La mutation PS1 : caractérisation phénotypique neurochimique et neuropathologique de souris transgéniques, modèles de la maladie d'Alzheimer

Rozat Houssin Jazi

▶ **To cite this version:**

Rozat Houssin Jazi. La mutation PS1 : caractérisation phénotypique neurochimique et neuropathologique de souris transgéniques, modèles de la maladie d'Alzheimer. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10063 . tel-01777271

HAL Id: tel-01777271
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777271

Submitted on 24 Apr 2018

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université Henri Poincaré – Nancy 1
Faculté de Médecine

Ecole doctorale :
Biologie Santé Environnement

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université UHP-NANCY-1

Mention : Biologie Cellulaire et Nutrition

Rozat JAZI

La mutation *PS1* : caractérisation phénotypique neurochimique et neuropathologique de souris transgéniques, modèles de la maladie d'Alzheimer

Thèse dirigée par
Pr. Catherine STRAZIELLE

Soutenue le 06 Juillet 2009

JURY

Dr. Chantal MATHIS	**CR., CNRS, Strasbourg : Rapporteur externe**
Dr. Rita RAISMAN-VOZARI	**DR., INSERM, U 679, Paris : Rapporteur externe**
Pr. Catherine STRAZIELLE	**PR., INSERM, U 954, Nancy : Directeur de thèse**
Pr. Simon THORNTON	**PR., INSERM, U 648, Nancy : Président**

Remerciements

Cette thèse est le fruit de travaux de recherche menés au sein du Laboratoire INSERM U954 de la Faculté de Médecine dirigée par Monsieur le professeur ***Jean Louis GUEANT****. Je l'en remercie sincèrement.*

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, Mademoiselle ***Catherine STRAZIELLE*** *Professeur à l'Université Henri Poincaré, chercheur associé au Laboratoire Inserm U954 et de microscopie électronique, pour m'avoir proposé ce sujet de recherche, pour les conseils et les multiples idées qu'elle a su m'apporter tout au long de ces années de travail*

J'adresse mes remerciements et ma reconnaissance à Monsieur le professeur ***Jean Yve JOUZEAU****, directeur de l'école doctorale BIOSE pour son soutien.*

.

Je remercie également Monsieur le Professeur ***Robert LALONDE*** *de la Faculté de Médecine de Rouen qui a fourni les souris et m'a donné un enseignement sur les tests comportementaux effectués pour ses conseils précieux, sa générosité.*

Je tiens, à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury presidé par Monsieur le professeur ***Simon THORNTON,*** *INSERM U.961-UHP, Nancy 1.et les remercie de l'intérêt qu'ils ont montré pour cette thèse et de leur disponibilité.*
Aux deux rapporteurs :

Madame le docteur ***Chantal MATHIS****, chargé de recherche ULP/CNRS, de l'université de Strasbourg.*

Madame le docteur ***Rita RAISMAN****, directeur de recherche INSERM U.679-Neurol. Thérapeutique Exp.-NEB, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris*

Mes remerciements et ma profonde reconnaissance s'adressent aussi à Monsieur le doyen de la faculté de chirurgie dentaire le docteur ***Pierre Bravetti*** *pour son soutien et son encouragement, ainsi que à monsieur le docteur* ***Jacques Schouver*** *pour son encouragement.*

J''exprime toute mon amitié à toute l'équipe du laboratoire de microscopie électronique, tout particulièrement, Monsieur le professeur ***Foliguet*** *qui a accepté que ce travail soit effectué au sein de son laboratoire, ainsi que madames* ***Jacqueline Chanel*** *et* ***Maryse Adam,*** *pour leur aide et leur soutien. Mes remerciements à monsieur le professeur* ***Ali Dalloul*** *de departement d'histologie pour ses conseils et son encouragement.*

Que toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont aidé à progresser dans mon travail trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à préciser que cette aventure humaine m'a apporté beaucoup, aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan relationnel, j' ai non seulement appris à analyser le comportement animal, mais aussi à mieux comprendre la complexité des relations humaines, ce fut une aventure enrichissante à tout point de vue.

Dédicace

A mes racines : en Syrie

A mes branches : en France

« Ce fruit est là, grâce à vous
et toujours dans un but
de chercher la lumière ».

Ce travail est dédicacé en hommage à mon père qui m'a toujours encouragée et soutenue dans mes études, j'espère que tu es, comme toujours, fier de moi, là où tu es maintenant.

Le mérite de ce travail revient à ma petite famille : mon cher mari Raid qui m'a beaucoup aidé grâce à son expérience dans ce domaine et son soutien inconsiderable, mes adorables enfants : Fadi, Ali, Dany qui ont supporté parfois mes changements d'humeur et mon manque de disponibilité pendant toutes ces années de travail.
Merci de tout cœur, grâce à votre affection, votre soutien et vos sacrifices, ce travail est abouti.

A ma mère et à mes sœurs et frères, tout particulièrement ma sœur Samaher et mon beau frère Firas.

A mes beaux parents.

A mes amis, du et hors laboratoire, merci de m'avoir apporté votre soutien quand j'en avais besoin : Maryse, Christelle, Bernadette, Céline, Claudia, Mary, Christine, Françoise, Geneviève…, et tout particulièrement Chantal et Elie pour leur aide.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES **1**

LISTE DES ABREVIATIONS : **3**

INTRODUCTION **4**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **8**

1. DIAGNOSTIC ET SYMPTOMATOLOGIE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 9
   1.1 Diagnostic clinique *9*
   1.2. Les stades cliniques de la maladie d'Alzheimer *10*
   1.3. Les difficultés liées au diagnostic *11*
2. LA CARACTERISATION *POST-MORTEM* DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 12
   2.1. Les lésions microscopiques *12*
   2.1.1. Les plaques séniles *12*
   2.1.2. Les dégénérescences neurofibrillaires *14*
   2.1.3. Les pertes synaptiques *15*
   2.1.4. Les pertes neuronales *16*
   2.2. Les lésions macroscopiques *18*
   2.2.1. Les atteintes régionales *18*
   2.2.2. Les altérations neurochimiques résultantes *18*
3. CAUSES ET FACTEURS DE RISQUE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER 20
   3.1 Les facteurs génétiques des formes familiales *20*
   3.2. Les facteurs génétiques des formes sporadiques *22*
   3.3. Les facteurs de risque épigénétiques et environnementaux *23*
4. LA FORMATION DU PEPTIDE AMYLOÏDE BETA (Aβ) OU AMYLOÏDOGENESE 23
   4.1. L'amyloid Precursor Protein (APP) *23*
   4.2. Le métabolisme de l'Amyloid Precursor Protein (APP) *24*
   4.3. Les présénilines 1 et 2 et l'activité γ-secrétase *27*
   4.4. La toxicité du peptide Aβ *30*
5. LA CASCADE AMYLOÏDE 31
   5.1. Rôle des lésions histopathologiques dans la maladie *31*
6. DEBIT SANGUIN CEREBRAL ET CONSOMMATION DE GLUCOSE 34
7. LES ALTERATIONS MITOCHONDRIALES DANS LA MA 36
   7.1. Les modifications morphologiques *37*
   7.2. Les enzymes mitochondriales dans la maladie d'Alzheimer *38*
   7.2.1. Le cycle de la glycolyse *38*
   7.2.2 Le métabolisme énergétique et l'activité neuronale *39*
   7.3. Mitochondries et radicaux libres dans la MA *42*
   7.4. Oxydation et mutation des bases nucléiques mitochondriales dans la MA. *45*
8. LE SYSTEME CHOLINERGIQUE ET LA MALADIE D'ALZHEIMER 46
   8.1. L'innervation cholinergique du système nerveux central *47*
   8.2. Les lésions cholinergiques dans la maladie d'Alzheimer *48*
   8.3. L'acétylcholinestérase *50*

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL **53**

RESULTATS ET DISCUSSION **58**

1ERE PARTIE **59**

I.1. INTRODUCTION 60
I. 2. LES MODELES ANIMAUX 60
   I.2.1.La mutation PS1-A246E *60*
   I.2.2.La mutation PS1-I213T *62*
I.3. ETUDES COMPORTEMENTALES 63
   I.3.1. Evaluation neurologique globale *63*
   I.3.2. Evaluation de l'activité d'exploration et de l'anxiété *64*
   I.3.3. Evaluation de la coordination motrice *66*

I.3.4. Evaluation des capacités d'apprentissage *66*
I.3.5. Tableau récapitulatif *67*

2EME PARTIE **68**

II.1 PUBLICATION N°1 69
II.1.1 Objectifs de l'étude *69*
II.1.2 Manuscrit *71*
II.1.3 Synthèse de la publication *91*
II.2. PUBLICATION N°2 93
II.2.1. Objectifs de l'étude *93*
II.2.2. Manuscrit *94*
II.2.3. Synthèse de la publication *103*

3EME PARTIE **105**

III.1. PUBLICATION N°3 106
III.1.1. L'objectif de cette étude : *106*
III.1.2. Manuscrit *107*
III.1.3. Synthèse de la publication *116*
III.2. LES ETUDES ANNEXES 118
III.2.1. Expression du peptide Aβ : *118*
III.2.2. L'étude des bases oxydées d'ADN *120*
III.2.3. l'étude métabolique régionale *123*

4EME PARTIE DISCUSSION GENERALE **126**

5EME PARTIE CONCLUSION ET PERSPECTIVES DU RAVAIL **134**

ANNEXE MATERIELS ET METHODES **139**

PROTOCOLES TECHNIQUES 140
I. PREPARATION DES TISSUS 140
1.1. Prélèvement de l'encéphale et préparation des coupes *140*
1.2. Protocole pour la réalisation des lames gélatinées *140*
2. MARQUAGES HISTOCHIMIQUES 141
2.1. Marquage du cytochrome oxydase (COX) *141*
2.2. Marquage de l'acétylcholinestérase (AChE) *143*
2.3. Marquage de la nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NAPDH-d) *146*
2.4. L'analyse quantitative des marquages histochimiques *147*
3. COLORATIONS HISTOLOGIQUES 148
3.1. Coloration au crésyl violet *148*
3.2. Coloration au Fluoro-Jade B *149*
4. MARQUAGES IMMUNOHISTOLOGIQUES 150
4.1-Protocole de marquage immunohistochimique de l'Aß-40-42 ..... *150*
4.2. Marquage immunohistochimique de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) *152*
4-3- Le marquage immunohistochimique de l'oxyde nitrique synthétase neuronal (nNOS) *153*
4.4. L'analyse des marquages immunohistochimiques *154*

BIBLIOGRAPHIE **156**

LISTE DES ABREVIATIONS :

ACh	acétylcholine
AChE	acétylcholinestérase
ADP	adénosine diphosphate
APP	protéine précurseur amyloïde
ATP	adénosine triphosphate
Aβ-42	peptide amyloïde-bêta- 42
BChE	butyrylcholinésterase
ChAT	cholinacétyltransférase
COX	cytochrome oxydase
CT-scan	tomographie axiale calculée par ordinateur
DNF	dégénérescence neurofibrillaire
FAD	forme autosomique dominante
$FADH_2$	flavine-adénine dinucléotide reduit
KGDHC	complexe α-ketoglutarate déhydrogénase
MA	maladie d'Alzheimer
MCI	troubles cognitifs légers
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NMDA	N-méthyl-D-aspartate (recepteur glutamatergique)
NO	mono oxyde d'azote
8-OHdG	8-hdyroxy-2'-deoxyguanosine.
PDHC	complexe de pyruvate déhydrogénase
PET-scan	tomographie d'émission positron
PS1	préséniline 1
ROS	espèces réactives de l'oxygène
SDH	succinate déshydrogénase

SPECT-scan : tomographie cérébrale d'émission monophotonique

INTRODUCTION

Introduction

La Maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative liée au vieillissement. Elle se définit sur le plan clinique par l'apparition progressive d'un syndrome démentiel qui touche en premier lieu les fonctions cognitives. Aujourd'hui, des études statistiques démontrent que les hommes autant que les femmes, toutes ethnies confondues, sont susceptibles de développer cette maladie. Dans les pays occidentaux où la population est vieillissante, la MA est la première cause de démence et la quatrième cause de décès, précédée par les maladies cardiaques, le cancer et les accidents vasculaires cérébraux. Elle survient en moyenne vers 65 ans et concerne actuellement environ 350.000 personnes en France et près de 25 millions de personnes dans le monde (Gallez, 2005).

La MA se caractérise par la présence, au niveau du système nerveux central, de plaques séniles extracellulaires formées principalement du peptide ß-amyloïde (ou Aβ) ainsi que d'amas neurofibrillaires intracellulaires (Cummings et al., 1998), d'une atteinte du système cholinergique à l'origine de troubles cognitifs importants, d'une perte neuronale et synaptique spécifiques à certaines régions antérieures de l'encéphale, et d'une baisse du débit sanguin cérébral et de l'activité métabolique cérébrale (Selkoe, 1999 ; Vickers et al., 2000).

Bien que l'étiologie de la MA soit multifactorielle incluant des facteurs génétiques et environnementaux, il existe des formes autosomiques dominantes de la maladie (FAD) caractérisées par la précocité d'apparition de la maladie (Robakis et al., 1987; Goate et al., 1991; Campion et al., 1995; St George-Hyslop, 2000).

La MA est décrite pour la première fois par le psychiatre allemand Aloïs Alzheimer (1864-1915) en 1906 à propos d'une patiente présentant un syndrome démentiel et des caractéristiques histopathologiques particuliers; en 1910, la communauté médicale de l'époque donne à cette forme de démence le nom d'Alzheimer même si les lésions cérébrales telles que les plaques séniles et les enchevêtrements neurofibrillaires avaient déjà été décrites antérieurement par des anatomopathologistes. Après une longue période durant laquelle les seuls acquis concernent l'histologie des lésions cérébrales caractéristiques, il faut attendre la dernière décennie du XXième siècle et la formidable explosion technologique en

biologie moléculaire et en imagerie médicale pour que les connaissances concernant cette maladie évoluent considérablement. A l'aube du XXIème siècle, une révolution se produit lorsque des Equipes montrent sur différentes souches de souris transgéniques Alzheimer que l'immunisation par le peptide Aβ diminue la quantité des dépôts amyloïdes ainsi que les déficits cognitifs observés chez ces animaux (Schenk et al., 1999; Bard et al., 2000; Gelinas et al., 2004). Si les premiers essais thérapeutiques sont interrompus brutalement un an après, de nombreux laboratoires travaillent depuis, sur des approches vaccinales alternatives et moins dangereuses.

Aloïs Alzheimer ne se doutait certainement pas que son nom allait ainsi passer à la postérité. La MA constitue actuellement une priorité, au niveau de la recherche médicale mais aussi en matière de politique de santé pour au moins les 30 prochaines années et près de 60.0000 articles ont déjà été publiés, à ce jour, dans le domaine. Ainsi, toute tentative de synthèse bibliographique exhaustive sur la maladie est difficile, voire impossible.

L'équipe de recherche du laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse travaille sur la caractérisation phénotypique comportementale et neurochimique de modèles animaux des maladies neurodégénératives humaines et notamment la maladie d'Alzheimer. Ces modèles animaux permettent d'appréhender la pathologie au sein de systèmes intégrés et ainsi, d'établir le lien entre les résultats obtenus dans les études cellulaires et la symptomatologie clinique chez l'homme.

Lorsque j'ai débuté, une expertise comportementale de différentes mutations des gènes *APP (amyloid precursor protein)* et *PS1 (presenilin1)* impliqués dans la MA, était en cours de réalisation au sein de l'équipe. Nous nous sommes vus confier la tâche d'étudier les altérations neurochimiques et histopathologiques des deux modèles de mutation *PS1* dont disposait le laboratoire. L'étude comportementale ayant révélé une faible atteinte des fonctions cognitives dans ces deux modèles, l'expertise neurochimique de ces modèles offrait la possibilité d'étudier les altérations précoces pré-cliniques de la maladie permettant ainsi de tester la validité de marqueurs précoces de la maladie et cibler des pistes pour une thérapie préventive.

Cet ouvrage s'organise en 4 parties principales.

Dans un premier temps, après une description générale des caractéristiques cliniques et histopathologiques de la MA, une synthèse bibliographique est réalisée sur l'étiopathogénie et la physiopathologie de la maladie. Les hypothèses "mitochondriale", "oxydative" et "cholinergique" y sont traités en détails car nos

études expérimentales sont ciblées dans ces domaines. Après avoir défini les objectifs spécifiques de l'étude en deuxième partie de l'ouvrage, la caractérisation phénotypique comportementale des mutations *PS1* fait l'objet d'un premier chapitre de la section "Résultats", servant de préambule aux études neurochimiques : elle résume un article de synthèse sur le sujet, publié par l'équipe du laboratoire, et pour lequel je suis co-auteur. La troisième partie proprement dite du manuscrit présente l'ensemble des résultats neurochimiques. Cette partie s'articule autour de 3 articles pour chacun desquels une introduction et une synthèse des résultats sont réalisées.

Enfin, nous analysons, dans une discussion générale, les résultats obtenus dans notre travail avec les données déjà publiées sur le sujet.

Nous avons regroupé toutes les techniques expérimentales utilisées pour la réalisation de notre projet dans une section "Matériels et Méthodes" que nous avons placée en annexe à la fin de cet ouvrage.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Au cours de vieillissement, un ensemble de facteurs génétiques et/ou environnementaux peuvent faire basculer l'individu vers la cascade pathologique de la maladie d'Alzheimer (MA) par l'intermédiaire de mécanismes multiples dont la plupart restent à élucider.

La MA se définit par l'association sur le plan clinique de l'apparition progressive d'une démence dégénérative caractérisée par des troubles de la mémoire, une atteinte de l'innervation cholinergique du cerveau antérieur, et sur le plan histopathologique, par la présence de lésions cérébrales caractéristiques, les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires.

1. Diagnostic et symptomatologie de la maladie d'Alzheimer

1.1 Diagnostic clinique

La mémoire est perturbée de manière systématique et précoce dans la MA (Dubois et al., 1998). Les déficits de mémoire épisodique à long terme (durant les processus d'acquisition, de stockage et de récupération) surviennent au préalable, avant ceux de la mémoire de travail à court terme. Ces troubles mnésiques sont parfois les seuls signes présents pendant plusieurs années (Weintraub and Mesulam, 1993). Les études montrent que les fonctions exécutives déclinent rapidement surtout lors de la réalisation de tâches nécessitant des capacités de flexibilité mentale, d'autocontrôle, ainsi que de structuration temporelle et spatiale (McKhann et al., 1984).

D'autres désorganisations cognitives plus hétérogènes apparaissent également telles que les troubles de l'attention, des phénomènes d'aphasie (troubles du langage), d'apraxie (incapacité à réaliser des gestes ou écrire) ou d'agnosie (incapacité à reconnaître ou identifier des objets; Graham et al., 2004; Helmes et al., 2002; Jacobs et al., 1995).

Au cours de la MA, des symptômes comportementaux et psychologiques sont fréquents et précoces. Ils aggravent les troubles cognitifs des patients et diminuent la tolérance de leur entourage. A un stade précoce de la maladie, les symptômes "négatifs" sont les plus constants, assimilables à une indifférence affective, une

dysphorie et une apathie, conséquences directes d'une perte de motivation et d'initiative (Pilorge, 1997). A un stade plus tardif, les symptômes peuvent être contraires et regrouper des psychoses, une agitation (activités motrices et verbales inappropriées agressives ou non), des anxiétés, voire de la dépression, et plus rarement des désinhibitions (Chen et al., 1991; Chung and Cummings, 2000; Daffner et al., 1992; Frisoni et al., 1999; Hart et al., 2003; Petry et al., 1988; Senanarong et al., 2004). Les troubles du sommeil et du cycle circadien apparaissent également, associés à des troubles de l'alimentation, souvent sur le mode d'une anorexie pouvant conduire à une dénutrition.

Des signes neurologiques somatiques apparaissent généralement au stade tardif de la maladie et sont marqués par des troubles posturaux et de la marche (Huff et al., 1987; Pettersson et al., 2002). Les chutes peuvent devenir fréquentes. Des troubles moteurs dominés par la bradykinésie et l'akinésie sont également possibles. Certains malades sont atteints de réflexes myoclôniques et de convulsions, indices fréquemment observés dans les cas d'épilepsie (Chen et al., 1991; Förstl et al., 1992; Huff et al., 1987).

1.2. Les stades cliniques de la maladie d'Alzheimer

L'évolution de la MA est variable d'un individu à l'autre et peut s'échelonner sur 3 à 20 ans, la durée moyenne de survie étant de 10 ans (Weintraub and Mesulam, 1993).

La chronologie de la MA est généralement décrite selon 3 stades :

- La phase précoce ou initiale : les premiers symptômes légers apparaissent avec une prédominance de troubles bénins de la mémoire et des modifications légères mais détectables de la personnalité. La personne est généralement consciente du diagnostic.
- La phase intermédiaire ou modérée : le syndrome démentiel se précise. Le patient perd son autonomie, les troubles de mémoire s'aggravent associés à des pertes du sens de l'orientation dans le temps et l'espace.
- La phase tardive ou avancée : la démence est alors majeure, la communication est impossible et l'autonomie nulle.

De nombreux travaux de recherche clinique portent actuellement sur les troubles cognitifs légers (Mild Cognitive Impairment, MCI) et les phases pré-démentielles. Ces troubles cognitifs pourraient évoluer dans 15 à 20% des cas vers

une démence de type Alzheimer. Les facteurs protecteurs et/ou prédicateurs de l'évolution des MCI vers la démence restent encore à définir (Petersen et al., 2001).

1.3. Les difficultés liées au diagnostic

Le diagnostic positif du syndrome démentiel est déterminé sur un ensemble de critères répondant à une standardisation internationale et identifiés à partir d'un examen clinique et neuropsychologique. L'instrument d'évaluation cognitive de référence le plus largement utilisé est le "Mini-Mental State Exam" (MMSE, Derouesné et al., 1999). C'est un examen de dépistage préliminaire. Il est suivi, dans un second temps, par un examen clinique plus complet regroupant l'anamnèse du patient, un examen physique et neuropsychologique ainsi qu'un bilan biologique. Parmi les marqueurs biochimiques utilisés, il y a le taux de peptide Aβ-42 dans le liquide céphalo-rachidien, la protéine tau, et la concentration plasmique de peptide Aβ-42 (Andreasen and Blennow, 2002). L'électroencéphalogramme (EEG) et l'imagerie sont également des éléments importants du diagnostic. L'imagerie structurelle (CT-scan, IRM) et fonctionnelle (PET-scan, SPECT-scan) (Anderson et al., 2005) évaluent l'atrophie régionale hippocampique par la mesure de l'épaisseur de la partie interne du lobe temporal droit (Pasquier F, 1994) mais aussi du lobe frontal; elles évaluent également la participation vasculaire et les anomalies de substance blanche, ceci dans un but de diagnostic différentiel. Le PET-scan est utilisé pour la détection d'un déclin métabolique régional (métabolisme de glucose dans le cerveau), le SPECT-scan pour mesurer le débit sanguin cérébral.

Malgré les rapides progrès en matière de diagnostic, il n'existe encore aucun consensus sur l'existence de marqueurs biologiques et/ou radiologiques suffisamment fiables et spécifiques pour affirmer le diagnostic d'une démence de type Alzheimer. Les différents examens exposés précédemment contribuent à une meilleure standardisation des critères diagnostiques des différents types de syndromes démentiels. Ces critères ont été validés par de nombreuses études et par la pratique clinique. Ils permettent en outre d'écarter un certain nombre d'autres types de démences (dépression, démences vasculaires, dégénérescences fronto-temporales et démences à corps de Lewy). Ils permettent aussi de retenir le diagnostic de syndrome démentiel de type Alzheimer " MA probable" ou "MA possible" avec une probabilité comprise entre 90 et 95% (Kantarci et al., 2003; McKhann et al., 1984).

Toutefois, seul l'examen histopathologique de l'encéphale permet de confirmer le diagnostic de façon définitive. On ne parlera de "MA certaine" que si l'examen neuropathologique *post-mortem* du cerveau révèle la présence des deux types de lésions caractéristiques de la maladie, les plaques séniles extracellulaires constituées de dépôts amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires intraneuronales formées de protéines tau anormalement phosphorylées, ces deux types de lésions étant localisés préférentiellement dans les régions hippocampiques et corticales associatives.

Selon Selkoe (2001), les modifications neuropathologiques commenceraient 20 à 30 ans avant les premiers symptômes cliniques.

2. La caractérisation *post-mortem* de la maladie d'Alzheimer

Décrites pour la première fois par Aloïs Alzheimer lui-même (1906), les deux lésions histologiques caractéristiques de la MA, les plaques amyloïdes dites plaques séniles (PS) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), sont obligatoirement observées en microscopie après coloration histologique (Perl et al., 2000), la limite de résolution nécessaire (quelques micromètres) pour les mettre en évidence n'étant pas encore possible avec des méthodes non-invasives d'imagerie cérébrale.

D'autres atteintes tissulaires sont associées à ces lésions (Selkoe, 2001). Les histopathologistes distingueront, par conséquent, les lésions microscopiques des lésions macroscopiques.

2.1. Les lésions microscopiques

2.1.1. Les plaques séniles

Les plaques séniles sont des lésions extraneuronales qui se forment dans le parenchyme extracellulaire et que l'on rencontre dans le vieillissement cérébral physiologique. Elles sont également présentes dans la trisomie 21 et les démences mixtes à corps de Lewy. Dans la MA, elles sont distribuées dans la quasi-totalité du néocortex et leur densité, supérieure à celle des sujets normaux, ne semble pas corrélée au degré de démence (Mirra et al., 1991).

Les plaques séniles sont constituées principalement d’agrégats d’un fragment peptidique insoluble et toxique appelé peptide amyloïde-β (Aβ) de 4 KDa dont la taille varie de 39 à 43 acides aminés issu du clivage protéolytique séquentiel de son

précurseur, la protéine APP (pour Amyloid Precursor Protein; Gleener et al., 1984 ; Gunnar et al., 2005; Master et al., 1985 ; Wong et al., 1985). La nature amyloïde de ces dépôts est mise en évidence par la thioflavine ou le rouge Congo, des colorants révélant spécifiquement la structure β à feuillets plissés des constituants protéiques.

L'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les différentes formes de peptide Aβ (1-40 ou 1-42) a permis de distinguer différents types de plaques séniles que l'on peut identifier séparément ou simultanément dans les différentes régions cérébrales (*Figure 1*) :

- La plaque primitive ou diffuse est immature. Elle résulte de l'accumulation de peptide Aβ-42 non fibrillaires (non-Congophyle). Les dépôts sont irréguliers, volumineux et relativement mal délimités au sein du parenchyme cérébral (Gowing et al., 1994 ; Lalowski et al., 1996).

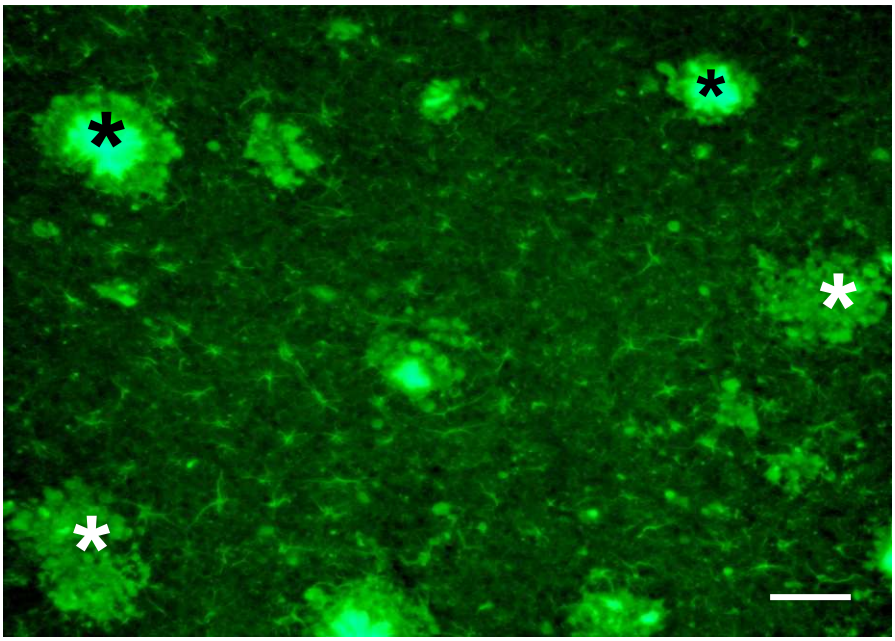


***Figure 1** : Coloration au fluoro-jade B des différents types de plaques (plaques diffuses = étoile de couleur blanche et plaques neuritiques = étoile de couleur noire) et de la glie (astrocytes réactifs de forme étoilée et cellules microgliales de forme arrondie) dans le cortex préfrontal de la souris transgénique APP 23 (mutation suédoise).*
(photo réalisée au sein du laboratoire - barre d'agrandissement = 100 µm)

- La plaque neuritique, mature, forme une lésion composite. Elle est formée d'un dépôt central de peptide Aβ sous forme fibrillaire ou agrégée entouré d'une couronne de neurites dystrophiques chargés en protéine tau, preuves d'une mort cellulaire (Duyckaerts et al., 1999). Ces plaques sont associées à

une réaction inflammatoire massive définie par la présence en leur sein de plusieurs types d'interleukines et en périphérie de cellules microgliales activées, d'astrocytes réactifs et de radicaux libres (Eikelenboom et al., 2002). La plaque compacte ne contient plus qu'un noyau de dépôt amyloïde compact, les débris ayant été phagocytés par les macrophages et la microglie.

Des dépôts de peptide Aβ se produisent également au niveau de la paroi des artères et des veines, méningées ou parenchymateuses, ainsi que dans les capillaires déterminant un épaississement progressif de la membrane basale et une perte progressive de l'élasticité des microvaisseaux (Kalaria, 1997).

Des études sur la chronologie d'apparition des dépôts d'amyloïde montrent que les agrégats de peptides Aβ-42 précèdent ceux d'Aβ-40 (Iwatsubo et al., 1994). Les dépôts diffus seraient à l'origine des plaques neuritiques en catalysant l'agrégation du peptide Aβ-42 formant alors le coeur de la plaque (Iwatsubo et al., 1994; Susuki et al., 1994 ; Barelli et al., 1997).

La distribution des plaques séniles est concentrée dans le néocortex, les lésions débutant dans les aires associatives pour se propager sur l'ensemble des aires corticales, ainsi que dans l'hippocampe. Les plaques diffuses se trouvent dans ces mêmes régions mais s'étendent aussi dans les zones sous-corticales comme les noyaux gris centraux, le thalamus, le complexe amygdalien, la partie dorsale du mésencéphale et même le cervelet (Ikeda et al., 1989).

Les plaques séniles sont pathogènes à partir d’un certain seuil de densité qui répond à une classification précise (critères CERAD) mais leur densité n’est pas corrélée aux troubles mnésiques et par conséquent au degré de la démence (Mirra et al., 1991).

2.1.2. Les dégénérescences neurofibrillaires

La dégénérescence neurofibrillaire est la seconde lésion histopathologique caractéristique de la MA. Il s'agit de conglomérats de filaments anormaux constitués d'une forme hyperphosphorylée de la protéine tau, protéine appartenant à la famille des MAP (Microtubule Associated Proteins). Ces faisceaux denses de fibres prennent l’aspect de paires de filaments hélicoïdaux. D'autres modifications post-traductionnelles de cette protéine comme la glycosylation contribuent également à la formation des ces lésions (Takahashi et al., 1999). Ces amas sont localisés dans la région intracytoplasmique périnucléaire des neurones et dans les dendrites

proximaux. On les trouve également dans les plaques séniles dont ils forment la couronne. La protéine tau normalement phosphorylée joue un rôle dans la polymérisation-dépolymérisation des microtubules du cytosquelette neuronal et dans le transport axonal. En quantité excessive, la protéine tau hyperphosphorylée peut perturber le transport axonal et par conséquent, le fonctionnement des neurones et entraîner leur destruction (Zékri, 1999).

Le processus de "dégénérescence neurofibrillaire" (DNF) n'est pas spécifique à la MA. Il est associé à d'autres démences, à la trisomie 21, et se retrouvent en quantités modérées dans la région hippocampique de toutes les personnes âgées de plus de 75 ans (Delacourte et al., 1998). Cependant, les régions corticales associatives (cortex préfrontal, temporal associatif, pariétal postérieur) ne sont jamais touchées au cours du vieillissement cérébral normal alors qu'elles le sont toujours dans la MA (Arnold et al., 1991).

Dans la MA, cette dégénérescence neurofibrillaire (DNF) n'est pas distribuée au hasard. Des régions cérébrales sont plus vulnérables à l’accumulation de DNF, comme le cortex temporal (cortex entorhinal), la formation hippocampique et les aires corticales associatives. Les régions primaires sensori-motrices sont touchées dans les formes sévères (Duyckaerts et al., 1999). Des anticorps spécifiques des protéines tau pathologiques permettent de visualiser les lésions de DNF.

Contrairement aux plaques séniles, la densité des DNF semble corrélée avec le degré d'atteinte des capacités cognitives, ce qui ferait de la protéine tau tronquée un bon indicateur des déficits cognitifs observés dans la MA (Arriagada et al., 1992).

Par ailleurs, le peptide Aβ serait impliqué dans le processus lésionnel intracellulaire : injecté dans des neurones en culture d’hippocampe de rat, il induit la phosphorylation de la protéine tau qui va alors s’accumuler dans le compartiment somato-dendritique, perdre sa capacité de liaison aux microtubules et se dissocier d'eux (Busciglio et al., 1995).

2.1.3. Les pertes synaptiques

Le neuropile est constitué par l'ensemble des connexions dendritiques, synaptiques et axonales des neurones. L'arborisation dendritique couvre à elle seule 95% de la surface synaptique réceptrice neuronale.

Dans la MA, le neuropile et tout particulièrement l'arborisation dendritique subit des modifications régressives (diminution de la longueur des dendrites et pertes des

synapses) dans certaines régions comme le neocortex, l'hippocampe ou le subiculum. Le nombre de synapses par neurone peut diminuer de moitié dans les tissus *post-mortem* des patients atteints de la MA. La perte est également évaluée par l'analyse densitométrique des protéines impliquées dans la structure et la fonction synaptiques. Dans l'ensemble, la protéine la plus étudiée est la synaptophysine (protéine composite des vésicules synaptiques) et sa diminution est particulièrement importante dans l'hippocampe et plusieurs régions temporales et frontales du cortex cérébral (Honer, 2003; Masliah et al., 1994). Ces déficits synaptiques sont fortement liés au déclin des fonctions cognitives et constitueraient, pour certains auteurs, un excellent corrélat de la démence, meilleur que les dégénérescences neurofibrillaires (Gomez-Isla et al., 1997; Sze et al., 1997).

L'hypothèse formulée pour expliquer ces pertes synaptiques implique des tentatives réactionnelles de plasticité en réponse à des phénomènes régressifs débutants ou favorisés par des facteurs génétiques, métaboliques et/ou environnementaux (Selkoe, 2002). La présence d'anomalies de conformation des protéines synaptiques engendrerait leur propre agrégation et leur confèrerait des propriétés neurotoxiques ou des propriétés de neuroprotection moindre contre des agents toxiques comme le peptide Aβ (Sisodia and Price, 1995). Des corps multivésiculaires ont été décrits dans le neuropile (Takahashi et al., 2002) mais également au niveau de la membrane cytoplasmique du péricaryon (Yamaguchi et al., 2000) de neurones présentant une accumulation intracellulaire de peptide Aβ (Gouras et al., 2000).

Le système cholinergique antérieur étant particulièrement sensible dans la MA, l'altération synaptique cholinergique est importante et semble précéder l'atteinte des synapses glutamatergiques ou GABA-ergiques (Bell et al., 2007). Ces auteurs ont montré que des régulations à la hausse des boutons cholinergiques présynaptiques apparaissent dans les stades pré-cliniques ou légers de la MA avant la déplétion observée dans les stades plus avancés (Bell et Cuello, 2006).

2.1.4. Les pertes neuronales

Les altérations cellulaires locales rapportées dans le paragraphe précédent se traduisent plus tardivement par la mort des cellules. Ces pertes cellulaires présentent ainsi une spécificité régionale similaire impliquant l'hippocampe, le cortex cérébral et le complexe amygdalien (Simic et al., 1997). Par ailleurs, les neurones

cholinergiques de la partie basale du cerveau antérieur qui se projettent sur l'hippocampe et le néocortex sont particulièrement sensibles dans la maladie d'Alzheimer et leur souffrance est directement liée à la symptomatologie clinique de la maladie.

On a attribué à l'apoptose un rôle déterminant dans la perte neuronale observée dans la MA même si son importance dans les phases précoces de la maladie est encore discutée. Elle pourrait expliquer la différence de vulnérabilité et la perte sélective des neurones. Cette hypothèse est supportée par la démonstration que l'injection de peptide Aβ dans des neurones en culture induit une mort cellulaire de type apoptotique (Pillot et al., 1999). La présence d'ADN en fragmentation et de neurones TUNEL positifs (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick-End Labelling) a été détectée dans les tissus cérébraux *postmortem* de patients atteints de MA mais les autres marqueurs morphologiques de l'apoptose sont rares (Anderson et al., 2000; Broe et al., 2001; Colurso et al., 2003; Lassmann et al., 1995; Su et al., 2002; Troncoso et al., 1996). Outre les problèmes techniques de détection du phénomène apoptotique, deux hypothèses ont été émises pour expliquer ces résultats :

- Comme certaines cellules présentaient une activation des caspases initiatrices sans activation des caspases effectrices, certains auteurs suggèrent que les neurones initient un processus apoptotique sans le mener à terme et parlent de phénomène d'apoptose "avortée" ("aborted apoptosis", Raina et al., 2001).
- Les phénomènes apoptotiques pourraient être limités à la synapse. Les composants des voies de signalisation intracellulaire qui initient ou préviennent l'apoptose sont concentrés dans les terminaisons synaptiques. Toutes les altérations biochimiques du phénomène apoptotique pourraient être activées localement au niveau du neuropile (Ivins et al., 1998). Cette action localisée pourrait modifier la plasticité et les fonctions synaptiques, induire des modifications morphologiques des synapses et neurites ce qui entraînerait finalement la mort cellulaire par apoptose.

2.2. Les lésions macroscopiques

2.2.1. Les atteintes régionales

L'ensemble des processus impliqués dans la formation des altérations microscopiques décrites précédemment entraîne irrémédiablement l'atrophie cérébrale lors du développement de la MA. Chez les sujets sains, la perte de poids du cerveau est de 2% tous les dix ans, mais chez les patients atteints de MA, le cerveau peut perdre 8 à10% de son poids.

L'atrophie cérébrale est étendue. Une diminution importante de la densité tissulaire de la substance grise dans le cerveau Alzheimer est observée dans les régions temporale, pariétale et préfrontale du néocortex ainsi que dans l'hippocampe, le complexe amygdalien et l'insula (Frisoni et al., 2002; Scahill et al., 2002). L'atrophie tissulaire touche également la substance blanche du néocortex (Bartzokis et al., 2003) et de l'hippocampe (Jack et al., 1998; Laakso et al., 1998; Callen et al., 2001) déterminant une dilatation du système ventriculaire, un agrandissement des espaces périvasculaires et un élargissement des sillons corticaux (Duyckaerts et al., 1985). Une atteinte tissulaire est également observée dans les cortex limbiques (parahippocampique, rétrosplénial, entorhinal et périrhinal), la région septale, le thalamus et les corps mamillaires (Juottonen et al., 1998; Callen et al., 2001) ainsi que dans le néostriatum (Rombouts et al., 2000) et la partie vermienne du cervelet (Sjöbeck et al., 2001), des régions pourtant très pauvres en plaques séniles. La perte cellulaire intéresse également les noyaux impliqués dans les systèmes de stimulation, ascendants, non spécifiques pour le cortex cérébral : le noyau de Meynert cholinergique est atteint de façon majeure mais des pertes cellulaires sont également observées dans le raphé dorsal sérotoninergique (Zweig et al., 1988), le locus coeruleus noradrénergique (Zarow et al., 2003) et à un moindre degré la substance noire ou l'aire tegmentale ventrale tous deux dopaminergiques (Mann et al., 1987; Lyness et al., 2003).

2.2.2. Les altérations neurochimiques résultantes

Comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, certaines populations cellulaires sont vulnérables dans la MA affectant ainsi la quantité et la qualité de certains neuromédiateurs.

La neurotransmission cholinergique est la plus affectée : caractérisée par une

diminution de l'acétylcholine et de ses métabolites (Nordberg, 1999), elle est responsable de la perte cognitive, de troubles mnésiques et d'une réduction de l'habilité intellectuelle (DeKosky et al., 1992; Baskin et al., 1999). Comme le système cholinergique joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la MA, il sera étudié ultérieurement en détails.

Le système noradrénergique subit également des altérations. Le locus coeruleus semble très vulnérable dans la MA et une diminution de l'innervation noradrénergique peut s'observer dans le néocortex des patients Alzheimer. Elle provoque des symptômes de dépression (Frisoni et al., 1999) ainsi qu'une baisse d'attention ou de la capacité de concentration (Kobayashi et al., 2001). La réduction d'activité existante résulterait d'une baisse endogène de la noradrénaline et/ou de l'activité de son enzyme de synthèse, la dopamine bêta-hydroxylase (Baker and Reynolds, 1989).

Le système sérotoninergique est également affecté, tout comme dans les autres maladies neurodegenerative et peut être responsable de la depression observée dans la maladie de Parkinson (Raisman et al., 1986). Dans la MA une atteinte des noyaux du raphé est observée, les patients Alzheimer psychotiques présentent des diminutions de sérotonine dans le subiculum (Frisoni et al., 1999).

Le système dopaminergique est relativement préservé. Toutefois, une baisse de la densité des récepteurs D1 et D2 est observée dans le cortex, l'hippocampe, le striatum et l'amygdale (Joyce et al., 1993).

Les désordres neurodégénératifs de type Alzheimer affectent de façon importante les neurotransmetteurs appartenant à la famille des acides aminés excitateurs. Ils jouent un rôle important dans le développement clinique et physiopathologique de la MA. A des stades précoces de la maladie, une augmentation du taux de glutamate est observée dans le liquide céphalo-rachidien, concomitante à une réduction du niveau d'aspartate, de glutamine et de taurine ainsi qu'à une hausse de proline, substrat de la synthèse de glutamate (Pomara et al., 1992). Cet excès de glutamate pourrait être la cause des dégénérescences et pertes cellulaires dues à une toxicité massive précoce. Les interactions avec le peptide Aβ diminueraient la résistance des cellules à ce type d'agression et potentialiseraient leurs effets excitotoxiques (Pomara et al., 1992). A l'inverse, les stades tardifs de la maladie se caractérisent par des pertes d'activité glutamatergique sévères dans le

cortex frontal et temporal. Cette diminution du niveau de glutamate serait parallèle à la progression des symptômes cognitifs (Procter et al., 1988).

Les désordres neurodégénératifs de type Alzheimer affectent également l'activité des acides aminés inhibiteurs car une atteinte importante du réseau de fibres GABAergiques (Gamma AminoButyric Acid) dans le cortex et l'hippocampe a été mise en évidence (Hardy et al., 1987; Simpson et al., 1988).

3. Causes et facteurs de risque dans la maladie d'Alzheimer

Même si les connaissances sur la physiopathologie de la MA ont beaucoup progressé ces dernières années, les causes exactes de la maladie d'Alzheimer demeurent inconnues et de nombreuses recherches épidémiologiques et fondamentales sont entreprises afin de déterminer les facteurs de risque qui pourraient avoir une influence quelconque sur la progression de la maladie.

Tous les auteurs s'accordent à dire que la MA a des causes multifactorielles (Goate, 1997; Ling, Morgan et al., 2003) et il convient dans un premier temps de distinguer les deux catégories de MA, (1) les formes familiales héréditaires, d'apparition précoce et (2) les formes sporadiques plus tardives. Des études ont permis de démontrer que seulement 5-10% des cas de la maladie d'Alzheimer représentent des cas familiaux, les 90-95% restant étant sporadiques, sans antécédents familiaux et d'étiologie inconnue (Rocchi et al., 2003).

3.1 Les facteurs génétiques des formes familiales

Les études génétiques effectuées sur les familles dans lesquelles la MA survient précocement avant 65 ans ont clairement permis l'identification de mutations pathogènes au sein de trois gènes.

Les formes qui en résultent sont autosomiques dominantes, à pénétrance complète, ce qui veut dire que les porteurs de ces mutations développent inévitablement et précocement la maladie.

Le gène *APP* : en 1987, des chercheurs montrent que le peptide Aβ est un produit de catabolisme d'une protéine appelée APP (Amyloid Protein Precursor) dont le gène est situé sur le chromosome 21 (Kang et al., 1887; Goate et al., 1991). En 1997, Hardy démontrait que certaines formes familiales de la MA sont provoquées par une mutation du gène *APP* sur le codon 717 (mutation London), en aval de la

partie qui code pour le peptide Aβ (Hardy, 1997). Cette découverte sera suivie par l'identification d'autres mutations, sur les codons 670 et 671, juste en amont de la région codant pour le peptide Aβ (mutation suédoise) ou sur le codon 716 (mutation Florida) ou, très récemment, sur le codon 715 (mutation Rouen). Ces mutations modifient le catabolisme de l'APP en favorisant deux facteurs qui agissent sur l'agrégation du peptide Aβ : (1) la production de fragments de la longueur 1-42 plutôt que 1-40 (2) en quantité excessive (Hardy, 1997). A l'heure actuelle, une quarantaine de familles porteuses du gène *APP* muté ont été découvertes.

Les gènes préséniline 1(*PS1*) et 2 (PS2) : dans d'autres familles où la maladie apparaît de façon encore plus précoce, la découverte d'autres mutations sur d'autres gènes est venue renforcer le rôle de l'APP et du peptide Aβ (Goate, 1997; Selkoe, 2001). Le gène *PS1*, situé sur le chromosome 14 est responsable d'environ 130 mutations pathogènes différentes (Sherrington et al., 1995; Duering et al., 2005) alors que le gène *PS2*, situé sur le chromosome 1 ne présente jusqu'à maintenant qu'une dizaine de mutations (Hardy, 1997). Les mutations *PS1* sont dominantes, fréquentes (environ 80 % de tous les cas familiaux connus) et conduisent à une forme très agressive et très précoce de la maladie, puisqu'elles touchent des personnes jeunes, entre 24-50 ans. Il s'agit de mutations ponctuelles, dites faux-sens, substituant un acide aminé à un autre (Campion et al., 1995).

Peu de temps après la découverte de *PS1*, le gène *préséniline-2* (*PS2*) est isolé et caractérisé (Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995). Il existe une forte homologie avec *PS1* (67% chez l'humain). Contrairement à *PS1*, les mutations dans le gène *PS2* sont rares (9 mutations identifiées) et associées à une forme familiale moins agressive (entre 40-70 ans).

Nous verrons dans un chapitre ultérieur que ces deux gènes codent pour des protéines modulant l'activité métabolique de la protéine APP, et contrôlant son expression et son transport vers les terminaisons synaptiques. De plus, faisant partie intégrante de la γ-secrétase, elles favorisent le clivage du fragment sAPPβ au niveau du codon 713 aboutissant à la formation du peptide Aβ-42 plus toxique que le peptide Aβ-40 (Scheuner et al., 1996, Citron et al., 1997 ; Xia et al., 1998; Guo et al., 1999). En effet, une quantité importante de ce peptide envahit le tissu cérébral induisant dans un second temps l'augmentation des dépôts amyloïdes dans les cortex cérébraux ou dans le sérum des patients atteints de FAD (Gouras et al.,

2000). Ainsi, ce mécanisme par lequel les mutations *PS1* produisent leur effet délétère semble être le gain d'une fonction aberrante.

3.2. Les facteurs génétiques des formes sporadiques

Actuellement, le seul facteur de susceptibilité reconnu dans les formes sporadiques et familiales est le gène codant pour l'apolipoprotéine E (ApoE, sur le chromosome 19), protéine jouant un rôle important dans le transport et la distribution des lipides. Au niveau du système nerveux central, il peut jouer également un rôle dans la croissance neuritique, le maintien de l'intégrité neuronale et la stabilisation du cytosquelette (réseau de microtubules) associée à l'établissement des synapses cholinergiques (Masliah et al., 1995).

Le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE) se présente sous trois allèles majeurs dans la population générale : ε3, ε2, ε4. Des études ont montré que l'allèle ε4 peut être surexprimé chez les patients atteints de la MA (Strittmatter et Roses, 1995). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'implication de l'allèle ε4 comme facteur de risque de la MA :

- Des expériences *in vitro* montrent que l'isoforme ApoE4, produit de l'allèle ε4 se forme plus rapidement que l'ApoE2 ou l'ApoE3, cette association favorisant la formation de fibrilles insolubles de peptide Aβ (Wisniewski et al., 1995).
- Par ailleurs, l'ApoE permet la restructuration des membranes neuronales lésées, en apportant les lipides constitutifs nécessaires. Dans ce rôle de réparation neuronale, l'ApoE4 est la protéine la moins performante (Poirier, 1995). Cet effet est vraisemblablement général car il est observé dans d'autres maladies neurodégénératives (Moulard et al., 1996).
- En dehors de l'interaction directe de l'ApoE4 avec le peptide Aβ et la formation des dépôts amyloïdes, la protéine pourrait intervenir dans le processus pathologique de la MA en entraînant un dysfonctionnement du métabolisme lipidique cérébral. Ainsi, une alimentation riche en cholestérol et en acides gras saturés augmenteraient le risque de développer la maladie. Une hypercholestérolémie augmente le nombre de plaques amyloïdes dans le cortex cérébral de souris transgéniques, le cholestérol s'accumulant à l'intérieur des plaques neuritiques (Mori et al., 2001). A l'inverse, l'administration d'un hypocholestérolémiant induit une diminution du nombre de plaques amyloïdes (Refolo et al., 2001).

