

COMMUNICATION

Stratégie de recherche translationnelle sur la maladie d'Alzheimer : cibles, modèles animaux et biomarqueurs

MOTS-CLÉS : BIOMARQUEURS PHARMACOLOGIQUES. ENDOPHÉNOTYPES. MALADIE D'ALZHEIMER. MODÈLES ANIMAUX DE MALADIE HUMAINE

Strategy of translational research on Alzheimer's disease: targets, animal models and biomarkers

KEY-WORDS: BIOMARKERS, PHARMACOLOGICAL. ENDOPHENOTYPES. ALZHEIMER DISEASE. DISEASE MODELS, ANIMAL

Marc DHENAIN *

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

RÉSUMÉ

La maladie d'Alzheimer entraîne des altérations cognitives sévères et est caractérisée par deux processus pathologiques principaux : une pathologie amyloïde β ($A\beta$) et une pathologie tau. Des biomarqueurs en imagerie permettent d'établir l'histoire naturelle de la maladie et montrent un hypométabolisme régional et une atrophie cérébrale évolutive. Le développement de nouveaux médicaments contre cette maladie repose en grande partie sur des étapes précoces qui ne peuvent être étudiées de façon précise que chez l'animal. Notre revue est centrée sur les modèles d'amyloïdose et le modèle primate microcèbe. L'utilisation de biomarqueurs chez ces modèles permet de révéler des endophénotypes qui peuvent être comparés à des endophénotypes chez l'homme afin de rationaliser les prises de décision lors du développement de nouvelles thérapies. Les modèles animaux permettent également d'évaluer des nouvelles hypothèses sur les mécanismes physiopathogéniques de la maladie. Nous nous focaliserons sur l'hypothèse de la mauvaise conformation des protéines car elle va probablement moduler notre vision de la maladie d'Alzheimer dans les années à venir. Cette hypothèse suggère que les peptides $A\beta$ natifs deviennent toxiques lorsque leur conformation en hélices alpha évolue vers une conformation en feuillets beta et suggère aussi que des protéines mal conformées peuvent transmettre leur mauvaise conformation à des protéines normales.

* UMR9199 CEA, CNRS, UPSaclay, UPSud — MIRCen — 18 Route du Panorama, 92265 Fontenay aux Roses ; e-mail : Marc.Dhenain@cea.fr

Tirés à part : Docteur Marc DHENAIN, même adresse
Article reçu le 14 février 2015, accepté le 9 mars 2015

SUMMARY

Alzheimer's disease causes severe cognitive alterations in humans and is associated with two main pathologic processes: the β -amyloid and tau pathologies. Imaging biomarkers can reveal the natural history of the disease and show an alteration of glucose metabolism and an evolving cerebral atrophy process. The discovery of new therapies against this disease relies on early stages of drug development that can be evaluated precisely only in animals. Our review focuses on transgenic mouse models of amyloidosis and on the mouse lemur primate model. Biomarkers in these animals may reveal endophenotypes that can be compared to human endophenotypes and help rationalizing decision-making during the development of new therapies. Animal models can also help to validate new hypotheses on disease mechanisms. We focus here on the protein misfolding hypothesis of Alzheimer as it will probably modulate our vision of the disease in forthcoming years. This hypothesis suggests that native $A\beta$ peptides become toxic when their conformation in alpha helices evolves into a beta-sheet conformation and also suggests that misfolded proteins can transmit their misfolded conformation to normal proteins.

MALADIE D'ALZHEIMER : ENDOPHÉNOTYPES ET BIOMARQUEURS

La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative la plus répandue actuellement. Elle induit une atteinte cognitive sévère. Une fois le diagnostic clinique posé, elle mène au décès du patient après environ 10 ans d'évolution lente mais inexorable. Cette maladie est caractérisée par une longue phase asymptomatique qui commence au moins 10 ans avant le début de la phase clinique de la maladie [1, 2]. Les lésions microscopiques de la MA sont les dépôts extracellulaires de protéines β -amyloïdes mal conformées et les altérations liées à des dépôts intracellulaires de protéines tau anormalement phosphorylées. Les dépôts extracellulaires de protéines β -amyloïdes mal conformées peuvent prendre des formes multiples : dépôts diffus, dépôts focaux, plaques neuritiques ou angiopathie amyloïde par exemple [3]. La pathologie amyloïde peut aussi avoir des effets délétères via l'accumulation intracellulaire d'amyloïde- β [4] et via la toxicité des formes solubles des oligomères d'amyloïde- β sur les synapses [5]. Les lésions contenant des protéines tau anormales sont les dégénérescences neurofibrillaires (accumulations dans le corps cellulaire des neurones), les fibres tortueuses (accumulations dans le neuropile, principalement dans les dendrites) et les couronnes de prolongements cellulaires dilatés autour des plaques amyloïdes neuritiques [3]. Les formes solubles des protéines tau anormales ont probablement également un rôle important dans le processus pathologique de la maladie [6]. Ces altérations entraînent des dysfonctions synaptiques et des pertes neuronales. La séquence des régions touchées suggère une progression par les voies anatomiques [7], progression que des expériences d'injections d'homogénats de cortex porteur de pathologie tau confirment [8]. Elle commence dans le locus coeruleus [9], puis s'étend au cortex entorhinal, à l'hippocampe, puis aux autres régions corticales. Au contraire, la pathologie β -amyloïde apparaît initialement dans les régions corticales et allocorticales puis évolue de façon antérograde vers des

régions connectées telles que le striatum ou le diencéphale puis des noyaux du tronc et du cervelet [10]. L'étude neuropathologique de grandes cohortes de cerveaux révèle que certains sujets présentent uniquement des lésions tau dans les régions entorhinales sans aucune pathologie amyloïde ce qui suggère que la pathologie tau apparaît avant les plaques amyloïdes. Ensuite, c'est la pathologie amyloïde corticale et allocorticale qui apparaît. La pathologie tau corticale apparaît en dernier [11].

