201.

Lee, J., Culyba, EK., Powers, ET. & Kelly, JW. Amyloid-beta forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nat Chem Biol* 2011; 7, 602–609.

Lee, EB., Leng, LZ., Zhang, B., Kwong, L., Trojanowski, JQ., Abel, T., and Lee, VMY. Targeting Amyloid-beta Peptide (A β) Oligomers by Passive Immunization with a Conformation-selective Monoclonal Antibody Improves Learning and Memory in A β Precursor Protein (APP) Transgenic Mice. *J Biol Chem* 2006; 281: 4292-4299.

Lee, S., Varvel, NH., Konerth, ME., Xu, G., Cardona, AE., Ransohoff, RM., et al. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid

deposition in two alzheimer's disease mouse models. *Am J Pathol* 2010; 177: 2549–2562.10.2353

Lemere, CA., Spooner, ET., Leverone, JF., Mori, C., Iglesias, M., Bloom, JK., and Seabrook, TJ. Amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease transgenic mouse models and wildtype mice. *Neurochem. Res.* 2003 ; 28 : 1017–1027.

Lemieux, R., Bazin, R., Néron, S. Therapeutic intravenous immunoglobuling. *Molecular Immunology* 2005; 42: 839–848.

Leong, H., et al., Unlabeled uses of intravenous immune globulin. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65(19): 1815-24.

Lesne, S., Koh, MT., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, CG., Yang, A., Gallagher, M. and Ashe, KH. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006; 440: 352-357.

Levin, EC., Acharya, NK., Sedeyn, JC., Venkataraman, V., D'Andrea, MR., Wang, HY., Nagele, RG. Neuronal expression of vimentin in the Alzheimer's disease brain may be part of a generalized dendritic damage-response mechanism. *Brain Res* 2009; 1298:194-207.

Levites, Y., Smithson, LA., Price, RW. et al. Insights into the mechanisms of action of anti-Aβ antibodies in Alzheimer's disease mouse models. *FASEB J* 2006; 20: 2576–8.

Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, DM., Oshima, J., Pettingell, WH., Yu, CE., Jondro, PD., Schmidt, SD., Wang, K., et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995; 269: 973–977.

Li, Q., Lebson, L., Lee, DC., Nash, K., Grimm, J., Rosenthal, A., Selenica, ML., Morgan, D. and Gordon, MN. Chronological age impacts immunotherapy and monocyte uptake independent of amyloid load. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7: 202-214.

Lie, DC., et al. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 399–421.

Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hébert, R., Helliwell, B., Hill, G.B., McDowell, I. Risk Factors for Alzheimer's Disease: A Prospective Analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 445-453.

Lipton, SA. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov* 2006; 5: 160-170.

Liu, Y.H., Giunta, B., Zhou, H.D., Tan, J., and Wang, Y.J. Immunotherapy for Alzheimer disease: the challenge of adverse effects. *Nat Rev Neurol* 2012 ; 8: 465-469.

Loeffler, DA. Should development of Alzheimer's disease-specific intravenous immunoglobulin be considered? *J Neuroinfla* 2014; 11(1): 198.

Lombardo, JA., Stern, EA., McLellan, ME., et al. Amyloid-beta antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alterations. *J Neurosci* 2003; 23(34): 10879–10883.

Lopez-Toledano, MA., Shelanski, ML. Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw, Ind). *J Alzheimers Dis* 2007; 12: 229-240.

Lucotte, B., Tajhizi, M., Alkhatib, D., Samuelsson, E. B., Wiehager, B., Schedin-Weiss, S., Sundstrom, E., Winblad, B., Tjernberg, L. O., and Behbahani, H. Stress Conditions Increase Vimentin Cleavage by Omi/HtrA2 Protease in Human Primary Neurons and Differentiated Neuroblastoma Cells. *Mol Neurobiol* 2014 ; Epub 2014 Oct 8.

Lyketsos, CG., Steinberg, M., Tschanz, JT., Norton, MC., Steffens, DC., Breitner, JC. Mental and behavioral disturbances in dementia: findings from the Cache County Study on Memory in Aging. *Am J Psychiatry* 2000;157:708–14.

Ma, DK., Bonaguidi, MA., Ming, GL., Song, H. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res* 2009; 19: 672–682.

Magga, J., Puli, L., Pihlaja, R., Kanninen, K., Neulamaa, S., Malm, T., Hartig, W., Grosche, J., Goldsteins, G., Tanila, H., Koistinaho, J., and Koistinaho, M. Human intravenous immunoglobulin provides protection against Abeta toxicity by multiple mechanisms in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinfla* 2010; 7: 90.