3.3. Les facteurs de risque épigénétiques et environnementaux

Les études épidémiologiques ont permis de définir différents facteurs de risque selon que leur rôle est certain ou défini, possible et probable en fonction de la concordance des diverses études les impliquant (Schenk et al., 2004).

L'âge et par conséquent, le vieillissement est le facteur de risque principal de la MA (Ling et al., 2003), la prévalence de la pathologie doublant tous les 5 ans après l'âge de 65 ans.

S'ajoutent à ce "risque de vivre et de vieillir", plusieurs facteurs environnementaux. L'un des arguments les plus forts en faveur de l'importance des facteurs environnementaux est l'existence d'une variation de la pénétrance des caractères liés à la MA chez des jumeaux monozygotes en fonction de l'exposition environnementale.

En plus des variables liées à l'éducation, au niveau socio-professionnel et aux activités de loisirs, certains traits biologiques et psychologiques joueraient un rôle non négligeable (Schenk et al., 2004). Parmi ceux-ci on note les pathologies vasculaires (Hofman et al., 1997; Kudo et al., 2000), les traumatismes crâniens (Jellinger et al., 2004), les états de dépression (Mc Cury et al., 2004). D'autres études incriminent certains métaux (aluminium, mercure, ...), l'alcool et le tabac et des facteurs alimentaires (carences en vitamines, régime trop riche en graisses, ...).

Enfin, on peut définir un ensemble de facteurs hormonaux (et plus particulièrement le taux d'œstrogènes (Geerlings et al., 2003), inflammatoires et/ou liés à l'oxydation cellulaire. Au cours du vieillissement, l'encéphale produit de plus en plus d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species), celles-ci pouvant jouer un rôle dans le développement de la MA.

Il est ainsi tout à fait cohérent que de nombreuses études démontrent l'effet bénéfique de la consommation de substances antioxydantes sur l'apparition, voire l'évolution de la MA.

4. La formation du peptide amyloïde beta (Aβ) ou amyloïdogénèse

4.1. L'amyloid Precursor Protein (APP)

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 695 à 770 acides aminés codée à partir d'un seul gène localisé sur le bras long du chromosome 21 (Kang et al., 1987). Le gène de l'APP est exprimé dans une grande variété de tissus

chez les mammifères (système sanguin, système nerveux, peau, tractus digestif, muscles) mais son expression est particulièrement élevée au niveau du système nerveux, à la fois dans les neurones et leurs terminaisons axonales mais également dans certaines cellules gliales (Selkoe, 1994). Il existe 4 isoformes principales de l'APP, la forme de 695 acides aminés étant la forme prépondérante dans les neurones. Bien que leur rôle ne soit pas déterminé de façon certaine, les protéines APP peuvent être considérées comme des molécules d'adhésion et de mobilité cellulaire. De plus, des protéines se fixent au domaine C-terminal intracellulaire de l'APP, suggérant un rôle dans la transmission de signaux. La perte de l'expression d'APP chez la souris génétiquement modifiée induit des altérations de la structure neuronale, une réduction de la densité synaptique et des déficits cognitifs associés à une diminution de l'activité de potentialisation à long terme (LTP).

L'APP possède un seul domaine transmembranaire, un très large domaine N-terminal (environ 650 à 700 acides aminés) situé dans la lumière de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique ou dans l'espace extracellulaire ainsi qu'un court domaine C-terminal (47 acides aminés) situé dans le cytoplasme (Dyrks et al., 1988). Le fragment peptidique correspondant au peptide Aβ est une séquence de 40/42 acides aminés située entre les résidus 672 et 711/713 (numérotation basée sur l'isoforme APP-770) composée de 28 acides aminés jouxtant le domaine trans-membranaire et de 12 à 14 acides aminés voisins faisant partie du domaine extra-membranaire.

L'isoforme spécifique APP-695 associée à la membrane plasmique des neurones présente donc les caractéristiques d'un récepteur orphelin sans ligand spécifique actuellement identifié. Cependant, contrairement aux autres récepteurs membranaires, cette protéine est sensible à de nombreux clivages protéolytiques menant à la génération de fragments peptidiques longs, de courts fragments comme le peptide Aβ et différents fragments C-terminaux.

4.2. Le métabolisme de l'Amyloid Precursor Protein (APP)

Cette protéine est métabolisée selon deux voies biologiques, la voie non-amyloïdogénique, la plus commune, et la voie amyloïdogénique, responsable de la production du peptide Aβ (*Figure 2*).

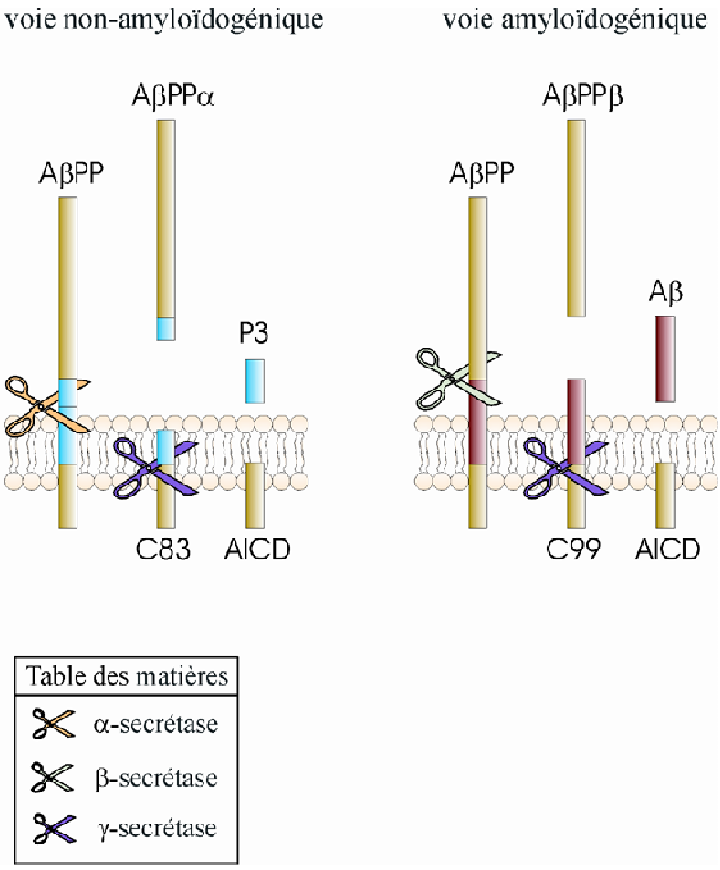


Figure 2 *: Représentation schématique des deux voies de maturation de l'APP.*
(D'après site internet : www.theses.ulaval.ca).

Les clivages de l'APP s'effectuent au niveau de sites bien définis par l'intermédiaire d'enzymes portant une activité α-, β- et γ-secrétase; les clivages résultant des activités α-et β-secrétase sont mutuellement exclusifs.

Dans la voie non-amyloïdogénique, deux clivages endoprotéolytiques orchestrés par l'α-secrétase, puis la γ-secrétase ont comme résultat final la production de trois fragments distincts : la partie APP soluble α (AβPPα ou sAPPα), et les domaine AICD (pour "APP intracellular domain") et peptide P3 provenant du clivage secondaire du fragment C83 (Busciglio et al., 1993). Le fragment soluble sAPPα présente une activité cytotrophique et neuroprotectrice, il migre éventuellement le long de l'axone pour être finalement sécrété (Sisodia, 1992). Ces fragments sont secrétés par des nombreuses cellules en culture et sont retrouvés

dans le cerveau humain et le liquide céphalorachidien de sujets sains ou de patients atteints par la MA (Selko et al., 1988 ; Palmert et al., 1989 ; Schubert et al., 1989 ; Weidemann et al., 1989). Cette voie de maturation de l'APP correspond à un processus physiologique normal et ne produit pas de fragment correspondant au peptide Aβ.

Dans la voie amyloïdogénique, l'APP est clivée par la β-secrétase mais pas au même endroit que précédemment. Dans un second temps, l'action de la γ-secrétase libère les peptides Aβ et le domaine AICD du fragment C99 (Busciglio et al., 1993a; Haass et al., 1992b). Le clivage au niveau de l'extrémité C-terminale présente une certaine hétérogénéité puisque le clivage par la γ-secrétase produit le peptide Aβ dont la longueur peut varier de 39 à 43 acides aminés (Cordell et al., 1994 ; Selko, 1994). Le peptide Aβ est réparti principalement en deux populations, l'une se termine à l'acide aminé 40 ou peptide Aβ (1-40) et l'autre se termine à l'acide aminé 42 ou peptide Aβ (1-42), ces deux populations représentant respectivement 90% et 10% de la totalité du peptide Aβ secrété. Plusieurs mutations dans l'APP peuvent affecter le clivage γ-secrétase ayant pour effet de produire des peptides légèrement plus long (Aβ42) que les peptides Aβ40 générés par la protéine non mutée. L' Aβ42 est considéré comme neurotoxique par sa propriété hautement insoluble et oligomérisante (Jarrett et al., 1993; Jarrett and Lansbury, 1993).

Il faut souligner que la voie amyloïdogénique n'est pas systématiquement synonyme de pathologie. Le peptide Aβ est produit physiologiquement sous une forme soluble par de nombreux types cellulaires et dans le liquide céphalorachidien humain (Seubert et al., 1993). La production du peptide Aβ dépend du type cellulaire et les astrocytes humains en produisent en forte quantité (Haass et al., 1992b ; Busciglio et al., 1993). C'est en revanche le dérèglement de cette voie de maturation, et par conséquent, la surproduction de peptide Aβ qui est pathogène. Par ailleurs, tous les produits de clivage de l'APP qui contiennent le peptide Aβ entier sont potentiellement amyloïdogéniques : il a été montré que le fragment C-99 entraîne une perturbation de l'homéostasie calcique, des problèmes d'apprentissage et de mémorisation, et déclenche une réponse inflammatoire à travers l'activation des astrocytes (Fukuchi et al., 1993; Lalonde et al., 2002).

4.3. Les présénilines 1 et 2 et l'activité γ-secrétase

L'activité de la γ-secrétase est assurée par un large complexe protéique multimérique appelé complexe γ-secrétase. De multiples protéines membranaires participent à sa formation, parmi lesquelles la Nicastrine, l'Aph-1, la Pen-2 et les présénilines-1 et -2 (De Strooper, 2003; Kimberly et al., 2003; Wolfe, 2003). Ces quatre protéines se régulent de façon coopérative et semblent nécessaires pour permettre l'activité γ-secrétase. Les présénilines, et plus particulièrement la préséniline 1 (PS1) ont une grande importance au sein de ce complexe et font l'objet de recherches intensives car leurs mutations sont responsables de la majorité des formes familiales précoces de la MA.

Les présénilines sont largement exprimées dans le système nerveux central, de façon prédominante dans les neurones (Sherrington et al., 1995; Kovacs et al., 1996), mais aussi dans la glie (Lah et al., 1997; Xia et al., 1998). Cette protéine est principalement localisée dans les membranes intracellulaires de l'enveloppe périnucléaire du réticulum endoplasmique, et de l'appareil de Golgi (Walter et al., 1996; De Strooper et al., 1997) et en petite quantité dans certaines vésicules intracytoplasmiques comme les lysosomes (Pasternak et al., 2003), dans la membrane cytoplasmique (Kaether et al., 2002) et les terminaisons synaptiques (Lah et al., 1997). La présiniline 1 est localisée à la fois dans les péricaryons et les prolongements cellulaires alors que la préséniline 2 est exclusivement concentrée dans le péricaryon des cellules (Blanchard et al., 1997). Ces protéines sont en quantité importante dans les régions nerveuses vulnérables dans la MA mais leur expression est également présente dans d'autres régions comme le cervelet (Moussaoui et al., 1996; Busciglio et al., 1997).

Les présénilines sont des acteurs importants du fonctionnement cellulaire. Elles font partie d'un système métabolique complexe dont les composants joueraient différents rôles lors du développement et de la maintenance des cellules nerveuses adultes (van Gassen et al., 2000). Les présénilines interagissent avec de nombreuses protéines impliquées dans la transduction de signaux induisant l'expression de gènes aux fonctions différentes, significatives ou non pour la MA. Il y a, par exemple, la nicastrine qui semble influencer l'activité de la γ-secrétase, mais aussi la protéine tau, principal composant des dégénérescences neurofibrillaires (Takashima et al., 1998), ou Bcl-2 et Bcl-xL, deux protéines anti-apoptotiques. Les

interactions de PS1 avec quatre protéines, APP, Notch, β-caténine et N-cadhérine sont particulièrement intéressantes (Wittenburg et al., 2000) :

- L'importance de PS1 pour la protéolyse de la protéine APP a été mise en évidence par les résultats d'une expérience consistant à muter les deux acides aspartiques au milieu des domaines transmembranaires 6 et 7, prédits comme faisant partie du site enzymatique actif et à en analyser les conséquences dans des modèles cellulaires (Wolfe et al., 1999). L'endoprotéolyse de PS1semble abrogée mais la production des peptides Aβ est également inhibée.
- Les présénilines peuvent se lier à Notch et participer au clivage de cette protéine comme elles semblent le faire avec APP. Notch est un récepteur qui, lorsqu'il fixe certaines molécules présentes à l'extérieur de la cellule, se clive. Le fragment intracellulaire généré par protéolyse voyagerait dans le noyau où il activerait la transcription de gènes qui s'opposeraient à la différenciation neuronale et à la croissance neuritique. au cours de l'embryogénèse. Les souris homozygotes knock-out $PS1^{-/-}$ ne sont pas viables; elles présentent de graves malformations squelettiques et nerveuses semblables à celles observées au niveau de knock-out $Notch1^{-/-}$ (Qian et al., 1998), ces observations confirmant le rôle important de PS1 dans le développement embryonnaire. Ce rôle s'exerce également plus tardivement à l'âge adulte au niveau des phénomènes de plasticité cellulaire et réparation tissulaire (Giannakopoulos et al., 1997).
- Impliquée dans la voie de signalisation de la β-caténine, PS1 est liée aux processus impliqués dans l'adhésion cellulaire essentielle notamment au cours du développement du système nerveux central (Czech et al., 2000). Elle participe aux mécanismes d'induction/suppression de l'apoptose : elle forme avec la β-caténine un complexe stable qui, lors de diminution d'activité, est capable de causer une augmentation de la vulnérabilité des cellules à des agents toxiques et apoptotiques (Zhang et al., 1998; Czech et al., 2000).
- La protéine PS1 coupe les cadhérines E et N agissant indirectement sur CREB impliqué dans le maintien de la potentialisation à long terme. Ainsi,

PS1 pourrait influencer négativement ce phénomène dans la MA, en plus de son rôle dans la scission de l'APP (Marambaud et al., 2003).

Les mutations sur les gènes des préséniline et plus particulièrement *PS1* conduisent à une surproduction du peptide Aβ-42 (Duff et al., 1996; Jankowsky et al., 2004) et une augmentation de ce peptide par rapport au peptide Aβ-40 (Haass et al., 1992; Scheuner et al., 1996, Citron et al., 1997 ; Guo et al., 1999). En effet, des cellules en culture transfectées avec de la *PS1* mutée produisent de plus grandes quantités du peptide Aβ-42 que des cellules transfectées avec la PS1 normale, et, de la même façon, les souris transgéniques surexprimant les *PS1* mutées (mais non la PS1 normale) présentent une production accrue du peptide Aβ-42 au niveau cérébral (Citron et al., 1997). Le phénotype des souris transgéniques exprimant le gène humain muté *PS1*-M146V est caractérisé par une quasi-absence de dépôts extracellulaires de peptide Aβ alors que l'accumulation intracytoplasmique de ce peptide est augmentée et que des pertes cellulaires liées à des phénomènes apoptotiques sont observées (Chui et al., 1999; Guo et al., 1999). Enfin, une mutation *PS1* potentialise les effets d'une mutation *βAPP*, déclenchant plus précocement et accélérant la formation de plaques neuritiques (Borchelt et al., 1997) et diminuant la densité des synapses cholinergiques dans le cortex (Wong et al., 1999).

Les mutations *PS1* perturbent l'homéostasie du calcium, l'adhésion cellulaire et la plasticité synaptique (Czech et al., 1998; Sisodia et al., 1999; Dowjat et al., 2001; Guo et al., 2005) rendant ainsi les cellules plus vulnérables aux agents pro-apoptotiques (Guo et al., 1996; Kovacs et al., 1999; Chan et al., 2000; Leisring et al., 2000; Terro et al., 2002). Ainsi, *PS1* agit à plusieurs niveaux dans les processus apoptotiques, soit directement par son action sur Bcl-2 et Bcl-xL, soit indirectement via l'accumulation intracellulaire de peptide Aβ (Vito et al., 1996) ou encore par la production de radicaux libres et la réduction de la voie de signalisation de la β-caténine (Begley et al., 1999; Kang et al., 1999; Grilli et al., 2000; Leutner et al., 2000). Les mutations *PS1* agiraient également sur les oligodendrocytes induisant des troubles de la myélinisation et par conséquent des défauts cognitifs (Pak et al., 2003).

4.4. La toxicité du peptide Aβ

Le peptide Aβ et le fragment carboxy-terminal (Ct) de la molécule APP contenant le peptide Aβ présentent des propriétés neurotoxiques *in vitro* lorsqu'ils sont appliqués sur les neurones en culture primaire (Loo et al., 1993) et sur des lignées cellulaires (Yankner et al., 1989), et *in vivo* lorsque le peptide est injecté dans des cerveaux de singes âgés (Dudkin et al., 2005).

En plus de son effet neurotoxique direct, le peptide Aβ peut potentialiser les effets toxiques de plusieurs autres facteurs tels que les acides aminés excitateurs, la privation en glucose et le stress oxydant (Mattson et al., 1992 ; Yankner et al., 1996).

La neurotoxicité du peptide Aβ est dépendante de son état conformationnel, de son agrégation en fibrilles insolubles (Pike et al., 1993; Busciglio et al., 1995; Yan et al., 1996). Bien que le peptide Aβ-42 ne diffère que de 2 acides aminés du peptide Aβ-40, il est plus hydrophobe et a une tendance plus importante à s'agréger, avant l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires ou la perte cellulaire (Harper et al., 1997; Lippa et al., 1998). Le peptide Aβ au sein des plaques séniles n'est pas la seule forme de toxicité, et il a été démontré que son état soluble sous la forme de monomère et d'oligomère est également toxique (Small et al., 1999).

Les mécanismes qui expliquent la toxicité du peptide Aβ sont basés sur la perturbation de l'homéostasie ionique, l'augmentation du calcium intracellulaire et la formation des radicaux libres qui causent un stress oxydatif. Ces phénomènes peuvent être déclenchés par la détérioration de l'activité d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire (Shearman et al., 1994; Behl et al., 1994). Selon certains auteurs (Lin et al., 1999), le peptide Aβ lui-même pourrait aménager des pores à travers la membrane entraînant une augmentation de l'influx ionique. D'après cette hypothèse, le peptide pourrait former des canaux calciques *in vitro*, entraînant une augmentation de la capture du calcium.

Enfin, la toxicité de peptide Aβ est non seulement extracellulaire mais aussi intracellulaire (LaFerla et al., 1997) car, dans le cerveau des patients atteints de la MA, de nombreuses cellules en dégénérescence se trouvent éloignées des dépôts amyloïdes.

5. La cascade amyloïde

5.1. Rôle des lésions histopathologiques dans la maladie

Il est important de noter que les formes sporadiques et génétiques de la MA se caractérisent, sans distinction autre que la temporalité, par les mêmes phénomènes physiopathologiques.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses hypothèses ont été posées pour tenter d'expliquer les mécanismes pathogéniques cellulaires et moléculaires liés au développement de la MA. Actuellement, les auteurs s'accordent à considérer que le facteur étiologique central de la MA est la cascade amyloïde impliquant de façon causative l'augmentation, l'accumulation et l'agrégation du peptide Aβ-42 dans la physiopathologie de la démence de type Alzheimer (Hardy et Selkoe, 2002). Cette hypothèse est basée sur le fait que le peptide Aβ fibrillaire est le composant majeur des plaques neuritiques et accompagne le processus dégénératif de la MA (Sisodia et al., 1990). Elle est défendue par les études génétiques qui ont montré que plusieurs mutations situées précisément dans les sites d'action des sécrétases au niveau de l'APP et/ou portées par les présénilines sont liées au développement des formes familiales de MA.

Dans toutes les formes de la MA, le dérèglement de la voie amyloïdogénique se traduit par une augmentation de la concentration des peptides et un rapport anormal des formes Aβ-40/Aβ-42 (de 1/9 à 8-5/2-5) entraînant leur accumulation et leur passage d'un état soluble à un état agrégé. Dans des conditions non pathologiques, l'Aβ reste soluble, il est dégradé par des enzymes protéolytiques ou évacué par des mécanismes de transport. Dans des conditions pathologiques, un déséquilibre lent et progressif, d'origine multifactorielle, entre les mécanismes de production et ceux de dégradation de l'Aβ serait à l'origine d'une cascade d'événements ou "cascade amyloide", aboutissant à la dégénérescence des neurones et à la démence (*Figure 3*).

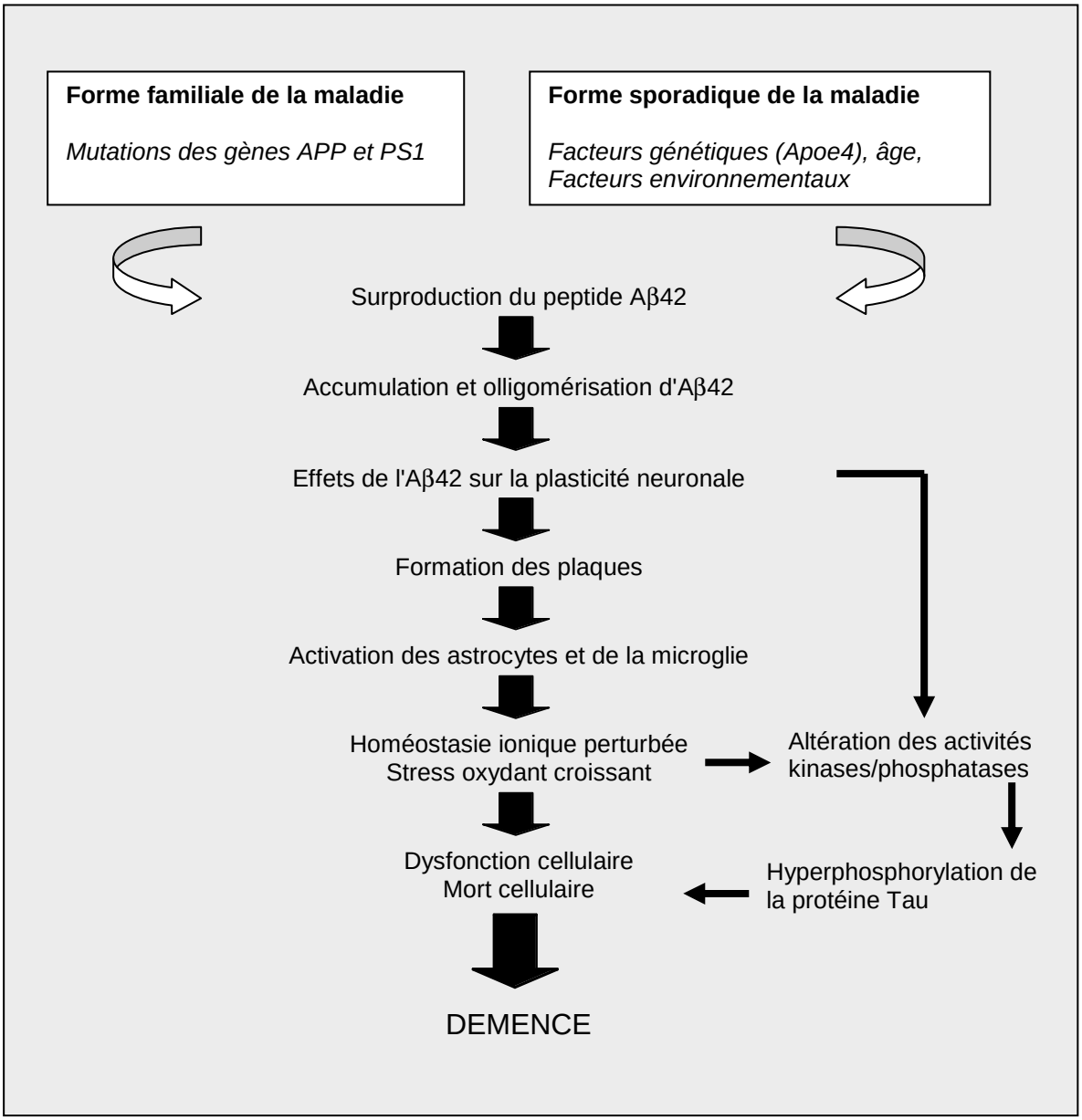


Figure 3 *: La cascade amyloïde (adaptée de Hardy and Selkoe, 2002)*

Pour que l'hypothèse amyloïde soit correcte, il est important de démontrer et comprendre les liens entre la surproduction et l'agrégation des peptides Aβ d'une part et l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires conduisant à la mort neuronale d'autre part.

Plusieurs études ont montré que les altérations du métabolisme des protéines tau, non spécifiques à la MA, ne sont pas suffisantes pour induire la formation des plaques neuritiques caractéristiques de la MA. Les résultats suggèrent ainsi que l'altération du métabolisme de l'APP et la formation des dépôts amyloïdes sont des

événements antérieurs au dérèglement du métabolisme des protéines tau (Hardy and Selkoe, 2002). Une corrélation significative entre le niveau des plaques amyloïdes et le degré des déficits cognitifs observés a été mise en évidence (Cummings et al., 1996). Un tel lien a également été établi avec le taux de peptide Aβ-42 (Naslund et al., 2000).

Par ailleurs, le peptide Aβ-42 fibrillaire induit une hyperphosphorylation des protéines tau et la formation de dégénérescences neurofibrillaires dans des cellules en culture (Busciglio et al., 1995; Zheng et al., 2002). Il agirait directement ou indirectement sur l'activation et la régulation de plusieurs protéines kinases. Toutefois, le fait que les neurones knock-out tau$^{-/-}$soient résistants à la toxicité du peptide Aβ démontre que la présence de tau est nécessaire à sa neurotoxicité (Rapoport et al., 2002). Enfin, la protéine tau tronquée est un bon prédicteur des déficits cognitifs observés dans la MA car le taux de sa forme anormalement clivée s'avère être proportionnel à l'atteinte des capacités cognitives observées chez les patients (Rissman et al., 2004).

L'étude des formes familiales a permis de reproduire des modèles transgéniques afin d'étudier le rôle des différents composants physiopathologiques de la cascade amyloïde chez l'animal. Il s'avère que si dans le cerveau humain la surproduction de peptide Aβ résultant d'une mutation de l'*APP* suffit à provoquer l'ensemble des lésions y compris les dégénérescences neurofibrillaires, dans les modèles murins la constitution de dégénérescences neurofribrillaires n'est jamais observée. Pour obtenir ces dégénérescences, il est nécessaire de créer artificiellement une mutation du gène Tau alors que ces mutations ne sont jamais observées chez l'homme dans la MA. Les paradoxes ne s'arrêtent pas là. L'évaluation des fonctions d'apprentissage et de mémorisation dans ces modèles animaux montre des troubles cognitifs progressifs en l'absence de dégénérescences neurofibrillaires alors que ces lésions sont, chez l'homme, les mieux corrélées au déficit cognitif mais également avant l'apparition des plaques neuritiques. Ainsi, ces modèles animaux transgéniques surexprimant APP ou le peptide Aβ soluble indiquent que la diminution des capacités cognitives peut se produite très précocement en dehors de la présence des lésions histopathologiques caractéristiques de la MA. Ces données suggèrent que la constitution de ces lésions ne représente que la partie visible de l'iceberg et ne traduirait que des événements

relativement tardifs dans le processus neurodégénératif initié par l'accumulation d' Aβ.

Ainsi, en dehors de l'hypothèse de la "cascade amyloïde", d'autres hypothèses ont été proposées pour expliquer la pathogénèse de la MA. Parmi celles-ci ont été suggérées l'hypothèse cérébrovasculaire, l'hypothèse du stress oxydant, l'hypothèse du dysfonctionnement mitochondrial, ou encore l'hypothèse cholinergique. Elles sont basées sur des mécanismes qui contribuent de façon importante à la physiopathologie de la maladie et qui apparaissent également très précocement dans la cascade des événements physiopathologiques de la MA, avant la mise en évidence des lésions histopathologiques. Même si actuellement, il est difficile d'établir leur implication exacte dans le processus dégénératif, cette précocité d'apparition mérite l'attention de nombreux chercheurs et suscite de nombreuses études.

6. Débit sanguin cérébral et consommation de glucose

La régulation de la circulation cérébrovasculaire est une propriété fondamentale de la circulation cérébrale : les vaisseaux sanguins ont pour fonction de maintenir le débit sanguin cérébral constant malgré des variations de pression artérielle (Niwa et al., 2002a). Cette perfusion sanguine intracérébrale assure le transport et la libération des nombreux nutriments, comme le glucose et l'oxygène, nécessaires à la survie des neurones.

Des dépôts de peptide Aβ sont observés dans la parois des vaisseaux irriguant le cortex et les leptoméninges de patients atteints de la MA (Vonsattel et al., 1991). Des applications locales de peptide Aβ soluble chez la souris normale altèrent la morphologie et la fonction normale des microvaisseaux par le biais de réactions pro-inflammatoires (Paris et al., 2000). Augmentant le phénomène de vasoconstriction, elles suppriment ainsi le mécanisme d'autorégulation de la circulation cérébrale, la rendant très dépendante de la pression artérielle moyenne, et réduisent la consommation de glucose (Niwa et al., 2002a; 2002b). Les mêmes phénomènes sont observés chez la souris transgénique surexprimant le gène *hAPP* muté (Dodart et al., 1999; Iadecola et al., 1999). A long terme, la perte des fibres musculaires lisses de ces vaissaux cérébraux induit dans certains cas des hémorragies cérébrales localisées (Christie et al., 2001). Chez l'homme, une baisse de débit sanguin cérébral

et de la consommation d'oxygène et de glucose (Benson et al., 1983; Hoyer, 1991; Nyback et al., 2001), associée à des dégénérescences microvasculaires, apparaissent très tôt dans la MA (Rapoport et al., 1996; de la Torre, 1997, 2000), localisée principalement dans les aires corticales temporo-pariétales et frontales associatives (Johnson et Albert, 2000).

Depuis de nombreuses années, les études cliniques réalisées au PET-scan à l'aide de marqueurs comme le fluorodeoxyglucose mettent en évidence des baisses intracérébrales de la consommation de glucose chez le patient atteint de démence (Hoyer et al., 2004). Il faut savoir que de faibles diminutions du métabolisme cérébral suffisent à provoquer très rapidement des erreurs de jugement, de mémorisation, d'orientation ou d'autres fonctions cognitives. Une baisse sévère et prolongée du métabolisme du glucose conduit à des troubles fonctionnels importants voire même à un syndrome démentiel irréversible (Hoyer et al., 2004). Une baisse du métabolisme du glucose est toujours présente dans les formes déclarées de la MA et elle peut être corrélée avec les modifications des performances neuropsychologiques observés au cours de la maladie (Pettegrew et al., 1994; Bartenstein et al., 1997; Blass et al., 2000; Verner et al., 2000). Ce trouble métabolique serait insulino-dépendant (Moreira, 2007) puisque un apport de glucose et d'insuline améliorent les performances mnésiques des patients atteints de la MA, au moins transitoirement (Craft et al., 2000).

Cependant, une réduction du métabolisme cérébral peut être observée avant les déficits cognitifs et l’atrophie cérébrale. Elle apparaît précocement dans la cascade physiopathologique, indépendamment des lésions histopathologiques spécifiques (Friedland et al., 1983; Haxby et al., 1986; Dodart et al., 1999; Haier et al., 2003). Elle peut même apparaître plusieurs décennies avant la symptomatologie clinique (Small et al., 1995; Reiman et al., 1996). C'est ainsi que certains auteurs s'accordent à considérer le taux de consommation de glucose comme marqueur utile précoce de la maladie. Il semblerait que la région cingulaire postérieure (ou rétrospléniale) soit une des premières régions affectées (Minoshima et al., 1994; Reiman et al., 1996; Valla et al., 2001; 2008).

Toutefois, il est intéressant de noter que si une baisse générale de la consommation de glucose caractérise l'activité métabolique cérébrale de base des patients atteints de la MA, une augmentation de la consommation régionale de glucose est observée lors de l'exécution de tâches comportementales dans les

régions impliquées, pour les patients dans les stades précoces de la maladie (Rapoport, 1999), ceux-ci ayant été comparés à une population de personnes normales du même âge. Une telle réponse est également observée chez les patients atteints de troubles cognitifs légers (Mild Cognitif Impairment, MCI) ou chez des patients non-déments atteints de trisomie 21 pour lesquels le taux de peptide Aβ est augmenté (Rapoport, 1999; Morris et al., 2002; Haier et al., 2003). Cette surconsommation anormale de glucose pourrait : 1) signer une réponse compensatoire précoce dans la progression de la maladie ou 2) signer un dysfonctionnement cellulaire, les cellules "en souffrance" devant travailler plus pour maintenir leur efficacité (Haier et al., 2003).

7. Les altérations mitochondriales dans la MA

Les cellules nerveuses fonctionnent en aérobie et par conséquent, leur activité est dépendante de la consommation de glucose et du métabolisme oxydatif. L'activité neuronale, le métabolisme du glucose et le métabolisme énergétique sont intimement liés et concentrés principalement dans le compartiment cellulaire mitochondrial.

La cellule nerveuse métabolise le glucose au niveau du cycle de Krebs par l'intermédiaire de 8 enzymes et utilise la chaîne de la phosphorylation oxydative pour fabriquer l'ATP (Adénosine tri-Phosphate) nécessaire au fonctionnement cellulaire (*Figure 4*). L'énergie fournie sous forme d'ATP au sein de la cellule nerveuse sert globalement à : 1) alimenter les pompes ioniques nécessaires au maintien du potentiel de membrane, 2) permettre le transport axonal et 3) assurer la synthèse des macromolécules et neuromédiateurs (Castellani et al., 2002).

Augmenter l'activité cellulaire requiert obligatoirement un accroissement du métabolisme énergétique au sein de la mitochondrie, la régulation se faisant par l'accumulation d'ADP (Adénosine di-Phosphate) résultant de l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, une nouvelle quantité d'énergie n'est générée que si l'énergie est dépensée. Cet équilibre qui lie le métabolisme énergétique à l'activité neuronale va donc dans le sens unique d'un contrôle de la production d'énergie par l'activité neuronale (Wong-Riley, 1989).

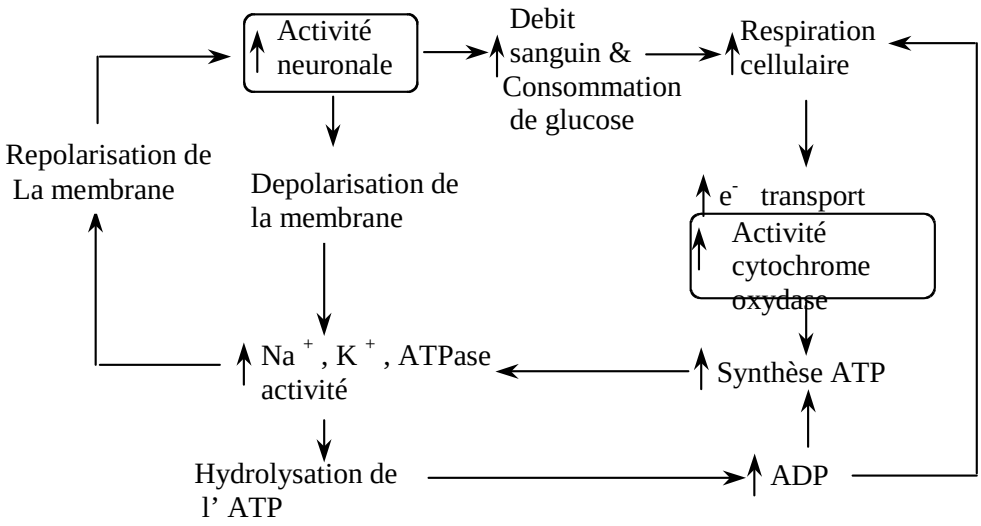


Figure 4 *: Schéma expliquant les relations entre l'activité neuronale et le métabolisme oxydatif (adapté de Wong-Riley, TNS, 1989).*

De nombreuses études expérimentales placent la pathologie mitochondriale au cœur de l'étiopathogénie de la MA. Nous allons voir que certaines des altérations sont caractéristiques de la maladie; précoces, elles pourraient constituer un élément étiologique majeur de la maladie (Parker et al., 1990; Blass and Gibson, 1991; Beal, 1992; Smith et al., 2002). Par ailleurs, le stress oxydant, directement impliqué dans la MA, contribue largement à la pathologie mitochondriale (Beal, 2005). La présence de peptide Aβ et du complexe γ-secrétase a été décrite récemment dans les mitochondries (Hansson et al., 2004).

7.1. Les modifications morphologiques

Peu de travaux ont été effectués sur la morphologie des mitochondries intraneuronales dans la MA. Des distorsions ou déformations mitochondriales apparaissent dans les premiers stades de la MA (Wisniewski et al., 1970), en premier lieu dans les neurites puis autour des plaques séniles et dans la cellule autour des dégénérescences neurofibrillaires (Johnson and Blum, 1970). Une biopsie de cortex fronto-pariétal montre une réduction de 25% du nombre des mitochondries mais une augmentation de leur taille, ces altérations étant directement liées au taux de dommage oxydatif présent dans les neurones (Hirai et al., 2001). Par ailleurs, la perte du transport axonal modifie la répartition des mitochondries dans les différents compartiments cellulaires de régions très diverses comme le cortex cérébral, le

thalamus, le striatum, le cervelet ou le locus coeruleus (Lin et Beal, 2006). Ces organites s'accumulent dans le corps cellulaire et la diminution consécutive de leur nombre et de leur taille dans les dendrites distaux contribuent à la perte des épines et de l'arborisation dendritiques ainsi que des synapses (Stokin et al., 2005; Baloyannis, 2006).

7.2. Les enzymes mitochondriales dans la maladie d'Alzheimer

7.2.1. Le cycle de la glycolyse

Le pyruvate, produit de la glycolyse est transporté aux mitochondries où il est oxydé en CO_2 par une suite de réactions d'oxydo-réduction produisant une grande quantité d'ATP. Le tronçon final de l'oxydation se fait au niveau du cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs, suite complexe de neuf réactions. Dans la MA, trois enzymes-clés mitochondriales du cycle de Krebs présentent une diminution d'activité dans les tissus nerveux prélevés en *post-mortem*, la pyruvate déhydrogénase servant à transformer le pyruvate en acetyl-CoA (PDHC; Perry et al., 1980; Yates et al., 1990), l'α-ketoglutarate déhydrogénase dépendante de la thiamine (KGDHC; Gibson et al., 1988; Mastrogiacomo et al., 1993; 1996) et l'isocitrate déhydrogénase (Bubber et al., 2005), directement corrélée avec la sévérité du score de démence évalué préalablement chez ces patients (Bubber et al., 2005).

Le peptide Aβ pourrait être en partie responsable de ce dysfonctionnement enzymatique mitochondrial car une inhibition des activités des PDHC et KGDHC est observée sur des culots de mitochondries de cerveau de rat après incubation de ceux-ci avec du peptide Aβ seul ou en association avec du monoxyde d'azote (Casley et al., 2002).

Toutefois, pour certains auteurs, il est difficile de considérer ces altérations enzymatiques comme spécifiques de la MA. Le complexe enzymatique KGDHC est fortement influencé par des facteurs comme l'hypoxie par exemple; il est également diminué dans d'autres maladies dégénératives comme la maladie de Parkinson, le syndrome de Wernicke-Korsakoff ou l'ataxie de Friedreich (Kish, 1997). Par ailleurs, aucune altération des gènes codant pour ce complexe enzymatique n'a été mise en évidence.

7.2.2 Le métabolisme énergétique et l'activité neuronale

La chaîne respiratoire servant au transfert d'électrons et à la fabrication des molécules d'ATP, se situe sur la membrane interne des crêtes mitochondriales. Elle est constituée de 4 complexes multi-protéiques transporteurs d'électrons qui, par l'intermédiaire d'un couplage au pompage de protons, transfèrent les électrons résultant de la réoxydation de 2 coenzymes réduits, le NADPH (forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide) et le $FADH_2$ (forme réduite du dinucléotide de flavine-adénine réduit).

En 1990, Parker et ses collègues mettent en évidence une diminution d'activité de la cytochrome oxydase (COX), enzyme du complexe IV de la chaîne respiratoire dans les plaquettes sanguines des patients atteints de la MA. Comme cette même équipe avait mis en évidence la déficience enzymatique du complexe I dans la maladie de Parkinson, ils proposent alors l'altération de la COX comme facteur étiopathogénique majeur de la MA. Ils suggèrent également que cette dysfonction enzymatique pourrait être le résultat d'une accumulation de mutations de l'ADN mitochondrial, cette enzyme étant codée pour plusieurs de ses sous-unités par le génome mitochondrial (Parker, 1990). Dès la publication de ces travaux et la proposition de ces hypothèses, de nombreux travaux sur la fonction mitochondriale ciblent plus spécifiquement la COX.

Avant d'analyser les résultats obtenus dans ce domaine, il nous semble opportun de présenter les caractéristiques de cette enzyme et sa configuration.

La cytochrome oxydase est une protéine constituée de 13 sous-unités chez les Mammifères : les trois premières, codées par l'ADN mitochondrial sont les pièces fondamentales catalytiques, les autres sous-unités ont une fonction de régulation et sont codées par l'ADN nucléaire (Fontanesi et al., 2006). Fabriquée en fonction des besoins énergétiques de la cellule, son activité représente ainsi la capacité énergétique des cellules travaillant en aérobie. Elle est donc, au niveau du système nerveux central, un index fonctionnel fiable du métabolisme neuronal, la glie étant basée sur des mécanismes énergétiques anaérobiques (Wong-Riley, 1989). L'activité de la COX est également corrélée avec les autres indices du métabolisme cérébral comme la glycogène phosphorylase ou le 2-déoxyglucose. Cependant, si ce dernier est un très bon marqueur d'un état "aigu", la cytochrome oxydase est un marqueur "chronique" du métabolisme neuronal, mieux adapté à l'étude des mécanismes

dégénératifs lents (Wong-Riley, 1989). Au niveau du neurone lui-même, la COX se distribue dans les différents compartiments cellulaires de façon hétérogène, suivant les demandes locales en énergie. Elle est en relation très étroite avec la fonction synaptique directement dépendante de la phosphorylation oxydative, et plus particulièrement gouvernée par les synapses excitatrices glutamatergiques et les récepteurs NMDA (Zhang et Wong-Riley, 1999), l'activité COX la plus importante étant localisée dans les terminaisons postsynaptiques des synapses excitatrices.

Après les premiers résultats de Parker et ses collaborateurs (1990), les études sur le rôle de la COX dans l'étiopathogénie de la MA se sont développées, donnant des résultats très partagés.

Les études *in vitro* montrent l'action directe du peptide Aβ sur la mitochondrie, l'inhibition conséquente de l'activité de la COX et l'induction d'un stress oxydant (Casley et al., 2002; Crouch et al., 2005). A l'inverse, une inhibition de la COX augmente la production du peptide Aβ mais aussi son agrégation (Gabuzda et al., 1994). Une baisse globale de l'activité de la COX, de sa cinétique et de son expression est décrite dans les tissus périphériques et le système nerveux central des patients Alzheimer, suggérant une atteinte structurale de l'enzyme (Hamblet et al., 2006; Parker et Parks, 1994). Des études régionales montrent une atteinte de certaines régions de l'encéphale des patients AD : l'ensemble des cortex selon Wong-Riley et col. (1997), ou plus spécifiquement le cortex pariéto-temporal (Kish et al., 1992) et l'hippocampe (Simonian et Hyman, 1993; Chandrasekaran et al., 1998; Maurer et al., 2000; Verwer et al., 2000) mais également le cortex frontal (Kish et al., 1992), le cortex occipital visuel (Wong-Riley et al., 1997), le cortex cingulaire postérieur impliqué dans la fonction de mémorisation (Valla et al., 2001) et même le cervelet (Wong-Riley et al., 1997).

Une baisse d'activité de la COX peut apparaître précocement dans des stades pré-cliniques de la MA : des patients atteints de troubles cognitifs modérés ("mild cognitive impairment" ou MCI) présentent un hypométabolisme dans la région cingulaire postérieure (Valla et al., 2006). Les altérations enzymatiques de la COX semblent donc indépendantes des lésions neuropathologiques qu'elles précèdent puisqu'on peut les observer dans des régions et des cellules indemnes de plaques neuritiques ou d'amas neurofibrillaires (Gonzalez-Lima et al., 1997); toutefois, à un stade avancé de la maladie, l'hypométabolisme observé dans les zones corticales, est lié à la quantité de plaques neuritiques (Wong-Riley et al., 1997).

La spécificité régionale de cet hypométabolisme indique une vulnérabilité différentielle des cellules liée non seulement à leur capacité métabolique en aérobie et à leur capacité de lutter contre le stress oxydant mais aussi à leur différence d'expression des gènes codant pour la protéine (Chandrasekaran et al., 1994). L'injection chez l'animal d'azide de sodium (ou azoture de sodium), un inhibiteur de la COX, produit un déficit d'apprentissage et de mémorisation sans induire de troubles moteurs montrant ainsi que les régions impliquées dans les circuits fonctionnels de la mémoire sont particulièrement vulnérables (Bennett et Rose, 1992).

Pourtant, les études sont loin de s'accorder. Par exemple, l'équipe de Kish (1992) obtient, par dosage biochimique de la COX sur certaines régions encéphaliques de tissus *post-mortem* de patients Alzheimer, une augmentation d'activité non significative de l'ordre de 20% dans l'hippocampe (Kish et al., 1992) alors que Simonian et Hyman (1993) montre par histochimie, une diminution significative d'activité de la COX dans l'hippocampe et le gyrus denté. Il est évident que l'hétérogénéité des résultats peut s'expliquer par la grande variabilité du tableau clinique de la maladie et par conséquent, des différences enzymatiques des patients Alzheimer, mais aussi par les différences de méthodologie employée, les évaluations ayant été réalisées par histochimie, immunohistochimie, biochimie par dosage spectrophotométrique de l'activité enzymatique d'homogénats de tissus ou de fractions mitochondriales ou encore par détermination de la quantité d'enzyme.

Toutefois, depuis quelques années, les études ne cessent d'alimenter les controverses. Plusieurs études sur des souris génétiquement modifiées, modèles de la MA, ont été réalisées au sein de notre laboratoire par évaluation quantitative de l'activité de la COX révélée par la technique histochimique mise au point par Wong-Riley (1979). Les résultats sont surprenants dans la mesure où ils sont souvent contraires à ceux obtenus dans les tissus *post-mortem* de patients Alzheimer. Les altérations métaboliques observées chez la souris Tg13592, caractérisée par une surexpression du fragment C99 terminal de la protéine APP sans formation de plaques neuritiques, sont toutes des augmentations d'activité de l'ordre de 10 à 15% intéressant des régions sous-corticales comme le thalamus ou le septum médian mais épargnant la formation hippocampique (Strazielle et al., 2004). Cet hypermétabolisme pourrait signer des phénomènes compensatoires car il est corrélé avec une augmentation d'activité motrice sans défaut (Lalonde et al., 2002) sauf dans le premier jour d'apprentissage du labyrinthe aquatique pour lequel les souris pourvues

de la plus grande activité métabolique dans le noyau intralaminaire du thalamus responsable en partie de l'activation corticale, étaient celles qui avaient les plus mauvaises performances comportementales (Lalonde et al., 2002). Les souris Tg13592 étant indemnes de plaques neuritiques, une telle activation de la COX pourrait signer un stade précoce de la MA qui s'inverserait alors dans les stades plus avancées. Il est, en fait, impossible de conclure ainsi car l'expertise neurochimique de la souris APP23, dotée de la mutation suédoise et caractérisée par des plaques neuritiques, une perte cellulaire dans l'hippocampe et des troubles de la mémorisation (Lalonde et al., 2002), présente également une augmentation de l'activité de la COX dans toutes les régions altérées (Strazielle et al., 2003). De plus, au niveau des cortex, on observe une augmentation de l'activité enzymatique très localisée dans le tissu neuronal entourant les plaques neuritiques illustrée par un marquage plus intense en couronne autour des plaques amyloïdes indemnes de coloration (Strazielle et al., 2003). Cet hypermétabolisme pourrait signaler une activité compensatoire de la part des cellules intactes ou des synapses restantes, celles-ci travaillant plus pour pallier à la dégénérescence. Depuis, l'hyperactivité métabolique dans les cellules entourant les plaques est confirmée par électrophysiologie (Busche et al., 2008), les auteurs proposant comme explication à cette hyperactivité, la suppression de l'action inhibitrice des fibres GABAergiques au niveau synaptique. Par ailleurs, une augmentation de l'expression de la COX est observée dans le cerveau de patients Alzheimer à un stade précoce et à une stade tardif suggérant une demande accrue de production d'énergie à différents stades de la maladie (Nagy et al., 1999; Manczak et al., 2004). L'absence d'expression de la COX dans les neurones atteints de dégénérescence neurofibrillaire indique que l'hyperactivité neuronale se trouve dans les cellules indemnes de lésions histopathologiques (Nagy et al., 1999). L'obtention d'un double-marquage en immunofluorescence de 8-hydroxyguanosine et de cytochrome oxydase au niveau de certaines cellules suggère que cette surexpression de la COX pourrait être le résultat d'une altération mitochondriale précoce relative à une augmentation de dommages oxydatifs (Manczak et al., 2004).