Comprendre la longue phase asymptomatique de la maladie est important pour élaborer des thérapies efficaces. Il s'agit de définir les **endophénotypes** de la maladie, c'est-à-dire des phénotypes intermédiaires et invisibles à « l'œil nu » dont la manifestation est plus proche du processus initiateur de la maladie que le phénotype final [12]. Le concept d'endophénotype est initialement issu d'études en épidémiologie génétique dans le but de décortiquer un phénotype pathologique (une maladie) en une série de phénotypes intermédiaires qui auraient une relation plus forte que le phénotype final (la maladie) avec des paramètres génétiques. Par extension l'utilisation d'endophénotypes pourrait permettre de résoudre des questions relatives aux modèles étiologiques des maladies, par exemple pour évaluer la part de paramètres génétiques, environnementaux et épigénétiques dans leur apparition [12]. L'identification d'endophénotypes permet également de classer les patients lors d'études cliniques et de définir des jalons lors du traitement de maladies chroniques. La caractérisation des endophénotypes d'une maladie peut aussi permettre d'affiner le développement de modèles animaux pertinents, qui ne seraient plus des modèles du phénotype final de la pathologie, mais des modèles endophénotypiques. Le concept d'endophénotypes a d'abord été utilisé en psychiatrie [12], mais il a ensuite été étendu à de nombreux autres domaines y compris l'étude de la maladie d'Alzheimer [13-16]. Les endophénotypes peuvent être caractérisés par des marqueurs que l'on peut mettre en évidence *post mortem* ou par des **biomarqueurs**, paramètres biologiques que l'on peut mesurer, *in vivo*, sur un mode longitudinal et de façon objective [12]. Par exemple, les plaques amyloïdes qui pendant longtemps ne pouvaient être détectées qu'en *post mortem* peuvent désormais être détectées *in vivo*, grâce à des examens en imagerie par tomographie par émission de positons (TEP). Ces examens ont révélé que les plaques amyloïdes apparaissent 17 ans avant le début de la phase clinique de la maladie [17]. Les dégénérescences neurofibrillaires sont également détectables par imagerie TEP [18]. L'atrophie cérébrale associée à la MA peut, elle, être détectée *in vivo* par imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM). Une atrophie hippocampique est visible quatre ans avant la phase clinique de la maladie et s'étend progressivement à l'ensemble du cerveau. Cette atrophie, qui est corrélée aux performances cognitives, est fortement liée à la présence des dégénérescences neurofibrillaires [19, 20].

Certains biomarqueurs donnent accès à des informations fonctionnelles, inaccessibles lors d'études *post mortem*. Par exemple, la TEP avec des ligands analogues du glucose (18F-FDG) révèle un hypométabolisme cérébral lors de la MA [21]. Une réduction de la perfusion cérébrale, corrélée à l'hypométabolisme cérébral, est aussi mise en évidence grâce à l'IRM [22]. L'IRM permet également de mesurer les

variations du flux sanguin local induite par une stimulation cérébrale (imagerie de l'effet BOLD ou *Blood Oxygen Level Dependent*). La méthode révèle des altérations de l'activation cérébrale associée à une tâche cognitive chez les patients atteints par la maladie [23]. L'IRM fonctionnelle est également utilisée pour caractériser les réseaux neuronaux en mode repos. Il s'agit de détecter différentes régions du cerveau qui sont actives de façon synchrone lorsque le cerveau est au repos. Le réseau du mode par défaut est un réseau actif lorsqu'un individu n'effectue aucune tâche précise. Son activité diminue lorsqu'une tâche cognitive est engagée. Le réseau du mode par défaut inclut différentes régions du cerveau telles que le précuneus, le cortex cingulaire postérieur, le cortex pariétal inférieur, la partie médiane de la circonvolution frontale supérieure et le cortex cingulaire antérieur. Au cours de la maladie, l'amyloïde s'accumule en priorité dans ce réseau et cette accumulation entraîne une altération de son fonctionnement [24].

L'utilisation de biomarqueurs a permis d'établir une chronologie d'apparition des altérations dans le cortex : les plaques amyloïdes arrivent en premier, suivies des dégénérescences neurofibrillaires, puis des altérations fonctionnelles et de l'atrophie cérébrale qui précèdent les troubles cognitifs majeurs (*figure 1*) [17]. Cette cascade a cependant été récemment remise en question. En effet, des études en imagerie ont démontré que environ 25 % des formes de MA sont caractérisées par un processus de neurodégénérescence progressive qui suit les dégénérescences neurofibrillaires, mais en l'absence de dépôts amyloïdes [25]. Les 75 % de cas où la dégénérescence est associée à l'amyloïdose évoluent plus vite. Suite à ces observations, il semble donc que la pathologie amyloïde accélère la diffusion de la pathologie tau. En revanche, la pathologie tau, n'influence pas la pathologie amyloïde [25].

ÉCHEC DES THÉRAPIES CONTRE LA MALADIE D'ALZHEIMER : UN REFLET DE LA CRISE DU DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES THÉRAPIES ?

Les thérapies contre la MA doivent agir sur les altérations cognitives pour obtenir une autorisation de mise sur le marché. Les seuls traitements disponibles actuellement sont des médicaments symptomatiques qui modulent principalement la neurotransmission cholinergique. 99.6 % des 413 thérapies testées au niveau clinique dans la période 2002-2012 ont échoué [26]. En particulier, le taux d'échec dans les phases avancées de développement clinique (phase II et phases III), qui sont les plus coûteuses, augmente [27]. Ces échecs reflètent la crise de productivité qui touche actuellement l'industrie pharmaceutique.