Maier, M., Seabrook, T.J., Lazo, N.D., Jiang, L., Das, P., Janus, C., Lemere, C.A. Short amyloid-beta (A β) immunogens reduce cerebral A β load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an A β -specific cellular immune response. *J Neurosci* 2006; 26:4717– 4728.

Mayeux, R., and Stern, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspect Med* 2012; 2(8): a006239.

McGeer, P.L., and McGeer, E.G. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J Neurovirol* 2002; 8: 529–538

McKhann, G.M., et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging – Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: J Alz Ass* 2011; 7(3): 263-269.

Mesulam, M. Cholinergic Aspects of Aging and Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* 2012; 71(9): 760–761

Meyer-Luehmann, M., Spires-Jones, T.L., Prada, C., Garcia-Alloza, M., De Calignon, A., Rozkalne, A., Koenigsknecht-Talboo, J., Holtzman, D.M., Bacskai, B.J., Hyman, B.T. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 2008; 451: 720–724.

Mintun MA, Vlassenko A, Sheline YI, Morris JC. Longitudinal PIB PET imaging of the appearance and accumulation of beta-amyloid in cognitively normal middle and late life adults. *Alz Dement* 2010; 6: S2.

Monje, M.L., Toda, H., Palmer, T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003; 302(5651): 1760-1765.

Morris, M., Maeda, S., Vessel, K., and Mucke, L. The many faces of tau. *Neuron* 2011; 70, 410–426.

Morris, J.C., Roe, C.M., Grant, E.A. et al. Pittsburgh compound B imaging and prediction of progression from cognitive normality to symptomatic Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2009; 66: 1469-1475.

Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C.,

Gordon, M., Arendash, GW. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000; 408: 982–985.

Mohamed, A., Cortez, L., De Chaves, EP. Aggregation state and neurotoxic properties of alzheimer β -amyloid peptide. *Curr Protein Pept Sci* 2011; 12(3): 235-57.

Mucke, L., Masliah, E., Yu, GQ., Mallory, M., Rockenstein, EM., Tatsuno, G., Hu, K., et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 2000; 20: 4050–4058.

Mawuenyega, KG., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, JC., et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 2010; 330: 1774.

Nagelkerke, SQ., Dekkers, G., Kustiawan, I., van de Bovenkamp, FS., Geissler, J., Plomp, R., et al. Inhibition of Fc γ R-mediated phagocytosis by IVIg is independent of IgG-Fc sialylation and Fc γ RIIb in human macrophages. *Blood* 2014; 124:3709–18.

Nelson, P.T., Braak, H., and Markesbery, W.R. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68(1): 1-14.

Nelson, PT., Alafuzoff, I., Bigio, EH., Bouras, C., Braak, H., Cairns, NJ., Castellani, RJ., Crain, BJ., Davies, P., Del Tredici, K., Duyckaerts, C., Frosch, MP., Haroutunian, V., Hof, PR., Hulette, CM., Hyman, BT., Iwatsubo, T., Jellinger, KA., Jicha, GA., Kovari, E., Kukull, W.A., Leverenz, JB., Love, S., Mackenzie, IR., Mann, DM., Masliah, E., McKee, A.C., Montine, T.J., Morris, J.C., Schneider, JA., Sonnen, JA., Thal, DR., Trojanowski, JQ., Troncoso, JC., Wisniewski, T., Woltjer, RL., and Beach, TG. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71:362-381.

Nicoll, JA., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., Weller, RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 2003; 9:448-452.

Noguchi, A. et al. Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (Abeta) assembly from Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 2009; 284: 32895–32905.

Oddo, S., Billings, L., Kesslak, JP., Cribbs, DH., LaFerla, FM. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyper-phosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* 2004; 43: 321–32.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, JD., Murphy, MP., Golde, TE., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, MP., Akbari, Y. and LaFerla, FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003; 39: 409-421

Oddo, S., Vasilevko, V., Caccamo, A., Kitazawa, M., Cribbs, DH. and FM. LaFerla. Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* 2006; 281: 39413-39423.

Olariu, A., Cleaver, KM., Cameron, HA. Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle. *J Comp Neurol* 2007; 501: 659-667.

Orgogozo, JM., Gilman, S., Dartigues, JF., Laurent, B., Puel, M., Kirby, LC., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, BF., Boada, M., Frank, A., Hock, C. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 2003; 61: 46-54.

Ott, VL., Fong, DC., Cambier, JC. Fc gamma RUB as a potential molecular target for intravenous gamma globulin therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: S95-98.

