

Université de Sherbrooke

**Propriétés anti-virales des peptides β -amyloïdes associés à la maladie d'Alzheimer :
implication dans le développement et la progression de la maladie**

Par

KARINE BOURGADE

Programme d'Immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en Immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Janvier, 2016

Membres du jury d'évaluation

Pr Denis Gris, Directeur du jury, membre interne au programme d'Immunologie
Pr Tamàs Fülöp, Directeur de recherche, programme d'Immunologie
Pr Gilles Dupuis, co-Directeur de recherche, programme d'Immunologie
Pr Eric H Frost, co-Directeur de recherche, programme de Microbiologie et d'Infectiologie
Pr François Boudreau, membre externe, programme de Biologie Cellulaire
Pr Georges Lévesque, membre externe, Université Laval, Québec

© [Karine Bourgade, 2015]

À Emie-Rose

RÉSUMÉ

Propriétés antivirales des peptides β -amyloïdes associés à la maladie d'Alzheimer : implication dans le développement et la progression de la maladie

KARINE BOURGADE

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en Immunologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les plaques amyloïdes sont l'une des principales caractéristiques pathologiques de la maladie d'Alzheimer (MA). Elles sont composées de peptides amyloïdes- β (A β) 1-40 et 1-42 fibrillaires et ont été décrites comme responsable de la réponse inflammatoire et de la neurodégénérescence. L'Herpès simplex virus 1 (HSV-1) a été impliqué comme facteur de risque de la MA et retrouvé à l'intérieur des plaques amyloïdes. Des données récentes suggèrent que les peptides A β possèdent une activité antimicrobienne et antivirale *in vitro*. La première partie des travaux décrits dans cette thèse concerne l'étude du rôle antiviral des peptides A β contre les virus HSV-1. Pour cela, des cellules fibroblastiques, épithéliales et neuronales ont été exposées aux peptides A β 40 et A β 42 et infectées avec le virus HSV-1. L'analyse quantitative par PCR a montré que les peptides A β 40 et A β 42 inhibent la réplication des virus HSV-1, qui possèdent une enveloppe mais n'inhibent pas l'infection par les adénovirus-5 qui n'en possèdent pas. Nos résultats ont aussi montré que les peptides interagissent directement avec les virus HSV-1 dans un modèle acellulaire et inhibent leur entrée dans les cellules. Dans une deuxième partie de l'étude, nous avons utilisé un modèle de cocultures de lignées cellulaires de neuroblastomes (H4) et microgliales (U118-MG) en tant que modèle minimal *in vitro* afin de déterminer si les cellules H4 produisent des peptides A β et si cette production induit une protection antivirale contre le virus HSV-1. Les résultats ont montré que les cellules H4 sécrètent A β 42 en réponse à une infection par les virus HSV-1 et que les cellules U118-MG internalisent le peptide A β 42. De plus, le peptide A β 42 exogène induit une forte production de cytokines pro-inflammatoires mais l'infection des cellules par les virus HSV-1 n'augmente pas significativement cette production. Par ailleurs, la protection antivirale du peptide A β 42 a été confirmée lors d'expériences de transferts impliquant des milieux de cultures conditionnés provenant de cellules H4 infectées par le virus HSV-1. Ces milieux confèrent une protection A β -dépendante, contre les infections par les virus HSV-1 dans des essais de nouvelles cultures de cellules H4. Dans le but de mettre en évidence le mécanisme responsable de l'effet antiviral des peptides A β , nous avons proposé que l'homologie de séquence entre les peptides A β et la région proximale transmembranaire de la glycoprotéine de fusion B (gB) du virus HSV-1 pourrait être responsable de l'interférence des peptides A β avec la réplication des virus HSV-1 en s'insérant dans l'enveloppe externe des virus. Cette explication a été appuyée par des expériences de FRET. Les résultats ont montré que l'interaction peptide A β 42 et gB-GFP implique une distance de 10 nm ou moins, suggérant que le peptide A β 42 peut s'insérer dans l'enveloppe virale. L'ensemble de nos données suggère qu'une production de peptides A β par les neurones pourrait les protéger lors d'une infection par les virus HSV-1 latents et, contre d'autres pathogènes. Par contre, une surproduction pourrait contribuer à la formation des plaques amyloïdes, expliquant ainsi pourquoi les infections ont un rôle dans la pathogénicité de la forme sporadique de la MA.

Mots clés : maladie d'Alzheimer, amyloïde- β , virus Herpes, peptides antimicrobiens.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
Résumé.....	iii
Table des matières	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations	ix
Introduction.....	1
I. Maladie d'Alzheimer	1
I.1. Caractéristiques cliniques	1
<i>I.1.1. Symptômes cliniques et stades de la maladie d'Alzheimer</i>	1
<i>I.1.2. Diagnostics</i>	2
I.2. Formes génétiques ou EOFAD.....	3
I.3. Forme sporadique ou LOAD.....	4
I.4. Modifications morphologiques.....	6
<i>I.4.1. Atrophie corticale</i>	6
<i>I.4.2. Plaques séniles</i>	6
<i>I.4.3. Dégénérescence neurofibrillaire</i>	15
<i>I.4.4. Relation entre la protéine tau et les peptides Aβ</i>	16
I.5. Traitements actuels ou en cours d'études cliniques	16
I.6. Inflammation du cerveau associée à la maladie d'Alzheimer	19
II. Virus <i>Herpesviridae</i>.....	22
II.1. Herpes Simplex virus 1	23
II.2. Cytomégalovirus	28
III. Revue de la littérature sur les propriétés antimicrobiennes des peptides Aβ	28
III.1. Les pathogènes dans la maladie d'Alzheimer.....	28
III.2. A β sont des peptides possédant une activité antimicrobienne	30
Hypothèse et objectifs.....	32
Hypothèse.....	32

Objectifs	32
Objectif #1	32
Objectif #2	32
Objectif #3	32
Article 1	33
Article 2	64
Objectif 3	98
I. Matériel et méthodes	98
Interaction entre HSV-1-GFP et A β 42-HiLyteFluor-555 par expériences de FRET	98
II. Résultats	99
La fluorescence émise par la protéine gB-GFP du virus HSV-1 excite le fluorochrome HiLyteFluor-555 associé aux peptides A β 42.....	99
III. Discussion	102
Discussion	103
Perspectives.....	111
Conclusions générales.....	112
Liste des références	114
Remerciements	127
Annexes	128
I) Preuve d'acceptation – Article 2 - Journal of Alzheimer's Disease	128

LISTE DES FIGURES

Introduction	Pages
Figure 1. Voies alternatives de protéolyse de l'APP.....	11
Figure 2. Sites de clivage des sécrétases.....	12
Figure 3. Protéolyse de l'APP dans les neurones.....	13
Figure 4. Inflammation cérébrale suite à l'agrégation des peptides A β	21
Figure 5. Représentation schématique des virus <i>Herpesviridae</i>	23
Figure 6. Cycle de réplication des virus <i>Herpesviridae</i>	27
Article 1	
Figure 1. A β 1-40 and A β 1-42 inhibition of HSV-1 replication in MRC-5 cells.....	43
Figure 2. A β 1-40 and A β 1-42 inhibition of HSV-1 replication in A549 cells.....	45
Figure 3. A β 1-40 and A β 1-42 inhibition of HSV-1 replication in H4 cells.....	47
Figure 4. Lack of effect of A β 1-40 and A β 1-42 on HAd5 replication in MRC-5 cells	48
Figure 5. Lack of effect of A β 1-40 and A β 1-42 on HAd5 replication in A549 cells.....	49
Figure 6. Cathelicidin LL-37-dependent inhibition of HSV-1 replication in MRC-5 cells	50
Figure 7. Fluorescent detection of A β 1-42 in MRC-5 cells	51
Figure 8. Effect of washing of A β 1-40 or A β 1-42 on HSV-1 replication.....	52
Figure 9. Interaction of A β 1-42 with HSV-1 in a cell-free system	54
Figure S1. Time-dependent replication of HSV-1 and HAd5 in MRC-5 and A549 cells, respectively	62
Figure S2. Sequence homology between A β 1-42 and a transmembrane region of HSV-1 gB.....	62

Article 2

Figure 1. HSV-1-dependent A β production in H4 neuronal and U118-MG glial cells.....	75
Figure 2. Kinetics of HSV-1 replication and A β 42 production in H4 cells exposed to BACE-1 inhibitor.....	77
Figure 3. A β production in cocultures of H4 neuronal and U118-MG glial cells	79
Figure 4. Influence of HSV-1 and A β on the production of pro-inflammatory cytokine TNF α by H4 and U118-MG cells and, cocultures of these cells	80
Figure 5. Influence of HSV-1 and A β on the production of pro-inflammatory cytokine IL-1 β by H4 and U118-MG cells and by cocultures of these cells.....	81
Figure 6. Influence of HSV-1 and A β on the production of anti-viral cytokine INF α by H4 and U118-MG cells and by cocultures of these cells.....	82
Figure 7. Protective effect of conditioned supernatants (C-sup) of HSV-1 infected H4 cells against HSV-1 replication upon HSV-1 challenge in <i>de novo</i> cultures.....	83
Figure 8. Assays of conditioned supernatants from H4 cell cultures on HSV-1 replication	85
Figure 9. Model depicting the influence of A β in response to infection in brain inflammation and AD	91

Objectif 3

Figure 1. Transfert d'énergie entre la HSV-1-(gB-GFP) et A β 42 marqué au fluorophore <i>HiLyteFluor-555</i>	100-101
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------

LISTE DES TABLEAUX

Article 1	Pages
Table 1. A β peptide inhibition of HSV-1 interaction with MRC-5 cells.....	53
Table S1. Amino acid sequences of peptides used in this study.....	63
Table S2. Nucleotide sequences of primers used for PCR amplification.	63

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A β	Amyloïde- β (<i>β-amyloid</i>)
A β 40 et A β 42	Amyloïde- β 1-40 et amyloïde- β 1-42
ABCA7	<i>ATP-binding cassette transporter A7</i>
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
AICD	<i>APPβ intracellular C-terminal domain</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique (<i>desoxyribonucleic acid, DNA</i>)
ARN	Acide ribonucléique (<i>ribonucleic acid, RNA</i>)
aMCI	<i>amnesic Mild Cognitiv Impairment</i>
AMP	<i>Antimicrobial peptide</i>
APH-1	<i>Anterior pharynx-defective 1</i>
ApoE et D	Apolipoprotéine E et D
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
BACE 1	<i>Beta-site APP-cleaving enzyme 1</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CD33	<i>Cluster differentiation 33</i>
CLU	<i>Clusterin</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CR1	<i>Complement receptor 1</i>
CTF	<i>C-terminal fragment</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
EOFAD	<i>Early-onset familial Alzheimer's disease</i>
FBS	Sérum bovin foetal (<i>foetal bovine serum, FBS</i>)
FGF	<i>Foetal growth factor</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfert</i>
gB	Glycoprotéine B (<i>glycoprotein B</i>)
gH	Glycoprotéine H (<i>glycoprotein H</i>)

gL	Glycoprotéine L (<i>glycoprotein L</i>)
GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GSK-3	<i>Glycogen 3β-synthase kinase</i>
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HAd5	Adénovirus de type 5 humain (<i>Human Adenovirus 5</i>)
HHV-6	Virus herpes humain 6 (<i>Human Herpes virus 6</i>)
HSV-1	Virus herpes simplex 1 (<i>Herpes simplex virus 1</i>)
HSV-2	Virus herpes simplex 2 (<i>Herpes simplex virus 2</i>)
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i>
ID ₅₀	<i>Infectious dose 50</i>
Ig	Immunoglobuline
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IL	Interleukine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IVIG	<i>Intravenous immunoglobulin</i>
LAT	<i>Latency-associated transcript</i>
LDLR	<i>LDL receptor</i>
LOAD	<i>Late-onset Alzheimer's disease</i>
LRP1	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MA	Maladie d'Alzheimer (<i>Alzheimer's disease, AD</i>)
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NIA	<i>National Institut of Aging</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	Oxyde nitrique (<i>Nitric Oxyde</i>)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEN2	<i>Presenilin enhancer 2</i>
PIB	<i>Pittsburg Compound B</i>
PICALM	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
PLD3	<i>Phospholipase D3</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PSEN 1 et 2	<i>Presenilin 1 and 2</i>
RLR	<i>RIG-1-like receptor</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SEM	<i>Écart à la moyenne (Standard error of the mean)</i>
SORL1	<i>Sortilin-Related Receptor, L(DLR Class) A Repeats Containing</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TREM2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>

INTRODUCTION

I. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite pour la première fois en 1907 par le Dr. Aloïs Alzheimer (Alzheimer *et al.*, 1995) suite au décès d'une patiente atteinte de troubles cognitifs et de perte de mémoire. Lors de l'autopsie, il a observé des modifications morphologiques du cerveau, appelées aujourd'hui plaques séniles et dégénérescence neurofibrillaire (Alzheimer *et al.*, 1995).

A l'heure actuelle, la maladie d'Alzheimer est la forme de démence la plus commune (Fulop *et al.*, 2013). Il y a environ 35,6 millions de personnes qui souffrent de cette maladie dans le monde (WHO report, 2013 : Tam *et al.*, 2012). En conséquence de l'augmentation constante de l'espérance de vie, ce nombre va augmenter au cours des prochaines décennies et pourrait atteindre les 100 millions de malades d'ici 40 ans (WHO report, 2013). De plus, il a été décrit que la prévalence de la MA augmente de manière exponentielle avec l'âge car le facteur de risque le plus important est l'âge (Thies *et al.*, 2013).

Il existe deux formes de la MA : la forme génétique appelée EOFAD (*early-onset familial Alzheimer disease*) qui apparaît précocement, représentant 1 à 5% des cas et la forme sporadique LOAD (*late-onset Alzheimer disease*), apparaissant tardivement et qui représente 95 à 99% des cas. Ces deux formes sont plus amplement décrites plus loin dans cette thèse.

I.1. Caractéristiques cliniques

I.1.1. Symptômes cliniques et stades de la maladie d'Alzheimer

Généralement, les troubles cognitifs rencontrés chez les patients diagnostiqués pour la MA sont une perte de la mémoire (au début à court terme et lors de la progression à long terme), des troubles de l'humeur et des troubles psychomoteurs (Thies *et al.*, 2013). Les fonctions endommagées vont impliquer une difficulté dans la résolution de problèmes,

l'accomplissement de tâches domestiques ou professionnelles, une distorsion du temps et de l'espace, des difficultés orales et écrites, une diminution de la capacité de jugement et des altérations de la personnalité et de l'humeur, impliquant une perturbation des activités sociales (Thies *et al.*, 2013). Le motif symptomatique le plus courant commence graduellement par une diminution de la mémoire immédiate (Thies *et al.*, 2013), dû au fait que les premiers neurones endommagés sont situés dans la zone cérébrale responsable de la formation des nouveaux souvenirs (hippocampe). Ces patients sont catégorisés comme étant soit aMCI (*amnestic Mild Cognitive Impairment*) soit « Alzheimer léger » dépendamment du degré de l'altération de la fonctionnalité. La progression de la maladie va faire évoluer ces patients à un stade modéré puis sévère. Dans les cas avancés de la MA, les patients vont avoir besoin d'une aide quotidienne pour les activités de base comme prendre un bain, manger ou s'habiller. Aux stades terminaux de la maladie, les patients deviennent incapables de communiquer, de reconnaître leurs proches et ne quittent plus leur lit (Bekris *et al.*, 2010 ; Thies *et al.*, 2013). L'absence de mouvement rend ces patients vulnérables aux infections, notamment aux pneumonies, cause importante de décès des patients atteints de la MA au stade sévère (Thies *et al.*, 2013). Cependant, le décès peut aussi survenir suite à une inanition générale et une malnutrition (Bekris *et al.*, 2009). Des symptômes de types neurologiques peuvent également être présents selon les causes de la maladie, tels que des attaques cérébrales, de l'hypertonie, des myoclonies, de l'incontinence et du mutisme (Bekris *et al.*, 2009). En outre, l'évolution des symptômes semble être plus rapide dans les cas de la forme génétique de la maladie par rapport à la forme sporadique (Wu *et al.*, 2012).

1.1.2. Diagnostics

Le diagnostic avéré de la MA est généralement différentiel et est confirmé souvent suite à l'autopsie des patients. Avant cette étape ultime, il est difficile de distinguer un type de démence avec perte de mémoire et la MA. De plus, la survie des patients atteints de ce type de démence est d'un maximum 10 à 12 ans après le diagnostic. Les outils de diagnostic utilisés en clinique actuellement comprennent un examen neurologique, des tests neuropsychologiques complexes (Bekris *et al.*, 2009) et de l'imagerie par résonance

magnétique (IRM ou la tomographie par émission de positrons) qui permet de mesurer les variations d'absorption de glucose par les neurones au moyen du marqueur ¹⁸fluor *D*-glucose, ainsi que l'intensité du marquage du Pittsburgh compound B (PIB) qui permet la localisation des plaques séniles dans le cerveau. Dans la MA, l'absorption du glucose par les cellules est diminuée et le marquage des plaques séniles par le PIB augmenté. L'IRM permet également d'écarter d'autres pathologies qui pourraient expliquer les symptômes (tumeurs ou indices d'accident vasculaire cérébral) (Thies *et al.*, 2013). Les nouvelles lignes directrices proposées par le NIA (*National Institut of Aging*) et l'*Alzheimer's Association* impliqueraient en outre des tests sanguins pour détecter des biomarqueurs tels que les niveaux d'Aβ dans le sang et dans le liquide céphalo-rachidien (Wang-Dietrich *et al.*, 2013 ; Bruggink *et al.*, 2012 ; Williams *et al.*, 2015) et des marqueurs de dommages neuronaux chez les patients atteints de formes légères de la MA ou les aMCI (Thies *et al.*, 2013).

1.2. Formes génétiques ou EOFAD

La forme EOFAD apparaît de façon précoce (avant 65 ans) et correspond à la forme génétique ou familiale de la maladie. De ce fait, les patients atteints de cette forme ont généralement des antécédents familiaux et elle est également catégorisée maladie autosomale dominante. Elle représente 1 à 5% des cas et est le résultat de mutations des gènes codant pour les protéines APP (*Amyloid Precursor Protein*) ou PSEN1 et 2 (Présénilines 1 et 2) (Holtzman *et al.*, 2012). Wu et son équipe ont recensé 230 mutations géniques impliquées dans la forme EOFAD qui touchent la voie protéolytique de l'APP (Wu *et al.*, 2012). Ces mutations sont associées avec une production excessive de peptides amyloïdes-β 1-40 et 1-42 (Aβ40 et Aβ42).

La première mutation a été découverte grâce à sa localisation. Une corrélation entre les symptômes de la forme EOFAD et certains symptômes du syndrome de Down a guidé les recherches en direction du chromosome 21 et a permis la découverte du locus du gène de l'APP : 21q21 (St.Georges-Hyslop *et al.*, 1992). Par la suite, les recherches ont permis d'impliquer le gène *PS1* qui code pour la PSEN1, localisé sur le chromosome 14 (14q24) et le gène *PS2* codant pour la PSEN2, localisé sur le chromosome 1 (1q31). Ces découvertes

ont été faites entre 1992 et, 1995 et depuis, 185 mutations différentes ont été identifiées dans le gène *PS1*, 13 dans le gène *PS2* et 32 dans le gène *APP* (Wu *et al.*, 2012). Les mutations dans le gène *PS1* sont à la fois les plus fréquentes et les plus sévères, elles peuvent induire une apparition de la maladie dès l'âge de 24 ans (Wu *et al.*, 2012).

1.3. Forme sporadique ou LOAD

La seconde forme de la maladie apparaît de façon plus tardive, généralement après 65 ans (Wu *et al.*, 2012). Elle est considérée comme une forme sporadique et représente 95 à 99% des cas (Bekris *et al.*, 2010 ; Holtzman *et al.*, 2012). Les causes de l'apparition de la forme LOAD sont diverses mais elles impliquent un schéma complexe mettant en jeu des facteurs de risques génétiques et des facteurs environnementaux (Tanzi, 2012).

Cependant, un gène de susceptibilité majeur a été découvert, celui codant pour l'ApoE (Apolipoprotein E) (Liu *et al.*, 2013), localisé sur le locus 19q13 (Strittmatter *et al.*, 1993). L'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* augmente le risque de développer la MA de 4 fois s'il est présent une seule fois et de 10 fois, si le patient possède les 2 copies (Tanzi, 2012). A l'inverse, l'allèle $\epsilon 2$ du gène de l'*APP* a été décrit comme protecteur envers la MA (Corder *et al.*, 1994 ; Liu *et al.*, 2013) et l'allèle $\epsilon 3$ ne semble quant à lui, pas être impliqué. Ces trois allèles sont déterminés par différentes combinaisons d'acides aminés des résidus 112 et 158 : $\epsilon 2$: Cys₁₁₂/Cys₁₅₈, $\epsilon 3$: Cys₁₁₂/Arg₁₅₈ et $\epsilon 4$: Arg₁₁₂/Arg₁₅₈.

La protéine ApoE est impliquée dans la liaison, l'internalisation et le catabolisme des particules lipoprotéiques, elle sert également de ligand pour le récepteur aux LDL (lipoprotéines de faible densité) et a un rôle dans le transport du cholestérol et des lipides (Holtzman *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2013). La protéine ApoE-4 est, quant à elle, associée à une hyperlipidémie et une hypercholestérolémie (Liu *et al.*, 2013). En ce qui concerne la MA, cette protéine semble être impliquée dans la clairance des peptides A β hors du cerveau (Tanzi, 2012).

D'autres gènes de susceptibilité ont également été décrits, notamment le gène *TREM2* impliqué dans le contrôle des fonctions des cellules dendritiques, ostéoclastes et cellules microgliales (Colonna, 2003). Il aurait un rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques, des composants de la matrice et des macromolécules, par la microglie. De ce

fait, un défaut dans l'expression de ce gène conduirait à une accumulation de produits toxiques qui seraient la cause des dommages cérébraux (Colonna, 2003). De manière intéressante, des études génétiques récentes à grande échelle ont montré l'implication de variant de *TREM2* dans la MA (Benitez *et al.*, 2013 ; Guerreiro *et al.*, 2013 ; Reitz *et al.*, 2013 ; Jonsson *et al.*, 2013).

Plus récemment, une équipe a montré que des variants dans le gène codant la phospholipase D3 (PLD3) confèrent un risque deux fois plus élevé pour la forme tardive de la MA (Cruchaga *et al.*, 2014). La PLD3 est fortement exprimée dans les régions du cerveau vulnérables lors de la MA (hippocampe et cortex fronto-temporal) (Peng et Frohman, 2012) et son expression est significativement plus faible dans les neurones des patients atteints de la MA par rapport aux patients contrôles. Cette revue rapporte qu'il a été remarqué qu'une surexpression de PLD3 mène à une diminution importante de l'APP intracellulaire et de peptides A β 40 et A β 42 extracellulaires. A l'inverse, un knock-down de ce gène conduit à une augmentation significative de peptides A β 40 et A β 42 extracellulaires. Les phospholipases D1 et D2 ont également été impliquées dans le processus protéolytique de la protéine APP et la maladie d'Alzheimer (Cruchaga *et al.*, 2014). A l'heure actuelle, il existe une base de données nommée AlzGene.org qui recense les gènes candidats et les mutations impliquées dans la MA (Bertram et Tanzi, 2008). Les analyses de type GWAS (*genome-wide association study*) révèlent plus d'une quarantaine de loci montrant une augmentation significative du risque de développer la MA (Tanzi, 2013), tels que *SORL1* (*sortilin-related receptor 1*), *ACE* (*angiotensin converting enzyme I*) (Kehoe *et al.*, 1999), *CD33*, *CLU* (*clusterin*), *CRI* (*complement receptor 1*), *PICALM* (*phosphatidylinositol binding clathrin assembly molecule*) (Tanzi, 2012) ou *LDLR* (*low-density lipoprotein receptor*) (Kim *et al.*, 2009).

De plus, comme mentionné précédemment, l'âge est le facteur de risque principal de la forme sporadique (Thies *et al.*, 2013). Les patients évoluent d'un vieillissement normal à un vieillissement pathologique induisant des complications au niveau du système immunitaire telles qu'une susceptibilité accrue aux maladies infectieuses, une difficulté à combattre les pathogènes, une baisse de la réponse immunitaire et de la réponse aux vaccins (Lang *et al.*, 2012), ainsi qu'une augmentation de l'incidence des cancers, de l'ostéoporose, du diabète et aussi de la MA (Glass *et al.*, 2010).

1.4. Modifications morphologiques

1.4.1. Atrophie corticale

Les modifications pathologiques décrites dans les cas de MA se situent essentiellement dans le cerveau. On observe une atrophie importante de la masse corticale correspondant à une perte neuronale et synaptique qui touche fortement les zones de la mémoire et du langage, c'est-à-dire l'hippocampe et les lobes fronto-temporaux (Castellani *et al.*, 2010). Cette atrophie importante est provoquée par la présence de deux pathologies récurrentes chez les patients souffrant de la MA. Ces pathologies sont caractérisées par la présence des plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire (Castellani *et al.*, 2010 ; Bekris, 2010) qui vont avoir comme conséquence une mort progressive des neurones et conséquemment la dégénérescence des synapses, induisant une perte importante du volume cérébral au profit d'une augmentation du volume des ventricules remplis par le liquide céphalo-rachidien.

1.4.2. Plaques séniles

Les plaques séniles sont le résultat du dépôt de peptides A β dans le milieu extracellulaire cérébral (Liu *et al.*, 2013). Il a été décrit que leur accumulation dans le cerveau précède de 10 ans le début clinique de la maladie (Villemagne *et al.*, 2013) et cette observation est à la base de « l'hypothèse amyloïde » de la MA (Sorrentino *et al.*, 2014). Selon cette hypothèse, la MA est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de peptides A β et leur clairance.

Chronologiquement, l'entrée de monomères extracellulaires de peptides A β dans les neurones conduit à une neurotoxicité depuis l'intérieur des neurones (La Ferla *et al.*, 2007 ; Moreth *et al.*, 2013). Les neurones endommagés ou morts deviennent un point d'ancrage pour les peptides A β qui, suite à leur accumulation dans le milieu extracellulaire, évoluent de la forme monomérique à oligomérique puis fibrillaire. Les fibrilles de peptides A β s'agglutinent sous forme de plaques et accentuent la dégénérescence des neurones environnants et endommagent les oligodendrocytes (Roth *et al.*, 2005) ainsi que les

connexions synaptiques et concomitamment induisent et maintiennent la neuroinflammation (Tam *et al.*, 2012 ; Kam *et al.*, 2014).

Le peptide A β 42 est le plus abondant dans les plaques séniles, mais des fragments d'APP et une faible proportion de peptides A β 40 sont aussi présents (Armstrong, 2009). Des constituants « secondaires » ont également été découverts à l'intérieur des plaques séniles tels que de l'aluminium (Mann *et al.*, 1992), des protéines de la phase aiguë (α -anti-chymotrypsine et α 2-macroglobuline) (Eikelenboom *et al.*, 1994 ; Ma *et al.*, 1994 ; Van Gool *et al.*, 1993), de l'IL-6 (Shalit *et al.*, 1994), des molécules d'adhésion cellulaire (Eikelenboom *et al.*, 1994), de l'Apo E et Apo D (Yamaguchi *et al.*, 1994 ; Desai *et al.*, 2005) et des protéines du complément (C1q, C4 et C3) (Verga *et al.*, 1989). Suite au dépôt d'A β , la formation des plaques séniles induit l'activation des cellules gliales, des astrocytes et cause la dystrophie des neurites et des synapses, ce qui mène à la formation des nœuds neurofibrillaires, à la mort cellulaire et à la démence. C'est le schéma proposé par l'hypothèse amyloïde, principale hypothèse envisagée pour décrire la pathogénèse de la MA (Hardy *et al.*, 1992). Cependant, la cause du dépôt d'A β dans le cerveau est différente selon la forme de la maladie (génétique ou sporadique).

I.4.2.1. Dépôt d'A β dans le cas de la forme EOFAD

Dans le cas de la forme génétique, il a été décrit que l'accumulation de peptides A β est due à des mutations génétiques dans les gènes *APP* (*Amyloid Precursor Protein*), *PS1* et *PS2* (*Presenilin 1 et 2*) qui engendrent une augmentation de la production des peptides A β dans le cerveau (Bekris *et al.*, 2010). Ce processus est un événement pathologique précoce dans la forme génétique de la MA, mais existe aussi chez les personnes âgées non démentes (Podlisny *et al.*, 1991). La première démonstration d'une relation causale entre des protéines pathologiques et des mutations génétiques dans les maladies neurodégénératives a été faite pour la MA (Chartier-Harlin *et al.*, 1991 ; Goate *et al.*, 1991). Une dégradation aberrante de l'APP résulte en la formation des peptides A β , en particulier la forme A β 42, constituant majeur des plaques séniles (Armstrong, 2009).

Les formes génétiques les plus communes sont liées aux mutations qui touchent les gènes *PS1* et *2* (Sherrington *et al.*, 1995 ; Levy-Lahad *et al.*, 1995). Les effets de ces

mutations induisent indirectement une accumulation de peptides A β , mais le processus est encore incertain. *PS1* est un gène impliqué dans la signalisation de Notch (Steiner *et al.*, 1999) et semble important pour la différenciation cellulaire. Les protéines PSEN1 et 2 sont en outre des composantes des complexes γ -sécrétases qui sont importants pour la génération des peptides A β (Armstrong, 2009).

I.4.2.2. Dépôt d'A β dans le cas de la forme LOAD

Le dépôt des peptides A β dans la forme sporadique est plutôt induit soit par une surproduction de peptides A β de causes multiples impliquant toutefois l'action de sécrétases, soit par un dysfonctionnement de la clairance des peptides par la microglie, provoquant ainsi une accumulation intracérébrale (Prokop *et al.*, 2013). La surproduction des peptides A β dans la forme LOAD fait généralement suite à des accidents ou agressions cérébrales telles que l'hypercholestérolémie (Giudetti *et al.*, 2015), les infections, le diabète ou l'hypoxie (Miklossy, 2011 ; De Chiara *et al.*, 2012 ; Armstrong, 2013 ; Grimm *et al.*, 2013 ; De la Monte *et al.*, 2014 ; Morgen et Frölich, 2015).

La composition lipidique de la membrane plasmique (ex. radeaux lipidiques) peut influencer l'action des sécrétases (α -, β - et γ -) et expliquer ainsi le lien entre la MA et le diabète (Nesic *et al.*, 2012). Cette possibilité corrèle avec le groupe de patients porteurs de l'allèle de susceptibilité de la protéine ApoE (allèle ϵ 4) (Liu *et al.*, 2013) qui est associé à une diminution de la clairance des peptides A β . L'implication de l'ApoE dans la forme sporadique de la MA sera décrite en détails plus loin dans cette thèse.

I.4.2.3. Génération des peptides A β : protéolyse de l'APP

L'APP existe sous trois isoformes : APP695, APP751 et APP770 qui sont toutes des glycoprotéines de surface possédant une seule région transmembranaire (Berkenbosh *et al.*, 1990). La voie non-amyloïdogénique (Fig. 1), voie physiologique non pathogène, est le résultat d'un clivage de l'APP par l' α -sécrétase, enzyme qui coupe l'APP entre les résidus 687 et 688, position 16 à l'intérieur de la séquence correspondant aux peptides A β empêchant ainsi la production des peptides A β (Descamps *et al.*, 2013). Trois métalloprotéases (ADAM 9, 10 et 17) ont été proposées comme composantes de l'activité protéolytique de l' α -sécrétase. Suite à des expériences de surexpression, la protéine ADAM 10 a été décrite comme la candidate la plus probable pour composer l' α -sécrétase (Buxbaum *et al.*, 1998 ; Lammich *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2011). Ce clivage libère un fragment soluble, l'APP α s, qui possède des effets neuroprotecteurs impliqués dans la survie et la plasticité neuronale lorsqu'il se fixe sur son récepteur à la surface des neurones. Il est également impliqué dans la protection des neurones de l'hippocampe contre l'excitotoxicité, la toxicité des peptides A β et le manque de glucose (Furukawa *et al.*, 1996). Ce clivage induit la formation d'un fragment transmembranaire appelé C83 (LaFerla *et al.*, 2007) dont la fonction est encore très peu étudiée et donc peu connue. Cependant, le fragment C83 a été décrit comme inhibiteur du complexe enzymatique γ -sécrétase menant à la production des peptides A β et donc comme amplificateur de la voie non-amyloïdogénique *via* l'action de l'enzyme α -sécrétase (Tian *et al.*, 2010).

La seconde voie de protéolyse, dite voie amyloïdogénique (Fig. 1) commence par un clivage de l'APP à la position 670 par la β -sécrétase ou BACE1, protéine transmembranaire contenant un site actif qui libère une protéine soluble (APP β s) dans l'espace extracellulaire (Yan *et al.*, 1999 ; LaFerla *et al.*, 2007). La protéine soluble APP β s est neurotoxique (Furukawa *et al.*, 1996). Le fragment restant (C-terminal fragment : CTF ou C99) subit des clivages par le complexe γ -sécrétase, menant à la libération du peptide A β et de l'AICD (*APP β intracellular C-terminal domain*) (LaFerla *et al.*, 2007). Les fonctions de ces fragments ne sont pas totalement élucidées mais l'AICD est un médiateur de la signalisation intracellulaire (Descamps *et al.*, 2013). La γ -sécrétase est un complexe multiprotéasique composé des deux PSEN1 et 2 responsables de l'activité catalytique, ainsi

que de protéines régulatrices de l'activité enzymatique, soient : la nicastrine, la PEN2 (*Presenilin enhancer 2*) et l'APH-1 (*Anterior pharynx-defective 1*), régulatrice de la localisation à la surface cellulaire de la nicastrine (Kaether *et al.*, 2006 ; Bekris *et al.*, 2010). Les clivages de l'APP par la γ -sécrétase sont variables et induisent la production de peptides A β de tailles différentes (Fig. 2) dont les formes 1-40 et 1-42 impliquées dans la MA (Ford *et al.*, 2007). Les peptides A β sont connus pour leur forte implication dans la pathogénèse de la MA, mais il a également été montré qu'ils possèdent un rôle physiologique normal à une faible concentration et qu'ils sont même essentiels pour le fonctionnement des synapses. Lorsque le peptide A β est libéré par les neurones de l'hippocampe en condition basale, il va avoir pour rôle de réguler le potentiel d'action synaptique afin de le diminuer et ainsi favoriser le processus de mémorisation dans ces neurones (Morley *et al.*, 2010 ; Koudinov et Berezov, 2004).

Comme mentionné précédemment, l'action d'une sécrétase en particulier dépend du patrimoine génétique de l'individu et de la composition en lipides et en cholestérol des membranes cellulaires. De ce fait, les mutations rencontrées chez les personnes qui développent la forme génétique de la MA, vont plutôt induire la libération des peptides A β grâce à l'action du complexe γ -sécrétase (implication des gènes codant pour les PSEN1 et 2) (Bekris *et al.*, 2010).

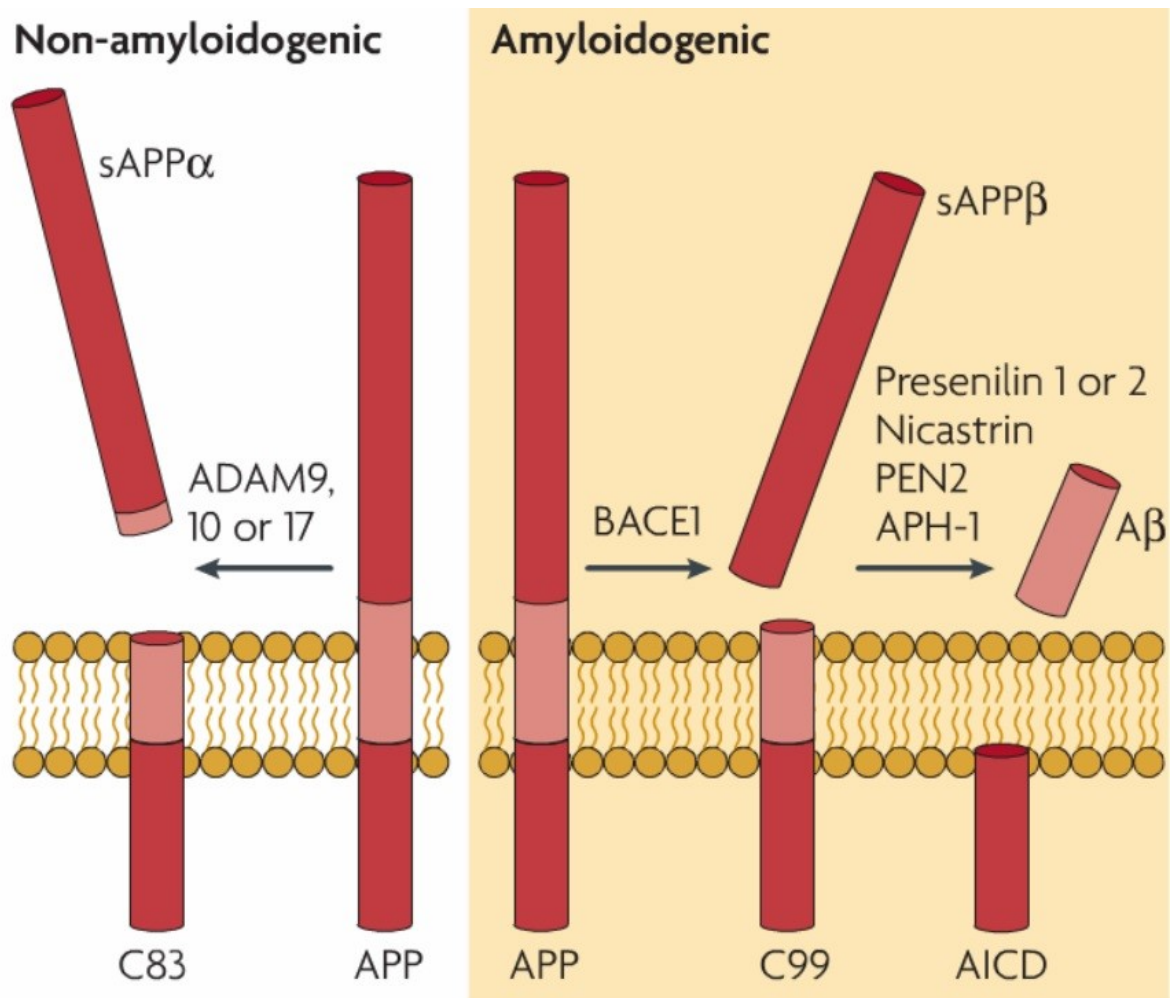


Figure 1. Voies alternatives de protéolyse de l'APP.

La voie non-amyloïdogénique procède par clivage de l'APP par l' α -sécrétase (ADAMs) générant le fragment C83 et la protéine soluble APP α s. Le clivage par la β -sécrétase (BACE1) et le complexe protéique γ -sécrétase (PSEN1 ou 2, nicastrine, PEN2, APH-1) induit la protéolyse par la voie amyloïdogénique de l'APP et la génération des fragments C99 et AICD, ainsi que des peptides A β et de la protéine APP β s (LaFerla *et al.*, 2007. Reproduit par permission de Nature Publishing Group).