En réaction à cette crise, plusieurs publications ont identifié les facteurs associés au succès de programmes de recherche et développement de thérapies. Trois facteurs semblent importants : **1.** Les programmes les plus efficaces sont ceux qui s'appuient sur des *modèles animaux pertinents* chez qui il est possible de tester les hypothèses mécanistiques des maladies et l'efficacité de médicaments [28]. **2.** La mise au point de nouvelles thérapies repose sur l'identification de cibles thérapeutiques et

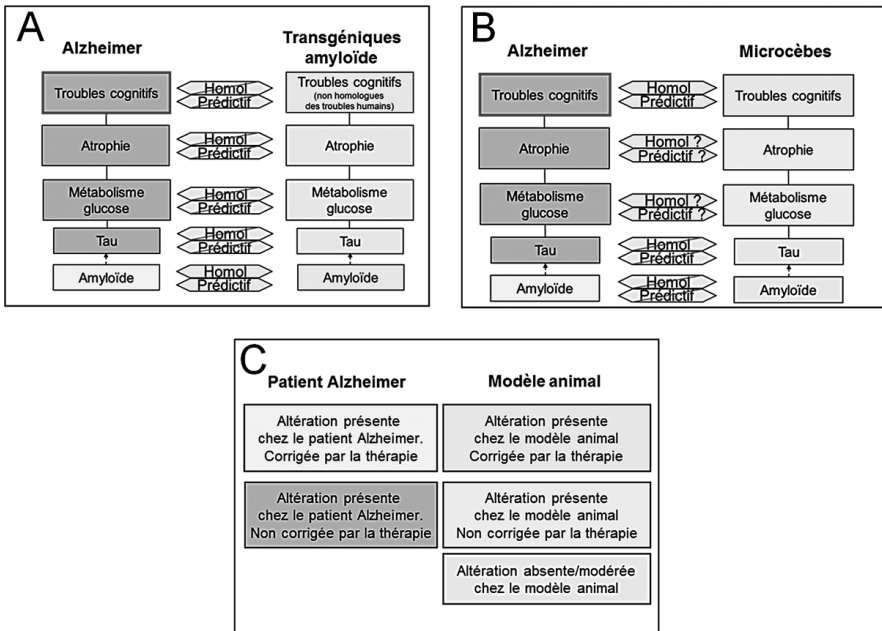


FIG. 1. — Comparaison des altérations présentes chez les patients Alzheimer (colonnes de gauche) et chez des modèles animaux (colonnes de droite). Deux modèles sont présentés : les modèles transgéniques d'amyloïdoses (A) et les primates âgés par exemple le microcèbe (B). Cinq altérations typiques de la cascade d'événement se produisant lors de la MA sont représentées : les plaques amyloïdes, la dégénérescence neurofibrillaire (tau), les altérations du métabolisme du glucose, l'atrophie cérébrale et les troubles cognitifs. La pathologie amyloïde ne se produit pas de façon systématique chez les patients Alzheimer (25), ce qui justifie la flèche en pointillés entre les lésions amyloïdes et tau. Les troubles cognitifs sont entourés en rouge car il s'agit de l'altération qui doit être modifiée pour obtenir l'autorisation de mise sur le marché d'un médicament. La présence de l'altération et l'efficacité de thérapies de référence sont les critères utilisés pour établir le code couleur de chaque cadre (C). Le traitement de référence est l'immunothérapie anti-amyloïde pour les données chez l'homme et les souris. Pour les primates, il s'agit des thérapies testées jusqu'à maintenant chez les microcèbes. La présence ou l'absence d'homologie des altérations présentées par le modèle animal et le patient Alzheimer est présentée pour chaque critère (cadre " homol " vert ou gris barré pour la présence ou l'absence d'homologie). La valeur prédictive des modèles pour chaque critère est aussi présentée (cadre prédictif vert ou gris barré pour la présence ou l'absence de prédictivité). Cette représentation schématique, peut être affinée en précisant plus en détail chaque modèle.

l'identification de ces cibles passe par une bonne *compréhension des mécanismes associés à la maladie*. Dans le domaine des maladies neurodégénératives, la faible maturité/qualité des hypothèses explicatives pourrait expliquer notre incapacité à choisir les bonnes cibles. **3.** Finalement les programmes les plus efficaces sont ceux qui parviennent à *éliminer les molécules en phases précliniques* ou dans les toutes premières phases du développement clinique pour ne garder que les molécules les plus efficaces lors des phases II et III [29].

Au cours de cette revue, nous proposons une réflexion sur les modèles d'amyloïdose et sur le modèle primate microcèbe. L'utilisation de biomarqueurs chez ces modèles permet de révéler des endophénotypes qui peuvent être comparés à des endophénotypes chez l'homme afin de rationaliser les prises de décision lors du développement de nouvelles thérapies. Une deuxième partie de la présentation est consacrée à l'utilisation des modèles animaux pour imaginer des nouvelles hypothèses mécanistiques de la maladie. Nous nous focaliserons sur le rôle prépondérant des agents de propagation de la mauvaise conformation des protéines. Ils vont probablement moduler notre vision de la maladie d'Alzheimer dans les années à venir.

HYPOTHÈSE DE LA CASCADE AMYLOÏDE, MODÈLES MURINS TRANSGÉNIQUES ET THÉRAPIES ANTI-AMYLOÏDES

Dans les années 1990, des mutations de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) ou de gènes associés à son métabolisme (PS1, PS2) ont permis d'expliquer des cas familiaux de MA. Il s'agissait alors d'arguments forts en faveur d'un rôle important de l'amyloïde dans la MA [30]. Ces découvertes ont favorisé la création de modèles animaux permettant d'évaluer *in vivo* la biologie de l'amyloïde et de tester l'efficacité de médicaments anti-amyloïdes. Les modèles les plus utilisés sont des souris transgéniques, chez lesquelles sont surexprimés les gènes de l'APP mutés (*figure 1A*, <http://www.alzforum.org/res/com/tra/app/default.asp>). Des mutations des gènes de la préséniline 1 ou 2 (PS1, PS2) permettent d'accélérer l'évolution du phénotype des souris APP (<http://www.alzforum.org/res/com/tra/double-cross/default.asp>). Il s'agit donc de modèles murins d'amyloïdose cérébrale. Peut-on considérer que ces modèles sont des bons modèles de la MA ?