Panott, MD, and Greenwood, CE. Dietary influences on cognitive function with aging: from high-fat diets to healthful eating. *Ann N Y Acad Sci* 2007 ; 7774 : 389-397.

Pedrini, S., Thomas, C., Brautigam, H., Schmeidler, J., Ho, L., Fraser, P., Westaway, D., Hyslop, P.S.G., Martins, R.N., Buxbaum, J.D., Pasinetti, G.M., Dickstein, D.L., Hof, P.R., Ehrlich, M.E., and Gaudy, S. Dietary composition modulates brain mass and solubilizable Abeta levels in a mouse model of aggressive Alzheimer's amyloid pathology. *Mol Neurodegener* 2009 ; 4 :40.

Pencea, V., Bingaman, KD., Wiegand, SJ., Luskin, MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 2001 ; 21(17) : 6706–6717.

Pocernich, CB., Butterfield, AD. Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Acta* 2012; 1822, 625–630.

Price, JL., McKeel, DW., Jr., Buckles, VD., Roe, CM., Xiong, C., Grundman, M., Hansen, LA., Petersen, RC., Parisi, JE., Dickson, DW., et al. Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 2009; 30, 1026–1036.

Prince, M., Prina, M., Guerchet, M. World Alzheimer Report. *Alz Disease Int* London; 2013.

Proulx, DP., Rouleau, P., Paré, I., Vallières-Noël, MM. & Bazin, R. *J Neuroimmunology* 2012; 251, 39–44.

Puli, L. et al. Effects of human intravenous immunoglobulin on amyloid pathology and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. 2012; 1–19.

Querfurth, HW., LaFerla, FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2010; 362: 4.

Ransohoff, RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity* 2009; 31:711-721.

Ravetch, J.V. and S. Bolland, IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 275-290.

Relkin, N., Szabo, P., Adamiak, B., Burgut, T., Monthe, C., Lent, RW., Younkin, S., Younkin, L., Schiff, R., Weksler, ME. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 2009; 30: 1728–1736.

Relkin N, et al. Intravenous immunoglobulin treatment decreases rates of ventricular enlargement and cognitive decline in Alzheimer's disease. *AAN* 2010; Abstract P03.294.

Relkin N, et al "Three-year follow-up on the IVIG for Alzheimer's phase II study" AAIC 2012; Abstract P3-381.

Relkin, N. Results of the GAP 160701 Study: A Phase 3 Clinical Trial of Intravenous Immunoglobulin for Mild to Moderate Alzheimer's Disease - Norman Relkin on Behalf of the ADCS and Baxter Gap 160701 Study Group. AAIC. 2013; 9(4): 39689.

Rinne, JO., Brooks, DJ., Rossor, MN., Fox, NC., Bullock, R., Klunk, WE., Mathis, CA., Blennow, K., Barakos, J., Okello, AA., Rodriguez Martinez de Liano, S., Liu, E., Koller, M., Gregg, KM., Schenk, D., Black, R. and Grundman, M.. 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol* 2010; 9: 363-372.

Rogers, J., Mastroeni, D., Leonard, B., Joyce, J., Grover, A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: Are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol* 2007; 82: 235–246.

Ryan, JM., Grundman, M. Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: ACC-001 clinical trials are ongoing. *J Alz Dis* 2009; 17: 243.

Saido, T., and Leissring, MA. Proteolytic degradation of amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(6): a006379.

Salloway, S., Sperling, R., Gilman, S., et al. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 2009; 73(24): 2061–2070.

Salloway, S., Sperling, R., Fox, NC., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, LS., Porsteinsson, AP., Ferris, S., Reichert, M., Ketter, N., Nejadnik, B., Guenzler, V., Miloslavsky, M., Wang, D., Lu, Y., Lull, J., Tudor, IC., Liu, E., Grundman, M., Yuen, E., Black, R., Brashear, HR. Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2014; 370(4): 322-33.

Samuelsson, A., Towers, TL. and Ravetch, JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 2001; 291(5503): 484-486.

Sanchez, MM., Moghadam, S., Naik, P., Martin, KJ., Salehi, A. Hippocampal network alterations in Alzheimer's disease and Down syndrome: from structure to therapy. *J Alz Dis* 2011; 26(3): 29-47.

Sandberg, A., Luheshi, LM., Söllvander, S, et al. Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid-beta oligomers by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 15595–600.

Savva, GM., Wharton, SB., Ince, PG., Forster, G., Matthews, FE., Brayne, C. Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study. Age, neuropathology, and dementia. *N Engl J Med* 2009; 360(22): 2302-2309.