7.3. Mitochondries et radicaux libres dans la MA

L'élaboration d'un état de stress oxydant *via* la génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (communément appelées ROS) est un événement cellulaire avancé par de nombreuses équipes comme étant un élément central dans la

pathogénie des maladies neurodégénératives (Beal, 2000) et notamment la MA : les dommages oxydatifs induits par une concentration trop importante et non contrôlée de ROS seraient responsables de la dégénérescence neuronale observée dans la maladie (Miranda et al., 2000; Taber et al., 2000). Ces résultats ont amené à l'élaboration de stratégies thérapeutiques basées sur l'administration d'antioxydants. Cependant, comme pour les autres évènements cellulaires impliqués dans la pathogénèse de la MA, il est difficile de déterminer si les dommages cellulaires liés au stress oxydant représentent un facteur primaire initiant la maladie ou si cet évènement constitue un phénomène secondaire non spécifique du développement de la MA.

Plusieurs études montrent que le peptide Aβ induit un stress oxydant en générant des ROS par plusieurs mécanismes comme le rôle catalytique des métaux, fer, cuivre, zinc et aluminium (Atwood et al., 1998), la peroxydation lipidique membranaire (Canevari et al., 2004), le dysfonctionnement mitochondrial (Casley et al., 2002; Reddy et Beal, 2005), l'excitotoxicité glutamatergique par l'intermédiaire de mécanismes reliés aux récepteurs NMDA (Parks et al., 2001) ou encore indirectement par l'activation des cellules gliales, astrocytes ou microglie (Lee et al., 1993; Abramov et al., 2004). L'hyperphosphorylation de la protéine tau augmenterait également le stress oxydant par le biais des protéines kinases (Lovell et al., 2004).

Les zones cérébrales où la mort cellulaire intervient et où l'établissement d'un stress oxydant a été déterminé sont étroitement associées avec le dépôt des plaques séniles, impliquant l'hypothèse selon laquelle les peptides Aβ-40 et -42 agrégés sont directement responsables des dommages cellulaires irréversibles liés à la libération des ROS (Varadarajan et al., 2000). Cependant, la génération d'un stress oxydant représente, pour certains auteurs, un événement cellulaire très précoce rencontré avant la formation des dépôts amyloïdes, caractérisé par des dommages oxydatifs présents dans le cytoplasme des neurones; le stress oxydant diminuerait au fur et à mesure que les lésions neuropathologiques apparaissent (Nunomura et al., 2001; Atwood et al., 2003).

Le lien fonctionnel entre le métabolisme cérébral et le stress oxydant est particulièrement complexe. Les insuffisances énergétiques rencontrées dans la MA sont à l'origine de la synthèse anormalement élevée de ROS. Réciproquement, les radicaux libres, agissant sur la hausse de la concentration des ions calcium intracellulaire, causent des déficits du métabolisme énergétique. Par conséquent, ce

phénomène de spirale mitochondriale rappelle que cet élément est à la fois la source et la cible des radicaux libres (*Figure 5*; Blass et al., 2000). Le déficit fonctionnel de la mitochondrie contribuerait directement au déficit énergétique, à l'augmentation de la production des radicaux libres et du stress oxydant ainsi qu'à la perte cellulaire (Cassarino et Bennett, 1999, Zhu et al., 2006), et indirectement à la surproduction et à l'agrégation du peptide amyloïde (Iverfeldt et al., 1993).

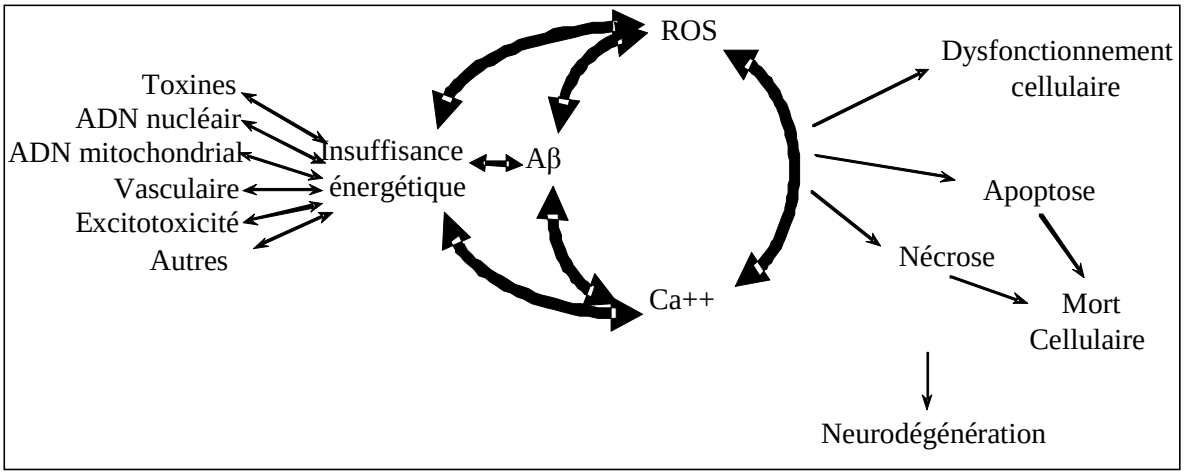


Figure 5 : *la spirale mitochondriale (adapté de Blass, PNAS, 2000)*

Outre les ROS, il existe une autre source de radicaux libres largement impliquée dans le stress oxydant et les dommages mitochondriaux, le monoxyde d'azote (NO ou oxyde nitrique - Perry et al., 2000). Considéré comme un modulateur neuronal, le NO régule l'excitabilité cellulaire et les processus mnésiques (Philippu et Prast, 2001). En excès, le NO devient neurotoxique. Comme les autres radicaux libres, le NO et ses métabolites peuvent induire des dysfonctionnements mitochondriaux, des dommages cellulaires, des détériorations membranaires et des hypersensibilités de certaines populations de neurones aux diverses sources de toxicité (de la Monte et al., 2003; Stewart et Heales, 2003). De plus, le NO a une action modulatrice inhibitrice sur l'activité de la COX; il agit donc directement sur l'activité enzymatique du complexe IV plus spécifiquement impliqué dans la MA (Cleeter et al., 1994; Brown, 1999; Moncada et Bolaños, 2006).

7.4. Oxydation et mutation des bases nucléiques mitochondriales dans la MA.

Dix fois plus vulnérable que l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial est particulièrement sensible au stress oxydant en raison du métabolisme oxydatif du compartiment mitochondrial, de la faiblesse des mécanismes de réparation, et de l'absence d'histones et d'introns (Richter et al., 1988; Beal, 2005; Kang et Hamasaki, 2005). Les dommages oxydatifs de l'ADN mitochondrial s'amplifient avec l'âge, les taux de bases nucléiques oxydées et des produits de la peroxydation lipidique s'accumulant alors que les capacités anti-oxydantes diminuent; potentiellement mutagènes, les lésions résultantes des acides nucléiques perturbent les fonctions mitochondriales et tout particulièrement la chaîne de la phosphorylation oxydative (Swerdlow et al., 1997; Lin et al., 2002). La plus abondante des bases oxydées est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Ainsi, les dommages oxydatifs et les mutations résultantes de l'ADN mitochondrial sont considérés comme des biomarqueurs du vieillissement neuronal (Abe et al., 2002; Fukui et Moraes, 2008).

Comparativement, ces altérations des bases nucléiques sont encore plus importantes dans la MA. L'évaluation quantitative des dommages oxydatifs des bases nucléiques dans le liquide céphalo-rachidien et le tissu nerveux montrent des augmentations non seulement sur l'ADN nucléaire et mitochondrial, mais également sur les ARN nucléaire et cytoplasmique (Mecocci et al., 1994; Lyras et al., 1997; Lovell et al., 1999; Nunomura et al., 1999; Abe et al., 2002; Lin et al., 2002; Wang et al., 2005). Parallèlement, une diminution des produits de réparation excrétés est mise en évidence (Gabbita et al., 1998). Une augmentation des dommages oxydatifs au sein de l'ADN mitochondrial serait à l'origine de troubles de la chaîne de la phosphorylation oxydative et l'augmentation résultante de ROS alimenterait alors en retour (cercle vicieux) les dommages oxydatifs mitochondriaux (de la Monte, 2000).

Nous avons vu que la COX est une enzyme résultant d'un double-codage nucléaire (sous-unités IV à XIII) et mitochondrial (sous-unités I à III). Une importante réduction de l'ARNmessager codant pour la sous-unité II de la COX et non pour la sous-unité IV est observée dans les cellules hippocampiques, indiquant que l'altération de la COX serait plus spécifiquement d'origine mitochondriale (Simonian et Hyman, 1994). La mise en évidence de neurones "COX négatifs et SDH positifs", indiquant une perte d'activité de la COX et la préservation de l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH), conforte l'implication de l'ADN mitochondrial dans la

pathogénie de l'atteinte de la COX (Cottrell et al., 2001) et ainsi, dans le dysfonctionnement de la chaîne de la phosphorylation oxydative (Davies et al., 1997). Une vingtaine de mutations ponctuelles ont été identifiées dans les séquences codant pour les subunités I, II et III de la COX (Qiu et al., 2001; Lin et al., 2002; Hamblet et al., 2006) parmi lesquelles, la mutation 9861, résultant de la substitution de la phenylalanine en leucine, est susceptible d'induire une baisse d'activité de 80% de la COX dans les tissus nerveux de patients Alzheimer (Hamblet et al., 2006). Par ailleurs, la mise en culture de cellules cybrides possédant l'ADN mitochondrial des plaquettes sanguines de patients atteints par la forme sporadique de la MA, montre une augmentation intracellulaire et extracellulaire du taux de peptides Aβ-40 et -42 suivie de la formation de dépôts amyloïdes extracellulaires de configuration très semblable à celle des plaques neuritiques (Khan et al., 2000) ainsi qu'une altération mitochondriale conduisant à l'activation des caspases (Cardoso et al., 2004). Même si ces résultats confortent la COX comme facteur étiologique possible de la MA, actuellement, aucune mutation mise en évidence n'a induit l'apparition systématique d'un stress oxydant et l'accumulation de peptide Aβ. De plus, de façon surprenante, la genèse d'une souris Alzheimer déficiente en COX dans le cortex cérébral et l'hippocampe (croisement d'une souris transgénique APP/PS1 avec une souris KO-COX10) provoque une réduction du nombre des plaques, une baisse de la quantité de peptide Aβ-42 ainsi qu'une diminution du stress oxydant supposant ainsi que la perte d'activité de la COX ne serait pas responsable de l'aggravation de la spirale oxydative mais serait plutôt une conséquence de la dysfonction (Fukui et al., 2007).

Ainsi, bien que la COX montre une vulnérabilité spécifique dans la MA, les études donnent des résultats très hétérogènes qui n'ont pas permis jusqu'à maintenant de considérer un déficit intrinsèque de cette enzyme comme facteur étiologique de la MA.

8. Le système cholinergique et la maladie d'Alzheimer

Il existe quatre grands systèmes de stimulation, ascendants, non spécifiques, pour le cortex cérébral, les systèmes cholinergiques, noradrénergique, dopaminergique et sérotoninergique. Ces systèmes "diffus" sont très importants pour la mémorisation, l'attention et la motivation. Ils sont très vulnérables aux processus du vieillissement particulièrement le système cholinergique directement impliqué dans la physiopathologie de la MA.

8.1. L'innervation cholinergique du système nerveux central

L'innervation cholinergique du système nerveux central est principalement constituée :

- d'un système ascendant réticulaire d'activation formé par des neurones cholinergiques organisés en 6 noyaux situés dans le cerveau antérieur et dans la partie supérieure du tronc cérébral (Mesulam et al., 1983; Mesulam et Geula, 1988) : le complexe basal cholinergique du cerveau antérieur comprend le septum médian (Ch1), la bandelette diagonale de Broca formé d'un bras vertical (Ch2) et d'un bras horizontal (Ch3) et un ensemble de structures anatomiques (Ch4) formé du noyau basal de Meynert, du globus pallidus, de la substance inominée et du noyau préoptique. Les fibres cholinergiques se projettent majoritairement sur l'hippocampe (pour Ch1/Ch2), sur le cortex limbique cingulaire (pour Ch2) et les bulbes olfactifs (pour Ch3) ainsi que sur le complexe amygdalien, l'ensemble du néocortex et le thalamus (pour Ch4). Les projections cholinergiques issues des 2 noyaux du tronc cérébral, pedonculopontique (Ch5) et laterodorsal (Ch6) du tegmentum forment la voie dorsotegmentale ascendante et innervent les noyaux diffus du thalamus facilitant la transmission thalamocorticale (Hallanger et al., 1987).
- d'interneurones disséminés dans différentes régions comme le néostriatum (noyaux caudé, putamen et accumbens), l'hippocampe, le cortex cérébral, l'hypothalamus et la moelle épinière.
- de motoneurones dans les centres segmentaires moteurs et les centres végétatifs parasympathiques.

Les neurones cholinergiques utilisent l'acétylcholine (ACh) pour la neurotransmission. L'enzyme de synthèse, la choline acétyltransferase (ChAT) ainsi que les vésicules transporteur d'ACh sont situées dans le compartiment présynaptique uniquement, alors que l'enzyme de dégradation, l'acétylcholinesterase (AChE), se trouve à la fois dans les compartiments présynaptique du neurone cholinergique et postsynaptique du neurone cholinoceptif (Smiley et al., 1997). Le compartiment postsynaptique répond à l'ACh par l'intermédiaire de récepteurs de type muscarinique ou de type nicotinique. La glie adjacente contient de la butyrylcholinesterase (BChE). L'inhibition des AChE ou BChE par des agents pharmacologiques exerce un effet cholinomimétique en retardant l'hydrolyse de

l'ACh. Ils furent les premiers agents pharmacologiques administrés dans la MA et restent les principaux même si leurs effets sont hétérogènes et parfois décevants.

Le système cholinergique joue un rôle dans le contrôle du débit sanguin cérébral (Barbelivien et al., 1999), dans l'attention et l'éveil cortical (Lucas-Meunier et al., 2003) ainsi que dans la modulation des fonctions cognitives et la plasticité neuronale (Larson et al., 1990; Schliebs et al., 1996). Les études cliniques et pharmacologiques montrent une forte corrélation entre la perte d'acétylcholine cérébrale et la diminution des performances cognitives. Les neurones cholinergiques du complexe basal antérieur dépendent du rôle neurotrophique du facteur de croissance neuronal (*Nerve Growth Factor* ou NGF) et la dégradation de celui-ci pourrait expliquer la vulnérabilité plus spécifique du système cholinergique antérieur au cours de la MA (Cuello ,1993).

8.2. Les lésions cholinergiques dans la maladie d'Alzheimer

L'atteinte du système cholinergique fait partie de la symptomatologie obligatoire de la MA (Bartus et al., 1982; Coyle et al., 1983) et se situe, par conséquent, au centre de la physiopathologie de la maladie (Atack et al., 1983, Younkin et al., 1986). L'altération semble précoce puisque les patients atteints de troubles cognitifs légers (MCI) présentent une augmentation du métabolisme cholinergique favorisant l'activation hippocampique (Shinotoh et al., 2000; DeKosky et al., 2002) et ce mécanisme de compensation neurochimique suggère l'importance du rôle joué par le système cholinergique dans les processus physiopathologiques qui conduisent à la MA (Goekoop et al., 2006).

Dans les stades cliniques de la maladie, elle se caractérise par une perte des fibres cholinergiques et de leurs terminaisons dans le néocortex et l'hippocampe (Vaucher et al., 2002; Bell et al., 2006), une diminution des récepteurs cholinergiques (Wevers et al., 2000) ou de leur activité, plus particulièrement les nicotiniques $\alpha 4$ (Perry et al., 2000) et muscariniques M2 (Meunier et Shvaloff, 1992), ainsi que par des réductions significatives de l'activité des enzymes, ChAT et AChE (Atack et al., 1983; Coyle et al., 1983; Hardy et al., 1985, Perry et al., 1992; Geula et al., 1998; Blusztajn et Berse, 2000). C'est dans les aires corticales de la région temporale que la dénervation cholinergique est la plus importante, atteignant 80% des fibres dans le cortex entorhinal (Geula et Mesulam, 1996). Il est important de souligner que l'atteinte cholinergique n'est pas générale, l'innervation du striatum par des

interneurones et celle du thalamus provenant essentiellement du tronc cérébral semblent relativement intactes. Il s'agit donc d'une atteinte sélective du cortex cérébral et plus particulièrement des lobes temporaux et des aires limbiques adjacentes. Selon l'hypothèse cholinergique, les déficits cognitifs, les pertes de mémoire et les désordres comportementaux rencontrés dans la MA, seraient en partie causés par les altérations corticales de la transmission cholinergique (Bartus, 2000). La densité de récepteurs cholinergiques révélée par tomographie à émission de positrons (PET) à différents stades cliniques de la maladie montre que l'altération neurochimique augmente avec la progression de la maladie (Nordberg, 2001).

Associée à la dégénérescence des fibres cholinergiques, une perte des cellules cholinergiques est observée dans le complexe nucléaire basal du cerveau antérieur (Coyle et al., 1983; Geula et Mesulam, 1996; Frölich et al., 2002; Lyness et al., 2003), plus particulièrement dans la partie postérieure de Ch4 comprenant les neurones responsables de l'innervation plus spécifique des lobes temporaux. Cette dégénérescence cellulaire est progressive et les premiers signes cliniques apparaissent pour des pertes supérieures à 30% de cellules. Elle pourrait : 1) s'effectuer par voie rétrograde, secondairement à la perte des terminaisons cholinergiques corticales, ou 2) représenter la lésion primaire à l'origine de la dénervation corticale. Cette perte cellulaire est liée également à la défaillance de l'action neurotrophique de NGF qui semble s'exercer très tôt et s'aggraver au fur et à mesure de la progression de la maladie (Mufson et al., 2003).

Un lien existe entre le métabolisme de l'APP et le système cholinergique : la surproduction de peptide Aβ pourrait contribuer aux variations physiologiques et aux perturbations cholinergiques pathologiques observées dans la MA (Auld et al., 1998; Pettit et al., 2001). Le dysfonctionnement du système cholinergique influencerait l'amyloïdose mais le phénomène est complexe car une lésion de la région Ch4 à l'origine d'une baisse d'activité cholinergique au niveau cortical ne déclenche pas d'amyloïdose (Boncristiano et al., 2002). L'exposition chronique au peptide Aβ à des taux micromolaires provoque la toxicité des cellules cholinergiques, peut-être par hyperphosphorylation de la protéine tau (Kar et al., 2004). Le peptide Aβ est également capable de bloquer la fonction cholinergique : à l'état soluble, il empêche le relargage de l'ACh, agrégé, il bloque le transport des lipides et le flux de choline (Auld et al., 1998). A l'inverse, la stimulation des récepteurs muscariniques M1

augmente la libération de sAPP, favorisant la voie non amyloïdogénique et diminuerait ainsi la production de peptide Aβ; sAPP stimule la ChAT et exerce son action neurotrophique (Müller et al., 1997; Nitsch et al., 1998). C'est ainsi que si un déficit important des récepteurs présynaptiques muscariniques de type M2 est observé dans la maladie, en revanche, le nombre de récepteurs postsynaptiques M1 est préservé, voire augmenté (Meunier et Shvaloff, 1992). La nicotine par l'intermédiaire des récepteurs nicotiniques modulerait le métabolisme de l'APP de façon similaire, favorisant la voie non amyloïdogénique (Seo et al., 2001; Utsuki et al., 2002; Lahiri et al., 2002).

8.3. L'acétylcholinestérase

Outre son action dans la transmission synaptique, l'acétylcholinestérase (AChE) joue un rôle important au cours du développement, dans la prolifération et la différenciation cellulaires ainsi que dans la plasticité neuronale et la réponse au stress oxydant (Talesa, 2001). Par ailleurs, l'action de l'AChE sur le métabolisme de l'APP ainsi que sa co-localisation avec les dépôts amyloïdes suggèrent que l'enzyme joue un rôle particulier dans la pathogénie de la maladie (Gomez-Ramos et al., 1992). En effet, l'AChE serait précocement engagée dans des mécanismes induisant une accélération de l'agrégation du peptide Aβ-40 (Inestrosa et al., 1996; Cottingham et al., 2002; Bartolini et al., 2003) et sa stabilisation en conformation fibrillaire (Moran et al., 1993; Reyes et al., 2004), formant alors les dépôts amyloïdes primaires. A l'inverse, le peptide Aβ, particulièrement le peptide soluble, interagirait par un stress oxydant avec l'AChE (Melo et al., 2003) en créant chez celle-ci, par l'intermédiaire des récepteurs nicotiniques α7, des modifications d'expression et de conformation (Sberna et al., 1997). Par exemple, le peptide Aβ provoque une augmentation de l'expression de la protéine dans des neuroblastomes, en limitant sa dégradation dans l'environnement extracellulaire (Hu et al., 2003), et les propriétés fibrillogéniques de l'AChE associées au peptide Aβ convertissent la séquence α-hélicoïdale de la protéine (composée de 14 AA) en feuillet β-plissé (Cottingham et al., 2002). Un double transgénique surexprimant les deux protéines humaines, APP (avec la mutation suédoise) et AChE produit des plaques plus rapidement et de taille plus importante que le simple transgénique APP (Rees et al., 2003). Par conséquent, le peptide Aβ et l'AChE constituent un complexe généralement co-localisé de forme

agrégée, insoluble et très toxique (Soto, 1995, Inestrosa et al., 1996; Inestrosa et al., 2008). Cette co-localisation, démontrée *in vitro* est également mise en évidence dans le cortex de souris transgéniques APP porteuses de la mutation suédoise (Boncristiano et al., 2002; Apelt et al., 2002). Ces résultats soulignent l'importance de développer des nouveaux inhibiteurs de cette enzyme car, outre leur action dans la transmission synaptique, ils pourraient également influencer le processus de clivage de l'APP (Rees et al., 2003).

Ainsi, si l'AChE, sous sa forme tétramérique (G4) est globalement diminuée dans les tissus cérébraux des patients Alzheimer (Atack et al., 1983), une hyperactivité d'AChE, possiblement sous sa forme monomérique (G1) est observée dans les plaques amyloïdes et les amas neurofibrillaires, dès l'apparition des premières lésions histopathologiques (Arendt et al., 1992; Moran et al., 1993; Talesa, 2001). Une augmentation d'activité de l'isoforme G1 glycosylée est observée dans des extraits tissulaires de cortex de souris transgéniques APP_{695}SWE (mutation suédoise) alors que l'activité de l'isoforme G4 reste inchangée (Fodero et al., 2002). Ce lien pourrait s'exprimer plus précocement encore puisqu'une augmentation d'activité de l'AChE est mise en évidence dans des souris transgéniques surexprimant le fragment C-terminal de l'APP, CT100 (Sberna et al., 1998) et CT99 (Dumont et al., 2006), indemnes de lésions histopathologiques. Toutefois, dans ce dernier modèle (Dumont et al., 2006), l'hyperactivité enzymatique, observée dans le cortex préfrontal mais aussi dans d'autres régions, Ch1, Ch4, la formation hippocampique et le thalamus, après corrélation avec les résultats comportementaux, indiquait plus des compensations fonctionnelles qu'une interaction délétère entre l'enzyme cholinergique et le peptide Aβ.

Ainsi, si l'importance du rôle joué par le système cholinergique dans la MA n'est plus à démontrer, de nombreux points restent à élucider quant à la chronologie d'apparition de ces lésions en lien avec la cascade amyloïde et les déficits cognitifs.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

Hypotheses et objectifs de travail

L'impressionnante accumulation de données concernant les mécanismes pathologiques cellulaires et tissulaires impliqués dans la MA scelle l'idée que le peptide Aβ est un des éléments-clé du développement de la maladie, l'hypothèse de la cascade amyloïde impliquant l'agrégation du peptide Aβ comme facteur causal de la maladie.

Cependant, la cascade amyloïde ne permet pas d'expliquer à elle-seule toutes les caractéristiques physiopathologiques de la maladie, plus particulièrement dans les phases précoces, pré-cliniques, certainement les plus importantes à appréhender en matière de prévention ou d'intervention thérapeutique.

Ainsi, au vu des altérations, présentes bien avant l'apparition des plaques séniles, de nombreux travaux s'accordent à reconnaître les formes solubles du peptide Aβ comme médiateur principal de la neurotoxicité dans la MA. L'action du peptide Aβ-42 sur de nombreux compartiments cellulaires et tissulaires a permis l'émergence d'autres hypothèses basées sur l'action d'un stress oxydant, une atteinte du métabolisme mitochondrial ou des perturbations de la fonction cholinergique. Il est certain que ce sont des éléments importants de la physiopathologie de la MA, liés les uns aux autres, mais comme les altérations semblent apparaître très précocement dans la chronologie évolutive de la maladie, la question du facteur causal reste posée.

Par ailleurs, l'analyse bibliographique nous montre que les résultats obtenus dans les études *in vitro* sont souvent différents de ceux obtenus par les études *in vivo* car c'est sans compter avec les formidables réactions compensatoires que possède tout système intégré. De plus, outre les variabilités techniques, la grosse difficulté réside dans le fait que tout modèle animal actuel, lésionnel ou génétique, ne permet pas de reproduire la totalité des symptômes de la maladie, ni son développement.

Compte tenu de l'orientation du projet de recherche de l'équipe dans laquelle j'ai travaillé et de l'avancée des différents travaux déjà effectués, la recherche qui m'a été confiée s'inscrit dans la continuité des études visant à caractériser les modèles animaux transgéniques, susceptibles de reproduire la MA.

Plusieurs modèles animaux, génétiquement modifiés, ont été créés grâce aux mutations humaines trouvées dans les formes familiales de la MA.

Notre travail porte sur deux souris porteuses de mutations simples du gène *PS1* (souris KO *PS1*/A246E et souris KI *PS1*/I213T), le gène *PS1* étant responsable du plus grand nombre des formes familiales. Ces modèles présentent tous deux une surexpression neuronale du peptide Aβ-42 sans amyloïdose. Ils offrent, par conséquent, l'avantage d'une étude à un stade précoce de développement de la maladie, le but principal de notre travail étant leur caractérisation phénotypique, physiopathologique et neurochimique.

Au cours de mon travail, mes efforts se sont focalisés sur des objectifs spécifiques ciblant des altérations et signes précoces de la maladie, à la base des hypothèses évoquées précédemment :

1. L'étude de l'activité métabolique neuronale, reflet de la fonction mitochondriale au moyen de la COX, enzyme du complexe IV de la chaîne de la phosphorylation oxydative. Une cartographie régionale de l'ensemble de l'encéphale permet d'appréhender les réseaux fonctionnels et de corréler leur altération avec les troubles comportementaux. L'utilisation de la COX comme marqueur de l'activité métabolique est également pertinente dans son évaluation comme facteur causal pathogénique de la MA.
2. L'étude de la fonction cholinergique, en lien direct avec les fonctions cognitives, par l'intermédiaire d'une révélation histochimique de l'activité AChE. Bien que non spécifique, cette enzyme est un bon marqueur de l'innervation cholinergique du cerveau antérieur. Elle représente le seul marqueur utilisable en imagerie chez l'homme et permet ainsi la comparaison avec les études cliniques. L'évaluation de cette enzyme par cartographie sur l'ensemble de l'encéphale permet une étude globale de tout le système cholinergique ascendant d'activation cérébrale. Elle permet également de tester le lien direct qu'elle établit avec le peptide Aβ.
3. Une expertise des lésions tissulaires au niveau de l'encéphale au moyen de marqueurs histologiques standards et d'une évaluation morphométrique ainsi qu'une évaluation régionale de la quantité de peptide Aβ et du dommage oxydatif évalué au niveau des molécules d'ADN nucléaire et mitochondriale.

Ces données permettent d'étudier l'incidence du peptide Aβ sur les fonctions étudiées et le stress oxydant.

Une étude quantitative de l'expression de la NOS neuronale (oxyde nitrique synthétase) a été effectuée parallèlement en immunohistochime et histochimie par l'intermédiaire de la NADPH-diaphorase. Nous avons choisi de ne pas présenter les résultats dans ce travail car les marquages obtenus pour les deux techniques ont montré une grande hétérogénéité pour certaines des régions étudiées mettant en doute les protocoles utilisés.

RESULTATS ET DISCUSSION

1ERE PARTIE

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES MUTATIONS *PS1*-A246E et -I213T

Les modèles animaux : caractéristiques générales et évaluations comportementales

I.1. Introduction

Les études neuro-comportementales des mutations *PS1* qui font l'objet de notre travail ont été réalisées à Rouen (Lalonde et al., 2003; Lalonde et Strazielle, 2005). Nous n'avons donc pas pu y participer mais nous nous sommes familiarisées aux différents tests lors d'expérimentations comportementales effectuées par l'équipe à Nancy. Etant donné notre investissement dans le projet global et plus particulièrement dans l'étude des deux mutations A246E et I213T expertisées par le laboratoire, nous avons été intégrée comme co-auteur d'un article de revue sur la caractérisation neuro-comportementale de modèles animaux, souris transgéniques présentant une mutation *PS1 :*

Robert LALONDE, Rozat JAZI and Catherine STRAZIELLE
NEUROBEHAVIORAL CHARACTERISTICS OF PRESENILIN TRANSGENIC MICE
In : Cognitive Sciences (M.-K.SUN, ed.), 2005, 1-2 :169-204.

Après une présentation de nos deux modèles utilisés, nous allons nous servir de ce premier article pour en présenter les résultats comportementaux, les comparer et les rapporter à la symptomatologie clinique de la MA. Ces évaluations sont importantes pour appréhender nos études neurochimiques car les déficits fonctionnels sont le reflet des altérations chimiques du système nerveux central.

I. 2. Les modèles animaux

I.2.1.La mutation *PS1*-A246E

Les souris transgéniques *PS1*-A246E ont été générées par le laboratoire Merck (Rahway, New Jersey, USA) il y a une dizaine d'années. Ces souris transgéniques ont été créées à partir d'un knock-out (KO) pour lesquels le gène *PS1* murin a été supprimé. Le gène *PS1* humain a été inséré, non muté (Thy-*hPS1*) ou muté (Thy-*hPS1A246E)*. Une telle construction présente un intérêt certain car elle élimine la possible influence exercée par le gène murin, le seul gène PS1 à s'exprimer étant d'origine humaine et la comparaison intergroupe se faisant entre gène humain normal et gène humain possédant la mutation A246E.

L'étude des fonctions de la préséniline1 par l'intermédiaire de souris knock-out (KO), a montré que la souris KO homozygote était létale avant la naissance ou juste

après, car elle souffrait d'importantes anomalies du squelette axial, d'une perte neuronale au niveau du système nerveux central et de sévères hémorragies cérébrales ou spinales (Shen et al., 1997; Wong et al., 1997). Ces résultats démontraient que la préséniline1 est indispensable au développement normal du système nerveux central. L'insertion du gène humain *PS1* normal ou possédant la mutation A246E, à l'aide du promoteur Thy-1 spécifique du neurone, sauvait le phénotype des souris PS1-/- de la mortalité et des malformations (Qian et al., 1998). Ainsi, la mutation du gène PS1 ne compromet par son activité normale au cours du développement et il semblerait que des taux bas d'expression de la protéine humaine soient suffisants pour supporter une fonction normale.

L'évaluation des taux de peptide Aβ-40 et Aβ-42-43, par ELISA dans l'encéphale de ces souris, montre une augmentation d'environ 100% du taux de Aβ-42-43 ainsi que du rapport Aβ-42-43/ Aβ-40 dans le groupe des souris *PS1*-A246E, indiquant ainsi que cette surexpression de peptide $A\beta_{42-43}$ résulte directement de la mutation *PS1* (Duff et al., 1996; Qian et al., 1998) qui influence le clivage de l'APP pour augmenter et accélérer la production de peptide Aβ-42-43 (Lewis et al., 2004).

Ces souris ne présentaient ni dépôt amyloïde, ni perte neuronale ou gliose. Toutefois la mutation humaine *PS1*-A246E exprimée avec la mutation *APP*swe (double mutation) accélère et augmente les dépôts amyloïdes de manière dramatique; alors que la mutation APPswe seule montre des dépôts amyloïdes chez les souris transgéniques à partir de l'âge de 18 mois, la double-mutation (*APPswe*/*PS1*-A246E) présente des plaques amyloïdes dans l'hippocampe, le subiculum et les cortex frontaux et occipitaux dès l'âge de 10-12 mois (Borchelt et al., 1997).

Les études effectuées en culture cellulaire sur des neurones de l'hippocampe de souris exprimant la mutation *PS1*-A246E ont montré une diminution de la transmission synaptique, traduite par une réduction du nombre des synapses et une diminution de la synaptophysine (Priller et al., 2006).

Nous avons vu précédemment que les mutations *PS1* perturbent l'homéostasie calcique intracellulaire produisant ainsi une altération des propriétés éléctrophysiologiques des neurones; normalement dépendante de l'entrée intracellulaire de calcium, la potentialisation à long terme (LTP), présente dans l'hippocampe et associée à l'apprentissage visuo-spatial, est augmentée chez les souris transgéniques exprimant la mutation *PS1*-A246E (Parent et al., 1999).

Les souris sur lesquelles nous avons travaillé provenaient directement du laboratoire Merck (NJ, USA). L'étude comportementale a été menée à Rouen (Lalonde et al., 2003) et nous avons récupéré les cerveaux à Nancy pour les études neurochimiques.

I.2.2.La mutation *PS1*-I213T

La mutation *PS1*-I213T est une mutation découverte dans une famille japonaise il y a une dizaine d'années. Elle induit une apparition précoce de la MA dès l'âge de 45 ± 4 ans (Hardy, 1997; Kamino et al., 1996). Des souris Knock-In (KI *PS1*-I213T) présentant la mutation ont été générées par une équipe Japonaise de l'Université d'Osaka. Par rapport aux modèles transgéniques, le modèle KI présente un avantage : l'insertion du gène humain *PS1* possédant la mutation japonaise I213T est inséré sur le site chromosomique normalement occupé par le gène endogène murin, écrasant ainsi l'expression de ce dernier (Nakano et al., 1999). Les souris sont générées sur un fond génique hybride B6 x 129/SvJ. Les études s'effectueront donc par comparaison des souris homozygotes (*PS1/PS1*) ou hétérozygotes (*PS1*/+) à des souris contrôles (+/+) présentant le même fond génique hybride.

Les souris *PS1*-I213T, hétérozygotes et homozygotes, évaluées à 16-20 semaines post-natales, sont caractérisées par une augmentation spécifique du taux de peptide Aβ-42 et plus particulièrement du rapport Aβ-42/ Aβ-40 sans accumulation intracellulaire ni dépôts amyloïdes extracellulaires (Nakano et al., 1999). La comparaison avec les souris contrôles a montré que le taux d'Aβ-42 était multiplié par un facteur multiplicateur de 1,3 chez les hétérozygotes et, par un facteur double chez les homozygotes, indiquant par ces résultats que la quantité d'expression du gène *PS1* muté détermine le taux de production du peptide Aβ-42 (Nakano et al., 1999). Il semblerait que la mutation *PS1*, par son action sur la γ-secrétase, non seulement accélère le clivage du fragment C99 mais aussi le perturbe, inhibant la production d'Aβ-40 au profit de la production d'Aβ-42, voire même de peptides plus longs (Masafumi et al., 2008).

Récemment, la présence de protéine tau hyperphosphorylée a été observée dans l'hippocampe de ces souris hétérozygotes ou homozygotes, dès l'âge de 2 mois, suggérant que les mutations *PS1* ne causent pas seulement une surproduction d'Aβ-42 mais pourraient aussi affecter le cytosquelette des neurones, induisant l'accumulation des neurofilaments liés à l'hyperphosphorylation de la protéine tau

(Tanemura et al., 2006). Des observations de souris hétérozygotes à différents âges ont montré que ce phénomène apparaissait dans la région CA3 de l'hippocampe pour s'étendre ensuite plus largement dans la formation hippocampique. De faibles augmentations ont également été observées dans le cortex cérébral, le striatum et le cervelet. Conjointement un marquage TUNEL n'a révélé aucun signe d'apoptose dans ces neurones (Tanemura et al., 2006).

Actuellement, aucune autre étude n'a été référenciée sur ce modèle dans la littérature si ce n'est la caractérisation comportementale effectuée par l'équipe dans laquelle nous avons travaillé (Lalonde et Strazielle, 2005). Un élevage de souris KI *PS1*-I213T a été effectué pendant 2 ans (2004-2005) à l'Université de Rouen, élevage réalisé à partir de couples de souris hétérozygotes (+/PS1m) provenant du laboratoire d'Osaka qui les fabrique. Après l'étude comportementale réalisée à Rouen, nous avons récupéré les encéphales pour réaliser les études neurochimiques qui font l'objet de notre travail.

I.3. Etudes comportementales

I.3.1. Evaluation neurologique globale

Certains symptômes neurologiques peuvent apparaître dans la MA. Des myoclonies ou des crises d'épilepsie, pouvant résulter d'un trouble cérébelleux (Sjöbeck et al., 2001) ou d'une atteinte du système sérotoninergique (Pappert et al., 1998), sont présentes dans les stades avancées de la maladie (Chen et al., 1991; Förstl et al., 1992), particulièrement dans les formes familiales (Campion et al., 1996). Des réflexes posturaux anormaux tels que des succions, des crispations manuelles ou des agrippements peuvent également apparaître au cours de la maladie; ils signent en général une atteinte du lobe frontal (Förstl et al., 1992).

Le SHIRPA (SmithKlline / Harwell / Imperial College / Royal Hospital / Phenotype Assessment) sert à détecter ces troubles neurologiques (Rogers et al., 1997). Par des tests simples et rapides de manipulation de l'animal, il expertise les réflexes posturaux normaux et anormaux, les fonctions sensorielles, les réactions anormales face à un stimulus. Certains réflexes d'agrippement des pattes antérieures ou postérieures ont été observés, par exemple, chez des souris *APP*23 (mutation suédoise) âgées, lorsqu'elles étaient tenues par la queue (Lalonde et al., 2005). Ces mêmes souris présentaient des sautillements verticaux rapides et répétés sur leurs pattes postérieures le long de la paroi de la cage, ces comportementaux

anormaux s'apparentant aux myoclonies des patients atteints de MA (Lalonde et al., 2005).

Aucun réflexe anormal n'a été détecté dans les deux modèles de mutation *PS1* dont nous disposons. Toutefois, une force musculaire plus importante dans les pattes antérieures et une réaction exacerbée au bruit caractérisent la mutation PS1-I213T. Par ailleurs, des sautillements anormaux apparentés à des myoclonies étaient observées dans 21% des souris *PS1*-A246E alors que les souris *PS1*-I213T étaient indemnes.

I.3.2. Evaluation de l'activité d'exploration et de l'anxiété

L'activité motrice d'exploration est en général évaluée dans un "open-field" ou "champ ouvert" (Walsh et Cummins, 1976), enceinte ouverte vers le haut permettant, lorsque la version du test est automatisée, de calculer le nombre de mouvements horizontaux et verticaux (redressement sur deux pattes), lents ou rapides correspondant respectivement à des déplacements ou à une mobilité sans déplacement, pour un temps donné.

L'estimation de l'activité d'exploration et de l'anxiété chez la souris est à mettre en rapport avec les comportements inhérents aux changements d'humeur et de perception ou de transmission des émotions observés chez la personne atteinte de MA (Chung and Cummings, 2000). L'activité d'exploration peut traduire une apathie accompagnée parfois chez l'homme de troubles du comportement social et d'une dépression ou, à l'opposé, une agitation accompagnée d'un comportement de désinhibition ou d'euphorie.

Le test d'alternance spontanée (test sur 11 jours consécutifs) explore la curiosité vis à vis de la nouveauté. Les souris placées dans un labyrinthe ont le choix de visite de deux bras, l'un familier et l'autre non familier.

Une baisse de l'alternance (-50% de bras non familiers dans le choix) peut traduire la néophobie ou la baisse de curiosité naturelle observées chez certains patients atteints de la MA (Chung and Cummings, 2000).

Les deux mutations ne présentaient aucune différence de résultats avec les contrôles respectifs au niveau des divers paramètres mesurés dans l'open-field ou du labyrinthe en T. Il semblerait, selon la littérature actuelle, qu'aucune mutation *PS1* ne perturbe cette fonction d'exploration : l'activation cérébrale ainsi que la curiosité naturelle vis à vis des éléments nouveaux ne sont donc pas affectées.

Toutefois, le choix d'alternance chez les souris *PS1*-A246E avait une latence plus importante : les souris mettaient donc plus de temps à faire le choix du bras à visiter que les souris contrôles. Cet élément pourrait traduire une certaine lenteur cérébrale, et par conséquent une baisse de l'activation cérébrale, mais subtile puisqu'elle ne s'exprime pas dans le test de l'open-field.

Plusieurs tests peuvent mesurer l'anxiété (Cole and Rogers, 1993; Holmes, 2001). La souris possède une anxiété naturelle vis à vis des espaces ouverts et clairs. Elle a tendance à choisir les endroits confinés et sombres. Ce comportement est normal, certainement lié au fait qu'elle évite de s'exposer aux prédateurs potentiels. Les tests utilisent cette caractéristique. Cette mesure de l'anxiété est pertinente dans la MA car les patients peuvent manifester une néophobie ou, à l'opposé, une tendance à la désinhibition se traduisant par des crises de rire ou une indifférence (Chung and Cummings, 2000).

Le labyrinthe en croix surélevé est formé de 4 bras, 2 fermés et sombres et 2 ouverts (simples plates-formes). Le rapport du nombre des visites des bras ouverts / visites des bras fermés pendant une durée donnée (5 minutes - 2 jours consécutifs) mesure ce comportement d'anxiété. Plus ce rapport augmente, plus la souris montre un comportement de désinhibition. La mesure du temps passé dans chaque catégorie de bras est également calculée.

Le test d'émergence est un second test utilisé pour évaluer l'anxiété. Une petite enceinte est placée au centre d'un compartiment plus grand. Sur une durée de 5 minutes, on mesure le temps mis par la souris à sortir de la petite enceinte (endroit confiné et sombre), pour explorer la grande enceinte qu'elle ne connaît pas.

Au niveau du test du labyrinthe en croix surélevé, une perte de l'anxiété naturelle était observée dans le groupe des souris *PS1*-A246E : celles-ci présentaient une augmentation, à la fois, du nombre des bras ouverts visités et du temps passé dans les bras ouverts. La mutation *PS1*-I213T n'a pas montré de changement par rapport aux contrôles quant à l'exploration des bras ouverts; toutefois, elle présentait une diminution du nombre des bras fermés visités. Les résultats obtenus dans les autres mutations déjà étudiées sont variables et semblent dépendre du modèle animal utilisé.

Dans le test d'émergence, les 2 types de souris mutées avaient des scores semblables à ceux de leurs contrôles respectifs.

I.3.3. Evaluation de la coordination motrice

Plusieurs tests sont utilisés pour évaluer la coordination motrice (Lalonde et Strazielle, 1999). Celle-ci regroupe l'équilibre, la fonction posturale et la fonction dynamique. Si ces différentes fonctions motrices sont indissociables, certains tests peuvent en évaluer un des aspects plus spécifiquement. Les tests de la poutre horizontale et du cintre calculent la distance parcourue sur le dispositif ainsi que la latence avant la chute. Le rotarod est un mât horizontal tournant sur un axe avec une vitesse croissante. La souris placée sur ce mât est obligée de marcher et d'adapter sa vitesse de marche à la vitesse de rotation du mât si elle ne veut pas tomber.

Bien que la MA soit considérée comme une maladie touchant la mémoire et les fonctions cognitives, des troubles posturaux et d'équilibre ont été décrits dès les premiers stades de la maladie (Pettersson et al., 2002). Les atteintes motrices peuvent être sévères dans les stades les plus tardifs de la maladie. Ainsi, l'évaluation de la motricité dans ces modèles animaux ne doit pas être négligée.

Seules les souris *PS1*-A246E ont montré un léger trouble de leur fonction motrice par rapport à leurs contrôles, la quantité de chutes lors des déambulations sur la poutre horizontale étant plus importante. Ce résultat n'a pas été confirmé sur le test du cintre suggérant ainsi une atteinte très spécifique dans les fonctions d'équilibre et de posture. Aucune déficience n'a été observée sur le rotarod. Les souris *PS1*-I213T n'ont présenté aucune déficience de la fonction motrice.

I.3.4. Evaluation des capacités d'apprentissage

La capacité d'apprentissage et par conséquent la mémorisation de nouvelles informations est un des premiers troubles de la MA (Jacobs et al., 1995). La désorientation spatiale est également précoce (Rainville et al., 2002; Monacelli et al., 2003).

Le test le plus employé dans les études chez l'animal est le test du labyrinthe aquatique (Morris et al., 1982). Les animaux sont introduits à des points différents d'un bassin rond dans lequel est placée une plate-forme immergée et invisible mais susceptible de permettre à l'animal de sortir de l'eau. Au fur et à mesure des essais (4/j) et des jours (5), les animaux, grâce à un repérage spatial et environnemental sauront retrouver la plate-forme pour pouvoir échapper à l'eau rapidement. L'évaluation est généralement complétée par un test de nage sans plate-forme et un

test pour lequel la plate-forme est visible, ceci afin de vérifier la rétention des informations et d'écarter une éventuelle cause visuelle.

Les deux mutations ont donné des résultats différents. Si la mutation *PS1*-A246E ne montrait aucun trouble d'apprentissage et de mémorisation, la mutation *PS1*-I213T présentait un retard d'apprentissage. Les souris apprenaient moins vite que les souris contrôles mais elles retenaient l'information apprise.

I.3.5. Tableau récapitulatif

Tests comportementaux	***PS1*-A246E**	***PS1*-I213T**
Exploration motrice		
- open-field	normale	Normale
- labyrinthe en T	Alternance normale Latence augmentée	Normale
Anxiété		
- labyrinthe en croix surélevé	Visites "bras ouverts" Nombre ↑- temps ↑	Visites "bras fermés" Nombre ↓
- émergence	normale	Normale
Coordination motrice		
- poutre horizontale	Chutes ↑	Normale
- cintre	normale	Normale
- rotarod	normale	Normale
Apprentissage visuo-spatiale		
- labyrinthe aquatique	Normale	Apprentissage plus lent
SHIRPA		
- réflexes posturaux	Normaux	Normaux
- force musculaire	Normale	Augmentée
- myoclonies	3 /14 souris	Pas de myoclonies

2EME PARTIE

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE de la MUTATION *PS1*-A246E

Etude neurochimique et neuropathologique

II.1 Publication N°1

Regional brain cytochrome oxidase activity in *PS1*/A246E mutation: correlations with behavioral performances and oxidative stress

Catherine STRAZIELLE, Rozat JAZI, Yann VERDIER, Su QIAN and Robert LALONDE

Publication acceptée dans la revue Neurochemistry International Aout 2009.

II.1.1 Objectifs de l'étude

Pour cette étude, nous disposons de deux groupes de souris âgées de 12 mois provenant du Laboratoire Merck (NJ, USA) pour lesquels le gène *PS1* murin a été supprimé (*mPS1*$^{-/-}$). Le gène *PS1* humain a été inséré, non muté pour le groupe contrôle (Thy-*hPS1*) et muté (Thy-*hPS1A246E)* pour le groupe pathologique. Les souris *PS1*-A246E se caractérisent par une surexpression d'Aβ_{42} sans présence de dépôts amyloïdes (Qian et al., 1998).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la mutation *PS1*-A246E induit une tendance à la désinhibition, un ralentissement psychomoteur dans la prise de décision ainsi qu'un faible trouble moteur. Par contre, les souris ne présentent aucune perte des capacités d'apprentissage et de mémorisation (Lalonde et al., 2003). Les troubles comportementaux ne s'apparentant pas aux stades établis de la maladie d'Alzheimer, la caractérisation neurochimique de ce modèle présente un grand intérêt car elle permet d'étudier les altérations précoces de la maladie souvent inaccessibles dans les études cliniques chez l'Homme.