D'une façon générale, trois critères sont retenus pour estimer la **validité/qualité d'un modèle animal** [31] : **1. la validité de construction**, qui reflète la similitude entre les mécanismes de construction du modèle et ceux qui sont impliqués dans la maladie humaine ; **2. la validité d'apparence**, c'est-à-dire la capacité à reproduire des lésions, mécanismes ou symptômes de la maladie humaine ; **3. la validité de prédiction**, c'est-à-dire la capacité à prédire un mécanisme ou l'effet d'un traitement chez l'homme à partir des études chez l'animal. Celle-ci implique que les molécules aient été testées chez l'homme (et chez l'animal), ce qui pendant longtemps n'a pas été le cas pour les thérapies anti-amyloïdes.

Les modèles APP, PS1 ou PS2 ont une validité de construction car ils possèdent des mutations de gènes directement associés à la maladie de l'homme. Ils développent des dépôts amyloïdes cérébraux et des troubles comportementaux en vieillissant et, dès 1999, ils ont permis de démontrer que des immunothérapies anti-amyloïdes réduisent la charge amyloïde et certains troubles comportementaux [32]. Ces découvertes ont favorisé le développement chez l'homme de traitements anti-amyloïdes, incluant des thérapies qui bloquent la synthèse d'amyloïde cérébrale, empêchent son agrégation ou accélèrent son élimination [26].

Le passage chez l'homme des thérapies anti-amyloïdes n'a cependant pas permis de moduler significativement les troubles cognitifs associés à la maladie. Par exemple, la première immunothérapie (AN1792), testée en phase 2 chez 372 patients, réduisait la charge amyloïde cérébrale de certains patients mais n'a pas amélioré significativement leur cognition [33]. Les autres lésions de la MA étaient peu modifiées : les dégénérescences neurofibrillaires n'étaient pas réduites et des études en IRM ont révélé une augmentation de l'atrophie cérébrale [34]. Des résultats similaires ont été décrits avec d'autres thérapies [26]. Par exemple le Bapineuzumab, un anticorps monoclonal qui cible l'amyloïde, réduit la charge amyloïde détectée en TEP, mais n'améliore pas de façon significative les troubles cognitifs de la MA [35].

MODÉLISATION DE LA CIBLE THÉRAPEUTIQUE MAIS PAS DE LA CASCADE AMYLOÏDE CHEZ LES MODÈLES MURINS D'AMYLOÏDOSE

Les échecs des essais cliniques qui cherchaient à valider des médicaments contre l'amyloïde ont entraîné une remise en question de la valeur prédictive des modèles animaux. Nos travaux qui ont caractérisé les *endophénotypes visualisables par imagerie chez les modèles souris d'amyloïdose et les ont comparés à ceux des patients Alzheimer* permettent de mieux comprendre les différences de résultats entre l'application d'une thérapie chez les souris et chez l'homme (*figure 1A*). Grâce à des études en IRM, nous avons démontré que les modèles souris ne développent pas d'atrophie cérébrale similaire à celle retrouvée chez les patients [36]. Nos études en TEP ont montré que les plaques amyloïdes entraînent un hypermétabolisme cérébral chez les souris [37], ce qui tranche avec l'hypométabolisme détecté chez les patients. D'autres modifications telles que des altérations vasculaires [38] et une hypoperfusion cérébrale [37] sont retrouvées chez les souris. Dans le futur proche, il sera possible de réaliser des images fonctionnelles du mode par défaut chez les rongeurs [39] et de comparer les effets des troubles sur des paramètres fonctionnels chez l'homme et l'animal. Cette étape prend toute son importance car au cours de la MA, le mode par défaut est particulièrement altéré.

Si on considère les endophénotypes visualisés en imagerie chez l'homme et chez les modèles murins, il semble donc que presque tous les paramètres en aval de l'amyloïde (réduction du métabolisme ou atrophie cérébrale) ne sont pas homologues chez l'homme et l'animal. Les troubles comportementaux ont aussi une origine différente chez l'homme et l'animal car chez les patients, ils sont liés aux dégénérescences neurofibrillaires et chez les animaux, ils dépendent principalement de l'effet toxique de l'amyloïde sur les neurones [40]. L'homologie des phénotypes (les troubles cognitifs) chez l'homme et la souris n'est donc pas fondée sur une homologie endophénotypique ou étiologique (*figure 1A*). Les modèles murins sont donc uniquement des modèles de cible (l'amyloïde) et ne sont prédictifs que de l'efficacité du médicament sur la cible amyloïde mais pas du devenir clinique des patients.

SUIVI PAR DES BIOMARQUEURS DE MODÈLES PRIMATES NON GÉNÉTIQUES

Face aux carences des modèles transgéniques d'amyloïdose, il paraît important d'explorer d'autres modèles potentiels de la MA. Au cours de nos travaux nous avons évalué les modifications endophénotypiques liées au vieillissement cérébral du microcèbe murin (*Microcebus murinus*) (**figure 1B**). Ce petit primate (12 cm) dont l'espérance de vie maximale en captivité atteint 12 ans est utilisé comme modèle du vieillissement cérébral [41]. Nous avons démontré que, en vieillissant, ces animaux développent des altérations cognitives et une atrophie cérébrale qui touche le noyau caudé, la substance blanche, le cortex temporal, cingulaire et occipital [42]. Une sous-catégorie d'animaux présente aussi une atrophie du septum et de l'hippocampe qui est corrélée aux troubles comportementaux [42]. L'origine de cette atrophie cérébrale reste cependant encore incertaine.