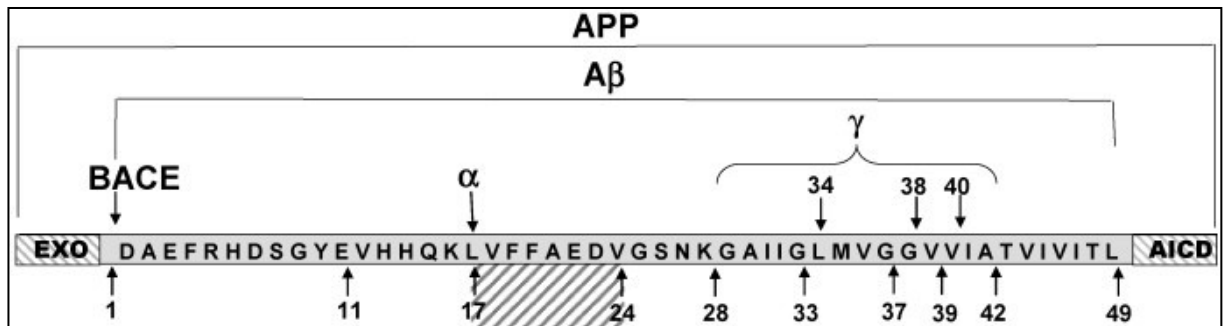


Figure 2. Sites de clivage des sécrétases.

La sécrétase BACE1 clive l'APP au niveau du premier résidu formant le peptide Aβ. L' α -sécrétase clive l'APP au niveau du 17^{ème} résidu à l'intérieur de la séquence formant le peptide Aβ. La partie comprise entre les résidus 17 et 24 correspond au fragment transmembranaire à la fois de la protéine APP et du peptide Aβ. La γ -sécrétase possède plusieurs sites de clivage variables dans la séquence du peptide Aβ : 28, 33, 34, 37, 38, 39, 40, 42. Les parties « exo » et « AICD » sont clivées lors de la génération du fragment Aβ et libérée dans le milieu extracellulaire ou dans le cytoplasme. (Modifié de Ford *et al.*, 2007).

La protéolyse de l'APP est souvent décrite comme ayant lieu à la surface des cellules, cependant, dans le cas de la voie amyloïdogénique, elle a plutôt lieu à l'intérieur des endosomes, dans les neurones (Fig. 3). La séquence de clivage est identique et dépendante de la composition lipidique de la bicouche (Nesic *et al.*, 2012), mais les peptides Aβ libérés suite aux clivages, vont demeurer ancrés dans la membrane plasmique suite à leur transport à la surface cellulaire par des corps vésiculaire (Rivest, 2009).

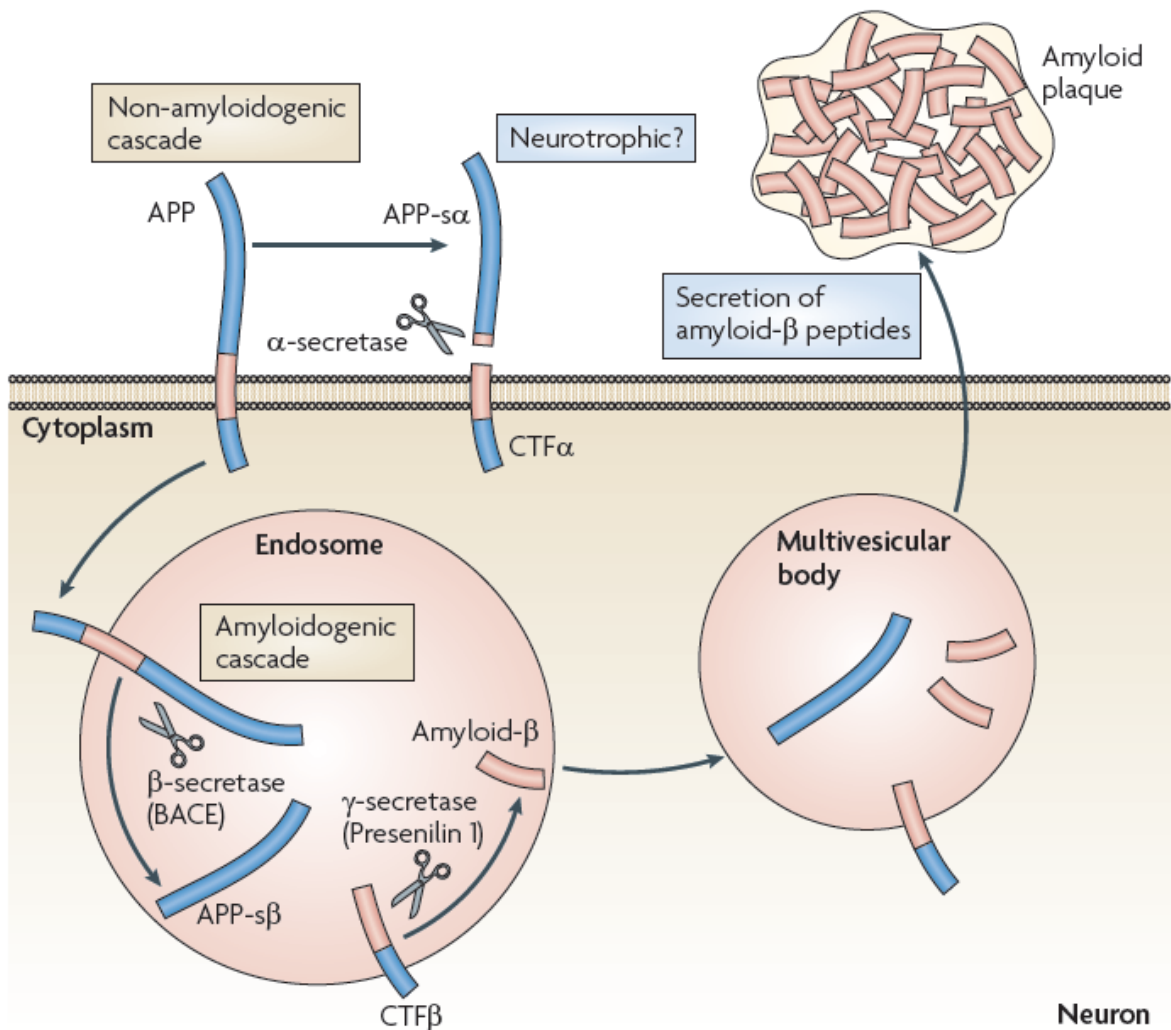


Figure. 3. Protéolyse de l'APP dans les neurones.

Dans le cas de la protéolyse amyloïdogénique de l'APP, la protéine est internalisée dans les endosomes neuronaux où elle va subir les différentes séquences de clivage par la β -sécrétase et le complexe γ -sécrétase. Puis le fragment correspondant au peptide A β va être transporté à la surface par des corps multivésiculaires. Suite à leur production, les peptides A β vont être en mesure de s'agréger en plaque sénile dans le milieu extracellulaire neuronal. (Rivest *et al.*, 2009. Reproduit par permission de Nature Publishing Group).

I.4.2.4. Clairance des peptides A β

De nombreux échanges moléculaires et protéiques ont lieu dans le milieu extracellulaire du cerveau entre les différents types de cellules cérébrales, pouvant conduire à l'apparition et à l'accumulation de toxines suite à la dégradation de pathogènes ou de protéines. Pour éviter cela, le cerveau contient de nombreux vaisseaux sanguins pouvant interagir avec la barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE est la plus grande surface de transport et d'échange entre le cerveau et la périphérie et donc la voie de clairance principale du milieu extracellulaire cérébral (Nelson *et al.*, 2015). Plusieurs maladies neurodégénératives telles que la MA, la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington présentent des défauts de clairance de protéines toxiques depuis le cerveau (Nelson *et al.*, 2015).

Dans la forme sporadique de la MA, un défaut de clairance des peptides A β est envisagé pour expliquer la forte présence des peptides dans le cerveau. Des études expérimentales sur divers modèles animaux ont montré qu'en conditions physiologiques, 70 à 85 % des peptides A β sont éliminés du cerveau *via* la BHE (Nelson *et al.*, 2015). La première protéine à médier la transcytose des peptides à travers la BHE est la protéine LRP1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 1*) (Ramanathan *et al.*, 2015 ; Nelson *et al.*, 2015 ; Storck *et al.*, 2016) *via* l'absorption des peptides dans les cellules endothéliales. Cette protéine est connue pour être fortement diminuée chez les personnes âgées et les personnes souffrant de la MA (Donahue *et al.*, 2006). De plus, l'intégrité des vaisseaux sanguins cérébraux et de la BHE est fortement compromise dans la MA, en partie due à la diminution de l'expression de la protéine GLUT1 (*glucose transporter 1*) (Horwood et Davies, 1994).

La protéine ApoE est quant à elle connue pour réguler l'aggrégation des peptides A β , leur absorption, leur dégradation et leur clairance par phagocytose, dans le cerveau (Sato et Morishita, 2015). Cependant, la forme ApoE4 de la protéine a été montrée chez la souris, comme induisant des dommages à la BHE, ainsi diminuant sa capacité de clairance (Nelson *et al.*, 2015). Il a été également montré dans les souris que des protéines impliquées dans l'homéostasie lipidique telle que ABCA7 (*ATP-binding cassette transporter A7*) ou TREM2 sont impliquées dans la phagocytose des peptides A β par les cellules microgliales

(Kim *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2015). L'expression de ces protéines est modifiée lors de la MA et induit donc une diminution de la phagocytose des peptides.

Les métabolismes lipidiques et glucidiques étant fortement perturbés au cours du vieillissement mais aussi de la MA, ces différents systèmes de clairance deviennent défectueux et induisent une accumulation de peptides A β dans le milieu extracellulaire cérébral.

1.4.3. Dégénérescence neurofibrillaire

En conditions physiologiques normales, la protéine tau aide à l'assemblage de la tubuline en microtubules, composants majeurs du cytosquelette cellulaire. En conditions pathologiques comme dans la MA, une phosphorylation anormale de la protéine tau diminue l'assemblage de la tubuline α/β et mène à une désorganisation du cytosquelette (Kolarova *et al.*, 2012). La protéine tau hyperphosphorylée peut également s'autopolymériser et former des filaments insolubles conduisant à la mort des neurones appelés aussi enchevêtrements de neurofibrilles ou nœuds neurofibrillaires (Kolarova *et al.*, 2012 ; Cardenas *et al.*, 2012). Ces protéines possèdent dans leur séquence plusieurs répétitions d'un même domaine qui permet la liaison aux microtubules, régulée par la phosphorylation de la protéine. La protéine tau hyperphosphorylée est moins soluble et est modifiée chimiquement suite au stress oxydatif. Dans ces conditions, la protéine s'agrège en forme de paires hélicoïdales de filaments puis ensuite en neurofibrilles (Barghon *et al.*, 2002). Ce sont les filaments présents dans le cytoplasme qui sont responsables de la neurodégénérescence observée dans les tauopathies.

Pendant de nombreuses années, « l'hypothèse tau » a été considérée aussi valable que « l'hypothèse amyloïde » comme cause probable de la MA. Cependant, des données récentes ont montré que l'hyperphosphorylation de la protéine tau est une conséquence de la surproduction des peptides A β (LaFerla *et al.*, 2005). Les lésions provoquées par la protéine tau ne sont pas spécifiques à la MA et sont également présentes dans d'autres maladies neurodégénératives appelées « tauopathies » telles que le syndrome de Down et la démence fronto-temporale, par exemple (LaFerla *et al.*, 2005).

1.4.4. Relation entre la protéine tau et les peptides A β

Le lien entre les deux lésions morphologiques majeures de la MA, i.e. les plaques de peptides A β et les neurofibrilles de la protéine tau, a fait l'objet de nombreuses discussions controversées en rapport avec leur implication comme cause de la neurodégénérescence (Suh *et al.*, 2002).

Physiologiquement, la protéine tau participe à la stabilisation des microtubules axonaux ce qui contribue essentiellement au transport vésiculaire (Zhang *et al.*, 2005) impliqué dans la plasticité synaptique et le processus de mémorisation (Boekhoorn *et al.*, 2006). Plusieurs protéines kinases sont impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau. Les plus importantes en rapport avec la MA sont la GSK-3 (glycogène 3 β -syntase kinase) et la MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Elles sont également colocalisées avec les neurofibrilles dans le cerveau des patients atteints de la MA. Il a été rapporté qu'une stimulation de MAPK par les peptides A β augmente la phosphorylation de la protéine tau (Rapoport *et al.*, 2000). La GSK-3 est activée suite à l'agrégation des peptides A β et induit l'hyperphosphorylation de la protéine tau, conduisant par la suite à la mort neuronale (Alvarez *et al.*, 1999 ; Takashima *et al.*, 1993). D'autres études ont montré que l'accumulation des peptides A β et l'hyperphosphorylation de la protéine tau ont lieu de manière asynchrone et que les changements conformationnels de la protéine tau à l'intérieur des neurones a lieu suite à l'accumulation des peptides A β (LaFerla *et al.*, 2005 ; Oddo *et al.*, 2003). Suite à l'ensemble de ces observations, « l'hypothèse tau » comme cause de la MA a été abandonnée au profit de « l'hypothèse amyloïde » dont la conséquence est une hyperphosphorylation de la protéine tau et la présence d'un état pro-inflammatoire cérébral.

1.5. Traitements actuels ou en cours d'études cliniques

Les traitements actuels contre la MA ont davantage un rôle bénéfique envers les symptômes qu'une réelle fonction thérapeutique (Lleó *et al.*, 2006). La plupart des interventions ciblent les neurotransmetteurs et leurs récepteurs afin d'améliorer les fonctions cognitives des patients. Cependant, les essais cliniques actuels sont plutôt orientés

vers l'immunothérapie active ou passive contre les peptides A β ou les enzymes impliquées dans le processing de l'APP. D'autres essais cliniques visent à traiter la MA très en amont en ciblant les causes du dépôt de peptides amyloïdes. Ces différents traitements sont brièvement présentés ci-dessous :

- Inhibiteurs de l'acétylcholine estérase

Une forte perturbation du système cholinergique a été observée chez les patients atteints de la MA, laquelle se traduit par une diminution des fonctions cognitives. La voie thérapeutique usuelle pour traiter les patients consiste à utiliser des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase (AChE-I) de type donézépil, rivastigmine ou bromhydrate de galantamine. L'inhibition de l'enzyme augmente la concentration et la durée d'action de l'acétylcholine dans la fente synaptique et ainsi améliore le fonctionnement des récepteurs cholinergiques impliqués dans les fonctions cognitives. Ces traitements ont cependant pour effets secondaires d'induire un état dépressif chez les patients (Suh *et al.*, 2002). Plusieurs modes d'actions des AChE-I sur la voie protéolytique de l'APP ont également été proposés, notamment la diminution de la cytotoxicité des peptides A β (Kimura *et al.*, 2005), la régulation non-amyloïdogène de l' α - et de la β -sécrétase (Caccamo *et al.*, 2006 ; Zimmermann *et al.*, 2005) et l'inhibition de l'accumulation des peptides A β (Caccamo *et al.*, 2005).

- Les antagonistes des récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) sont activés par le glutamate et permettent de faire entrer le flux d'ions calcium à l'intérieur des cellules *via* des canaux ioniques. Lorsque le niveau de stress oxydatif est important, les canaux calciques deviennent hyperactivés et induisent un important influx d'ions calcium, ce qui conduit à une signalisation en cascade menant à l'apoptose des neurones (Suh *et al.*, 2002). Les traitements proposés sont des antagonistes non compétitifs des récepteurs NMDA (chlorydrate de mémantine) et sont utilisés en tant que neuroprotecteur afin de ralentir le

développement de la MA et de diminuer les troubles de comportement (Revett *et al.*, 2013).

- Inhibition de l'APP et de la production des peptides A β

- Plusieurs mécanismes ont été tentés sur des souris dans ce cas, par exemple l'utilisation de la doxycycline permettant de diminuer la régulation du gène APP et donc de contrôler le dépôt de peptides A β (Jankowsky *et al.*, 2005). Cependant, tout comme pour les immunothérapies, les effets de ce genre de traitement sont très modestes compte tenu du rôle physiologique basal des peptides A β .
- Les inhibiteurs des sécrétases ont également fait l'objet de nombreuses recherches et de tests cliniques sont présentement en cours avec des composés tels que le LY450139TM de Eli Lilly & Co, inhibiteur de la γ -sécrétase actuellement en phase II, le R-flurbiprofène[®] de Myriad Genetics, en phase III. Les inhibiteurs de la β -sécrétase sont testés actuellement en clinique en association avec de l'immunothérapie (Moulder *et al.*, 2013).
- L'immunothérapie active ou passive visant les peptides A β est évaluée en clinique de manière préventive ou thérapeutique. Plusieurs études préventives sont en cours pour le traitement de patients atteints de la forme familiale de la MA. Les traitements les plus courants sont le Gantenerumab, le Solanezumab et le Crenezumab qui sont des anticorps monoclonaux (IgG1, immunoglobuline G1 dans le cas du ganenerumab) dirigés contre les peptides A β dans le but d'empêcher leurs actions cytotoxiques et la formation de plaques. Ces traitements sont cependant peu efficaces pour les patients déjà atteints par la maladie, mais les données en thérapie préventive sont attendues (Wang *et al.*, 2013b).

- Les anti-inflammatoires

Etant donné le caractère inflammatoire de la MA, notamment au niveau cérébral et la corrélation entre un retard d'apparition de la maladie chez les

patients traités chroniquement par des AINS (anti-inflammatoires non-stéroïdiens), des études se sont penchées sur les effets d'un traitement anti-inflammatoire par AINS ou cannabinoïdes (Moriyama *et al.*, 2005 ; Ramirez *et al.*, 2005). Ces études n'ont pas montré de réels bénéfices, mais l'utilisation d'anti-inflammatoires en association avec d'autres traitements demeure envisageable.

- Les IVIG

Une étude a montré que l'injection d'immunoglobulines (Ig) par voies intraveineuses chez un modèle murin est efficace pour réduire l'accumulation de peptides A β . Les résultats ont montré qu'elles peuvent également agir de manière synergique avec l'Acyclovir[®], un agent antiviral spécifique au virus HSV-1. Ces résultats suggèrent que leur utilisation combinée pourrait être bénéfique pour traiter la MA. Les IVIG (*intravenous immunoglobulins*) sont un produit thérapeutique déjà connu, dérivé d'un pool de plasma d'une centaine de personnes et identifié pour fonctionner contre des infections par les virus HSV-1 entre autres (Itzhaki et Wozniak, 2012).

1.6. Inflammation du cerveau associée à la maladie d'Alzheimer

Une autre caractéristique importante des modifications pathologiques associées à la MA est son état inflammatoire important (Fig. 4). Il a été décrit que les peptides A β servent de signal d'inflammation dans le cerveau (Ferretti *et al.*, 2012 ; Lyman *et al.*, 2013 ; Dalgediene *et al.*, 2013) et les dommages créés par la MA, en particulier sur les neurones, provoquent un état inflammatoire qui engendre des complications impliquant des facteurs immuns qui affectent les différentes cellules du cerveau (Glass *et al.*, 2010). Une partie des cellules microgliales (considérées comme protectrices) va produire des facteurs neurotrophiques comme l'IGF (*Insulin Growth Factor*) et le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) suite à l'action du TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) (Glass *et al.*, 2010).

Ces cellules ont également pour rôle la destruction et la clairance des peptides A β ou tout autre déchet organique ou cellulaire nuisible pour les neurones. Ainsi, les cellules microgliales sont donc considérées comme les macrophages du cerveau (présentation d'antigènes, expression des récepteurs scavengers, phagocytose) (Glass *et al.*, 2010). En revanche, les cellules microgliales dites neurotoxiques, ainsi que les astrocytes activés produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et du monoxyde d'azote (NO) qui induisent l'apoptose et la nécrose des neurones affectés, ainsi que des cytokines. Ces cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF α (*Tumor Necrosis Factor- α*)) maintiennent l'état inflammatoire dans le cerveau et sa transmission au système périphérique (Glass *et al.*, 2010 ; Jacobs *et al.*, 2012 ; Le Page *et al.*, 2015). La MA est de ce fait une maladie inflammatoire systémique (Tuppo *et al.*, 2005).

Selon les connaissances actuelles, le vieillissement normal s'accompagne de changements immuns appelés immunosenescence associée à l'inflamm-aging (Fülöp *et al.*, 2015). Lors du processus d'immunosenescence, outre les complications cliniques mentionnées ci-dessus, le système immunitaire accumule des déficits. Ce phénomène est de manière générale associé avec une diminution de la quantité de L_T et L_B (lymphocytes T et B) naïfs, une augmentation des L_T sénescents positifs spécifiques à certains pathogènes, notamment le CMV, une réponse cytokinique de type surtout Th2 et une augmentation de plusieurs cytokines telles que l'IL-6, le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-12 et l'IL-18 sont augmentées (Jacobs *et al.*, 2012).

L'hypothèse inflammatoire dans la MA est appuyée par le fait que les patients traités de façon chronique par des anti-inflammatoires non stéroïdiens présentent un risque fortement diminué de développer la MA (In t'Veld *et al.*, 2001 ; Etminan *et al.*, 2003 ; Gasparini *et al.*, 2004). Cet état inflammatoire provoqué par les modifications pathologiques subies par le cerveau est de surcroît amplifié par la production de peptides A β par les neurones en réponse à l'état inflammatoire. Une boucle d'activation soutenue de l'inflammation est ainsi générée dans le cerveau, mais la cause primaire qui initie l'état inflammatoire demeure à déterminer (Glass *et al.*, 2010).

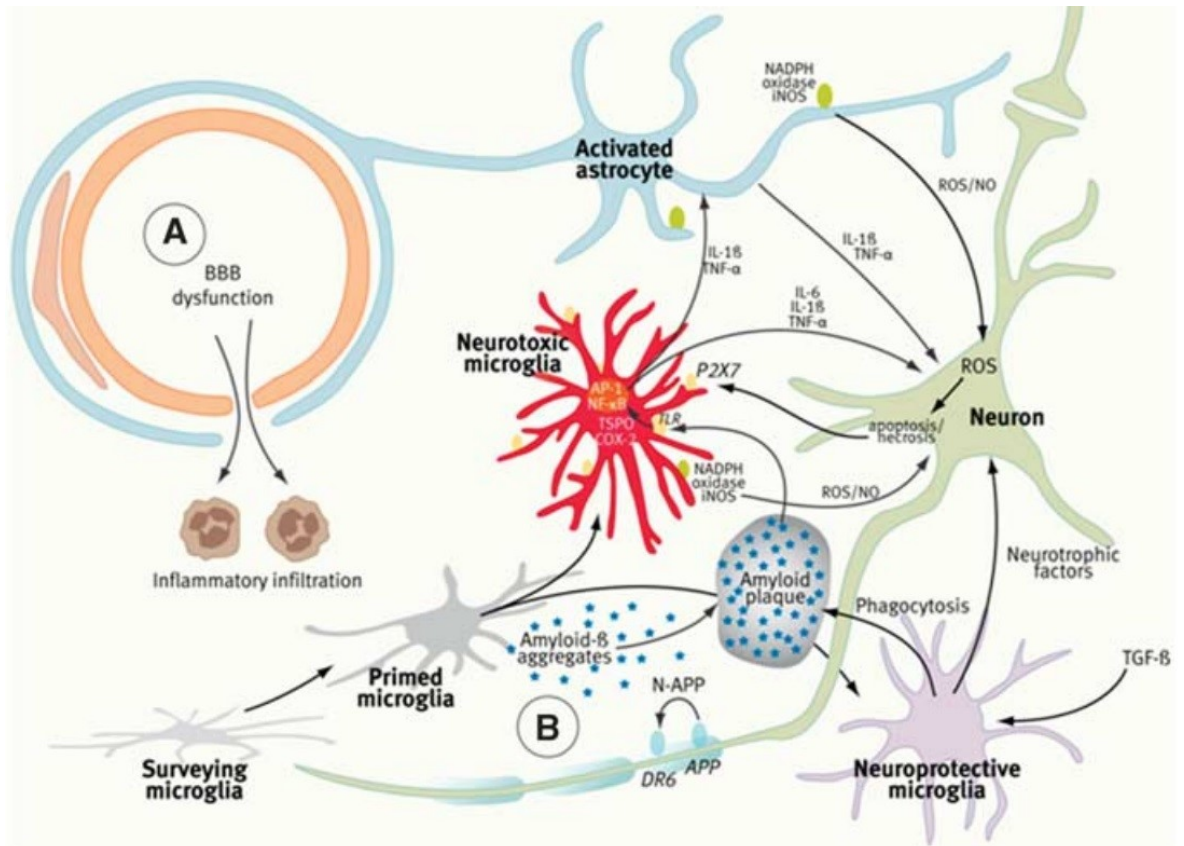


Figure 4. Inflammation cérébrale suite à l'agrégation des peptides Aβ.

Représentation schématique de l'état inflammatoire dans le cerveau suite à la sécrétion de peptides Aβ par les neurones et mettant en jeu les neurones, les cellules microgliales, les astrocytes et le lien avec la périphérie *via* la barrière hémato-encéphalique. (Jacobs *et al.*, 2012. Licence commune).

II. Virus *Herpesviridae*

L'intérêt des virus de la famille des *Herpesviridae* dans cette thèse vient du fait que l'implication des infections cérébrales dans la pathogénèse de la MA a été mise en évidence (Harris et Harris, 2015). Les pathogènes induisent la MA directement ou indirectement *via* la production de peptides A β toxiques, l'accumulation de peptides A β en plaques, l'hyperphosphorylation de la protéine tau, les dommages neuronaux et l'apoptose (Wozniak et Itzhaki, 2013 ; Harris et Harris, 2015).

La famille des virus *Herpesviridae* compte environ 130 virus différents et ils possèdent tous un large ADN double brin. Chez l'humain, 8 herpesvirus (HHV) sont connus, soient : herpès simplex virus (HSV) 1 et 2, varicella zoster virus (VZV) ou HHV-3, Epstein-Barr virus (EBV) ou HHV-4, cytomégalovirus (CMV) ou HHV-5, HHV-6, HHV-7 et HHV-8 (Steiner et Benninger, 2013).

Les virus de la famille des *Herpesviridae* sont des virus dits « enveloppés », puisqu'ils possèdent une enveloppe cellulaire qui protège le génome encapsidé composé d'ADN bicaténaire linéaire (Grinde, 2013 ; Reske *et al.*, 2007) (Fig. 5). La capside est composée de 162 capsomères qui forment un icosapentahédre (Steiner et Benninger, 2013). L'enveloppe est une bicouche lipidique assemblée à partir de la membrane nucléaire de la cellule hôte, dans laquelle s'insère des glycoprotéines ayant des rôles dans l'adhésion, la fusion et l'entrée des virus dans la cellule telles que la glycoprotéine B (gB) qui permet l'entrée de virus dans la cellule. D'autres glycoprotéines à la surface des virus HSV-1 sont nécessaires à la fusion/entrée, telles que la protéine gD, appelée aussi « *receptor binding protein* » (permet l'attachement aux cellules) (Steiner et Benninger, 2013 ; Eisenberg *et al.*, 2012) qui permet d'activer le dimère gH/gL également important pour la fusion des virus avec les membranes des cellules hôtes (Akhtar *et al.*, 2009 ; Reske *et al.*, 2007 ; Eisenberg *et al.*, 2012 ; Komala *et al.*, 2013). L'enveloppe lipidique protège également le tégument qui contient les protéines virales.

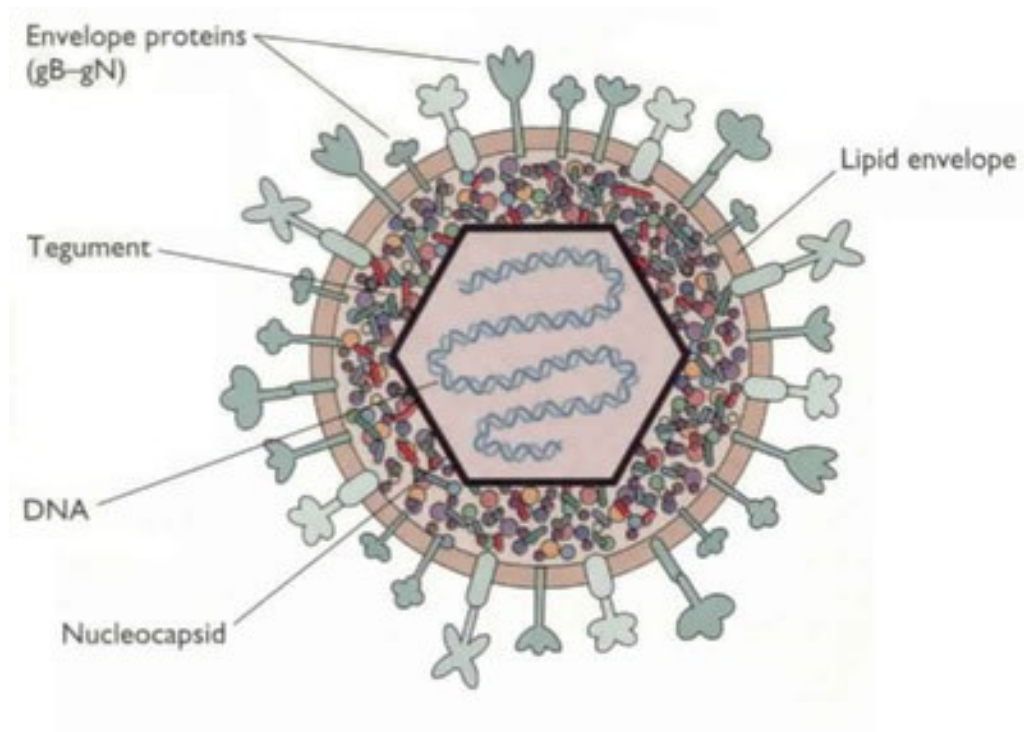


Figure 5. Représentation schématique des virus *Herpesviridae*.

Les *Herpesviridae* sont composés d'un génome sous forme linéaire bicaténaire protégé par une capsidie de nature protéique. L'enveloppe du virus est une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées nombreuses glycoprotéines servant au contact avec les cellules cibles. L'enveloppe protège le génome du virus et les protéines virales présentes dans le tégument (Licence commune).

II.1. Herpes Simplex virus 1

Le virus HSV-1 a la capacité de demeurer dans l'organisme durant toute la vie suite à la primo infection (Akhtar *et al.*, 2009 ; Grinde, 2013). Il infecte l'humain *via* les surfaces muqueuses ou des dommages au niveau de la peau et les primo-infections sont généralement asymptomatiques (Steiner et Benninger, 2013). Ils restent sous forme latente dans les neurones des ganglions trijumeaux (Grinde, 2013 ; Held et Derfuss, 2011) et sont réactivés lors d'une déficience du système immunitaire, de fatigue ou de stress (Grinde,

2013). De manière générale, ces réactivations sont asymptomatiques mais dans certains cas on peut observer la réapparition de lésions herpétiques à l'endroit de l'infection primaire de type boutons de fièvre ou, dans les cas les plus graves, apparaissant chez les patients immunosupprimés ou déprimés, des encéphalites herpétiques (Grinde, 2013).

Le cycle infectieux neurotrophique des virus HSV-1 débute par la réplication dans les cellules somatiques et est suivi d'une transmission secondaire aux cellules des ganglions et des nerfs crâniens (Steiner et Benninger, 2013). La transmission entre les cellules et le double tropisme (cellules épithéliales et neurones) est peu comprise et toujours sous étude (Abaitua *et al.*, 2013). L'entrée des virus dans les cellules nécessite l'interaction des protéines gD avec des récepteurs spécifiques à HSV-1 tels que HVEM (*herpesvirus entry mediator*) ou la nectine-1 et a lieu par le biais des radeaux lipidiques, régions riches en cholestérol (Bender *et al.*, 2003). Cependant, dans certaines cellules, l'entrée peut également se faire par endocytose. Suite à l'entrée des virions dans les terminaisons nerveuses, *via* fusion des membranes, l'enveloppe des virus est détruite et la capside et le tégument sont déposés dans le cytosol. Le transport axonal rétrograde délivre les capsides au noyau le long des microtubules suite à un réarrangement du cytosquelette généré par le virus lui-même (Dixit *et al.*, 2008 ; Bertke *et al.*, 2012).

Les neurones présentent un comportement différentiel par rapport à l'infection par HSV-1. Certains neurones sont susceptibles à l'infection productive tandis que d'autres sont susceptibles à incorporer HSV-1 sous forme latente. Ces différences semblent être expliquées par la présence d'ARN ou de protéines régulatrices présentes dans le noyau des neurones infectés (Steiner et Benninger, 2013). La latence est caractérisée par le maintien du génome viral à l'intérieur des neurones sous forme circulaire (dans les ganglions trijumeaux dans le cas des virus HSV-1) (Su *et al.*, 2002) en absence de production de nouveaux virus infectieux (Steiner et Benninger, 2013). La forme latente est maintenue par la forte expression du gène LAT (*latency-associated transcript*) (Stevens *et al.*, 1987). En parallèle, les propriétés anti-apoptotiques de LAT permettent le maintien de la latence en promouvant la survie des neurones infectés (Perng et Jones, 2010).

La sortie de la forme latente semble être médiée par la protéine virale VP16 qui est un transactivateur de l'expression génique immédiate et qui promeut l'infection (Steiner et Benninger, 2013). Il a été montré dans un modèle murin que la néo-production de protéines

virales VP16 induit la sortie directe de la forme latente des virus HSV-1 et leur réactivation (Thompson *et al.*, 2009).

Suite à la réactivation du virus, le génome reprend sa forme linéaire et la transcription et la traduction ont lieu dans le noyau (Coen *et al.*, 2003). Pendant la phase infectieuse productive, les gènes sont transcrits en une cascade ordonnée depuis les gènes « immediate early » à tardifs en passant par précoces (Coen *et al.*, 2003 ; Harkness *et al.*, 2014). Le cycle de réplication d'HSV-1 est illustré à la Fig. 6. Par la suite, les protéines virales sont synthétisées et assemblées pour former notamment la capsid. Les virions néoformés bourgeonnent depuis la membrane nucléaire et sont acheminés par transport antérograde rapide à l'extrémité des axones (Steiner et Benninger, 2013). Les données sont cependant encore incertaines et les virions pourraient également être transportés le long des axones sous forme « nue », c'est-à-dire sans enveloppe et bourgeonner à partir de la membrane plasmique plutôt que nucléaire (Steiner et Benninger, 2013).

Le virus HSV-1 est reconnu par le système immunitaire inné par le biais des TLR (*Toll-like receptors*) tels que TLR2, TLR3 et TLR9 qui induisent une réponse immédiate *via* les interférons de type I, essentiels à la survie suite à une infection par le virus HSV-1 (Wang *et al.*, 2012 ; Reinert *et al.*, 2012), mais aussi les RLR (*RIG-I-like receptors*), les NLR (*NOD-like receptors*), en particulier NLRP3, ou des récepteurs cytosoliques qui détectent les structures moléculaires invariantes de type PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Ma et He, 2013). Les récepteurs PRR (*pattern recognition receptors*) sont localisés essentiellement à la surface cellulaire ou dans des compartiments intracellulaires dans le cas des récepteurs qui reconnaissent les protéines, l'ADN et l'ARN viraux (Ma et He, 2013). La signalisation intracellulaire suite à la reconnaissance du virus HSV-1 implique la protéine MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) et le facteur de transcription NF- κ B, ce qui va conduire à l'expression de cytokines proinflammatoires (Ma et He, 2013). La production de cytokines par les cellules microgliales, les astrocytes et les cellules immunitaires infiltrées dans le cerveau est essentiellement médiée par l'activation du TLR2 suite à sa liaison avec le virus HSV-1 (Wang *et al.*, 2012).

Il est évident que les virus herpétiques latents doivent se protéger de l'activation du système immunitaire lors de l'infection, notamment des neurones. Il existe un mécanisme

qui limite la présentation des antigènes par le CMH et même une régulation de l'expression des CMH de classe I et II afin d'inhiber les signaux inflammatoires (Grinde, 2013). Les virus herpétiques n'induisent pas de mort cellulaire laquelle serait interprété comme étant un signal d'infection pour les cellules voisines, limitant ainsi l'activation à la hausse de la microglie. Le virus HSV-1 et d'autre virus de la famille *Herpesviridae* ont besoin de cellules vivantes, sans signaux d'infectivité, pour se répliquer ou entrer en latence, tout en bloquant la réponse immunitaire. Le scientifique britannique James Lovelock a d'ailleurs dit à leur sujet : « *An inefficient virus kills its host. A clever virus stays with it* ».

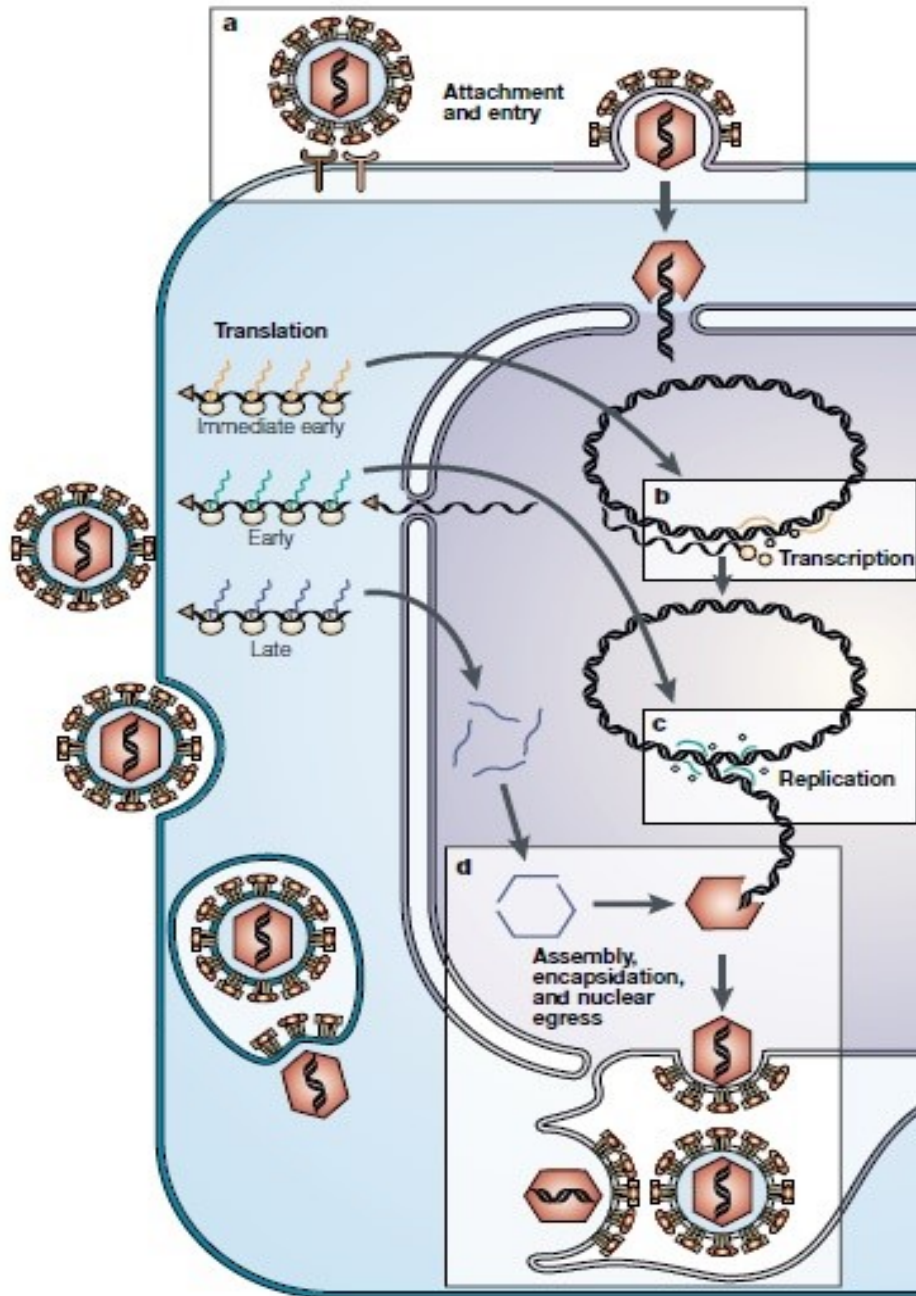


Figure 6. Cycle de répliation des *Herpesviridae*.