Dans ce travail, nous étudions la fonction mitochondriale et le stress oxydatif, qui, pour de nombreux auteurs, représentent deux facteurs principaux précoces dans l'étiopathogénie de la maladie d'Alzheimer.

Une cartographie histochimique de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase (COX) est réalisée sur l'ensemble de l'encéphale (120 régions). Elle permet de mesurer l'activité métabolique neuronale pour chaque région étudiée. Une cartographie plus modeste est effectuée, au niveau des régions affectées dans la maladie d'Alzheimer ainsi qu'au niveau des régions qui présentaient des

changements d'activité métabolique, pour évaluer la quantité d'oxydation de l'ADN (nucléaire et mitochondrial) au moyen d'un marquage du 8-OHdG par immunohistololgie. En complément, le peptide $A\beta_{42}$ est quantifié dans ces mêmes régions après son marquage en immunohistologie. Enfin, une observation histopathologique est réalisée au moyen de deux colorations : le Fluoro-JadeB marque positivement en jaune-vert fluorescent, les cellules en dégénérescence, les astrocytes excités et les dépôts amyloïdes. Le crésyl-violet permet d'expertiser la perte cellulaire et l'atrophie régionale.

Les objectifs principaux de cette étude répondent à plusieurs questions posées :

- L'augmentation intracérébrale du peptide Aβ-42 a t-elle une incidence directe et précoce sur l'activité métabolique des cellules et quelles sont les structures cérébrales affectées?
- Les perturbations métaboliques cérébrales sont-elles responsables des troubles du comportement obtenus précédemment sur ces mêmes souris?
- L'augmentation régionale du peptide Aβ-42 est-elle à l'origine d'un stress oxydant local?
- Les troubles métaboliques sont-ils liés avec la quantité d'oxydation des bases d'ADN et par conséquent, sont-ils dépendants du stress oxydant local.

II.1.2 Manuscrit

Abstract

Mitochondrial function and oxidative stress are closely related in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), producing an overall hypometabolism at the end-stage. Regional brain metabolism was analyzed by cytochrome c oxidase (COX) histochemistry in *PS1*-A246E mouse mutants, a model of autosomal dominant AD overexpressing beta-amyloid (Aβ) peptide without amyloidosis or cell degeneration. Immunohistochemical samples were analyzed on adjacent sections for evaluating regional Aβ1-42 levels, as well as DNA oxidative damage with 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) at the DNA level. COX activity increased in the forebrain basal nuclear complex, specific parts of the amygdala and hippocampus, as well as in striatum and connected regions, such as the superior colliculus, and the lateral habenula. On the contrary, a hypometabolism was observed in the midline thalamic, interpeduncular, and pedonculopontine nuclei. The integration of these regions in circuitries subserving emotions, arousal, and cognitive functions may explain why neurochemical alterations in specific brain regions were linearly correlated with psychomotor slowing and disinhibitory tendencies previously reported in the mutant. As the *PS1*-A246E model appears to mimick prodromal AD, the results support the existence of mitochondrial abnormalities prior to AD-related cognitive deficits. However, since *PS1*-A246E brain regions affected in their metabolism were not primarily those altered in AD-associated histopathological features and did not systematically display either Aβ overexpression or higher 8-OHdG immunolabelling, the hypermetabolism observed seems to comprise a compensatory reaction to early mitochondrial abnormalities; furthermore, neuronal synaptic function should be considered as particularly relevant in COX activity changes.

1. Introduction

In patients with Alzheimer's disease (AD), decreased blood flow and neuronal metabolic activity are considered very early hallmarks of the disease, preceding significant cognitive impairments and amyloid deposition (Reiman et al., 1996; Niwa et al., 2000; Small et al., 2000). An associated mitochondrial dysfunction (Beal, 1995), more precisely a focal alteration in cytochrome c oxidase (COX) activity transmitted through mitochondrial genes has been proposed as a central etiologic event (Parker et al., 1990; Simonian et Hyman, 1994; Parker and Parks, 1995; Parker and Davis, 1997; Swerdlow et al., 1997; Maurer et al., 2000; Cottrell et al., 2001), where metabolic defect, oxidative stress, and Aβ peptide feed themselves in a vicious circle (Iverfeldt et al., 1993; Canevari et al., 1999; Cassarino and Bennett, 1999; de la Monte et al., 2000; Hirai et al., 2001; Parks et al., 2001; Casley et al., 2002). COX is the terminal enzyme of the electron transfer chain immediately preceding ATPase and its activity, correlated to its amount, is closely related to neuronal activity (Wong-Riley, 1989). COX activity has been found to be decreased in several *postmortem* AD brain regions (Kish et al., 1992, 1999; Wong-Riley et al., 1997; Chandrasekaran et al., 1998; Valla et al., 2001). However, COX cartography in the Tg13592 model overexpressing APP-C99 fragment showed regionally selective increases in enzymatic activity (Strazielle et al., 2004). A similar neuronal hyperactivity was revealed in APP23 with Aβ plaques (Strazielle et al., 2003; Busche et al., 2008) and higher COX gene expressions were found in AD brain specimens, possibly due to functional compensation in early or mild stages of neuropathology to glutamatergic excitotoxicity (Nagy et al., 1999; Hirai et al., 2001; Hynd et al., 2004; Manczak et al., 2004) or to impaired synaptic inhibition (Busche et al., 2008). It is noteworthy that glucose consumption of Alzheimer patients performing behavioral tasks increased relative to age-matched controls in mild but not in severe dementia (Rapoport, 1999), or in non-demented Down syndrome patients at baseline (Haier et al., 2003). The functional significance of these enzymatic alterations is still unclear, though COX expression and activity may vary in accordance with clinical stages of the disease and with the possible vulnerability of the regions to oxidative stress, inflammation or Aβ peptides (de la Monte et al., 2000).

Presenilin-1 (PS1) mutations are involved in most cases of autosomal dominant, early-onset AD (Campion et al., 1996; Price and Sisodia, 1998; Czech et

al., 2000). The *PS1* gene, encoding a protein facilitating Notch signalling, is normally required for proper neural morphology and function (Wittenburg et al., 2000). However, the mutated protein leads to increased production of the more amyloidogenic form 1-42 of the Aβ peptide by altering cleavage processing at the γ-secretase site (Duff et al., 1996; Jankowsky et al., 2004). It affects cell functions including calcium homeostasis, cell adhesion, synaptic plasticity (Czech et al., 1998; Sisodia et al., 1999; Dowjat et al., 2001; Guo et al., 2005), and may promote the vulnerability of neurons to apoptosis through various mechanisms, such as free radical production and reduction of the β-catenin signaling pathway (Begley et al., 1999; Kang et al., 1999; Grilli et al., 2000; Leutner et al., 2000). In an opposite manner to cell studies, transgenic mice overexpressing mutated human *PS1* alone did not induce detectable lesion, except for elevated brain $Aß_{1-42}$ levels and cellular stress (Chui et al., 1995; Duff et al., 1996; Borchelt et al., 1997; Citron et al., 1997; Barrow et al., 2000), together with minor behavioral changes (Janus et al., 2000; Lalonde et al., 2003). Therefore, *PS1* mutations may be relevant for studying early neurochemical changes often inaccessible in clinical studies. To study the potential impact of early-stage amyloid pathology on regional brain metabolism, a quantitative histochemical cartography of COX activity was undertaken in the *PS1*/A246E mouse mutant on a murine *PS1* null background causing a gain-of-malfunction increase of brain $Aß_{1-42}$ concentrations in the absence of plaque deposits (Qian et al., 1998). The metabolic alteration was correlated with behavioral performances obtained previously on the same series of mice (Lalonde et al., 2003). In a parallel fashion, imunohistochemical samples were analyzed on adjacent sections for evaluating regional $Aß_{1-42}$ levels, as well as DNA oxidative damage by labelling 8-OHdG at the DNA level.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

PS1/A246E transgenic mice were generated under the transcriptional control of the neuron-specific *Thy-1* promoter on a null background for the endogenous *PS1* gene at Merck Research Laboratories (Qian et al., 1998). Line 16-4 expressing the *PS1*-A246E mutation was compared to line 17-2 expressing wild-type human *PS1*. Twelve-month-old *PS1*-A246E mice (n=14, 6 females and 8 males) and human wild-type *PS1* controls (n=14, 7 females and 7 males) on a mixed background strain (50%

B6, 25% SJl, 25% 129Sv) were sent to the University of Rouen (France) for a 16 day-period evaluation of exploratory behavior, anxiety, motor coordination, and spatial learning (Lalonde et al., 2003). The brains were sent to Nancy (France) for neurochemical assessment. All procedures complied with recommendations edited by the European Community Council for the Ethical Treatment of Animals (86/609/EEC) and local animal welfare regulations.

2.2. Tissue preparation

The mice were killed by decapitation on the day following the end of the behavioral studies, the brains rapidly removed, snap-frozen in cooled *N*-methylbutane, and stored at -80 ℃. The 20 μm-thick coronal sections were serially cut on a cryostat, collected on gelatin-chrome alum-coated slides so that the entire mouse brain could be observed and sampled on two slides, and conserved at a temperature of –80℃ until processing.

2.3. COX histochemistry

Histochemical detection of COX activity was carried out on one series of sections from each brain as well as several complete sets of their respective standards using the Wong-Riley (1979) protocol slightly modified as described previously (Strazielle et al., 1998). The incubation time was 70 min. Standards for COX activity were prepared from whole brain homogenates according to a previous protocol (Strazielle et al., 1998). The specific activity measured by spectrophotometry (38.2 μmol/min/g of tissue) remained constant in -80℃ frozen standa rds for several months. Brain homogenate sections of variable thicknesses were used to cover the entire range of activity measured in the different structures by histochemistry. This standardization method was validated by Gonzalez-Lima and Jones (1994). Under our experimental conditions, the staining intensity was highly correlated to the thickness of the standard sections (linear function with r=+0.997). Analysis of the COX stained sections was carried out with the BIOCOM computer-assisted image analysis system (Les Ulis, France), in which optical density readings were converted by means of standards into enzymatic activity values expressed in μmol/min/g of tissue. Anatomical structures were defined according to the Franklin and Paxinos mouse atlas (1997). Multiple optical density readings were taken of labelled regions following certain rules to obtain an homogeneous evaluation (Reader and Strazielle, 1999; Strazielle et al., 2003).

2.4. Oxidative DNA damage labelling

Oxidative DNA damage was identified by immunohistochemistry with an antibody to 8-OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine). After fixation in a 4% paraformaldehyde-phosphate buffered saline (PBS) solution (pH=7.4) followed by three rinses, brain sections were incubated for 30 min in PBS containing 0.5% H_2O_2, 0.5% normal horse serum (Vector Laboratory, France), and 0.5% Triton X-100 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), washed and incubated in a 10% horse serum PBS for 30 min, before overnight soaking at room temperature with the anti 8-OHdG antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA) diluted to 1 :200 in PBS. Sections were then washed again and treated with a secondary anti-goat-HRP antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) diluted to 1 :500 in PBS, for 3 hrs. After rinses, the labelling was revealed by soaking the sections for 30 sec in PBS containing 0.02% H_2O_2, 0.5% DAB, and 0.15% nickel-ammonium sulfate (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). The slides were washed, then dried before dehydrating in ethanol and xylene baths, and coverslipped with Eukitt. The images (9 per cortex, 3 for the other nuclei for each brain) were captured with a Provis AX70 microscope equipped with a DP 70 camera (Olympus, France) at 20x magnification and analysed on a MCID™ image analysis system (Cambridge, UK). Optical density of the distinct black reaction product for 8-OHdG was taken by systematically charting all labelled neurons with a diameter higher than 14 μm, after calibrating the system to absolute gray levels from a scale with known optical densities (Kodak®). The lower density threshold for a positive immunoreaction was chosen as twice the optical density measured between the labelled cells, considered as the background. Data were expressed as per cent distribution of labelled cells positively immonoreactive for 8-OHdG and intergroup comparisons tested for significance. This expertise was given for regions with COX activity changes as well as specific ones involved in AD physiopathology.

2.5. Brain pathology detection

The mouse monoclonal anti-β-amyloid antibody 4G8 (Signet Lab, Dedham, MA, USA) recognizing residues of 17-24, was used to detect the intracellular localization of Aβ in transgenic mice and the fluorescent labelling was quantitatively evaluated as proportional area of labelling according to previously well-described techniques (Jazi et al., 2008). For detecting possible regional alterations inherent to the *PS1*-A246E

mutation, sections were stained with a 0.5% cresyl violet solution. In addition, sections were incubated in a Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc., Jefferson, AR, USA) solution according to the protocol described by Schmued and Hopkins (2000), and observed under fluorescent (fluoresceine isothiocyanate) microscopy : dying neurons are labelled in fluorescent yellow-green. As Fluoro-Jade B labelled neuritic plaques and activated microglia and astrocytes (Damjanac et al., 2007), the sections were inspected to ascertain the absence of these specific AD features.

2.6. Statistical evaluation

The data were analyzed by Statview™ 4.1 software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). The COX activity of *PS1*/A246E mice was first compared to that of controls by a series of 2-way repeated ANOVAs (transgene vs specific brain regions) according to anatomically-defined pathways with the level of significance set at $P<0.05$: comparisons were performed among the constitutive subregions of each structure or among regions of a functional brain circuitry. An unpaired-*t* test (two-tailed) was then used for individual group comparisons in those brain regions with significant ANOVAs, the level of significance being raised to $P<0.01$, owing to the high number of regions studied. Secondly, Pearson correlation coefficients were measured with $P=0.05$ as the threshold of significance between COX activity in the brain regions showing intergroup differences and behavioral performances obtained previously (Lalonde et al., 2003). Similarly to the COX activity data, group differences were compared by two-tailed unpaired t-tests for the immunohistochemical labelling of $A\beta_{1-42}$ and 8-OHdG, the significance being considered at the $P<0.01$ as well.

3. Results

3.1. COX activity in brain

COX densities of labelling were measured in 140 brain regions, with structures selected as the most affected in AD given in Tables 1 and 2. The insertion of the human *PS1*-A246E mutated transgene in mice resulted in regionally-selective variations of brain metabolism.

The cortical regions presented variable diffuse staining following lamination patterns, with the present measures taken globally. Among different cortical subregions (Table 1), COX activity was changed in two functional areas : visual and paralimbic cortices showed a significant gene main effect ($F_{(1,,23)}=7.4$, $P<0.05$ and $F_{(1,,23)}=5.0$, $P<0.05$, respectively) with an additional interaction ($F_{(2,,40)}=3.8$, $P<0.05$)

for paralimbic areas; the visual cortex had higher COX activity, more precisely in the lateral secondary visual area (t_{23}=3.5, P<0.01), while hypermetabolism of the paralimbic zone was attributable to agranular insular cortex, more specifically in its anterior part (t_{23}=2.9, P<0.01). In addition, the superior colliculus, a mesencephalic region functionally associated with visual cortical areas, displayed a higher level of COX activity as well (t_{23}=2.9, P<0.01; Table 2). Olfactory and optic nerves are peripheric structures belonging to the telencephalon. Although no atrophy was observed by comparing thickness of the respective tracts between *PS1*-A246E and wild-type mice, both nerves showed a significant hypometabolism (Table 1). COX activity decreased by 14% in the lateral olfactory tract and by 12.5% in the optic tract. Evaluation of COX activity in additional olfactory structures revealed no significant variations (data not shown).

Metabolic changes were prevalent in the striatum (gene effect with $F_{(1,23)}$=21.96, P<0.001), involving dorsal and ventral striato-pallidal systems ($F_{(1,23)}$=14.34, P<0.001 and $F_{(1,23)}$=5.92, P<0.05 with ANOVA, respectively). More precisely, COX activity in *PS1*-A246E transgenic mice (Table 1), was higher in the dorsal neostriatum (t_{25}=3.1, P<0.01) and its main output regions, the medial part (t_{24}=4.0, P<0.001) of the globus pallidum area. Similarly, the ventral striato-pallidal circuit showed a hypermetabolism in the nucleus accumbens (t_{24}=2.8, P<0.01), both core and shell parts, and its output region, the ventral pallidum (t_{23}=2.9, P<0.01). In addition, COX activity was higher in the claustrum, assimilated to striatal regions (t_{23}=2.9, P<0.01), and in the lateral habenular nucleus, efferent to the medial globus pallidus (t_{25}=3.3, P<0.01; Table 2). The other basal ganglia structures, such as the subthalamic nucleus, the zona incerta, and the mesencephalic dopaminergic nuclei, were not affected (P>0.05). The four cholinergic regions of the basal forebrain nuclear complex had higher COX activity ($F_{(1,22)}$=6.79, P<0.05), affecting more specifically the substantia inominata localized in ventral globus pallidus (t_{24}=4.49, P<0.001; Table 1), the fourth cholinergic area according to the classification of Mesulam et al. (1983).

Among limbic regions (Table 2), the global hippocampal formation and the CA2-CA3 area showed a significant gene effect ($F_{(1,24)}$=6.2, P<0.05 and $F_{(1,25)}$=8.2, P<0.01, respectively) while a significant interaction occurred in CA1 ($F_{(3,72)}$=16.2, P<0.0001). Intergroup differences occurred at the level of CA1 and CA2-CA3 pyramidal layers (t_{25}=3.5, P<0.01 and t_{25}=2.8, P<0.01, respectively), as well as the subiculum, preferentially in its anterior part (t_{24}=3.3, P<0.01), with higher COX activity

in *PS1*-A246E mice by comparison to controls. Similarly, the amygdaloid nuclear complex, another region of main importance in AD, displayed higher COX activity (gene effect with $F_{(1,22)}$=7.2, P<0.05), more preferentially in its medio-cortical part (t_{22}=2.9, P<0.01). Considering other limbic structures, the septal nuclear complex, COX activity was not affected.

The thalamus displayed a mosaic of various COX activity patterns corresponding closely to anatomical boundaries between thalamic nuclei (Table 2). Thalamic COX activity in *PS1*-A246E mice was similar to that of controls except in the medial group of nuclei with diffuse projections ($F_{(1,24)}$=6.8, P<0.05), in which the midline complex including reuniens, rhomboid, and submedial nuclei displayed lower COX activity (t_{24}=3.2, P<0.01). In other diencephalic regions such as hypothalamus, and mamillary bodies, COX activity was equivalent in the two mouse populations (data not shown). Metabolic activity in hindbrain regions (Table 2) was minimally affected. However, pedunculopontine and laterodorsal tegmental reticular formation, considered as hindbrain cholinergic areas as well as the interpeduncular nucleus receiving a large cholinergic input showed lower COX activity ($F_{(1,22)}$=10.0, P<0.01, main gene effect, t_{23}=2.9 and t_{23}=3.1, respectively, P<0.01). Similarly, lower metabolic changes were prevalent in the cochlear nuclei (gene effect with ANOVA, $F_{(1,21)}$=6.9, P<0.05) inputed to the ventral cochlear one being hypometabolic (t_{22}=3.3, P<0.01). A significant interaction occurred in the adjacent vestibular nuclear complex ($F_{(4,84)}$=4.9, P<0.01). Intergroup differences affected more precisely the mediocaudal vestibular nucleus (t_{24}=3.7, P<0.001) with higher COX activity in *PS1*-A246E mice by comparison to controls. In the final analysis, the cerebellum and other brainstem sensorimotor structures displayed no changes in COX activity (data not shown).

3.2. Correlations between COX activity and behavioral performances

Simple linear regressions were tested between each behavioral score (Lalonde et al., 2003) and COX activity for brain regions significantly differing from normal. Significant correlations were revealed in the elevated plus-maze anxiety test, as abnormally high COX activity in substantia inominata was associated (P<0.05) with open-arm visits (r=+0.541) and duration (r=+0.613) as well as with the open/enclosed time ratio (r=+0.604), corresponding to a decrease in anxiety. In the T-maze test, higher latencies before responding were observed in *PS1*-A246E mice; these were inversely correlated (P<0.05) with COX activity in the nucleus accumbens (r=-0.586), superior collliculus (r=-0.623), and midline thalamic subregion (r=-0.557), indicating

that higher COX activity was linked with faster responding.

3.3. Oxidative DNA damage

DNA damage expressed by 8-OHdG immunoreactivity was present in both groups with considerable individual and regional variations. The labelling was prominent in neuronal cytoplasm resulting in nuclear (nDNA) as well as mitochondrial (mtDNA) accumulation of the abnormal nucleotide. In cortical areas, immunopositive-cells were scattered over the cellular layers (II-VI) with more intense labelling in layers II (granular cells) and V (large pyramidal cells). When compared with controls, neuronal 8-OHdG immunointensities in *PS1*-A246E mice increased in all cortical regions except motor ones (Figure 1a), reaching significance (P<0.01) for cingulate (+45%), piriform (+131%), agranular insular (+127%) cortices, and claustrum (*55%)*. In basal forebrain cholinergic nuclei, 8-OHdG immunostaining was present in the large cholinergic neurons (Fig. 1a), but more intensely in *PS1*-A246E mice, producing 85% and 152% increases of positive-cells in medial septal cholinergic complex (Ch1-Ch3) and substantia inominata (Ch4), respectively (P<0.01). The neuronal 8-OHdG immunostaining was heterogeneous in the hippocampal formation (Fig. 1b), more specifically concentrated in the pyramidal cell layer of CA1-CA3. Subiculum and its efferent lateral septum were the only two regions displaying a higher immunointensity in *PS1*-A246E mice (+120% and +100%, respectively, P<0.01). 8-OHdG immunostaining of the neostriatum (Fig. 1a) and amygdaloid nuclear complex (Fig. 1b) remained unchanged in *PS1*-A246E mice. In thalamus, few nuclei were evaluated (Fig. 1b) : immunopositive-cell proportion increased in midline and lateral habenula (114% and +100%, respectively with P<0.01) but remained unchanged in dorsomedial thalamic nucleus and medial habenula. In brainstem (Fig. 1b), the superior colliculus, locus coeruleus, dorsal raphe, and interpeduncular nucleus displayed relatively high 8-OHdG immunostaining with a 82% higher level of positive-cells only observed in the latter region when intergroup differences were performed (P<0.01).

3.4. Amyloid-ß expression

Aß positive-immunostaining was detected in many forebrain regions of both groups but in a greater quantity in *PS1*/A246E mutant mice for all evaluated regions. The cortical immunolabelling was predominantly observed in layers III-V, relative increases being higher in anterior cortices (approximatively +50% for cingulate, piriform, eye field) than in posterior cortices (approximatively +30% for posterior

parietal, visual, retrosplenial) with two exceptions : entorhinal cortex showing the greatest level of Aß positive-immunostaining (+75%) and agranular insular cortex the lowest (+12%). Similarly, Aß positive-immunostaining was more numerous in *PS1*/A246E nuclei of the basal cholinergic system, medial septum (+62%), vertical diagonal band (+115%), and substantia inominata (+51%), as well as in the dorsal striato-pallidal system, dorsal neostriatum (+67%) and medial part of the globus pallidus (+93%). The ventral striato-pallidal system was relatively spared (+15%), such as the amygdaloid nuclear complex (8-12%), except in its basal nucleus characterized by a 50% increase of Aß positive-immunostaining. In the hippocampal formation, Aß positive-immunostaining was concentrated in the pyramidal layers of CA1-CA3 subregions and polymorphic layer of the dentate gyrus, but in higher proportions in *PS1*/A246E mutants (75% to 90%). The *PS1*/A246E thalamus displayed wider Aß positive-immunostaining in its dorsomedial (+57%) and midline (65%) nuclei. In the brainstem, the Aß positive-immunostaining was weak with a substantial increase found only in the substantia nigra (+99%) and interpeduncular nucleus (+75%). The largest Aß overproduction found in *PS1*/A246E mutants was in Purkinje cells (113%) while other parts of the cerebellum were free.

3.5. Regional brain pathology

In cresyl violet-stained sections, gross examination of those brain regions affected in terms of regional brain metabolism or oxidative stress revealed neither alteration in cell density nor detectable atrophy among laminar areas. No Fluoro-Jade B fluorescent staining was observed in brain sections, attesting to the absence of neuronal degeneration, amyloid deposits, activated microglia, and astrocytes.

4. Discussion

4.1. Regional brain pathology

We evaluated regional brain metabolism in human *PS1*-A246E transgenic mice relative to wild-type on a *Ps1* null background. Several studies demonstrated that presenilin mRNA and protein expression are essentially neuronal, localized mainly in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus but also in synaptic terminals (Lah et al., 1997) and mitochondria (Ankarcrona and Hultenby, 2002), largely distributed throughout the brain (Kovacs et al., 1996), without being restricted to regions normally affected in AD. Histological examination of transgenic brain sections revealed no specific neuropathologic features of AD. The $A\beta_{1\text{-}42}$ overproduction

induced by the *PS1*-A246E mutation was moderate, not confined to vulnerable structures of AD, but instead distributed throughout the brain without exceeding 1.2 times control amounts, similar to the level reported in quantified samples of whole brain (Qian et al., 1998). The 0.5 to 1.5 increase in 8-OHdG immunoreactivity observed among brain regions of the mutants is concordant with the idea that oxidative damage is an early event, before histopathological hallmarks appear (Nunomura et al., 2001) but 8-OHdG immunostaining did not follow the COX labelling pattern.

4.2. COX activity

Intimately coupled to ATP production, COX activity is used as an endogenous marker of long-term change in oxidative metabolic capacity, depending on energy requirements in different cell compartments. Strongly governed by excitatory glutamatergic synapses (Zhang and Wong-Riley, 1999), COX is primarily localized in mitochondria on dendritic arborization of neurons. Our brain metabolic cartography provides a functional study of integrated structural networks rather than of isolated structures known to be affected in AD. The main COX activity changes induced by the *PS1*-A246E mutation showed no evident link with Aβ immunostaining. They occurred in motor and emotional circuitries of the basal ganglia, where dorsal and especially ventral striato-pallidal systems were activated. The basal ganglia are viewed as part of a planning mechanism driving motor pattern generators (Graybiel, 1995). These metabolic changes may be responsible for mild motor deficits seen in two stationary beam tests (Lalonde et al., 2003). The nucleus accumbens, considered as a limbic-motor interface, is the central part of the ventral striatum. This region subserves emotions and influences arousal, attention, and cognitive function via its connections through the basal nucleus, part of the substantia inominata, source of cholinergic fibers to the cortex (Graybiel, 1995; Heimer et al., 1997). The metabolic activity in substantia inominata of *PS1*-A246E mice was correlated with anxiety levels measured in the plus-maze test (Lalonde et al., 2003), indicating that emotional reactions affected by the mutation are due to dysfunction in forebrain cholinergic innervation. COX activation in insular and secondary visual cortices, hippocampus, and amygdala may be explained by interconnections with the ventral striato-pallidal complex and their role in limbic circuitries regulating anxiety (Reiman et al., 1997). The lateral habenular nucleus and its main efferent region, the interpeduncular nucleus, as well as pedunculopontine tegmental nucleus and

superior colliculus can be considered as accumbens output stations via the globus pallidus (Steininger et al., 1992; Winn et al., 1997). Stimulation of lateral habenular nucleus inhibited dopaminergic neurons in the nigral complex or serotonin release by dorsal raphe neurons, and therefore is susceptible to regulate biogenic amine levels in forebrain (Reisine et al., 1982) commonly altered in AD (Martorana et al., 2008; Weinshenker, 2008). Contrariwise, metabolic activity was down-regulated in pedunculopontine tegmental and interpeduncular nuclei. As with the forebrain basal nucleus, it is an important source of acetylcholine for several regions, particularly the thalamus and medial limbic cortex, participating in the ascending reticular activating system (Gerfen, 2004). Moreover, it is involved in attention and arousal (Steckler et al., 1994), regulating activity of the basal nucleus via reciprocal connections (Butcher et al., 1995). Three of these metabolically altered regions were correlated with response speed in the T-maze, slower in *PS1*-A246E mice relative to controls (Lalonde et al., 2003). Abnormally elevated COX activity in nucleus accumbens and superior colliculus was associated with faster responding, explainable by functional compensation, whereas lower COX activity in midline thalamic nucleus was linked with slower responses. The latter finding is explainable by its well-known role in regulating forebrain neural excitability (Price, 1995).

4.3. Functional meaning of altered COX activity

The question arises as to the functional impact of elevated COX activity. One possibility is that hypermetabolic neurons are dysfunctional, higher COX activity being the sign of an early mitochondrial alteration related to oxidative damage (Hirai et al., 2001; Reddy et al., 2006; Zhu et al., 2006). As COX activity is mainly regulated by mitochondrial genes encoding catalytic subunits of the enzyme (Hevner and Wong-Riley, 1993), mtDNA oxidative damage may alter COX expression, impairing its activity (Mecocci et al., 1994; Aksenov et al., 1999; Hamblet et al., 2006). Contrary to this hypothesis is the evidence of mild behavioral changes observed in *PS1*-A246E mutants and of COX alterated activity in regions such the striatum without any evidence of DNA oxidation. Genetic inactivation of *COX* in neurons reduced oxidative stress suggesting that COX alteration and oxidative damage observed in AD may be two independent factors resulting from Aβ accumulation (Fukui et al., 2007).

Another interesting hypothesis is the existence of an adaptative response in neurons chronically exposed to low levels of oxidative stress, and thereby more sensitive to excitatory amino-acids. COX activity may represent a sign of cell

activation, possibly as a precursor to hypometabolism. The importance of disease progression on energy demands is emphasized by Rapoport (1999), as glucose consumption in PET scans of Alzheimer patients performing behavioral tasks increased to the same extent as age-matched controls in mild dementia but not in severe dementia. More recently, increased brain activation (Dickerson et al., 2005) as well as upregulation of glutamatergic presynaptic boutons (Bell et al., 2007) were demonstrated in subjects with mild cognitive impairment (MCI) but not in subjects with AD. As COX activity is strongly governed by excitatory glutamatergic synapses (Zhang and Wong-Riley, 1999), COX hyperactivity may be associated with elevated neurotransmission probability. It remains to be determined whether this regional phenomenon occurred in subpopulations of still "healthy neurons", or whether neurons suffering from oxidative damage have a higher metabolic rate or must work harder to maintain their effectiveness for the preservation of brain functions.

Nondemented adults with Down syndrome displayed temporal cortical hypermetabolism, enphasizing the fact that compensatory responses could occur before AD as such (Haier et al., 2003). However, COX activity also increased in APP_{751}SWE (TgAPP23) transgenic mice with Aβ plaques (Strazielle et al., 2003) and cognitive impairment (Lalonde et al., 2002). As regional histochemical labelling was evaluated by avoiding neuritic plaques, measurements of CO activity mainly reflect the metabolic activity of remaining neurons, suggesting therefore compensation in disease progression, certainly depending on the number of healthy neurons. Several studies on *postmortem* AD brain specimens or AD animal models with neuritic plaques, evaluating expression of mitochondrial genes (Reddy et al., 2004) and COX protein (Nagy et al., 1999; Manczack et al., 2004), activity of glutamatergic or γ-aminobutyric acid (GABA) synapses (Bell et al., 2003; Bell and Cuello, 2006) or glutamate levels (Klunk et al., 1992) support this hypothesis. Recently, similar hyperactive cortical neurons were observed in the vinicity of Aβ plaques in a double APPxPS1 transgenic mouse, possibly due to a relative decrease in synaptic inhibition, disturbing the cortical function (Busche et al., 2008). However, in the present study, the positive correlations obtained between behavioral performances and COX activity partially corroborate the hypothesis that COX hyperactivity may partly reflect early compensatory reactions to minimize neuronal perturbations caused by the mutation. Because numerous altered regions are functionaly

interconnected, changes in COX activity may also be due to disturbances in integrated networks regulating brain functions. In a cartography of cholinergic innervation in the same series of mice (Jazi et al., 2009), AChE activity was upregulated in many structures displaying changed COX activity, namely the striato-pallidal complex, their various associated structures, and cholinergic nuclei of the basal forebrain. The vulnerability of cholinergic innervation is a major feature of AD (Whitehouse, 1982; DeKosky et al. 2002; Lyness et al., 2003) but it is present in very early stages of the disease without necessarily being related with cognitive impairment (Shinotoh et al., 2000; Herholtz et al., 2004; Contestabile et al., 2006). Similarly to early upregulated cholinergic terminals observed in the pre-plaque phase (Bell and Cuello, 2006), AChE hyperactivity may be a consequence of plasticity for restoring synaptic function, possibly accountable by COX alterations. Further studies on synaptic integrity are necessary to investigate this hypothesis.

4.5. Conclusion

As the *PS1*-A246E mouse model appears to mimick prodromal AD, the present results support the existence of mitochondrial dysfunction, specifically COX activity, as well as DNA oxidative damage prior to AD-related cognitive deficits. Both markers showed higher labelling in various brain regions without presenting an evident link between them. *PS1*-A246E brain regions affected in metabolism were not primarily those altered in AD-associated histopathological features and did not systematically display Aβ overexpression. Therefore, besides early mitochondrial abnormalities, COX activity may be a cell marker of metabolic activity mainly governed by synaptic function (Wong-Riley, 1989), whose pathology is particularly relevant in AD (Terry et al., 1991; Bell and Cuello, 2006) and for each region, by the widely influential network of afferent inputs arising from multiple brain targets. Further neurochemical analyses should focus on synaptic function to identify the functional meaning of metabolic alterations in AD and more particularly in pre-clinical stages.

Références :

Les publications utilisées dans cet article ont été placées dans la section « références bibliographiques » correspondant aux références utilisées pour l'ensemble de notre travail.

Table 1. Cytochrome oxidase activity (means and S.E.M. in μmol/(min x g of tissue) in forebrain regions of *PS1*-A246E mice (n=11-14) and controls (n=10-14) and percentage changes for regions showing significant differences (magnification 20x)

Regions	Controls	*PS1*-A246E
Cortical area		
-cingulate	51.8 ± 0.9	49.2 ± 1.3
-orbitofrontal	50.3 ± 0.7	50.0 ± 0.8
-lateral prefrontal	50.2 ± 1.0	50.8 ± 0.9
-prelimbic	48.4 ± 1.0	49.1 ± 0.7
-retrosplenius	54.9 ± 0.9	57.8 ± 0.9
-agranular insular	46.2 ± 0.9	**50.1 ± 1.0 * (+8%)**
-eye field (M2)	46.7 ± 1.2	47.9 ± 0.9
-motor cortex (M1)	47.1 ± 1.2	46.9 ± 1.1
-somatosensory (S1)	48.4 ± 0.8	48.7 ± 0.7
-parietal posterior	52.8 ± 1.0	54.9 ± 1.0
-temporal auditory	51.8 ± 1.6	51.3 ± 1.0
-piriform	46.6 ± 1.1	46.6 ± 0.8
-lateral entorhinal	46.7 ± 1.1	47.6 ± 1.0
-visual (V1)	50.2 ± 1.3	53.1 ± 0.9
-visual, V2med	50.6 ± 1.1	53.1 ± 0.9
-visual, V2lat	45.0 ± 1.2	**50.5 ± 0.9 *(+12%)**
Lateral olfactory tract	24.4 ± 0.6	**20.91 ± 0.7 *(-14%)**
Optic tract	16.8 ± 0.5	**14.7 ± 0.6*(-12.5%)**
Striatum		
-dorsal neostriatum	44.9 ± 0.6	**47.8 ± 0.6*(+6.5%)**
-ventral neostriatum	49.3 ± 1.1	47.3 ± 0.8
-accumbens nucleus	55.9 ± 1.3	**61.2 ± 1.4 * (+9%)**
-lateral pallidum	39.4 ± 0.7	**44.9 ± 0.6** (+12%)**
-medial pallidum	32.0 ± 0.7	**34.8 ± 0.5 * (+8%)**
-ventral pallidum	24.7 ± 0.5	**26.8 ± 0.5 * (+8%)**
-claustrum	40.8 ± 1.1	**45.1 ± 1.0* (+10.5%)**
Forebrain cholinergic areas		
-medial septum (Ch1)	42.6 ± 1.1	44.9 ± 1.0
-vertical diagonal band (Ch2)	48.9 ± 1.3	50.3 ± 1.1
-horizontal diagonal band (Ch3)	45.0 ± 0.9	46.2 ± 0.9
-substantia inominata (Ch4)	42.7 ± 0.6	**46.0 ± 0.8 * (+7%)**

***** $P < 0.01$; ****** $P < 0.001$

Table 2. Cytochrome oxidase activity (means and S.E.M. in μmol/min/g of tissue) in limbic, thalamic, and brainstem regions of *PS1*-A246E mice (n=12-14) and controls (n=10-14) and percentage changes for regions showing significant differences (magnification 20x, except where otherwise indicated)

Regions	Controls	*PS1*-A246E
Limbic regions		
-hippocampus CA1	42.9 ± 0.4	44.1 ± 0.6
CA1, pyramidal layer#	38.2 ± 0.8	**43.0 ± 1.1 * (+12.5%)**
-hippocampus CA2-CA3	41.5 ± 0.6	42.4 ± 0.8
CA2-CA3, pyramidal layer#	38.9 ± 0.4	**41.9 ± 0.9 * (+8%)**
-dentate gyrus (DG)	44.2 ± 0.7	45.0 ± 0.7
-subiculum#	52.6 ± 0.6	**55.8 ± 0.7 * (+6%)**
-baso-lateral amygdala	48.2 ± 0.8	47.2 ± 0.6
-cortico-medial amygdala	44.0 ± 0.7	**47.7 ± 0.9 * (+8%)**
-central amygdala	55.4 ± 1.2	56.7 ± 0.8
-lateral septum	49.1 ± 0.8	47.1 ± 1.0
-bed n. stria terminalis#	42.2 ± 0.8	46.3 ± 0.7
Thalamus		
-lateral habenula	48.6 ± 0.8	**53.4 ± 0.6 * (+8%)**
-dorsomedial n.	50.7 ± 1.1	50.8 ± 1.1
-midline n.	42.8 ± 0.8	**39.5 ± 0.6 * (-8%)**
-intralaminar n.	40.2 ± 0.8	39.8 ± 1.2
-reticular n.	36.6 ± 0.8	35.6 ± 1.1
-periventricular n.	43.6 ± 1.0	43.9 ± 0.7
-ventrolateral n.	42.4 ± 1.0	45.2 ± 0.9
-posterior n.	44.2 ± 0.7	44.7 ± 0.9
-lateral geniculate n.	47.3 ± 0.9	46.6 ± 0.7
-medial geniculate n.	49.6 ± 0.9	46.3 ± 1.0
Brainstem		
-substantia nigra	45.3 ± 0.7	44.9 ± 0.6
-ventral tegmental area	38.5 ± 0.9	37.6 ± 0.7
-dorsal raphe n.	49.1 ± 1.0	49.4 ± 0.8
-interpeduncular n.	70.5 ± 1.2	**65.7 ± 1.0 * (-7%)**
-superior colliculus	51.1 ± 0.8	**55.6 ± 0.9 ** (+9%)**
-inferior colliculus	50.0 ± 1.1	50.6 ± 1.3
-locus coeruleus	46.8 ± 1.0	49.0 ± 0.9
-parabrachial n.	44.6 ± 0.7	44.8 ± 0.6
-medial vestibular n.	48.0 ± 0.7	**52.1 ± 0.8 ** (+8.5%)**
-ventral cochlear	49.4 ± 1.2	**44.8 ± 0.7 * (-9.5%)**
-pedunculopontine n. (Ch5)	39.3 ± 1.0	**35.9 ± 0.7 * (-9%)**

***** P < 0.01; ****** P < 0.001
(n. = nucleus; # structure with COX measure at magnification 40x)

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : 8-OHdG immunostaining in the cingulate cortical region (scale bar=250µm) and more precisely in the cells of the layer II (scale bar=80µm) of the control (a,c) and *PS1*-A246E mutant (b,d) mice.
cc=corpus callosum; Cg=cingulate cortex.

Figure 2 : Pourcentage of 8-OHdG immunopositive cells (means and S.E.M.) in brain regions of *PS1*-A246E mice (n=5-6) and controls (n=4-6). Asterisks (*) indicate values that differ statistically (*t*-test, P<0.01) between the two groups of mice.

Figure 2a : Acb=nucleus accumbens; AI= agranular insular cortex; Cg=cingulate cortex; Cl=claustrum; CPU-DL=caudate-putamen, dorsolateral part; Lent=lateral entorhinal cortex; MS=medial septum; Pir=piriform cortex; SI=substantia inominata; V2L= secondary visual cortex, lateral part.

Figure 2b : A=amygdala; CA1Py=CA1 part of the hippocampal formation, pyramidal cell layer; IP=interpeduncular nucleus; LC=locus coeruleus; LHb=lateral habenula; LS=lateral septum; thalMD=mediodorsal thalamic nucleus; thalMi=midline thalamic nucleus; S=subiculum; SC=superior colliculus.

Figure 3 : Regional COX labelling in control (a,c,e,g) and *PS1*-A246E mutant (b,d,f,h) mice.

Figures 3a-b illustrate COX labelling in the Ch4 cholinergic area of the basal forebrain nuclear complex (scale bar=250µm) showing higher labelling in the substantia inominata (SI) and globus pallidum (GP) in the mutant in comparison with control. Figures 3c-d illustrate more precisely the difference of labelling in globus pallidum (scale bar=150µm). Figures 3e-f illustrate COX labelling in the medial (MHb) and lateral (LHb) habenula showing a higher COX activity in the mutant lateral one(scale bar=250µm). Figures 3g-h illustrate COX activity in the CA1 region of the hippocampus, with higher labelling specifically in the pyramidal layer (asterisk) of the mutant while oriens (Or) and radiatum (Rd) layers show unchanged enzymatic activity (scale bar=150µm).

Figure 1

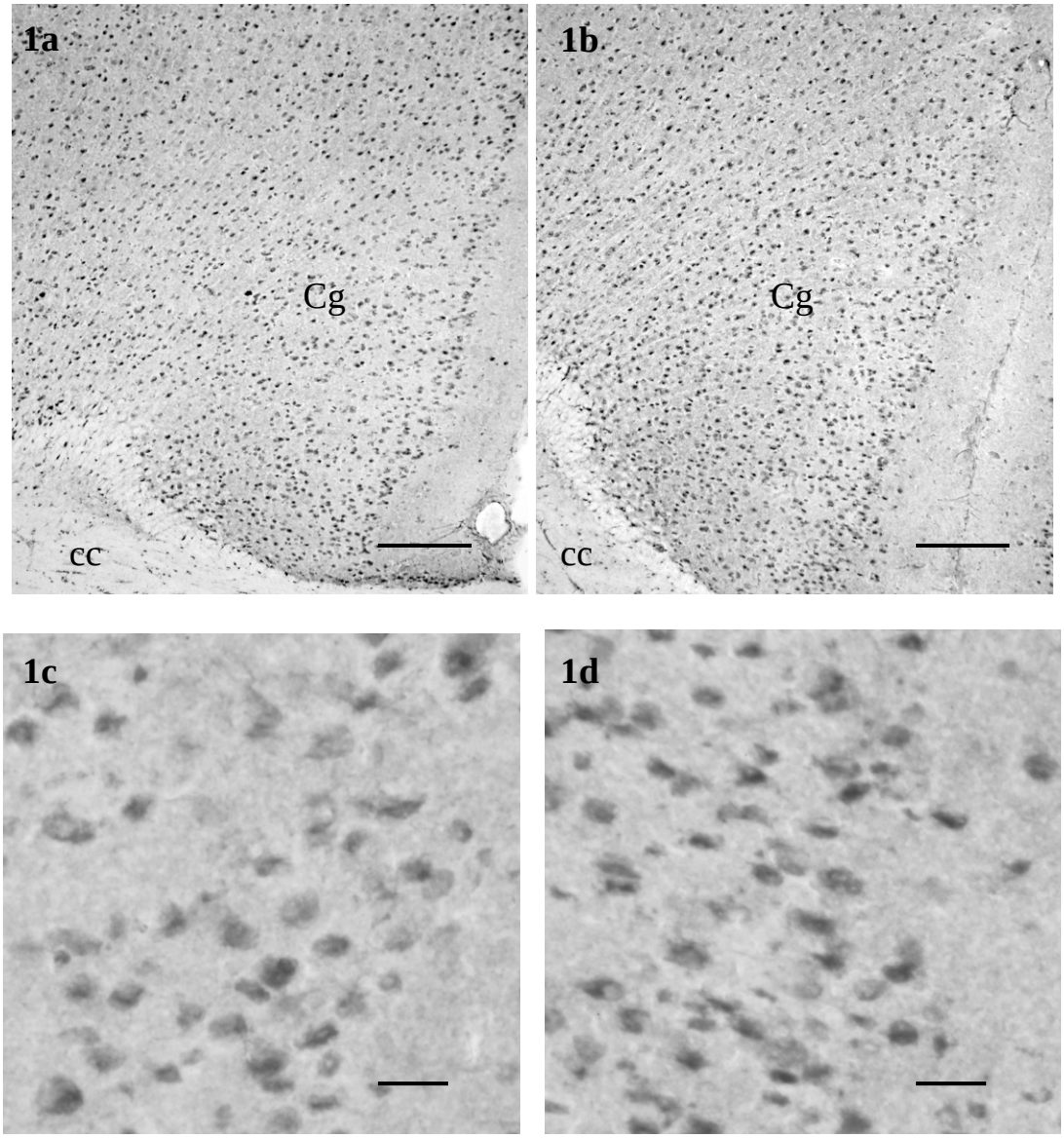


Figure 2a

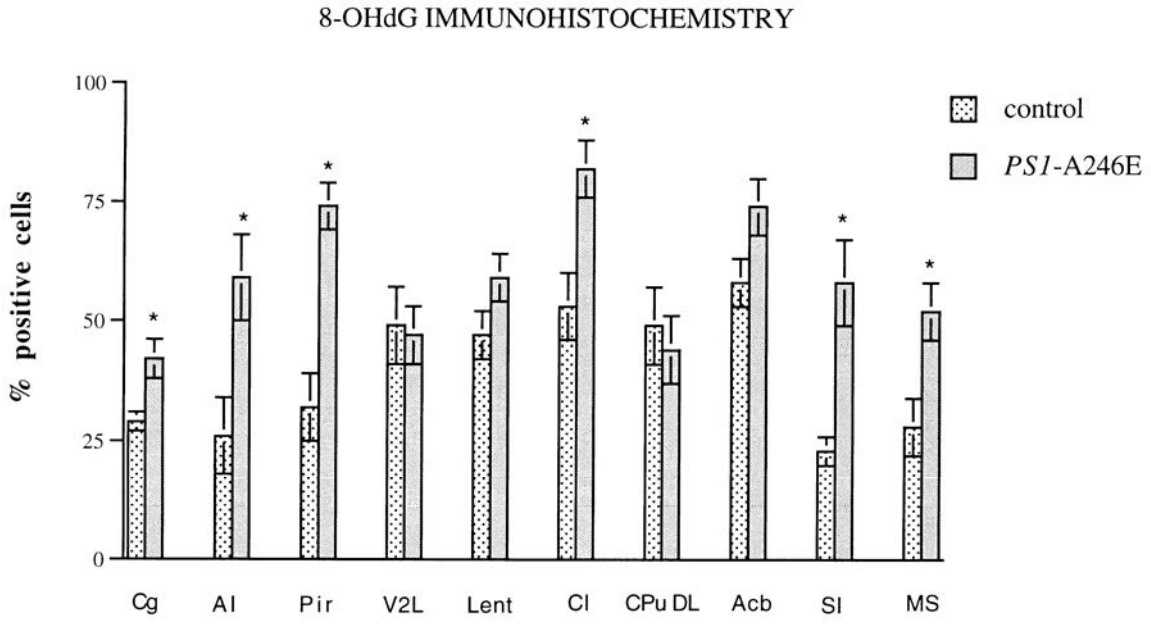


Figure 2b

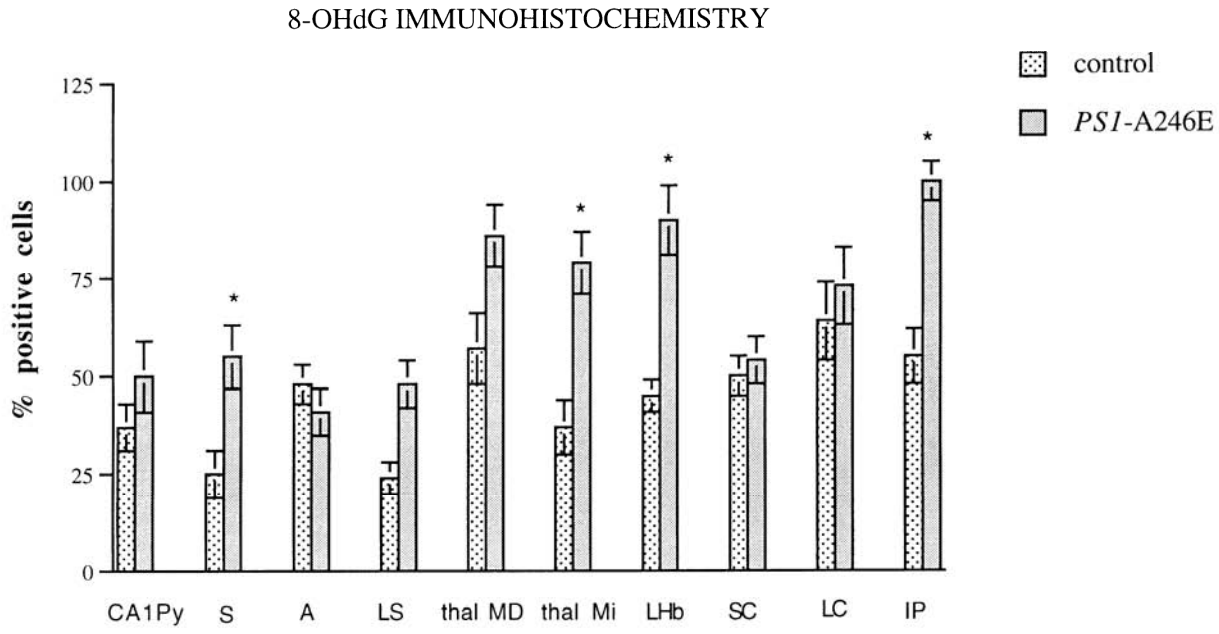
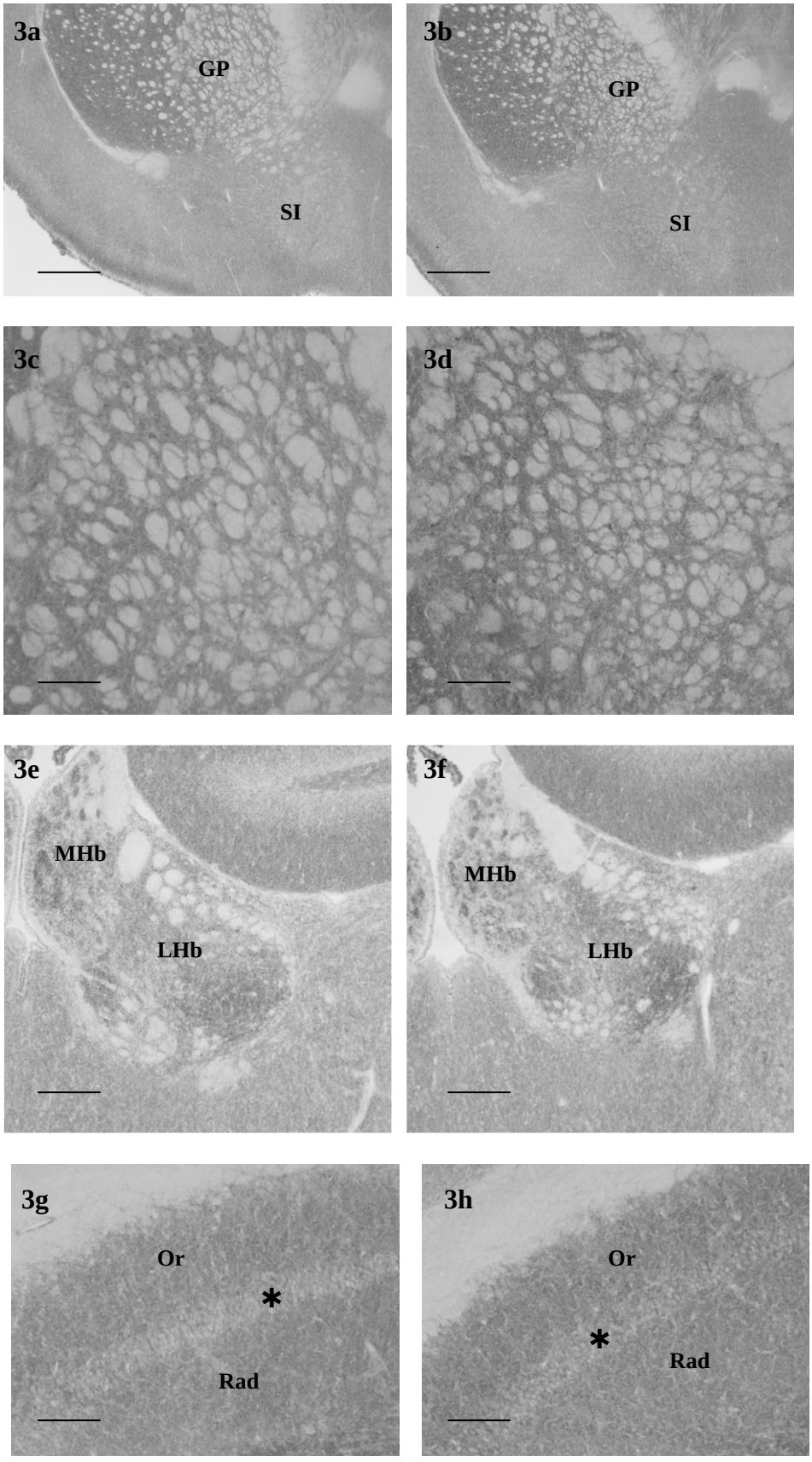


Figure 3



II.1.3 Synthèse de la publication

L'estimation quantitative du marquage immunohistochimique du peptide Aβ dans les tissus des souris mutées montre une surexpression du peptide de l'ordre de 50% à 120% par rapport aux souris contrôles, suivant les régions observées. Il s'agit par conséquent d'une faible surexpression. Elle ne semble pas suivre un schéma particulier car l'accumulation du peptide Aβ n'intéresse pas prioritairement les régions vulnérables dans la MA. Si l'hippocampe et certaines aires neocorticales sont riches, l'amygdale, par exemple, montre un taux de peptide Aβ faible. Inversement, les cellules de Purkinje du cervelet présentent le taux d'augmentation le plus important, alors qu'une atteinte strucuturo-fonctionnelle de ces cellules ne survient que dans les stades cliniques les plus tardifs de la maladie.