Nous avons également montré que certains animaux développent des dépôts amyloïdes intracellulaires [43] similaires à ceux détectés dans les formes précoces de la MA [4]. De plus, chez cet animal, l'accumulation d'amyloïde intracellulaire est associée à une réduction de l'amyloïde plasmatisque, qui reflète probablement le taux d'amyloïde présent dans l'espace intercellulaire cérébral. Nos données suggèrent donc que l'amyloïde commence par s'accumuler dans les cellules avant d'être libéré dans l'espace intercellulaire, lieu où les formes oligomériques d'amyloïde entraînent un processus toxique pour les synapses [44] et où l'amyloïde s'agrège pour former des plaques amyloïdes également toxiques.

Malgré leur caractérisation encore imparfaite, les microcèbes peuvent être utilisés pour évaluer des thérapies visant les formes précoces, asymptomatiques de la MA. Par exemple, nous avons révélé qu'ils développent des microhémorragies cérébrales suite à des immunothérapies, un résultat similaire à ceux décrits chez l'homme [45]. Des effets secondaires des immunothérapies qui n'ont encore jamais été décrits chez l'homme, comme une accumulation anormale de fer dans les plexus choroïdes, ont aussi été mis en évidence chez des microcèbes âgés [45]. Le microcèbe pourrait également être un modèle pertinent pour évaluer des interventions thérapeutiques longues, avec des thérapies à « large cible » et peu spécifiques. Plusieurs études ont suggéré que ces thérapies peuvent apporter un bénéfice pour retarder l'apparition de la MA [46]. Nous avons mis en évidence des améliorations cognitives dans des tâches explorant la mémoire spatiale et des améliorations du métabolisme cérébral chez des microcèbes supplémentés avec des acides gras polyinsaturés oméga-3 [47]. Ces améliorations cognitives sont cohérentes avec des améliorations cognitives détectées chez des patients MCI [48, 49] ou avec une forme légère d'Alzheimer [50] supplémentés avec des oméga-3. D'autres évaluations des effets de thérapies alimentaires (resveratrol par exemple) sont également en cours chez les microcèbes [51].

VERS DE NOUVELLES HYPOTHÈSES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : ÉVALUATION DU RÔLE CENTRAL DES AGENTS PROPAGATEURS DE MAUVAISE CONFORMATION

La mise au point de nouvelles thérapies repose sur l'identification de mécanismes physiopathogéniques de la maladie. Des données récentes suggèrent que des mécanismes moléculaires similaires se produisent pour les protéines amyloïdes ou tau et les prions. Pour ces derniers, les protéines normales ont une conformation riche en hélices alpha : leur structure secondaire a une forme en hélice liée à l'association de leurs groupements N-H avec leurs propres groupements C = O grâce à des ponts hydrogènes. Ces protéines peuvent être transformées en conformères insolubles, riches en hélices bêta et ainsi devenir pathologiques et infectieuses. La conformation en hélices bêta repose sur des ponts hydrogènes se mettant en place entre les groupements N-H et C = O de différentes protéines. Ici, nous nous focaliserons principalement sur l'importance de ces mécanismes pour les protéines amyloïdes. Les peptides A β natifs, générés par clivage protéolytique de l'APP, sont toujours produits dans le cerveau humain, où ils restent normalement dans un état soluble avec une conformation en hélices alpha (*figure 2*). Cependant, ces peptides peuvent adopter une conformation en feuillets beta qui favorise leur association en oligomères et en structures fibrillaires très toxiques (*figure 2*). L'évolution de la forme monomérique soluble vers la forme fibrillaire suit un *processus de « nucléation/propagation »*. Ces réactions de polymérisation sont constituées de deux phases : la phase initiale/primaire de nucléation (« phase de latence ») et la phase de nucléation secondaire (élongation ou phase de croissance).

Pendant la phase de nucléation primaire, les monomères natifs subissent une série de changements conformationnels cinétiquement défavorables et forment des espèces mal repliées ou des oligomères. Ces éléments sont instables parce que l'énergie nécessaire à la transition des protéines vers un état mal conformé ou agrégé (ou au maintien dans cet état) dépasse la quantité d'énergie nécessaire à la stabilisation des protéines dans un état bien conformé ou non agrégé. Toutefois, dans certaines conditions des formes multimériques stables appelées « noyaux » peuvent se former (losanges verts dans la *figure 2*). La phase de nucléation primaire est lente et nécessite du temps pour se produire en quantité significative. Plusieurs paramètres notamment un polymorphisme génétique déstabilisant l'A β ou la modulation de la concentration des monomères natifs peuvent affecter la vitesse de la phase de nucléation primaire.

Au cours de la phase de nucléation secondaire, les noyaux peuvent incorporer des monomères natifs en provoquant leur mauvaise conformation et cela crée des assemblages oligomériques ou fibrillaires dont la taille augmente. La fragmentation de ces assemblages crée des extrémités supplémentaires ce qui accélère encore l'agrégation des protéines. Contrairement à la nucléation primaire, les processus de nucléations secondaires se produisent rapidement. Ainsi, une fois que les noyaux