Représentation schématique du cycle de répliation des virus *Herpesviridae* dans une cellule. Suite à l'attachement et l'entrée des virus dans la cellule, le génome est internalisé dans le noyau et transcrit selon un ordre précis. Les protéines virales sont ensuite traduites et les nouveaux virions sont assemblés et quittent la cellule par bourgeonnement à travers la membrane plasmique. (Coen *et al*, 2003. Reproduit par permission de Nature Publishing Group).

II.2. Cytomégalo­virus

Le cytomégalo­virus (CMV) fait également partie des virus de la famille *Herpesviridae*. Il entre également dans des cycles de latence et de réactivations suite à sa primo infection, également asymptomatiques, sauf dans les cas des patients immunodéprimés, immunosupprimés ou lors d'infections du fœtus (Lurain *et al.*, 2013). Les infections peuvent alors induire des encéphalites graves ou des neuropathies (Kim et Hollander, 1993 ; Lurain *et al.*, 2013). Dans le cas du fœtus, l'infection cause des retards de croissance et des défauts de développement sévères (Grinde, 2013). Son intérêt dans notre étude relève du fait qu'il va avoir les mêmes conséquences que le virus HSV-1 sur l'organisme suite à leurs nombreuses réactivations. Les réactivations du CMV induisent également une augmentation de lymphocytes T spécifiques avec l'âge, au détriment d'autres lymphocytes qui seraient utiles pour lutter contre d'autres infections (Lurain *et al.*, 2013). En revanche, le virus CMV reste latent dans les monocytes (Grinde, 2013 ; Lurain *et al.*, 2013) et peut infecter le cerveau suite à sa réactivation. La réponse immunitaire est alors déclenchée ce qui peut contribuer au développement de la MA (Lurain *et al.*, 2013). Le virus CMV se réplique selon des séquences identiques à celles du virus HSV-1 et les voies de signalisations inflammatoires activées ou les techniques d'évasion du système immunitaire sont essentiellement les mêmes que pour le virus HSV-1 (Grinde, 2013).

III. Revue de la littérature sur les propriétés antimicrobiennes des peptides A β

III.1. Les pathogènes dans la maladie d'Alzheimer

L'hypothèse infectieuse a récemment été proposée dans le but d'expliquer certaines formes sporadiques de la MA (Itzhaki et Wozniak, 2010 ; Miklossy, 2011). Il a été observé que les cerveaux de certains patients atteints de la MA montrent la présence de pathogènes en concentrations élevées, dont des bactéries (*Chlamydomyxa pneumoniae*, *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*), des parasites (*Spirochaetales*), des champignons (*Actinomyces*) et des virus (*Herpesviridae*) (Miklossy, 2011 ; Bu *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont décrit l'implication du virus HSV-1 et du virus CMV dans la MA (Lin *et al.*, 2002 ; Lin *et al.*, 2002b ; Itzhaki *et al.*, 2004 ; Letenneur *et al.*, 2008 ; Mori *et al.*, 2004 ; Carbone *et al.*, 2013 ; Itzhaki, 2014) ainsi qu'une nette corrélation avec les patients porteurs de l'allèle ApoE-ε4 (Itzhaki *et al.*, 1997 ; Lin *et al.*, 1998 ; Itzhaki et Wozniak, 2005, 2006 ; Steel et Eslick, 2015). Le virus HSV-1 peut être présent dans les plaques séniles des patients atteints de la MA (Jamieson *et al.*, 1991, 1992, Wozniak *et al.*, 2009), mais surtout on retrouve des anticorps anti-HSV-1 chez 90% des personnes âgées non démentes (Wozniak *et al.*, 2009 ; Steiner et Benninger, 2013 ; Piacentini *et al.*, 2014). Le virus CMV a également été retrouvé chez les patients atteints de la MA et chez les personnes non démentes, mais les taux varient de 20% à 100% selon l'âge et le statut socio-économique (Lurain *et al.*, 2013).

Un fait important à souligner dans le contexte de cette thèse et pour la compréhension de l'étiologie de la MA, est que les zones du cerveau touchées par les encéphalites herpétiques provoquées par les virus HSV-1 sont les mêmes que celles endommagées dans la MA, à savoir l'hippocampe et les lobes frontaux-temporaux (Dobson *et al.*, 2003). Il a également été observé que les peptides Aβ colocalisent avec l'ADN des virus HSV-1 dans le cerveau des patients atteints de la MA (Wozniak *et al.*, 2009 ; Kammerman *et al.*, 2006). De plus, Wozniak et Itzhaki ont montré que l'utilisation d'agents antiviraux tels que l'acyclovir ou le penciclovir réduisent l'accumulation de peptides Aβ et de protéines tau hyperphosphorylées dans des cellules en culture infectées par HSV-1 (Wozniak *et al.*, 2011).

Plusieurs études récentes font également état d'un rôle important des virus herpétiques dans l'étiologie de la MA. L'étude de Lövheim et collaborateurs mentionne une augmentation de la présence d'anticorps IgG anti-HSV-1 dans le plasma des patients malades vs patients sains (Lövheim *et al.*, 2015). Cette même équipe indique néanmoins que seule la présence des IgM anti-HSV-1, indicateur des infections suite à une réactivation, induit une augmentation du risque de développer la MA, mais pas la présence des IgG (Lövheim *et al.*, 2015b).

D'autres virus de la famille *Herpesviridae* tels que CMV, EBV et l'HHV-6 ont également été impliqués dans la progression de la MA (Carbone *et al.*, 2014). De plus, une étude récente a également montré qu'une infection *in vitro* de cellules de type

neuroblastome par le HSV-2 induit une forte accumulation de protéines tau hyperphosphorylées et de peptides A β 40 et 42. L'étude montre également que l'infection induit une diminution de la protéolyse non-amyloïdogénique d'APP au profit de la voie amyloïdogénique et donc, pathogène, ainsi qu'une altération du processus autophagique des cellules (Kristen *et al.*, 2015).

III.2. A β sont des peptides possédant une activité antimicrobienne

Des traitements immunothérapeutiques ont été utilisés contre les peptides A β dans le but de diminuer leurs concentrations dans le cerveau afin de traiter ou prévenir la MA. La première étude utilisant un vaccin contre les peptides A β a été un échec (Wilcock et Colton, 2008). Aucun effet favorable n'a été observé et 6% des patients (15 sur 360) ont développé une encéphalite, conduisant dans certains cas au décès du patient (Wilcock et Colton, 2008). Ces résultats négatifs ont cependant attiré l'attention sur le fait que les peptides A β pourraient jouer un rôle physiologique important et, jusque-là inconnu. Les éliminer complètement entraîne des conséquences morbides. Dans ce contexte, une étude a montré que les peptides A β possèdent un rôle antimicrobien contre nombreuses bactéries et levures dans des essais *in vitro* (Soscia *et al.*, 2010). Dans cette étude, les résultats obtenus avec les peptides A β s'apparentaient à ceux de l'unique peptide antimicrobien naturel humain LL-37 (Soscia *et al.*, 2010 ; Guani-Guerra *et al.*, 2010), tout en possédant une efficacité supérieure dans certains cas.

En 2014, une étude s'est également penchée sur les propriétés antimicrobiennes des peptides A β et a montré un rôle antiviral contre les virus Influenza de type A (White *et al.*, 2014). Les auteurs ont montré que les peptides inhibent la réplication des souches pandémiques H3N2 et H1N1 *in vitro*. Ils précisent également que la forme du peptide A β la plus toxique : A β 42, montre une plus grande activité antivirale.

Notre étude a également permis de montrer que les peptides A β ont une activité antivirale contre les virus HSV-1, mais pas contre l'Adénovirus (Bourgade *et al.*, 2015). La différence entre ces deux virus réside dans le fait que l'Adénovirus est un virus « nu » qui ne possède pas d'enveloppe externe. Cette information, ainsi que la découverte de Cribbs, qui a montré une homologie de séquence entre les gB d'HSV-1 et les peptides A β (Cribbs

et al., 2000), nous a permis de proposer que l'action antivirale des peptides A β se fait *via* la membrane externe des virus enveloppés (HSV-1 et Influenza par exemple). Nous avons également montré que les virus HSV-1 et les peptides A β interagissent directement et que l'inhibition de la réplication des virus HSV-1 par les peptides A β se fait dans le milieu extracellulaire et que la présence des peptides A β inhibe l'entrée des particules virales dans les cellules.

Une autre étude, nous a également permis de déterminer que les neurones produisent des peptides A β en réponse à une infection virale. Plusieurs méthodes ont été employées pour confirmer le rôle des peptides A β dans l'inhibition de la réplication virale observée et infirmer le rôle des interférons. Nous avons également observé une réponse pro-inflammatoire de la part de la microglie suite à l'ajout dans le milieu de culture des peptides A β 42 et des virus HSV-1 de manière concomitante. L'activation de la microglie a induit une augmentation de la production des cytokines TNF α , IL-1 β et IFN α . ainsi qu'une phagocytose rapide des peptides A β 42. Cette étude nous a également permis de mettre au point une coculture de cellules de type neuronal et microglial pour étudier les interactions entre les peptides A β et les virus HSV-1 (Bourgade *et al.*, JAD, *in press*).

L'ensemble de ces informations nous permet de penser qu'il pourrait y avoir un lien entre la présence des virus, notamment HSV-1, mais en particulier leurs réactivations fréquentes dans le cerveau et l'accumulation dramatique des peptides A β en plaques séniles conduisant à l'apparition des symptômes de la MA.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Hypothèse

Les neurones produisent les peptides A β pour lutter contre l'infection suite à la réactivation des virus de la famille *Herpesviridae*.

Objectifs

Objectif #1

Mettre en évidence l'effet antiviral des peptides A β contre le virus HSV-1.

Objectif #2

Mettre en évidence la production de peptides A β par les cellules neuronales suite à une infection virale par le virus HSV-1 et étudier les effets des peptides A β dans un modèle de coculture de cellules neuronales et microgliales.

Objectif #3

Obtenir des données expérimentales dans le but de mettre en évidence le mécanisme de l'action antivirale des peptides A β .

ARTICLE 1

β -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1

Auteurs de l'article: Karine Bourgade, Hugo Garneau, Geneviève Giroux, Aurélie Y. Le Page, Christian Bocti, Gilles Dupuis, Eric H. Frost et Tamàs Fülöp.

Statut de l'article: publié dans *Biogerontology* 15(5), 7 novembre 2014:85-98.

Avant-propos: Ma contribution: conception et réalisation majeures des expériences, rédaction des premières versions du manuscrit en anglais, révisions et approbation des corrections.

Résumé : Les plaques amyloïdes, principaux marqueurs de la maladie d'Alzheimer (MA), contiennent les formes fibrillaires des peptides amyloïde- β (A β) 1-40 et 1-42. L'Herpès simplex virus 1 (HSV-1) a été impliqué comme facteur de risque de la MA et retrouvé à l'intérieur des plaques amyloïdes. Les peptides A β 1-40 et A β 1-42 possèdent un rôle antibactérien, anti-levures et antiviral. Dans cette étude, des cellules fibroblastiques, épithéliales et neuronales ont été exposées aux peptides A β 1-40 et A β 1-42 avant d'être infectées avec HSV-1. L'analyse quantitative par PCR a montré que les peptides A β 1-40 et A β 1-42 inhibent la réplication d'HSV-1 lorsqu'ils sont ajoutés 2 h avant ou au même moment que le virus, mais pas lorsqu'ils sont ajoutés 2 ou 6 h après l'ajout de virus dans le milieu de culture. En revanche, les peptides A β 1-40 et A β 1-42 n'inhibent pas la réplication d'un virus non-enveloppé, l'Adénovirus 5 humain. Comparativement, le peptide antimicrobien LL-37 inhibe l'infection virale indépendamment de sa séquence d'addition au milieu de culture. Nos résultats montrent également que les peptides A β 1-40 et A β 1-42 interagissent directement avec HSV-1 dans un modèle acellulaire et inhibent l'entrée des virus dans les cellules. L'homologie de séquence entre A β et la région proximale transmembranaire de la glycoprotéine de fusion gB d'HSV-1 suggère que l'interférence d'A β avec la réplication d'HSV-1 pourrait impliquer son insertion dans l'enveloppe externe de HSV-1. Nos données suggèrent que les peptides A β représentent une nouvelle classe de peptides antimicrobiens qui protègent contre les infections de virus enveloppés neurotrophiques tels que le HSV-1. Une surproduction de peptides A β pour protéger contre les virus HSV-1 latents dans le cerveau et, éventuellement contre d'autres infections impliquées dans la MA, pourrait contribuer à la formation des plaques amyloïdes. Cette hypothèse pourrait expliquer, du moins en partie, pourquoi les infections microbiennes ont un rôle dans la pathogénicité et la progression de la forme sporadique de la MA.

β -Amyloid Peptides Display Protective Activity Against the Human Alzheimer's Disease-Associated Herpes Simplex Virus-1

Karine Bourgade¹, Hugo Garneau¹, Geneviève Giroux², Aurélie Le Page¹, Christian Bocti³, Gilles Dupuis⁴, Eric H. Frost², Tamàs Fülöp Jr.¹

¹Research Center on Aging, Graduate Program in Immunology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, ²Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, ³Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, ⁴Department of Biochemistry, Graduate Program in Immunology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

Corresponding author: Dr. Tamàs Fülöp, Research Center on Aging, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4. E-mail: tamas.fulop@usherbrooke.ca

Key words: Beta-amyloid peptides, herpes simplex virus-1, human adenovirus type 5, viral replication inhibition, antimicrobial peptides, Alzheimer's disease.

Running title: Anti-viral activity of β -amyloid peptides.

Abstract

Amyloid plaques, the hallmark of Alzheimer's disease (AD), contain fibrillar β -amyloid (A β) 1-40 and 1-42 peptides. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) has been implicated as a risk factor for AD and found to co-localize within amyloid plaques. A β 1-40 and A β 1-42 display anti-bacterial, anti-yeast and anti-viral activities. Here, fibroblast, epithelial and neuronal cell lines were exposed to A β 1-40 or A β 1-42 and challenged with HSV-1. Quantitative analysis revealed that A β 1-40 and A β 1-42 inhibited HSV-1 replication when added 2 h prior to or concomitantly with virus challenge, but not when added 2 h or 6 h after virus addition. In contrast, A β 1-40 and A β 1-42 did not prevent replication of the non-enveloped human adenovirus. In comparison, antimicrobial peptide LL-37 prevented HSV-1 infection independently of its sequence of addition. Our findings showed also that A β 1-40 and A β 1-42 acted directly on HSV-1 in a cell-free system and prevented viral entry into cells. The sequence homology between A β and a proximal transmembrane region of HSV-1 glycoprotein B suggested that A β interference with HSV-1 replication could involve its insertion into the HSV-1 envelope. Our data suggest that A β peptides represent a novel class of antimicrobial peptides that protect against neurotropic enveloped virus infections such as HSV-1. Their overproduction to protect against latent herpes viruses may contribute to amyloid plaque formation, which is suggested to play a pathogenic role in the progression of the sporadic form of AD in relationship to brain infection.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the world (Tam *et al.*, 2012). It is estimated that nearly 35.6 million people suffer from this form of dementia and, with aging of the global population, this number is expected to triple in the next 40 years or so (WHO Report, 2013) as aging is the most important risk factor for its development. AD is characterized by progressive pathological changes associated with loss of cognitive functions and memory (Castellani *et al.*, 2010). The hallmark of AD, in addition to neuronal loss, is the presence of cortical senile plaques and neurofibrillary tangles in the brain of affected patients (Karran *et al.*, 2011; Seeman *et al.*, 2011). The

major components of these senile plaques are β -amyloid ($A\beta$) peptides 1-40 and 1-42, derived from successive cleavage of amyloid precursor protein (APP) by β - (BACE) and γ -secretases (Pearson *et al.*, 2006). Accumulation of $A\beta$ peptides in a filamentous (insoluble) form (Griciuc *et al.*, 2013) leads to neuronal degeneration and cortical atrophy (Castellani *et al.*, 2010). However, a soluble form of $A\beta$ peptides is present at nanomolar concentrations in the blood of healthy individuals, suggesting that $A\beta$ peptides play a physiological role that has not been clearly defined yet (Perneczky *et al.*, 2013).

Accumulation of $A\beta$ peptides in plaques of the familial form of AD is due to gene mutations of plasma membrane-bound proteases (APP, PSEN-1) involved in $A\beta$ production (Bekris *et al.*, 2010). In contrast, causes of $A\beta$ peptide accumulation in the sporadic form of AD are less clearly understood. In this case, $A\beta$ peptide accumulation appears to be caused by overproduction or by a defect in their clearance and degradation by microglial cells (Bekris *et al.*, 2010) which is further altered by age related immune changes (immunosenescence and inflamm-aging) (Larbi *et al.*, 2009; Franceschi *et al.*, 2014; Streits *et al.*, 2014). Although the β -amyloid hypothesis is viewed as one of the main pathophysiological cascades associated with AD (Benilova *et al.*, 2012), parasitic, bacterial and viral infections have also been correlated with AD (Querfurth *et al.*, 2010, Miklossy, 2011). With respect to the role of viral infections in AD, it has been reported that herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is more frequently present in AD patients' brain than in non-AD individuals (Miklossy, 2011), that HSV-1 co-localizes within amyloid plaques (Wozniak *et al.*, 2009) and that HSV-1 sero-positive individuals are at increased risk of AD (Letenneur *et al.*, 2008). Other members of the herpes virus family, namely HSV-2, CMV, and HHV-6, have also been detected in the brain of AD patients (Lin *et al.*, 2002) or have been associated with its pathogenesis (Piacentini *et al.*, 2014).

It is thought that over 90% of the world's population is latently infected with viruses of the herpes family as a result of generally asymptomatic initial infections. The host's immune system then holds the virus in a latent state, but it can be reactivated under conditions of immune deficiency or stress (Nicoll *et al.*, 2012). Reactivation can lead to asymptomatic, minor (e.g., *herpes labialis* infections) or major effects such as herpes encephalitis. It is important to emphasize that herpes encephalitis affects the same regions

of the brain as those linked to AD (hippocampus and frontal and temporal cortical lobes) (Denaro *et al.*, 2003).

The structure of HSV-1 comprises an external envelope derived from the nuclear membrane of the host cell that gave rise to the virus initially. It is composed of a lipid bilayer membrane and several types of membrane-embedded glycoproteins that protect the encapsidated DNA and its tegument proteins (Grünewald *et al.*, 2003). The envelope plays a central role in virus recognition and infection of target cells (Reske *et al.*, 2007). The first step in HSV-1 infection is attachment and fusion of the viral envelope with the cell plasma membrane. Three viral glycoproteins compose the minimal assembly of the fusion machinery (Eisenberg *et al.*, 2012). These viral glycoproteins are glycoprotein B (gB) and heterodimeric glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL). A number of additional viral envelope proteins participate in cognate cellular receptor recognition to ensure viral tropism (Akhtar *et al.*, 2009). This process induces formation of pores which allow entry of viral component into the cytoplasm of the cells (Akhtar *et al.*, 2009). gB primary structure is made of 904 amino acid residues that are organized into five domains, including one membrane proximal region, one transmembrane domain and one cytoplasmic domain (Heldwein *et al.*, 2006). gB is retained in the HSV-1 envelope through a single transmembrane sequence that comprises positions 775-795 of the protein. It has been reported that a hydrophobic membrane proximal region (positions 713-763) bears significant homology to the C-terminal region of A β 1-42 (Cribbs *et al.*, 2000). Viruses that do not possess an envelope, infect cells as a result of cell surface attachment to the glycocalyx followed by receptor recognition of protein constituents of the capsid, uncoating and delivery of viral genome or through endocytosis, intracellular trafficking and processing (Sun *et al.*, 2013). Members of the family of non-enveloped adenoviruses bind to a variety of cell receptors depending on their targets (Cupelli *et al.*, 2011; Nemerow *et al.*, 2012; Russell *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010).

Wozniak *et al.* (2007) have reported that HSV-1 and CMV infections are associated with accumulation of A β peptides in cells. Furthermore, these authors have shown that antiviral treatments could be used to reduce formation of A β peptides in HSV-1 infected cells (Wozniak *et al.*, 2011), possibly opening an anti-viral approach for clinical therapy of AD (Itzhaki *et al.*, 2012). With respect to a physiological role of A β peptides, it has

recently been reported that they possess antimicrobial properties that are reminiscent of the archetypal human antimicrobial peptide (AMP) LL-37 (Soscia *et al.*, 2010). The report showed that A β peptides displayed AMP activity equivalent to or, in some cases, superior to LL-37 against a number of clinically relevant bacteria and yeasts. In addition, homogenates of AD brains had a similar antimicrobial activity, suggesting that A β peptides may perform some essential protective function in the brain. Interestingly, while preparing our manuscript, a recent report showed also that A β peptides displayed antiviral activities against the enveloped influenza A virus (White *et al.*, 2014).

Taken together, these findings support the notion that A β peptides may be natural antimicrobial agents, particularly in the human brain, secreted by neuronal cells in response to pathogen infections (Piacentini *et al.*, 2014). Our present observations extend the findings of A β peptides as AMP which include antiviral activity against enveloped HSV-1 but not against non-enveloped human adenovirus. We propose a mechanism of antiviral action for A β peptides and suggest possible links between HSV-1 infection and latency, A β peptides and the sporadic form of AD.

2. Materials and Methods

2.1 MRC-5, A549 and H4 cell cultures

MRC-5 and A549 cells were obtained from Diagnostic Hybrids (Athens, OH). H4 cells came from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), penicillin G (2.5 IU/ml) and streptomycin (50 μ g/ml). Serum and antibiotics were from Wisent Bioproducts (St-Bruno, QC). Cultures were allowed to reach confluence before use.

2.2 Viruses

HSV-1 was an isolate obtained from the clinical microbiology and virology laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). An inoculum of HAd5 was obtained from the American Type Culture Collection.

2.3 Peptides

Synthetic A β 1-40, A β 1-42, scrambled A β 1-40, scrambled A β 1-42 and antimicrobial LL-37 peptides were obtained from Anaspec (Fremont, CA). All peptides were used at a concentration of 20 μ g/ml. Amino acid sequences of peptides are illustrated in Table S1 (Supporting information).

2.4. Cell viability

Cell viability was determined using the Trypan blue exclusion method.

2.5. Cell treatments with β -amyloid peptides, viruses and DNA isolation

MRC-5, A549 and H4 cells cultured in DMEM (100 μ l) in 96-well plates were treated under various conditions. HSV-1 and HAd5 were titrated by end point dilution with MRC-5 and A549 cells using serial dilutions of each virus in 96-well plates. Based on this titration, cells were infected in all experiments at a ratio of 0.01 ID₅₀ per cell. Cells were treated with A β 1-40, A β 1-42, scrambled A β 1-40, scrambled A β 1-42, or LL-37 peptides and exposed to HSV-1 or HAd5, as described in the legends of the Figures. Viral DNA replication was stopped by freezing the cell suspension 24 h (HSV-1) or 48 h (HAd5) post infection. DNA was extracted with an in-house protocol using alkaline lysis and ethanol precipitation. Aliquots (1 μ l) were amplified by real-time PCR (qPCR) without purification to detect viral and β -actin DNA.

2.6. DNA amplification by real-time PCR

Viral and human DNA were analyzed in total DNA samples. To detect HSV-1 using the LightCycler instrument, a mastermix of the following reaction components was prepared at the indicated final concentrations, 4.5 μ l H₂O, 0.15 μ l forward primer (0.5 μ M), 0.15 μ l reverse primer (0.5 μ M), 0.03 μ l probe (0.2 μ M) and 7.5 μ l Roche Probe Master Mix (Roche Diagnostic Canada, Laval, QC). HSV-1 mastermix (14 μ l/well) and DNA (1 μ l/well) were added to a 96-well plate. The plate was sealed, centrifuged and placed in the Roche LightCycler 480 II instrument. Fluorescent probe for HSV-1 and, forward and reverse primers are listed in Table S2. Human adenovirus type 5 (HAd5) and β -actin DNA were analyzed in total DNA samples using the Roche LightCycler 480 II instrument with

SybrGreen Master Mix (Roche Diagnostic Canada). For LightCycler reaction of HAd5 and β -actin detection, a mastermix of the following reaction components was prepared to the indicated final concentration, 5.5 μ l H₂O, 0.15 μ l forward primer (0.5 μ M), 0.15 μ l reverse primer (0.5 μ M) and 7.5 μ l Roche SybrGreen Master Mix (Roche Diagnostic Canada). HAd5 and β -actin mastermix (14 μ l/well) and DNA (1 μ l/well) were added to a 96-well plate. The plate was sealed, centrifuged and placed in the Roche LightCycler 480 II instrument. Forward and reverse primers are listed in Table S2. Probes and primers were from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Thermocycling conditions were as follows, denaturation program (95°C for 5 min), amplification and quantification program repeated 45 times (95°C for 10 s, 55°C for 30 s and, 72°C for 15 s with a single fluorescence measurement) followed by melting curve program (40-95°C with a heating rate of 0.11°C per second and a continuous fluorescence measurement) and, finally, a cooling step to 40°C for 30 s. For use of the mathematical model required for DNA quantification, the threshold cycle Ct (Cq (quantification cycle) (Bustin *et al.*, 2009) was determined for each transcript. Cq is defined as the point at which fluorescence rises above background fluorescence. The 2nd Derivative Max method was performed using the LightCycler software version 1.5.0 (Roche Diagnostics) which served to determine Cq in each experiment. The linear range of the exponential phase of DNA amplification was observed after 22 to 40 cycles of amplification. Each experiment used a positive and negative control to ensure accuracy. Amplified viral DNA was normalized to amplified β -actin DNA ($2^{\text{exp}(\beta\text{-actin } C_q - \text{viral } C_q)} \times 1000$) to correlate viral DNA variations to cell response rather cell number.

2.7. Immunofluorescent detection of intracellular distribution of FITC-labelled A β 1-42 peptide in MRC-5 cells

MRC-5 cells were seeded in 6-chamber culture slides (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ). Confluent cells were treated with A β 1-42-FITC peptide (rPeptide, Bogart, GA) (20 μ g/ml) for 24 h. Cells were then washed with PBS and fixed with 4% (w/w) paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Cells were mounted using the ProLong antifade kit (Life Technologies Inc. Burlington, ON) that contained DAPI DNA-stain.

Fluorescence was recorded using a Nikon Eclipse TE2000-S (Nikon, Mississauga, ON) fluorescent microscope.

2.8. Effect of A β peptides on HSV-1 interaction with MRC-5 cells

MRC-5 cells were infected with HSV-1 in the absence or the presence of A β 1-40 or A β 1-42 peptides, as described under Section 2.5. After 15 min or 2 h of incubation, supernatants were removed and frozen. Adherent cells were scraped off, transferred to fresh culture medium which was frozen. DNA present in cell homogenates and supernatants was respectively extracted and viral DNA quantitated by qPCR.

2.9. Interaction of β -amyloid peptides with HSV-1 in a cell-free system

Protein A/G-coated Sepharose beads (BioVision, Milpitas, CA) were suspended in 10 volumes of DMEM. Four different experimental conditions were used. In one set, the beads (20 μ l suspension) were mixed with 200 μ l of a solution containing FITC-labelled A β 1-42 (20 μ g/ml) for 30 min at 4°C under gentle end-over-end mixing. In a second set, the beads (20 μ l) were coated with an anti-gB mAb (clone 10B7, Abcam, Cambridge, MA, 2 μ g in each experiment) dissolved in DMEM (200 μ l), for 1 h at 4°C under gentle end-over-end mixing. In a third set, the beads (20 μ l suspension) were incubated with a mixture of HSV-1 (4000 ID₅₀) and FITC-labelled A β 1-42 (20 μ g/ml) for 30 min at 4°C under gentle end-over-end mixing. For this three sets, the antibody-coated or not coated beads were washed (PBS) three times and mixed with FITC-labelled A β 1-42 (20 μ g/ml) overnight at 4°C under gentle end-over-end mixing. In a fourth set, anti-gB-coated beads (20 μ l) were incubated with a mixture of FITC-labelled A β 1-42 peptides (20 μ g/ml) and HSV-1 (4000 ID₅₀), overnight at 4°C under gentle end-over-end mixing. In all cases, the beads were washed (PBS) and fluorescence intensity was measured using a micro plate reader (Victor X5, Perkin Elmer, Waltham, MA).

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed using the Graph-Pad Prism 5 (La Jolla, CA) or Excel software (Microsoft Canada Inc., Mississauga, ON). Statistical analyses were performed by two-tailed Student's *t* test.

3. Results

3.1. Time-course of infection of MRC-5 and A549 cells with HSV-1 or HAd5

MRC-5 and A549 cells were exposed to HSV-1 or HAd5 respectively (0.01 ID₅₀ per cell in each case) at 37°C, for various periods of time. Virus replication was measured by real-time PCR. Optimal levels of virus replication in MRC-5 cells were detected at 24 h in the case of HSV-1 (Fig S1A) and at 48 h in the case of A549 cells infected with HAd5 (Fig S1B).

3.2. Effects of A β 1-40 and A β 1-42 on HSV-1 replication in MRC-5, A549 and H4 cells

The effect of A β 1-40 and A β 1-42 on HSV-1 replication was investigated in three human cell lines. A series of experiments were set using MRC-5 cells. These cells derived from normal human foetal lung fibroblasts and are known to possess HSV-1 susceptibility. Virus replication was quantitated by real-time PCR and results normalized to β -actin DNA. Data were represented relative to viral replication in MRC-5 cells cultured in the absence of A β peptides which was arbitrarily set to 100%. Addition of A β 1-40 or A β 1-42 2 h prior to exposure to HSV-1 or, concomitantly with HSV-1, resulted respectively in 82% and 91% decreases in viral DNA replication for A β 1-40 (Fig. 1A) and 85% and 83% for A β 1-42 (Fig. 1B). The interfering effect of these peptides was not observed when they had been added 2 h or 6 h after exposure of the cells to the virus (Figs. 1A and 1B). Cell viability was 79% \pm 11% in the case of cells incubated with HSV-1, 79% \pm 7% for cells incubated with A β peptides and 86% \pm 19% for cells incubated with HSV-1 and A β peptides. Control experiments performed under similar experimental conditions using scrambled sequences of A β 1-40 (Fig. 1C) or A β 1-42 (Fig. 1D) revealed a lack of effect on HSV-1 replication.

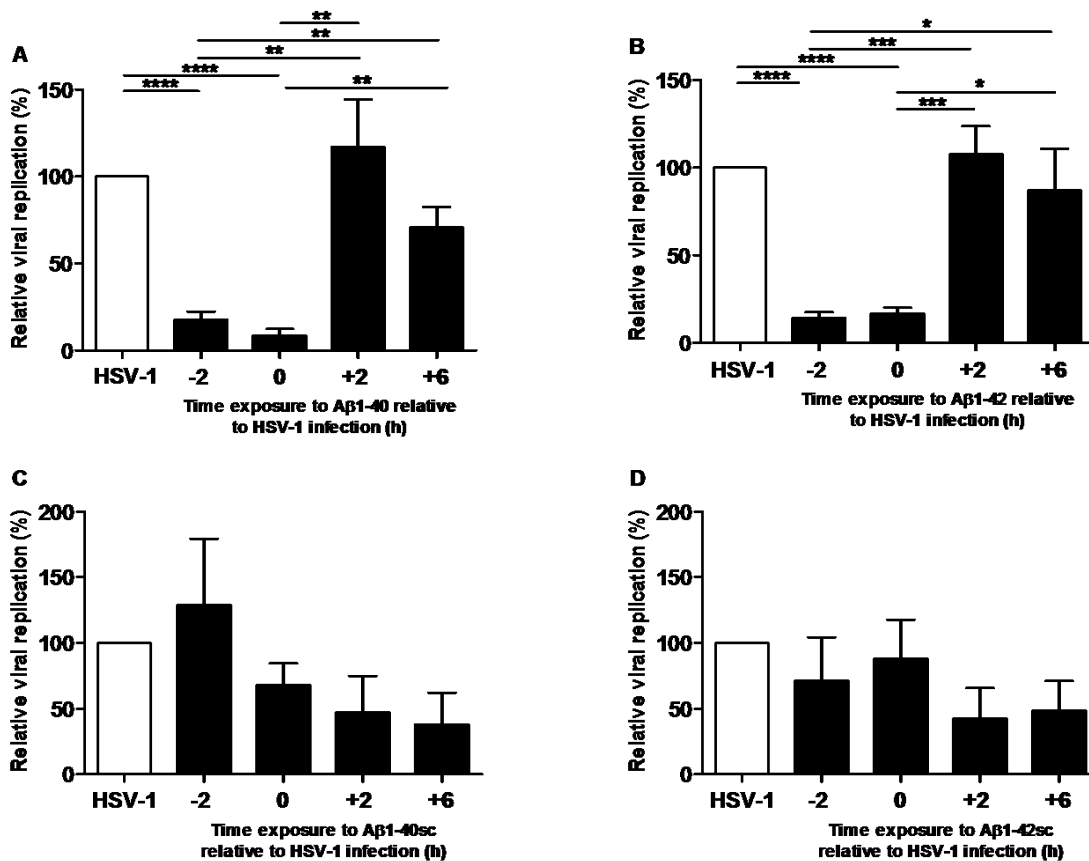


Fig. 1. Aβ 1-40 and Aβ 1-42 inhibition of HSV-1 replication in MRC-5 cells. MRC-5 cells were exposed to HSV-1 (0.01 ID₅₀ per cell) and, Aβ 1-40 (20 μg/ml) (A) or Aβ 1-42 (20 μg/ml) (B) were added 2 h before, simultaneously or 2 h and 6 h after exposing the cells to the virus. Control experiments were performed using scrambled Aβ 1-40 (20 μg/ml) (C) or scrambled Aβ 1-42 (20 μg/ml) (D). Viral replication was stopped after 24 h by freezing the cell suspension. DNA was isolated and aliquots were analyzed by real-time PCR. Results were computed as the ratio of viral DNA relative to β-actin DNA. Data are shown relative to HSV-1 replication in the absence of Aβ peptides arbitrarily set at 100%. They are a combination of 3-4 independent experiments performed in triplicate and are displayed as the mean ± SEM. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****), respectively.

We next tested whether the protective effects of A β peptides against HSV-1 infection extended to cells of a different lineage. The A549 adenocarcinoma lung epithelial cell line was chosen for this purpose. Using experimental conditions and data analysis similar to those described in the case of MRC-5 cells, it was found that interference with HSV-1 replication was observed when A β 1-40 or A β 1-42 were added 2 h before or simultaneously with HSV-1. In these experiments, 83% and 62% reduction of viral replication was observed for A β 1-40 (Fig. 2A) and 60% and 59% reduction of viral replication was observed for A β 1-42 (Fig. 2B). Addition of the A β peptides 2 h or 6 h after the cells had been exposed to HSV-1 had no significant effect on viral replication (Figs. 2A and 2B). Control experiments performed under similar experimental conditions using scrambled sequences of A β 1-40 (Fig. 2C) or A β 1-42 (Fig. 2D) showed a lack of effect on HSV-1 replication.

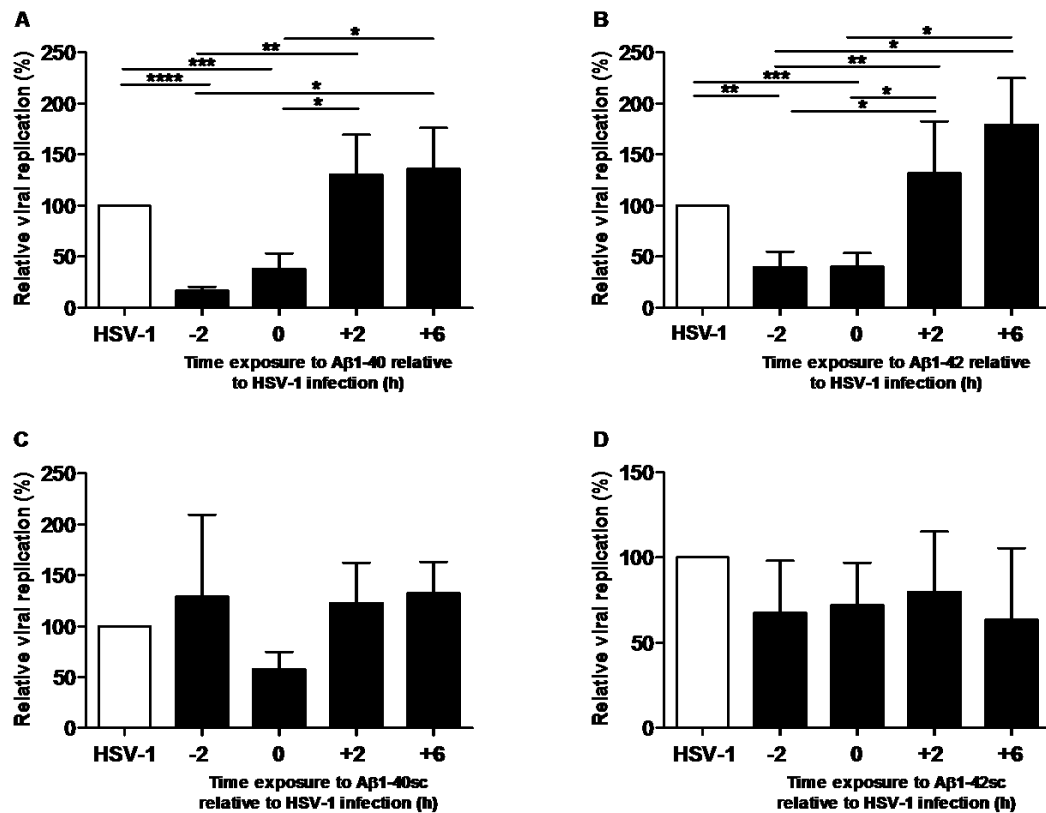


Fig. 2. Aβ 1-40 and Aβ 1-42 inhibition of HSV-1 replication in A549 cells. A549 cells were exposed to HSV-1 (0.01 ID₅₀ per cell) and, Aβ 1-40 (20 μg/ml) (A) or Aβ 1-42 (20 μg/ml) (B) were added 2 h before, simultaneously or 2 h and 6 h after exposing the cells to the virus. Control experiments were performed using scrambled Aβ 1-40 (20 μg/ml) (C) or scrambled Aβ 1-42 (20 μg/ml) (D). Virus replication was analyzed by real-time PCR 24 h later. Viral replication was stopped after 24 h by freezing the cell suspension. DNA was isolated and aliquots were analyzed by real-time PCR. Results were computed as the ratio of viral DNA relative to β-actin DNA. Data are shown relative to HSV-1 replication in the absence of Aβ peptides arbitrarily set at 100%. They are a combination of 2-5 independent experiments performed in triplicate and are displayed as the mean ± SEM. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****), respectively.