L'étude histologique classique confirme l'absence d'une perte cellulaire. Aucune accumulation extracellulaire ou dépôt amyloïde ne sont observés.

Au niveau du marquage du 8-OHdG, il est intéressant de noter que les quantités d'augmentation obtenues chez les souris mutées sont de l'ordre de 50% à 150%, des pourcentages très semblables à ceux observés pour le peptide Aβ même si les régions atteintes ne sont pas les mêmes. La présence de bases oxydées au niveau de l'ADN, nucléaire et mitochondrial, signe les effets précoces d'un stress oxydatif généré par la mutation.

La quantification de l'activité enzymatique de la COX montre des modifications de l'activité métabolique dans plusieurs régions spécifiques du système nerveux central. Ces résultats confirment l'atteinte précoce de l'activité métabolique neuronale avant même l'apparition de troubles cognitifs, et pour des augmentations faibles de peptide Aβ. Cette altération métabolique est liée chez l'homme à la modification du débit sanguin cérébral. Par contre, si elle correspond généralement à un hypométabolisme chez le patient Alzheimer, les résulats obtenus au niveau de la mutation *PS1*-A246E montrent plus fréquemment une hausse de l'activité métabolique régionale qu'une baisse.

De nombreuses régions présentant des modifications de leur activité métabolique sont intégrées dans les circuits moteurs et émotionnels des ganglions de la base, le compartiment limbique étant le plus affecté. Ces noyaux sont impliqués dans la programmation et le contrôle du mouvement; le compartiment limbique gère la connotation psycho-affective de l'acte moteur. Des systèmes associés à ces

circuits et notament le système cholinergique, participant à l'éveil, à la concentration et aux fonctions cognitives subissent également des modifications de leur activité métabolique, la substance inominée présentant un hypermétabolisme, le noyau pedunculopontique du tegmentum, un hypométabolisme.

Des corrélations existent entre l'activité métabolique régionale et les résultats comportementaux, intéressant la substance inominée et par conséquent le système cholinergique ainsi que des régions associées au système limbique. Les corrélations sont positives, une augmentation de l'activité métabolique améliorant les performances (test du labyrinthe en T) ou diminuant l'anxiété naturelle de la souris (test du labyrinthe en X).

En conclusion, nous pouvons dire que dans la mutation *PS1*-A246E, les souris présentrent un stress oxydatif et des modifications précoces du métabolisme neuronal, même pour des augmentations faibles de peptide Abeta dans les tissus. Toutefois, il ne semble pas que les deux marqueurs soient liés; ils s'expriment différemment, peut-être indirectement dépendants de la quantité de peptide Aβ. L'hyperactivité métabolique semble être un phénomène compensatoire, 1) des cellules "en souffrance" qui réagissent pour tenter de préserver leur fonction ou 2) des cellules adjacentes "intactes" qui compensent la déficience fonctionnelle de certaines cellules en travaillant plus. Enfin, il ne faut pas oublier que l'activité métabolique des cellules résultent en grande partie de l'activité synaptique provenant des fibres afférentes qui se projettent sur ces cellules mais aussi de l'activité neuritique terminale des cellules-mêmes. Une déafférentation crée un phénomène de "bourgeonnement" ("sprouting") des terminaisons nerveuses restantes, ce phénomène n'améliorant pas forcément la fonction. Une étude neuritique et synaptique serait nécessaire pour étudier cette hypothèse.

II.2. Publication N°2

REGIONAL BRAIN EVALUATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN *PS1*/A246E TRANSGENIC MICE

Rozat JAZI, Robert LALONDE, Su QIAN and Catherine STRAZIELLE

In : *Neuroscience Research,* 2009, 63 :106-114.

II.2.1. Objectifs de l'étude

La préparation des encéphales en coupes sériées nous permettant de faire plusieurs marquages sur les mêmes souris. Nous avons donc utilisé pour ce travail, la même population de souris que pour l'évaluation de l'activité métabolique régionale par l'intermédiaire de l'activité de la COX.

Les souris présentent donc les caractéristiques structurales et comportementales décrites précemment. Etant donné que l'atteinte cholinergique est au coeur de la MA, responsable en partie des troubles cognitifs, nous avons évalué quantitativement l'innervation cholinergique de l'encéphale dans la mutation *PS1*-A246E. Pour ce faire, nous avons réalisé une cartographie histochimique de l'activité enzymatique de l'acétylcholinesterase (AChE). Bien que marqueur non-spécifique du système cholimergique, l'AChE a été validé comme un marqueur fiable de l'innervation cholinergique; il nous permet d'en établir une évaluation quantitative.

De plus, comme l'AChE intervient dans l'amyloïdose, augmentant la toxicité des dépôts, un marquage immunohistologique du peptide Aβ-42 a été réalisé sur des coupes sériées adjacentes.

Les objectifs de cette étude sont :

- de tester l'hypothèse d'une atteinte précoce du système cholinergique au niveau du système nerveux central avant même l'altération des fonctions cognitives et de caractériser cette altération dans la cartographie structuro-fonctionnelle du système nerveux central.

- de déterminer si l'activité AChE est liée à la surexpression du peptide Aβ-42, un tel lien contribuant à la validation de l'AChE comme marqueur précoce de la MA.

Manuscrit

Neuroscience Research 63 (2009) 106–114

Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neures

Regional brain evaluation of acetylcholinesterase activity in *PS1*/A246E transgenic mice

R. Jazi [a,b], R. Lalonde [c,d], S. Qian [e], C. Strazielle [a,b,*]

[a] *Inserm, U724, Vandoeuvre les Nancy, France*
[b] *Univ Henri Poincaré, Nancy, France*
[c] *Univ Rouen, Fac. Sciences Rouen F-76000, France*
[d] *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal/St-Luc, Unité de Recherche en Sciences Neurologiques, Montréal H2X 3J4, Canada*
[e] *Merck Research Laboratories, Dept. Metabolic Disorders, Rahway, NJ 07065, USA*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 31 August 2008
Received in revised form 31 October 2008
Accepted 6 November 2008
Available online 14 November 2008

Keywords:
Alzheimer's disease
Presenilin-1
Acetylcholinesterase
Cholinergic innervation
Aβ peptide
Transgenic mouse

ABSTRACT

Human presenilin-1 (*PS1*) mutations are a major cause of autosomal dominant Alzheimer's disease. Forebrain cholinergic innervation was estimated in transgenic mice with the A246E mutation by measuring the activity of the non-specific catabolic enzyme, acetylcholinesterase (AChE). In the model, $A\beta_{42}$ concentrations increase without neuritic plaques or cell degeneration. *PS1*/A246E transgenic mice had altered AChE activity in several regions also vulnerable in Alzheimer pathology. In particular, AChE activity was upregulated in major cholinergic cell nuclei (medial septum, vertical diagonal band, substantia inominata) and in cortical and thalamic regions (eye field, posterior parietal and visual cortices, posterior thalamic and lateral geniculate nuclei) responsible for selective attention and visuomotor coordination, as well as limbic structures (hippocampal formation and amygdala) with related regions (midline, periventricular, reticular thalamic nuclei, and lateral prefrontal, agranular insular cortices) involved in cognition, arousal, emotion, and plasticity. As the murine model caused no apparent learning defects, cholinergic network changes in forebrain seem to be an early event caused by soluble Aβ peptides. *PS1*/A246E mice mimic to some extent pre-symptomatic Alzheimer's disease neuropathology, useful for studying early neurochemical changes often inaccessible in clinical studies.
© 2008 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

1. Introduction

In addition to amyloid beta-peptide (Aβ) deposits, selective neuronal loss is a hallmark of Alzheimer's disease (AD) brains, especially dysfunction and degeneration of basal forebrain cholinergic neurons projecting to hippocampus and neocortex (Geula and Mesulam, 1996; Lyness et al., 2003). The cause of the vulnerability of basal forebrain cholinergic neurons and its relationships to Aβ formation remains unsolved, but suppression of cortical cholinergic transmission altered β-amyloid precursor protein (APP) processing by favoring the amyloidogenic way (Seo et al., 2002; Liskowsky and Schliebs, 2006). Moreover, the cognitive decline and irreversible loss of memory affecting AD patients have widely been associated with cortical cholinergic deficiencies (DeKosky et al., 1992; Baskin et al., 1999). Reduced activities of choline acetyl-transferase (ChAT; Coyle et al., 1983; DeKosky et al., 1992) and acetylcholinesterase (AChE), the enzyme responsible for acetylcholine hydrolysis from cholinergic and non-cholinergic neurons (Whitehouse et al., 1982; Atack et al., 1983; Kuhl et al., 1999; Blusztajn and Berse, 2000; Shinotoh et al., 2000), and reduced cholinergic receptors (Wevers et al., 2000) have been reported in *postmortem* studies on AD patients. However, in an opposite manner of well-defined Alzheimer's stages, upregulation of cholinergic innervation occurs in models without amyloidosis at early stages of AD-like amyloid pathology, such as mice overexpressing C-terminal fragments of the β-amyloid protein precursor (Sberna et al., 1998; Dumont et al., 2006) or an APP mutation (Wong et al., 1999). Similarly, patients with mild cognitive impairment (MCI) showed upregulation of cholinergic markers in frontal cortex and hippocampus (DeKosky et al., 2002).

In spite of the general reduction in brain AChE activity following global cholinergic deficit, the enzyme appears to be increased within and around neuritic plaques (Gomez-Ramos et al., 1992; Moran et al., 1993), promoting Aβ assembly into fibrils (Inestrosa et al., 1996; Bartolini et al., 2003) and causing cytotoxicity (Alvarez et al., 1998). Conversely, studies using cultured P19 cells (Fodero et al., 2004) and transgenic mice overexpressing human Aβ indicate that AChE hyperactivity may be induced by Aβ peptides, mainly $A\beta_{42}$, by direct activation of alpha7-nicotinic receptors in

* Corresponding author at: Laboratoire de Microscopie Electronique, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 36 13; fax: +33 3 83 44 60 65.
E-mail address: straziel@persmail.uhp-nancy.fr (C. Strazielle).

0168-0102/$ – see front matter © 2008 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neures.2008.11.002

cells adjacent to amyloid plaques (Wong et al., 1999; Bronfman et al., 2000; Fodero et al., 2004). In accordance with these results, AChE is consequently an important index of AD, and could play an early pathogenic role by influencing the process leading to amyloid toxicity (Auld et al., 2002; Schliebs and Arendt, 2006).

Among genes directly involved in Alzheimer's disease, *PS1* encodes a protein facilitating Notch signalling, active in development (Shen et al., 1997), as well as in postmitotic neurons, and is required for proper neural morphology and function (Wittenburg et al., 2000; Parent et al., 1999). *PS1* mutations comprise most cases of autosomal dominant, early-onset AD (Campion et al., 1996; Price and Sisodia, 1998). They increase $A\beta_{42}$ levels by altering cleavage processing of APP at the γ-secretase site (Duff et al., 1996; Jankowsky et al., 2004), and may promote the vulnerability of neurons to apoptosis (Czech et al., 1998; Guo et al., 1999, 2005) through various mechanisms, such as disruption of calcium homeostasis, free radical production, and reduction of the β-catenin signaling pathway (Mattson and Guo, 1997; Begley et al., 1999; Kang et al., 1999; Grilli et al., 2000; Leutner et al., 2000). In addition to these degenerative mechanisms, PS1 may play a role in regulating expression of the cholinergic phenotype: the *PS1* mutations expressed in rat PC12 cells gained anti-cholinergic functions (De Sarno et al., 2001), involving a drastic reduction in basal ChAT activity (Pedersen et al., 1997), probably contributing to cognitive impairments. Coexpression of mutated human *APP* and *PS1* genes accelerates amyloidosis and causes precocious spatial memory deficits (Borchelt et al., 1997; Holcomb et al., 1998; Kurt et al., 2001). However, mice overexpressing the *PS1* mutation alone elevated brain $A\beta_{42}$ levels and excessive cellular stress without neuritic plaque development (Chui et al., 1995; Duff et al., 1996; Borchelt et al., 1997; Citron et al., 1997; Barrow et al., 2000) or spatial learning deficits (Janus et al., 2000; Lalonde et al., 2003, 2006). Whether or not amyloid deposition causes spatial memory deficits as a result of altered cholinergic innervation in AD-like mouse models remains unsettled (Holcomb et al., 1998). In an opposite fashion to *in vitro* studies, an enhancement of cholinergic fibers defined by ChAT, was observed in frontal cortex of *PS1*/M146V mutant mice (Hernandez et al., 2001), while in the *PS1*/M146L mutant, the cortical cholinergic network remained unchanged (Wong et al., 1999).

We evaluated the *PS1*/A246E mouse mutant on a murine *Ps1* null background, causing a gain-of-malfunction increase of brain $A\beta_{42}$ concentrations without plaque deposits (Qian et al., 1998) and tau hyperphosphorylation (unpublished data). To study the potential impact of early-stage amyloid pathology on forebrain cholinergic innervation, a detailed cartography of AChE activity was undertaken. Because of the neurotoxic properties of Aβ peptides (Mattson et al., 1992) and their interaction with AChE activity in cell cultures (Inestrosa et al., 1996; Hu et al., 2003; Melo et al., 2003; Sberna et al., 1997), transgenic mice (Sberna et al., 1998; Dumont et al., 2006), and human patients (Shinotoh et al., 2000; Herholz et al., 2004), we hypothesize that forebrain cholinergic innervation is affected despite the absence of Aβ plaques. Since no spatial learning deficit was discerned in this model (Lalonde et al., 2003), Aβ peptide overexpression in the absence of obvious AD-related pathology allows us to evaluate the relevance of cholinergic anomalies as an early marker (Mesulam, 2004) in the pathogenic amyloidogenic cascade.

2. Methods

2.1. Animals

PS1/A246E transgenic mice were generated under the transcriptional control of the neuron-specific *Thy1* promoter on a null *Ps1* background (Qian et al., 1998). Line 16-4 expressing the *PS1*/A246E mutation was compared to line 17-2 expressing wild-type human *PS1*. Twelve-month-old *PS1*/A246E mice ($n = 14$, 6 females and 8 males) and human wild-type *PS1* controls ($n = 14$, 7 females and 7 males) on a mixed background strain (50% B6, 25% SJl, 25% 129Sv) were air-freighted to France for behavioral tests (Lalonde et al., 2003) followed by the present histochemical analysis. All procedures complied with recommendations edited by the European Community Council for the Ethical Treatment of Animals (86/609/EEC) and local animal welfare regulations.

2.2. Tissue preparation

The mice were killed by decapitation and the brains rapidly removed, frozen in *N*-methylbutane, cooled at −40 °C, and stored at −80 °C. The brains were serially cut with a cryostat into 20 μm-thick coronal sections, mounted on gelatin-chrome alum-coated slides, and conserved at −80 °C until processing.

2.3. AChE histochemistry

All chemical products used in histochemical and biochemical experiments were purchased from Sigma–Aldrich Chemical Company (Saint Quentin Fallavier, France), except for ambenomium, obtained from Tocris (Illkirch, France).

Histochemical staining for AChE was performed on a series of sections from each mouse brain as well as several complete sets of standards, using an incubation medium composed of 50 mM acetate buffer (pH 5.0) with 4 mM copper sulfate and 16 mM glycine, together with 3 mg ethopropazine and 116 mg *S*-acetylthiocholine iodide per 100 ml (Koelle and Friendenwald, 1949; Paxinos and Watson, 1986; Dumont et al., 2006). Sections were incubated overnight (15 h) at room temperature. The staining was revealed by incubation in a 1% sodium sulfide solution (pH 7.5) for 10 min. Validation of the method was assured by absence of the AChE reaction product with the substrate removed from the incubation medium, or when 50 M ambenomium, a potent AChE inhibitor, was added, confirming the specificity of AChE labelling (Dumont et al., 2006).

Standards for AChE activity were prepared in cylindrical microtubes filled by whole brain homogenates, frozen and kept at a temperature of −80 °C until cut into 10, 20, 30, and 40 μm-thick sections at the same time as the brain sections. Under our experimental conditions, staining intensity was linearly proportional to the thickness of the standard sections ($r = 0.995$). The specific AChE activity of these homogenates was measured by spectrophotometry with the colorimetric method of Ellman et al. (1961) modified by Dumont et al. (2006). Thiocholine, formed during hydrolysis of acetylthiocholine, rapidly reacts with 5,5′-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) to release a colored 5-thio-2-nitrobenzoate anion with maximum absorption at 412 nm. The specific activity was 13.0 ± 0.66 μmol/min/g of tissue (mean ± S.D., $n = 8$), calculated with the molar extinction coefficient of $1.36 \times 10^4\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ for the thionitrobenzoate anion. AChE activity remained constant in −80 °C frozen standards for several months.

2.4. Densitometric analyses

Analysis of AChE histochemical staining was carried out with the MCID™ computer-assisted image analysis system (Cambridge, UK), with optical density readings converted by means of standards into enzymatic activity values expressed in mol/min/g of tissue. Anatomical structures were defined according to the Franklin and Paxinos mouse atlas (1997). Multiple optical density readings (10-100 samples at magnifications of 20× or 40×) were obtained from labelled regions, taking into account all the parameters necessary for an objective and homogeneous evalua-

tion (Reader and Strazielle, 1999). All measurements were globally performed on 14 control and 14 transgenic mice, except when regions presented histological artifacts or for small and heterogeneous structures presenting a field difference from the chosen plane. These restrictions limited the measurements to no less than 10 mice per group.

2.5. Statistical analyses

The data were analyzed by Statview 4.1 software. To take into account the high number of comparisons of multiple brain regions, a two-way repeated ANOVA was used to test mean group differences at an alpha level of $P = 0.05$: comparisons were performed among the constitutive subregions of each structure or among regions of a functional brain circuitry. An unpaired t-test with $P = 0.01$ as the threshold of significance was then used for individual group comparisons in brain regions with significant ANOVAs.

2.6. Neuropathology

A series of sections was used for detection and localization of Aβ peptides (6 brains per group) and determination of possible neuronal degeneration in cholinergic regions of basal forebrain and brainstem (8 brains per group).

A mouse monoclonal anti-amyloid antibody recognizing 1–42 residues was used to detect the intracellular localization of Aβ in transgenic mice. After fixation in a 4% paraformaldehyde-phosphate buffered saline (PBS) solution (pH 7.4), brain sections were first incubated for 30 min at room temperature in a PBS solution containing 0.5% H_2O_2, 0.5% normal horse serum, and 0.5% Triton X-100 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). After rapid immersion in formic acid (90%), a Vector M.O.M. immunodetection kit (AbCys S.A., Paris, France) was used for enhancing specific staining by reducing the background influence. Tissue sections were successively incubated in a PBS solution containing 3.6% M.O.M. mouse Ig blocking reagent for 1 h, and 8% M.O.M. diluent for 5 min before overnight soaking at 4 °C with the mouse anti-Aβ antibody (1:100 dilution in the latter M.O.M. diluent solution, Signet Lab, Dedham, MA, USA). Sections were then treated with a secondary fluorescent antibody (1:500 dilution in M.O.M. diluent solution, Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG, Molecular Probes, AA Leiden, The Netherlands) for 1 hr at room temperature. Controls consisted of the identical processing except that the tissue was incubated overnight in a solution without the primary antibody. The immunostained sections observed under fluorescent microscopy (Olympus, France) equipped with a rhodamine filter showed fluorescent red intracellular labelling. This $A\beta_{42}$ labelling was estimated by histomorphometry with the MCID image analysis system capable of color segmentation and automation, the labelling (positive targets) being expressed as a percentage of total area (total area of positive targets found in the scan outline). From each animal, regions were evaluated by 2–6 scanned images at 20× magnification (scan outline of 0.2 mm^2 each) from 1 to 3 brain coronal sections. Final data were expressed as mean standard error and intergroup differences assessed by the Mann–Whitney non-parametric test with threshold of significance set at $P = 0.05$. This expertise were given for regions or subregions presenting AChE activity changes as well as specific ones involved in AD physiopathology, including regions of the limbic system, associative cortical areas, cholinergic basal forebrain, limbic thalamic nuclei (dorsomedial, intralaminar, and midline), as well as mesencephalic nuclei providing serotoninergic (dorsal raphe), dopaminergic (substantia nigra and ventral tegmental area), and noradrenergic (locus coeruleus) innervation to forebrain.

For assessment of neuronal degeneration, sections were incubated in a Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc., Jefferson, AR, USA) solution according to the protocol described by Schmued and Hopkins (2000). The slides were observed under fluorescent (FITC) microscopy (Olympus, France) for detecting fluorescent yellow-green cells, indicative of dying neurons.

In addition, for each animal, section slides adjacent to those labelled for AChE histochemistry were simultaneously stained with a 0.5% cresyl violet solution for identifying and delimiting the precise anatomical localization of different neurochemical markers as well as for detecting possible cell alterations and regional atrophy inherent to the *PS1*/A246E mutation.

3. Results

3.1. AChE activity

As seen in Tables 1 and 2, AChE activity was altered in several forebrain regions, with only increases found. Labelling of AChE activity, originating from cholinergic afferent fibers and terminals, was diffuse throughout neocortex (Table 1), but weaker in the neuropil, the molecular layer being moderately stained. It was higher in *PS1*/A246E mutant mice than controls, as revealed by a group effect ($F_{1,13} = 10.25$; $P < 0.01$), affecting specifically associative cortices, such as lateral prefrontal ($t_{19} = 4.04$; $P < 0.001$), claustrum ($t_{25} = 2.77$; $P < 0.01$), eye field ($t_{25} = 2.92$; $P < 0.01$), and parietal posterior ($t_{25} = 3.32$; $P < 0.01$), as well as medial ($t_{24} = 3.13$; $P < 0.01$) and lateral ($t_{23} = 3.13$; $P < 0.01$) secondary visual areas.

The corpus striatum was the most intensively stained forebrain region in controls. In the neostriatum, site of cholinergic interneurons, a mosaic of two chemically distinct compartments was

Table 1
Acetylcholinesterase activity (means and S.E.M. in μmol/min/g of tissue) in forebrain regions of *PS1*–A246E mice ($n = 11$–14) and controls ($n = 10$–14) and percentage changes for regions showing significant differences (magnification 20×).

Regions	Controls	*PS1*–A246E
Cerebral cortex		
Anterior cingulate	8.39 ± 0.3	8.60 ± 0.2
Orbitofrontal	7.06 ± 0.5	7.45 ± 0.3
Lateral prefrontal	4.62 ± 0.3	6.11 ± 0.3** (+32%)
Prelimbic	8.68 ± 0.4	8.99 ± 0.5
Retrosplenius	6.42 ± 0.5	7.36 ± 0.3
Agranular insular	9.94 ± 0.3	11.04 ± 0.3* (+11%)
Claustrum	9.72 ± 0.4	11.17 ± 0.4* (+15%)
Eye field (M2)	7.77 ± 0.4	9.01 ± 0.3* (+16%)
Motor cortex (M1)	7.54 ± 0.4	8.37 ± 0.2
Somatosensory (S1)	7.91 ± 0.3	8.81 ± 0.3
Parietal posterior	5.16 ± 0.5	7.03 ± 0.3* (+36%)
Temporal auditory	7.76 ± 0.6	9.68 ± 0.5
Piriform	8.93 ± 0.3	9.93 ± 0.2
Lateral entorhinal	5.72 ± 0.4	5.97 ± 0.5
Visual (V1)	5.46 ± 0.6	7.03 ± 0.4
Visual, V2med	5.42 ± 0.5	7.16 ± 0.3* (+32%)
Visual, V2lat	6.26 ± 0.4	7.98 ± 0.3* (+27%)
Striatum		
Dorsal neostriatum	29.57 ± 0.3	31.55 ± 0.5* (+7%)
Ventral neostriatum	35.64 ± 0.5	35.04 ± 0.3
Accumbens n.	34.77 ± 0.6	37.33 ± 0.8* (+7%)
Lateral pallidum	17.17 ± 0.3	20.23 ± 0.3** (+18%)
Medial pallidum	10.92 ± 0.3	13.86 ± 0.4** (+27%)
Ventral pallidum	24.74 ± 0.5	26.78 ± 0.5* (+8%)
Cholinergic regions		
Medial septum (Ch1)	16.76 ± 0.4	18.99 ± 0.5* (+13%)
Vertical diagonal band (Ch2)	27.00 ± 0.7	30.64 ± 0.5** (+13%)
Horizontal diagonal band (Ch3)	28.18 ± 0.7	30.13 ± 0.4
Substantia inominata (Ch4)	14.28 ± 0.5	17.50 ± 0.5** (+23%)
Pedunculopontine n. (Ch5)	16.69 ± 0.6	20.01 ± 0.7* (+20%)

n. = nucleus.
* $P < 0.01$.
** $P < 0.001$.

Table 2
Acetylcholinesterase activity (means and S.E.M. in μmol/min/g of tissue) in limbic, thalamic, and brainstem regions of *PS1*–A246E mice (n = 12–14) and controls (n = 10–14) and percentage changes for regions showing significant differences (magnification 20×, except where otherwise indicated).

Regions	Controls	*PS1*–A246E
Limbic regions		
Hippocampus CA1	7.99 ± 0.4	9.20 ± 0.4* (+15%)
CA1, pyramidal layer#	9.62 ± 0.5	11.97 ± 0.4** (+24%)
Hippocampus CA2-CA3	10.03 ± 0.3	11.05 ± 0.4
CA2-CA3, pyramidal layer#	11.96 ± 0.5	14.63 ± 0.6* (+22%)
Dentate gyrus (DG)	8.59 ± 0.2	9.30 ± 0.2
DG, granular layer#	6.02 ± 0.2	6.85 ± 0.2* (+14%)
DG, polymorphic layer#	8.42 ± 0.5	10.84 ± 0.7* (+29%)
Subiculum	10.81 ± 0.5	12.93 ± 0.3** (+20%)
Baso-lateral amygdala	21.90 ± 1.0	23.57 ± 0.5
Cortico-medial amygdala	7.47 ± 0.5	9.63 ± 0.4** (+29%)
Lateral septum	9.04 ± 0.3	10.44 ± 0.3* (+15%)
Bed n. stria terminalis#	16.14 ± 0.5	15.65 ± 0.7
Thalamus		
Anterior n.	15.72 ± 0.5	18.48 ± 0.7* (+18%)
Dorsomedial n.	9.04 ± 0.4	9.54 ± 0.4
Midline n.	10.90 ± 0.5	13.14 ± 0.5* (+21%)
Intralaminar n.	14.24 ± 0.6	15.87 ± 0.5
Reticular n.	9.80 ± 0.4	11.43 ± 0.4* (+17%)
Periventricular n.	10.51 ± 0.5	13.28 ± 0.4** (+26%)
Ventrolateral n.	7.74 ± 0.5	7.92 ± 0.3
Ventroposterior n.	5.72 ± 0.4	6.18 ± 0.3
Posterior n.	8.40 ± 0.2	9.83 ± 0.3** (+17%)
Lateral geniculate n.	10.25 ± 0.5	12.45 ± 0.5* (+21%)
Medial geniculate n.	7.94 ± 0.4	8.04 ± 0.3
Zona incerta	10.57 ± 0.5	13.10 ± 0.2** (+24%)
Brainstem		
Locus coeruleus	25.93 ± 1.2	30.07 ± 0.7* (+16%)
Prepositus n.	21.75 ± 0.6	26.30 ± 1.0** (+21%)
Lateral pontine n.	19.81 ± 0.8	23.47 ± 0.8* (+18%)

n. = nucleus; # structure with AChE measure at magnification 40×.
* $P < 0.01$.
** $P < 0.001$.

revealed, AChE-poor striosomes alternating with the AChE-rich matrix. Staining was still dense in efferent pallidal regions. There was a group effect in corpus striatum ($F_{1,24} = 33.69$; $P < 0.001$), attributable to increased activity in dorsal neostriatum ($t_{23} = 3.40$; $P < 0.01$), nucleus accumbens ($t_{23} = 3.40$; $P < 0.01$) as well as lateral ($t_{23} = 7.48$; $P < 0.0001$), medial ($t_{23} = 5.21$; $P < 0.0001$), and ventral ($t_{24} = 2.91$; $P < 0.01$) pallidum.

The basal forebrain contains large cholinergic neurons scattered in the magnocellular basomedial telencephalic complex, extending in the rostral to caudal direction from olfactory tubercle to the hypothalamic region. Cholinergic neurons are grouped into 4 subareas according to the Mesulam et al. (1983) nomenclature. The medial septal nucleus (Ch1) as well as vertical and horizontal limbs (Ch2 and Ch3, respectively) of the diagonal band forms the medial septum complex. The last cholinergic area (Ch4), located in substantia inominata/ventral pallidum, rodent equivalent to the nucleus basalis in primates, overlaps in medullary laminae of the pallidum. Labelling was intense in these forebrain cholinergic regions, marked by large cell bodies surrounded by islands of AChE-positive neuropil (Table 1). Basal forebrain AChE activity was higher in *PS1*/A246E mutant mice, as revealed by a gene effect ($F_{1,22} = 34.97$; $P < 0.0001$), affecting specifically medial septum ($t_{23} = 3.30$; $P < 0.01$; Fig. 1), vertical diagonal band ($t_{23} = 4.33$; $P < 0.001$), and substantia inominata ($t_{26} = 4.78$; $P < 0.001$; Fig. 2). The pedunculopontine (Ch5) and laterodorsal tegmental (Ch6) brainstem nuclei represent two additional cholinergic areas, where the group effect was significant ($F_{1,23} = 10.50$; $P < 0.01$), with higher AChE activity observed in mutant cholinergic area Ch5 ($t_{23} = 3.54$; $P < 0.01$).

The hippocampal labelling was weak to moderate, AChE fibers and terminals mainly located at the interface of the pyramidal layer (supra- and sub-pyramidal zones) for CA1 and CA2-CA3 regions, as well as in the interface of the granular layer (deep molecular and superficial polymorphic positions) of the dentate gyrus. The hippocampal formation (Table 2) of *PS1*/A246E mice showed higher enzymatic activity ($F_{1,23} = 15.77$; $P < 0.001$; Fig. 3), attributable to specific subregional layers, i.e. pyramidal in CA1 ($t_{26} = 3.47$; $P < 0.01$) and CA2-CA3 ($t_{26} = 3.34$; $P < 0.01$), polymorphic ($t_{26} = 2.93$; $P < 0.01$) and granular ($t_{26} = 2.99$; $P < 0.01$) in dentate gyrus, as well as subiculum ($t_{24} = 3.85$; $P < 0.001$). The septal region was not spared ($t_{26} = 4.78$; $P < 0.001$), medial (Table 1, as Ch1 area) and lateral (Table 2, $t_{26} = 2.99$; $P < 0.01$) subregions being affected. In control mice, the amygdaloid nuclear complex had prominent AChE activity in basolateral nuclei by contrast with the corticomedial subarea. In *PS1*/A246E mutants (Table 2), the amygdala showed a higher enzymatic activity, as revealed by a gene effect ($F_{1,22} = 9.93$; $P < 0.01$), attributable to the corticomedial group ($t_{24} = 3.64$; $P < 0.01$) and more specifically the central nucleus ($t_{24} = 4.13$; $P < 0.001$).

The diencephalon displayed a mosaic of staining patterns in controls, the medial nuclear mass being more strongly labelled than lateral and ventral ones (Table 2). In contrast to thalamus where AChE labelling was mostly associated with the neuropil, the hypothalamus contained clearly outlined cell bodies. In paraven-

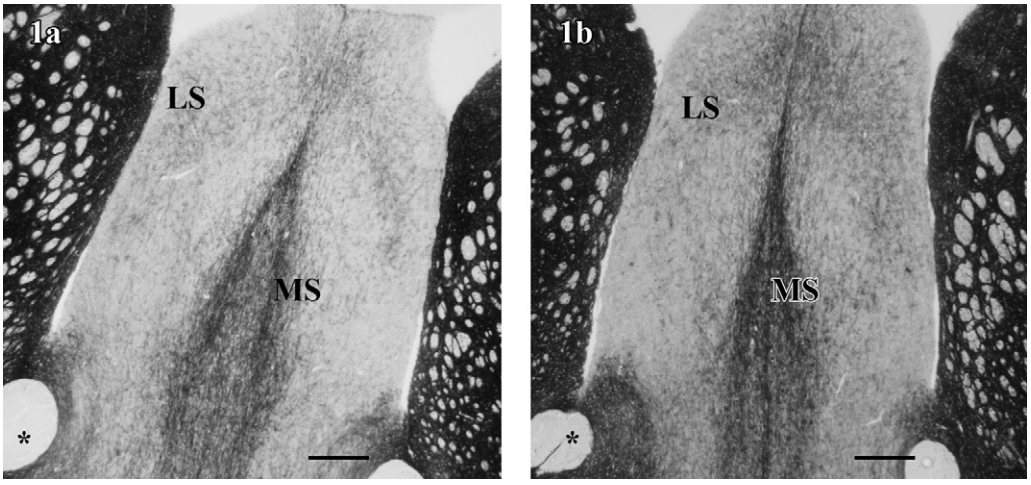


Fig. 1. Acetylcholinesterase (AChE) labelling in the septal region of control (a) and *PS1*/A246E mutant (b) mice at a 0.74 mm anterior plane from bregma. Note the higher AChE labelling in medial (MS) and lateral (LS) septum of the mutant mouse. Scale bar 300 μm; asterisks point at the anterior commissure.

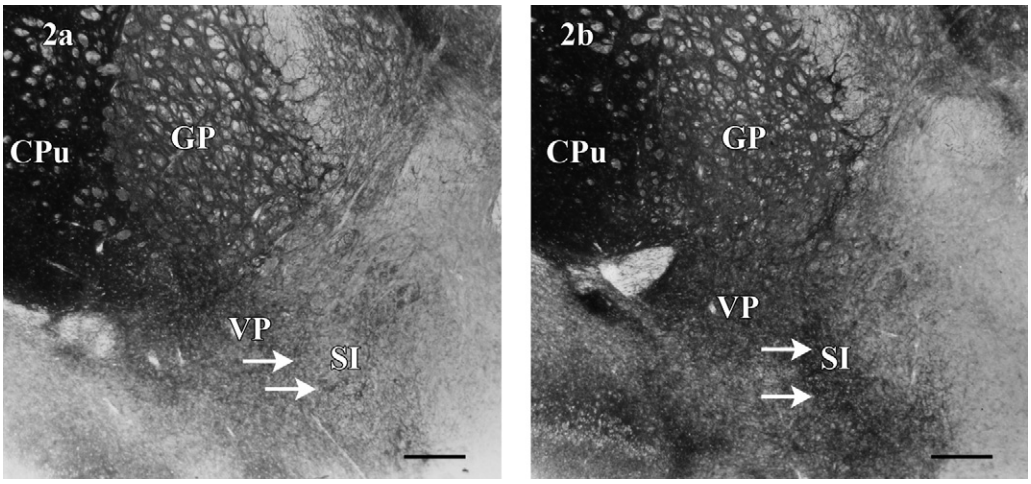


Fig. 2. Acetylcholinesterase (AChE) labelling in ventral pallidum (VP), substantia inominata (SI), and lateral pallidum (GP as globus pallidum) of control (a) and of *PS1*/A246E mutant (b) mice localized at a 0.34 mm posterior plane from bregma. In comparison with the control, the mutant mouse had higher AChE labelling in regions containing cholinergic neurons projecting to neocortex. Large cell bodies (arrows) surrounded by islands of AChE-positive neuropils are distinctively labelled. Scale bar 300 μm; CPu, caudate-putamen.

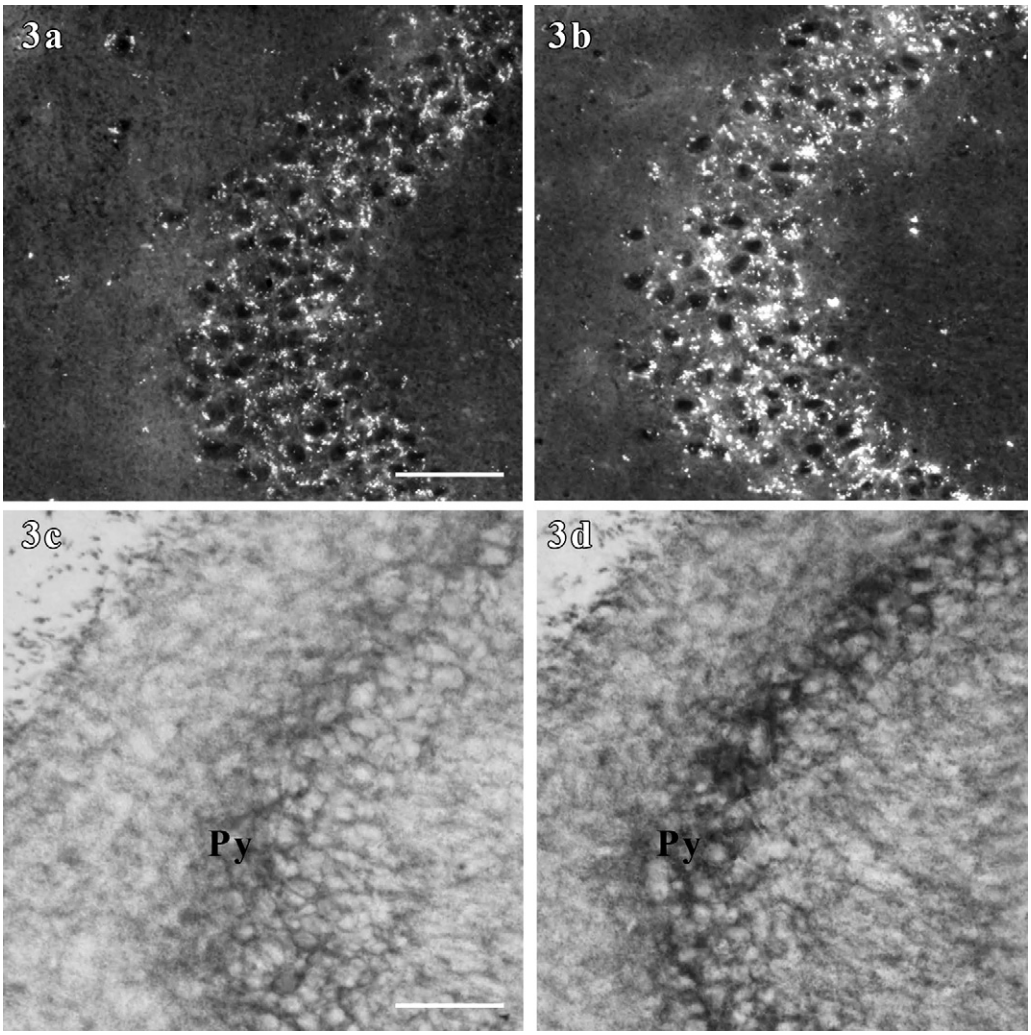


Fig. 3. CA2-CA3 subregions of the hippocampal formation of control (a and c) and *PS1*/A246E mutant (b and d) mice at a 1.94 mm posterior plane from bregma. Strong immunolabelling of $A\beta_{42}$ (a and b) is specifically observable in the pyramidal layer as well with higher labelling in the mutant mouse (b) when compared with control (a). By comparison with the control (c), acetylcholinesterase (AChE) labelling was higher in the pyramidal layer of the mutant (d). Scale bar 300 μm.

tricular nucleus, a densely packed aggregate of small and medium-sized AChE-positive cell bodies could be seen. AChE-rich cell bodies were also scattered in dorsal third of hypothalamus. In *PS1*/A246E mutants, AChE activity was similar to controls in hypothalamic regions but higher in thalamus ($F_{1,13} = 8.55$; $P < 0.01$), including anterior ($t_{18} = 3.09$; $P < 0.01$), midline ($t_{26} = 3.20$; $P < 0.01$), reticular ($t_{26} = 3.25$; $P < 0.01$), periventricular ($t_{26} = 4.11$; $P < 0.001$), posterior ($t_{25} = 4.04$; $P < 0.001$), and lateral geniculate ($t_{26} = 3.21$; $P < 0.01$) nuclei. The zona incerta, adjacent to the reticular nucleus and related diffuse thalamic nuclei, was modulated in the same direction ($t_{25} = 4.33$; $P < 0.001$).

In brainstem, among multiple regions evaluated (data not shown), only three reached significance (Table 2), mainly the vestibular system ($F_{1,25} = 5.78$; $P < 0.05$) including prepositus ($t_{25} = 3.89$; $P < 0.001$), the lateral pontine ($t_{23} = 3.22$; $P < 0.01$) nuclei as well as the locus coeruleus, major source of noradrenergic fibers to forebrain ($t_{21} = 3.04$; $P < 0.01$).

3.2. Regional brain pathology

In Fluoro-Jade B stained sections, fluorescent fibers were rare, with no Fluoro-Jade B positive cells observed in any region, more precisely in basal forebrain and tegmental cholinergic systems; moreover, gross examination of cresyl-violet-stained sections revealed no detectable regional atrophy, the surface area of the structures or thicknesses of laminar regions showing no intergroup differences. The absence of degenerating neurons was thus attested in 12-month old mice.

$A\beta_{42}$ immunostaining was detected in many forebrain regions of both groups, but more intensely in *PS1*/A246E mutant mice: for cortical areas, labelling was higher in anterior cingulate (45%), piriform (50%), entorhinal (75%), and eye field (58%) cortices with predominant cell population labelling in layers II to IV. Similarly, immunostaining was higher in nuclei of the basal cholinergic system, more specifically medial septum (62%), vertical diagonal band (115%), substantia inominata (51%), the pyramidal cell layer of CA1 and CA2-CA3 subregions (respectively 90% and 77%; Fig. 3), polymorphic layer of dentate gyrus (75%), and dorsal neostriatum (67%). The thalamus, with predominance in non-specific nuclei, had increased immunostaining (65% in the midline nuclear thalamus). In brainstem, a large Aβ overproduction was observed in red nucleus, pontine nuclei, dorsal raphe, cerebellum (cortex and nuclei), lateral vestibular, and prepositus nuclei, as well as reticular formation (tegmental, gigantocellular, and lateral) nuclei.

4. Discussion

4.1. General features of AChE activity and cholinergic innervation

AChE activity measured in the neuronal compartment, localized preponderantly at synaptic sites (Wright et al., 1993; Giacobini, 1998) was estimated by quantitative histochemistry. Although butyrylcholinesterase (BChE) has a similar structure in adult central nervous system, only AChE activity was labelled in the present study. AChE histochemistry on freshly frozen tissue is suitable for studying cholinergic innervation (Gordon and Finch, 1984). Choline acetyltransferase (ChAT) is a specific cholinergic marker and AChE a non-specific one, although their distribution is associated with acetylcholine release, including presynaptic cholinergic cell bodies and axons and postsynaptic cholinoceptive neurons (Mesulam and Geula, 1988). In AD and animal model brains, AChE activity was associated with ChAT activity as well as basal ACh release (Gil-Bea et al., 2005), confirming AChE histochemical quantification as a valid method for characterizing the cholinergic system in AD-related transgenic mice. Therefore, this neurohistochemical method allowed us to perform a brain cartography of *PS1*/A246E cholinergic innervation, a useful study before testing functional consequences of specific brain regions.

AChE activity of *PS1*/A246E mutants was upregulated in basal forebrain-containing cholinergic cell bodies: medial septum, vertical diagonal band, substantia inominata, major sources of forebrain cholinergic innervation modulating neuronal excitability in hippocampal formation, amygdala, and neocortex (Mesulam et al., 1983; Butcher, 1995). Since large cholinergic neurons invade pallidal regions as well as ventral caudate-putamen (Mesulam et al., 1983), the enzymatic changes may be due to an altered ventral forebrain cholinergic system. The target regions of these cholinergic nuclei are involved in many cognitive functions: posterior parietal cortex being linked with secondary visual and prefrontal cortex and frontal eye field with spatial attention and orientation (Colby and Goldberg, 1999).