Scarmeas, N., et al. Physical Activity and Alzheimer Disease Course. *Am J Geriatric Psy* 2011 ; 19 : 471–481

Scarpini, E., Scheltens, P. and Feldman, H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol*. 2003; 2: 539-547.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. and Seubert, P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400: 173-177.

Schmidt, C., Lepsverdize, E., Chi, SL., Das, AM., Pizzo, SV., Dity-Atev, A., Schachner, M. Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. *Mol Psychiatry* 2008; 13: 953–69.

Schwarze, S.R., DePrimo, S.E., Grabert, L.M., Fu, V.X., Brooks, J.D. & Jarrard, D.F. Novel pathways associated with bypassing cellular senescence in human prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 14877-14883.

Selkoe, DJ. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 447-453.

Selkoe, DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002; 298 : 789–791.

Selkoe, DJ. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat Med* 2011; 17 : 1060-1065.

Seong, S., Matzinger, P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Reviews Immunol* 2004; 4(6): 469–478.

Seubert, P., Barbour, R., Khan, K., et al. Antibody capture of soluble A β does not reduce cortical A β amyloidosis in the PDAPP mouse. *Neurodegener Dis* 2008; 5(2): 65–71

Shankar, GM., Li, S., Mehta, TH., Garcia-Munoz, A., Shepardson, NE., Smith, I., Brett, FM., Farrell, MA., Rowan, MJ., Lemere, CA., Regan, CM., Walsh, DM., Sabatini, BL., Selkoe, DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2006; 14(8): 837–842.

Shi, Y., Evans, JE., Rock, KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003 ; 425 (6957): 516–21.

Sheng, JG., Mrak, RE., Griffin, WS. Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms. *Acta Neuropathol* 1997; 94: 1–5.

Sherrington, R., Rogaev, EI., Liang, Y., Rogaeva, EA., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375: 754–760.

Sherrington, R., Froelich, S., Sorbi, S., Campion, D., Chi, H., Rogaeva, EA., Levesque, G., Rogaev, EI., Lin, C., Liang, Y., et al. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Human Mol Genet* 1996; 5: 985–988.

Shruster, A. & Offen, D. *Behavioural Brain Research*. *Behav Brain Res* 2014; 261: 193–201.

Siemers, ER., Friedrich, S., Dean, RA., et al. Safety and changes in plasma and cerebrospinal fluid amyloid-beta after a single administration of an amyloid-beta monoclonal antibody in subjects with Alzheimer disease. *Clin Neuropharmacol* 2010; 33(2): 67–73.

Siemers, ER., Friedrich, S., Dean, RA., et al. Safety, tolerability and biomarker effects of an Abeta monoclonal antibody administered to patients with Alzheimer's disease. *Alz Dem* 2008; 4(4): T774.

Siegel, J., Immune globulins: therapeutic, pharmaceutical, cost, and administration considerations. *Pharm Pract News* 2011; 23-29.

Sierra, A., Beccari, S., Diaz-Aparicio, I., Encinas, JM., Comeau, S., Tremblay, M. Surveillance, Phagocytosis, and Inflammation: How Never-Resting Microglia Influence Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neural Plasticity* 2014; 2014: 610343.

Smith, LM., Coffey, MP., Klaver, AC. and Loeffler, DA. Intravenous immunoglobulin products contain specific antibodies to recombinant human tau protein. *Int Immunopharmacol* 2013; 16: 424-428.

Smith, LM., Coffey, MP., Loeffler, DA. Specific binding of intravenous immunoglobulin products to tau peptide fragments. *Int Immunopharmacol* 2014 ; 21(2): 279-282.

Snyder, JS., Hong, NS., McDonald, RJ., Wojtowicz, JM. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neurosci* 2005; 130: 843-852.

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

Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., Yednock, T. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 2000, 6: 916-919.

Spalding, KL., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, HB., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, BA., Possnert, G., Mash, DC., Druid, H., Frisén, J. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013 ; 153(6): 1219-1227.

St-Amour, I., Pare, I., Alata, W., Coulombe, K., Ringuette-Goulet, C., Drouin-Ouellet, J., Vandal, M., Soulet, D., Bazin, R. and Calon, F. Brain bioavailability of

human intravenous immunoglobulin and its transport through the murine blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 10: 1038-1049.

Strachan, MW., Reynolds, RM., Marioni, RE., Price, JF. Cognitive function, dementia and type 2 diabetes mellitus in the elderly. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7(2): 108–114

Strittmatter, WJ. et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 1977–1981.

Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 920: 134-139.

Sudduth, TL., Greenstein, A. & Wilcock, DM. Intracranial Injection of Gammagard, a Human IVIg, Modulates the Inflammatory Response of the Brain and Lowers A in APP/PS1 Mice Along a Different Time Course than Anti-A Antibodies. *J Neurosci* 2013 ; 33 : 9684–9692.