H4 cells were used to obtain further evidence of the general protective effect of A β peptides against HSV-1 replication in cells of human origin. Of interest, these cells are derived from a human neuroglioma and were used here as a model to test A β -dependent protection of brain cells. Experiments were performed as described in the case of MRC-5 and A549 cells and HSV-1 replication quantitated by real-time PCR. Data analysis and display were as above. Results showed that interference with HSV-1 replication was observed when A β 1-40 or A β 1-42 were added 2 h before or simultaneously with HSV-1. In these experiments, 88% and 75% reduction of viral replication was observed in the case of A β 1-40 (Fig. 3A) and 83% and 70% in the case of A β 1-42 (Fig. 3B). As observed in the case of MRC-5 and A549 cells, addition of the A β peptides 2 h or 6 h after the cells had been exposed to HSV-1 had no significant effect on viral replication (Figs. 3A and 3B). Control experiments performed under similar experimental conditions using scrambled sequences of A β 1-40 (Fig. 3C) or A β 1-42 (Fig. 3D) showed a lack of effect on HSV-1 replication.

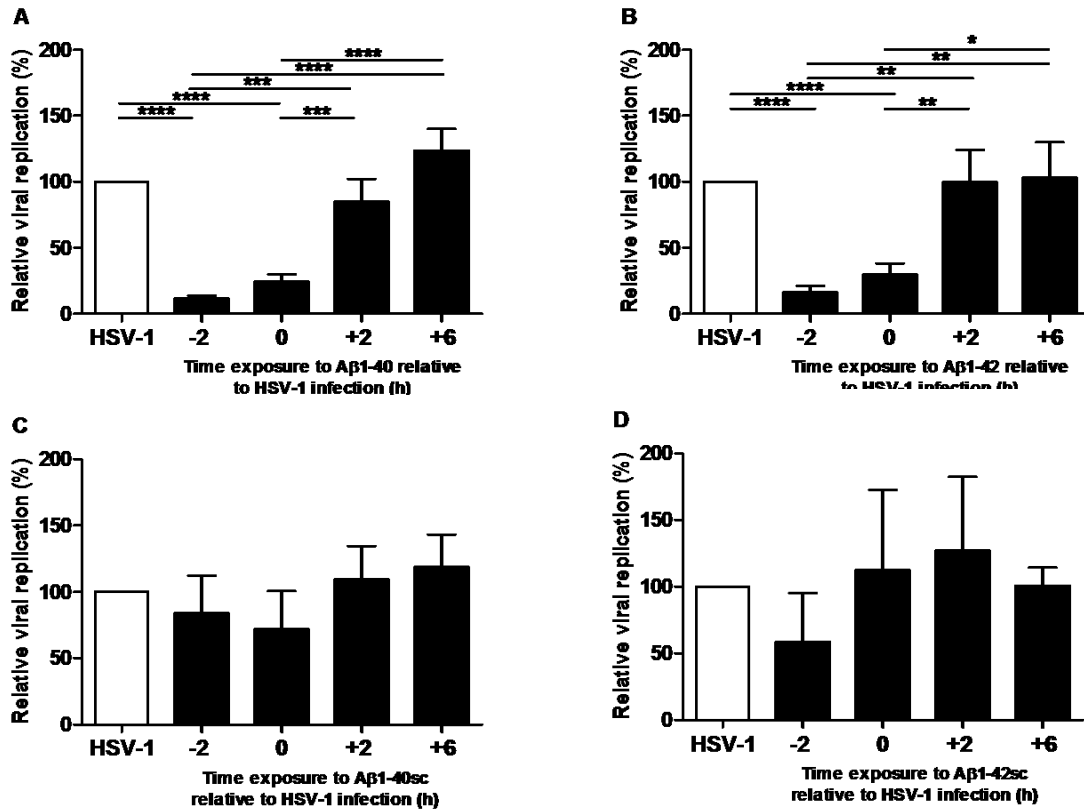


Fig. 3. Aβ 1-40 and Aβ 1-42 inhibition of HSV-1 replication in H4 cells. H4 cells were exposed to HSV-1 (0.01 ID₅₀ per cell) and, Aβ 1-40 (20 μg/ml) (A) or Aβ 1-42 (20 μg/ml) (B) were added 2 h before, simultaneously or 2 h and 6 h after exposing the cells to the virus. Control experiments were performed using scrambled Aβ 1-40 (20 μg/ml) (C) or scrambled Aβ 1-42 (20 μg/ml) (D). Viral replication was stopped after 24 h by freezing the cell suspension. DNA was isolated and aliquots were analyzed by real-time PCR. Results were computed as the ratio of viral DNA relative to β-actin DNA. Data are shown relative to HSV-1 replication in the absence of Aβ peptides arbitrarily set at 100%. They are a combination of 6 independent experiments performed in duplicate and are shown as the mean ± SEM. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****) respectively.

3.3. Lack of effect of A β 1-40 and A β 1-42 on HAd5 replication in MRC-5 and A549 cells

The effect of A β peptides on non-enveloped HAd5 was investigated under similar experimental conditions to those used with HSV-1. A β 1-40 and A β 1-42 did not display anti-viral activity whether they were added 2 h before, concomitantly, or after (2 h and 6 h) MRC-5 cells were exposed to the virus (Figs. 4A and 4B). As expected, control (scrambled) A β 1-40 (Fig. 4C) and A β 1-42 (Fig. 4D) did not display any anti-viral activity.

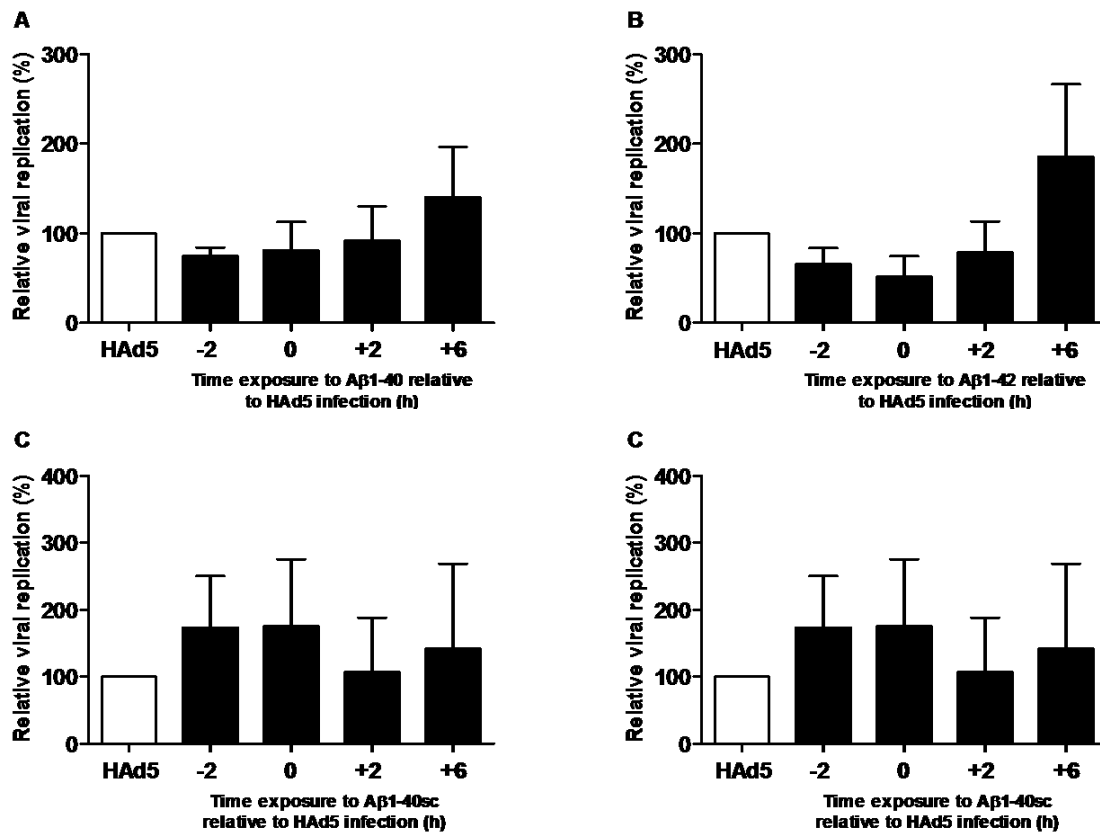


Fig. 4. Lack of effect of A β 1-40 and A β 1-42 on HAd5 replication in MRC-5 cells. MRC-5 cells were exposed to HAd5 (0.01 ID₅₀ per cell) and, A β 1-40 (20 μ g/ml) (A) or A β 1-42 (20 μ g/ml) (B) were added 2 h before, simultaneously or 2 h and 6 h after exposing the cells to the virus. Control experiments were performed using scrambled A β 1-40 (20 μ g/ml) (C) or scrambled A β 1-42 (20 μ g/ml) (D). Viral replication was stopped after 48 h by freezing the cell suspension. DNA was isolated and aliquots were analyzed by real-time PCR. Results were computed as the ratio of viral DNA relative to β -actin DNA. Data are shown relative to HSV-1 replication in the absence of A β peptides arbitrarily set at 100%. They are a combination of 2 independent experiments performed in triplicate and are shown as the mean \pm SEM.

In another series of experiments, we performed similar assays using A549 cells as a target. Results showed that A β 1-40 (Fig. 5A) and A β 1-42 (Fig. 5B) did not display anti-viral activity when added 2 h before, simultaneously or 2 h and 6 h after exposing the cells to HAd5. Corresponding scrambled (control) A β 1-40 (Fig. 5C) and A β 1-42 (Fig. 5D) did not inhibit viral replication.

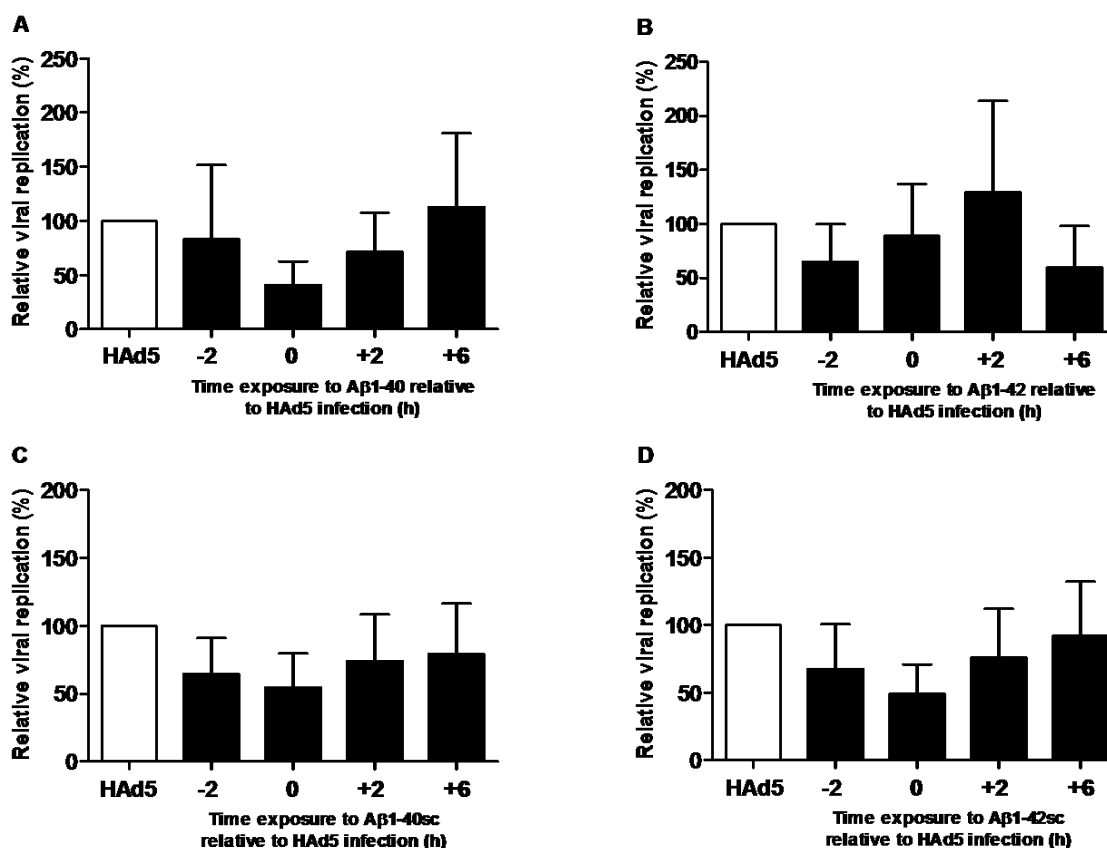


Fig. 5. Lack of effect of A β 1-40 and A β 1-42 on HAd5 replication in A549 cells. A549 cells were exposed to HAd5 (0.01 ID₅₀ per cell) and, A β 1-40 (20 μ g/ml) (A) or A β 1-42 (20 μ g/ml) (B) were added 2 h before, simultaneously or 2 h and 6 h after exposing the cells to the virus. Control experiments were performed using scrambled A β 1-40 (20 μ g/ml) (C) or scrambled A β 1-42 (20 μ g/ml) (D). Viral replication was stopped after 48 h by freezing the cell suspension. DNA was isolated and aliquots were analyzed by real-time PCR. Results were computed as the ratio of viral DNA relative to β -actin DNA. Data are shown relative to HSV-1 replication in the absence of A β peptides arbitrarily set at 100%. They are a combination of 2-3 independent experiments performed in triplicate and are shown as the mean \pm SEM.

3.4. Effect of the human cathelicidin LL-37 on HSV-1 replication in MRC-5 cells

The anti-viral activity of A β 1-40 and A β 1-42 against HSV-1 replication was reminiscent of the properties of LL-37, the only human member of the cathelicidin family of AMP (Frasca *et al.*, 2012). The activity of LL-37 was tested on HSV-1 replication in MRC-5 cells. Results showed that LL-37 drastically decreased HSV-1 replication in these cells whether it was added before, simultaneously or after cell challenge with HSV-1 (Fig. 6). These observations suggested that LL-37 was cytotoxic to MRC-5 cells. However, cell viability ($68\% \pm 9\%$ in the case of LL-37 and $88\% \pm 9\%$ in the case of cells incubated with LL-37 and HSV-1) was similar to experiments performed with A β 1-42, suggesting that the effect of LL-37 was not due to cytotoxicity.

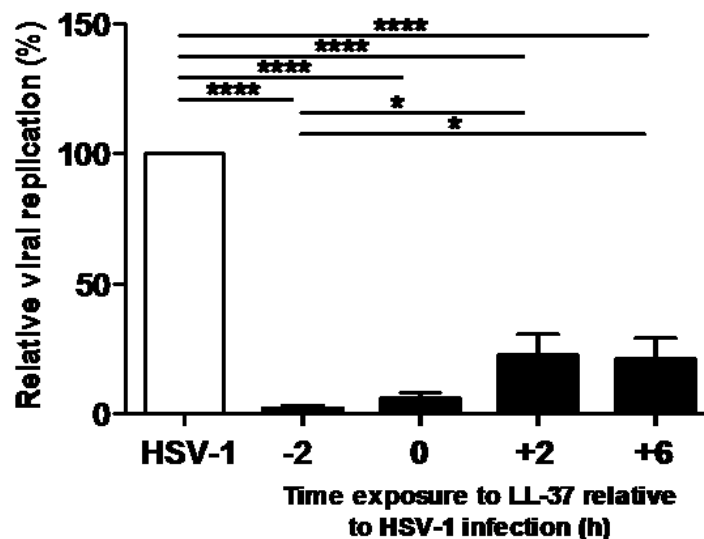


Fig. 6. Cathelicidin LL-37-dependent inhibition of HSV-1 replication in MRC-5 cells. MRC-5 cells were exposed to HSV-1 (0.01 ID₅₀ per cell) and LL-37 (20 μ g/ml) was added 2 h before, simultaneously or 2 h and 6 h after exposing the cells to the virus. Viral replication was stopped after 24 h by freezing the cell suspension. DNA was isolated and aliquots were analyzed by real-time PCR. Results were computed as the ratio of viral DNA relative to β -actin DNA. Data are shown relative to HSV-1 replication in the absence of A β peptides arbitrarily set at 100%. They are a combination of 3-4 independent experiments performed in triplicate and are displayed as the mean \pm SEM. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.0001$ (****).

3.5. Immunofluorescent detection of A β 1-42 in MRC-5 cells

An immunofluorescence study was performed to determine the location of A β peptides in MRC-5 cells. When MRC-5 cells were incubated with FITC-labelled A β 1-42 for 24 h, fluorescence was primarily associated with the cell plasma membrane, weakly present in the cytoplasm and absent in the nucleus (Fig. 7).

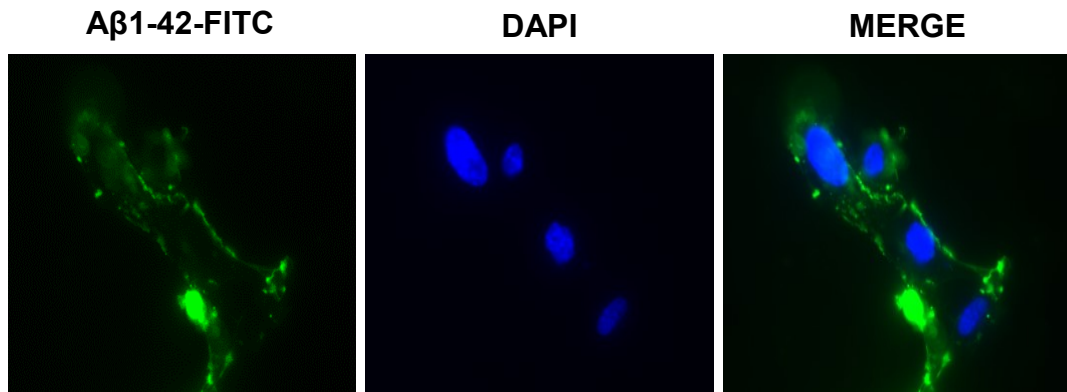


Fig. 7. Fluorescent detection of A β 1-42 in MRC-5 cells. MRC-5 cells were exposed to A β 1-42-FITC (20 μ g/ml). Cells were cultured for 24 h, washed, fixed and processed. Pseudo-colors are FITC-labelled A β 1-42 (green) and cell nuclei (DAPI, blue). Magnification was 60X.

3.6. Effect of washing MRC-5 cells incubated with A β peptides prior to exposure to HSV-1

In order to investigate the possibility that A β peptides interacted with HSV-1 outside the cell and prevented attachment or entry of HSV-1, cells were exposed (2 h) to A β 1-40 or A β 1-42, followed by non-stringent washing with PBS. Cells were then exposed to HSV-1 and viral replication determined by real-time PCR amplification. Data showed that control experiments (treatment with A β peptides and then infection without washing) resulted in a significant decrease (57%, for both A β 1-40 and A β 1-42) in viral replication (Fig 8). In marked contrast, when cells were treated with A β peptides followed by washing and then infected, viral replication proceeded to the same extent as that observed in control conditions without exposure to A β peptides.

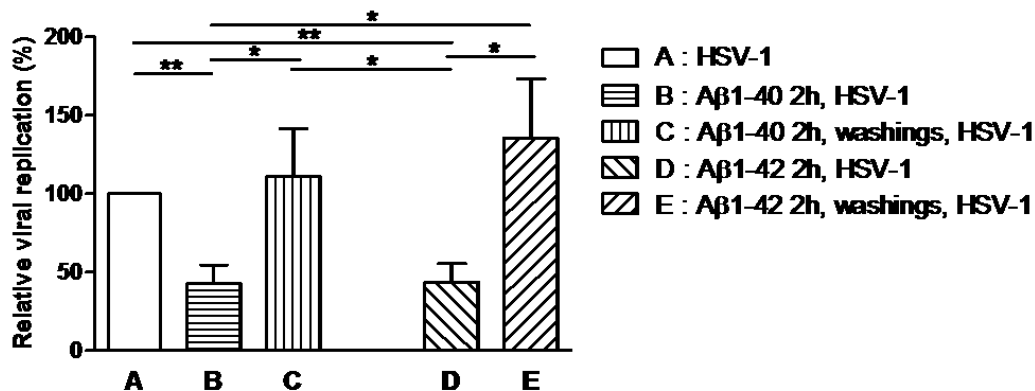


Fig. 8. Effect of washing of Aβ 1-40 or Aβ 1-42 on HSV-1 replication. MRC-5 cells were exposed to HSV-1 (0.01 ID₅₀ per cell) (A) and viral and β-actin DNA were isolated 24 h later and amplified. Cells were exposed to Aβ 1-40 (B) or Aβ 1-42 peptide (D) (20 μg/ml) added 2 h prior to addition of HSV-1. Cells were also exposed to Aβ 1-40 (C) or Aβ 1-42 (E) (20 μg/ml) for 2 h, washed (PBS) and HSV-1 (0.01 ID₅₀ per cell) was added. Viral replication was stopped after 24 h by freezing the cell suspension. DNA was isolated and aliquots were analyzed by real-time PCR. Results were computed as the ratio of viral DNA relative to β-actin DNA. Data are shown relative to HSV-1 replication in the absence of Aβ peptides arbitrarily set to 100%. They are representative of 3 independent experiments performed in duplicate and are displayed as the mean ± SEM. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

3.7. Aβ peptide inhibition of HSV-1 interaction with MRC-5 cells

In order to evaluate the effect of Aβ peptides on HSV-1 interaction with MRC-5 cells, cells were infected with HSV-1 in the absence of Aβ peptides or in the presence of Aβ 1-40 or 1-42. Viral DNA associated with the cells or remaining in the supernatant was separately quantified 15 min or 2 h post-infection (Table 1). Results showed that 15 min post-infection in the absence of Aβ peptides, 68% of viral DNA was associated with the cells. This value decreased to 1% and 4%, respectively, when Aβ 1-40 or Aβ 1-42 were present, indicating nearly complete inhibition of HSV-1 interaction with the cells. Viral DNA quantification 2 h post-infection revealed that 80% of viral DNA was associated with the cells in the absence of Aβ peptides. However, the percentage of cell-associated viral DNA decreased by 50-60% when Aβ 1-40 or Aβ 1-42 were present (Table 1).

Table 1. A β peptide inhibition of HSV-1 interaction with MRC-5 cells.

	HSV-1		HSV-1 + A β 1-40		HSV-1 + A β 1-42	
	Time of incubation					
	15 min	2 h	15 min	2 h	15 min	2 h
Cell homogenate	274 (68%)	477 (80%)	2 (1%)	181 (50%)	8 (4%)	147 (40%)
Supernatant	128	120	256	181	194	223

MRC-5 cells were incubated with HSV-1 in the absence or presence of A β peptides (20 μ g/ml in each case) for the indicated periods of time, at 37°C. Supernatants were removed by aspiration and viral DNA present in supernatant and cell homogenate was amplified by real-time PCR. Data are expressed as ID₅₀ equivalents. The numbers in parentheses correspond to the percentages of viral DNA present in cell homogenates relative to total DNA.

3.8. Interaction of A β 1-42 with HSV-1 in a cell-free system

A cell-free system was used to obtain further evidence that A β peptides interacted with HSV-1 outside the cells used in this study. Protein A/G Sepharose beads were left uncoated or were coated with an anti-gB mAb. The uncoated or anti-gB-coated beads were then mixed with FITC-labeled A β 1-42 or a mixture of FITC-A β 1-42 and HSV-1. Results showed that FITC-A β 1-42 interacted with the uncoated beads, suggesting non-specific interactions with the support (Fig. 9). When anti-gB-coated beads were used, higher levels of fluorescent A β 1-42 were detected, suggesting additive non-specific interactions. Of importance, the addition of a mixture of HSV-1 and FITC-A β 1-42 to anti-gB-coated beads showed levels of fluorescence that were significantly ($p < 0.003$) higher than in experiments using beads not coated with the anti gB mAb (Fig. 9). These observations were taken as further evidence that A β 1-42 interacted directly with HSV-1.

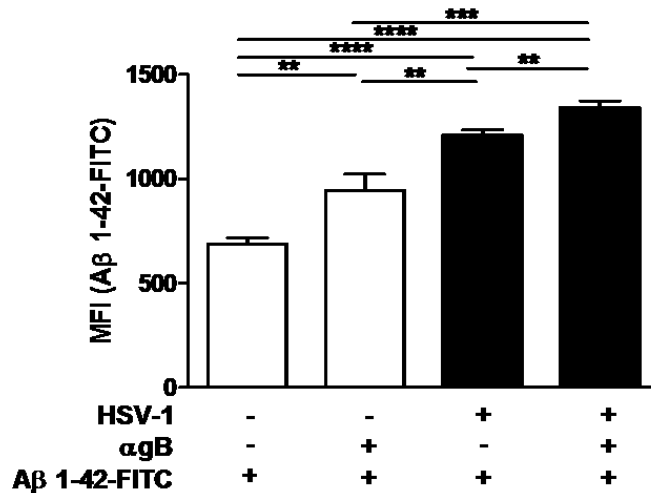


Fig. 9. Protein A/G Sepharose beads (20 μ l) were incubated with FITC-labelled A β 1-42 (20 μ g/ml) or a mixture of HSV-1 (0.1 ID₅₀) and FITC-labelled A β 1-42 (20 μ g/ml), under conditions described under the Materials and Methods section. After washing (PBS), emitted fluorescence was measured using a micro plate reader. Alternatively, the beads were coated with an anti-gB (α gB) mAb, washed and incubated overnight with with FITC-labelled A β 1-42 (20 μ g/ml) or a mixture of HSV-1 (0.1 ID₅₀) and FITC-labelled A β 1-42 (20 μ g/ml). Data are representative of 2 independent experiments performed in hexaplicate and are shown as the mean fluorescence intensity (MFI) \pm SEM. The asterisks (*) correspond to $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****) respectively.

4. Discussion

The key findings in this study were that A β 1-40 and A β 1-42 displayed antiviral activity in a model of HSV-1 infection of human fibroblasts, epithelial and neuronal cells. HSV-1 can cause infections which may remain latent throughout the life of the host (Egan *et al.*, 2013) with the latent virus residing in the regions of the brain affected by AD and subject to reactivation, even in the brain. For example, herpes simplex encephalitis has recently been reported to occur even 8 years following initial clinical manifestations (Rigamonti *et al.*, 2013). Here, the protective effect of A β peptides depended on prior or simultaneous addition of the peptides to the cell cultures (Figs. 1, 2 and 3). Sequence-

scrambled amyloid peptides were inefficient, consistent with the interpretation that their antiviral properties resided with their intact primary structure. The observations that the favorable protection of A β peptides was related to their sequence of addition to the cells suggested that their effect occurred before HSV-1 entered the cells or that they interfered with the machinery of viral membrane fusion, or both. In contrast, the amyloid peptides were not efficient in preventing infection of cells with HAd5, independently of the sequence of addition to the cells (Figs. 4 and 5). Taken together, the data suggested that A β 1-40 and A β 1-42 peptides could possess antiviral properties which seem to be dependent on the presence of a viral envelope.

It has recently been shown that HSV-1 infection of human or rat neuronal cells induces APP amyloidogenic processing (De Chiara *et al.*, 2010; Piacentini *et al.*, 2010). Our present observations extend these previous reports by showing the reason why the cell turns on APP amyloidogenic processing in the presence of HSV (and probably other pathogenic microorganisms as well). We propose that it is part of an intrinsic immune mechanism to inhibit the pathogen's replication. Although initially efficient, with time this mechanism of protection can be overcome in the brain where HSV-1 remains latent and may periodically reactivate. This situation triggers continued APP amyloidogenic processing during life which can ultimately lead to A β deposition in the brain, in particular when deficiency in A β clearance by microglia is further altered by immunosenescence (Larbi 2009; Franceschi *et al.*, 2014; Streits *et al.*, 2014). Other innate defense mechanisms have been shown to have possible deleterious effects, therefore A β could be added to this list (Carty *et al.*, 2014).

The interpretation of A β peptides behaving as AMP was reminiscent of the reported properties of the human cathelicidin LL-37. This AMP is secreted by immune cells such as neutrophils in response to microbial attacks (Turner *et al.*, 1998). LL-37 is able to insert itself into and lyse membranes (Burton *et al.*, 2009), although microbial membranes are preferred targets, depending on the nature of the challenge. For example, in the absence of pathogens, LL-37 can lyse eukaryotic plasma membranes (Bowdish *et al.*, 2005). In the present study, LL-37 strongly inhibited HSV-1 replication in MRC-5 cells in a manner that was independent of its sequence of addition to the cell cultures (Fig. 6). These observations were in marked contrast with the effects of A β 1-40 and A β 1-42. Nevertheless, the

outcome of LL-37 and A β peptides with respect to preventing HSV-1 replication in MRC-5 cells was similar, suggesting that A β could represent a natural defence against herpes viruses. However, the AMP activity of LL-37 was markedly higher than A β peptides and time-independent, suggesting differences in the mechanism of action of these AMP. LL-37 is able to enter eukaryote cells and attack intracellular pathogens (Turner *et al.*, 1998). The possibility that A β 1-40 and A β 1-42 possessed a similar property was investigated in MRC-5 cells. Fluorescence distribution of FITC-labelled A β 1-42 peptide showed that the peptide appeared mostly as a diffuse signal located at the cell surface (Fig. 6). Furthermore, the presence of HSV-1 did not appear to influence the distribution of the A β 1-42 peptide. Taken together, these data strongly suggested that the AMP properties of A β 1-42 differed significantly from those of LL-37 and further suggested that A β 1-42 initiated its anti-viral effects prior to HSV-1 entry into the cells.

Studies using model membranes (Jang *et al.*, 2013; Masters *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012; Sciacca *et al.*, 2012), human neurons and mouse fibroblasts (Jang *et al.*, 2010) have shown that A β peptides can insert into lipid bilayers and form toxic ion channels that destabilize cellular ionic balance. Therefore, we tested the possibility that this mechanism could explain the anti-viral activity of A β peptides. If this proposition were true, incubation of MRC-5 with A β peptides would alter cell viability which would inhibit HSV-1 replication. Data showed that this possibility did not hold under our experimental conditions. First, A β peptides did not induce rapid cell death, as assayed with Trypan blue exclusion. Furthermore, A β peptides acted very early in the viral replicative cycle as they had no effect when added 2 h after infection. We showed that they prevented association of HSV-1 with cells. We obtained evidence that this effect was caused by an interaction of A β peptides with the virus rather than with the cell by simple washing experiments. Indeed, washing MRC-5 cells that had been exposed to A β peptides revealed that, under these experimental conditions, HSV-1 replication was not different than control where A β peptides were absent (Fig. 8). These observations suggested that A β peptides did not interfere with the integrity of the cell plasma membrane and that their AMP properties were likely due to interactions with HSV-1. This possibility was further tested in a cell-free system, based on fluorescence detection assays. In one series of experiments, Protein A/G Sepharose beads were coated with an anti-HSV-1 antibody that served to retain HSV-1.

Exposing antibody-bound beads to a solution of A β 1-42 peptides and HSV-1 showed that the immune complex retained a significant greater quantity of the fluorescent A β peptide than in the absence of anti-gB (Fig. 9). This finding was taken as further evidence that A β peptide interacted directly with HSV-1. Thus we propose that the anti-viral activity of A β peptides involved initial interactions with the HSV-1 envelope that occurred outside the cells, resulting in decreased attachment to or fusion with the host cell membrane (Table 1). This interpretation is further supported by the inability of A β peptides to interfere with cell infection by a non-enveloped virus (HAd5).

An intriguing possibility to explain the selective effect of A β peptides is that they initially insert into the membrane of the envelope of HSV-1, at least transiently and alter the viral membrane's physical properties in a way that affects the process of viral replication. Evidence supporting this possibility comes from the work of Cribbs *et al.* (2000) who showed that a transmembrane sequence of HSV-1 fusion protein gB shared homology with A β 1-42. A high degree of similarity (67%) was shown to exist between the membrane proximal region (positions 713 – 763) of the gB sequence and the C-terminal sequence of A β 1-42 peptides (Fig. S2). This partial sequence of gB has been associated with neurotoxicity (Yankner *et al.*, 1989) and fibril formation (Halverson *et al.*, 1990). Furthermore, Cribbs *et al.* (2000) showed that the two homologous sequences corresponded to peptides with similar physical properties in a number of assays, including aggregation and cytotoxicity.

The bulk of results presented here lead to the conclusion that A β peptides possess AMP activity directed against Alzheimer's disease-associated HSV-1 pathogen. Our observations are in agreement with those of White *et al.* (2014) with respect to AMP activity against viruses such as HSV-1 and influenza virus and a direct interaction of A β with HSV-1. In addition, our observations further suggest selectivity of enveloped viruses as a target of A β peptides as opposed to non-enveloped viruses. Our findings suggest that the production of A β peptides, at least initially in the course of the sporadic form of AD, may be for protection against microbial aggression. Infection by HSV-1 has been shown to lead to a release of A β peptides by human and rat neurons (De Chiara *et al.*, 2010; Piacentini *et al.*, 2011) which could restrict virus spread. However, a sustained induction of A β peptide production by brain cells may become deleterious with aging. Indeed, as life

progresses, microglia becomes less efficient at eliminating both viruses and A β peptides. As a consequence, extracellular deposition of A β peptides increases and contributes to the progression toward AD in the aging brain.

Acknowledgments

Funding: This work was supported by grants-in-aid from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) (No. 106634), the Université de Sherbrooke, and the Research Center on Aging.

Competing interests: None declared.

References

- Akhtar J, Shukla D (2009) Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J* 276:7228-7236.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of alzheimer disease. *J Ger Psychiatry Neurol* 23:213-227.
- Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012) The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nature Neurosci* 15:349-357.
- Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE (2005) Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol* 77:451-459.
- Burton MF, Steel PG (2009) The chemistry and biology of LL-37. *Nat Prod Rep* 26:1572-1584.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 55:611-622.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer disease. *Disease-a-Month* 56:484-546.
- Cribbs DH, Azizeh BY, Cotman CW, LaFerla FM (2000) Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's Abeta peptide. *Biochemistry* 39:5988-5994.
- Cupelli K, Stehle T (2011) Viral attachment strategies: the many faces of adenoviruses. *Curr Opin Virol* 1:84-91.
- De Chiara G, Marcocci ME, Civitelli L, Argnani R, Piacentini R, Ripoli C, Manservigi R, Grassi C, Garaci E, Palamara AT (2010) APP processing induced by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) yields several APP fragments in human and rat neuronal cells. *PLOS One* 5:e13989.

- Denaro FJ, Staub P, Colmer J, Freed DM (2003) Coexistence of Alzheimer disease neuropathology with herpes simplex encephalitis. *Cell Mol Biol* 49:1233-1240.
- Egan KP, Wu S, Wigdahl B, Jennings SR (2013) Immunological control of herpes simplex virus infections. *J Neurovirol* 19:328-345.
- Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH (2012) Herpes virus fusion and entry: A story with many characters. *Viruses* 4:800-832.
- Franceschi C, Campisi J (2014) Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 Suppl 1:S4-S9.
- Frasca L, Lande R (2012) Role of defensins and cathelicidin LL37 in auto-immune and auto-inflammatory diseases. *Curr Pharm Biotech* 13:1882-1897.
- Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, Hooli B, Choi SH, Hyman BT, Tanzi RE (2013) Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* 78:631-643.
- Grünewald K, Desai P, Winkler DC, Heymann JB, Belnap DM, Baumeister W, Steven AC (2003) Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 302:1396-1398.
- Halverson K, Fraser PE, Kirschner DA, Lansbury PT (1990) Molecular determinants of amyloid deposition in Alzheimer's disease: conformational studies of synthetic beta-protein fragments. *Biochemistry* 29:2639-2644.
- Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P (2003) Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 2:228-239.
- Heldwein KE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Harrison SC (2006) Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313:217-220.
- Itzhaki RF, Wozniak MA (2012) Could antivirals be used to treat Alzheimer's disease? *Future Microbiol* 7:307-309.
- Jang H, Arce FT, Ramachandran S, Capone R, Azimova R, Kagan BL, Nussinov R, Lal R (2010) Truncated beta-amyloid peptide channels provide an alternative mechanism for Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:6538-6543.
- Jang H, Connelly L, Arce FT, Ramachandran S, Kagan BL, Lal R, Nussinov R (2013) Mechanisms for the insertion of toxic, fibril-like β -amyloid oligomers into the membrane. *J Chem Theory Comput* 9:822-833.
- Karran E, Mercken M, De Strooper B (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Rev Drug Discov* 10:698-712.
- Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, Schipper HM, Derhovanessian E, Goldeck D, Fulop T (2009) Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 17(1):91-103.

- Letenneur L, Peres K, Fleury H, Garrigue I, Barberger-Gateau P, Helmer C, Orgogozo JM, Gauthier S, Dartigues JF (2008) Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: A population-based cohort study. *PLOS One* 3:e3637.
- Lin WR, Wozniak MA, Cooper RJ, Wilcock GK, Itzhaki RF (2002) Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J Pathol* 197:395-402.
- Masters CL, Selkoe DJ (2012) Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect Med* 2:a006262.
- Miklossy J (2011) Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med* 13:e30.
- Nemerow GR, Stewart PL, Reddy VS (2012) Structure of human adenovirus. *Curr Opin Virol* 2:115-121.
- Nicoll MP, Proença JT, Efstathiou S (2012) The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev* 36:684-705.
- Pearson HA, Peers C (2006) Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol* 575:5-10.
- Pernecky R, Guo LH, Kagerbauer SM, Werle L, Kurz A, Martin J, Alexopoulos P (2013) Soluble amyloid precursor protein beta as blood-based biomarker of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 3:e227.
- Piacentini R, Civitelli L, Ripoli C, Marcocci ME, De Chiara G, Garaci E, Azzena GB, Palamara AT, Grassi C (2011) HSV-1 promotes Ca^{2+} -mediated phosphorylation and $A\beta$ accumulation in rat cortical neurons. *Neurobiol Aging* 32:2323.e13-e26.
- Piacentini R, De Chiara G, Li Puma DD, Ripoli C, Marcocci ME, Garaci E, Palamara AT, Grassi C (2014) HSV-1 and Alzheimer's disease: more than a hypothesis. *Front. Pharmacol.* 5:97
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *New Engl J Med* 362:329-344.
- Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR (2007) Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol* 17:205-215.
- Rigamonti A, Lauria G, Mantero V, Salmaggi A (2013) A case of late herpes simplex encephalitis relapse. *J Clin Virol* 58:269-270.
- Russell WC (2009) Adenoviruses: Update on structure and function. *J Gen Virol* 90:1-20.
- Sciacca MF, Kotler SA, Brender JR, Chen J, Lee DK, Ramamoorthy A (2012) Two-step mechanism of membrane disruption by $A\beta$ through membrane fragmentation and pore formation. *Biophys J* 103:702-710.
- Seeman P, Seeman N (2011) Alzheimer's disease β -amyloid plaque formation in human brain. *Synapse* 65:1289-1297.
- Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR (2010) Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 343:195-224.
- Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLOS One* 5:e9505.