The entire target subregions of hippocampal formation, receiving cholinergic input from medial septum and vertical diagonal band, were affected in the *PS1* model, with enhanced enzymatic activity in layers with intracellular Aβ overproduction. This functional circuitry is severely compromised in AD and animal models (Atack et al., 1983; Coyle et al., 1983; Kuhl et al., 1999; Blusztajn and Berse, 2000; Shinotoh et al., 2000).

The diencephalic regions receive their main innervation from Ch5 and Ch6 pontomesencephalic cholinergic nuclei (Butcher, 1995), but also from basal forebrain (Heckers et al., 1992). As part of the functional regulation in septo-hippocampal circuitry and cortical activation, the thalamic nuclei and striato-complex presenting AChE hyperactivation in *PS1*/A246E mice are particularly relevant in AD symptomatology. In contrast, few brainstem regions was altered, but included the locus coeruleus, source of noradrenegic modulation of neocortex. Alterations of noradrenergic forebrain innervation have been described in AD patients (Zweig et al., 1993) and in an AD transgenic model (Szot et al., 2006).

4.2. AChE activity and Aβ-immunostaining

The higher Aβ-immunostaining in *PS1*/A246E mutant relative to non-mutant structures illustrate $A\beta_{1-42/43}$ overproduction, as previously demonstrated (Qian et al., 1998), and define sensitive brain regions. Aβ-immunopositive cells were manifest in cholinergic forebrain regions involved in AD pathology and AChE activity was higher in structures rich in Aβ-immunostaining, indicating that AChE activities are regionally controlled, perhaps as a result of structure-dependent sensitivity to increasing amyloid load. Moreover, subcellular colocalization of PS1 and AChE in cultured cells as well as coexpression patterns in human brain sections was recently demonstrated, indicating a direct PS1 protein interaction with the enzyme (Silveyra et al., 2008).

These results point towards an existing link between Aβ and cholinergic innervation. The initial forebrain cholinergic depletion in cortical areas is a relevant clinical sign of AD, as Aβ disrupted ACh synthesis and signal-transduction events associated with cholinergic neurotransmission (Kelly et al., 1996; Auld et al., 1998) and induced apoptotic cell death of cholinergic neurons (Mattson and Guo, 1997). Cholinergic depletion, in turn, favors the amyloidogenic route of APP processing (Liskowsky and Schliebs, 2006), increasing Aβ production as well as neurotoxicity (Kihara et al., 1997) and indicating that preserved cholinergic neurotransmission may prevent a vicious circle being formed.

4.3. General aspects of AChE activity in mutant mice

Although the cholinergic system degenerates in later stages of illness (Lyness et al., 2003), AChE activity increased with Aβ exposure (Sberna et al., 1998). The enzyme is observable within

and around amyloid plaques and promotes Aβ aggregation and toxicity (Inestrosa et al., 1996; Talesa, 2001; Bartolini et al., 2003). Nevertheless, AChE activity was unchanged in *APP*/751swe (Boncristiano et al., 2002) and *APP*/695swe (Apelt et al., 2002; Fodero et al., 2002) transgenic brains despite extensive plaques. When specific AChE isoforms were taken into account, the activity of an abnormally glycosylated G1 version increased in *APP*/695swe cortical extracts, the tetrameric G4 version being unchanged (Fodero et al., 2002). This result was not extended to the *APP*/695 London mutant (Bronfman et al., 2000).

In *PS1*/A246E mutants, AChE activity was higher in several forebrain regions despite lack of amyloidosis. A recent study on the same mutation reported lower AChE activity (for all three molecular forms) in cortical extracts but with unchanged protein and mRNA levels (Silveyra et al., 2008). Although we did not dissociate between isoforms, we undertook a more detailed cartography of the enzyme. When comparing the two studies, the age of the animals was very similar. We ascribe the discrepancy to the 16-day behavioral study in our mouse groups, as acquisition of learning tasks or simply exercise influence cholinergic innervation and regional AChE activity (Segal et al., 1988; Ang et al., 2006).

In parallel to our results, AChE activity was elevated in several regions involved in the functional loop of regulation between septum and hippocampus or single forebrain structures of transgenic mice overexpressing C99 (Dumont et al., 2006) or C100 (Sberna et al., 1998) *APP* fragments. Likewise, vesicular acetylcholine (VAChT) binding increased in *APP*/695swe neocortex (Wong et al., 1999; Klingner et al., 2003). Moreover, cholinergic neuron numbers in medial septum (Jaffar et al., 2001) and cortical monomeric AChE isoform activity were upregulated (Fodero et al., 2002) in the same model. In *PS1*/M146V transgenic mutants, ChAT activity increased in frontal cortex (Hernandez et al., 2001).

Overproduction of soluble Aβ may directly affect cholinergic neurotransmission (Kar et al., 1996; Kelly et al., 1996; Gonzalo-Ruiz and Sanz, 2002) and inhibit cholinergic synaptic function, leading to an increment in AChE activity through oxidative stress mechanisms (Melo et al., 2003). Cell culture studies of a neuron-like line indicate that elevated AChE activity slowed down AChE degradation, possibly due to lysosomal changes rather than accelerated synthesis (Hu et al., 2003).

Fiber sprouting is a common response to organic lesions. Cholinergic fiber sprouting was observed after hippocampal deafferentation caused by entorhinal cortex lesions in rats (Ramirez et al., 2001). Although no ongoing cell degeneration was detected with Fluoro-jade B labelling in *PS1*/A246E mutants, upregulated AChE activity can be a consequence of plasticity to restore innervation as a reaction to synaptic dysfunction. This hypothesis was evoked in cases of MCI and Down's syndrome (Contestabile et al., 2006) with elevated ChAT and AChE activities in specific forebrain regions. In *APP*/C99 transgenic mice, elevated AChE activity in medial septum was linearly correlated with poor spatial performances and elevated AChE activity in paraventricular thalamic nucleus with superior spatial performances (Dumont et al., 2006). Such a link between AChE activity and behavioral performances was not observed in *PS1*/A246E mutants (unpublished results), possibly because of the absence of a learning deficit (Lalonde et al., 2003).

Besides the role of mutated *PS1* on Aβ production, the altered protein may directly suppress neurotransmitter synthesis in cholinergic neurons, in the regulation of a neuronal phenotype, resulting in sprouting of cholinergic terminals. Levels of ChAT were markedly reduced in PC12 cells expressing mutated relative to wild-type *PS1* or wild-type controls (Pedersen et al., 1997).

In addition to direct or indirect roles of *PS1* mutations on the cholinergic network, subregional increases of AChE activity in forebrain are a possible indication of a trophic role for PS1 (Mattson and Pedersen, 1998; Wittenburg et al., 2000), an explanation of the apparent lack of overt Aβ toxicity in *PS1* mutants. ChAT activity increased in hippocampus and neocortex of *PS1*/M146V mutants in parallel with augmented ChAT mRNA in medial septum/diagonal band, demonstrating a trophic action of PS1 on cholinergic projection systems (Hernandez et al., 2001). However, in another study, a significant elevation in cholinergic synaptic density was observed in cortical regions of *APP* mutants, but not of a *PS1* mutant (Wong et al., 1999). On the other hand, cholinergic neuron terminals sprouted in response to trophic factors (Cuello et al., 1992), particularly nerve growth factor, known to protect cholinergic neurons and improve spatial memory (Fischer et al., 1991). Further studies on this theme should be done.

4.4. Concluding remarks

Mice overexpressing *PS1*/A246E have only small elevations in $A\beta_{42}$, underlining AChE hyperactivity as an early alteration in an AD-like pathogenic cascade. An overproduction in association with oxidative stress is involved in cholinergic modifications, with presenilin contributing to the cholinergic phenotype (Pedersen et al., 1997). A perturbation of cholinergic innervation is likely to be present in early stages of AD even without being related with cognitive disturbances (Shinotoh et al., 2000; Herholtz et al., 2004; Mesulam, 2004). Increased cholinergic enzymatic activity has been observed in specific brain regions of MCI patients (DeKosky et al., 2002; Morris, 2002; Herholtz et al., 2004), and in a Down syndrome murine model (Contestabile et al., 2006). Further studies on different AD models at several ages would help determine the chronology of cholinergic alterations and their interaction with amyloidogenesis, oxydative stress, neuroplasticity, and behavioral deficits.

Acknowledgement

This study was supported by the "Fondation pour la Recherche Médicale de Lorraine".

References

Alvarez, A., Alarcon, R., Opazo, C., Campos, E.O., Munoz, F.J., Calderon, F.H., Dajas, F., Gentry, M.K., Doctor, B.P., De Mello, F.G., Inestrosa, N.C., 1998. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. J. Neurosci. 18, 3213–3223.

Ang, E.T., Dawe, G.S., Wong, P.T., Moochhala, S., Ng, Y.K., 2006. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. Brain Res. 1113, 186–193.

Apelt, J., Kumar, A., Schliebs, R., 2002. Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human-amyloid precursor protein. Brain Res. 953, 17–30.

Atack, J.R., Perry, E.K., Bonham, J.R., Perry, R.H., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Fairbain, A., 1983. Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form. Neurosci. Lett. 40, 199–204.

Auld, D.S., Kar, S., Quirion, R., 1998. β-Amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link? Trends Neurosci. 21, 43–49.

Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S., Quirion, R., 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. Prog. Neurol. 68, 209–245.

Barrow, P.A., Empson, R.M., Gladwell, S.J., Anderson, C.M., Killick, R., Yu, X., Jefferys, J.G.R., Duff, K., 2000. Functional phenotype in transgenic mice expressing human mutant *presenilin-1*. Neurobiol. Dis. 7, 119–126.

Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., Andrisano, V., 2003. β-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. Biochem. Pharmacol. 65, 407–416.

Baskin, D.S., Browning, J.L., Pirozzolo, F.J., Korporaal, S., Baskin, J.A., Appel, S.H., 1999. Brain choline acetyl-transferase and mental function in Alzheimer disease. Arch. Neurol. 56, 1121–1123.

Begley, J.G., Duan, W., Chan, S., Duff, K., Mattson, M.P., 1999. Altered calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in cortical synaptic compartments of *presenilin-1* mutant mice. J. Neurochem. 72, 1030–1039.

Blusztajn, J.K., Berse, B., 2000. The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease. Met. Brain Dis. 15, 45–64.

Boncristiano, S., Calhoun, M.E., Kelly, P.H., Pfeifer, M., Bondolfi, L., Stalder, M., Phinney, A.L., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Enz, A., Sommer, B., Staufenbiel, M., Jucker, M., 2002. Cholinergic changes in the APP23 transgenic mouse model of cerebral amyloidosis. J. Neurosci. 22, 3234–3243.

Borchelt, D.R., Van Lare, J., Lee, M.K., Gonzalez, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. Neuron 19, 939–945.

Bronfman, F.C., Moechars, D., Van Leuven, F.W., 2000. Acetylcholinesterase-positive fiber deafferentation and cell shrinkage in the septohippocampal pathway of aged amyloid precursor protein London mutant transgenic mice. Neurobiol. Dis. 7, 152–168.

Butcher, L.L., 1995. Cholinergic neurons and networks. In: Paxinos, G. (Ed.), The Rat Nervous System. 2nd ed. Academic Press, New York, pp. 1003–1015.

Campion, D., Brice, A., Dumanchin, C., Puel, M., Baulac, M., De La Sayette, V., Hannequin, D., Duyckaerts, C., Michon, A., Martin, C., Moreau, V., Penet, C., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Agid, Y., Frebourg, T., 1996. A novel *presenilin 1* mutation in familial Alzheimer's disease with an onset age of 29 years. NeuroReport 7, 1582–1584.

Chui, D.-H., Tanahashi, H., Ozawa, K., Ikeda, S., Checler, F., Ueda, O., Suzuki, H., Araki, W., Inoue, H., Shirotani, K., Takahashi, K., Gallyas, F., Tabira, T., 1995. Transgenic mice with Alzheimer *presenilin 1* mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. Nat. Med. 5, 560–564.

Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., Selkoe, D.J., 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid -beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. Nat. Med. 3, 67–72.

Colby, C.L., Goldberg, M.E., 1999. Space and attention in parietal cortex. Annu. Rev. Neurosci. 22, 319–349.

Contestabile, A., Fila, T., Bartesaghi, R., Contestabile, A., Ciani, E., 2006. Choline acetyltransferase activity at different ages in brain of Ts65Dn mice, an animal model for Down's syndrome and related neurodegenerative diseases. J. Neurochem. 97, 515–526.

Coyle, J.T., Price, D.L., DeLong, M.R., 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. Science 219, 1184–1190.

Cuello, A.C., Maysinger, D., Garofalo, L., 1992. Trophic factor effects on cholinergic innervation in the cerebral cortex of the adult rat brain. Mol. Neurobiol. 6, 451–461.

Czech, C., Lesort, M., Tremp, G., Terro, F., Blanchard, V., Schombert, B., Carpentier, N., Dreisler, S., Bonici, B., Takashima, A., Moussaoui, S., Hugon, J., Pradier, L., 1998. Characterization of human *presenilin 1* transgenic rats: increased sensitivity to apoptosis in primary neuronal cultures. Neuroscience 87, 325–336.

DeKosky, S.T., Harbaugh, R.E., Schmitt, F.A., Bakay, R.A.E., Chui, H.C., Knopman, D.S., Reeder, T.M., Shetter, A.G., Senter, H.J., Markesbery, W.R., 1992. Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. Ann. Neurol. 32, 625–632.

DeKosky, S.T., Ikonomovic, M.D., Styren, S.D., Beckett, L., Wisniewski, S., Bennet, D.A., Cochran, E.J., Kordower, J.H., Mufson, E.J., 2002. Upregulation of choline-transferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. Ann. Neurol. 51, 145–155.

Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.-M., Perez-tur, J., Hutton, J., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M.N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J., Younkin, S., 1996. Increased β-amyloid42(43) in brains of mice expressing mutant *presenilin 1*. Nature 383, 710–713.

Dumont, M., Lalonde, R., Ghersi-Egea, J.-F., Fukuchi, K., Strazielle, C., 2006. Regional acetylcholinesterase activity and its correlation with behavioral performances in 15-month old transgenic mice expressing the human C99 fragment of *APP*. J. Neural Transm. 113, 1225–1241.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.

Fischer, W., Bjôrklund, A., Chen, K.S., Gage, P.H., 1991. NGF improves spatial learning in aged rodents as a function of age. J. Neurosci. 11, 1889–1906.

Fodero, L.R., Mok, S.S., Losic, D., Martin, L.L., Aguilar, M.I., Barrow, C.J., Livett, B.G., Small, D.H., 2004. 7-Nicotinic acetylcholine receptors mediate an $A\beta_{1-42}$-induced increase in the level of acetylcholinesterase in primary cortical neurons. J. Neurochem. 88, 1186–1193.

Fodero, L.R., Saez-Valero, J., McLean, C.A., Martins, R.N., Beyreuther, K., Masters, C.L., Robertson, T.A., Small, D.H., 2002. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in APP(sw) Tg2576 transgenic mice occurs prior to amyloid plaque deposition. J. Neurochem. 81, 441–448.

Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 1997. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, New York.

Geula, C., Mesulam, M.M., 1996. Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. Cereb. Cortex 6, 165–177.

Giacobini, E., 1998. Cholinergic foundations of Alzheimer's disease therapy. J. Physiol. (Paris) 92, 283–287.

Gil-Bea, F.J., Garcia-Alloza, M., Dominguez, J., Marcos, B., Ramirez, M.J., 2005. Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit. Neurosci. Lett. 375, 37–41.

Gomez-Ramos, P., Mufson, E.J., Moran, M.A., 1992. Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in neurofibrillary tangles, neuropil threads and senile plaques in aged and Alzheimer's brain. Brain Res. 569, 229–237.

Gonzalo-Ruiz, A., Sanz, J.M., 2002. Alteration of cholinergic, excitatory amino acid and neuropeptide markers in the septum-diagonal band complex following injections of fibrillar β-amyloid protein into the retrosplenial granular cortex of the rat. Eur. J. Anat. 6, 95–107.

Gordon, M.N., Finch, C.E., 1984. Topochemical localization of choline acetyltransferase and acetylcholinesrerase in mouse brain. Brain Res. 208, 364–368.

Grilli, M., Diodato, E., Lozza, G., Brusa, R., Casarini, M., Uberti, D., Rozmahel, R., Westaway, D., St George-Hyslop, P., Memo, M., Ongini, E., 2000. Presenilin-1 regulates the neuronal threshold to excitotoxicity both physiologically and pathologically. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 97, 12822–12827.

Guo, Q., Fu, W., Sopher, B.L., Miller, M.W., Ware, C.B., Martin, G.M., Mattson, M.P., 2005. Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in *presenilin-1* mutant knock-in mice. Nat. Med. 5, 101–106.

Guo, Q., Sebastian, L., Sopher, B.L., Miller, M.W., Ware, C.B., Martin, G.M., Mattson, M.P., 1999. Increased vulnerability of hippocampal neurons from *presenilin-1* mutant knock-in mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. J. Neurochem. 72, 1019–1029.

Heckers, S., Geula, C., Mesulam, M.M., 1992. Cholinergic innervation of the human thalamus: dual origin and differential nuclear distribution. J. Comp. Neurol. 325, 68–82.

Herholtz, K., Weisenbach, S., Zündorf, G., Lenz, O., Schröder, H., Bauer, B., Kalbe, E., Heiss, W.D., 2004. In vivo study of acetylcholinesterase in basal forebrain, amygdala, and cortex in mild to moderate Alzheimer disease. NeuroImage 21, 136–143.

Hernandez, D., Sugaya, K., Qu, T., McGowan, E., Duff, K., McKinney, M., 2001. Survival and plasticity of basal forebrain cholinergic systems in mice transgenic for presenilin-1 and amyloid precursor protein mutant genes. NeuroReport 12, 1377–1384.

Holcomb, L.A., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkowic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C.-M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K., Duff, K., 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant *amyloid precursor protein* and *presenilin* transgenes. Nat. Med. 4, 97–100.

Hu, W., Gray, N.W., Brimijoin, S., 2003. Amyloid-beta increases acetylcholinesterase expression in neuroblastoma cells by reducing enzyme degradation. J. Neurochem. 86, 470–478.

Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Perez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C., Garrido, J., 1996. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. Neuron 16, 881–891.

Jaffar, S., Counts, S.E., Ma, S.Y., Dadko, E., Gordon, M.N., Morgan, D., Mufson, E.J., 2001. Neuropathology of mice carrying APP_{SWE} and/or $PS1_{M146L}$ transgenes: alterations in the $p75^{NTR}$ cholinergic basal forebrain septohippocampal pathway. Exp. Neurol. 170, 227–243.

Jankowsky, J.L., Fadale, D.J., Anderson, J., Xu, G.M., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Lee, M.K., Younkin, L.H., Wagner, S.L., Younkin, S.G., Borchelt, D.R., 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β-amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific secretase. Hum. Mol. Genet. 13, 159–170.

Janus, C., D'Amelio, S., Amitay, O., Chishti, M.A., Strome, R., Fraser, P., Carlson, G.A., Roder, J.C., George-Hyslop, P., Westaway, D., 2000. Spatial learning in transgenic mice expressing human presenilin 1 (PS1) transgenes. Neurobiol. Aging 21, 541–549.

Kang, D.E., Soriano, S., Frosch, M.P., Collins, T., Naruse, S., Sisodia, S.S., Leibowitz, G., Levine, F., Koo, E.H., 1999. Presenilin 1 facilitates the constitutive turnover of β-catenin: differential activity of Alzheimer's disease-linked PS1 mutants in the β-catenin-signalling pathway. J. Neurosci. 19, 4229–4237.

Kar, S., Seto, D., Gaudreau, P., Quirion, R., 1996. Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. J. Neurosci. 16, 1034–1040.

Kelly, J.F., Furukawa, K., Barger, S.W., Rengen, M.R., Mark, R.J., Blanc, E.M., Roth, G.S., Mattson, M.P., 1996. Amyloid β-peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 6753–6758.

Kihara, T., Shimohama, S., Sawaa, H., Kimura, J., Kume, T., Kochiyama, H., Maeda, T., Akaike, A., 1997. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against β-amyloid toxicity. Ann. Neurol. 42, 159–163.

Klingner, M., Apelt, J., Kumar, A., Sorger, D., Sabri, O., Steinbach, J., Scheunemann, M., Schliebs, R., 2003. Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with β-amyloid plaque pathology. Int. J. Dev. Neurosci. 21, 357–369.

Koelle, G.B., Friendenwald, J.S., 1949. A histochemical method for localizing cholinesterase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70, 617–622.

Kuhl, D.E., Koeppe, R.A., Minoshima, S., Snyder, S.E., Ficaro, E.P., Foster, N.L., Frey, K.A., Kilbourn, M.R., 1999. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. Neurology 52, 691–699.

Kurt, M.A., Davies, D.C., Kidd, M., Duff, K., Rolph, S.C., Jennings, K.H., Howlett, D.R., 2001. Neurodegenerative changes associated with β-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. Exp. Neurol. 171, 59–71.

Lalonde, R., Jazi, R., Strazielle, C., 2006. Neurobehavioral characteristics of presenilin transgenic mice. In: Sun, M.-K. (Ed.), Cognitive Sciences, vol. 1. pp. 169–204.

Lalonde, R., Qian, S., Strazielle, C., 2003. Transgenic mice expressing the *PS1*-A246E mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination. Behav. Brain Res. 138, 71–79.

Leutner, S., Czech, C., Schindowski, K., Touchet, N., Eckert, A., Müller, W.E., 2000. Reduced antioxidant enzyme activity in brains of mice transgenic for human *presenilin-1* with single or multiple mutations. Neurosci. Lett. 292, 87–90.

Liskowsky, W., Schliebs, R., 2006. Muscarinic acetylcholine receptor inhibition in transgenic Alzheimer-like Tg2576 mice by scopolamine favours the amyloidogenic route of processing of amyloid precursor protein. Int. J. Dev. Neurosci. 24, 149–156.

Lyness, S.A., Zarow, C., Chui, H.C., 2003. Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer's disease: a meta-analysis. Neurobiol. Aging 24, 1–23.

Mattson, M.P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., Rydel, R.E., 1992. β-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. J. Neurosci. 12, 276–389.

Mattson, M.P., Guo, Q., 1997. Cell and molecular neurobiology of presenilins: A role for the endoplasmic reticulum in the pathogenesis of Alzheimer's disease? J. Neurosci. Res. 50, 505–513.

Mattson, M.P., Pedersen, W.A., 1998. Effects of amyloid precursor protein derivatives and oxidative stress on basal forebrain cholinergic systems in Alzheimer's disease. Int. J. Dev. Neurosci. 16, 737–753.

Melo, J.B., Agosinho, P., Oliveira, C.R., 2003. Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by beta-peptide. Neurosci. Res. 45, 117–127.

Mesulam, M.M., 2004. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? Learn. Memory 11, 43–49.

Mesulam, M.M., Geula, C., 1988. Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: observations based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. J. Comp. Neurol. 275, 216–240.

Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H., Levey, A.I., 1983. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on the alternative nomenclature (Ch1-Ch6). Neuroscience 10, 1185–1201.

Moran, M.A., Mufson, E.J., Gomez-Ramos, P., 1993. Colocalization of cholinesterases with β-amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. Acta Neuropathol. 85, 362–369.

Morris, J.C., 2002. Challenging assumptions about Alzheimer's disease: mild cognitive impairment and the cholinergic hypothesis. Ann. Neurol. 51, 143–144.

Parent, A., Linden, D.J., Sisodia, S.S., Borchelt, D.R., 1999. Synaptic transmission and hippocampal long-term potentiation in transgenic mice expressing FAD-linked *presenilin 1*. Neurobiol. Dis. 6, 56–62.

Paxinos, G., Watson, C., 1986. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego.

Pedersen, W.A., Guo, Q., Hartman, B.K., Mattson, M.P., 1997. Nerve growth factor-independent reduction in choline acetyltransferase activity in PC12 cells expressing mutant presenilin-1. J. Biol. Chem. 272, 22397–22400.

Price, D.L., Sisodia, S.S., 1998. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. Annu. Rev. Neurosci. 21, 479–505.

Qian, S., Jiang, P., Guan, X.-M., Singh, G., Trumbauer, M.E., Yu, H., Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H.T., Zheng, H., 1998. Mutant human presenilin-1 protects *presenilin 1* null mouse against embryonic lethality and elevates Aβ1-42/43 production. Neuron 20, 611–617.

Ramirez, M.J., Heslop, K.E., Francis, P.T., Rattray, M., 2001. Expression of amyloid precursor protein, tau and presenilin RNAs in rat hippocampus following deafferentation lesions. Brain Res. 907, 222–232.

Reader, T.A., Strazielle, C., 1999. Quantitative autoradiography of monoamine uptake sites and receptors in rat and mouse brain. In: Boulton, A.A., Baker, G.B., Bateson, A.N. (Eds.), Neuromethods, Cell Neurobiology Techniques, vol. 33. Humana Press, Totowa, pp. 1–51.

De Sarno, P., Lesort, M., Bijur, G.N., Johnson, G.V.W., Jope, R.S., 2001. Cholinergic- and stress-induced signaling activities in cells overexpression wild-type and mutant presenilin-1. Brain Res. 903, 226–230.

Sberna, G., Saez-Valero, J., Li, Q.X., Czech, C., Beyreuther, K., Masters, C.L., McLean, C.A., Small, D.H., 1998. Acetylcholinesterase is increased in the brains of transgenic mice expressing the C-terminal fragment (CT100) of the β-amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. J. Neurochem. 71, 723–731.

Sberna, G., Saez-Valero, J., Beyreuther, K., Masters, C.L., Small, D.H., 1997. The β-amyloid protein of Alzheimer's disease increases acetylcholinesterase expression by increasing intracellular calcium in embryonal carcinoma P19 cells. J. Neurochem. 69, 1177–1184.

Schliebs, R., Arendt, T., 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. J. Neural Transm. 113, 1625–1644.

Schmued, L.C., Hopkins, K.J., 2000. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. Brain Res. 874, 123–130.

Segal, M., Greenberger, V., Israeli, M., Biegon, A., 1988. A correlation between regional acetylcholinesterase activity in rat brain and performance in a spatial task. Behav. Brain Res. 30, 215–219.

Seo, H., Ferree, A.W., Isacson, O., 2002. Cortico-hippocampal APP and NGF levels are dynamically altered by cholinergic muscarinic antagonist or M1 agonist treatment in normal mice. Eur. J. Neurosci. 15, 498–505.

Shen, J., Bronson, R.T., Chen, D.F., Xia, W., Selkoe, D.J., Tonegawa, S., 1997. Skeletal and CNS defects in presenilin-1 deficient mice. Cell 89, 629–639.

Shinotoh, H., Namba, H., Fukushi, K., Nagatsuka, S., Tanaka, N., Aotsuka, A., Ota, T., Tanada, S., Irie, T., 2000. Progressive loss of cortical acetylcholinesterase activity in association with decline in Alzheimer's disease: a positron emission tomography study. Ann. Neurol. 48, 194–200.

Silveyra, M.-X., Evin, G., Montenegro, M.-F., Vidal, C.J., Martínez, S., Culvenor, J.G., Sáez-Valero, J., 2008. Presenilin 1 interacts with acetylcholinesterase and alters its enzymatic activity and glycosylation. Mol. Cell. Biol. 28, 2908–2919.

Szot, P., White, S.S., Greenup, J.L., Leverenz, J.B., Peskind, E.R., Raskind, M.A., 2006. Compensatory changes in the noradrenergic nervous system in the locus ceruleus and hippocampus of postmortem subjects with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. J. Neurosci. 26, 467–478.

Talesa, V.N., 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. Mech. Ageing Dev. 122, 1961–1969.

Wevers, A., Burghaus, L., Moser, N., Witter, B., Steinlein, O.K., Schütz, U., Achnitz, B., Krempel, U., Nowacki, S., Pilz, K., Stoodt, J., Lindstrom, J., De Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., Schröder, H., 2000. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease: postmortem investigations and experimental approaches. Behav. Brain Res. 113, 207–215.

Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T., Delon, M.R., 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. Science 215, 1237–1239.

Wittenburg, N., Eimerer, S., Lakowski, B., Röhrig, S., Rudolph, C., Baumeister, R., 2000. Presenilin is required for proper morphology and function of neurons in *c.elegans*. Nature 406, 306–309.

Wong, T.P., Debeir, T., Duff, K., Cuello, A.C., 1999. Reorganization of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus in transgenic mice carrying mutated *presenilin-1* and *amyloid precursor protein* transgenes. J. Neurosci. 19, 2706–2716.

Wright, C.I., Geula, C., Mesulam, M.M., 1993. Neuroglial cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. Ann. Neurol. 34, 373–384.

Zweig, R.M., Cardillo, J.E., Cohen, M., Giere, S., Hedreen, J.C., 1993. The locus ceruleus and dementia in Parkinson's disease. Neurology 43, 986–991.

II.2.3. Synthèse de la publication

De nombreuses régions de l'encéphale présentent des modifications de l'activité enzymatique de l'AChE chez les souris *PS1*-A246E. Ainsi, l'atteinte cholinergique apparait très précocement avant toute déficience cognitive et pour des quantités d'Aβ modérées puisque l'augmentation du taux d'Aβ n'excède pas 120% par rapport au taux obtenu dans la population des souris contrôles.

Cependant, alors que la MA se caractérise par une perte de l'innervation cholinergique au niveau de cerveau antérieur et par conséquent une baisse du taux d'acétylcholine et de ses enzymes (AChT et AChE), nous obtenons une hyperactivité enzymatique dans toutes les régions altérées. Ces altérations concernent l'ensemble des structures cérébrales antérieures, certaines étant liées entre elles dans des circuits neuronaux qui régulent et contrôlent la spatialité :

- les noyaux cholinergiques du complexe nucléaire basal, plus particulièrement la substance inominée ou noyau de Meynert à projection corticale et le septum median impliqué dans la voie septo-hippocampique; mais les noyaux postérieurs (noyau pedonculopontique du tegmentum) à projection prédominante thalamique ont également une hyperactivité.
- les aires néocorticales et plus précisément les aires associatives,
- les ganglions de la base, l'hyperactivité étant présente dans les deux compartiments structuro-fonctionnels moteur et limbique,
- le thalamus, essentiellement dans les noyaux diffus responsables de l'activation cérébrale et thalamique,
- le système limbique, toutes les régions de la formation hippocampique ayant une augmentation de l'activité AChE ainsi que le septum et certains noyaux du complexe amygdalien.
- Une atteinte modérée est présente dans le tronc cérébral affectant le locus coeruleus, structure noradrenergique impliqué dans le contrôle du système nerveux végétatif et le noyau prepositus dans la circulation sanguine.

Le lien entre l'AChE et le peptide Aβ, évident autour des plaques neuritiques ne semble pas exister de façon strict et direct dans notre modèle. En effet, une augmentation de marquage de l'AChE a été observée dans les régions riches en peptide Aβ mais aussi dans des régions qui ne sont pas chargées en peptide.

Au vu de la littérature, cette hyperinnervation cholinergique semble traduire plutôt un phénomène compensatoire en réaction à une altération synaptique ou une perte d'innervation cholinergique des structures observées. Le phénomène de bourgeonnement peut également être induit par des facteurs trophiques dont le rôle est le maintien de la fonction cholinergique et la préservation des fonctions cognitives.

3EME PARTIE

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE de la MUTATION *PS1*-I213T

Etude neurochimique et neuropathologique

III.1. Publication N°3

CHOLINERGIC ALTERATION IN THE THALAMUS OF PS1 KNOCKIN MICE WITH THE JAPANESE I213T MUTATION,

Rozat JAZI, Robert LALONDE, Gregory RAUX and Catherine STRAZIELLE

Publication soumise pour la revue Alzheimer's & Dementia

III.1.1. L'objectif de cette étude :

La transmission cholinergique est l'une des principales fonctions altérées au cours de la MA, elle est en grande partie responsable de l'atteinte de la mémoire et de l'apprentissage.

Cette étude a pour objectif d'évaluer les modifications de la fonction cholinergique liée à la mutation *PS1*-I213T chez les souris KI âgées de 11 mois par comparaison avec des souris contrôles normales.

L'activité enzymatique de l'AChE, révélée par histochimie, est utilisée pour marquer l'innervation cholinergique dans le système nerveux central. Ce marqueur permet d'obtenir une cartographie quantitative détaillée de toutes les structures cérébrales et ainsi d'appréhender l'ensemble du système cholinergique ascendant d'activation du cortex cérébral.

L'objectif de cette étude est :

La recherche éventuelle d'une atteinte précoce du système cholinergique dans les différentes régions du système nerveux central pouvant être responsable des caractéristiques phénotypiques comportementales observées chez ces souris.

III.1.2. Manuscrit

Abstract

Impairments in the cholinergic system are prevalent already in early stage of Alzheimer's disease. But it is still unclear whether the first signs of cognitive decline are associated with decreased function of this neurotransmitter. In the present investigation, cholinergic innervation was determined by acetylcholinesterase (AChE) histochemistry in knockin mice with a *PS1*-I213T mutation with elevated $A\beta_{42}$ concentrations without amyloidosis or cell degeneration and a mild spatial learning defect. The major enzymatic alteration occurred in the thalamus, the hippocampus and related structures being spared. By comparison to wild-type controls, *PS1*/I213T KI mice showed downregulation of AChE activity specifically in nuclei of the non-specific thalamus (midline and intralaminar nuclei) and of the limbic thalamus (mediodorsal, lateral, and posterior nuclei), both crucially involved in arousal and selective attention, contributing to information processing at cognitive and sensory levels during learning. The results support the concept that early cholinergic impairment affects subcortical regions and that the thalamus may be a relevant structure in early physiopathological events of Alzheimer's disease.

1. Introduction

Aβ pathology and impaired cholinergic transmission (Davies and Maloney, 1976; Whitehouse et al., 1982) in association with cognitive and behavioral disturbances (Baskin et al., 1999; DeKosky et al., 1992; Bierer et al., 1995) characterize Alzheimer's disease (AD). The neocortex and hippocampus are often preferentially affected, presenting reduced activities of choline acetyl-transferase (ChAT; Coyle et al., 1983; DeKosky et al., 1992), and acetylcholinesterase (AChE), the latter more specifically in its enzymatic tetrameric G4 form (Atack et al., 1983; Kuhl et al., 1999; Blusztajn and Berse, 2000; Shinotoh et al., 2000), as well as losses in cholinergic receptors (Wevers et al., 2000). According to some, cortical cholinergic synaptic depletion and deafferentation occur early, independently of basal forebrain degeneration observable in late stages of the disease (Mufson et al., 1987; Lyness et al., 2003; Herholtz et al., 2004). However, the chronological order of cholinergic physiopathology remains uncertain. Early cholinergic dysfunction might occur without necessarily being linked with cognitive disturbances (Shinotoh et al., 2000; Mesulam, 2004). In contrast, cholinergic enzymatic activity increased in specific brain regions of patients with mild cognitive impairment (DeKosky et al., 2002; Morris, 2002; Herholtz et al., 2004) as well as in animal models of Down's syndrome (Contestabile et al., 2006) or of pre-plaque AD (Dumont et al., 2005).

Mutations in *PS1* encoding presenilin-*1* are responsible for the majority of early-onset cases of autosomal dominant AD (Campion et al., 1999). *PS1* animal models mimick preclinical and early stages of amyloid pathology, including elevated $Aß_{42}$ levels without amyloidosis but with mild cellular and spatial learning defects (Janus et al., 2000; Lalonde et al., 2006; Sun et al., 2005). While mutated *PS1* caused nontoxic suppression of the cholinergic phenotype in the form of reduced ChAT activity in rat PC12 cells (Pedersen et al., 1997), transgenic mice overexpressing *PS1*-A246E displayed AChE hyperactivity in numerous forebrain regions, including hippocampus, neocortex, and striatum (Jazi et al., 2009). In the present study, *PS1* knockin mice with the Japanese I213T mutation were used with similar elevated $Aß_{42}$ levels (Nakano et al., 1999). We examined cholinergic alterations by histochemical analyses of AChE activity in the form of a brain cartography, permitting the exploration of key structures in AD, not only in neocortex and hippocampus but also in subcortical regions susceptible to contribute to its symptomatology.

2. Material and methods

2.1. Animals

The missense I213T point mutation was inserted into exon 7 of the *PS1* gene (Nakano et al., 1999). Breeder pairs obtained from Osaka University were mated at the University of Rouen. Eleven-month-old *PS1*/I213T KI mice (n=21) and age- and sex-matched wild-type controls (n=11) of the same hybrid B6x129/SvJ background were evaluated in motor and spatial tests (Lalonde and Strazielle, 2005) before histochemical assessment performed at the University of Nancy. The genotype of each animal was determined by a multiplex PCR assay of DNA obtained from tail biopsies. All procedures adhered with recommendations established by the European Community Council for the Ethical Treatment of Animals (86/609/EEC), NIH guidelines, and local animal welfare regulations at each university.

2.2. Tissue preparation

The mice were killed by decapitation one day after behavioral testing. The brains were rapidly removed, frozen in *N*-methylbutane cooled at –40°C, and stored at –80°C. The brains were serially cut with a cryostat into 20 μm-thick coronal sections, mounted on gelatin-chrome alum-coated slides, and conserved at -80°C until processing. For each series, the entire brain could be observed on two slides, with serial sections separated by 250-350 μm.

2.3. AChE histochemistry

All chemical products used in histochemical and biochemical experiments were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Compagny (Saint Quentin Fallavier, France), except for ambenomium, obtained from Tocris (Illkirch, France).

Acetylcholinesterase histochemistry was performed on a series of dual sections from each mouse brain with several complete sets of standards according to a protocol first presented by Koelle and Friedenwald (1949) and described in further detail by Paxinos and Watson (1986). Sections were incubated overnight (15 hours) at room temperature in a 50 mM acetate buffer solution (pH 5.0) with 4 mM copper sulfate and 16 mM glycine, together with 3 mg ethopropazine for inhibiting unspecific cholinesterases and 116 mg S-acetylthiocholine iodide per 100 ml. After three washes in distilled water, incubation in a 1% sodium sulfide solution (pH 7.5) for 10 min revealed the staining. The slides were then rinsed with distilled water, fixed in a 10% formalin bath for 30 min, rinsed a second time with distilled water, dehydrated

with ethanol and xylene, and mounted with Eukitt. Validation of the method was assured by absence of the AChE reaction product when the substrate was removed from the incubation medium, or when 50 μM ambenomium, a potent AChE inhibitor, was added, confirming the specificity of AChE labelling (Dumont et al., 2006).

Standards for AChE activity were prepared in cylindrical microtubes filled by whole brain homogenates, frozen and kept at a temperature of -80°C until cut into 10, 20, 30, and 40 μm-thick sections at the same time as the brain sections. Under our experimental conditions, staining intensity was linearly proportional to the thickness of the standard sections (r=+0.997). The specific AChE activity of these homogenates was measured by spectrophotometry with the colorimetric method of Ellman et al. (1961) modified by Dumont et al. (2006). The specific AChE activity was 13.0 ± 0.66 μmol/min/g of tissue (mean ± SD, n=8) and remained constant in -80°C frozen standards for several months.

2.4. Densitometric analyses

Mapping of brain AChE activity was assessed by densitometry on a MCID™ computer-assisted image analysis system (Cambridge, UK), with optical density readings converted by means of standards into enzymatic activity values expressed in μmol/min/g of tissue. Anatomical structures were defined according to the Franklin and Paxinos mouse atlas (1997). Multiple optical density readings (10-50 samples at 20X magnification) were taken of labelled regions by a single experienced operator under blinded conditions. To obtain an homogeneous evaluation, measures with the same surface area were obtained for every site and animal (Reader and Strazielle, 1999) and each structure was evaluated on a single or preferably multiple sections, depending of the extent of its surface, to obtain an average measure of labelling density.

2.5. Statistical analyses

To take into account a high number of comparisons, a two-way repeated ANOVA was used to compare mean group differences at an α level of P = 0.05. Comparisons were performed among the constitutive subregions of each structure or among regions of a functional brain circuitry. The unpaired-t test, with a criterion set at P = 0.01, was then used for individual group comparisons in those brain regions with significant ANOVAs.

2.6. Neuropathological detection

For each animal, section slides adjacent to those labelled for AChE histochemistry were simultaneously stained with a 0.5% cresyl violet solution for precise delimitation of subregions and for assessment of possible brain atrophy inherent to the *PS1*/I213T mutation. Neuronal degeneration in forebrain cholinergic regions was detected on a new series of sections from each brain by using Fluoro-Jade B, according to the protocol described by Schmued and Hopkins (2000). The slides were evaluated under fluorescent (FITC) microscopy (Olympus AX70, France) for the detection of fluorescent yellow-green cells, labelling dying neurons.

3. Results

The distribution of AChE activity was heterogenous, with intergroup comparisons indicating alterations in very specific brain regions. In the thalamus, among the mosaic of staining patterns mostly associated with the neuropil, the medial nuclear mass was the most strongly labelled (Table 1). There was a gene x brain region interaction in that region ($F_{1,24}$=2.0; $P < 0.01$), attributed to diminished AChE activity in mediodorsal (t_{30}=5.3; $P < 0.0001$), paraventricular (t_{29}=2.8; $P < 0.01$), intralaminar (t_{29}=5.1; $P < 0.0001$), midline (t_{30}=3.5; $P < 0.01$), laterodorsal (t_{30}=7.4; $P < 0.0001$), and posterior (t_{29}=3.6; $P < 0.001$) nuclei. In an opposite manner to thalamic subregions, AChE activity was 6% higher in temporo-parietal cortices, as revealed by a group effect ($F_{1,27}$=2.9; $P < 0.01$), affecting two areas : insular (11.3 $\pm$ 0.2 and 12.1 $\pm$ 0.1 for control and mutants, respectively, t_{29}=4.4; $P < 0.001$) and piriform (10.9 $\pm$ 0.1 and 11.6 $\pm$ 0.1 for control and mutants, respectively, t_{29}=4.0; $P < 0.001$).

Other brain regions were unchanged (data not shown) in the *PS1*/I213T mutation, including prefrontal, frontal, cingulate, auditory, retrosplenial, entorhinal, and occipital cortices, five subregions (basal, medial, cortical, central and lateral) of amygdala complex, bed nucleus of stria terminalis, and different structures of the olfactory system as well as hippocampal formation and cerebellum. Similarly, enzymatic activity remained unchanged in basal ganglia and associated regions, hypothalamus, and in the four basal forebrain cholinergic regions. Among multiple brainstem regions, two reached significance, the dopaminergic system ($F_{1,25}$=5.78; $P < 0.05$) with 8% lower AChE activity in pars compacta of the substantia nigra (19.9 $\pm$

0.3 and 18.4 ± 0.3 for controls and mutants, respectively, t_{28}=3.13; P < 0.01) and the red nucleus, 14% lower in its parvocellular part (7.4 ± 0.2 and 6.4 ± 0.2 for controls and mutants, respectively, t_{28}=3.64; P < 0.01).

Gross examination of brain regions affected in enzymatic activity revealed no detectable atrophy in the thalamus or hippocampus (P > 0.05). Optical density readings indicated no altered cell density in thalamic subregions and the surface areas remained unchanged (P>0.05), though the latter evaluation was possible only for the entire thalamus and not in individual nuclei. Fluoro-Jade B staining, a marker of degenerating neuronal fibers and perikarya, revealed rare to weak fluorescent fibers in different nuclei of the mutant mice, whereas no such staining pattern was observed in controls, but no Fluoro-Jade B positive cells were observed in any brain region evaluated.

4. Discussion

Although ChAT-immunostaining is a more specific marker of cholinergic synapses, AChE labeling revealed by quantitative histochemistry on freshly frozen tissue, preferentially marking presynaptic processes, is suitable to estimate cholinergic innervation (Gil-Bea et al., 2005; Mesulam and Geula, 1988). Likewise, the use of AChE tracers provides functional brain mapping of cholinergic innnervation in human brain (Herholz et al., 2004; Shinotoh et al., 2000).

Cholinergic cartography was performed in *PS1*-I213T KI mice with 0.8 to 1.5 Aβ_{42} overexpression in various brain regions (data not shown) without amyloidosis, together with retarded water maze learning (Lalonde and Strazielle, 2005). Because of the hippocampus-dependent nature of this task, we anticipated cholinergic alterations in this region. But hippocampus and related structures were spared. Instead, the major enzymatic alteration occurred in the thalamus. Enzymatic activity decreased specifically in the so-called non-specific thalamic group (midline and intralaminar nuclei) as well as mediodorsal and lateral nuclei. These subregions are characterized by elevated AChE activity and crucially involved in arousal and selective attention, contributing to information processing at cognitive and sensory levels during learning (Groenewegen and Witter, 2004; Van der Werf et al., 2002). Considered as part of the limbic thalamus, they establish reciprocal connections with prefrontal cortex and visceral functions (Bentivoglio et al., 1993; Groenewegen and Witter, 2004). Selective lesions in the midline/intralaminar nuclear complex cause

deficient awareness and working memory rather than long-term memory (Burk and Mair, 2001). Laterodorsal and posterior nuclei, often considered as visual associative thalamus, play a role in head orientation and spatial navigation (Van Groen et al., 2002), and mediodorsal thalamic nuclei is implicated in spatial working memory (Hunt and Aggleton, 1998). However, no linear correlation was found between the decrease in thalamic AChE activity and water maze performance. Because long-term memory was unchanged (Lalonde and Strazielle, 2005), neurochemical alterations in these nuclei lead one to suggest that the memory impairment observed in the mutants is the result of a defect in attention rather than memory.

Previous studies in *APP* and *PS1* transgenic mice without Aß deposits showed upregulated cholinergic parameters (Dumont et al., 2006; Klingner et al., 2003; Sberna et al., 1998; Wong et al., 1999). A similar cholinergic cartography performed in *PS1*/A246 mouse brain revealed AChE hyperactivity in numerous regions, including anterior, midline, periventricular, and reticular thalamic nuclei, as well as cholinergic nuclei (Jazi et al., 2009). However, while *PS1*-I213T KI mice were deficient in spatial learning, *PS1*-A246E mutants were not (Lalonde et al., 2003). The two studies differed on the choice of controls, in the former wild-type mice and in the latter the human *PS1* transgene on a null background. However, histopathological features were very similar in the two mutations. The hypothesis that differences in behavioral and cholinergic phenotypes may be the result of different levels of soluble Aß overproduction affecting cholinergic fibers (Gonzalo-Ruis and Sanz, 2002; Melo et al., 2003) appears unlikely, because the models displayed equivalent levels, notably in thalamus (unpublished results) and were evaluated at approximately the same age (11 and 12 months). Unlike the previous model, the present mutant showed no sign of AChE hyperactivity in cholinergic nuclei. Because the thalamus receives a double cholinergic innervation from basal forebrain and pontomesencephalic pathways (Heckers et al., 1992), modulating inputs from brainstem to neocortex and hippocampus, reduced AChE activity may indicate a terminal cholinergic alteration from pontomesensephalic fibers involved in regulating arousal and consciousness, manifesting an intrinsic change such as a synaptic dysfunction (Bell and Cuello, 2006) or a loss of trophic factors (Fisher et al., 1991).

Because Alzheimer's disease causes degeneration of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) (Whitehouse et al., 1986), particularly the $\alpha 4\beta 2$ nAChR subtype (Perry et al., 1995; Schmaljohann et al., 2004), even in the pre-plaque stage (Perry et

al., 2000), AChE-nicotinic receptor co-regulation was suggested based on findings of strong correlations between enzymatic activity and high affinity nicotinic receptor binding in Alzheimer brain and transgenic mouse brain overexpressing *AchE* (Perry et al., 2000). It is notable that the AChE-rich thalamus (Okamura et al., 2007) is the region with the highest $\alpha 4\beta 2$ nAChR density (Schmaljohann et al., 2004). Our model may recapitulate this Alzheimer feature, all the more plausible since AChE activity was diminished in substantia nigra pars compacta, displaying high concentrations of nAChR binding on dopaminergic neurons postsynaptic to cholinergic input from the brainstem (Bolam et al., 1991).

Because of the absence in neuronal loss, neurochemical investigations in Alzheimer-like murine models often show more selective anomalies. The present cholinergic cartography performed on *PS1*-I213T KI mice reveals that, besides regions involved in Alzheimer's disease, the thalamus appears sensitive to early $A\beta_{42}$ overexproduction, a region implicated in cognitive processes, and therefore may represent a relevant region in its physiopathology, possibly in identifying the disease at the prodromic stage (Zakzanis et al., 2003). Precocious changes in metabolic hypoperfusion (Chételat et al., 2003) and gray matter loss were reported in thalamus of patients with Alzheimer's disease as well as mild cognitive impairment (Karas et al., 2004; Teipel et al., 2007). Although no global thalamic atrophy was found in *PS1*-I213T mice, our findings should encourage further investigations for a direct role played by this subcortical region in early dementia.

Références :

Les publications utilisées dans cet article ont été placées dans la section « références bibliographiques » correspondant aux références utilisées pour l'ensemble de notre travail.

Table 1. Acetylcholinesterase activity (means and S.E.M. in μmol/min/g of tissue) in thalamic regions of *PS1*/I213T knockin mice (n=20-21) and non-transgenic controls (n=10-11) and percentage changes for regions showing significant differences (magnification 20).