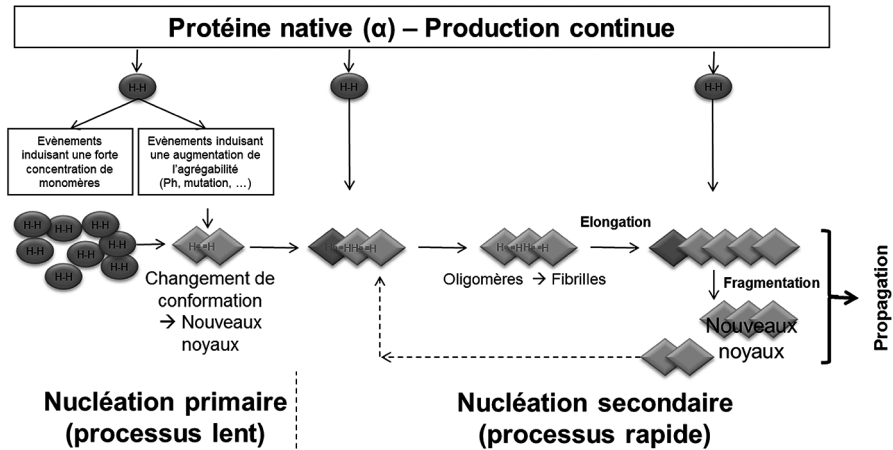


FIG. 2. — Processus de nucléation propagation. Les protéines natives, représentées par des ellipses bleues, sont produites de façon continue. Pendant la phase de nucléation primaire, ces monomères natifs subissent une série de changements conformationnels qui mènent à des formes multimériques stables appelées « noyaux » (losanges verts). Lors de la phase de nucléation secondaire, les noyaux interagissent avec les protéines natives en hélice alpha. Ces dernières prennent une conformation en hélice bêta et deviennent pathologiques. La fragmentation de séries de protéines pathologiques crée des nouveaux noyaux qui induisent la propagation locale ou à distance des protéines pathologiques.

amyloïdes sont formés, la cinétique d'évolution des lésions n'est plus déterminée par la vitesse de la nucléation primaire mais par le processus de nucléation secondaire qui induit une croissance exponentielle des assemblages de protéines mal repliées. En d'autres termes, une fois que la nucléation secondaire commence, la densité des lésions amyloïdes augmente rapidement et la pathologie se répand dans le cerveau [52]. De plus, les noyaux d'amyloïde semblent pouvoir migrer à distance de leur site de production en suivant, par exemple, les voies anatomiques [53]. Cela induit la propagation des lésions dans le cerveau.

Plusieurs études ont démontré que lorsque des échantillons de cerveau contenant des noyaux amyloïdes sont injectés dans le cerveau de modèles souris d'amyloïdose, l'apparition de la pathologie amyloïde est accélérée localement ou à distance du site d'injection. La réduction de la phase de latence d'apparition des lésions suggère que la pathologie est initiée directement au niveau de la phase de nucléation secondaire rapide et court-circuite la lente phase de nucléation primaire [53]. On parle alors d'un « effet d'ensemencement » lié à l'administration de noyaux de protéines mal conformées. De plus, la diffusion des lésions à distance du site d'injection rappelle les processus de diffusion de l'amyloïde dans le cerveau humain [7, 10]. Les protéines amyloïdes (et tau) sont donc des agents de « propagation de leur propre mauvaise conformation ». Cette nouvelle catégorie d'agents pathogènes, qui regroupait initialement principalement les prions, aurait donc une importance beaucoup plus grande qu'imaginé précédemment. Plusieurs caractéristiques remarquables ont été

mises en avant pour ces agents. Tout d'abord, comme pour les prions, il existe différentes « souches » de protéines pathologiques (amyloïde [54] ou tau [55]). En effet, les caractéristiques morphologiques des lésions (plaques amyloïdes ou tauopathie) du tissu injecté se retrouvent dans les lésions développées par l'animal receveur. Une autre caractéristique est que l'induction de pathologie peut se produire lors d'injections périphériques d'agents propagateurs de mauvaise conformation [56]. Cela suggère que l'origine d'une pathologie de mauvaise conformation pourrait être périphérique et non pas centrale comme imaginé jusqu'à maintenant.

Ces découvertes offrent la possibilité de créer des nouveaux modèles de la MA sur la base de l'administration locale d'échantillons de tissus Alzheimer et permettent d'évaluer des nouveaux mécanismes de la maladie. Par exemple, au cours de nos travaux chez des modèles primates, grâce à l'utilisation fine de biomarqueurs, nous pouvons démontrer que l'administration d'échantillons de cerveaux de patients Alzheimers induit des processus neurodégénératifs, associés à des atteintes fonctionnelles et comportementales [57].

CONCLUSION

Les nombreux échecs subis par la recherche de thérapies contre la MA ont permis d'initier des réflexions qui ont modulé notre vision de la pathologie et des stratégies de recherche translationnelle. Tout d'abord, en ce qui concerne les modèles animaux, ces dernières années ont vu deux évolutions importantes. 1. La réalisation d'essais cliniques d'envergure permet de comparer les résultats de traitements chez l'homme et chez les modèles animaux. 2. L'utilisation de biomarqueurs permet de définir des endophénotypes afin d'affiner les comparaisons entre les modèles animaux et l'homme. Si deux (endo)phénotypes sont homologues chez l'animal et l'homme, alors il est raisonnable de supposer que les résultats issus des recherches chez l'animal sont prédictifs des données chez l'homme. En cas de non homologie, on ne peut pas se prononcer sur la prédictivité du modèle. Des nouvelles hypothèses sont également apparues. Par exemple il semble que amyloïde et tau sont des agents de propagation de la mauvaise conformation des protéines. Cette hypothèse va mener à la création de nouveaux modèles animaux. Leur suivi en imagerie permettra de mieux comprendre la maladie et participera à la mise en place de nouvelles thérapies ou procédures prophylactiques contre la maladie d'Alzheimer.

RÉFÉRENCES

- [1] Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging and the Alzheimer's Association workgroup. *Alzheimers Dement.* 2011;7:280-92.