- Streit WJ, Xue QS (2014) Human CNS immune senescence and neurodegeneration. *Curr Opin Immunol* 29C:93-96.
- Sun E, He J, Zhuang X (2013) Live cell imaging of viral entry. *Curr Opin Virol* 3:34-43.
- Switzer WM, Michler RE, Shanmugam V, Matthews A, Hussain AI, Wright A, Sandstrom P, Chapman LE, Weber C, Safley S, Denny RR, Navarro A, Evans V, Norin AJ, Kwiatkowski P, Heneine W (2001) Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs. *Transplantation* 7:959-65.
- Tam JH, Pasternak SH (2012) Amyloid and Alzheimer's disease: Inside and out. *Can J Neurol Sci* 39:286-298.
- Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI (1998) Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2206-2214.
- White MR, Kandel R, Tripathi S, Condon D, Taubenberger J, Hartshorn KL (2014) Alzheimer's associated β -amyloid protein inhibits influenza A virus and modulates viral interactions with phagocytes. *PLOS One* 9:e101364.
- WHO report (April 11 2013) Dementia: a public health priority.
- Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, Dobson CB (2007) Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Letters* 429:95-100.
- Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF (2009) Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol* 217:131-138.
- Wozniak MA, Frost AL, Preston CM, Itzhaki RF (2011) Antivirals reduce the formation of key Alzheimer's disease molecules in cell cultures acutely infected with herpes simplex virus type 1. *PLOS One* 6:e25152.
- Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1989) Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 245:417-420.
- Zhao LN, Long H, Mu Y, Chew LY (2012) The toxicity of amyloid β oligomers. *Int J Mol Sci* 13:7303-7307.

Supporting information

Supporting Figures and legends

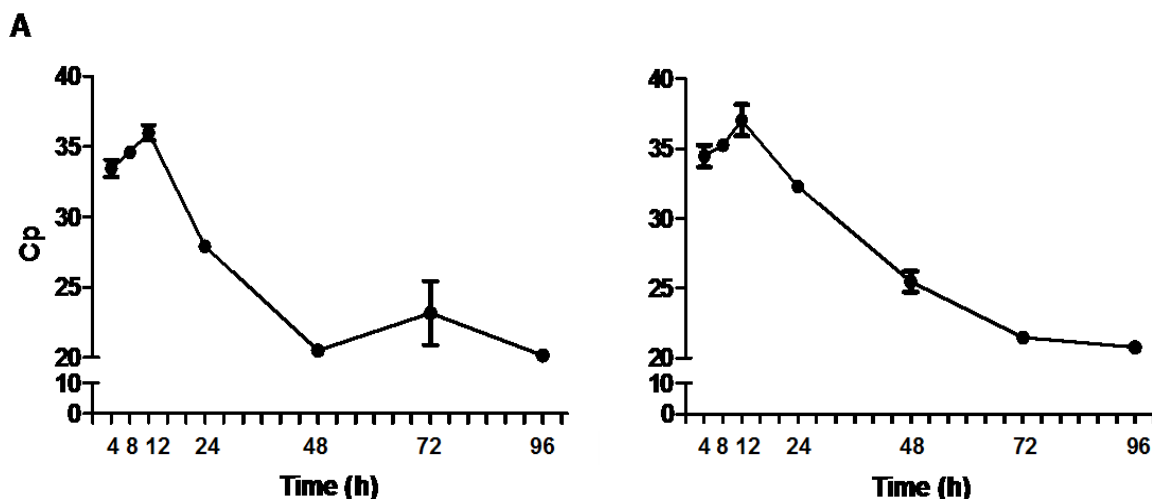


Fig. S1. Time-dependent replication of HSV-1 and HAd5 in MRC-5 and A549 cells, respectively. MRC-5 and A549 cells were exposed to (A) HSV-1 or (B) HAd5 using an initial 0.01 ID₅₀ per cell. Viral replication was analyzed by real-time PCR at the indicated times. Data are a combination of 2 independent experiments performed in duplicate and are shown as the mean ± SEM. Cp designates the crossing point which corresponds to the number of qPCR cycles needed to detect fluorescence of each sample.

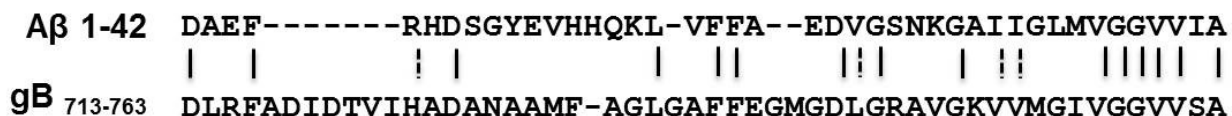


Fig. S2. Sequence homology between Aβ 1-42 and a transmembrane region of HSV-1 gB. Amino acid sequence alignment of Aβ 1-42 and a transmembrane region (positions 713 – 763) of HSV-1 gB using Clustal Omega shareware (<http://expasy.org/proteomics>). Identical amino acid residues are indicated by vertical lines and amino acids possessing similar properties, by dashed vertical lines. Adapted with permission from Cribbs *et al.* (Biochemistry, 39 (2000) 5988-5994). Copyright 2000, American Chemical Society.

Table S1. Amino acid sequences of peptides used in this study

Peptides	Sequences
A β 1-40	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
A β 1-42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Scrambled-A β 1-40	AEGDSHVLKEGAYMEIFDVQGHVFGGKIFRVVDLGSNVA
Scrambled-A β 1-42	AIAEGDSHVLKEGAYMEIFDVQGHVFGGKIFRVVDLGSNVA
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES

Amino acids are shown in a one-letter code.

Table S2. Nucleotide sequences of primers used for PCR amplification.

Primers	Sequences
HSV-1 forward*	5'-CATCATCATGGCCCACAACCT-3'
HSV-1 reverse*	5'-CTTTCGCATGGCSAGCCAGTC-3'
HSV-1 probe*	5'-CCGACGCAGTGGCGCACCTGGAGG-3'
HAd5 forward♦	5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3'
HAd5 reverse♦	5'-GTSGGSGCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT-3'
β -actin forward#	5'-GTGCTGTCCCTGTACGCCTCT-3'
β -actin reverse#	5'-GGCCGTGGTGGTGAAGCTGTA-3'

(1) HSV-1 primers and probe were designed on the basis of the highly conserved herpes viral DNA polymerase gene.

(2) Primers for HAd5 DNA amplification were adapted from Heim *et al.* (2003).

(3) Primers for β -actin amplification were designed according to Switzer *et al.* (2001).

ARTICLE 2

Protective Effect of Amyloid- β Peptides Against Herpes Simplex Virus-1 Infection in a Neuronal Cell Culture Model

Auteurs de l'article: Karine Bourgade, Aurélie Le Page, Christian Bocti, Jacek M. Witkowski^c, Gilles Dupuis, Eric H. Frost, Tamàs Fülöp Jr.

Statut de l'article: Accepté par le Journal of Alzheimer's Disease, *in press*.

Avant-propos: Ma contribution: conception et réalisation majeures des expériences. Rédaction des versions initiales du manuscrit en anglais, approbation des modifications finales.

Résumé: Les plaques séniles sont l'un des principaux marqueurs de la maladie d'Alzheimer (MA). Elles correspondent à des dépôts insolubles de peptides amyloïde- β (A β) et sont responsables de la réponse inflammatoire et de la neurodégénération qui mène à la perte de mémoire et de fonctions cognitives. Des données récentes suggèrent que les peptides A β possèdent une activité antimicrobienne et anti-virale *in vitro*. Dans cette étude nous avons utilisé des cocultures de lignées cellulaires neuronales (H4) et microgliales (U118-MG) en tant que modèle minimal *in vitro* afin de déterminer si les cellules H4 produisent des peptides A β et si cette production peut induire une protection anti-virale contre une infection par HSV-1 dans le modèle des cocultures. Les résultats ont montré que les cellules H4 sécrètent des peptides A β en réponse à une infection par HSV-1 et que les cellules U118-MG internalisent rapidement A β 42. De plus, HSV-1 produit différents effets sur la production des cytokines inflammatoires. Alors que la production de TNF α et d'IL-1 β par les cellules H4 est importante dans des conditions basales, l'infection de ces cellules par HSV-1 n'augmente pas significativement cette production. Des effets similaires ont été observés dans le cas des cellules U118-MG. Les deux lignées cellulaires produisent de faibles niveaux d'IFN α . Cependant, A β 42 exogène induit une forte production de ces cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, la protection anti-virale d'A β 42 a été révélée lors d'expériences de transferts impliquant des milieux de cultures conditionnés (CM) provenant de cellules H4 infectées par HSV-1. Ces CM confèrent une protection A β -dépendante, contre les infections par HSV-1 dans de nouvelles cultures de cellules H4 exposées à HSV-1. Nos résultats ont également montré que les IFN de type 1 ne jouent pas de rôle dans cette inhibition. Nos données suggèrent que les cellules de neuroblastomes H4 produisent du peptide A β 42 en réponse à une infection par HSV-1 et que celui-ci protège contre une infection virale subséquente. Ce mécanisme pourrait être impliqué dans l'étiologie de la forme sporadique de la MA.

Protective effect of amyloid- β peptides against Herpes Simplex Virus-1 infection in a neuronal cell culture model

Karine Bourgade^a, Aurélie Le Page^a, Christian Bocti^b, Jacek M. Witkowski^c, Gilles Dupuis^d, Eric H. Frost^e, Tamàs Fülöp Jr.^{f,*}

^a*Research Center on Aging, Graduate Program in Immunology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4*

^b*Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4*

^c*Department of Pathophysiology, Medical University of Gdansk, Poland*

^d*Department of Biochemistry, Graduate Program in Immunology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4*

^e*Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4*

^f*Department of Medicine, Research Center on Aging, Graduate Program in Immunology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4*

*Correspondence to: Tamàs Fülöp, M.D., Ph.D., Research Center on Aging, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, J1H 5N4, Canada. Tel.: +1-819-780-2220; Fax: +1-819-829-7141; E-mail: Tamas.Fulop@usherbrooke.ca.

Running title: Anti-viral protection of neuronal cells by amyloid- β peptide.

Abstract. Senile amyloid plaques are one of the main hallmarks of Alzheimer's disease (AD). They correspond to insoluble deposits of amyloid- β peptides (A β) and are responsible for the inflammatory response and neurodegeneration which lead to loss of memory. Recent data suggest that A β possess antimicrobial and anti-viral activity *in vitro*. Here, we have used cocultures of neuroglioma (H4) and glioblastoma (U118-MG) cells as a

minimal *in vitro* model to investigate whether A β is produced by neuroglioma cells and whether this could result in protective anti-viral activity against HSV-1 infection. Results showed that H4 cells secreted A β 42 in response to HSV-1 challenge and that U118-MG cells could rapidly internalize A β 42. Production of pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-1 β by H4 and U118-MG cells occurred under basal conditions but infection of the cells with HSV-1 did not significantly upregulate production. Both cell lines produced low levels of IFN α . However, extraneous A β 42 induced strong production of these cytokines. A combination of A β 42 and HSV-1 induced production of pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-1 β , and IFN α in the cell lines. The reported anti-viral protection of A β 42 was revealed in transfer experiments involving conditioned medium (CM) of HSV-1-infected H4 cells. CM conferred A β -dependent protection against HSV-1 replication in *de novo* cultures of H4 cells challenged with HSV-1. Type 1 interferons did not play a role in these assays. Our data established that H4 neuroglioma cells produced A β 42 in response to HSV-1 infection thus inhibiting secondary replication. This mechanism may play a role in the etiology of AD.

Keywords: Beta-amyloid peptides, herpes simplex virus-1 (HSV-1), viral replication inhibition, neuronal cells, glial cells, cocultures, Alzheimer's disease.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by irreversible destruction of specific regions of the brain. AD is clinically identified by initial progressive loss of memory, impaired language skills and on-going manifestations of cognitive functional alterations, such as judgement and decision making, individual self-autonomy and, in a large number of cases, uncontrolled behavioral disturbances [1, 2]. Currently, AD is the most common form of dementia world-wide [3]. It is estimated that nearly 35.6 million people currently suffer from this form of dementia and it is expected that this number will triple in the next 40 years or so [4] largely due to increased life expectancy of the global population, as aging is the most important risk factor of AD [5].

There are two clinical forms of AD. The early onset of AD (EOAD) corresponds to the genetic and familial form whereas the late onset of AD (LOAD) is the sporadic manifestation of the disease that generally occurs after the age of 65. However, both forms are characterized by similar pathological changes namely, irreversible neuronal loss, deposits of cortical senile plaques and neurofibrillary tangles in the brain of affected patients [6, 7]. The hallmark of LOAD is the intracellular accumulation of tangles of hyperphosphorylated tau protein and the extracellular deposits (senile plaques) of short amyloid beta peptides (A β) 1 - 40 (A β 40) and 1 - 42 (A β 42) derived from successive cleavage of the amyloid precursor protein (APP), through the amyloidogenic pathway. The amyloidogenic pathway is initiated by the action of β -secretases (BACE-1) that release the ectodomain of APP which becomes the substrate of the γ -secretase complex that generates the A β fragments [8-10] which are secreted [11]. Accumulation of deposits of A β in a filamentous (insoluble) form is associated with neuronal degeneration and cortical atrophy [2, 12]. The exact cause of LOAD remains elusive but has been proposed to be linked to a host of factors such as gene susceptibility [13, 14], metabolic disorders [15, 16], brain inflammation [17-19] and brain infection by several types of pathogens [20-22]. In addition, environmental factors, family history and vascular risk factors such as hypertension and hypercholesterolemia have been suggested as additional factors that may contribute to AD [23, 24]. The mechanism of A β accumulation in LOAD is not fully understood but appears to be caused by overproduction or by a defect in clearance and degradation by microglial cells, or both [25]. In addition, A β clearance is altered by age-related immune changes (immunosenescence and inflamm-aging) [26-29].

Chronic inflammation of the brain (neuroinflammation) and the peripheral immune system is a fundamental characteristic of AD [30-33]. Neuroinflammation is triggered by microglia and astrocyte activation and, infected neurons in some cases. In this connection, microglia and astrocytes have been shown to proceed from a resting to an activated inflammatory state following brain infection or insult [30, 34]. Upregulation of microglia and astrocyte activity results in production of pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IL-1 β , IL-6 and, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) [35]. These mediators are responsible for apoptosis or necrosis of damaged neurons [35]. In addition, microglia respond to A β aggregates and plaques through a number of receptors, namely

RAGE, scavenger receptors, CD36, Fc receptors and TLR [36]. Occupation of these receptors induces the switch to a neurotoxic state that sustains neuroinflammation and induces A β phagocytosis and degradation. Although the β -amyloid hypothesis is a signature of LOAD [37], its role as a cause of AD is still much debated, especially in view of the failure of A β -targeted immunotherapies [38-42].

Viral infections have been suggested to be a contributing factor to AD [20-22]. For instance, herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is frequently found in AD patients' brain [22, 43] where it colocalizes within amyloid plaques [44]. In addition, HSV-1 sero-positive individuals are at increased risk of AD [45]. Other members of the herpes virus family, namely HSV-2, CMV, and HHV-6, have also been detected in the brain of AD patients [46] or have been associated with its pathogenesis [43]. HSV-1 is a virus which infects approximately 90% of the human population early (before 10 years of age) and is able to remain latent during the whole life of the infected individuals [47]. The exact percentage of individuals with HSV-1 in the brain is still uncertain but in any case is increasing with age and can be estimated by the different studies to be around 70% [48,49]. HSV-1 escapes immune recognition by remaining latent in trigeminal ganglions but can be activated under conditions of immunodeficiency or stress. Under these conditions, HSV-1 re-infects the host [50] and colonizes the hippocampus and fronto-temporal lobes [51]. In cases of strong immunodeficiency, re-activation of HSV-1 can trigger lethal herpetic encephalopathy which also occurs in the same areas of the brain as those affected in AD (hippocampus and frontal and temporal cortical lobes) [52-54].

A new picture is slowly emerging with respect to a protective role of A β against pathogenic agents. For instance, we [55] and one other group [56] have presented evidence that A β possessed antiviral activity against enveloped HSV-1 as well as, H3N2 and H1N1 influenza A virus strains respectively, in *in vitro* assays. In addition, A β have been reported to display antimicrobial activity against a host of clinically relevant bacteria and yeast [57]. The bulk of these observations suggests that A β may belong to a novel class of antimicrobial peptides that protect against neurotropic enveloped virus infections such as HSV-1 and influenza virus and, against other neuroinfections [21]. Here, we sought to obtain further evidence for A β -dependent protection against HSV-1 infection using an *in vitro* model of coculture of neuroglioma (H4) and glioblastoma (U118-MG) cell lines.

Results showed that HSV-1 triggered a time-dependent A β 42 production by H4 cells but the absence of A β 40 production. U118-MG cells produced low amounts of A β 42 or A β 40. Production of A β was also low in cocultures of H4/U118-MG cells exposed to HSV-1, due to rapid uptake of A β by U118-MG cells. Together, A β 42 and HSV-1 induced production of pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-1 β , and IFN α in the cell lines. Culture medium of H4 cells exposed to HSV-1 (defined as conditioned medium or CM) conferred protection against infection of *de novo* cultures of H4 cells by HSV-1 due to the presence of A β in C-sup. Type I interferons (IFN α , IFN β) were not responsible for the protective effect. Taken together, our data further support our previous observations [55] that A β display anti-viral activity against HSV-1 infection in *in vitro* assays and extend these observations to demonstrate that A β is induced by HSV-1 infection in an *in vitro* model of coculture of neuroglioma and glioblastoma cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures and cocultures

H4 (ATCC HTB-148), a human neuroglioma cell line, and U118-MG (ATCC HTB-15), a human glioblastoma cell line, came from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). MRC-5, a human lung fibroblast cell line, was obtained from Diagnostic Hybrids (Athens, OH). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), penicillin G (2.5 I.U./ml) and streptomycin (50 μ g/ml). Serum and antibiotics were from Wisent Bioproducts (St-Bruno, QC). Individual cell cultures were allowed to reach confluence before use. In the case of cocultures of H4 and U118-MG, each cell line was grown to approximately 70% confluence. H4 cells were detached by trypsin treatment and added to adherent U118-MG cells in fresh medium. Cocultures were left to grow for 24 h before use.

Synthetic amyloid- β peptides, antibodies and BACE-1 inhibitor

Synthetic A β 40, A β 42 and Alexa Fluor 555-conjugated A β 42 were obtained from Anaspec (Fremont, CA). A β were used at a concentration of 20 μ g/ml for cytokine quantification experiments and at 5 μ g/ml for phagocytosis experiment of Alexa Fluor 555-labeled A β 42 by U118-MG cells. These concentrations of A β peptides used are in agreement with that used by other investigators (58-61). Furthermore, we also tested concentrations of 1 μ g/ml and 10 μ g/ml. Best and most consistent results were obtained at the above concentrations [55]. Amino acid sequences of synthetic peptides used in this study have been reported [55]. A neutralizing anti-human α -IFN monoclonal antibody was purchased from EMD Millipore (EMD Millipore, Etobicoke, ON) and used at a 100 ng/ml concentration. Anti-human β -interferon neutralizing polyclonal antibodies (EMD Millipore, Etobicoke, ON) were used at a concentration of 10 units/ml. A β -secretase (BACE-1) inhibitor was obtained from EMD Millipore (product #565749) and used at a 2.5 μ M concentration.

HSV-1 virus

HSV-1 was an isolate obtained from the clinical microbiology and virology laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS) [55].

Quantification of A β by ELISA

A sandwich ELISA method was used to determine A β 40 and A β 42 concentrations in cell supernatants. ELISA-designed 96-well plates were coated (5 μ g/ml) with N-terminal anti-A β antibody (Rockland, Limerick, PA) in coating buffer (NaHCO₃, 100 mM, Na₂CO₃, 34.9 mM, pH 9.5) and incubated at 4°C, overnight. After 3 washes with PBS-T (PBS containing 0.05% Tween-20), ELISA plates were subjected to a blocking step using a blocking buffer (PBS containing 10 % FBS, 200 μ l/well) for 1 h at room temperature. Three additional washes were performed with PBS-T buffer. A calibration curve was constructed by adding serial dilutions of A β 40 or A β 42 over a range of concentrations from

3.91 pg/ml to 10 µg/ml in coating buffer. Incubations were done at room temperature for 3 h, followed by 3 washes with PBS-T. Quantification of Aβ in cell supernatants was performed in the same way. Primary antibody against Aβ40 or Aβ42 (Anaspec) was diluted in coating buffer at 1 µg/ml and added to the plates for 1 h at room temperature. After 3 washes (PBS-T), HRP-conjugated anti-mouse IgG (Abcam, Cambridge, MA) was added to each well at 1:500 final dilution in coating buffer, incubated for 30 min at room temperature and then washed 5 times (PBS-T). TMB substrate (BioLegend, San Diego, CA) was mixed and 100 µl were added to each well. The colorimetric reaction was stopped by addition of 1N H₂SO₄ (100 µl). Plates were read at 450 nm using a micro plate reader (Viktor X5, Perkin Elmer, Waltham, MA). Concentrations were determined by reference to the calibration curve, after subtraction of the blank values.

Measure of BACE-1 activity

SensoLyte 520 β-secretase Assay Kit “Fluorimetric” (Anaspec) was used to quantitate the activity of BACE-1 in H4 cells lysates following HSV-1 infection by measuring the fluorescent signal (Ex/Em = 485/535 nm) of the fluorescent peptide substrate provided in the kit. Activity was calculated by comparison with an internal control and is represented as relative fluorescent units (RFU).

Cytokine quantification

Multiplex immunobead assay technology (Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, EMD Millipore Corp., Billerica, MA) was used to simultaneously detect three human cytokines (TNFα, IL-1β and IFNα) in small samples of cell supernatants. Cytokines in cell culture supernatants were quantified at baseline without cell treatment and 16 h later after addition of Aβ40 or Aβ42 in the absence or presence of HSV-1 challenge. Supernatants were processed according to the manufacturer’s recommendations (thawing and centrifugation) and quantification was performed using the Multiplex Assay Analysis Software (EMD Millipore). Analyte concentrations were calculated based on respective standard curves for each analyte.

DNA isolation and amplification of cells treated with A β and HSV-1

MRC-5, H4 and U118-MG cells were cultured in DMEM (100 μ l) in 96-well plates and then treated under various conditions. HSV-1 was titrated by end point dilution with MRC-5 cells using serial dilutions of the virus in 96-well plates. Based on this titration, cells were infected in all experiments at a ratio of 0.01 ID₅₀ per cell. Cells were treated with BACE-1 inhibitor or neutralizing antibodies and exposed to HSV-1, as described in the legends to the Figures. In most cases, treatments consisted of addition of BACE-1 inhibitor and/or antibodies for 2 h to cell cultures, followed by exposure to HSV-1. Assays designed to test the protective effect of A β were prepared as follows. Culture medium from H4 cell cultures not exposed to HSV-1 was added to *de novo* H4 cell cultures 2 h prior to addition of HSV-1. In another set of experiments. Culture medium of HSV-1-infected H4 cells was harvested after 24 h and designated as conditioned medium (CM). The CM was added to *de novo* H4 cell cultures 2 h prior to addition of HSV-1. In each case, viral DNA replication was stopped by freezing the cell suspension 24 h post viral exposure. DNA was extracted by alkaline lysis and ethanol precipitation [62]. Aliquots (1 μ l) were amplified by real-time PCR without purification to detect viral and β -actin DNA, as described [55]. Amplified viral DNA was normalized to amplified β -actin DNA ($2^{\text{exp}(\beta\text{-actin } C_q - \text{viral } C_q)} \times 1000$) to correlate viral DNA variations to cell number.

Analysis of Alexa Fluor 555-labeled A β 42 uptake by U118-MG cells using fluorescence microscopy

Alexa Fluor 555-labeled A β 42 was added (5 μ g/ml) to confluent U118-MG cells. Cells were mounted using the ProLong Antifade kit (Life Technologies Inc. Burlington, ON) that contained DAPI DNA-stain. Images were recorded at room temperature using a Nikon Eclipse TE2000-S fluorescence microscope (Melville, NY) equipped with a CCD camera (Qimaging 32-0116A-122 Retiga 1300R Fast Cooled Mono 12 bit, Surrey, BC, Canada). Data were processed using Simple PCI software.

Cell viability

Cell viability was determined using the Trypan blue exclusion method.

Statistical analysis

Data were analyzed using the Graph-Pad Prism 5 (La Jolla, CA) or Excel software (Microsoft Canada Inc., Mississauga, ON). Statistical analyses were performed by two-tailed Student's *t*-test.

RESULTS

Time- and β -secretase-dependent production of A β in H4 neuroglioma cells and U118-MG glioblastoma cells in response to HSV-1 infection

In a first series of experiments, we quantitated A β production by H4 and U118-MG cells in response to HSV-1 infection. Results showed that baseline production of A β 42 by H4 cells after 24 h in culture was low, amounting to 13.2 ± 3.9 pg/ml (Fig. 1A). In marked contrast, HSV-1 induced a significant ($p < 0.05$) 4-fold increase in production of A β 42 (52.2 ± 17.1 pg/ml) 24 h after infection of these cells (Fig. 1A). However, HSV-1 did not induce A β 40 production, under the same experimental conditions (Fig. 1A). Kinetic experiments revealed a progressive production of A β 42 following HSV-1 infection but there was no significant increased production of A β 40 at any time (Fig. 1B). Evidence that A β 42 production by the H4 neuroglioma cell line involved the established amyloid- β pathway was obtained by measuring BACE-1 activity. Results showed that basal activity in H4 cells infected with HSV-1 was similar at 2 h (886.3 ± 20.3 RFU) and 6 h (855.3 ± 20.3 RFU) but significantly increased ($p < 0.0001$) at 24 h (1193 ± 56 RFU) (Fig. 1C). HSV-1 challenge of U118-MG cells did not stimulate increased production of A β 42 which was 13.2 ± 5.1 pg/ml under basal conditions and 9.0 ± 3.2 pg/ml following challenge with HSV-1 for 24 h (Fig. 1D). A β 40 production was low (0.35 ± 0.25 pg/ml) in U118-MG cells under basal conditions but exposing the cells to HSV-1 for 24 h induced a significant ($p < 0.01$) but small (1.75 ± 0.26 pg/ml) increase in A β 40 production (Fig. 1D).

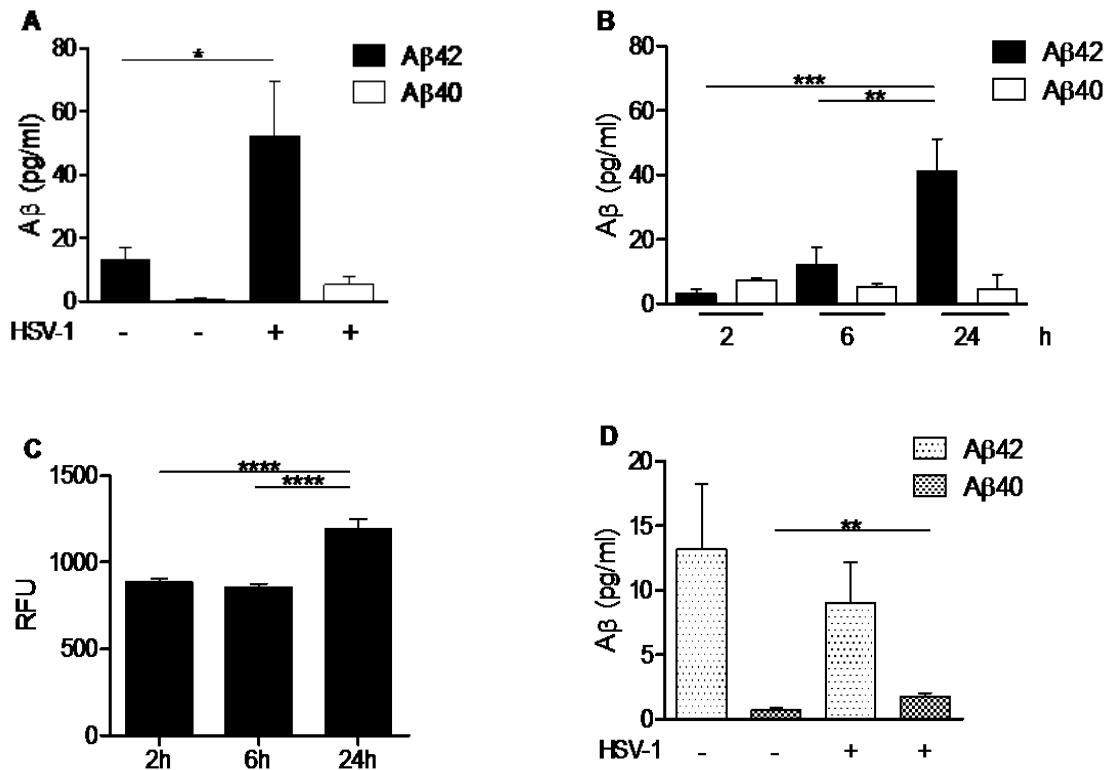


Fig. 1. HSV-1-dependent A β production in H4 neuroglioma and U118-MG glial cells. A) H4 neuroglioma cells were cultured in the absence (-) or presence (+) of HSV-1 for 24 h and production of A β 42 and A β 40 was quantitated by ELISA assays. B) Time-course production of A β 42 and A β 40 by H4 neuroglioma cells cultured in the presence of HSV-1. C) Time course of BACE-1 activity in H4 neuroglioma cells exposed to HSV-1 expressed in relative fluorescence units (RFU). D) A β 42 and A β 40 production by U118-MG glioblastoma cells exposed to HSV-1 for 24 h, as determined by ELISA assays. Data are shown as the mean \pm SEM of 4 to 5 experiments performed in duplicate. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****), respectively.

Effect of β -secretase inhibition on HSV-1 replication and A β 42 production in long-term cultures of H4 cells

We next investigated whether H4 cells were able to sustain replication of HSV-1 and continued production of A β 42 in the absence or presence of BACE-1 inhibitor, over a 5-day period of time. Results showed that HSV-1 replication in the presence of BACE-1 inhibitor increased as a function of time (Fig. 2A). In contrast, HSV-1 replication was

severely inhibited in cultures not containing BACE-1 inhibitor (Fig. 2A). These observations suggested that inhibition of HSV-1 replication was related to the presence of A β , in agreement with previous observations from our laboratory [55]. Further support for this interpretation was obtained by quantification of A β production in the absence of BACE-1 inhibitor. Results showed that HSV-1 induced sustained production of A β 42 over time up to 30 pg/ml (Fig. 2B). As expected, the presence of BACE-1 inhibitor efficiently blocked A β production (Fig. 2B). H4 cells remained viable (93.8 ± 1.9 %) over the 5-day period of culture and the continued presence of HSV-1 did not significantly affect cell viability (80.2 ± 12.5 %) (Fig. 2C). The presence of BACE-1 inhibitor decreased cell viability over the 5-day period of culture, although cells remained viable to the level of 59.0 ± 25.5 %. Exogenous addition of A β 42 reduced cell viability to 46.4 ± 12.5 % over the same period of time (Fig. 2C), an observation which is likely due to the reported cytotoxicity of A β 42 [63].

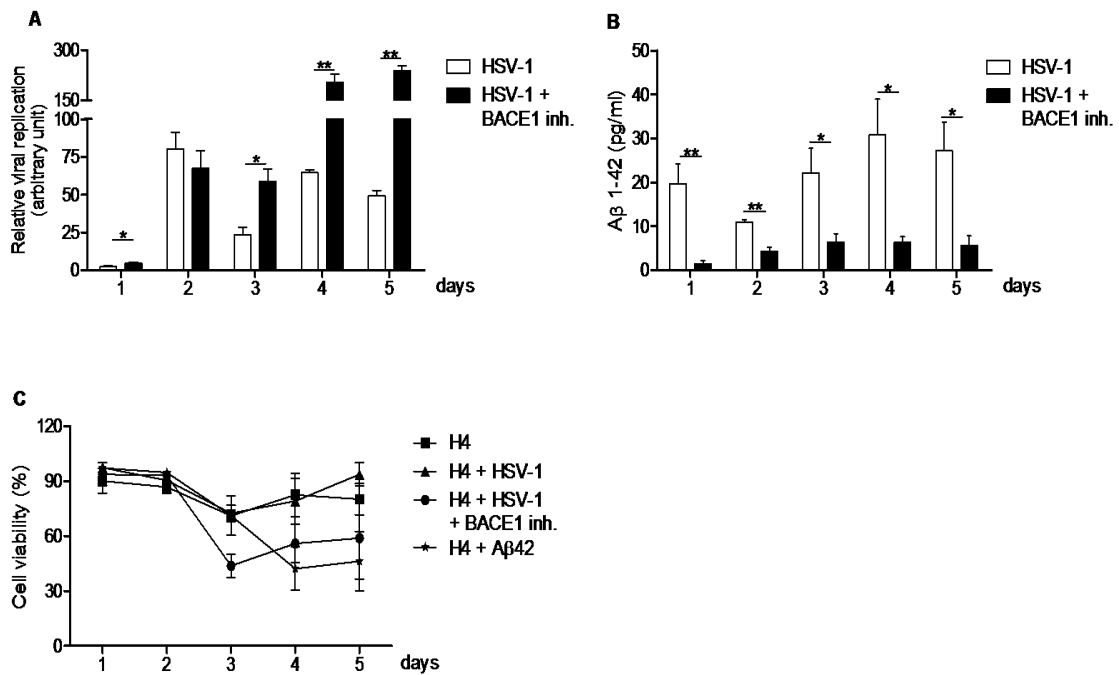


Fig. 2. Kinetics of HSV-1 replication and Aβ₄₂ production in H4 cells exposed to BACE-1 inhibitor. A) Relative HSV-1 replication in H4 cells initially infected with HSV-1 and cultured for the indicated times in the absence (empty columns) or the presence (filled columns) of BACE-1 inhibitor. Viral replication was stopped by freezing the cell suspension. DNA was isolated and aliquots were analyzed by real-time PCR. Results were computed as the ratio of viral DNA relative to β-actin DNA and are shown as relative viral replication in arbitrary units. They are a combination of 4 independent experiments and are displayed as the mean ± SEM. The *asterisks* (*) correspond to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**), respectively. B) Aβ₄₂ production by H4 cells initially exposed to HSV-1 and cultured for the indicated times in the absence (empty columns) or the presence (filled columns) of BACE-1 inhibitor. Aβ₄₂ quantification was performed by ELISA assays and data correspond to 4 independent experiments shown as the mean ± SEM. The *asterisks* (*) correspond to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**), respectively. C) Viability of H4 cells cultured in the absence (indicated by H4) or the presence of HSV-1, a combination of HSV-1 and BACE-1 inhibitor and, exogenous Aβ₄₂ for the indicated times. Data correspond to 4 independent experiments shown as the mean ± SEM.

Aβ production in cocultures of H4 and U118-MG cells in response to HSV-1 infection

The major objective of the current investigation was to use an *in vitro* model of neuronal/glial cell interactions to further investigate the role of Aβ in protection against HSV-1 infection. Cocultures of H4 and U118-MG cells were set and Aβ production quantitated. Results showed absence of Aβ40 accumulation under basal conditions or when the cells had been challenged with HSV-1 for 24 h (Fig. 3A). These data suggested that U118-MG cells did not influence the previously observed low levels of Aβ40 production by H4 cells. Unexpectedly, data showed that Aβ42 concentrations were slightly lower in cocultures, with values of 7.7 ± 3.1 pg/ml under basal conditions, as opposed to 13.3 ± 3.9 pg/ml in H4 cultures alone. A similar observation was made under conditions of HSV-1 infection for 24 h. In this case, values were 11.2 ± 3.6 pg/ml in cocultures as opposed to 52.2 ± 17.1 pg/ml in the absence of U118-MG cells. The bulk of these data suggested that Aβ42 accumulation occurred in cocultures of H4 and U118-MG cells, although at much reduced levels compared to H4 cell cultures. It has been reported that glial cells can efficiently phagocytose Aβ by way of a series of endogenous receptors [64]. We investigated whether this property could explain the reduced levels of Aβ42 production in coculture experiments. Results showed that Alexa Fluor 555-labeled Aβ42 was rapidly taken up by U118-MG cells (Fig. 3B), suggesting that this mechanism was responsible for the low levels of detection of Aβ42 in cocultures.

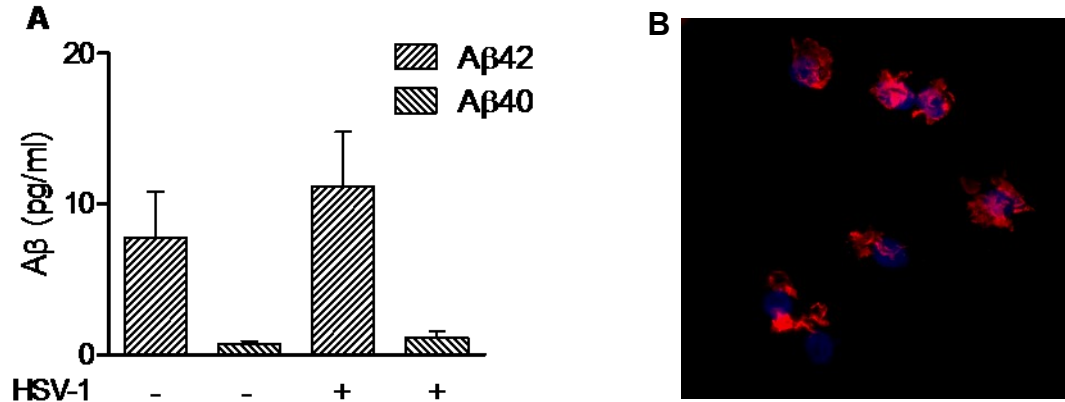


Fig. 3. A β production in cocultures of H4 neuroglioma and U118-MG glioblastoma cells. A) Production of A β 42 and A β 40 was quantitated by ELISA assay in cocultures not exposed (-) or exposed (+) to HSV-1 for 24 h. Data correspond to 3 independent experiments performed in duplicate shown as the mean \pm SEM. B) Illustrative micrograph of Alexa Fluor 555-labeled A β 42 internalization by U118-MG cells. Distribution of fluorescence in DAPI-stained (blue color) U118-MG cells exposed for 30 min., at room temperature, to Alexa Fluor 555-labeled (red color) A β 42 and analyzed by fluorescence microscopy (n = 3). Bar scale corresponds to 20 μ m.

TNF α production by H4, U118-MG and cocultures in response to HSV-1 and A β treatments

Brain inflammation is a major component of AD [65-67]. Levels of several cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN α) have been reported to be increased in AD [67-69]. We asked the question whether the *in vitro* model of coculture of neuronal and glial cells used in the present study generated cytokine production under various conditions, including exposure to HSV-1 and A β . In a first series of experiments, we assessed the production of pro-inflammatory cytokine TNF α in 16 h cultures. Results showed that H4 cells produced TNF α under basal conditions but production by U118-MG cells was significantly lower (Fig. 4A). TNF α production was similar to that of H4 cells in cocultures (Fig. 4A). Exposure of H4 cells to HSV-1 did not influence production of TNF α (Fig. 4B). Whereas the presence of A β 40 inhibited TNF α production in non-infected cells, it had no effect when H4 cells had been infected with HSV-1 (Fig. 4B). Similar observations were made in the case of A β 42, except that there was increased production of TNF α when cells were also

exposed to HSV-1 (Fig. 4B). Interestingly, significantly increased production of TNF α was only observed when U118-MG cells (Fig. 4C) and cocultures (Fig. 4D) were grown in the combined presence of A β 42 and HSV-1.