Regions	Controls	Knockin *PS1*/I213T	% difference
Thalamic nucleus			
- anterior	19.8 ± 0.4	19.3 ± 0.5	
- dorsomedial	10.2 ± 0.2	**9.2 ± 0.1 *****	- 10%
- periventricular	11.9 ± 0.2	**11.2 ± 0.1 ***	- 6%
- midline	12.5 ± 0.1	**11.8 ± 0.1 ***	- 6%
- intralaminar	16.3 ± 0.2	**14.8 ± 0.2 *****	- 9%
- reticular	6.7 ± 0.2	6.5 ± 0.2	
- laterodorsal	14.4 ± 0.1	**12.8 ± 0.1 *****	- 11%
- ventrolateral	3.5 ± 0.1	3.6 ± 0.1	
- ventromedian	5.0 ± 0.2	5.2 ± 0.1	
- vpl/vpm	4.4 ± 0.2	3.9 ± 0.1	
- posterior	5.3 ± 0.2	**4.2 ± 0.2 ***	- 21%
- lateral geniculate	10.5 ± 0.2	10.1 ± 0.2	
- medial geniculate	12.5 ± 0.2	12.4 ± 0.1	

* P < 0.01 vs controls; ** P < 0.001 vs controls

vpl/vpm : ventroposterolateral and ventroposteromedial thalamic nuclei.

III.1.3. Synthèse de la publication

Cette étude évalue la fonction cholinergique dans le système nerveux central. Au vu du retard d'apprentissage observé dans l'étude comportementale des souris *PS1*-I213T, nous suspections des changements d'activité AChE au niveau de l'hippocampe et des régions responsables de la mémoire et de l'apprentissage. Il se trouve qu'aucune de ces régions n'est affectée en dehors des cortex piriforme et de l'insula caractérisés par une faible hyperactivité enzymatique.

Par contre, une diminution d'activité enzymatique est observée dans le thalamus des souris *PS1*/I213T, plus spécifiquement dans ses noyaux limbiques (medio-dorsal, latéral et postérieur) et dans ses noyaux non spécifiques diffus (midline et intralaminaire) tous directement impliqués dans l'activation cérébrale et l'attention, dans la mémoire visuo-spatiale et la régulation des processus d'apprentissage. Conjointement, une diminution de l'activité AChE est observée dans la *pars compacta* de la substance noire, site des neurones dopaminergiques à l'origine de la voie nigro-striée et de l'innervation dopaminergique du cortex cérébral ainsi que dans le *neorubrum,* partie du noyau rouge en connexion avec le cortex cérébral.

La comparaison des résultats observés dans les noyaux thalamiques avec ceux obtenus dans des études lésionnelles suggère que la baisse d'activité AChE des souris *PS1*/I213T traduit plus un déficit d'attention qu'un défaut de mémorisation. L'absence de corrélation entre les variations histochimiques et le retard d'apprentissage évalué dans le test du labyrinthe aquatique corrobore cette hypothèse.

Le thalamus reçoit une double innervation cholinergique : 1) de la région basale antérieure (aire Ch4) pour une faible partie, et 2) majoritairement du complexe nucléaire pontomésencéphalique (région Ch5). L'hypoactivité de l'AChE pourrait être l'expression d'une altération des terminaisons et synapses des fibres cholinergiques provenant du tronc cérébral bien que les corps cellulaires ne révèlent aucune modification histologique ou histochimique. Par ailleurs, la MA est caractérisée par la perte des récepteurs cholinergiques nicotiniques et plus particulièrement des récepteurs $\alpha 4\beta 2$. Cette perte est précoce puisqu'elle est visible dans le stade précédant les plaques neuritiques. Le fait que le thalamus soit la région la plus riche

en récepteurs de ce type pourrait expliquer la vulnérabilité plus spécifique du thalamus dans ce modèle animal. Il est intéressant de noter que ces récepteurs sont également largement exprimés dans la *pars compacta* de la substance noire.

Les investigations cliniques en neuroimagerie ont rapporté des altérations thalamiques dans des stades pré-cliniques de la MA. Nos résultats montrent une vulnérabilité très précoce du thalamus. Ils confirment l'importance de cette structure sous-corticale très tôt dans la physiopathologie de la MA. Etant donné son rôle majeur dans l'activation cérébrale, une meilleure compréhension de ses atteintes neurochimiques pourrait servir à l'établissement d'un diagnostic et d'une stratégie thérapeutique précoces.

III.2. Les Etudes Annexes

III.2.1. Expression du peptide Aβ :

Une localisation régionale du peptide Aβ a été réalisée par un marquage immunohistochimique (anticorps 4G8) révélé en fluorescence pour déterminer les régions affectées par le peptide Aβ soluble dans le groupe des souris KI *PS1*-I213T, en comparaison avec les souris contrôles. Nous n'avons pas fait d'évaluation quantitative du marquage du peptide mais une simple observation visuelle à l'aide d'un microscope à fluorescence (Figures 1-a, b), un contrôle positif est fait au même temps en HRP. La revelation est faite au DAB pour confirmer le marquage en fluorescence.

Un marquage général caractérise les tissus cérébraux des deux groupes de souris épargnant toutefois les ganglions de la base et la majorité du tronc cérébral. Dans le groupe des souris *PS1*-I213T, une augmentation du peptide Aβ est observée dans plusieurs structures cérébrales :

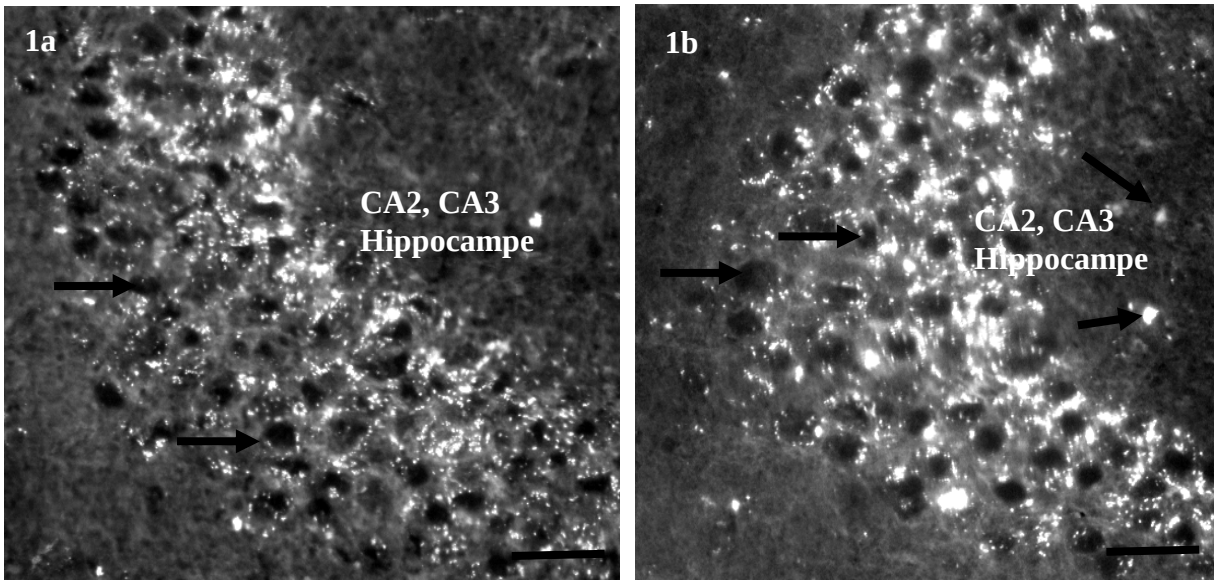
- l'ensemble des cortex cérébraux sauf le cortex de l'insula, le cortex prélimbique, le claustrum et les cortex visuels.
- les noyaux cholinergiques, et tout particulièrement le septum médian (Ch1) et la substance inominée (Ch4)
- l'hippocampe, dans les cellules pyramidales des régions CA1, CA2-CA3, dans la couche polymorphe du gyrus denté, ainsi que dans le subiculum.
- les noyaux de complexe amygdalien, particulièrement dans les noyaux basal, latéral et central
- le diencéphale, dans les noyaux limbiques et diffus du thalamus (dorsomédian, dorsolatéral, midline, periventriculaire, ventropostéromédian et ventropostérolatérale (VPM/VPL), ainsi que dans l'hypothalamus médian.
- le tronc cérébral, pour le complexe nucléaire vestibulaire, la réticulée gigantocellulaire et le noyau moteur de nerf facial.

La concentration du peptide soluble dans le broyat de cerveau de souris *PS1*-I213T homozygotes de 4-5 mois augmente d'un facteur de 0.85 par rapport aux souris contrôles (Nakano et al., 1999). Les souris de notre étude sont plus âgées (11 mois) et la concentration nous semble supérieure pour certaines des régions observées sans toutefois excéder un facteur de 2.

Légendes des figures

Figure 1(a, b) : marquage immunohistochimique en fluorescence du peptide Aβ dans les cellules pyramidales des régions CA2-CA3 de l'hippocampe chez les souris contrôles (1a) et chez les souris KI-I213T (1b). Un marquage intra et extracellulaire est obtenu.

Bar d'echelle = 200µm.



III.2.2. L’étude des bases oxydées d'ADN

Une étude des bases oxydées d'ADN, marqueur du vieillissement neuronal, a été réalisée par l'intermédiaire du marquage de la plus abondante des bases oxydées, la 8-oxo-7,8-dihydro-2’-deoxyguanosine (8-OHdG) révélée par immunohistochimie dans de nombreuses régions cérébrales reconnues pour leur vulnérabilité au stress oxydant et leur implication dans la MA.

Une estimation quantitative du nombre de cellules marquées (valeur supérieure à une valeur seuil définie) a été effectuée dans les deux groupes de souris contrôles et génétiquement modifiés. Les résultats, présentés ici sous la forme d'histogrammes (Figure 3) montrent un marquage présent dans les deux groupes de souris, mais plus important dans certaines régions du groupe des souris *PS1*-I213T.

Une augmentation significative du marquage de la 8-OHdG est observée dans les cortex cérébraux des souris KI, plus précisément le cingulaire antérieur (+110%), les moteurs primaire et secondaire (+153% pour M1, +216% pour M2, respectivement) (Figure 2), le piriforme (+141%), l'entorhinal latéral (+141%) et le claustrum (+107%). Par contre, les analyses effectuées dans les autres cortex étudiés (cortex visuel, orbitofrontal, insulaire, dans sa partie agranulaire, et retrosplenial), ne montrent aucune différence significative de marquage entre les deux groupes de souris. Les noyaux cholinergiques présentent une augmentation du taux de marquage de la 8-OHdG dans le noyau vertical de la bandelette diagonale (Ch2; +100%) et dans le noyau cholinergique pédonculopontique du tegmentum (Ch5; +125%). Parmi les régions du système limbique, la couche des cellules pyramidales de CA2-CA3 de l’hippocampe, les noyaux du complexe amygdalien et le septum latéral présentent un taux plus important de ces bases dans le groupe des souris KI (+107%, 109% et 110%, respectivement). Les marquages n'épargnent pas le tronc cérébral qui présente une augmentation significative de la quantité de cellules marquées dans le colliculus supérieur (+164.7%) et le noyau pontique médian de la formation réticulée (+90.5%).

Ainsi, le dommage oxydatif est présent précocement dans le groupe des souris *PS1*-I213T et affecte des régions très diverses parmi lesquelles certaines, limbiques, corticales et sous-corticales sont impliquées dans la MA.

Légende des figures :

Figure 2 (a, b) : un marquage immunohistochimique des bases 8-OHdG dans l'hippocampe chez les souris KI-I213T (2a), et un marquage intracellulaire plus intense dans les cellules pyramidales de la couche CA2, CA3 de l'hippocampe(2b).
Bar d'echelle, (1a)= 200µm, (Ab)= 100 µm.

Figure 3 : Histogrammes illustrant le taux de marquage immunohistochimique de 8-OHdG chez les souris contrôles et génétiquement modifiées, et la différence significative de marquage entre les deux souris (indiquée par * pour $p<0.05$).
Le premier histogramme montre les résultats obtenus dans les différents cortex étudiés : cingulaire antérieur (Cg), moteur primaire (M1), moteur secondaire (M2), pariétal postérieur (PPtA), entorhinal latéral (Lent), retrosplenial (RS), orbitofrontal (OFr) et claustrum (Cl).
Le deuxième histogramme présente les résultats dans : 1) les différents noyaux cholinergiques, la substance inominée (SI), le septum médian (MS), le noyau pedonculopontique du tegmentum (PPTg), et 2) les cellules pyramidales des régions CA1 (Py), et CA2-CA3 (Py) de l'hippocampe.
Le troisième histogramme présente les résultats dans : 1) certains noyaux du système limbique, le septum latéral (LS), le subiculum (S), le complexe amygdalien (A), 2) le noyau midline du thalamus (Mi thal) et 3) dans certains noyaux du tronc cérébral comme le colliculus supérieur (Su), le locus coeruleus (LC), le cervelet (Cb) et les noyaux du pont (Pn).

Figure 2

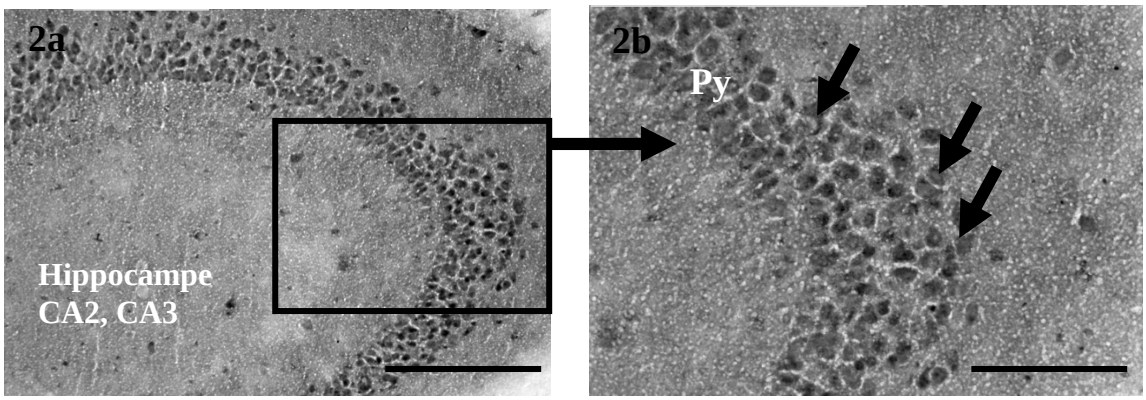
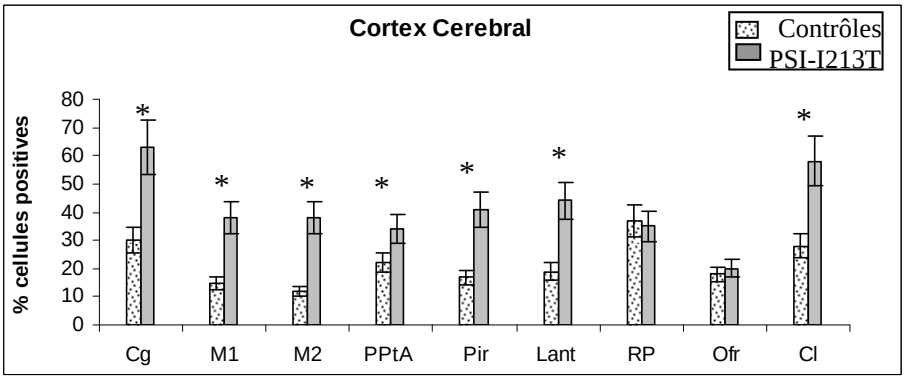
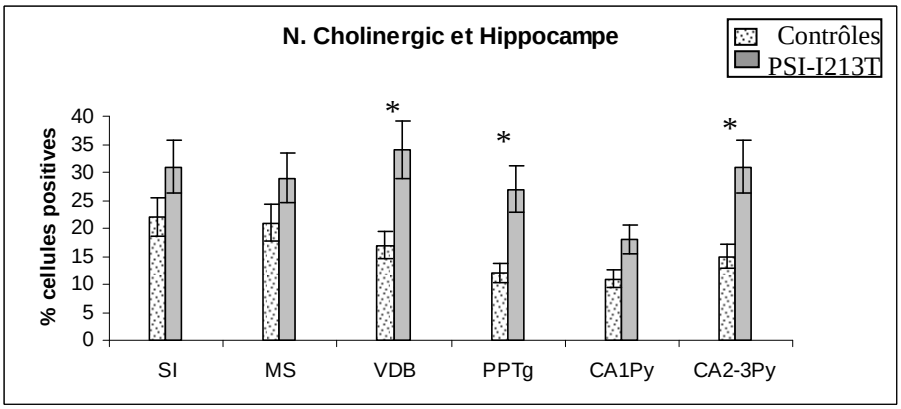
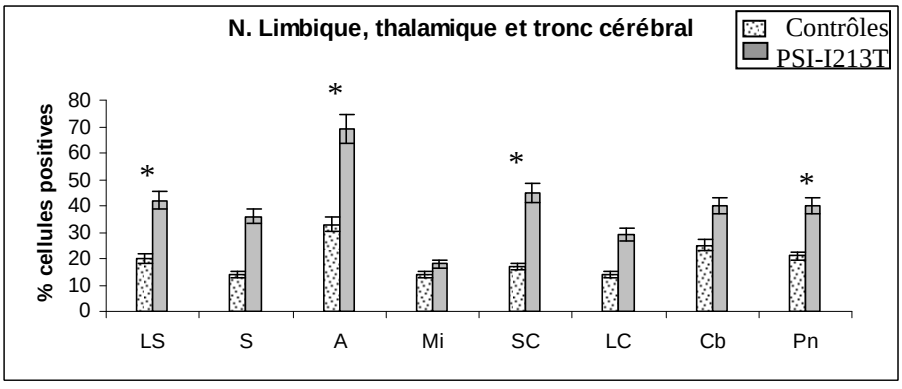


Figure 3







III.2.3. l’étude métabolique régionale

Une cartographique régionale de l'activité de la COX a été effectuée afin d’évaluer la fonction métabolique régionale chez les souris exprimant la mutation *PS1*-I213T, et tester le lien éventuel entre les altérations métaboliques et la surexpression du peptide Aβ-42 qui caractérise cette mutation.

Le protocole histochimique de révélation de l'activité de la COX permet une évaluation quantitative comparative des deux groupes de souris. Nous avons été surprise de constater, après comparaison des souris *PS1*-I213T avec celles du groupe contrôle, que les altérations métaboliques sont peu nombreuses et intéressent des régions très spécifiques du système nerveux central (Tableau 1).

Dans ces souris *PS1*-I213T, les résultats montrent une augmentation d'activité de la COX dans la substance inominée (t_{26}=3.04, *P*<0.01), et au niveau de la couche moléculaire de CA2-CA3 de l’hippocampe (t_{25}=6.07, *P*<0.001). A l'opposé, une diminution de l’activité de cette enzyme reflétant un hypométabolisme est observée au niveau des noyaux thalamiques ventrolatéral et ventromédian (t_{26}=3.44, *P*<0.01). Une diminution de l’activité de COX est également observée au niveau des noyaux de tronc cérébral, plus spécifiquement dans la réticulée pontique orale (t_{26}=2.67, *P*<0.01), dans le noyau cunéiforme latéral (t_{26}=2.71, *P*<0.01) et enfin dans *la pars compacta* de la substance noire (t_{26}=2.89, *P*<0.01).

L'analyse statistique n'a révélé aucune corrélation entre ces résultats neurochimiques et les performances neurocomportementales observées sur ces mêmes souris (Lalonde et Strazielle, 2005).

L'équivalent d'amas neurofibrillaires (inclusions de protéine Tau hyperphosphorylée) a été décrit dans cette mutation dès l'âge de 2 mois, plus spécifiquement dans les cellules de la région CA3 de l'hippocampe (Tanemura et al., 2006). Nous n'avons pas cherché à marquer ces lésions neuropathologiques. Toutefois, un marquage au Fluoro-jade B, marqueur des neurones en voie de dégénérescence, des plaques neuritiques et de la gliose, est effectué parallèlement. Il ne révèle aucune gliose, lésion dégénérative ou neuropathologique, même dans la région CA2-CA3 de l'hippocampe.

Tableau 1. Activité de la cytochrome oxydase (moyennes et S.E.M. en μmol/ (min x g de tissu) dans certaines régions cérébrales des souris *PS1*-I213T (n=15-21) et contrôles (n=8-10) et pourcentage de variation pour les régions montrant des différences significatives.

Régions	Contrôles	*PS1*-I213T
Cortex		
- cingulaire	33.9 ± 0.5	34.0 ± 0.6
- orbitofrontal	30.2 ± 0.6	28.8 ± 0.3
- prélimbique	31.4 ± 1.3	31.4 ± 0.6
- retrosplenial	45.9 ± 0.5	43.9 ± 0.4
- insulaire	29.9 ± 0.9	28.1 ± 0.5
- moteur secondaire(M2)	32.5 ± 0.5	31.2 ± 0.5
- moteur primaire(M1)	31.5 ± 0.6	31.3 ± 0.6
- somatosensoriel (S1)	30.9 ± 0.5	30.5 ± 0.6
- piriform	33.7 ± 0.8	29.8 ± 0.6
- entorhinal latéral	40.4 ± 1.0	40.5 ± 0.8
- visuel primaire	45.2 ± 0.7	44.2 ± 0.6
-visuel associatif (med)	46.2 ± 0.7	45.3 ± 0.4
-visuel associatif (lat)	44.5 ± 1.2	42.9 ± 0.6
Aires cholinergiques antérieures		
-septum médian (Ch1)	26.3 ± 0.7	27.5 ± 0.7
-bande diagonale verticale (Ch2)	30.2 ± 0.5	29.9 ± 0.6
-bande diagonale, horizontal (Ch3)	29.0 ± 0.5	28.9 ± 0.3
-substance inominée (Ch4)	19.9 ± 0.5	**22.2 ± 0.4*(+11.4%)**
Régions limbiques		
-amygdale baso-latérale	29.1 ± 0.6	29.0 ± 0.6
-amygdale cortico-médiale	28.8 ± 0.7	28.9 ± 0.5
Hippocampe		
-CA1 couche pyramidale	39.9 ± 0.6	39.6 ± 0.7
-CA1 couche moléculaire	49.3 ± 1.0	48.2 ± 0.7
-CA2,CA3 couche pyramidale	39.6 ± 0.5	39.7 ± 0.7
-CA2,CA3 couche moléculaire	39.8 ± 0.6	**47.2 ± 0.7**(+18.6%)**
Thalamus		
-noyau ventro-médial	45.1 ± 0.5	**41.8 ± 0.6* (-7.3%)**
-noyau ventro-latéral	47.9 ± 0.9	**44.5 ± 0.8*(-7.3%)**
Tronc cérébral		
-substance noire	44.3 ± 1.0	**40.8 ± 0.7*(-7.9%)**
-noyau cunéiforme latéral	39.5 ± 0.5	**36.9 ± 0.6*(-6.3%)**
-réticulé pontique orale	37.6 ± 0.8	**35.2 ± 0.5* (-6.5%)**

P < 0.01; ****** P < 0.001

L’activité de la COX, marqueur du métabolisme neuronal est principalement le reflet de l'activité des synapses et majoritairement des synapses activatrices dépendantes du glutamate (Wong-Riley, 1989; Zhang and Wong-Riley, 1999).

La mutation *PS1*-I213T affecte peu l'activité de la COX, intéressant des structures dont les rôles sont variables. Par ailleurs, au vu des résultats, il n'existe aucune homogénéité entre la distribution régionale du peptide Aβ, le dommage oxydatif révélé par la 8-OHdG et l'altération métabolique, soulignant ainsi l'absence d'un lien simple et direct entre le peptide Aβ et le métabolisme neuronal.

Les structures présentant une baisse d'activité métabolique font partie des boucles de contrôle et de régulation du système sensori-moteur et particulièrement impliquées dans des connexions avec le cervelet excepté pour la substance noire. Celle-ci, pour sa partie compacte, est le principal fournisseur des fibres dopaminergiques du système d'activation ascendant et le régulateur indispensable de l'activité fonctionnelle du néostriatum. Une baisse d'activité métabolique signe généralement une souffrance cellulaire mais celle-ci ne semble pas le reflet d'une quelconque lésion structurale à ce stade. Par ailleurs, les souris *PS1*-I213T présentaient une force d'agrippement plus importante dans le test du SHIRPA, démontrant une force musculaire plus importante.

A l'opposé, l'hyperactivité de la COX, observée dans le groupe des souris KI, intéresse deux régions directement impliquées dans la MA. La modification de l'activité métabolique observée dans la couche moléculaire de la région CA2-CA3 de l’hippocampe pourrait être la conséquence locale de la surexpression du peptide $A\beta_{42}$ mais surtout de la présence de protéine tau hyperphosphorylée perturbant le cytosquelette des cellules pyramidales et affectant ainsi l'activité des terminaisons neuronales (Tanemura et al., 2006). Elle peut également, à l'instar de la substance inominée, refléter une activation compensatoire nécessaire pour pallier le déficit dans le processus de mémorisation.

Une hyperactivité de la COX est également observée dans la substance inominée (Ch4), équivalent au noyau de Meynert des Primates. L'étude de l'innervation cholinergique n'a montré aucune altération de la fonction cholinergique dans ce noyau, et très peu dans les cortex-cibles. Cette activation très spécifique peut signer la vulnérabilité de la région dans la MA mais également l'importance des phénomènes compensatoires, neurotrophiques ou autres (Arendt, 1993; Connor et al., 1997).

4EME PARTIE

DISCUSSION GENERALE

Notre travail a consisté à étudier le métabolisme énergétique et l'innervation cholinergique dans une forme familiale de la maladie d'Alzheimer causée par des mutations du gène présiniline1 (*PS1*), sachant que celles-ci conduisent à une forme agressive et précoce de la maladie.

Pour les deux mutations *PS1*-A246E (Qian et al., 1998) et *PS1*-I213T (Nakano et al., 1999) que nous avons expertisées, nous disposions de souris adultes âgées de 11 mois, âge pour lequel le facteur du vieillissement ne joue pas encore de façon importante sur la progression physiopathologique de la maladie. Ces deux modèles de souris sont semblables par l'effet neuropathologique qu'ils expriment, tous les deux étant affectés globalement par une augmentation du peptide Aβ-42 sans formation de plaques neuritiques, ni dégénérescence cellulaire. Ces deux modèles sont donc situés en amont dans la cascade amyloïde même si de la protéine tau hyperphosphorylée a été observée en faible quantité dans la région CA3 de l'hippocampe dans la mutation *PS1*-I213T (Tanemura et al., 2006). Ces deux modèles offrent donc l'intérêt d'une étude à des stades précoces, pré-lésionnelles de la maladie, ces stades étant les plus importants pour la recherche de marqueurs précoces de diagnostic et le développement d'une thérapie préventive.

Toutefois, il nous faut souligner que la comparaison des résultats neurochimiques restera limitée par le fait que les contrôles utilisés sont différents pour les deux modèles; les souris *PS1*-A246E sont analysées et comparées à des souris contrôles exprimant le gène humain *PS1* non muté sur un fond génique murin nul alors que les souris *PS1*-I213T sont comparées à des souris contrôles normales exprimant le gène *PS1* murin normal.

La symptomatologie comportementale des deux mutants diffère même si, pour les deux souris, elle est frustre dans le sens où les altérations sont peu importantes et signent des stades sub-cliniques de la maladie. La souris *PS1*-A246E ne présente pas de déficit de mémorisation et d'apprentissage mais un ralentissement psychomoteur et une tendance à la désinhibition (Lalonde et al., 2003). La souris *PS1*-I213T présente un retard d'apprentissage sans perturbation de la mémoire à long terme, par rapport aux souris contrôles (Lalonde et Strazielle, 2005). Cette symptomatologie frustre est retrouvée dans d'autres modèles de souris *PS1* (Lalonde et al., 2005) alors que chez l'homme ces mutations sont non seulement précoces mais induisent une évolution rapide de la maladie.

Les études de Qian et al. (1998) et de Nakano et al. (1999) ont mis en évidence, pour nos deux modèles, une surproduction modérée du peptide soluble dans le cerveau des souris d'un facteur multiplicateur de l'ordre de 1 à 1.5. Ces taux sont exprimés pour la globalité de l'encéphale.

Nous avons réalisé une cartographie de la distribution régionale du peptide Aβ afin de distinguer les structures cérébrales les plus touchées par cette augmentation. Il nous faut préciser que l'anticorps 4G8 que nous avons utilisé n'est pas spécifique de la forme Aβ-42 et par conséquent, un marquage de la totalité de l'expression du peptide amyloïde est obtenu. Toutefois, comme la mutation *PS1* accélère et perturbe le clivage du fragment C99, en inhibant la production d'Aβ-40 au profit de la production d'Aβ-42 et des fragments plus longs de ce peptide (Masafumi et al., 2008), nous pouvons considérer que l'augmentation observée est imputable au peptide Aβ-42. L'analyse quantitative (pourcentage de surface marquée) effectuée dans de nombreuses régions cérébrales de la mutation *PS1*-A246E nous a donné des taux de marquage très semblables à celui obtenu par Qian et al., (1998) en western-blot puisque les augmentations obtenues étaient de l'ordre de 0.8 à 1.5. Les marquages étaient très semblables dans la mutation I213T laissant supposer des augmentations similaires et par conséquent correspondant aussi à la valeur moyenne globale obtenue par Nakano et al., (1999).

L'analyse de la distribution du peptide Aβ pour les deux modèles de mutation *PS1* nous permet de conclure que la surexpression du peptide Aβ ne concerne pas seulement les régions cérébrales reconnues pour être impliquées dans la MA comme l'hippocampe et les néocortex, mais elle touche de nombreuses autres régions comme les noyaux thalamiques, les noyaux du tronc cérébral ou le cervelet. Cette large distribution est également décrite par d'autres auteurs, plus particulièrement dans le cervelet et il semblerait qu'elle intéresse les formes familiales de la MA plutôt que les formes sporadiques (Campion et al., 1996). Des plaques neuritiques ont été décrites dans le cervelet de patients atteints de forme familiale de la MA; elles sont associées à des troubles épileptiques et des myoclonies (Lemere et al., 1996). Nous avons observé des myoclonies dans certaines des souris *PS1*-A246E (Lalonde et al., 2005).

L'étude tissulaire que nous avons réalisée à l'aide des colorants standards comme le crésyl violet ou du Fluoro-Jade B nous a permis de vérifier l'intégrité des tissus cérébraux. Aucune lésion tissulaire n'a été mise en évidence, même au niveau

de la région CA3 de l'hippocampe dans la mutation *PS1*-I213T caractérisée par la présence de protéine tau hyperphosphorylée (Tanemura et al., 2006). La seule différence obtenue était une augmentation faible de l'ordre de 8 à 12% des épaisseurs, pour les cortex sensitif primaire, entorhinal et cingulaire dans la mutation *PS1*-A246E. Nous n'avons pas poussé les investigations mais l'hypertrophie observée dans ces trois cortex chez la souris KO pourrait suggérer l'implication précoce des facteurs neurotrophiques dans les stades pré-cliniques de la MA et en réponse à la surexpression du peptide Aβ.

L'hypothèse proposée par beaucoup d'auteurs sur la neurotoxicité du peptide Aβ-42 semble être associée à l'induction précoce d'un stress oxydant conduisant à des processus neurodégénératifs (Yankner et al., 1996; LaFerla et al., 1997). Nous avons évalué le dommage oxydatif sur les bases d'ADN par l'intermédiaire d'un marquage de la 8-OHdG, ces bases étant les molécules les plus fragiles face à un stress oxydant. Ces bases oxydées d'ADN sont augmentées dans le vieillissement normal et dans les tissus cérébraux au cours de la MA (Abe et al., 2002) et constitue un bon marqueur de dommage précoce des molécules d'ADN (Migliore et al., 2005). L'ADN mitochondrial est plus vulnérable au stress oxydant que l'ADN nucléaire (Wang et al., 2005) et plusieurs mutations sur l'ADN mitochondrial concernant la cytochrome oxydase sont causées par ce dommage oxydatif sur l'ADN au cours de la MA (Qiu et al., 2001). Le marquage que nous avons obtenu préfigure la forme des cellules indiquant ainsi qu'il intéresse à la fois le noyau et le cytoplasme.

Les résultats de ce marquage montrent l'implication précoce du stress oxydant dans les tissus car un marquage des bases oxydées d'ADN était observé dans l'ensemble des structures cérébrales des souris normales et mutantes avec des intensités de marquage variable. Nous n'avons effectué les analyses quantitatives que dans certaines régions, le choix de ces régions étant basé sur les résultats de l'analyse du métabolisme régional et de la distribution du peptide Aβ ainsi que sur l'importance connue de ces régions dans la MA. Nombreuses de ces régions ont montré un taux de dommage oxydatif plus important soulignant ainsi que les régions vulnérables dans la MA sont sensibles à un stress oxydant. Il est également important de noter que les régions cérébrales les plus marquées par la 8-OHdG sont des régions dont le taux de peptide Aβ était augmenté. Cette observation témoignerait d'une toxicité directe du peptide Aβ sur les neurones par l'intermédiaire d'un stress oxydant, et ceci très précocement dans la pathogénèse de la maladie.

Toutefois, si la neurotoxicité du peptide Aβ est établie, d'autres facteurs interviennent dans les phénomènes phyiopathologiques qu'il induit. Parmi les structures étudiées, certaines comme le néostriatum présentent un dommage oxydatif sans augmentation de peptide Aβ alors que le cervelet, structure la plus riche en peptide Aβ n'est pas affecté par une augmentation du taux de bases oxydées d'ADN. Ces différences peuvent s'expliquer à différents niveaux : 1) les mécanismes antioxydants sont variables selon les cellules; 2) des activités métaboliques régionales variables confèrent à la mitochondrie des propriétés différentes; 3) l'action neurotoxique du peptide Aβ agit en association avec d'autres facteurs neurochimiques ce qui expliquerait la vulnérabilité spécifique de certaines régions.

La fonction mitochondriale et le dommage oxydatif sont intimement liés dans la pathogénie et la physiopathologie de la MA (Hirai et al., 2001). Une hypothèse concernant la fonction mitochondriale est proposée par plusieurs auteurs qui ont montré que la MA est caractérisée par une baisse du métabolisme cérébral et du débit sanguin (Kish et al., 1992, Maurer et al., 2000 ; Parks et al., 2001) et que ces altérations métaboliques sont corrélées avec la sévérité de la démence (Eustache et al., 2000, 2001). Nous avons utilisé la cytochrome oxydase comme marqueur chronique du métabolisme énergétique régionale (Wong-Riley, 1989), aussi valide que le 2-déoxyglucose (2-DG) pour comprendre les circuits anatomo-fonctionnels altérés dans la MA et permettant une meilleure résolution dans l'analyse du marquage puisque nous pouvons pousser le degré d'analyse jusqu'au niveau intracellulaire.

Dans les deux mutations, nous avons réalisé une cartographie de l'activité métabolique régionale d'environ 150 régions du système nerveux central. Cette technique histochimique que nous avons rendu quantitative grâce à l'utilisation de standards offre l'avantage d'appréhender le fonctionnement des neurones en réseau, l'activité d'un neurone modifiant en cascade l'activité du neurone cible, cette activité mesurant majoritairement la fonction synaptique.

Pour les deux mutations, la quantification de l'activité enzymatique de la COX montre des modifications de l'activité métabolique dans plusieurs régions spécifiques du système nerveux central. Ces résultats confirment l'atteinte précoce de l'activité métabolique neuronale avant même l'apparition de troubles cognitifs, et pour des augmentations faibles de peptide Aβ. Cette altération métabolique est liée chez

l'homme à la modification du débit sanguin cérébral. Par contre, si elle correspond généralement à un hypométabolisme chez le patient Alzheimer, nous pouvons observer, dans nos modèles, qu'un hypermétabolisme caractérise les structures corticales et sous-corticales du cerveau antérieur.

Les résultats que nous avons obtenus sont très différents entre les deux mutants car si la mutation *PS1*-A246E induit des altérations métaboliques importantes, la mutation *PS1*-I213T exprime peu de différences. Dans la MA, les structures les plus vulnérables sont les structures entorhino-hippocampiques et corticales qui sous-tendent les fonctions de mémoire. Dans nos modèles, si des activations métaboliques sont présentes dans des régions bien spécifiques de l'hippocampe, en rapport possible avec la surexpression du peptide Aβ ou avec la présence de protéine tau hyperphosphorylée, les cortex sont globalement épargnés. Par conséquent, si nous considérons que la perte des terminaisons synaptiques est une des principales caractéristiques de la MA, elle n'apparaît pas précocement ou nécessite un certain seuil pour altérer significativement l'activité métabolique corticale. Une évaluation du nombre des synapses après marquage permettrait de répondre à cette question. Dans les formes sporadiques, les lésions débutent dans le cortex entorhinal, les cortex cingulaire et retrosplenial, certains auteurs, ayant proposé l'altération métabolique du cortex rétrosplénial comme marqueur précoce de la MA (Valla et al., 2001, 2008). Dans nos modèles, aucun de ces cortex ne montre de variation de l'activité métabolique, peut-être parce que les modèles animaux différent des formes humaines de la maladie ou peut-être parce que nous ne sommes qu'à des stades prodromiques. Globalement, les structures dont l'activité était augmentée font partie des circuits fonctionnels impliqués dans le contrôle de la sensori-motricité et des émotions, l'édification des stratégies ainsi que dans les fonctions de base qui sous-tendent l'éveil cortical et l'attention. Une activation de ces structures sous-corticales serait ainsi nécessaire pour un fonctionnement normal des circuits nerveux assurant l'appréhension et les interactions avec l'environnement.

Enfin, nous avons constaté que les modifications du métabolisme régional et la distribution du dommage oxydatif s'expriment différemment, peut-être indirectement dépendants de la quantité du peptide Aβ. Ainsi, l'incidence directe du stress oxydant sur l'expression et l'activité de la COX (Hirai et al., 2001) n'est pas mise en évidence dans nos modèles même si les deux phénomènes sont présents dès les premiers stades. L'analyse corrélative avec les performances comportementales suggère que

l'hyperactivité métabolique peut être un phénomène compensatoire des cellules "en souffrance" qui réagissent pour tenter de préserver leur fonction ou des cellules adjacentes "intactes" qui compensent la déficience fonctionnelle de certaines cellules en travaillant plus. Des études cliniques ont mis en évidence ces phénomènes compensatoires se traduisant par une consommation plus importante d'oxygène et de glucose dans les stades précoces ou prodromiques de la MA (Desgranges, 1996; Rapoport et al., 1999; Morris et al., 2002). Il semblerait que les neurones soient obligés de "travailler plus" pour fournir le même travail.

Cependant, les résultats obtenus dans ce travail nous permettent de supposer que cet hypermétabolisme compensatoire même s'il est jugé bénéfique car il retarde l'apparition des signes cliniques caractéristiques de la maladie, peut être délétère sur le plan neuropathologique car il place les neurones en stress fonctionnel induisant à son tour des radicaux libres et des dommages oxydatifs. Ceux-ci, dans un cercle vicieux, affecteraient le métabolisme énergétique par l'intermédiaire d'une excitotoxicité glutamatergique. Nous rentrons dans une spirale (Blass et al., 2000).

L'hypothèse cholinergique propose l'atteinte cholinergique liée à la perte synaptique et neuronale cholinergique comme facteur physiopathologique principal responsable de la symptomatologie clinique caractérisant la MA (Atack et al, 1983; Younkin et al., 1986; Boncristiano et al., 2002). Nous avons utilisé le marquage histochimique de l'acétylcholinestérase pour étudier cette innervation cholinergique établissant une cartographie d'environ 150 régions cérébrales.

Nous avons démontré que l'atteinte cholinergique liée à ces mutations *PS1* est très précoce, apparaissant avant les déficits cognitifs à des stades prodromiques de la maladie. Entre les deux mutations, les résultats sont très différents, mais les régions altérées intéressent les circuits d'activation cérébrale et ceux de l'apprentissage. On sait que l'activation du système cholinergique permet aux stimulations sensorielles d'atteindre le seuil de signification et de "sortir du bruit de fond", favorisant les processus d'attention et de mémoire (Gould et al., 1999). Les afférences cholinergiques moduleraient les phénomènes synaptiques de potentialisation à long terme, en influençant l'organisation temporelle et spatiale de l'excitabilité, ce qui à son tour, va influencer la synchronisation des rythmes cérébraux, plus particulièrement corticaux, et contribuer aux mécanismes de focalisation de l'attention.

L'hyperactivité de l'AChE observée dans la mutation *PS1*-A246E en absence de déficit cognitif suggère un phénomène compensatoire. A l'opposé, la diminution de l'activité de l'AChE dans la mutation *PS1*-I213T pourrait expliquer le retard d'apprentissage.

Enfin, de nombreuses études ont montré qu'il existait une interaction entre le peptide Aβ-42 et l'AChE dans les régions corticales (Sberna et al., 1998). Une étude récente sur les mêmes souris *PS1*-A246E à l'âge de 9 mois montre une co-localisation intracellulaire de la *PS1* muté avec l'AChE suggérant une interaction entre les deux molécules (Silveyra et al., 2008). Il faut noter que la protéine PS1 s'exprime de façon importante dans le cervelet. Or, si nous avons observé une augmentation de peptide Aβ dans cette région, aucune modification cholinergique n'a été mise en évidence. Il semblerait, par conséquent, que cette interaction soit spécifique de certaines régions, corticales et autres localisées dans le cerveau antérieur.

L'acétylcholinestérase est utilisée comme une principale cible pour développer des médicaments contre la MA (Reyes et al., 1997). Les modifications très précoces de l'innervation cholinergiques liées à la mutation *PS1* dans nos modèles, nous permet de nous demander, si un traitement préventif anticholinestérasique est un bon choix à ce stade et en absence de toute altération cognitive. Et quel anticholinesterasique est le plus adapté pour ce rôle préventif, sachant que dans ce travail on n'a pas distingué entre les deux isoformes de l'AChE, G1 et G4. Nos résultats attestent de l'importance de poursuivre la recherche pharmacologique dans ce domaine afin de développer des nouvelles molécules ciblant l'AChE dans son isoforme G4 pour maintenir la fonction synaptique, mais également dans son isoforme G1 pour diminuer l'interaction de cette enzyme avec le peptide Aβ.

5EME PARTIE

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les mutations du gène présiniline1 (*PS1*) conduisent à une forme agressive et précoce de la maladie d'Alzheimer. Notre travail consiste à évaluer l'effet des deux mutations humaines *PS1*/A246E et *PS1*/I213T sur l'activité neuronale et l'innervation cholinergique, dans deux modèles de souris. La première souris exprime la mutation humaine A246E sur un fond génique murin absent (Ko), comparée à un groupe de souris exprimant le gène humain normal en absence de gène murin aussi.

La deuxième souris exprime la mutation humain *PS1*- I213T sur un fond génique écrasé, cette souris est comparée à un groupe de souris contrôles normale exprimant le gène *PS1* murin. Les deux types de souris sont évaluées sur le plan comportemental, et les résultats de ces testes montrent des phénotypes correspondant à un stade préclinique de la MA (Lalonde et al., 2005).

Sur le plan neuropathologique, ces souris montrent une surexpression du peptide A bêta 42 en absence des plaques neuritiques (Qian et al., 1998), Nakano et al., 1999). Les deux modèles de souris ne présentent aucun signe de dégénérescence neuronale ou de gliose. Les souris KO, A246E, montrent une hypertrophie dans deux cortex l'entorhinale et le cingulaire antérieur, sans modification de la densité cellulaire mesurée par l'évaluation de la densité de corps de Nissl. L'hippocampe ne montre aucun signe d'une atrophie malgré la présence de la protéine tau hyperphosphorylée dans cette régions (Tanemura et al., 2006). Dans ce cadre, une étude des facteurs neurotrophiques sera pertinente chez ces souris.

Nous avons évalué la cascade histopathologique dans les différentes régions cérébrales pour essayer de trouver un lien direct entre l'expression régionale du peptide Aβ avec les modifications physiopathologiques régionales observées. Pour cette étude fonctionnelle nous avons choisi comme marqueurs, l'activité de la COX un marqueur du métabolisme cérébral, l'Activité de l'AChE comme marqueur de l'innervation cholinergique, cette étude est globale car une cartographie de toutes les structures cérébrales est effectuée.

Les résultats montrent que malgré une expression régionale faible du peptide amyloïde, un dommage oxydatifs est détecté dans certains régions cérébrales, qu'elles ne sont pas toujours les plus impliquées dans la MA, ces deux marqueurs neuropathologiques ne semblent pas liés directement, car ils ne s'expriment pas toujours dans les mêmes régions.

Les résultats de l'étude physiopathologique sont très différents entre les deux mutants car si la mutation *PS1*-A246E induit des altérations métaboliques importantes, la mutation *PS1*-I213T exprime peu de différences.

Une modification précoce de la fonction synaptique est observée chez les souris PS1/A246E, aussi bien au niveau de l'activité métabolique qu'au niveau de l'innervation cholinergique. Les structures dont l'activité métabolique était augmentée sont impliquées dans le contrôle de la sensori-motricité et des émotions, l'édification des stratégies ainsi que dans les fonctions de base qui sous-tendent l'éveil cortical et l'attention. Des phénomènes compensatoires ou d'une perte synaptique obligeant les cellules intactes de travailler plus pour conserver la fonction cognitive, dans ce stade les cellules sont encore capables de réagir face aux facteurs neurotoxique et aux stress. Une déafférentation pourra expliquer aussi une réaction de la cellule face à une perte synaptiques afférentes, alors les cellules sont obligées à travailler plus pour compenser la manque de fonction (phénomène de bourgeonnement) ou (sprouting). L'étude des marqueurs synaptique comme la synaptophysine pourra nous aider à mieux expliquer ce hypermétabolisme. Le lien intime entre le métabolisme énergétique et les synapses glutamatergiques nous permet de suggérer que cette hyperactivité pourra être les résultats d'une excitotoxicité glutamatergique, où la demande d'énergie est accrue. Une évaluation des récepteurs glutamatergique nous permettra de confirmer cette hypothèse. Si les souris A246E ont montré une modification métabolique dans plusieurs régions cérébrales, les souris *PS1*-I213T ont montré un hypermétabolisme que dans les cellules pyramidales de la couche CA2, CA3 de l'hippocampe et dans le noyau cholinergique de cerveau antérieur, la substance innominée (Ch4), cette hyperactivité pourrait être les résultats de la surexpression du peptide $A\beta_{42,}$ mais aussi à la présence de la protéine tau hyperphosphorylée (Tanemura et al., 2006). Elle peut également refléter une activation compensatoire nécessaire pour pallier le déficit dans le processus de la mémorisation. Un faible hypométabolisme est observé dans certains noyaux de thalamus, sans corrélation existant avec les performances comportementales observées chez ces souris.

Nous avons démontré que l'atteinte cholinergique liée à ces mutations *PS1* est très précoce, apparaissant avant les déficits cognitifs. Cette modification de l'activité cholinergique est traduite par une hyperactivité chez les souris *PS1*-A246E concernant les structures cérébrales impliquées dans l'activation cérébrale et ceux

de l'apprentissage. Le système cholinergique favorise les processus d'attention et de la mémoire. Par contre, les souris *PS1*-I213T montrent une hypoactivité cholinergique dans le thalamus et tout particulièrement dans les noyaux diffus de thalamus et les noyaux limbiques impliqués dans l'activation cérébrale et les processus de l'attention, cette hypo-innervation cholinergique au niveau du thalamus pouvait expliquer le retard d'apprentissage observé chez ces souris dans les tests des performances comportementales. Ces résultats montrent l'importance de la région du thalamus dans les phases précoce de la maladie. Cette région est riche en récepteurs nicotiniques $\alpha 4\beta 2$, pour cette raison une étude de facteur neurotrophique NGF sera utile pour évaluer la vulnérabilité de cette région face à la neurotoxicité.

L'ensemble de nos résultats confirment les modifications très précoces de la fonction synaptique, concernant aussi bien l'activité métabolique que l'innervation cholinergique. Ces modifications fonctionnelles liées à la mutation *PS1* dans nos modèles, nous permet de nous demander si un traitement préventif anticholinestérasique est un bon choix à ce stade et en absence de toute altération cognitive. Les phénotypes observés chez les deux modèles de souris étudiés, nous offrent la possibilité d'effectuer des essais thérapeutiques, pour des anticholinestérasique préventive, sachant qu'une étude spécifique de l'isoforme G4 sera nécessaire pour mieux orienter les cibles de développement des anti-cholinestérasiques.

Tableau récapitulatif : montrant l'ensemble des résultats de caractérisation phénotypique, neurochimique et histopathologique, chez les deux mutations *PS1* étudiées.