Suzumura, A., Marunouchi, T., Yamamoto, H. Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res* 1991 ; 545(1-2) : 301-306.

Takamura, A., Sato, Y., Watabe, D., Okamoto, Y., Nakata, T., et al. Sortilin is required for toxic action of A β oligomers (A β O_s): Extracellular A β O_s trigger apoptosis, and intraneuronal A β O_s impair degradation pathways. *Life Sci* 2012; PMID:22579764.

Tayeb, HO., Murray, ED., Price, BH. and Tarazi, FI. Bapineuzumab and solanezumab for Alzheimer's disease: is the 'amyloid cascade hypothesis' still alive? *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13: 1075-1084.

Teng, E., Lu, PH., Cummings, JL. Neuropsychiatric symptoms are associated with progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007; 24(4): 253-9.

Tremblay, C., Pilote, M., Phivilay, A., Emond, V., Bennett, D.A. and Calon, F., Biochemical characterization of Abeta and tau pathologies in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alz Dis* 2007; 12 : 377-390.

Van Praag, H., Schinder, AF., Christie, BR. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002; 28: 1030-1034.

Vukovic, J., Colditz, MJ., Blackmore, DG., Ruitenber, MJ., Bartlett, PF. Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. *J Neurosci* 2012; 32, 6435–6443.

Weintraub, S., Wicklund, AH., Salmon, DP. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 12: 381-392.

Wegiel, J., Imaki, H., Wang, KC., Wronska, A., Osuchowski, M., Rubenstein, R. Origin and turnover of microglial cells in fibrillar plaques of APP^{sw} transgenic mice. *Acta Neuropathol* 2003; 105: 393–402.

Weksler, ME., Relkin, N., Turkenich, R., et al. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol* 2002; 37: 943–48.

Wilcock, DM. et al. Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinfla* 2004; 1, 24.

Wilcock, DM., Rojiani, A., Rosenthal, A. et al. Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *J Neurosci* 2004; 24: 6144–51.

Wilcock, DM. and Colton CA. Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: relevance of transgenic mouse studies to clinical trials. *J Alz Dis* 2008; 15: 555-569

Wilcock, DM. & Colton, CA. Immunotherapy, vascular pathology, and microhemorrhages in transgenic mice. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009; 8: 50-64.

Wilkinson, D., Wirth, Y., Goebel, C. Memantine in Patients with Moderate to Severe Alzheimer's Disease: Meta-Analyses Using Realistic Definitions of Response. *Dem Geriatr Cogn Disord* 2014; 37: 71-85

Wimo, A., Jönsson, L., Bond, J., Prince, M. & Winblad, B. The worldwide economic impact of dementia. *Alzheimer's and Dementia* 2010; 9, 1–11.

Winblad, B., Andreasen, N., Minthon, L., Floesser, A., Imbert, G., Dumortier, T., Maguire, RP., Blennow, K., Lundmark, J., Staufenbiel, M., Orgogozo, JM., Graf, A. Safety, tolerability, and antibody response of active A β immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol* 2012; 11: 597–604.

Winocur, G., Wojtowicz, JM., Sekeres, M., et al. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 2006; 16: 296–304.

Wyss-Coray, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med*. 2006; 12(9):1005–1015.

Xing, SL., Chen, B., Ding-Zhu, S., Cui-Qing, Z. β -amyloid Peptide Binds and Regulates Ectopic ATP Synthase α -Chain on Neural Surface. *Int J Neurosci* 2012 ; 122 : 290–297

Yamada, K., Yabuki, C., Seubert, P., Schenk, D., Hori, Y., et al. Abeta immunotherapy: intracerebral sequestration of Abeta by an anti-Abeta monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Abeta. *J Neurosci* 2009; 29: 11393-11398

Yan, P., Bero, AW., Cirrito, JR., Xiao, Q., Hu, X., Wang, Y., Gonzales, E., Holtzman, DM., Lee, JM. Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice. *J Neurosci* 2009; 29: 10706–10714.

Ziabreva, I., Perry, E., Perry, R., et al. Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Psychosom Res* 2006; 61: 311–316.

Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, SJ., Luskin, MB. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 1998; 11(4) : 234–245

Zhao, C., Deng, W., Gage, FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008; 132: 645–660.

Zotova, E., Bharambe, V., Cheaveau, M., Morgan, W., Holmes, C., Harris, S., et al. Inflammatory components in human Alzheimer's disease and following active amyloid-b42 immunization. *Brain* 2013; 136: 2677–706.