- [2] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 2014;13(6):614-29.
- [3] Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 2009;118(1):5-36.
- [4] Gouras GK, Tsai J, Naslund J, et al. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol.* 2000;156(1):15-20.
- [5] Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* 2005;8(1):79-84.
- [6] Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, et al. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2012;26(5):1946-59.
- [7] Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82:239-59.
- [8] Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* 2009;11(7):909-13.
- [9] Braak H, Del Tredici K. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol.* 2011;121(2):171-81.
- [10] Thal DR, Rub U, Orantes M, et al. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002;58(12):1791-800.
- [11] Duyckaerts C, Hauw JJ. Prevalence, incidence and duration of Braak's stages in the general population: can we know? *Neurobiol Aging.* 1997;18(4):362-9;discussion 89-92.
- [12] Gottesman I, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry.* 2003;160(4):636-45.
- [13] Reitz C, Mayeux R. Endophenotypes in normal brain morphology and Alzheimer's disease: a review. *Neuroscience.* 2009;164(1):174-90.
- [14] Apostolova LG. Alzheimer disease: 'generation next' in Alzheimer disease genetic studies. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(8):422-3.
- [15] Shen L, Thompson PM, Potkin SG, et al. Genetic analysis of quantitative phenotypes in AD and MCI: imaging, cognition and biomarkers. *Brain imaging and behavior.* 2014;8(2):183-207.
- [16] Silver M, Janousova E, Hua X, et al. Identification of gene pathways implicated in Alzheimer's disease using longitudinal imaging phenotypes with sparse regression. *Neuroimage.* 2012; 63(3):1681-94.
- [17] Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, et al. Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 2013;12(4):357-67.
- [18] Maruyama M, Shimada H, Suhara T, et al. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron.* 2013; 79(6):1094-108.
- [19] Villemagne VL, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, et al. In vivo evaluation of a novel tau imaging tracer for Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014;41(5):816-26.
- [20] Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, et al. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1992;42(3 Pt 1):631-9.
- [21] Mosconi L. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005;32(4):486-510.
- [22] Chen Y, Wolk DA, Reddin JS, et al. Voxel-level comparison of arterial spin-labeled perfusion MRI and FDG-PET in Alzheimer disease. *Neurology.* 2011;77(22):1977-85.
- [23] Fleisher AS, Houston WS, Eyler LT, et al. Identification of Alzheimer disease risk by functional magnetic resonance imaging. *Arch Neurol.* 2005;62(12):1881-8.

- [24] Sperling RA, Laviolette PS, O'Keefe K, et al. Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron*. 2009;63(2):178-88.
- [25] Jack CR, Jr., Wiste HJ, Knopman DS, et al. Rates of beta-amyloid accumulation are independent of hippocampal neurodegeneration. *Neurology*. 2014;82(18):1605-12.
- [26] Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's research & therapy*. 2014;6(4):37.
- [27] Pammolli F, Magazzini L, Riccaboni M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(6):428-38.
- [28] Ringel M, Tollman P, Hersch G, et al. Does size matter in R&D productivity? If not, what does? *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(12):901-2.
- [29] Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(3):203-14.
- [30] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992; 256(5054):184-5.
- [31] Willner P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1986;10(6):677-90.
- [32] Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999;400(6740):173-7.
- [33] Holmes C, Boche D, Wilkinson D, et al. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*. 2008; 372(9634):216-23.
- [34] Fox NC, Black RS, Gilman S, et al. Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology*. 2005;64(9):1563-72.
- [35] Vellas B, Carrillo MC, Sampaio C, et al. Designing drug trials for Alzheimer's disease: what we have learned from the release of the phase III antibody trials: a report from the EU/US/CTAD Task Force. *Alzheimers Dement*. 2013;9(4):438-44.
- [36] Delatour B, Guegan M, Volk A, et al. In vivo MRI and histological evaluation of brain atrophy in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2006;27(6):835-47.
- [37] Poisnel G, Herard A-S, El Tannir El Tayara N, et al. Amyloid deposits induce an increased regional cerebral glucose uptake in APP/PS1 mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33(9):1995-2005.
- [38] El Tannir El Tayara N, Delatour B, Volk A, et al. Detection of vascular alterations by *in vivo* magnetic resonance angiography and histology in APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *MAGMA*. 2010;23(1):53-64.
- [39] Jonckers E, Van Audekerke J, De Visscher G, et al. Functional connectivity fMRI of the rodent brain: comparison of functional connectivity networks in rat and mouse. *PLoS ONE*. 2011; 6(4):e18876.
- [40] Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. 2006;440(7082):352-7.
- [41] Languille S, Blanc S, Blin O, et al. The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. *Ageing Res Rev*. 2012;11(1):150-62.
- [42] Picq JL, Aujard F, Volk A, et al. Age-related cerebral atrophy in nonhuman primates predicts cognitive impairments. *Neurobiol Aging*. 2012;33(6):1096-109.
- [43] Roy M, Cardoso C, Dorieux O, et al. Age-associated evolution of plasmatic amyloid in mouse lemur primates: relationship with intracellular amyloid deposition. *Neurobiol Aging*. 2015; 36:149-56.

- [44] Lacor PN, Buniel MC, Chang L, et al. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci.* 2004;24(45):10191-200.
- [45] Joseph-Mathurin N, Dorieux O, Trouche S, et al. A β immunization in old mouse lemur primates induces cerebral microhemorrhages and accelerates age-associated iron deposits in the choroid plexus. *Neurobiol Aging.* 2013;34(11):2613-22.
- [46] Carrie I, van Kan GA, Gillette-Guyonnet S, et al. Recruitment strategies for preventive trials. The MAPT study (MultiDomain Alzheimer Preventive Trial). *J Nutr Health Aging.* 2012; 16(4):355-9.
- [47] Pifferi F, Dorieux O, Castellano CA, et al. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids enhance resting state brain glucose utilization and reduce anxiety in an adult non-human primate, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *J lipid Res.* 2015;56(8):1511-8.
- [48] Chiu CC, Su KP, Cheng TC, et al. The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32(6):1538-44.
- [49] Kotani S, Sakaguchi E, Warashina S, et al. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosc Res.* 2006;56(2):159-64.
- [50] Scheltens P, Twisk JW, Blesa R, et al. Efficacy of Souvenaid in mild Alzheimer's disease: results from a randomized, controlled trial. *J Alzheimers Dis.* 2012;31(1):225-36.
- [51] Dal-Pan A, Pifferi F, Marchal J, et al. Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate. *PLoS ONE.* 2011; 6(1):e16581.
- [52] Eisele YS. From soluble abeta to progressive abeta aggregation: could prion-like templated misfolding play a role? *Brain Pathol.* 2013;23(3):333-41.
- [53] Jucker M, Walker LC. Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol.* 2011;70(4):532-40.
- [54] Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, et al. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science.* 2006;313(5794):1781-4.
- [55] Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, et al. Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron.* 2014;82(6):1271-88.
- [56] Eisele YS, Fritsch SK, Hamaguchi T, et al. Multiple factors contribute to the peripheral induction of cerebral beta-amyloidosis. *J Neurosci.* 2014;34(31):10264-73.
- [57] Gary C, Pifferi F, Koch J, et al. Experimental transmissibility of Alzheimer pathology in a non-human primate. *Neurodegenerative Diseases.* 2015;15 (suppl 1):74.