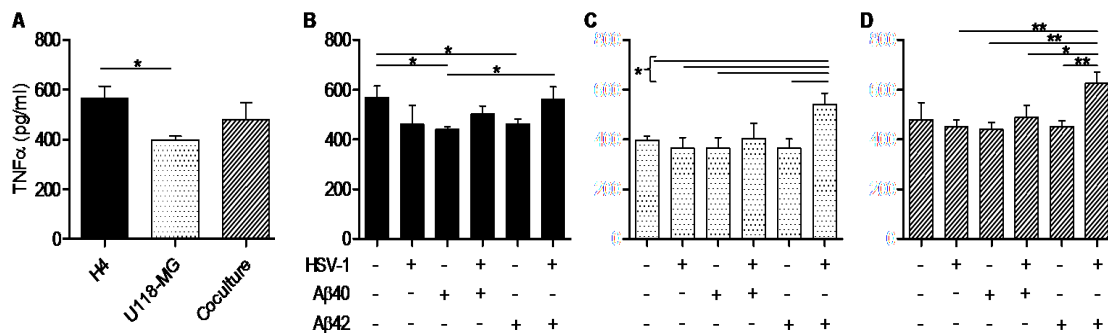


Fig. 4. Influence of HSV-1 and A β on the production of pro-inflammatory cytokine TNF α . TNF α production by (A) H4 and U118-MG cells and cocultures of these cells, (B) H4 cells, (C) U118-MG cells and, (D) cocultures of H4 and U118-MG cells under the conditions illustrated in the Figure. Cytokine quantification was performed by Luminex technology, after 16 h in each case. Data correspond to 3 to 4 independent experiments and are shown as the mean \pm SEM. The *asterisks* (*) correspond to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**), respectively.

IL-1 β production by H4 and U118-MG cells and cocultures in response to HSV-1 and A β

H4 cells and cocultures of H4 and U118-MG cells produced the same amounts of pro-inflammatory IL-1 β after 16 h, under basal conditions (Fig. 5A). However, U118-MG cells produced significantly less IL-1 β under similar conditions (Fig. 5A). The presence of A β 40, A β 42, HSV-1 or a combination of these challenges did not affect production of IL-1 β by H4 cells (Fig. 5B). In the case of U118-MG cells, results showed that HSV-1 in combination with or without A β 40 or A β 42 or, A β 42 alone potentiated production of IL-1 β (Fig. 5C). However, only a combination of HSV-1 and A β 42 increased production of IL-1 β in cocultures with respect to basal conditions (Fig. 5D).

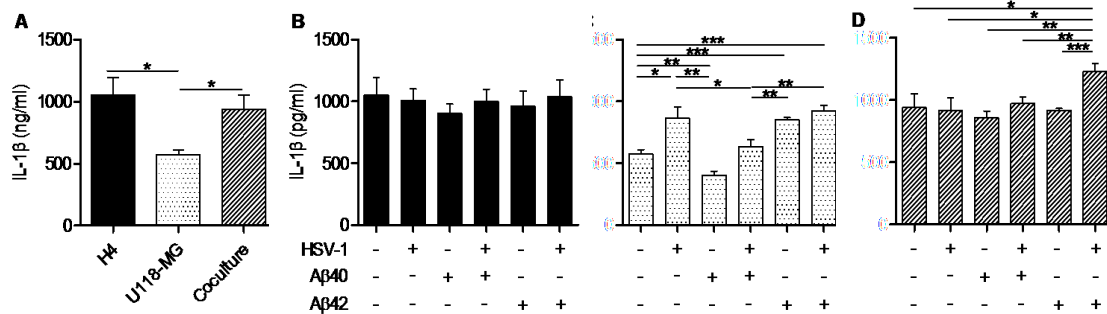


Fig. 5. Influence of HSV-1 and A β on the production of pro-inflammatory cytokine IL-1 β . IL-1 β production by, (A) H4 and U118-MG cells and cocultures of these cells, (B) H4 cells, (C) U118-MG cells and, (D) cocultures of H4 and U118-MG cells under the conditions illustrated in the Figure. Cytokine quantification was performed by Luminex technology, after 16 h. Data correspond to 3 to 4 independent experiments and are shown as the mean \pm SEM. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***), respectively.

INF α production in H4 and U118-MG cell lines and cocultures in response to HSV-1 and A β

Type 1 interferons contribute to neuroinflammation in AD and have been detected in brains of AD patients [70]. We investigated whether we could observe production of INF α in the *in vitro* model used in the present study. Results showed that H4 cells and cocultures of H4 and U118-MG cells produced low levels of INF α in 16 h cultures, under basal conditions, although there was absence of production in U118-MG cells (Fig. 6A). HSV-1 and a combination of HSV-1 and A β 40 or A β 42 significantly increased INF α production in H4 cells (Fig. 6B) but only A β 42, with or without HSV-1, showed this effect in U118-MG cells (Fig. 6C) and cocultures (Fig. 6D).

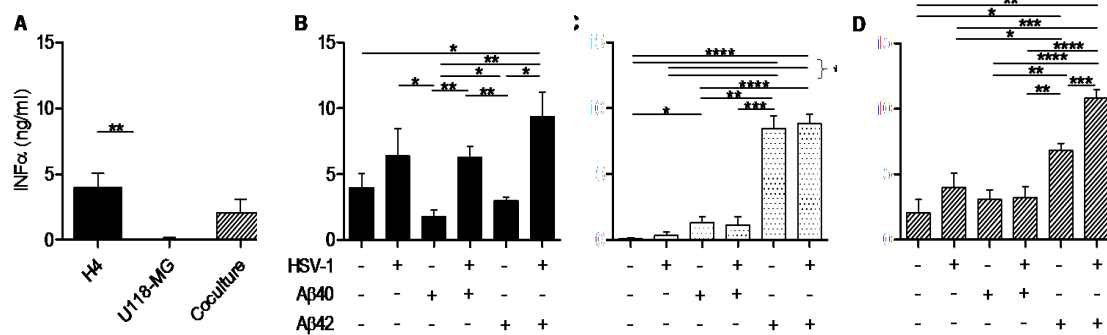


Fig. 6. Influence of HSV-1 and A β on the production of anti-viral cytokine INF α . INF α production by, (A) H4 and U118-MG cells and cocultures of these cells, (B) H4 cells, (C) U118-MG cells and, (D) cocultures of H4 and U118-MG cells under the conditions illustrated in the Figure. Cytokine quantification was performed by Luminex technology, after 16 h. Data correspond to 3 to 4 independent experiments and are shown as the mean \pm SEM. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****), respectively.

Inhibition of HSV-1 replication in de novo cultures of H4 cells by conditioned medium (CM) obtained from HSV-1-infected H4 cells

Previous work from our laboratory [55] and data presented in Fig. 2 showed that A β interfered with HSV-1 replication. CM from H4 cells infected with HSV-1 for 24 h was assayed in *de novo* cultures of H4 cells challenged with HSV-1. Results showed that the levels of HSV-1 replication were significantly lower ($38.2 \pm 11.1\%$, $p < 0.01$) (column #3) in comparison with *de novo* cultures exposed to HSV-1 without CM (column #1) or with medium from uninfected H4 cells (column #2) (Fig. 7A). These observations suggested that the inhibition of HSV-1 replication could be related to the presence of A β in CM (Fig. 7A). Further evidence that the presence of A β in CM was responsible for inhibition of HSV-1 replication was obtained by conducting similar experiments with fibroblast MRC-5 cells, a cell line that allows replication of HSV-1 [55] but that does not produce A β in response to HSV-1 (data not shown). As expected, HSV-1 replication occurred in these cells and levels of replication were not significantly different when the cells had been exposed to media from infected (CM) or uninfected MRC-5 cells (Fig. 7B).

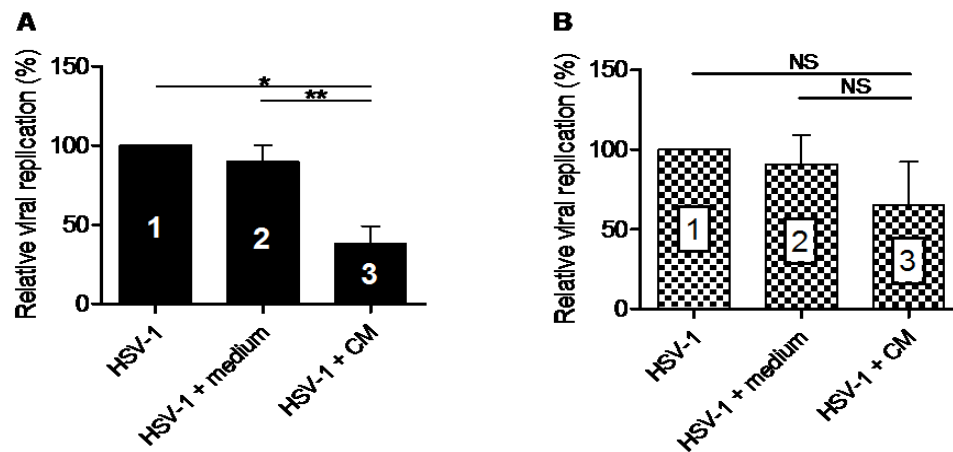


Fig. 7. Protective effect of conditioned medium (CM) from HSV-1 infected H4 cells against HSV-1 replication upon HSV-1 challenge in *de novo* cultures. In one set of experiments (columns #1), H4 cells (A) or MRC-5 cells (B) were cultured for 24 h in the presence of HSV-1. In a second set of experiments (columns #2), medium of H4 or MRC-5 cells grown in the absence of HSV-1 was added to *de novo* cultures of H4 or MRC-5 cells which were then exposed to HSV-1 for 24 h. In a third set of experiments (column #3), conditioned medium (CM) obtained from H4 or MRC-5 cells grown in the presence of HSV-1 for 24 h was added to a fresh culture of H4 or MRC-5 cells 2 h prior to exposure to HSV-1 for 24 h. In each set of experiments, viral replication was stopped by freezing the cell suspension and relative viral replication quantitated by real-time PCR. Results were computed as the ratio of viral DNA relative to β -actin DNA and are shown relative to the first column which was arbitrarily set to 100%. Data are a combination of 3 - 6 independent experiments and are displayed as the mean \pm SEM. The *asterisks* (*) correspond to $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**), respectively. ns refers to statistically non-significant.

Effects of BACE-1 inhibitor and type 1 IFN neutralizing antibodies on CM-dependent inhibition of HSV-1 replication in H4 cells

Data shown above suggested that A β present in CM was, at least in part, responsible for the inhibitory effect on HSV-1 replication in *de novo* cultures of H4 cells. This possibility was investigated by generating CM from H4 cells cultured in the absence or presence of a BACE-1 inhibitor. When infected H4 cells were treated with BACE-1 inhibitor, CM did not inhibit HSV-1 replication in *de novo* cultures of H4 cells (column 2, Fig. 8A), in marked contrast with CM from infected cells not treated with BACE-1 (column

5, Fig 8A). Furthermore, exogenous addition of BACE-1 inhibitor to CM prior to *de novo* infection did not prevent inhibition by CM (columns #4 and #6, Fig. 8A). The bulk of these observations supported the interpretation that A β was the main component of CM responsible for inhibition of HSV-1 replication in the *de novo* cultures of H4 cells (Fig. 8A).

Type-1 IFN (IFN α and IFN β) have been reported to induce pro-inflammatory gene transcription and secretion of pro-inflammatory cytokines TNF α , IL-1 β and IL-6 [71]. Given the fact that these pro-inflammatory cytokines are produced by H4 cells, we asked whether type 1 IFN may be an additional factor in CM-associated inhibition of HSV-1 replication in *de novo* cultures of H4 cells exposed to HSV-1. Anti-IFN α or anti-IFN β neutralizing antibodies were then added to CM prior to addition to *de novo* cultures of H4 cells 2 h prior to challenge (24 h) with HSV-1. Results showed that anti-IFN α or anti-IFN β neutralizing antibodies did not prevent CM from inhibiting HSV-1 replication (Fig. 8B). BACE-1 inhibitor added to CM prior to assays did not prevent inhibition of HSV-1 replication (Fig. 8B), in further agreement with the suggested role of A β in these assays.

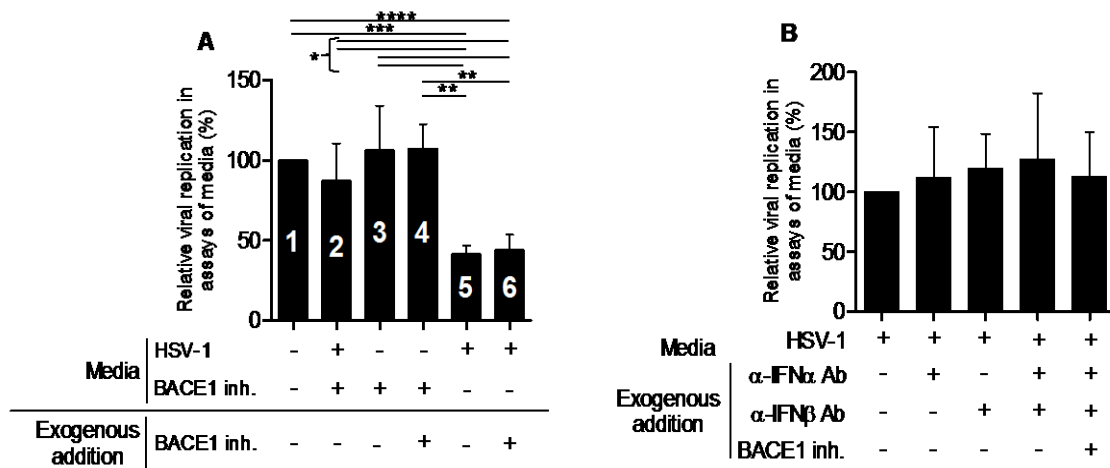


Fig. 8. Assays of media of H4 cells cultured under various conditions on HSV-1 replication in *de novo* cultures of H4 cells. A) Media were obtained from 24 h cultures of H4 cells grown in the presence/absence of HSV-1 or, in the simultaneous presence/absence of BACE-1 inhibitor, as indicated. Exogenous BACE-1 inhibitor was added to some samples prior to assays, as indicated (Exogenous addition). Media were individually assayed by addition to *de novo* cultures of H4 cells 2 h before challenge with HSV-1 for 24 h. Viral replication was quantitated by real-time PCR as in Figure 7. Data are a combination of 2 - 5 independent experiments performed in duplicate and are displayed as the mean \pm SEM. The asterisks (*) correspond to $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****). B) CM was obtained from 24 h cultures of H4 cells grown in the presence of HSV-1. Anti-type I IFN α (100 ng/ml), anti-type I IFN β (10 units/ml) neutralizing antibodies or BACE-1 inhibitor, were added to individual CM. These CM were assayed by addition to *de novo* cultures of H4 cells 2 h before challenge with HSV-1 for 24 h. Viral replication was quantitated by real-time PCR as in Figure 7. Data are a combination of 2 - 4 independent experiments performed in duplicate and are displayed as the mean \pm SEM. BACE-1 inh. refers to BACE-1 inhibitor.

DISCUSSION

Overproduction of A β by neurons and/or their decreased degradation and clearance by microglia lead to their accumulation and neurotoxic effects associated with AD [36,72]. Whether A β play a physiological role under normal healthy conditions remains to be established, although studies in animal models have suggested that A β may be involved in synaptic plasticity and memory [10,73]. Furthermore, a protective role for A β as antimicrobial peptides in *in vitro* assays is slowly emerging [55-57].

Neuroglioma H4 cells secreted A β 42 under basal conditions, in agreement with the fact that neurons are the major source of A β in the brain. Exposure of H4 cells to HSV-1 showed a steady increase in A β 42 production that was likely related to the viral load (Figs. 1A and 1B). These observations were in agreement with the recent reports that HSV-1 infection of neurons triggers APP processing in a rat model [74] and HSV-2 in human neuroblastoma cell cultures [75] and that HSV-1 infection causes cellular A β accumulation and secretase upregulation *in vitro* [76]. In contrast, H4 cells produced low levels of A β 40 even under challenge of HSV-1 (Figs. 1A and 1B). This result was unexpected given the fact that BACE-1 activity was detected under basal conditions and induced in cells infected with HSV-1 (Fig. 1C). U118-MG glioblastoma cells did not produce A β 40 and generated only low amounts of A β 42 even under conditions of HSV-1 infection (Fig. 1D). Further evidence that A β behaved as antimicrobial peptides and displayed anti-viral activity against HSV-1 infection *in vitro* [55] was obtained by growing H4 cells over an extended period of time in the absence or presence of a BACE-1 inhibitor. Results conclusively showed a robust replication of HSV-1 in cells cultured in the presence of BACE-1 inhibitor but inhibition of viral replication in its absence (Fig. 2A), suggesting that A β production was responsible for inhibition of HSV-1 replication. This interpretation was supported by the findings of time-related inhibition of A β 42 production in H4 cultures maintained in the presence of BACE-1 inhibitor but not in its absence (Fig. 2B). We investigated whether a coculture of H4 and U118-MG cells would yield observations similar to those of the individual cell lines. Unexpectedly, results showed that production of A β 40 was barely detectable under basal conditions or when HSV-1 was present, suggesting that contact between the two cell lines did not upregulate production of A β 40 (Fig. 3A). Furthermore,

levels of production of A β 42 were low under basal conditions and not upregulated in the presence of HSV-1 (Fig. 3A). These observations suggested that U118-MG cells had an inhibitory direct effect on A β 42-producing H4 cells or that U118-MG cells captured *de novo*-produced A β 42 due to their phagocytic properties, or both. Interpretation for the first possibility was considered unlikely on the basis of physiological considerations. For instance, microglial cells play a protective role in capture and degradation of A β under healthy homeostatic conditions, thus preventing undesired accumulation of A β and their neurotoxic effects [36,64]. It was therefore considered unlikely that the presence of U118-MG cells would prevent A β production by H4 cells. However, incubation of U118-MG cells with AlexaFluor 555-labeled A β 42 clearly showed that it was rapidly internalized, suggesting that this mechanism was responsible for the low levels of A β production in cocultures (Fig. 3B).

Neuroinflammation triggered by infection or other insults to the brain activate glial cells to secrete the pro-inflammatory cytokines TNF α , IL-1 β and IL-6 [35,77]. We investigated how the coculture model used here would behave in response to HSV-1 infection and the presence of exogenous A β with respect to pro-inflammatory cytokine production. Results clearly indicated that A β 42 alone or in combination with HSV-1 upregulated production of IL-1 β , TNF α and IFN α in the coculture model. These observations were in agreement with an expected behavior of glial cells in response to infection and A β 42 recognition which triggers a pro-inflammatory response involved in AD. Upregulation of type 1 interferons has been reported in post-mortem AD brains and in wild type cultures of neurons challenged with A β 42 [70]. Here, INF α was produced by H4 cells and cocultures under basal conditions (Fig. 6A). A β did not upregulate INF α production in H4 cells (Fig. 6B). This observation was in disagreement with that reported [70] and may be related to the use of a neuroglioma cell line as opposed to wild type neurons. Importantly, a combination of HSV-1 and A β stimulated INF α production (Fig. 6B) as reported in various other neuronal cell lines [78,79]. These data supported the interpretation that the modulation of this pro-inflammatory (TNF α , IL-1) and anti-viral (IFN α) response may contribute to the development of HSV-1 infection latency in humans at an immunoprivileged site but without any neuronal destruction. This inflammatory response may contribute to maintain latent HSV-1 infection [80].

We asked the question whether the anti-viral protective effect of A β [55] could be demonstrated using HSV-1-sensitive, A β -producing H4 cells. For obvious reasons, the coculture model could not be used because U118-MG cells rapidly internalized A β (Fig. 3B). CM from cultures of A β -producing H4 cells was harvested after 24 h, at a time point where HSV-1 replication was low (Fig. 2A). Results showed that CM inhibited HSV-1 replication in *de novo* cultures of H4 cells (Fig. 7). CM from HSV-1-sensitive fibroblast MRC-5 cells was prepared under similar conditions and assayed for inhibition of HSV-1 replication in *de novo* cultures. As expected, these CM did not show anti-viral activity in contrast to A β -producing H4 cells (Fig. 7A, column #3 and Fig. 8A, columns #5 and #6). The bulk of our findings strongly suggested that inhibition of HSV-1 replication in *de novo* cultures of HSV-1-infected H4 cells was due to the presence of A β produced by H4 cells (Fig. 1). Data in support of this interpretation were obtained by preparing CM from H4 cells under various conditions and assaying them in *de novo* cultures of H4 cells. Data clearly showed that inhibition of A β production due to the presence of BACE-1 inhibitor in the cultures used to prepare CM prevented this CM from inhibiting HSV-1 replication (Fig. 8A, column 2). In marked contrast, CM from BACE-1-free cultures significantly inhibited HSV-1 replication (Fig. 8A, column 5). However, the data did not exclude the possibility that type 1 IFN was involved in inhibition of HSV-1 replication. This possibility was investigated by adding anti-IFN α and/or anti-IFN β neutralizing antibodies to CM and then infecting *de novo* cultures with HSV-1. Results showed that the presence of these neutralizing antibodies did not prevent CM from inhibiting HSV-1 replication in *de novo* cultures (Fig. 8B), suggesting that extracellular type 1 IFN was not involved in inhibition of HSV-1 replication. However, our data did not formally exclude the possibility that intracellularly produced type I IFN could contribute to reduction of infectious virus production.

Although based on a minimal cellular model of cocultures of neuronal and glial cells, the bulk of our results supported our previous observations [55] and those of White *et al.* (2014) with respect to A β possessing anti-viral activity *in vitro* and, presumably, in the CNS. Production of A β may represent an initial attempt to set in motion a defensive brain response to curtail viral and, possibly, other aggressions. In this respect, it has been shown that infection by HSV-1 triggers the release of A β by human and rat neurons [81,82].

Therefore, our work further contributes to our understanding of the effect of HSV-1 on neuronal cells, and the induction of A β production. Furthermore, data presented here showed that A β production, even in cell cultures, is at sufficient levels to exert a beneficial anti-viral effect. Neurons bathe in much smaller volumes of extracellular medium in the brain and it is therefore likely that A β production provides effective protection. To the best of our knowledge, data presented here are the first to establish a link between neuronal A β production and its anti-viral role as a result of HSV-1 infection and, its putative role in AD pathogenesis. Furthermore, our results showed a sensitive regulatory interaction by microglia on A β production by neuronal cells, playing either protective or detrimental role for neuroinflammation/degeneration probably at different stages of the disease. Our observations may extend to protection against other inflammatory agents but this possibility needs further investigation. However, the negative facet of A β -dependent defence mechanism is that sustained induction of A β production in the brain in the case of frequent reactivation of HSV-1, may overwhelm A β clearance and that would be detrimental to brain function. This situation becomes particularly critical with aging as microglia becomes less efficient at eliminating viruses and A β [83]. A β overproduction and deposit in amyloid plaques triggers a state of inflammation that is associated with neuronal loss and region-specific destruction of the aging brain and progressive development of AD.

Taking into account the putative novel role of A β as antimicrobial peptides in the CNS, a model can be suggested to summarize AD pathophysiology in relationship to viral infection by members of the *Herpesviridae* family and influenza and, other microbial infections of the brain. According to a working model (Fig. 9), A β are normally produced by neurons under homeostatic conditions at a rate required to fulfill their physiological functions in maintaining synaptic plasticity and memory [73], as well as antimicrobial protection. A balance between A β production and regulation against overproduction by microglia-dependent phagocytosis would maintain a homeostatic condition (Fig. 9, physiological state). However, in cases of brain trauma such as infections, hypoxia at birth, metabolic defects, misfolded proteins and other insults, a protective mechanism would be triggered that would involve increased A β production. Neuron infection by members of the *Herpesviridae* family is a condition that affects over 90% of the world's population at least in its latent, asymptomatic, form. HSV-1 reactivation under conditions of weakened

immune response or stress [84] would trigger increased A β production that would then induce microglia activation and release of pro-inflammatory cytokines (Fig. 9, pathological state) on an individual basis. Pro-inflammatory cytokines would act as paracrine mediators, sustaining microglia and astrocytic activation [83] and initiating a vicious circle of inflammatory responses. In addition, pro-inflammatory cytokines could cross the blood brain barrier, initiating systemic inflammation [31,66]. Overproduction and accumulation of A β would interfere with their homeostatic physiological functions, would induce damage to neurons to which A β oligomers will associate in a fibrillar form and would generate senile plaques. Recurrence of this series of events during a life time would obviously result in amplification and irreversible damage to specific regions of the brain, namely the hippocampus and temporal lobes which have been reported to be a region of HSV-1 location [44] and a major site of injury in AD.

In conclusion, our data have clearly shown that A β production by a model of neurons was triggered by HSV infection. It is conceivable that A β production could be harmful under situations of frequent reactivation of HSV-1 in the brain throughout life. Repeated reinfections and subsequent elevated production of A β are involved in microglia and astrocytic activation which are deleterious for the brain. Our data reinforce the recent thinking that A β may be beneficial and not simply a by-product in the pathogenesis of AD. It may be suggested that therapeutic agents should target the aggressors that induce A β production such as HSV-1 infection rather than A β because of its frequent detection in the brains of AD patients.

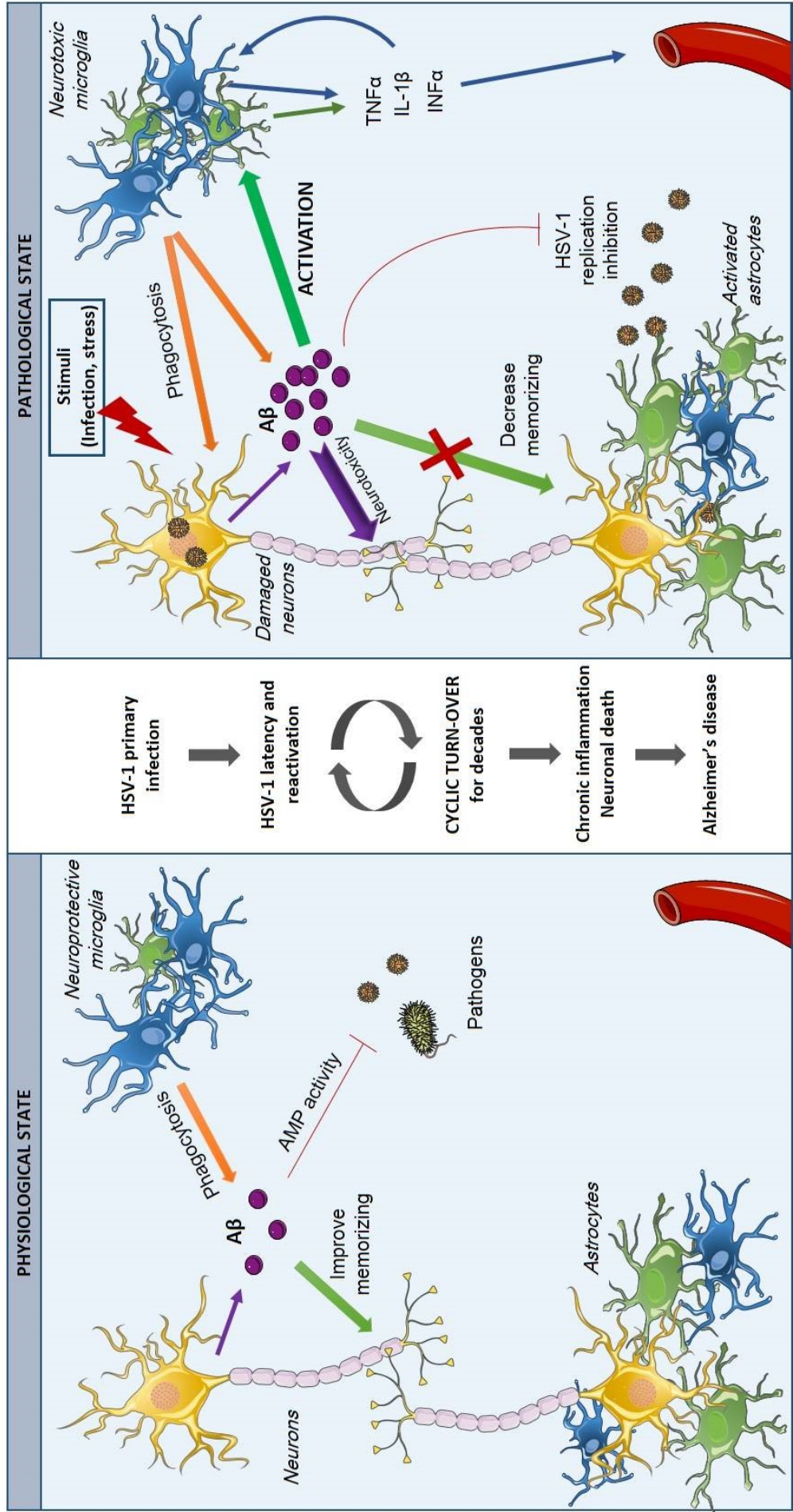


Fig. 9. Model depicting the influence of A β in response to infection in brain inflammation and AD. A β are normally produced by neurons under homeostatic conditions to fulfill their physiological functions in maintaining synaptic plasticity and memory and, antimicrobial protection. A balance between A β production and clearance is regulated by microglia-dependent phagocytosis (physiological state). Brain trauma such as infections and other insults would trigger a protective mechanism involving A β production. For instance, HSV reactivation would trigger increased A β production, activation of microglia and release of pro-inflammatory cytokines (pathological state) that would sustain microglia activation and initiate a vicious circle of inflammatory responses. In addition, pro-inflammatory cytokines can cross the blood brain barrier, initiating systemic inflammation. Overproduction and accumulation of A β would interfere with their physiological functions, induce damages to neurons to which A β oligomers will associate in a fibrillar form and generate senile plaques. Recurrence of this series of events during life would result in amplification and irreversible damages to specific regions of the brain, namely the hippocampus which is a region of HSV-1 location and a major site of injury in AD. Cells and pathogens pictures are adapted from Servier Medical Art.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (No. 106634), the Université de Sherbrooke, the Société des Médecins de l'Université de Sherbrooke (SMUS) and the Research Center on Aging.

REFERENCES

- [1] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E (2011) Alzheimer's disease. *Lancet* **377**, 1019 - 1031.
- [2] Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer disease. *Dis Mon* **56**, 484 - 546.
- [3] Tam JHK, Pasternak SH (2012) Amyloid and Alzheimer's disease: Inside and Out. *Can J Neuro Sci* **9**, 286 - 298.
- [4] WHO report (2013) Dementia: a public health priority. 11 April 2013.
- [5] Kern A, Behl C (2009) The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta* **10**, 1124 - 1132.
- [6] Karran E, Mercken M, De Strooper B (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Rev Drug Discov* **10**, 698 - 712.
- [7] Seeman P, Seeman N (2011) Alzheimer's disease: β -amyloid plaque formation in human brain. *Synapse* **65**, 1289 - 1297.
- [8] Claeysen S, Cochet M, Donneger R, Dumuis A, Bockaert J, Giannoni P (2012) Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay. *Cell Signal* **24**, 1831 - 1840.

- [9] LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007) Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Rev Neurosci* **8**, 499 - 509.
- [10] Pearson HA, Peers C (2006) Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol* **575**, 5 - 10.
- [11] Rivest S (2009) Regulation of innate immune responses in the brain. *Nature Rev Immunol* **9**, 429 - 439.
- [12] Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, Hooli B, Choi SH, Hyman BT, Tanzi RE (2013) Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* **78**, 631 - 643.
- [13] Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim S (2014) The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* **9**, 535 - 551.
- [14] Wang S, He F, Wang Y (2015) Association between polymorphisms of the insulin-degrading enzyme gene and late-onset Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* **28**, 94 - 108.
- [15] De la Monte SM, Tong M (2014) Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **88**, 548 - 559.
- [16] Morgen K, Frölich L (2015) The metabolism hypothesis of Alzheimer's disease: from the concept of central insulin resistance and associated consequences to insulin therapy. *J Neural Transm* **122**, 499 - 504.
- [17] Baglio F, Saresella M, Preti MG, Cabinio M, Griffanti L, Marventano I, Piancone F, Calabrese E, Nemni R, Clerici M (2013) Neuroinflammation and brain functional disconnection in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **5**, 8.
- [18] Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Fariás GA, Maccioni RB (2014) Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci* **8**.
- [19] Zhang F, Jiang L (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* **11**, 243 - 256.
- [20] Armstrong RA (2013) What causes Alzheimer's disease? *Folia Neuropathol* **51**, 169 - 188.
- [21] De Chiara G, Marcocci ME, Sgarbanti R, Civitelli L, Ripoli C, Piacentini R, Garaci E, Grassi C, Palamara AT (2012) Infectious Agents and Neurodegeneration. *Mol Neurobiol* **46**, 614-638.
- [22] Miklossy J (2011) Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med* **13**.
- [23] Fulop T, Lacombe G, Cunnane S, Le Page A, Dupuis G, Frost EH, Bourgade-Navarro K, Goldeck D, Larbi A, Pawelec G (2013) Elusive Alzheimer's disease: can immune signatures help our understanding of this challenging disease? Part 1: clinical and historical background. *Discov Med* **15**, 23 - 32.
- [24] Reitz C, Mayeux R (2014) Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* **88**, 640 - 651.
- [25] Bekris LM, Galloway NM, Millard S, Lockhart D, Li G, Galasko DR, Farlow MR, Clark CM, Quinn JF, Kaye JA, Schellenberg GD, Leverenz JB, Seubert P, Tsuang DW, Peskind ER, Yu CE (2010) Amyloid precursor protein (APP) processing genes and cerebrospinal fluid APP cleavage product levels in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **32**, 13 - 23.

- [26] Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* **908**, 244 - 254.
- [27] Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, Schipper HM, Derhovanessian E, Goldeck D, Fulop T (2009) Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **17**, 91 - 103.
- [28] Larbi A, Fortin C, Dupuis G, Berrougui H, Khalil A, Fulop T (2014) Immunomodulatory role of high-density lipoproteins: impact on immunosenescence. *Age* **36**.
- [29] Streit WJ, Xue QS (2014) Human CNS immune senescence and neurodegeneration. *Curr Opin Immunol* **29**, 93 - 96.
- [30] Cai Z, Hussain MD, Yan LJ (2014) Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* **124**, 307-321.
- [31] Le Page A, Bourgade K, Lamoureux J, Frost E, Pawelec G, Larbi A, Witkowski JM, Dupuis G, Fülöp T (2015) NK Cells are Activated in Amnesic Mild Cognitive Impairment but not in Mild Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis* **46**, 93-107.
- [32] Takeda S, Sato N, Morishita R (2014) Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Front Aging Neurosci* **6**, 171.
- [33] Zhang R, Miller RG, Madison C, Jin X, Honrada R, Harris W, Katz J, Forshe DA, McGrath MS (2013) Systemic immune system alterations in early stages of Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* **256**, 38 - 42.
- [34] Angelova PR, Abramov AY (2014) Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of A β -induced neurotoxicity. *Biochem Soc Trans* **42**, 1286 - 1290.
- [35] Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* **140**, 918 - 934.
- [36] Doens D, Fernández PL (2014) Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation* **11**, 48.
- [37] Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012) The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* **15**, 349 - 357.
- [38] Armstrong RA (2014) A critical analysis of the 'amyloid cascade hypothesis'. *Folia Neuropathol* **52**, 211-225.
- [39] Castello MA, Soriano S (2014) On the origin of Alzheimer's disease. Trials and tribulations of the amyloid hypothesis. *Ageing Res Rev* **13**, 10 - 12.
- [40] Morris GP, Clark IA, Vissel B (2014) Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* **2**, 135.
- [41] Reitz C (2012) Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int J Alzheimers Dis*.
- [42] Sorrentino P, Iuliano A, Polverino A, Jacini F, Sorrentino G (2014) The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. *FEBS Lett* **588**, 641 - 652.
- [43] Piacentini R, De Chiara G, Li Puma DD, Ripoli C, Marcocci ME, Garaci E, Palamara AT, Grassi C (2014) HSV-1 and Alzheimer's disease: more than a hypothesis. *Front Pharmacol*, **5**, 97.
- [44] Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF (2009) Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol* **217**, 131 - 138.

- [45] Letenneur L, Pérès K, Fleury H, Garrigue I, Barberger-Gateau P, Helmer C, Orgogozo JM, Gauthier S, Dartigues JF (2008) Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *PLoS One* **3**, e3637.
- [46] Lin WR, Wozniak MA, Cooper RJ, Wilcock GK, Itzhaki RF (2002) Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J Pathol* **197**, 395 - 402.
- [47] Steiner I, Benninger F (2013) Update on herpes virus infections of the nervous system. *Curr Neurol Neurosci Rep* **13**, 414.
- [48] Beffert U, Bertrand P, Champagne D, Gauthier S, Poirier J (1998) HSV-1 in brain and risk of Alzheimer disease. *Lancet* **351**, 1330-1331.
- [49] Itzhaki RF, Lin WR, Dhang D, Wilcock GK, Fragher B, Jamieson GA (1997) Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 241-247.
- [50] Held K, Derfuss T (2011) Control of HSV-1 latency in human trigeminal ganglia--current overview. *J Neurovirol* **17**, 518 - 527.
- [51] Itzhaki RF, Wozniak MA (2006) Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: a dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. *Prog Lipid Res* **45**, 73 - 90.
- [52] Denaro FJ, Staub P, Colmer J, Freed DM (2003) Coexistence of Alzheimer disease neuropathology with herpes simplex encephalitis. *Cell Mol Biol* **49**, 1233 - 1240.
- [53] Féart C, Helmer C, Fleury H, Béjot Y, Ritchie K, Amouyel P, Schraen-Maschke S, Buée L, Lambert JC, Letenneur L, Dartigues JF (2011) Association between IgM anti-herpes simplex virus and plasma amyloid-beta levels. *PLoS One* **6**, e29480.
- [54] Mancuso R, Baglio F, Agostini S, Cabinio M, Laganà MM, Hernis A, Margaritella N, Guerini FR, Zanzottera M, Nemni R, Clerici M (2014) Relationship between herpes simplex virus-1-specific antibody titers and cortical brain damage in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Front Aging Neurosci* **6**, 285.
- [55] Bourgade K, Garneau H, Giroux G, Le Page AY, Bocti C, Dupuis G, Frost EH, Fülöp T Jr (2015) β -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1. *Biogerontology* **16**, 85 - 98.
- [56] White MR, Kandel R, Tripathi S, Condon D, Qi L, Taubenberger J, Hartshorn KL (2014) Alzheimer's associated β -amyloid protein inhibits influenza A virus and modulates viral interactions with phagocytes. *PLoS One* **9**, e101364.
- [57] Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* **5**, e9505.
- [58] Arispe N, Diaz JC, Simakova O (2007) $A\beta$ ion channel. Prospects for treating Alzheimer's disease with $A\beta$ channel blockers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1768**, 1952-1965.
- [59] Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J (2006) Different conformations of Amyloid β induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neuroscience* **26**, 6011-6018.
- [60] Reyes Barcelo AA, Gonzalez-Velasquez FJ, Moss MA (2009) Soluble aggregates of the amyloid- β peptide are trapped by serum albumin to enhance amyloid- β activation of endothelial cells. *J Biol Engineering* **3**, 5.
- [61] Lue LF, kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth J, Rydel RE, Rogers J (1999) Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **3**, 853-862.

- [62] Vingataramin L, Frost EH (2015) A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. *Biotechniques* **58**, 120 - 125.
- [63] Williams TL, Serpell LC (2011) Membrane and surface interactions of Alzheimer's A β peptide--insights into the mechanism of cytotoxicity. *FEBS J* **278**, 3905 - 3917.
- [64] Lee CY, Landreth GE (2010) The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* **117**, 949 - 960.
- [65] Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **4**, 388 - 405.
- [66] Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM (2012) A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*.
- [67] Zhang F, Jiang L (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* **11**, 243 - 256.
- [68] Lee KS, Chung JH, Choi TK, Suh SY, Oh BH, Hong CH (2009) Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **28**, 281 - 287.
- [69] McGeer E, McGeer P (1997) Inflammatory cytokines in the CNS. *CNS Drugs* **7**, 214 - 287.
- [70] Taylor JM, Minter MR, Newman AG, Zhang M, Adlard PA, Crack PJ (2014) Type-1 interferon signaling mediates neuro-inflammatory events in models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **35**, 1012 - 1023.
- [71] de Weerd NA, Nguyen T (2012) The interferons and their receptors - distribution and regulation. *Immunol Cell Biol* **90**, 483 - 491.
- [72] Yu Y, Ye RD (2015) Microglial A β receptors in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol* **35**, 71 - 83.
- [73] Puzzo D, Arancio O (2013) Amyloid- β peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimers Dis* **33**, S111-S120.
- [74] Civitelli L, Marcocci ME, Celestino I, Piacentini R, Garaci E, Grassi C, De Chiara G, Palamara AT (2015) Herpes simplex virus type 1 infection in neurons leads to production and nuclear localization of APP intracellular domain (AICD): implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurovirol* April 30. [Epub ahead of print].
- [75] Kristen H, Santana S, Sastre I, Recuero M, Bullido MJ, Aldudo J (2015) Herpes simplex virus type 2 infection induces AD-like neurodegeneration markers in human neuroblastoma cells. *Neurobiol Aging*. June 18.
- [76] Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, Dobson CB (2007) Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett* **429**, 95 - 100.
- [77] Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT (2010) Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* **33**, 1539 - 1556.
- [78] Gianni T, Leoni V, Campadelli-Fiume G (2013) Type I Interferon and NF- κ B Activation Elicited by Herpes Simplex Virus gH/gL via α v β 3 Integrin in Epithelial and Neuronal Cell Lines. *J Virol* **87**, 13911 - 13916.

- [79] Préhaud C, Mégret F, Lafage M, Lafon M (2005) Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol* **79**, 12893 - 12904.
- [80] Theil D, Derfuss T, Paripovic I, Herberger S, Meinl E, Schueler O, Strupp M, Arbusow V, Brandt T (2003) Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* **163**, 2179 - 2184.
- [81] De Chiara G, Marcocci ME, Civitelli L, Argnani R, Piacentini R, Ripoli C, Manservigi R, Grassi C, Garaci E, Palamara AT (2010) APP processing induced by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) yields several APP fragments in human and rat neuronal cells. *PLoS One* **5**, e13989.
- [82] Piacentini R, Civitelli L, Ripoli C, Marcocci ME, De Chiara G, Garaci E, Azzena GB, Palamara AT, Grassi C (2011) HSV-1 promotes Ca²⁺-mediated APP phosphorylation and A β accumulation in rat cortical neurons. *Neurobiol Aging* **32**, e13 - e26.
- [83] Solito E, Sastre M (2012) Microglia function in Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* **3**, 14.
- [84] Nicoll MP, Proença JT, Efstathiou S (2012) The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 684 - 705.

OBJECTIF 3

Le but de ce troisième objectif était d'obtenir des données afin de mettre en évidence le mécanisme de l'action antivirale des peptides A β contre les virus HSV-1, en particulier et les virus enveloppés en général. Nos observations décrites dans les chapitres précédents avaient établi que les peptides A β interagissaient avec HSV-1. Cependant, plus de détails moléculaires étaient nécessaires pour obtenir des données sur le mécanisme impliqué. Nous avons suggéré qu'un mécanisme d'action des peptides A β consistait en leur insertion dans l'enveloppe virale, perturbant ainsi son intégrité et donc son pouvoir infectieux. Une des conséquences de ce mode d'action pourrait alors être une interférence avec les étapes de fusion avec les cellules cibles au niveau des radeaux lipidiques. Afin d'obtenir des données sur l'interaction peptides A β /HSV-1, nous avons mis à profit le fait que nous disposions d'un virus HSV-1 dont la glycoprotéine B (gB) est fusionnée à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) et de peptides A β fluorescents. Des expériences de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), ont été réalisées dans le contexte de cet objectif. L'intérêt d'utiliser le FRET pour ces expériences était que le transfert de fluorescence d'un fluorochrome donneur à un fluorochrome accepteur avait lieu, on pourrait conclure que les deux molécules étaient localisées à une distance inférieure ou égale à 10 nm (Broussard *et al.*, 2013).

I. Matériel et méthodes

Interaction entre HSV-1-GFP et A β 42-HiLyteFluor-555 par expériences de FRET

Des virus HSV-1 exprimant la protéine gB-GFP ont été obtenus du Pr. Flore Rozenberg (Institut Cochin, Paris, France). Ses travaux (Potel *et al.*, 2002) ont montré que la fonctionnalité du virus demeure intacte. Les expériences de FRET ont été réalisées à l'aide du lecteur de plaque PCR LightCycler 480 (Roche Diagnostic Canada, Laval, QC). Le virus HSV-1 exprimant gB-GFP a été mis en présence du peptide A β 42-HiLyteFluor-555 (Anaspec, Fremont, CA) suite ou non à différents prétraitements, en absence de cellules. Le

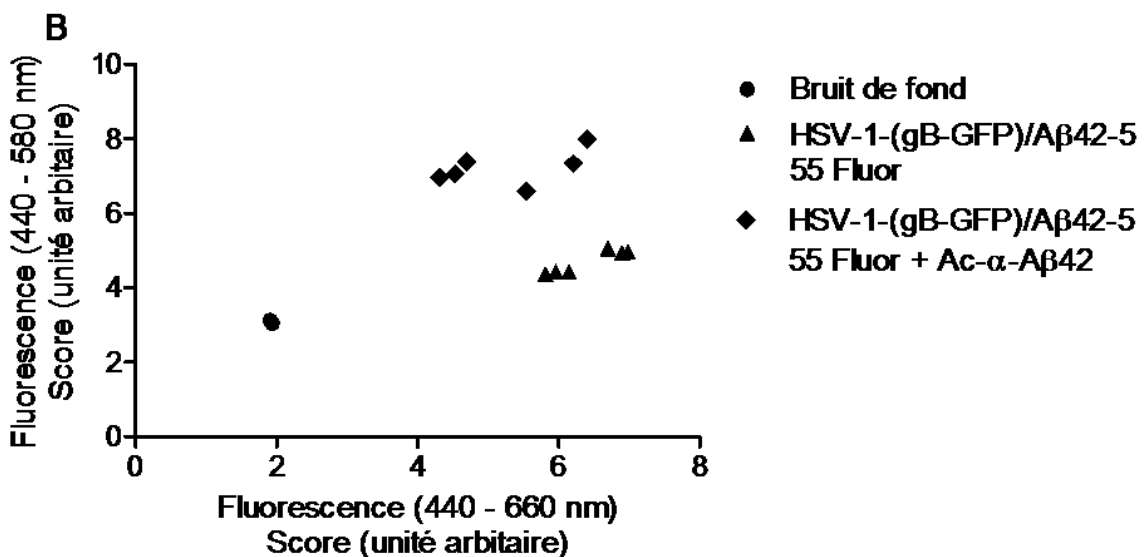
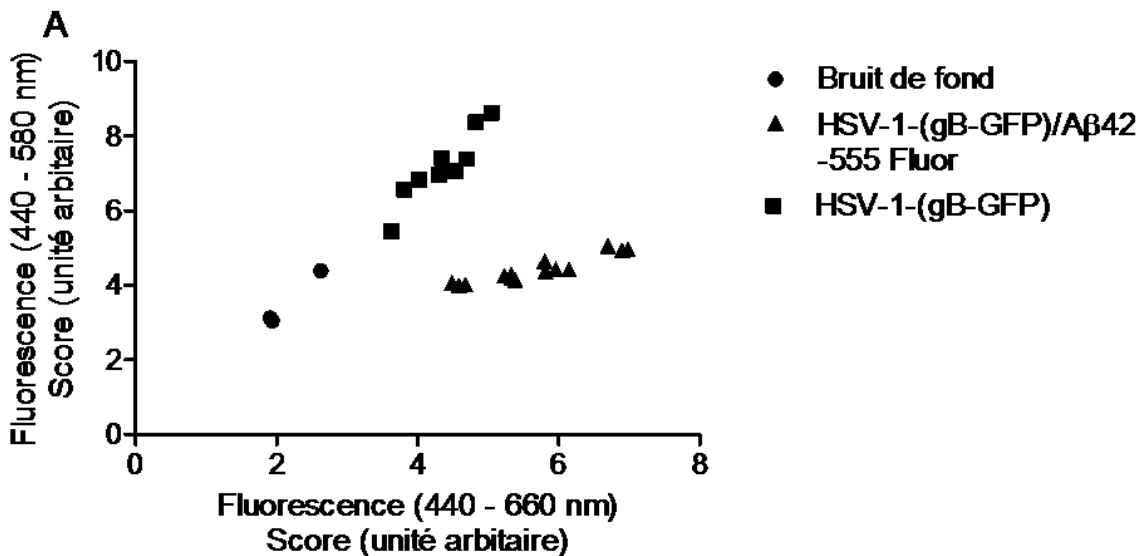
virus HSV-1 a été traité avec du NP40 pendant 30 min, à température ambiante, dans le but de désorganiser l'enveloppe virale. Dans d'autres expériences, le peptide A β 42-*HiLyteFluor-555*, a été mis en présence d'un anticorps anti-A β 42 (Anaspec, Fremont, CA) pendant 15 min, à température ambiante. Suite à ces traitements, le milieu de culture (bruit de fond), les virus HSV-1-(gB-GFP) et/ou le peptide A β 42-*HiLyteFluor-555* prétraité ou non, ont été placés dans les puits d'une plaque 96 puits. La plaque a été scellée et centrifugée pendant 3 min à 4000 rpm et à température ambiante. Les conditions du thermocycler étaient : 5 min de chauffage à 37°C, puis lecture de la fluorescence émise toutes les 10 min pendant 30 min. Les canaux sélectionnés (440 - 580 nm/440 - 660 nm) permettaient de mesurer la fluorescence émise par la GFP et le fluorochrome *HiLyteFluor 555* en excitant seulement la GFP. A la fin de la mesure, le logiciel fournit un ratio de l'intensité de fluorescence mesurée par chaque couple de canaux dans chaque puits, ce qui permet d'obtenir une valeur unique pour chaque puits dans le but d'établir un graphique.

II. Résultats

La fluorescence émise par la protéine gB-GFP du virus HSV-1 excite le fluorochrome HiLyteFluor-555 associé aux peptides A β 42.

L'intensité de fluorescence dans chaque expérience est représentée par un ratio entre les valeurs individuelles données par chacun des deux canaux de collection (440 - 580 nm et 440 - 660 nm). Ce ratio est exprimé en unité arbitraire (U.A.). Les cercles correspondent aux valeurs associées à la fluorescence émise par le milieu de culture (bruit de fond) (Fig. 1A, B et C) et leurs ratios donnent une moyenne de $3,08 \pm 0,75$ U.A. Les données montrent que la fluorescence émise par le fluorochrome de la gB-GFP (carrés) est significativement ($p < 0.0001$) différente de celle émise par le mix HSV-1-(gB-GFP)/A β 42-*HiLyteFluor-555* (triangles) (Fig. 1A). Les moyennes pour ces conditions sont, $7,18 \pm 0,94$ U.A. et $4,41 \pm 0,35$ U.A, respectivement ($n = 3 - 5$ en triplicata). Le même type de résultats a été obtenu dans les expériences représentées par les graphiques 1B et 1C. L'intensité de fluorescence relative mesurée dans le cas du mix HSV-1-(gB-GFP)/A β 42-*HiLyteFluor-555* (triangles)

donne un ratio moyen de $4,41 \pm 0,35$ U.A., tandis que celle mesurée suite aux prétraitements avec l'anticorps α -A β 42 (B, losanges) ou le NP-40 (C, étoiles), donnent des ratios moyens de $7,22 \pm 0,47$ U.A. et $6,21 \pm 1,13$ U.A., respectivement. Les ratios de l'intensité de fluorescence relative mesurée suite aux prétraitements (anticorps α -A β 42 ou NP-40) sont semblables à ceux mesurés dans le cas de la gB-GFP et correspondent à une absence de phénomène de FRET. Ces observations suggèrent que les prétraitements (anticorps α -A β 42 ou NP-40) interfèrent avec l'interaction HSV-1/A β 42. La différence de fluorescence mesurée dans les cas des mix HSV-1-(gB-GFP)/A β 42-*HiLyteFluor*-555 (triangles) (valeur arbitraire significativement plus faible), implique que le phénomène de transfert d'énergie entre la gB-GFP et l'*HiLyteFluor*-555 a eu lieu. Les résultats correspondent à des triplicatas de 2 à 5 expériences indépendantes.



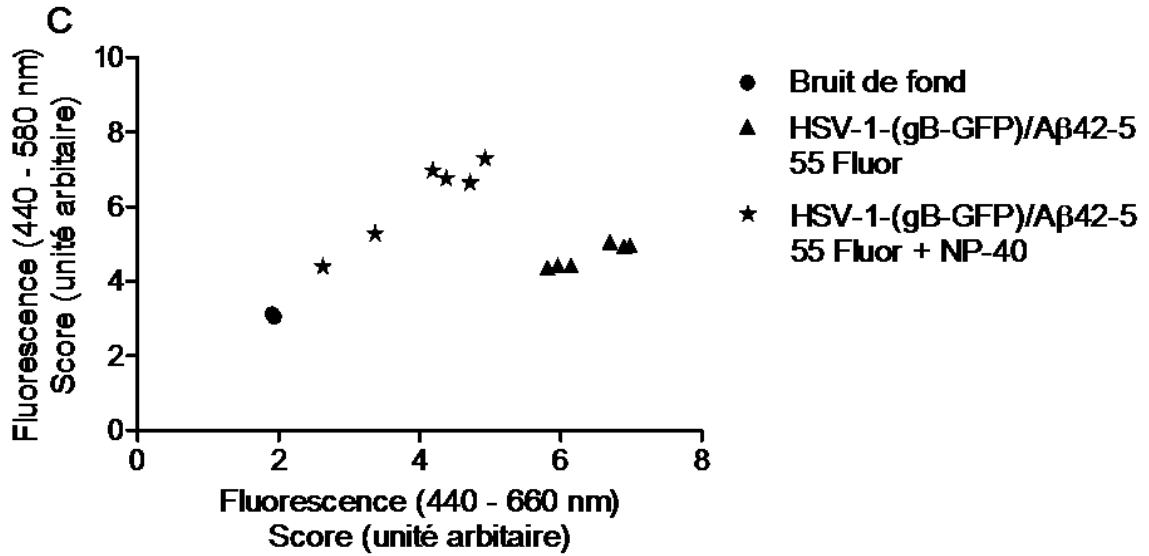


Fig. 1. Transfert d'énergie entre HSV-1-(gB-GFP) et Aβ42-*HiLyteFluor-555*. Représentation de l'intensité de fluorescence relative émise par le virus HSV-1-(gB-GFP) (carrés) et le peptide Aβ42-*HiLyteFluor-555* lors d'expériences de FRET. Chaque graphique (A, B et C) représente les résultats de la mesure du bruit de fond (cercles) et du mix HSV-1-(gB-GFP)/Aβ42-*HiLyteFluor-555* (triangles). Le graphique B (losanges) représente les mesures de l'intensité de fluorescence relative suite au traitement du peptide Aβ42-*HiLyteFluor-555* par des anticorps anti-Aβ42 (α -Aβ42), tandis que le graphique C (étoiles) représente les mesures de l'intensité de fluorescence relative suite au traitement du virus HSV-1-(gB-GFP) par le NP-40. Les valeurs associées aux intensités relatives de fluorescence correspondent au ratio entre l'intensité de fluorescence mesurée par les deux couples de canaux (440 - 580 nm/440 - 660 nm). n = 2 – 5 en triplicata.

III. Discussion

Les expériences de FRET effectuées dans le cadre de cette étude avaient pour but de déterminer le mécanisme d'action des peptides A β contre les virus HSV-1. L'objectif était de vérifier l'hypothèse émise dans la section Introduction, laquelle proposait que les peptides A β s'insèrent dans l'enveloppe externe des virus enveloppés de la même manière que le peptide LL-37. Le LL-37 est un peptide en hélice α qui s'insère dans les membranes lipidiques et forme des pores, délétères pour l'intégrité de la membrane et donc de l'organisme ou de la cellule ciblée (Kai-Larsen et Agerberth, 2008 ; Turner *et al.*, 1998). Le peptide A β 42 est également de forme hélice α et des études sur membranes cellulaires ou bactériennes ont montré qu'il était également capable de s'insérer dans les bicouches lipidiques (Lemkul et Bevan, 2013 ; Kagan *et al.*, 2012).

Les résultats ont montré que l'énergie résultant de l'excitation de la GFP associée à la gB du virus HSV-1 est transmise au fluorochrome *HiLyteFluor-555* associé au peptide A β 42 puisque c'est l'émission de ce peptide qui a été mesurée dans l'expérience. Cette donnée nous permettait de conclure que le phénomène de FRET a eu lieu entre les deux fluorochromes, signifiant qu'ils se trouvent à une distance inférieure ou égale à 10 nm (Broussard *et al.*, 2013). Cette conclusion est également permise puisque nous savons qu'un virion d'HSV-1 mesure environ 100 nm de diamètre et que donc le peptide A β 42 ne doit pas seulement être près du virion pour que le FRET se fasse, mais dans l'enveloppe externe. Nous pouvons donc conclure que le peptide A β 42 s'insère dans la membrane externe du virus, à proximité des gB. L'utilisation d'anticorps dirigés contre le peptide A β 42 empêchant la liaison du peptide à la membrane et la déstabilisation de la membrane virale par le détergent NP-40 comme expériences contrôles, ont montré une absence de phénomène de FRET, ce qui confirme la conclusion d'une insertion peptidique dans la membrane virale.

DISCUSSION

La surproduction de peptides A β par les neurones et/ou la diminution de leur dégradation et clairance par la microglie, mène à leur accumulation et à des effets neurotoxiques associés à la MA (Doens *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2015). Le rôle physiologique des peptides A β en conditions normales demeure mal connu, mais des publications sur des modèles animaux ont suggéré que les peptides A β sont impliqués dans la plasticité synaptique et la potentialisation de la mémoire (Pearson *et al.*, 2006 ; Puzzo *et al.*, 2013). Un rôle protecteur des peptides A β en tant qu'AMP émerge également de plusieurs études (Soscia *et al.*, 2010 ; White *et al.*, 2014). Les travaux décrits dans cette thèse (Bourgade *et al.*, 2015) montrent que les peptides A β 40 et A β 42 possèdent une activité protectrice contre les infections par les virus HSV-1 associés à la MA, *in vitro*.

Dans le premier article décrit dans cette thèse, nous avons montré que l'effet protecteur des peptides A β dépend de l'ordre d'ajout dans le milieu de culture (Figs. 1, 2 et 3). Les expériences avec les peptides *scrambled* ont permis de montrer que la structure primaire de la protéine est importante pour ce rôle. L'observation que le rôle favorable des peptides A β est relié à leur séquence d'addition aux milieux de culture suggère que leur effet précède l'entrée des virus HSV-1 dans les cellules ou qu'ils interfèrent avec la machinerie de fusion entre la membrane virale et la membrane de la cellule hôte, ou les deux. En outre, les peptides A β sont inefficaces contre les infections virales lorsqu'ils sont ajoutés aux milieux après que les virus aient eu le temps d'entrer dans les cellules. En revanche, les peptides A β n'ont aucun effet contre les infections virales par l'Adénovirus HAd5, quelle que soit leur séquence d'addition aux cellules (Figs. 4 et 5 du premier article). Ces données suggèrent que les peptides A β 40 et A β 42 possèdent des propriétés antivirales qui semblent dépendantes de la présence d'une enveloppe virale et qu'ils agissent précocement dans les étapes d'infections virales.

Récemment, il a été montré dans la littérature que des infections de cellules neuronales humaines ou de rat par HSV-1 induisent le clivage d'APP *via* la voie amyloïdogénique (De Chiara *et al.*, 2010 ; Piacentini *et al.*, 2011). Nos observations rapportées ici enrichissent ces données en suggérant une explication pour laquelle les

cellules empruntent la voie amyloïdogénique en présence d'HSV-1 (et probablement aussi d'autres microorganismes neurotrophiques). Nous avons proposé que ce phénomène serait une partie d'un mécanisme immunitaire de défense ayant pour but de protéger le cerveau d'agressions pathogéniques. Cependant, ce mécanisme initialement efficace, avec le temps, domine dans le cerveau où HSV-1 se réactive quand il quitte son état de latence. Cette situation induit un clivage amyloïdogénique maintenu de l'APP au cours de la vie, lequel va ultimement mener à un dépôt insoluble d'A β dans le cerveau, en particulier lorsque la clairance d'A β par la microglie est déficiente (dans les cas d'immunosénescence par exemple) (Larbi *et al.*, 2009 ; Streits *et al.*, 2014). En outre, d'autres systèmes de défenses innées ont été décrits comme ayant des effets délétères potentiels, de ce fait A β peut être ajouté à cette liste. Il s'agit par exemple de l'activation des cellules microgliales *via* les LPS ou le TNF qui sera toxique pour les neurones et les oligodendrocytes dans le cerveau, de la fièvre ou même de l'activation de la cascade du complément (Blais et Rivest, 2003 ; Lee *et al.*, 2012 ; Carty *et al.*, 2014). Le comportement des peptides A β en tant que peptides antimicrobiens (AMP) est semblable à celui d'une défensine humaine connue, de la classe des cathélicidines, le LL-37. Cet AMP est sécrété par les cellules immunes telles que les neutrophiles en réponse aux attaques microbiennes (Turner *et al.*, 1998) et est capable de s'insérer par lui-même dans les membranes et de les lyser (Burton *et al.*, 2009) mais cible préférentiellement les membranes microbiennes. Par exemple, en absence de pathogènes, le LL-37 peut lyser les membranes plasmiques eucaryotes (Bowdish *et al.*, 2005). Dans la présente étude, le LL-37 inhibe fortement la réplication d'HSV-1 dans les cellules MRC-5, indépendamment de sa séquence d'addition dans la culture cellulaire (Fig. 6 du premier article). Ces observations contrastent avec le comportement des peptides A β en tant qu'AMP. Néanmoins, le résultat de l'action du LL-37 et des peptides A β contre la réplication d'HSV-1 est similaire, suggérant qu'A β peut représenter une défense naturelle contre les virus herpétiques. Cependant, l'activité AMP du LL-37 est nettement plus élevée que celle des peptides A β et indépendante du moment de l'infection par rapport à son adjonction au milieu de culture, suggérant des différences entre leurs mécanismes d'actions notamment puisque le LL-37 est capable d'entrer dans les cellules eucaryotes et d'attaquer les pathogènes intracellulaires, notamment les bactéries qui conservent leur membrane suite à leur entrée dans les cellules (Turner *et al.*, 1998).

La possibilité que les peptides A β possèdent des propriétés similaires a été investiguée dans les cellules MRC-5. La distribution de la fluorescence des peptides A β 42 marqués au FITC montre qu'en condition basale le peptide se localise principalement à la surface cellulaire (Fig. 6 du premier article). De plus, la présence des virus HSV-1 ne semble pas influencer la localisation des peptides A β 42. Ces données suggèrent fortement que les propriétés AMP des peptides A β 42 diffèrent de celles du LL-37 et également que les peptides A β 42 initient les effets antiviraux avant l'entrée d'HSV-1 dans les cellules. Les études utilisant des modèles membranaires (Jang *et al.*, 2013 ; Masters *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2012 ; Sciacca *et al.*, 2012), des neurones humains ou des fibroblastes murins (Jang *et al.*, 2010) ont montré que les peptides A β peuvent s'insérer dans les bicouches lipidiques et former des canaux ioniques toxiques qui déstabilisent la balance ionique cellulaire, de la même manière que le LL-37. De ce fait, nous avons testé la possibilité que ce mécanisme puisse expliquer l'activité antivirale des peptides A β . Si cette proposition s'était avérée exacte, l'incubation des cellules MRC-5 avec des peptides A β aurait dû altérer la viabilité cellulaire et induire une inhibition de la réplication virale. Les données ont montré que cette possibilité n'était pas une explication des résultats dans nos conditions expérimentales de base. Premièrement, les peptides A β n'induisent pas de mort cellulaire rapide (moins de 24 h) comme démontré avec le test au Bleu de Trypan. De surcroît, les peptides A β agissent très tôt dans le cycle de réplication virale puisqu'on a observé qu'ils n'avaient pas d'effets s'ils sont rajoutés 2 h après l'infection. Nous avons également observé qu'ils empêchent l'association des cellules MRC-5 et des virus HSV-1, ainsi que des données montrant que ces effets sont causés par une interaction des peptides A β avec le virus plutôt qu'avec les cellules suite à de simples expériences de lavages. En effet, les lavages des cellules MRC-5 qui ont été exposées aux peptides A β révèlent que dans ces conditions expérimentales, la réplication d'HSV-1 n'était pas différente par rapport aux conditions contrôles où les peptides A β étaient absents (Fig. 8 du premier article). Ces observations suggèrent que les peptides A β n'interfèrent pas avec l'intégrité de la membrane plasmique cellulaire et que leurs propriétés AMP sont généralement dues à leurs interactions avec HSV-1. Ces possibilités ont également été testées dans un système acellulaire, basé sur un essai de détection de fluorescence. L'exposition de billes liées à des anticorps à une solution de peptides A β 42 et d'HSV-1 montre que les complexes immuns retiennent une quantité

significativement plus grande de peptides A β 42 fluorescents qu'en absence d'anticorps anti-gB (Fig. 9 du premier article). Cette observation suggère que les peptides A β interagissent directement avec le virus HSV-1.

Suite à l'ensemble de ces observations, nous avons proposé que l'activité antivirale des peptides A β implique des interactions initiales avec l'enveloppe d'HSV-1 et ce, dans le milieu extracellulaire, résultant en une diminution de l'attachement et/ou de la fusion des virus avec les cellules hôtes (Tableau 1 du premier article). Cette interprétation est largement supportée par l'incapacité qu'ont les peptides A β d'interférer avec les virus non-enveloppés tels que l'HA5. Cette donnée supporte notre hypothèse selon laquelle les peptides A β s'insèrent dans la membrane de l'enveloppe externe des virus HSV-1 et que ceci affecte le processus de réplication. Des données provenant de Cribbs *et al.*, (2000) ont montré que la région proximale transmembranaire (position 713 – 763) de la protéine gB d'HSV-1 partage 67% d'homologie avec la partie C-terminale des peptides A β 42 (Fig. S2 du premier article). De plus, Cribbs *et al.*, (2000) ont montré que les deux séquences homologues donnent des peptides ayant des propriétés physiques similaires dans nombreux essais, notamment des tests d'agrégations et de cytotoxicité.

Dans le but de mieux caractériser le rôle AMP des peptides A β dans le cerveau suite à une infection par les virus HSV-1, nous avons mis au point un système de cocultures constitué de cellules de neuroblastomes (H4) et des cellules microgliales (U118-MG). Nos expériences ont montré que les cellules de neuroblastomes H4 sécrètent le peptide A β 42 en conditions basales, en accord avec le fait que les neurones sont la source majeure de peptides β -amyloïdes dans le cerveau. L'exposition des cellules H4 à HSV-1 induit une augmentation importante de la production d'A β 42, fortement reliée à la charge virale (Figs. 1A et 1B du second article). Ces observations sont en accord avec de récentes études qui ont montré que des infections neuronales par HSV-1 induisent le processing d'APP dans un modèle murin (Civitelli *et al.*, 2015), mais également que les infections par HSV-1 causent une accumulation d'A β cellulaire et une augmentation de la régulation des sécrétases *in vitro* (Wozniak *et al.*, 2007). En revanche, les cellules H4 produisent un niveau faible de peptide A β 40, même à la suite d'une infection par HSV-1 (Figs. 1A et 1B du second article). Ce résultat est surprenant, mais pas contradictoire puisqu'il est indépendant de l'activité de la sécrétase BACE-1 détectée en conditions basales et induite par l'infection

des cellules par HSV-1 (Fig. 1C du second article), puisque la production de forme 1-40 ou 1-42 dépend de l'activité du complexe γ -sécrétase et non de BACE1. De plus, nous avons observé que les peptides A β se comportaient comme des AMP et possédaient une activité antivirale contre HSV-1 *in vitro*, suite à des expériences de coculture de longue durée en absence ou présence d'un inhibiteur de BACE-1. Les résultats ont montré une forte réplication des virus HSV-1 dans les cultures cellulaires en présence des inhibiteurs de BACE-1 ainsi qu'une inhibition de la réplication virale en son absence (Fig. 2A). Ces observations suggèrent que la production de peptides A β est responsable de l'inhibition de la réplication des virus HSV-1. Cette interprétation est supportée par la mise en évidence d'une inhibition de la production d'A β 42 dans les cellules H4 en présence d'un inhibiteur de BACE-1, mais pas en son absence (Fig. 2B). Par la suite, nous avons investigué si une coculture de cellules H4 et U118-MG donnerait des résultats similaires aux lignées seules. Cependant, les résultats ont montré que la sécrétion de peptides A β 40 et A β 42 est à peine détectable en conditions basales ou même lorsque le virus HSV-1 est présent, suggérant que le contact entre les deux lignées cellulaires a un effet négatif sur la production des peptides (Fig. 3A). Ces observations suggèrent que les cellules gliales U118-MG ont un effet inhibiteur direct sur la production des peptides A β par les cellules H4 et/ou que les cellules U118-MG capturent les peptides A β nouvellement produits grâce à leurs propriétés phagocytaires. La seconde hypothèse semble la plus probable et les expériences subséquentes ont été conçues en ce sens. Il a été montré qu'en conditions homéostatiques normales, les microglies jouent un rôle protecteur en capturant et dégradant les peptides A β . Ceci permet de prévenir l'accumulation de peptides A β et leurs effets neurotoxiques (Doens *et al.*, 2014 ; Lee et Landreth, 2010). Les cellules microgliales possèdent un large spectre de récepteurs impliqués dans la capture et la phagocytose des peptides A β (Doens *et al.*, 2014 ; Lee et Landreth, 2010). L'incubation des cellules U118-MG avec des peptides A β 42 marqué à l'AlexaFluor555 ont montré clairement que les peptides sont rapidement internalisés, suggérant que ce mécanisme est responsable des faibles niveaux de production d'A β dans les cocultures (Fig. 3B).

La neuroinflammation est provoquée par des infections ou autres dommages neuronaux qui activent les cellules gliales et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-6 (Glass *et al.*, 2010). De plus, ces

cytokines ont déjà été détectées dans le cerveau des patients atteints de la MA (Lee *et al.*, 2010b). Nous avons réalisé une série d'expériences afin de déterminer comment le modèle de coculture utilisé ici se comporterait en réponse à une infection par HSV-1 et la présence de peptides A β exogènes en termes de production de cytokines associées à la MA. Les résultats ont montré clairement que les peptides A β 42 seuls ou en combinaison avec les virus HSV-1 augmentent la production de l'IL-1 β , de TNF α et d'IFN α . Ces observations sont en accord avec le comportement suggéré des cellules gliales suite à une infection et la reconnaissance du peptide A β 42 qui induit une réponse pro-inflammatoires impliquée dans la pathogénèse de la MA. L'augmentation de la production des interférons de type I a été reportée lors d'autopsies de cerveaux de patients atteints de la MA et dans des cultures de neurones primaires exposés aux peptides A β 42 (Taylor *et al.*, 2014). Dans notre étude, l'IFN α est produit par les cellules H4 et les cellules en cocultures sous conditions basales (Fig. 6A) et les peptides A β n'induisent pas sa surproduction (Fig. 6B). Ces observations sont en désaccord avec des travaux précédents (Taylor *et al.*, 2014) mais pourraient être expliquées par la différence de type cellulaire utilisé (primaires *vs* transformées). De manière intéressante, nous avons également constaté qu'une combinaison de virus HSV-1 et de peptides A β stimulent la production d'IFN α (Fig. 6B), tel que décrit dans le cas d'autres lignées cellulaires neuronales (Gianni *et al.*, 2013 ; Préhaud *et al.*, 2005). Nos observations sont en accord avec l'interprétation que la modulation de ces réponses pro-inflammatoires (TNF α , IL-1) et antivirale (IFN α) peuvent contribuer au développement des infections latentes d'HSV-1 chez les humains au niveau de sites « immunoprivilégiés » et cela sans destruction neuronale subséquente. Cette réponse inflammatoire permet également le maintien de la latence virale (Theil *et al.*, 2003).

Nous nous sommes posé la question si l'effet protecteur d'A β pourrait être mis en évidence en utilisant des cellules sensibles à HSV-1 et également productrices de peptides A β : les cellules neuronales H4. Pour des raisons évidentes d'activité phagocytaire de la part des microglies (Fig. 3B du second article), le modèle de coculture n'a pas pu être utilisé. Des essais de milieux de culture conditionnés appelés CM pour « Conditioned Medium », ont été réalisés en utilisant des cellules H4. Les résultats ont montré que les CM de cellules H4 infectées par HSV-1 inhibent la réplication virale dans des cultures *de novo* de cellules H4 (Fig. 7A du second article). La même expérience a été réalisée en utilisant

des cellules fibroblastiques MRC-5 qui ne produisent pas de peptides A β . Les résultats ont montré que la réplication virale n'a pas été inhibée dans ces essais (Fig. 7B du second article). Ces données suggèrent fortement que l'inhibition de la réplication de HSV-1 dans les cultures *de novo* de cellules H4 est due à la présence des peptides A β produits par les cellules H4 elles-mêmes, tel que montré par les résultats de la Fig. 1 du second article. Des données supplémentaires pour confirmer cette interprétation ont été obtenues en préparant des CM de cellules H4 et en les ajoutant à des cultures infectées selon différentes conditions détaillées à la Figure 8. Les données montrent clairement que l'inhibition de la production d'A β en présence d'un inhibiteur des sécrétases BACE-1 dans le milieu, n'interfère pas avec la réplication d'HSV-1 dans les essais (Fig. 8A du second article). Cependant, ces observations n'excluent pas la possibilité d'une action des IFN de type I qui sont générées suite à une infection virale. Cette possibilité a été testée en ajoutant des anticorps neutralisant dirigés contre les IFN α et IFN β aux CM. Les résultats ont montré que leur présence n'interfère pas avec la réplication de HSV-1 dans les nouvelles cultures (Fig. 8B du second article), suggérant que les IFN de type I extracellulaires ne sont pas impliqués dans l'inhibition de la réplication de HSV-1 dans notre modèle.

Bien que basés sur un modèle cellulaire minimal de coculture de cellules neuronales et microgliales, l'ensemble des résultats du second article supporte les observations faites dans le premier article et celles de White *et al.* (2014), selon lesquelles les peptides A β possèdent une activité antivirale *in vitro* et probablement dans le système nerveux central. La production de peptides A β pourrait représenter une première tentative de réponse de défense du cerveau visant à combattre les infections virales et, éventuellement, d'autres types d'agressions. A cet égard, il a été observé que les infections par HSV-1 induisent la libération de peptides A β par des neurones humains et murins (De Chiara *et al.*, 2010 ; Piacentini *et al.*, 2011). Par conséquent, nos travaux contribuent à la compréhension des effets de HSV-1 sur les cellules neuronales et sur l'induction de la production de peptides A β . De plus, les données présentées dans cette thèse montrent que la production de peptides A β , même en culture cellulaire, est suffisante pour exercer un effet antiviral. Les neurones baignent dans un plus petit volume de milieu extracellulaire dans le cerveau, il est donc très probable que la production de peptides fournisse une protection efficace. Cependant, la facette négative de ce système de défense dépendant d'A β , est qu'une production d'A β

soutenue induite par les fréquentes réactivations de HSV-1 dans le cerveau pourrait dépasser la capacité de clairance de la microglie et ceci serait dommageable pour les fonctions cérébrales. Cette situation devient particulièrement critique avec l'âge lorsque la microglie devient moins efficace pour éliminer les peptides A β et les virus (Solito *et al.*, 2012). La surproduction de peptides A β et le dépôt sous forme de plaques amyloïdes mène à un état inflammatoire associé à la perte neuronale et à la destruction région-spécifique du cerveau âgé et le développement progressif de la MA.

En prenant en compte le potentiel de ce nouveau rôle des peptides A β comme AMP dans le système nerveux central, un modèle peut être suggéré pour résumer la pathophysiologie de la MA en relation avec une infection virale par les membres de la famille *Herpesviridae*, l'influenza et d'autres infections cérébrales. Selon le modèle proposé (Fig. 9 du second article), les peptides A β sont normalement produits par les neurones en conditions homéostatiques normales, à des concentrations nécessaires pour effectuer leurs fonctions physiologiques telles que la régulation de la plasticité synaptique et le maintien de la mémoire (Puzzo *et al.*, 2013) ainsi que la protection antimicrobienne. Un équilibre entre la production d'A β et la régulation de sa surproduction par la phagocytose microgliale permet de maintenir les conditions homéostatiques (Fig. 9, état physiologique). Cependant, dans les cas de traumatismes cérébraux tels que les infections, l'hypoxie cérébrale, les dysfonctions métaboliques, les protéines anormalement repliées ou d'autres types de dommages, un mécanisme protecteur induirait une augmentation de la production de peptides A β . La surproduction et l'accumulation de peptides A β à fortes concentrations interfèrent avec leurs propres fonctions physiologiques homéostatiques et induisent des dommages aux neurones auxquels les oligomères d'A β se fixent et s'agglutinent en forme fibrillaire qui généreront les plaques séniles. La récurrence de cette série d'évènements au cours de la vie résulterait manifestement en une amplification irréversible des dommages cérébraux dans certaines régions spécifiques, telles que l'hippocampe et les lobes temporaux, reportés comme zones de localisation de HSV-1 (Wozniak *et al.*, 2009) et des sites majeurs d'injures dans la MA. L'infection des neurones par HSV-1 est une condition qui affecte 90% de la population mondiale, au moins dans la forme latente et asymptomatique. La réactivation de HSV-1 en conditions de stress ou de fatigue immunitaire (Nicoll *et al.*, 2012) pourrait mener à une augmentation de la

production d'A β , qui induirait une activation microgliale et une libération de cytokines pro-inflammatoires (Fig. 9, état pathologique). Dans ces cas, les cytokines pro-inflammatoires agissent comme médiateurs paracrines et maintiennent l'activation microgliale et astrocytique (Solito *et al.*, 2012) et initient également un cercle vicieux de réponse inflammatoire. De plus, les cytokines pro-inflammatoires peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et initier une réponse inflammatoire systémique (Le Page *et al.*, 2015 ; Rubio-Perez *et al.*, 2012).

Suite aux travaux décrits dans cette thèse, il est raisonnable d'envisager la mise en évidence du mécanisme d'action exact des peptides contre les virus HSV-1 et de mieux cerner les cibles des peptides en tant qu'AMP. L'hypothèse selon laquelle les peptides A β soient capables de s'insérer dans la membrane externe des virus avait été discutée dans le premier article suite à la publication de Cribbs *et al.*, (2000). Dans cet optique, nous avons réalisé des expériences de FRET en utilisant un virus HSV-1 modifié dont la protéine de fusion gB est en séquence avec la GFP et le peptide A β 42 marqués à l'AlexaFluor 555. Les résultats ont montré que le peptide A β 42 est capable de s'insérer dans la membrane externe des virus HSV-1.