DISCUSSION

M. Jean-Luc de GENNES

D'autres mécanismes méritent aussi d'être étudiés dans la maladie d'Alzheimer. Ne faudrait-il pas étudier des anomalies éventuelles des apoprotéines transporteuses des lipides et surtout du cholestérol (95 % dans le cerveau contre 5 % pour le reste de l'organisme). Ce sont des Apo E qui font le transport au lieu de l'Apo B ; et ces Apo E augmentent chez l'homme de 5 à 10 fois ses risques d'Alzheimer.

Oui, c'est vrai qu'on ne peut pas limiter les causes de l'apparition de la maladie d'Alzheimer uniquement aux lésions β -amyloïdes ou Tau. Nous avons récemment publié un article qui montre le rôle majeur de l'altération de l'homéostasie du cholestérol dans

le processus neurodégénératif (Djelti *et al.*, 2015). Un excès de cholestérol neuronal induit un processus de mort neuronal par apoptose et une atrophie cérébrale importante. Cet effet est amplifié par la présence de plaques amyloïde, et l'excès de cholestérol neuronal pourrait donc être un élément qui amplifie l'impact délétère de l'amyloïdose sur le cerveau.

En ce qui concerne l'apolipoprotéine, la comparaison du statut de différentes espèces animales révèle que l'espèce humaine est la seule à présenter un polymorphisme allélique (E2, E3, E4) (Finch & Sapolsky, 1999). L'allèle E4 est un facteur de risque important pour la maladie d'Alzheimer (Strittmatter *et al.*, 1993) et les autres formes sont protectrices. Curieusement, c'est l'allèle E4 qui est l'isoforme ancestrale des mammifères (Mahley *et al.*, 1988) et les animaux ne développent pas la maladie d'Alzheimer de façon spontanée. Les isoformes E3 et E2 seraient apparues au cours de l'évolution de l'espèce humaine. Il est difficile de comprendre l'avantage évolutif conféré par ces nouvelles isoformes même si plusieurs hypothèses ont été élaborées (Finch & Sapolsky, 1999).

Djelti F *et al.* CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain*. 2015;138(Pt 8):2383-98.

Finch CE, Sapolsky RM. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms. *Neurobiol Aging*. 1999;20(4):407-28.

Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240:622-30.

Strittmatter WJ *et al.* 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 USA*. 1993;90(5):1977-81.

M. Jean-Jacques HAUW

Les deux protéines mal conformées de la maladie d'Alzheimer surviennent à des périodes différentes puisque la protéine tau pathologique est observée dès l'enfance et à l'adolescence, tandis que le peptide A β apparaît plus tardivement, à partir de 40 ans. Pensez-vous qu'il s'agisse de la conséquence, dans les deux cas, d'une anomalie de processus général de conformation (par exemple d'une dysfonction d'une protéine chaperone) ? Pourrait-il s'agir, au contraire, de la modulation de la conformation d'une de ces protéines par la malconformation de l'autre ?

Je ne pense pas qu'une anomalie du processus général de conformation puisse expliquer l'apparition de la pathologie tau ou A β . Un processus aspécifique qui se produirait aussi tôt dans la vie d'un individu aurait des conséquences majeures multiples sur l'ensemble de l'organisme. L'hypothèse de la modulation de la conformation d'une des protéines par une autre semble plus plausible. Cependant, les délais entre l'apparition des deux lésions sont énormes. Tau reste confinée au locus coeruleus et aux cortex transentorhinal/entorhinal (stades I-II de Braak) pendant environ 40 ans avant d'évoluer vers l'hippocampe et le reste du néocortex (stades III-VI de Braak)(Duyckaerts *et al.*, 1997 ; Braak & Del Tredici, 2015). Cette évolution est quasiment concomitante de l'apparition de l'amyloïde dans le néocortex. Il serait donc possible que l'amyloïdose favorise la migration ou la maturation de la tauopathie. Cependant Braak nous rappelle que la tauopathie peut évoluer en l'absence d'A β (Braak & Del Tredici, 2015). De plus, chez les modèles animaux, peu d'études montrent de façon définitive une interaction massive entre tau et A β . En particulier, aucun élément ne permet de dire qu'une

interaction entre amyloïde et tau est liée à leurs conformations respectives. Une troisième option peut être envisagée. La malconformation est un mode de réaction extrêmement répandu dans le fonctionnement normal d'un organisme. Il est possible que les malconformations de tau et d'A β soient des réactions communes à un processus pathologique unique dont nous ignorons encore en partie la nature. Une dernière option proposée par Braak est que les neurones touchés par la pathologie tau initient une sécrétion anormale d'A β qui entraîne alors son accumulation anormale (Braak & Del Tredici, 2015).

Duyckaerts C, Hauw JJ. Prevalence, incidence and duration of Braak's stages in the general population: can we know? *Neurobiol Aging*. 1997;18(4):362-9; discussion 89-92.

Braak H, Del Tredici K. The preclinical phase of the pathological process underlying sporadic Alzheimer's disease. *Brain*. 2015;138(10):2814-33.