Perspectives

Les résultats des expériences de FRET appuient l'hypothèse de l'interaction moléculaire entre A β et l'enveloppe de HSV-1. Par contre, la résultante de cette interaction en rapport avec l'inhibition de l'infection de cellules cibles demeure inconnue. Il est possible que l'interaction A β /enveloppe interfère avec le recrutement de HSV-1 dans les radeaux lipidiques (Bender *et al.*, 2003) et ainsi inhibe le processus de fusion du virus avec la cellule-cible. Cette possibilité pourrait être vérifiée par des expériences spatio-temporelles de microscopie confocale. En terme de perspectives à long terme associées à ce projet, il serait intéressant de tester notre hypothèse sur d'autres pathogènes neurotropes impliqués dans la MA et, également, dans d'autres conditions de stress neuronal comme l'hypoxie ou un stress physique qui serait le résultat d'un choc traumatique. Une mesure de la concentration des peptides A β dans le surnageant des cellules, par ELISA, donnerait déjà une bonne idée de la reproductibilité de cette étude.

D'un point de vue clinique, la possibilité d'un effet protecteur de la vaccination contre les virus HSV-1 et/ou CMV, dès le plus jeune âge mérite considération. En effet, comme mentionné précédemment, une bonne majorité des patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont infectés par le virus HSV-1 (Licastro *et al.*, 2014). Une vaccination efficace contre plusieurs Herpesviridae (HSV-1 et 2, CMV, EBV et HHV-6) induirait une protection non négligeable contre cette pathologie, même si une thérapie demeure à être mise au point dans le cas des patients souffrant de la forme génétique de la maladie ou dont l'étiologie est indépendante d'une infection par les virus *Herpesviridae*. Les expériences sur des modèles animaux étant très limitées dans le cas de la MA puisque seul l'Homme, certains grands singes et le lémurien *Microcebus* produisent des peptides A β et développent la maladie, des études plus physiologiques de cette maladie sont compliquées, mais toutefois faisables grâce au sang de patients ou grâce au Microcèbe, élevé en captivité.

Conclusions générales

La première partie de cette thèse présente des résultats menant à la conclusion que les peptides A β possèdent une activité AMP contre un des virus impliqué dans la maladie d'Alzheimer, le virus HSV-1. Nos observations sont en accord avec celles de White *et al.*, (2014) qui ont également démontré une activité AMP des peptides A β contre les virus de l'influenza. De plus, nos observations suggèrent une sélectivité d'action contre les virus enveloppés (cas également du virus influenza) mais pas contre les virus non-enveloppés. Nos observations suggèrent que la production de peptides A β , initialement impliquée dans la pathogénèse de la forme sporadique de la MA, pourrait être une forme de protection contre les agressions pathogéniques. Il a déjà été démontré que HSV-1 induit la libération de peptides A β par des neurones humains et murins (De Chiara *et al.*, 2010 ; Piacentini *et al.*, 2011). Nous démontrons que cette libération sert à limiter la réplication virale. Cependant, une induction prolongée de la production des peptides A β par les cellules du cerveau devient délétère avec l'âge. En effet, durant le vieillissement, la microglie devient moins efficace pour éliminer à la fois les virus et les peptides A β . Cela a pour conséquence une augmentation du dépôt extracellulaire de peptides A β et contribue à la progression de la MA.

En conclusion, nos données ont clairement montré que la production de peptides A β par un modèle de cellules neuronales est induite par une infection par HSV-1. Il est concevable que la production d'A β puisse être dommageable en cas de fréquentes réactivations de HSV-1 dans le cerveau au cours de la vie. Les fréquentes réactivations de l'infection latente de HSV-1 et la production subséquente élevée de peptides A β induisent l'activation de la microglie et des astrocytes et ceci est dommageable pour le cerveau. Nos données renforcent les observations récentes que les peptides A β peuvent être bénéfiques et pas uniquement un simple sous-produit de la pathogénèse de la MA. Il est également concevable que plutôt que de cibler directement A β , les agents thérapeutiques contre la MA devraient cibler les agresseurs du cerveau qui induisent la production d'A β tels que HSV-1 en particulier, dû à sa fréquente détection dans les cerveaux des patients atteints de la MA.

De ce que nous savons, les données présentées ici sont les premières à établir un lien entre la production neuronale de peptides A β et son rôle antiviral contre les infections par HSV-1, de même que le rôle potentiel dans la pathogénèse de la MA. De plus, nos résultats ont montré une interaction régulatrice sensible par la microglie sur la production des peptides A β par les cellules neuronales, jouant un rôle soit protecteur soit préjudiciable pour la neuroinflammation/dégénération probablement à différentes étapes de la maladie. Nos observations peuvent être étendues à la protection contre les autres agents inflammatoires, mais ces possibilités nécessitent de plus amples investigations.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abaitua F, Zia FR, Hollinshead M, O'Hare P. Polarized cell migration during cell-to-cell transmission of herpes simplex virus in human skin keratinocytes. *J Virol*. 2013 Jul;87(14):7921-7932.
- Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: Cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J*. 2009;276(24):7228-7236.
- Alvarez A, Toro R, Cáceres A, Maccioni RB. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett*. 1999 Oct 15;459(3):421-426.
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*. 1995;8(6):429-431.
- Armstrong RA. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*. 2009;47(4):289-299.
- Armstrong RA. What causes Alzheimer's disease? *Folia Neuropathol*. 2013;51, 169-188.
- Barghorn S, Mandelkow E. Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry*. 2002 Dec 17;41(50):14885-14896.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010;23(4):213-227.
- Bender FC, Whitbeck JC, Ponce de Leon M, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J Virol*. 2003 Sep;77(17):9542-9552.
- Benitez BA, Cruchaga C; United States–Spain Parkinson's Disease Research Group. TREM2 and neurodegenerative disease. *N Engl J Med*. 2013 Oct 17;369(16):1567-1568.
- Berkenbosch F, Refolo LM, Friedrich VL, Casper D, Blum M, Robakis NK. The Alzheimer's amyloid precursor protein is produced by type 1 astrocytes in primary cultures of rat microglia. *J Neurosci Res* 1990;25: 431-440.
- Bertke AS, Apakupakul K, Ma A, Imai Y, Gussow AM, Wang K, Cohen JI, Bloom DC, Margolis TP. LAT region factors mediating differential neuronal tropism of HSV-1 and HSV-2 do not act in trans. *PLoS One*. 2012;7(12):e53281.
- Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Oct;9(10):768-778.
- Blais V, Rivest S. [Role of the innate immune response in the brain] [French]. *Med Sci (Paris)*. 2003 Oct;19(10):981-987.
- Boekhoorn K, Terwel D, Biemans B, Borghgraef P, Wiegert O, Ramakers GJA, de Vos K, Krugers H, Tomiyama T, Mori H, Joels M, van Leuven F, Lucassen PJ. Improves long-term potentiation and memory in young Tau-P301L transgenic mice before onset of hyperphosphorylation and tauopathy. *Neurobiol Dis*. 2006;26(3):3514-3523.
- Bourgade K, Garneau H, Giroux G, Le Page AY, Bocti C, Dupuis G, Frost EH, Fülöp T Jr. β -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1. *Biogerontology*. 2015 Feb;16(1):85-98.
- Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol*. 2005 Apr;77(4):451-459.

- Broussard JA, Rappaz B, Webb DJ, Brown CM. Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat Protoc.* 2013 Feb;8(2):265-281.
- Bruggink KA, Jongbloed W, Biemans EA, Veerhuis R, Claassen JA, Kuiperij HB, Verbeek MM. Amyloid- β oligomer detection by ELISA in cerebrospinal fluid and brain tissue. *Anal Biochem.* 2013 Feb 15;433(2):112-120.
- Bu XL, Yao XQ, Jiao SS, Zeng F, Liu YH, Xiang Y, Liang CR, Wang QH, Wang X, Cao HY, Yi X, Deng B, Liu CH, Xu J, Zhang LL, Gao CY, Xu ZQ, Zhang M, Wang L, Tan XL, Xu X, Zhou HD, Wang YJ. A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2015 Dec;22(12):1519-1525.
- Burton MF, Steel PG. The chemistry and biology of LL-37. *Nat Prod Rep.* 2009 Dec;26(12):1572-1584.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem.* 1998 Oct 23;273(43):27765-27767.
- Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla FM. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron.* 2006 Mar 2;49(5):671-682.
- Carbone I, Lazzarotto T, Ianni M, Porcellini E, Forti P, Masliah E, Gabrielli L, Licastro F. Herpes virus in Alzheimer's disease: relation to progression of the disease. *Neurobiol Aging.* 2014 Jan;35(1):122-129.
- Cardenas AM, Ardiles AO, Barraza N, Baez-Matus X, Caviedes P. Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's disease and down syndrome. *Arch Med Res.* 2012;43(8):645-654.
- Carty M, Reinert L, Paludan SR, Bowie AG. Innate antiviral signalling in the central nervous system. *Trends Immunol.* 2014 Feb;35(2):79-87.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. *Dis Mon.* 2010;56(9):484-546.
- Chartier-Harlin M, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Rocques P, Hardy J, Mullan M. Early onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature* 1991;353:844-846.
- Civitelli L, Marcocci ME, Celestino I, Piacentini R, Garaci E, Grassi C, De Chiara G, Palamara AT. Herpes simplex virus type 1 infection in neurons leads to production and nuclear localization of APP intracellular domain (AICD): implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurovirol.* 2015 Oct;21(5):480-490.
- Coen DM, Schaffer PA. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Apr;2(4):278-288.
- Colonna M. TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jun;3(6):445-453.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994 Jun;7(2):180-184.
- Cribbs DH, Azizeh BY, Cotman CW, LaFerla FM. Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide. *Biochemistry.* 2000 May 23;39(20):5988-5994.

- Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, et al. Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature*. 2014;505(7484):550-554.
- Dalgediene I, Lasickiene R, Budvytyte R, Valincius G, Morkuniene R, Borutaite V, Zvirbliene A. Immunogenic properties of amyloid beta oligomers. *J Biomed Sci*. 2013;20(1):10.
- De Chiara G, Marcocci ME, Civitelli L, Argnani R, Piacentini R, Ripoli C, Manservigi R, Grassi C, Garaci E, Palamara AT. APP processing induced by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) yields several APP fragments in human and rat neuronal cells. *PLoS One*. 2010 Nov 15;5(11):e13989.
- De Chiara G, Marcocci ME, Sgarbanti R, Civitelli L, Ripoli C, Piacentini R, Garaci E, Grassi C, Palamara AT. Infectious Agents and Neurodegeneration. *Mol Neurobiol*. 2012;46:614–638.
- De la Monte SM, Tong M. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 2014;88:548-559.
- Desai PP, Ikonovic MD, Abrahamson EE, Hamilton RL, Isanski BA, Hope CE, Klunk WE, DeKosky ST, Kamboh MI. Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloidbeta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex. *Neurobiol Dis* 2005;20:574-582.
- Descamps O, Spilman P, Zhang Q, Libeu CP, Poksay K, Gorostiza O, Campagna J, Jagodzinska B, Bredesen DE, John V. AβPP-selective BACE inhibitors (ASBI): novel class of therapeutic agents for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2013;37(2):343-355.
- Dixit R, Tiwari V, Shukla D. Herpes simplex virus type 1 induces filopodia in differentiated P19 neural cells to facilitate viral spread. *Neurosci Lett*. 2008 Aug 1;440(2):113-118.
- Dobson CB, Wozniak MA, Itzhaki RF. Do infectious agents play a role in dementia? *Trends Microbiol*. 2003 Jul;11(7):312-317.
- Doens D, Fernández PL. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation*. 2014 Mar 13;11:48.
- Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, Duncan III JA, Silverberg GD, Miller MC, Tavares R, Yang W, Wu Q, Sabo E, Hovanesian V, Stopa EG. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. 2006 July 25;112(4):405-415.
- Eikelenboom P, Zhan SS, van Gool WA, Allsop D. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1994;15:447-450.
- Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH. Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses*. 2012 May;4(5):800-832.
- Etminan M, Gill S, Samii A. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Brit Med J*. 2003;327(7407):128.
- Ferretti MT, Bruno MA, Ducatzenzeiler A, Klein WL, Cuellar AC. Intracellular abeta-oligomers and early inflammation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33(7):1329-1342.
- Ford MJ, Cantone JL, Polson C, Toyn JH, Meredith JE, Drexler DM. Qualitative and quantitative characterization of the amyloid β peptide (Aβ) population in biological matrices using an immunoprecipitation–LC/MS assay. *J Neurosci Meth*. 2008 Mar 15;168(2):465-474.

- Fulop T, Lacombe G, Cunnane S, Le Page A, Dupuis G, Frost EH, Bourgade-Navarro K, Goldeck D, Larbi A, Pawelec G. Elusive Alzheimer's disease: can immune signatures help our understanding of this challenging disease? Part 1: clinical and historical background. *Discov Med*. 2013 Jan;15(80):23-32.
- Fulop T, Dupuis G, Baehl S, Le Page A, Bourgade K, Frost E, Witkowski JM, Pawelec G, Larbi A, Cunnane S. From inflamm-aging to immune-paralysis: a slippery slope during aging for immune-adaptation. *Biogerontology*. 2015 Oct 15.
- Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem*. 1996 Nov;67(5):1882-1896. Erratum in: *J Neurochem* 1997 Mar;68(3):1331.
- Gasparini L, Ongini E, Wenk G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: Old and new mechanisms of action. *J Neurochem*. 2004;91(3):521-536.
- Gianni T, Leoni V, Campadelli-Fiume G. Type I interferon and NF- κ B activation elicited by herpes simplex virus gH/gL via α v β 3 integrin in epithelial and neuronal cell lines. *J Virol*. 2013 Dec;87(24):13911-13916.
- Giudetti AM, Romano A, Lavecchia AM, Gaetani S. The role of brain cholesterol and its oxidized products in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2015 Sep 20.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010;140(6):918-934.
- Goate R, Chartier-Harlin M, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349: 704-706.
- Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *J Oral Microbiol*. 2013 Oct 25;5.
- 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, Hardy J; Alzheimer Genetic Analysis Group. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013 Jan 10;368(2):117-127.
- Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Teran LM. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*. 2010;135(1):1-11.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992; 256: 184-185.
- Harkness JM, Kader M, DeLuca NA. Transcription of the herpes simplex virus 1 genome during productive and quiescent infection of neuronal and nonneuronal cells. *J Virol*. 2014 Jun;88(12):6847-6861.
- Harris SA, Harris EA. Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2015 Sep 9;48(2):319-353.
- Held K, Derfuss T. Control of HSV-1 latency in human trigeminal ganglia-current overview. *J Neurovirol*. 2011;17(6):518-527.

- Holtzman DM, Mandelkow E, Selkoe DJ. Alzheimer disease in 2020. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Nov 1;2(11).
- Horwood N, Davies DC. Immunolabelling of hippocampal microvessel glucose transporter protein is reduced in Alzheimer's disease. 1994 Aug 1;425(1):69-72.
- in t'Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2001;345(21):1515-1521.
- Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet.* 1997 Jan 25;349(9047):241-244.
- Itzhaki RF, Wozniak MA, Appelt DM, Balin BJ. Infiltration of the brain by pathogens causes Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2004;25(5):619-627.
- Itzhaki RF, Wozniak MA. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: A dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. *Prog Lipid Res.* 2006;45(1):73-90.
- Itzhaki RF, Wozniak MA. Alzheimer's disease and infection: Do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease? *Alzheimers Dement.* 2010;6(1):83-84; author reply 85.
- Itzhaki RF, Wozniak MA. Could antivirals be used to treat Alzheimer's disease? *Future Microbiol.* 2012 Mar;7(3):307-309.
- Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: increasing evidence for a major role of the virus. *Front Aging Neurosci.* 2014 Aug 11;6:202.
- Jacobs AH, Tavitian B; INMiND consortium. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Jul;32(7):1393-1415.
- Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Craske J, Itzhaki RF. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol.* 1991 Apr;33(4):224-227.
- Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Yates CM, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is present in specific regions of brain from aged people with and without senile dementia of the Alzheimer type. *J Pathol.* 1992 Aug;167(4):365-368.
- Jang H, Connelly L, Arce FT, Ramachandran S, Kagan BL, Lal R, Nussinov R. Mechanisms for the Insertion of Toxic, Fibril-like β -Amyloid Oligomers into the Membrane. *J Chem Theory Comput.* 2013 Jan 8;9(1):822-833.
- Jang SJ, Kang JH, Kim KI, Lee TS, Lee YJ, Lee KC, Woo KS, Chung WS, Kwon HC, Ryu CJ, Choi TH, Choi CW, Lim SM, Cheon GJ. Application of bioluminescence imaging to therapeutic intervention of herpes simplex virus type I – Thymidine kinase/ganciclovir in glioma. *Cancer Lett.* 2010 Nov 1;297(1):84-90.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Gonzales V, Savonenko AV, Wen JC, Jenkins NA, Copeland NG, Younkin LH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt DR. Persistent amyloidosis following suppression of A β production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLoS Med.* 2005 Dec;2(12):e355.
- Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ, Rujescu D, Hampel H, Giegling I, Andreassen OA, Engedal K, Ulstein I, Djurovic S, Ibrahim-Verbaas C, Hofman A, Ikram MA, van Duijn CM, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013 Jan 10;368(2):107-116.
- Kaether C, Haass C, Steiner H. Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis.* 2006;3(4-5):275-283.

- Kagan BL, Jang H, Capone R, Teran Arce F, Ramachandran S, Lal R, Nussinov R. Antimicrobial properties of amyloid peptides. *Mol Pharm*. 2012 Apr 2;9(4):708-717.
- Kai-Larsen Y, Agerberth B. The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense. *Front Biosci*. 2008 May 1;13:3760-3767.
- Kam TI, Gwon Y, Jung YK. Amyloid beta receptors responsible for neurotoxicity and cellular defects in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Dec;71(24):4803-4813.
- Kammerman EM, Neumann DM, Ball MJ, Lukiw W, Hill JM. Senile plaques in Alzheimer's diseased brains: Possible association of beta-amyloid with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) L-particles. *Med Hypotheses*. 2006;66(2):294-299.
- Kehoe PG, Russ C, McIlroy S, Williams H, Holmans P, Holmes C, Liolitsa D, Vahidassr D, Powell J, McGleenon B, Liddell M, Plomin R, Dynan K, Williams N, Neal J, Cairns NJ, Wilcock G, Passmore P, Lovestone S, Williams J, Owen MJ. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nat Genet*. 1999 Jan;21(1):71-72.
- Kim J, Castellano JM, Jiang H, Basak JM, Parsadanian M, Pham V, Mason SM, Paul SM, Holtzman DM. Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. *Neuron*. 2009 Dec 10;64(5):632-644.
- Kim YS, Hollander H. Polyradiculopathy due to cytomegalovirus: Report of two cases in which improvement occurred after prolonged therapy and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 1993;17(1):32-37.
- Kim WS, Li H, Ruberu K, Chan S, Elliott DA, Low JK, Cheng D, Karl T, Garner B. Deletion of Abca7 increases cerebral amyloid- β accumulation in the J20 mouse model of Alzheimer's disease. 2013 Mar 6;33(10):4387-4394.
- Kimura M, Akasofu S, Ogura H, Sawada K. Protective effect of donepezil against A β (1-40) neurotoxicity in rat septal neurons. *Brain Res*. 2005 Jun 14;1047(1):72-84.
- Kolarova M, Garcia-Sierra F, Bartos A, Rigny J, Ripova D. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;2012:731526.
- Komala Sari T, Pritchard SM, Cunha CW, et al. Contributions of herpes simplex virus 1 envelope proteins to entry by endocytosis. *J Virol*. 2013;87(24):13922-13926.
- Koudinov AR, Berezov TT. Alzheimer's amyloid-beta (A beta) is an essential synaptic protein, not neurotoxic junk. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2004;64(1):71-79.
- Kristen H, Santana S, Sastre I, Recuero M, Bullido MJ, Aldudo J. Herpes simplex virus type 2 infection induces AD-like neurodegeneration markers in human neuroblastoma cells. *Neurobiol Aging*. 2015 Oct;36(10):2737-2747.
- LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med*. 2005 Apr;11(4):170-176.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(7):499-509.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Mar 30;96(7):3922-3927.
- Lang PO, Govind S, Aspinall R. Reversing T cell immunosenescence: why, who, and how. *Age (Dordr)*. 2013 Jun;35(3):609-620.

- Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, Schipper HM, Derhovanessian E, Goldeck D, Fulop T. Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009;17(1):91-103.
- Lee BH, Inui D, Suh GY, Kim JY, Kwon JY, Park J, Tada K, Tanaka K, Ietsugu K, Uehara K, Dote K, Tajimi K, Morita K, Matsuo K, Hoshino K, Hosokawa K, Lee KH, Lee KM, Takatori M, Nishimura M, Sanui M, Ito M, Egi M, Honda N, Okayama N, Shime N, Tsuruta R, Nogami S, Yoon SH, Fujitani S, Koh SO, Takeda S, Saito S, Hong SJ, Yamamoto T, Yokoyama T, Yamaguchi T, Nishiyama T, Igarashi T, Kakihana Y, Koh Y; Fever and Antipyretic in Critically ill patients Evaluation (FACE) Study Group. Association of body temperature and antipyretic treatments with mortality of critically ill patients with and without sepsis: multi-centered prospective observational study. *Crit Care.* 2012 Feb 28;16(1):R33.
- Lee CY, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm.* 2010 Aug;117(8):949-960.
- Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res.* 2010 Oct;33(10):1539-1556.
- Lemkul JA, Bevan DR. Aggregation of Alzheimer's amyloid β -peptide in biological membranes: a molecular dynamics study. *Biochemistry.* 2013 Jul 23;52(29):4971-4980.
- Le Page A, Bourgade K, Lamoureux J, Frost E, Pawelec G, Larbi A, Witkowski JM, Dupuis G, Fülöp T. NK Cells are Activated in Amnesic Mild Cognitive Impairment but not in Mild Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis.* 2015 May 7;46(1):93-107.
- Letenneur L, Peres K, Fleury H, et al. Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: A population-based cohort study. *PLoS One.* 2008;3(11):e3637.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano D, Oshima J, Pettingell W, Yu C, Jondro P, Schmidt S, Wang K, Crowley A, Fu Y, Guenette S, Galas D, Nemens E, Wijsman E, Bird T, Schellenberg G, Tanzi R. Candidate gene for chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 1995;269:973-977.
- Licastro F, Carbone I, Raschi E, Porcellini E. The 21st century epidemic: infections as inductors of neuro-degeneration associated with Alzheimer's Disease. *Immun Ageing.* 2014 Dec 5;11(1):22.
- Lin WR, Graham J, MacGowan SM, Wilcock GK, Itzhaki RF. Alzheimer's disease, herpes virus in brain, apolipoprotein E4 and herpes labialis. *Alzheimers Rep.* 1998;1:173-178.
- Lin WR, Wozniak MA, Cooper RJ, Wilcock GK, Itzhaki RF. Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J Pathol.* 2002;197(3):395-402.
- Lin WR, Wozniak MA, Wilcock GK, Itzhaki RF. Cytomegalovirus is present in a very high proportion of brains from vascular dementia patients. *Neurobiol Dis.* 2002;9(1):82-87.
- Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(2):106-118.
- Lleó A, Greenberg SM, Growdon JH. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med.* 2006;57:513-533.
- Lövheim H, Gilthorpe J, Johansson A, Eriksson S, Hallmans G, Elgh F. Herpes simplex infection and the risk of Alzheimer's disease: A nested case-control study. *Alzheimers Dement.* 2015 Jun;11(6):587-592.
- Lövheim H, Gilthorpe J, Adolfsson R, Nilsson LG, Elgh F. Reactivated herpes simplex infection increases the risk of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2015 Jun;11(6):593-599.

- Lurain NS, Hanson BA, Martinson J, Leurgans SE, Landay AL, Bennett DA, Schneider JA. Virological and immunological characteristics of human cytomegalovirus infection associated with Alzheimer disease. *J Infect Dis.* 2013 Aug 15;208(4):564-572.
- Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: The role and consequences. *Neurosci Res.* 2014 Feb;79:1-12.
- Ma Y, He B. Recognition of herpes simplex viruses: toll-like receptors and beyond. *J Mol Biol.* 2014 Mar 20;426(6):1133-1147.
- Ma Y, Yee A, Brewer B, Das S, Potter H. Amyloid-associated proteins α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer β -protein into filaments. *Nature.* 1994;372:92-94.
- Mann DMA, Younis N, Jones D, Stoddart RW. The time course of pathological events in Down's syndrome with particular reference to the involvement of microglial cells and deposits of b/A4. *Neurodegen.* 1992;1:201-215.
- Masters CL, Selkoe DJ. Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jun;2(6):a006262.
- Miklossy J. Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med.* 2011 Sep 20;13:e30.
- Moreth J, Kroker KS, Schwanzar D, *et al.* Globular and protofibrillar abeta aggregates impair neurotransmission by different mechanisms. *Biochemistry.* 2013;52(8):1466-1476.
- Morgen K, Frölich L. The metabolism hypothesis of Alzheimer's disease: from the concept of central insulin resistance and associated consequences to insulin therapy. *J Neural Transm.* 2015;122:499-504.
- Mori I, Kimura Y, Naiki H, *et al.* Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease. *J Med Virol.* 2004;73(4):605-611.
- Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu L. A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(2):441-449.
- Moulder KL, Snider BJ, Mills SL, Buckles VD, Santacruz AM, Bateman RJ, Morris JC. Dominantly Inherited Alzheimer Network: facilitating research and clinical trials. *Alzheimers Res Ther.* 2013 Oct 17;5(5):48-55.
- Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Dec 17.
- Nesic I, Guix FX, Vennekens K, Michaki V, Van Veldhoven PP, Feiguin F, De Strooper B, Dotti CG, Wahle T. Alterations in phosphatidylethanolamine levels affect the generation of A β . *Aging Cell.* 2012 Feb;11(1):63-72.
- Nicoll MP, Proença JT, Efstathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 May;36(3):684-705.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Dec;24(8):1063-1070.
- Pearson HA, Peers C. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol.* 2006;575(1):5-10.
- Peng X, Frohman MA. Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. *Acta Physiol (Oxf).* 2012 Feb;204(2):219-226.

- Perng GC, Jones C. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010;2010:262415.
- Piacentini R, Civitelli L, Ripoli C, Marcocci ME, De Chiara G, Garaci E, Azzena GB, Palamara AT, Grassi C. HSV-1 promotes Ca²⁺-mediated APP phosphorylation and A β accumulation in rat cortical neurons. *Neurobiol Aging*. 2011 Dec;32(12):2323-13-26.
- Piacentini R, De Chiara G, Li Puma DD, Ripoli C, Marcocci ME, Garaci E, Palamara AT, Grassi C. HSV-1 and Alzheimer's disease: more than a hypothesis. *Front Pharmacol*. 2014 May 7;5:97.
- Podlisny MB, Tolan DR, Selkoe DJ. Homology of amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1991;138:1423-1433.
- Potel C, Kaelin K, Gautier I, Lebon P, Coppey J, Rozenberg F. Incorporation of green fluorescent protein into the essential envelope glycoprotein B of herpes simplex virus type 1. *J Virol Methods*. 2002;105(1):13-23.
- Préhaud C, Mégret F, Lafage M, Lafon M. Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol*. 2005 Oct;79(20):12893-12904.
- Prokop S, Miller KR, Heppner FL. Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2013;126(4):461-477.
- Puzzo D, Arancio O. Amyloid- β peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimers Dis*. 2013;33(01):S111-S120.
- Ramanathan A, Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic BV. Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: the role, regulation and restoration of LRP1. 2015 July 15;7:136.
- Rapoport M, Ferreira A. PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2000 Jan;74(1):125-133.
- Reinert LS, Harder L, Holm CK, Iversen MB, Horan KA, Dagnæs-Hansen F, Ulhøi BP, Holm TH, Mogensen TH, Owens T, Nyengaard JR, Thomsen AR, Paludan SR. TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. *J Clin Invest*. 2012 Apr;122(4):1368-1376.
- Reitz C, Mayeux R; Alzheimer's Disease Genetics Consortium. TREM2 and neurodegenerative disease. *N Engl J Med*. 2013 Oct 17;369(16):1564-1565.
- Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol*. 2007 May-Jun;17(3):205-215.
- Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci*. 2013 Jan;38(1):6-23.
- Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jun;9(6):429-439.
- Roth AD, Ramírez G, Alarcón R, Von Bernhardi R. Oligodendrocytes damage in Alzheimer's disease: beta amyloid toxicity and inflammation. *Biol Res*. 2005;38(4):381-387.
- Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:756357.
- Santana S, Sastre I, Recuero M, Bullido MJ, Aldudo J. Oxidative stress enhances neurodegeneration markers induced by herpes simplex virus type 1 infection in human neuroblastoma cells. *PLoS One*. 2013 Oct 4;8(10):e75842.

- Sato N, Morishita R. The roles of lipid and glucose metabolism in modulation of β -amyloid, tau, and neurodegeneration in the pathogenesis of Alzheimer disease. 2015 Oct 13;7:199.
- Sciacca MF, Kotler SA, Brender JR, Chen J, Lee DK, Ramamoorthy A. Two-step mechanism of membrane disruption by A β through membrane fragmentation and pore formation. *Biophys J*. 2012 Aug 22;103(4):702-710.
- Shalit F, Sredin B, Stern L, Kott E, Huberman M. Elevated interleukin-6 secretion levels by mononuclear cells of Alzheimer's patients. *Neurosci Lett*. 1994;174:130-132.
- Sherrington R, Rogaev E, Liang Y, Rogaeva E, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin J, Bruni A, *et al*. Cloning of a gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1993;375:754-760.
- Solito E, Sastre M. Microglia function in Alzheimer's disease. *Front Pharmacol*. 2012 Feb 10;3:14.
- Sorrentino P, Iuliano A, Polverino A, Jacini F, Sorrentino G. The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. *FEBS Lett*. 2014 Mar 3;588(5):641-652.
- Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*. 2010;5(3):e9505.
- Steel AJ, Eslick GD. Herpes viruses increase the risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *J Alzheimers Dis*. 2015 Jul 24;47(2):351-364.
- Steiner H, Capell A, Leimer U, Haass C. Genes and mechanisms involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *Eur Arch Psych and Clin Neurol*. 1999;249:266-270.
- Steiner I, Benninger F. Update on herpes virus infections of the nervous system. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013 Dec;13(12):414.
- Stevens JG, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML, Feldman LT. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science*. 1987 Feb 27;235(4792):1056-1059.
- St George-Hyslop P, Haines J, Rogaev E, Mortilla M, Vaula G, Pericak-Vance M, Foncin JF, Montesi M, Bruni A, Sorbi S, Rainero I, *et al*. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nat Genet*. 1992 Dec;2(4):330-334.
- Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Di Spiezio A, Baches S, Vandenbroucke RE, Bouter Y, Prikulis I, Korth C, Weggen S, Heimann A, Schwaninger M, Bayer TA, Pietrzik CU. Endothelial LRP1 transports amyloid- β 1-42 across the blood-brain barrier. 2016 Jan 4;126(1):123-136.
- Streit WJ, Xue QS, Tischer J, Bechmann I. Microglial pathology. *Acta Neuropathol Commun*. 2014 Sep 26;2:142-159.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):1977-1981.
- Su YH, Moxley MJ, Ng AK, Lin J, Jordan R, Fraser NW, Block TM. Stability and circularization of herpes simplex virus type 1 genomes in quiescently infected PC12 cultures. *J Gen Virol*. 2002;83(12):2943-2950.

- Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 2002 Sep;54(3):469-525.
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Aug 15;90(16):7789-7793.
- Tam JH, Pasternak SH. Amyloid and Alzheimer's disease: Inside and out. *Can J Neurol Sci.* 2012;39(3):286-298.
- Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Oct 1;2(10):a006296.
- Taylor JM, Minter MR, Newman AG, Zhang M, Adlard PA, Crack PJ. Type-1 interferon signaling mediates neuro-inflammatory events in models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2014 May;35(5):1012-1023.
- Thies W, Bleiler L, Alzheimer's Association. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2013;9(2):208-245.
- Thompson RL, Preston CM, Sawtell NM. De novo synthesis of VP16 coordinates the exit from HSV latency in vivo. *PLoS Pathog.* 2009 Mar;5(3):e1000352.
- Tian Y, Crump CJ, Li YM. Dual role of alpha-secretase cleavage in the regulation of gamma-secretase activity for amyloid production. *J Biol Chem.* 2010 Oct 15;285(42):32549-32556.
- Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(2):289-305.
- Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Sep;42(9):2206-2214.
- Van Gool D, Destrooper B de, Van Leuven F, Triau E, Dom R. α 2-macroglobulin expression in neuritic-type plaques in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1993;14:233-237.
- Verga L, Frangione B, Tagliavini F, Giaccone G, Migheli A, Bugiani O. Alzheimer's and Down's patients: cerebral preamyloid deposits differ ultrastructurally and histochemically from the amyloid of senile plaques. *Neurosci Lett.* 1989;105:294-299.
- Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, Szoek C, Macaulay SL, Martins R, Maruff P, Ames D, Rowe CC, Masters CL; Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle (AIBL) Research Group. Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 2013 Apr;12(4):357-367.
- Wang JP, Bowen GN, Zhou S, Cerny A, Zacharia A, Knipe DM, Finberg RW, Kurt-Jones EA. Role of specific innate immune responses in herpes simplex virus infection of the central nervous system. *J Virol.* 2012 Feb;86(4):2273-2281.
- Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, Gilfillan S, Krishnan GM, Sudhakar S, Zinselmeyer BH, Holtzman DM, Cirrito JR, Colonna M. TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. 2015 Mar 12;160(6):1061-1071.
- Wang W, Fan L, Xu D, Wen Z, Yu R, Ma Q. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2012 Oct;44(10):807-814.

- Wang-Dietrich L, Funke SA, Kühbach K, Wang K, Besmehn A, Willbold S, Cinar Y, Bannach O, Birkmann E, Willbold D. The amyloid- β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2013;34(4):985-994.
- White MR, Kandel R, Tripathi S, Condon D, Qi L, Taubenberger J, Hartshorn KL. Alzheimer's associated β -amyloid protein inhibits influenza A virus and modulates viral interactions with phagocytes. *PLoS One.* 2014 Jul 2;9(7):e101364.
- WHO report, Dementia: a public health priority, April 11 2013.
- Wilcock DM, Colton CA. Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: Relevance of transgenic mouse studies to clinical trials. *J Alzheimers Dis.* 2008;15(4):555-569.
- Williams SM, Schulz P, Sierks MR. Oligomeric α -synuclein and β -amyloid variants as potential biomarkers for Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Eur J Neurosci.* 2016 Jan;43(1):3-16.
- Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, Dobson CB. Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett.* 2007 Dec 18;429(2-3):95-100.
- Wozniak MA, Frost AL, Itzhaki RF. Alzheimer's disease-specific tau phosphorylation is induced by herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis.* 2009;16(2):341-350.
- Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol.* 2009 Jan;217(1):131-138.
- Wozniak MA, Frost AL, Preston CM, Itzhaki RF. Antivirals reduce the formation of key Alzheimer's disease molecules in cell cultures acutely infected with herpes simplex virus type 1. *PLoS One.* 2011;6(10):e25152.
- Wozniak MA, Itzhaki RF. Intravenous immunoglobulin reduces β amyloid and abnormal tau formation caused by herpes simplex virus type 1. *J Neuroimmunol.* 2013 Apr 15;257(1-2):7-12.
- Wu L, Rosa-Neto P, Hsiung GY, Sadovnick AD, Masellis M, Black SE, Jia J, Gauthier S. Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Can J Neurol Sci.* 2012 Jul;39(4):436-445.
- Yamaguchi H, Ishiguro K, Sugihara S, Nakazato Y, Kawarabayashi T, Sun XY. Presence of apolipoprotein e on extracellular neurofibrillary tangles and on meningeal blood vessels precedes the Alzheimer β -amyloid deposition. *Acta Neuropathol.* 1994;88:413-419.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Henrikson RL, Gurney ME. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature.* 1999 Dec 2;402(6761):533-537.
- Yu Y, Ye RD. Microglial A β receptors in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2015 Jan;35(1):71-83.
- Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM, Trojanowski JQ. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:227-231.
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 2011 Jan 7;4:3.
- Zhao LN, Long H, Mu Y, Chew LY. The toxicity of amyloid β oligomers. *Int J Mol Sci.* 2012;13(6):7303-7327.

Zimmermann M, Borroni B, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M. Cholinesterase inhibitors influence APP metabolism in Alzheimer disease patients. *Neurobiol Dis.* 2005 Jun-Jul;19(1-2):237-242.

REMERCIEMENTS

Faire une thèse nécessite du travail et du courage mais surtout, du soutien. Et j'en ai eu beaucoup, alors cette page est importante pour moi.

En premier lieu j'aimerais remercier mes trois directeurs de thèse : le Dr Fülöp, le Dr Dupuis et le Dr Frost pour m'avoir accueillie dans leurs équipes, pour leur gentillesse perpétuelle, pour leur aide, leur confiance et leurs encouragements sans failles. Merci de m'avoir laissé n'en faire qu'à ma tête, ça a payé, nous avons écrit une belle histoire scientifique.

J'ai adoré mon passage dans ce laboratoire et c'est grâce à vous.

Mais grâce aussi à Aurélie Le Page, Evelyne Benoît, Laurie Vingataramin, Geneviève Giroux, Sébastien Choinière et les autres membres des labos. D'abord des collègues, vite devenus des amis. Les amis sont des personnes importantes lorsqu'on veut mener à bien une épreuve comme celle-là. Merci pour l'aide, les discussions, les manips, les soirées, les sorties et les conseils en tout genre ! Cela a été un plaisir de vous rencontrer, je vous aime.

Merci aux garçons de Génie : Tim, Jamie, Rajesh, Parker, Sylvain et Evan, pour votre bonne humeur, c'est important dans une équipe !

Merci à Camille Attané, qui s'est occupée de moi lors de mon premier stage. Merci pour tous tes conseils, tout ce que tu m'as appris et merci de m'avoir fait autant aimer la recherche. Je n'aurais pas pu rêver mieux pour une première expérience.

Merci à Jean-Sébastien, pour tout. Ton aide et ta gentillesse surtout.

Merci à mes meilleurs amis, Magali, Lucie et Guillaume, qui ont toujours cru en moi.

Et merci à Nicolas, pour ton soutien durant toutes ces années de fac. Merci d'avoir supporté mon stress à chaque examen et pour tout ce que tu as fait en ce sens.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités mais que je n'oublie pas.

Et à ceux qui m'ont gentiment rappelé tous les jours que j'avais des pages à écrire...

ANNEXES

I) Preuve d'acceptation – Article 2 - Journal of Alzheimer's Disease

De : george.perry@utsa.edu <george.perry@utsa.edu>

Envoyé : 22 novembre 2015 15:21

À : Tamas Fulop

Objet : Manuscript 15-0652R2 Decision

Dear Dr. Fulop:

Your manuscript (15-0652R2) has now been accepted in the Journal of Alzheimer's Disease. In keeping with the policy of JAD, your term as an Associate Editor (scheduled to begin January 1, 2016) has been extended by one year to December 31, 2017.

We require financial disclosure statements from all authors for each accepted manuscript. Please log on to our online disclosure system (<http://www.j-alz.com/node/add/disclosure>) and enter your manuscript number (15-0652R2). Select your name from the pull down list and complete the form. Please have all of your co-authors complete the form as well.

Additionally, please complete the Author Publication Fee Payment form (<http://www.iospress.nl/feeforms/form/?id=29297&fid=jad>). More information is available at our website: <http://www.j-alz.com/fees>. If you experience any problems with the payment, please contact Eva Christiaanse at Authorfees@iospress.nl.

Sincerely,

George Perry

Editor-in-Chief, JAD