Marqueur	***PS1*-A246E**	***PS1*I213T**
Comportement	-Ralentissement psychomoteur -Desinhibition	Retard d'apprentissage
Histopathologie		
Amyloïde bêta (Aβ42)	Augmentation Aβ42 (sans plaques)	Augmentation Aβ42 (sans plaques)
Bases d'ADN oxydées (8-OHdG)	Augmentation 8-OHdG	Augmentation 8-OHdG
Dégénérescence	Absence	Absence
Gliose	Absence	Absence
Atrophie (épaisseur)	Hypertrophie cortex cingulaire et entorhinale	Absence
Physiopathologie		
Activité métabolique COX	**Hypermétabolisme** Plusieurs régions impliquées dans la sensorimotricité, l'élaboration et le contrôle affectif des mouvements **Hypométabolisme** Peu de régions, impliquées dans l'éveil et l'activation cérébrale	**Hypermétabolisme** Peu de régions : 2 N.cholinergique(Ch4), cellules pyramidale de CA2, CA3 de l'hippocampe impliqués dans l'éveil et la mémorisation **Hypométabolisme** Quelques noyaux thalamiques impliqués dans la motricité
Innervation cholinergique AChE	**Hyperactivité** Régions impliquées dans l'activation cérébrale et de l'apprentissage, attention et mémoire	**Hypoactivité** noyaux thalamiques impliqués dans l'activation cérébrale et l'attention

ANNEXE
MATERIELS ET METHODES

PROTOCOLES TECHNIQUES

I. Préparation des tissus

1.1. Prélèvement de l'encéphale et préparation des coupes

Le jour suivant la fin des expérimentations neuro-comportementales, les animaux sont anesthésiés au forène (fluorothane) et euthanasiés par décapitation. La boîte crânienne est ouverte et l'encéphale est rapidement prélevé et congelé pendant 10 secondes dans une solution de 2-N-méthylbutane refroidi à l'azote liquide (entre -40° à -50℃); les encéphales sont a lors enveloppés dans du papier d'aluminium avant d'être conservés à –80℃ au congé lateur.

Des coupes sériées, dans le plan frontal, sont réalisées au cryostat à -20℃. L'intérêt de cette méthode de coupe est d'avoir toutes les régions de l'encéphale sur deux lames (antérieur et postérieur), les coupes étant séparées entre elles d'une épaisseur de 300 µm. Concernant les sériées réalisées, les 13 premières ont une épaisseur de coupe de 20µm, les 3 dernières séries, une épaisseur de coupe de 10µm. Les coupes sont montées sur des lames gélatinées puis mises à sécher à température ambiante pendant 2 à 3 heures. Cette étape est importante car la déshydratation qui en résulte va permettre d'éviter la formation de cristaux de glace dommageables pour les tissus lors de la congélation. Les lames sont alors conservées au congélateur à -80℃.

1.2. Protocole pour la réalisation des lames gélatinées

La gélatinisation des lames histologiques, utilisées pour monter les séries de coupes, permet une meilleure adhérence des tissus biologiques sur la lame et par conséquent préserve l'intégrité des tissus lors des traitements histologiques.

Les lames (nettoyées et dégraissées à l'achat) sont essuyées avec un papier spécial haute précision puis plongées quelques secondes dans une solution d'eau distillée chauffée à 40°-50℃ avec 0.5g de gélatine et 0.05g de chrome-alun/100 ml. Cette solution est filtrée avant utilisation.

Les lames sont ensuite recouvertes de papier d'aluminium, et mises à sécher pendant deux jours à température ambiante; puis elles sont rangées dans des boîtes hermétiques, à l'abri de la lumière et de la poussière.

2. Marquages histochimiques

2.1. Marquage du cytochrome oxydase (COX)

En 1989, Wong-Riley a démontré que l'activité de la COX est un indice valide et fiable de l'activité métabolique du neurone.

La révélation de l'activité de la COX se fait par une réaction histochimique d'oxydo-réduction. Lors de l'incubation, le cytochrome c, de couleur saumon, est réduit et devient rose; le produit de réaction est alors révélé au DAB (3,3'diaminobenzidine). Cette réaction est générée tant que le substrat peut-être réduit. Ainsi, l'intensité du marquage est directement proportionnelle à la quantité de COX présente dans les tissus.

Dans nos études, la révélation de la COX est faite sur une série de coupes (20µm d'épaisseur) de chaque cerveau selon le protocole de Wong-Riley, (1979) modifié par Strazielle et al. (1998). Des standards (coupes d'homogénat d'encéphale de souris) d'épaisseurs variables (entre 10-40µm) sont incubées en même temps. Le protocole histochimique est le même pour toutes les lames incubées. Les standards servent à vérifier la linéarité de la courbe des absorbances en fonction de l'épaisseur des coupes. La mesure préalable en spectrophotométrie de l'activité enzymatique de la COX dans ces homogénats va permettre la standardisation de l'analyseur d'image directement en activité enzymatique.

<u>Protocole histochimique</u>

- Séchage des lames à température ambiante
- Incubation à 37℃, à l'obscurité, sur agitateur pendant environ 1 heure (45 à 75 minutes - temps à déterminer suivant l'intensité de la coloration) dans le mélange suivant :

  pour 180 ml de tampon phosphate 0.1 M (pH 7.4) :
  - 40 mg de cytochrome c (SIGMA, type III, de cheval)
  - 100 mg de DAB-4HCl
  - 8 g de sucrose
  - 36 mg de catalase
- Rinçage au tampon phosphate 0.1M sucrosé à 10% à 4℃ pendant 5 min pour arrêter la réaction
- Fixation dans un bain de formaline (formaldehyde 4% tamponné) pendant 30

min

- Rinçage 3 fois au tampon phosphate 0.1M (5 min et 2 x 2 min)
- Déshydratation dans des bains successifs d'alcool (3 min chacun) de 50°, 70°, 96°, puis de 100° (2 fois 5 min) et enfin de xylène (2 fois 5 min).
- Montage au Permount ou à l'Eukitt.

Parallèlement, deux contrôles négatifs sont immergés dans la même solution mais 1) sans DAB et 2) avec du cyanide de potassium 0.01M pendant le même temps d'incubation. Aucun marquage de CO n'est présent sur ces lames.

Le marquage, de couleur brune, est analysé à l'aide d'un microscope à transmission, en lumière blanche. Etant donné que l'intensité du marquage est proportionnelle à la quantité de tissus analysée et au temps d'incubation, l'analyse de la densité de marquage se fait par mesure de l'absorbance.

Préparation des standards

- prélèvement de plusieurs encéphales de souris
- broyage manuel des encéphales de souris à l'aide d'un broyeur manuel de type Dounce jusqu'à obtention d'une pâte
- conservation de la pâte dans des petits ependorfs cylindriques.

Pour une bonne homogénéisation (densité uniforme de la pâte) faire tourner les homogénats rapidement dans une centrifugeuse (1800 rpm) à 4° pendant 15-30 sec.

- congélation des ependorfs dans l'isopentane à -40°C avant de les conserver au congélateur à -80°.

Pour la préparation des lames de standards, il suffit de démouler les petits "boudins" de pâte congelée, les placer sur un porte-objet, les couper à des épaisseurs variables de 10, 20 et 40 µm et les placer sur une même lame.

Pour extraire les boudins de pâte des ependorfs, il suffit de couper l'extrémité du tube et de les pousser à l'aide d'un bâtonnet : procéder sur de la carboglace pour maintenir une température en dessous de -20°C.

Calcul de l'activité enzymatique spécifique de la COX

L'activité enzymatique est calculée par dosage biochimique à l'aide de la méthode au spectrophotomètre décrite par Hess et Pope (1953).

- diluer le cytochrome c (SIGMA) à une concentration de 30µM dans du tampon phosphate 0.05M (pH 7).

- rajouter 0,3 g de sodium hydrosulfite (= hydrosulfite de Na) pour 100 ml de solution de cytochrome c, soit une concentration de 17 mM.
- Le cytochrome c est réduit par l'hydrosulfite de Na et passe d'une coloration saumon à une coloration rose (Nous obtenions par exemple, à 565 nm une D.O. de 0.13 et à 550 nm une D.O. de 2.08, soit un rapport d'environ 16. Ce rapport doit être impérativement > 6 sinon la solution doit être réduite à nouveau).
- mélanger alors 0.9 ml de cette solution de cytochrome réduit avec 0.1ml d'homogénat (l'homogénat est mélangé à du déoxycholate 0.75% dans un rapport de 0.012 g de pâte pour 5 ml de déoxycholate. Pour bien homogénéiser, utiliser un tube et un piston en friction).
- mesure de la D.O. à 550 nm.

On obtient une chute importante de la D.O. avec une courbe dont la pente est importante. Cette pente représente l'activité enzymatique qui est calculée directement par l'appareil par la formule :

$\Delta OD/E$ / (tissu) = µmol/min/g de tissu sec à 22° pH 7 ($E = 19.6\ nM^{-1}.\ cm^{-1}$)

Le calcul de la pente se fait lorsque la pente est la plus droite entre T15 sec et T75 sec.

Le ferricyanide de potassium doit arrêter tout de suite la réaction d'oxydation.

L'activité spécifique mesurée (38,5 µmol/min/g de tissu) reste stable pendant plusieurs mois.

2.2. Marquage de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'activité AChE est utilisée pour marquer l'innervation cholinergique dans le système nerveux central (Gil-Bea et al., 2005). Bien que l'AChE ne soit pas un marqueur spécifique puisque l'enzyme est présente à la fois dans les neurones présynaptiques et postsynaptiques, sa révélation histochimique nous permet d'en faire une évaluation quantitative.

Le principe de la méthode histochimique est de mesurer le niveau de la thiocholine produite par hydrolyse de l'acétylthiocholine utilisée comme un analogue du substrat naturel. La révélation de la thiocholine est effectuée par le sodium sulfide.

De la même façon que pour le marquage de la COX, une série de coupes de cerveau de chaque souris, non fixées et conservées à -80℃ (20µm d'épaisseur)

ainsi que des lames de standards (homogénats d'encéphale de souris) ont été utilisées. Le marquage est effectué selon le protocole de Paxinos et Watson (1998). L'intensité du marquage est directement proportionnelle à la concentration du tissu biologique (épaisseur) et à la durée d'incubation.

La mesure de l'activité enzymatique des homogénats utilisés pour les standards par spectrophotométrie permet la conversion de l'absorbance en activité enzymatique et la réalisation d'une évaluation quantitative de l'AChE.

Protocole histochimique

- Séchage des lames à température ambiante
- Préparation d'un tampon acétate 0,1M de pH=5,0

Solution A : (pour 100ml)

- 0.57ml acide acétique glacial 1N (pour faire une solution à 0.1N)
- eau distillée

Solution B : (pour 200ml)

- 1.64g sodium acétate pour une solution à 0.1N (PM : 82.03)
- eau distillée

Solution finale = 59ml de solution A + 141ml de solution B (soit 200ml à 0.1M)

- utilisation de tampon acétate 50mM de pH=5,0 : dilution de la solution finale par 2, soit un ajout de 200ml d'eau distillée
- Préparation de la solution stock : ajouter au tampon acétate (pour 400ml)

  4mM de sulfate de cuivre (soit 0,2554 g)

  16mM de glycine (soit 0,4804 g)

Cette solution stock peut se conserver pendant des mois au réfrigérateur et des années au congélateur.

- Préparation de la solution d'incubation : ajouter à la solution stock (pour 100 ml)

  116 mg de S-acétylthiocholine iodide

  3 mg d'éthopropazine

Bien mélanger la solution car l'éthopropazine se dissout difficilement

- Incubation des lames à température ambiante, sans agitation pendant 12 heures
- Rinçages rapides à l'eau distillée (3 fois) pour arrêter la réaction
- Révélation dans une solution de 1% de sodium sulfide $Na_2S_9H_2O$ à pH=7,5

(ajout d'acide acétique jusqu'à obtention du pH souhaité) pendant 10min

- Rinçages rapides à l'eau distillée (3 fois) pour arrêter la réaction
- Fixation dans un bain de formaline (formaldehyde 4% tamponné) pendant 30 min
- Rinçage à l'eau distillée (5 min et 2 x 2 min)
- Déshydratation dans des bains successifs d'alcool (3 min chacun) de 50°, 70°, 96°, puis de 100° (2 fois 5 min) et enfin de xylène ou clearene (2 fois 5 min).
- Montage au Permount ou à l'Eukitt.

Parallèlement, un contrôle négatif est immergé dans la même solution sans S-acétylthiocholine iodide, pendant le même temps d'incubation. Aucun marquage d'AChE n'est présent sur ces lames.

Le marquage, de couleur brune, est analysée à l'aide d'un microscope à transmission classique (lumière normale). Etant donné que l'intensité du marquage est proportionnelle à la quantité de tissus analysée et au temps d'incubation, l'analyse de la densité de marquage se fait par mesure de l'absorbance.

Préparation des standards

(protocole identique à celui du marquage de la COX)

Calcul de l'activité enzymatique spécifique de l'AChE

L'activité enzymatique de l'AChE a été déterminée en spectrophotométrie au moyen de la méthode colorimétrique d'Ellman et al. (1961) modifiée par Dumont et al., (2005). La thiocholine, formée durant l'hydrolyse de l'acetylthiocholine, est capable de réagir rapidement avec l'acide 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoique (DTNB) en libérant un anion 5-thio-2-nitrobenzoate dont la couleur présente un maximum d'absorption à la longueur d'onde de 412 nm.

- Réalisation d'un homogénat formé de 50 mg de pâte (standard d'encéphale de souris) dans 1 ml de tampon phosphate 0.1M (pH 8,0).
- Préparation d'aliquots de concentration tissulaire variable à partir de l'homogénat précédent (12.5 to 50 µl) par dilution dans du tampon phosphate contenant 25 µl de DTNB (0.5 mM).
- Mesure de l'absorbance à 412 nm de chaque aliquot après avoir rajouter dans la cuve de spectrophotomètre 10 µl d'acetylthiocholine-iodide (0.5 mM)

La valeur d'absorbance est proportionnelle à la concentration tissulaire (r = 0.997).

L'activité enzymatique est calculée directement par l'appareil par la formule :
$\Delta OD/E$ / (tissu) = µmol/min/g de tissu sec à 22° pH 7 ($E = 1{,}36\ nM^{-1}.\ cm^{-1}$)

- l'ajout de 50 µM d'ambenonium (Tocris, Illkirch, France), un puissant inhibiteur de l'AChE supprime la réaction.

L'activité spécifique mesurée (13,0 µmol/min/g de tissu) reste stable pendant plusieurs mois pour les standards conservés à -80°C .

2.3. Marquage de la nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NAPDH-d)

La NADPH-d est un marqueur de l'oxyde nitrique synthétase (NOS) au niveau du système nerveux central (Hope et al, 1991), à condition que les tissus étudiés soient préalablement fixés (Matsumoto et al, 1993). Sa révélation histochimique permet une évaluation quantitative du NOS.

Selon le protocole de Vincent et Kimura (1992), le NOS utilise la NADPH comme cofacteur pour réduire des sels de tetrazolium (le tetrazolium nitroblue, de couleur jaune) en diformazan de couleur bleue. La quantité de marquage est proportionnelle à la quantité de formazan produit, elle-même proportionnelle à la quantité de NOS au sein du tissu.

De la même façon que pour les autres marquages histochimiques, une série de coupes de cerveau de chaque souris, non fixées et conservées à -80°C (20µm d'épaisseur) ainsi que des lames de standards (homogénats d'encéphale de souris) ont été utilisées. Une étude sur les standards permet de vérifier que l'intensité du marquage est directement proportionnelle à la concentration du tissu biologique (épaisseur) et à la durée d'incubation, permettant ainsi une évaluation quantitative du marquage.

<u>Protocole histochimique</u>

- Séchage des lames à température ambiante
- Préparation du paraformaldehyde 4% :
    - 100 ml de PBS 0,1M (pH= 7,4) à 65°C au bain-marie
    - 4g de paraformaldéhyde
    - 1 goutte de NaOH
- Filtrage de la solution avant l'incubation
- Fixation des lames au paraformaldéhyde 4% pendant 30 min à température ambiante

- Rinçage des lames au tampon PBS (2 fois 5 min)
- Incubation des lames à 37℃ pendant 3h30 heures d ans une solution de 100 ml de tampon PBS 0,1M (pH = 7,4), contenant :
    - 0.3% Triton X-100
    - 0.1mg/ml de nitroblue tétrazolium (soit 10mg)
    - 1mg/ml de beta-NADPH (soit 100mg, SIGMA, forme réduite)
- Rinçage des lames dans du PBS 0,1M, pH= 7,4 pendant 5 min
- Rinçage des lames dans l'eau distillée 2 fois 5 min
- Séchage des lames à l'air libre
- Déshydratation au xylène (2 bains brefs consécutifs)
- Montage à l'Eukitt

Un témoin négatif est obtenu en incubant les tissus dans la même solution sans beta-NADPH.

La couleur observée au niveau des tissus est bleu-violet et l'observation microscopique se fait de façon standard en transmission, en lumière blanche.

L'activité spécifique de la NADPH-d n'a pas été calculée et l'évaluation quantitative a été réalisée par mesure de l'absorbance du marquage à l'analyseur d'image en utilisant pour standardiser l'appareil, une échelle Kodak™ de niveaux de gris.

2.4. L'analyse quantitative des marquages histochimiques

Des cartographies détaillées de plus de 120 régions à travers tout l'encéphale ont été établies. L'intensité des différents marquages est quantifiée par la mesure de l'absorbance (densité optique) régionale au moyen d'un analyseur d'image assisté par ordinateur (MCID™, Interfocus, UK)).

Chaque région est digitalisée à un grossissement X10. L'absorbance spécifique au marquage est mesurée après soustraction automatique de la coloration de fond. La standardisation de l'appareil permet les comparaisons intergroupes pour des conditions identiques d'observation.

La mesure des absorbances des standards en fonction des épaisseurs de tissus permet le calibrage de l'appareil (échelle linéaire, le facteur de corrélation n'étant jamais inférieur à 0,95). Connaissant l'activité spécifique de l'enzyme étudiée, l'absorbance est convertie directement en activité enzymatique par le logiciel pour chaque mesure enregistrée. Le calibrage de l'appareil peut se faire également en

utilisant une échelle de niveaux de gris élaborée et fournie par le laboratoire Kodak™.

Pour obtenir une évaluation homogène :

- toute l'analyse est faite par le même observateur en aveugle.
- les mesures sont effectuées dans le même plan de coupe pour les régions de vaste étendue,
- la surface mesurée pour chaque région est identique pour tous les encéphales. Pour les structures hétérogènes, une analyse globale est faite à faible grossissement (x10) complétée par une analyse précise des sous-régions à plus fort grossissement (x40).

3. Colorations Histologiques

3.1. Coloration au crésyl violet

Colorant les corps de Nissl, le crésyl violet est utilisé classiquement pour repérer les différentes régions de l'encéphale selon l'atlas à stéréotaxie (Franklin et Paxinos, 1997) et rendre compte de la densité neuronale de ces régions. L'intensité du marquage mesurée par absorbance donne une évaluation grossière de la densité cellulaire et renseigne, par conséquent sur une éventuelle perte cellulaire.

Une coloration au crésyl violet à 0.5% est réalisée systématiquement sur une série de coupes suivant le protocole de Bolam (1992).

<u>Protocole histologique</u>

- Séchage des lames à température ambiante
- Fixation à la formaline (fomaldéhyde 4% tamponné) pendant 24 heures
- Rinçage des lames dans de l'eau distillée (1 rinçage rapide suivi d'un rinçage de 5 min)
- Dégraissage des tissus par trempages successifs (3 min chacun) des lames dans une série ascendante puis une série descendante de bains d'alcool, (alcool 50°, 70°, 96°, 100° (2 fois), xylène, 100° (2 fois), 96°, 70°, 50°)
- Rinçage à l'eau distillée pendant 5 min
- Préparation de la solution de crésyl violet

Pour 250 ml de solution :

- 15 ml d'acétate de sodium 1M
- 75 ml d'acide formique 0.2M

- 150 ml de crésyl violet aqueux 0.5%

(filtrer la solution)

- Coloration des lames par immersion pendant 30 min dans la solution de crésyl violet (Procéder par essais pour définir le temps optimal de façon à obtenir une coloration bien contrastée)
- Rinçage rapide pour éliminer l'excès de colorant
- Immersion des lames dans une série de bains d'alcool 50°, 70°, 96°,100° (2 fois), xylène (2 fois), 3 min chacun

La déshydratation sert à différencier la coloration (la myéline perd la coloration alors que le corps cellulaire la conserve). Cette différenciation est accélérée en acidifiant légèrement les bains d'alcool 70° et 96° avec de l' acide acétique.

- Montage des lames avec à l'Eukitt.

Les cellules forment des points colorées en mauve-violet. L'observation se fait au microscope à transmission en lumière blanche.

3.2. Coloration au Fluoro-Jade B

Le Fluoro-Jade B est une substance fluorescente (PM=450) ayant un spectre d'émission à 530 nm. Il est reconnu comme marqueur de la dégénérescence neuronale colorant en vert-jaune fluorescent le corps cellulaire et les prolongements fibrillaires des neurones entrain de dégénérer (Schmued et Hopkins, 2000).

La coloration est effectuée sur une série de coupes (2 lames) par animal, non fixées et d'une épaisseur de 20 µm.

<u>Protocole histologique</u>

- ramener les lames à température ambiante
- Fixation préalable (coupes sur lame gélatinée) des lames pendant une nuit dans une solution de formaline (solution de formaldehyde 4% dans du tampon phosphate à un pH de 7,2).
- Rinçage des lames dans de l'eau distillée (1 rinçage rapide suivi d'un rinçage de 5 min)
- Préparation des solutions

Solution d'alcool 80% - NaOH 1% : mélanger 20 ml de NaOH 5% avec 80 ml d'alcool absolu.

Solution de permanganate de potassium 0.06%, soit 60 mg dans 100 ml d'eau

distillée (solution qui craint la lumière, à faire en extemporané).

Solution de Fluoro-Jade 0.0004% (à faire en extemporané, Histochem, Jefferson, AR, USA commercialisé en France par ASD, Evry) : partir d'une solution stock de Fluoro-Jade 0.01% (10 mg dans 100 ml d'eau distillée) qui peut être conservée 2 mois à 4℃ ; mélanger 4 ml de cette solution stock avec 96 ml d'une solution d'acide acétique 0.1% (0.1 ml d'acide acétique glacial dans 99.9 ml d'eau distillée).

- Immersion des lames dans la solution d'alcool 80% pendant 5 min
- Immersion dans un bain d'alcool 70° pendant 2 min
- Rinçage à l'eau distillée pendant 2 min
- Immersion des lames dans une solution de permanganate de potassium 0.06% pendant 10 min, sous agitation douce

Les bains d'alccol et de permanganate servent à diminuer la coloration de fond et empêcher l'affaiblissement du marquage fluorescent lors de l'exposition ("fading").

- Rinçage à l'eau distillée pendant 2 min
- Immersion des lames dans une solution de Fluoro-Jade 0.0004% pendant 20 min, sous agitation douce
- Rinçages à l'eau distillée, 3 fois 1 min
- Séchage rapide sous air chaud ou sur une plaque chauffante (50℃)
- Immersion dans le xylène (2 min) et montage au DPX

L'observation se fait au microscope muni d'un filtre pour fluorescence ou FITC. (Olympus AX70, France). La couleur positive avec le filtre est vert-jaune fluorescent.

4. Marquages immunohistologiques

4.1-Protocole de marquage immunohistochimique de l'Aß-40-42

Le protocole utilisé est adapté de celui de Schwab et al (2004). Le nombre d'animaux suffisant pour tester des différences intergroupes est de 5-6 dans chaque groupe. Une série de lames supplémentaire est utilisée pour le témoin négatif. Une lame de coupes issues d'un encéphale de souris transgénique APP23 possédant des plaques neuritiques est utilisée comme contrôle positif.

Protocole immunohistologique

- Séchage des lames au moins 2 heures à température ambiante.
- Marquage des bords avec une résine hydrophobe (de type Dakopen™) de façon à faire les incubations directement sur lame sans immersion.

- Fixation des coupes 30 min dans un bain de formaline (formaldéhyde 4% tamponné, pH 7,4)
- Rinçage des tissus 3 fois 20 min avec du PBS (tampon phosphate-salin)
- Perméabilisation des coupes dans une solution de PBS contenant :
    - 0,5% H_2O_2,
    - 0,5% de sérum de cheval (Vector Laboratory, France)
    - 0,5% de Triton X-100.
- Lavage des tissus 3 fois 5 min dans du PBS
- Saturation des coupes dans une solution de PBS contenant 10% de sérum de cheval pendant 30 min
- Passage des coupes 10 secondes à l'acide formique.
- Lavage des tissus 3 fois 5 min au PBS

Un kit d'immunodétection Vector M.O.M. (AbCys S.A., Paris, France) est utilisé pour augmenter le marquage spécifique et diminuer le bruit de fond.

- Saturation des coupes placées dans une chambre humide pendant 1 heure dans une solution servant à bloquer les immunoglobulines de souris (KIT Vector, 1,25ml PBS + une goutte de MOM blocking)
- Lavage des coupes 2 fois 5 min au PBS.
- ncubation des coupes dans le "diluent" pendant 5 min (KIT Vector,1,2ml PBS + 96µl de proteine concentré)
- Incubation des coupes avec l'anticorps primaire monoclonal 4G8 (Signet lab, MA, USA) dilué à 1/100 dans la solution du diluent M.O.M., pendant une nuit à 4℃
- Rinçage des tissus 2 fois 2 min dans du PBS
- Incubation des coupes pendant 1 heure à température ambiante dans l'anticorps secondaire IgG anti-souris (Alexa Fluor 555 d'âne, Molecular Probes) dilué à 1/500 dans le diluent M.O.M.
- Rinçage des tissus 2 fois 2 min dans du PBS
- Montage des lames au glycérol à 50% et conservation à 4℃, à l'humidité et à l'abri de la lumière.

Le marquage immunhistologique est observé au moyen d'un microscope équipé d'un filtre à la rhodamine. La coloration positive s'apparente à des points verts-jaunes fluorescents. Le marquage est intracellulaire et préfigure parfois la forme des cellules.

4.2. Marquage immunohistochimique de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

Le stress oxydant est susceptible d'agir sur les bases d'ADN en les oxydant; l'oxydation la plus étant la 8-OHdG. Ce marquage immunohistochimique concerne à la fois l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondriale, ce dernier étant beaucoup plus fragile que le premier. L'évaluation du marquage est réalisée sur certaines régions (20-30 régions) et le nombre d'animaux est réduit à 5-8 dans chaque groupe. Une série de lames supplémentaire est utilisée pour le témoin négatif.

Protocole immunohistochimique

- Séchage des lames à température ambiante pendant 3 heures
- Cerclage des régions par une résine hydrophobe (Dakopen™) pour permettre un marquage directe sur lame horizontale sans immersion.
- Fixation des coupes 30 min dans un bain de formaline (formaldéhyde 4% tamponné, pH 7,4)
- Rinçage des tissus 3 fois 10 min avec du PBS (tampon phosphate-salin)
- Perméabilisation des coupes 30 min dans une solution de PBS contenant : 3% H_2O_2,
    - 0,3% de sérum de cheval (Vector Laboratory, France)
    - 0,5% de Triton X-100.
- Rinçage des tissus 2 fois 2 min dans du PBS
- Saturation des coupes dans une solution de PBS contenant 10% de sérum de cheval pendant 30 min
- Rinçage des tissus 2 fois 2 min dans du PBS
- Incubation toute une nuit à température ambiante dans l'anticorps anti 8-OHdG (Chemicon, Temecula, CA, USA) dilué à 1/200 dans du PBS ou dans du PBS pour les témoins négatifs.
- Rinçage des tissus 2 fois 2 min dans du PBS
- Incubation 3 heures à température ambiante dans un anticorps secondaire (anti-chèvre-HRP, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) dilué à 1/400 dans du PBS.
- Rinçage des tissus 2 fois 2 min dans du PBS
- Révélation du marquage immunohistochimique par incubation pendant 30 sec dans une solution de PBS contenant pour 60 ml :

30 mg de DAB

90 mg de Nickel-Chlore

11 µl d' H_2O_2

- Rinçage des coupes 2 fois 2 min dans du PBS
- Séchage des lames
- Déshydratation des coupes dans un bain l'alcool 100° puis dans du xylène
- Montage à l'Eukitt.
- Le marquage, de couleur brun-noir est cellulaire, visible essentiellement dans les péricaryons. Ceux-ci présentent deux types de marquage : l'un, uniforme, intéressant l'ensemble du corps cellulaire; l'autre, partiel, formant une couronne en périphérie du corps cellulaire.

4-3- Le marquage immunohistochimique de l'oxyde nitrique synthétase neuronal (nNOS)

L'anticorps primaire utilisé marque de façon spécifique l'isoforme 1, neuronal, du NOS. Comme l'anticorps utilisé vient du laboratoire ABCAM™, le protocole de marquage utilisé est celui que ce laboratoire préconise pour tous les anticorps qu'ils commercialisent. Comme précédemment, l'évaluation du marquage est réalisée sur certaines régions (20-30 régions) et le nombre d'animaux est réduit à 5-8 dans chaque groupe. Une série de lames supplémentaire est utilisée pour le témoin négatif.

Protocole immunohistologique

- Séchage des lames pendant au moins 2 heures à température ambiante
- Fixation des coupes 7 min à température ambiante dans un bain d'acétone refroidi au préalable à 20℃ pendant 30 min
- Rinçage des tissus 3 fois 5 min avec du PBS (tampon phosphate-salin) refroidi à 4℃
- Séchage des lames à température ambiante
- Cerclage des coupes par une résine hydrophobe (Dakopen™) pour permettre un marquage directe sur lame horizontale sans immersion.
- Blocage des liaisons non-spécifiques par incubation des coupes pendant 40 minutes, dans une solution de 10% de BSA (Bovine Sérum Albumine) dans du tampon PBS, à température ambiante.
- Rinçage bref des coupes au PBS

- Incubation des coupes avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin (bNOS : brain nitric oxyde synthase, Abcam, France) pendant toute la nuit à 4℃. La dilution est de 1/800 dans du PBS contenant 1% de BSA.
- Rinçage des coupes 3 fois 5 min dans du PBS à température ambiante
- Incubation des coupes avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase (HRP) pendant une heure à température ambiante et à la dilution de 1/800 dans du PBS
- Rinçage des coupes 3 fois 5 min dans du PBS à température ambiante

Révélation du marquage immunohistochimique par incubation pendant 1 min dans une solution de PBS contenant pour 60 ml :

  - 30 mg de DAB
  - 90 mg de Nickel-Chlore
  - 11 µl d' H_2O_2

- Rinçage des coupes 2 fois 5 min dans du PBS
- Séchage des lames
- Déshydratation des coupes dans un bain l'alcool 100° puis dans du xylène
- Montage à l'Eukitt.

Le marquage positif, de couleur noir, s'observe au microscope à transmission en lumière blanche. Le marquage est intracellulaire, visible dans le corps cellulaire.

4.4. L'analyse des marquages immunohistochimiques

L'observation est faite au microscope Ces régions sont repérées à l'aide d'un atlas de stéréotaxie (Franklin et Paxinos, 1997) et des photos sont prises de ces structures à grossissement x20 avec des paramètres d'intensité lumineuse et de focus stables.

Les photos sont capturées à l'aide d'une caméra digitale (DP 70, Olympus), chaque photo couvrant une surface tissulaire de 400 x 301 $\mu m^{2.}$ Pour les régions corticales, 3 photos sont donc nécessaires pour couvrir l'ensemble des 6 couches cellulaires et chaque cortex a été étudié à deux niveaux différents séparés de 150 µm, soit 6 photos pour chaque cortex. Pour les régions nucléaires, 2 photos sont prises à deux niveaux différents. Ainsi, une étude intergroupe d'une trentaine de régions cérébrales entre 6 souris contrôles d'un côté et 6 souris génétiquement modifiées de l'autre nécessitent le traitement d'environ 1200 images.

La quantification des marquages immunohistologiques est faite au moyen d'un logiciel d'analyse d'image (MCID™, Interfocus, UK) à partir des images importées. Toutes les analyses sont effectuées par le même expérimentateur. L'appareil est calibré à l'aide d'une échelle de gris fournie par Kodak™.

Cette quantification peut se faire de plusieurs façons :

1) la surface occupée par les cellules marquées ou cellules dites positives (Staining Cell) sera mesurée par rapport à la surface totale de l'image analysée (Proportionnel Area). Ce mode d'évaluation est utilisé pour la fluorescence ou lorsque le marquage positif est susceptible d'augmenter en quantité de surface (nombre de cellules atteintes augmente). Il a l'avantage d'être entièrement automatisé à partir du moment où les paramètres qui définissent le marquage positif ont été déterminés au départ. Les pixels isolés sont éliminés automatiquement.

Le marquage positif est paramétré pour chaque coupe ou chaque image. Il peut-être défini par soustraction systématique d'un marquage non-spécifique "de fond" (zone ventriculaire ou zone fasciculaire lorsque le marquage est cellulaire par exemple). Il peut également être défini arbitrairement, comme 2 fois (ou n fois) supérieur à un marquage non spécifique moyen déterminé sur 10 mesures "de fond".

2) les cellules dites positives sont comptées et le marquage positif est exprimé en % de cellules positives par rapport au nombre total de cellules évaluées. Ce mode de quantification est utilisée lorsque la densité du marquage intratissulaire augmente (accumulation intracellulaire par exemple comme dans le marquage du 8-OHdG). Il est bien évidemment plus précis que le précédent.

Les paramètres à définir sont : le seuil minimal d'intensité déterminé arbitrairement en fonction du marquage non-spécifique de fond (comme expliqué dans le paragraphe précédent); la taille de l'élément à évaluer; sa forme peut également être déterminée. Le logiciel sélectionne alors les éléments marqués en fonction des paramètres. Le comptage est fait automatiquement.

BIBLIOGRAPHIE

Abe T., Tohgi H., Isobe C., Murata T., Sato C. Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res*., 2002, 70, 447-450.

Abramov AY., Canevari L., Duchen MR. Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J.Neurosci.,* 2004, 24, 565–575

Aksenov MY., Tucker HM., Nair P., Aksenova MV., Butterfield DA., Estus S., Markesbery WR. The expression of several mitochondrial and nuclear genes encoding the subunits of electron transport chain enzyme complexes, cytochrome c oxidase, and NADH dehydrogenase, in different brain regions in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.,* 1999, 24, 767-774.

Andreasen N., and Blennow K. Beta-amyloid (Abeta) protein in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *Peptides*, 2002, 23, 1205-1214.

Ankarcrona M., Hultenby K. Presenilin-1 is located in rat mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 2002, 295, 766-770.

Apelt J., Kumar A., Schliebs R. Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human B-amyloid precursor protein. *Brain Res.* 2002, 953, 17-30.

Arendt T., Brückner MK., Lange M., Bigl V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development a study of molecular forms. *Neurochem. Int*., 1992, 21, 3, 381-96

Arnold SE., Hyman BT., Flory J., Damasio AR., Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex*, 1991, 1, 103-116.

Arriagada PV., Growdon JH., Hedley-Whyte T., Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology,* 1992, 42, 631-639

Atack JR., Perry EK., Bonham JR., Perry RH., Tomlinson BE., Blessed G., Fairbain A. Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form. *Neurosci. Lett.,* 1983, 40, 199-204.

Atwood CS., Moir RD., Huang X., Scarpa RC., Bacarra NM., Romano DM., Hartshorn MA., Tanzi RE., Bush AI. Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol. Chem*., 1998, 22, 273, 21, 12817-26.

Atwood CS., Obrenovich ME., Liu T., Chan H., Perry G., Smith MA., Martins RN. Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res. Rev.,* 2003, 43, 1, 1-16.

Auld DS., Kar S., Quirion R. B-amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link?. *Trends Neurosci*., 1998, 21, 43-49.

Baker G.B. and Reynolds, G.P. Biogenic amines and their metabolites in Alzheimer's disease :Noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, and 5-hydroxyindole-3 acetic acid depleted in hippocampus but not in substantia innominata. *Neurosci. Lett.,* 1989, 100, 335-339.

Baloyannis SJ. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis., 2006, 9, 2, 119-26.

Barbelivien A., Bertrand N., Besret L., Beley A., MacKenzie ET., Dauphin F. Neurochemical stimulation of the rat substantia innominata increases cerebral blood flow (but not glucose use) through the parallel activation of cholinergic and non-cholinergic pathways. *Brain Res.*,1999, 4;840, 1-2, 115-24.

Bard F., Cannon C., Barbour R., Burke RL., Games D., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Lieberburg I., Motter R., Nguyen M., Soriano F., Vasquez N., Weiss K., Welch B., Seubert P., Schenk D., Yednock T. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med*., 2000, 6, 8, 916-9.

Barelli H., Lebeau A., Vizzavona J., Delaere P., Chevallier N., Drouot C., Marambaud P., Ancolio K., Buxbaum JD., Khorkova O., Heroux J., Sahasrabudhe S., Martinez J., Warter JM., Mohr M., Checler F. Characterization of new polyclonal antibodies specific for 40 and 48 amino-acid long amyloid beta peptides : Their use to examine the cell biology of presenilins and the immunohistochemistry of sporadic Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy cases. *Molec Med*, 1997, 3, 695-707.

Barrow PA., Empson RM., Gladwell SJ., Anderson CM., Killick R., Yu X., Jefferys JGR., Duff K. Functional phenotype in transgenic mice expressing human mutant *presenilin-1*. *Neurobiol. Dis.* 2000, 7, 119-126.

Bartenstein P., Minoshima S., Hirsch C., Buch K., Willoch F., Mösch D., Schad D., Schwaiger M., Kurz A. Quantitative assessment of cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease by SPECT, *J. Nucl. Med.*,1997, 38, 7, 1095-101.

Bartolini M., Bertucci C., Cavrini V., Andrisano V. B-amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.,* 2003, 65, 407-416.

Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.,* 2000, 163, 2, 495-529.

Bartus RT., Dean RL.3rd, Beer B., Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 1982, 30;217, 4558, 408-14.

Bartzokis G., Cummings JL., Sultzer D., Henderson VW., Nuechterlein KH., Mintz J. White matter structural integrity in healthy aging adults and patients with Alzheimer disease: a magnetic resonance imaging study. *Arch. Neurol*., 2003, 60, 393-398.

Baskin DS., Browning JL., Pirozzolo FJ., Korporaal S., Baskin JA., Appel SH. Brain choline acetyl-transferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.,* 1999, 56, 1121-1123.

Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Annals of Neurology,* 1992, 31, 119–130.

Beal MF. Oxidative damage as an early marker of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment, *Neurobiol Aging*., 2005, 26, 5, 585-6.

Beal MF. Oxidative metabolism. *Ann N Y Acad. Sci.,* 2000, 924,164-9.

Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol.,* 1995, 38, 357-366.

Begley JC., Duan W., Chan S., Duff K., Mattson MP. Altered calcium homoestasis and mitochondrial dysfunction in cortical synaptic compartments of presenilin-1 mutant mice. *J. Neurochem*., 1999, 72, 1030-1039.

Behl C., Davis JB., Lesley R., and Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell*, 1994, 77, 817-827.

Bell KFS., Bennett DA., Cuello AC. Paradoxical upregulation of glutamatergic presynaptic boutons during mild cognitive impairment. *J Neurosci.*, 2007, 27,10810-10817.

Bell KFS., Cuello AC. Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.,* 2006, 545,11-21.

Bell KFS., de Kort GJL., Steggerda S., Shigemoto R., Ribeiro-da-Silva A., Cuello AC. Structural involvement of the glutamatergic presynaptic boutons in a transgenic mouse model expressing early onset amyloid pathology. *Neurosci. Lett.*, 2003, 353,143-147.

Bennett MC., Rose GM. Chronic sodium azide treatment impairs learning of the Morris water maze task. *Behav. Neural. Biol*., 1992, 58, 1, 72-5..

Benson T.F., Kuhl D., Hawkins R., Phelps M.E., Cummings J.L. and Tsai S.Y. The fluorodeoxyglucose F scan in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Arch. Neurol.,* 1983, 40, 711-714

Bentivoglio M., Kultas-Llinsky K., Llinsky IA. Limbic thalamus: structure, intrinsic organization, and connections. In Vogt BA., Gabriel M., editors. Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus: *A comprehensive handbook. Boston: Birkhauser*, 1993.

Bierer LM., Haroutunian V., Gabril S., Knott PJ., Carlin LS., Purohit DP., Perl DP., Schmeidler J., Kanof P., Davis KL. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J. Neurochem*.,1995, 64, 749-60.

Blanchard BJ., Konopka G., Russell M., Ingram VM. Mechanism and prevention of neurotoxicity caused by beta-amyloid peptides: relation to Alzheimer's disease, *Brain Res*., 1997, 21, 776, 1-2, 40-50.

Blass JP. and Gibson GE. The role of oxidative: abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Revue Neurologique,* 1991, 147, 513–525.

Blass JP. The mitochondrial Spiral An Adequate Cause of Dementia in the Alzheimer's Syndrome. *P.N.A.S*, 2000, 170-183.

Blusztajn JK., Berse B. The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease. *Met. Brain Dis.,* 2000, 15, 45-64.

Bolam JP., Francis CM., Henderson Z. Cholinergic input to dopaminergic neurons in the substantia nigra: a double immunocytochemical study. *Neuroscience,*1991, 41, 483-94.

Bolam JP. Experimental Neuroanatomy. A practical approach. In : *The Practical Approach Series*. (Rickwood D. and Hames D., eds), *Oxford University Press*, New York, 1992.

Boncristiano S., Calhoun ME., Kelly PH., Pfeifer M., Bondolfi L., Stalder M., Phinney AL., Abramowski D., Sturchler-Pierrat C., Enz A., Sommer B., Staufenbiel M., Jucker M. Cholinergic changes in the APP23 transgenic mouse model of cerebral amyloidosis. *The J. of Neuroscience*, 2002, 22, 8, 3234-3243.

Borchelt DR., Van Lare J., Lee MK., Gonzalez V., Jenkins NA., Copeland NG., Price DL., Sisodia SS. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron,* 1997, 19, 939-945.

Broe M., Shephard CE., Milward EA., Halliday GM. Relationship between DNA fragmentation, morphological changes and neuronal loss in Alzheimer's Presenilin Transgenic Mice 191 disease and dementia with Lewy bodies. *Acta. Neuropathol.,* 2001, 101, 616-624.

Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999, 1411, 351-369.

Bubber P., Haroutunian V., Fisch G., Blass JP., Gibson GE. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann Neurol.*, 2005, 57, 695–703.

Burk JA., Mair RG. Effects of intralaminar thalamic lesions on sensory attention and motor intention in the rat: A comparison with lesions involving frontal cortex and hippocampus. *Behav. Brain Res*., 2001,123, 49-63.

Busche MA., Eichhoff G., Adelsberger H., Abramowski D., Wiederhold KH., Haass C., Staufenbiel M., Konnerth A., Garaschuk O. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science,* 2008, 19, 321, 5896, 1686-9.

Busciglio J., Hartmann H., Lorenzo A., Wong C., Baumann K., Sommer B., Staufenbiel M., Yankner BA. Neuronal localization of presenilin-1 and association with amyloid plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. J. Neurosci*., 1997, 1, 17, 13, 5101-7.

Busciglio J., Gabuzda DH., Matsudeira P., and Yankner BA. Generation of β-amyloid in the secretory pathway in neuronal and noneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 2092-2096.

Busciglio J., Lorenzo A., Yeh J., and Yankner BA. Beta-amyloid fibril induces tau phosphorylation and loss of microtubules binding. *Neurons*, 1995, 14, 879-888.

Butcher LL., Cholinergic neurons and networks. In Paxinos G. (ed) The Rat Nervous System, 2nd ed. Academic Press, New York, 1995, 1003-1015.

Callen DJA., Black SE., Gao F., Caldwell CB., Szalai JP. Beyond the hippocampus: MRI volumetry confirms widespread limbic atrophy in AD. *Neurology*, 2001, 57, 1669-1674.

Campion D., Dumanchin C., Hannequin D., Dubois B., Bellliard S., Puel M., Thomas-Anterion C., Michon A., Martin C., Charbonnier F., Raux G., Camuzat A., Penet C., Mesnage V., Martinez M., Clerget-Darpoux F., Brice A., Frebourg T. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J.Hum. Genet*., 1999, 65, 664-70.

Campion D., Brice A., Dumanchin C., Puel M., Baulac M., De La Sayette V., Hannequin D., Duyckaerts C., Michon A., Martin C., Moreau V., Penet C., Martinez M., Clerget-Darpoux F., Agid Y., Frebourg, T. A novel *presenilin 1* mutation in familial Alzheimer's disease with an onset age of 29 years. *Neuro.Report.*, 1996, 7,1582-1584

Campion D., Brice A., Hannequin D., Tardieu S., Dubois B., Calenda A., Brun E., Penet C., Tayot J., Martinez M. A large pedigree with early-onset Alzheimer's disease: clinical, neuropathologic, and genetic characterization. *Neurology*, 1995, 45, 80-85.

Canevari L., Abramov AY., Duchen MR. Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochem Res.,* 2004, 29, 3, 637-50.

Canevari L., Clark JB., Bates TE. B-amyloid fragment 25-35 slectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *F.E.B.S. Lett.*, 1999, 457,131-134.

Cardoso SM., Santana I., Swerdlow R.H. and Oliveira CR. Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity. *J. Neurochem*., 2004, 89, 1417–1426.

Casley CS., Canevari L., Land JM., Clark JB., Sharpe MA. B-Amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J. Neurochem.*, 2002, 80, 91-100.

Cassarino DS., Bennett JP. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.*, 1999, 29,1-25.

Castellani R., Hirai K., Aliev G., Drew KL., Nunomura A., Takeda A., Cash AD., Obrenovich ME., Perry G., Smith MA. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.,* 2002, 70, 357–60.

Chan SL., Mayne M., Holden CP., Geiger JD., Mattson MP. Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J. Biol. Chem*., 2000, 16, 275, 24, 18195-200.

Chandrasekaran K., Giordano T., Brady DR., Stoll J., Martin LJ. and Rapoport SI. Impairment in mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer disease, *Brain Research Molecular Brain Research,*1994, 24, 336–340.

Chandrasekaran K., Hatanpää K., Brady DR., Stoll J., Rapoport SI. Downregulation of oxidative phosphorylation in Alzheimer disease: loss of cytochrome oxidase subunit mDNA in the hippocampus and entorhinal cortex. *Brain Res.*, 1998, 796,13-19.

Chen JY., Stern Y., Sano M., Mayeux R. Cumulative risks of developing extrapyramidal signs, psychosis, or myoclonus in the course of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.,* 1991, 48, 1141-1143.

Chételat G., Desgranges B., De La Sayette V., Viader F., Eustache F., Baron JC. Mild cognitive impairment: can FDG-PET predict who is rapidly convert to Alzheimer's disease? *Neurology*, 2003, 60, 1374-1377.

Christie R., Yamada M., Moskowitz M., Hyman B. Structural and functional disruption of vascular smooth cells in a transgenic mouse model of amyloid angiopathy. *Am. J. Pathol*., 2001, 158, 1065-1071.

Chui DH., Tanahashi H., Ozawa K., Ikeda S., Checler F., Ueda O., Suzuki H., Araki W., Inoue H., Shirotani K., Takahashi K., Gallyas F., Tabira T. Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nature Med*., 1999, 5, 560-564.

Chui DH., Tanahashi H., Ozawa K., Ikeda S., Checler F., Ueda O., Suzuki H., Araki W., Inoue H., Shirotani K., Takahashi K., Gallyas F., Tabira T. Transgenic mice with Alzheimer *presenilin 1* mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nature Med*, 1995, 5, 560-564.

Chung JA., Cummings JL. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Neurol. Clin.,* 2000, 18, 829-846.

Citron M., Westway D., Xia W., Carlson G., Diehl T., Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M., Seubert P., Davis A., Kholodenko D., Motter R., Sherrington R., Perry B., Yao H., Strome R., Lieberburg I., Rommens J., Kim S., Schenk D., Fraser P., St George Hyslop P., Selkoe DJ. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid B-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Med.*, 1997, 3, 67-72.

Cleeter MW., Cooper JM., Darley-Usmar VM., Moncada S., Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *F.E.B.S. Lett*.,1994, 23, 345,1, 50-4.

Cole JC., Rodgers RJ. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plusmaze. *Behav. Pharmacol.,* 1993, 4, 573-580.

Colurso GJ., Nilson JE., Vervoort LG. Quantitative assessment of DNA fragmentation and beta-amyloid deposition in insular cortex and midfrontal gyrus from patients with Alzheimer's disease. *Life Sci.,* 2003, 73, 1795-1803.

Connor B., Beilharz EJ., Williams C., Synek B., Gluckman PD., Faull RJM., Dragonow M. Insulin-like growth factor-I IGF-I. immunoreactivity in the Alzheimer's disease temporal cortex and hippocampus. *Mol. Brain Res.,* 1997, 49, 283–290.

Contestabile A., Fila T., Bartesaghi R., Contestabile A., Ciani E. Choline acetyltransferase activity at different ages in brain of Ts65Dn mice, an animal model for Down's syndrome and related neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.,* 2006, 97, 515-526.

Cordell B., and Higgins L. Transgenic mouse model of Alzheimer's disease. In: Masters CL eds. Amyloid protein precursor in development aging and Alzheimer's disease. *Springer-Verlag*, 1994, 144-155.

Cottingham MG., Hollinshead MS., Vaux DJ. Amyloid fibril formation by a synthetic peptide from a region of human acetylcholinesterase that is homologous to the Alzheimer's amyloid-beta peptide. *Biochemistry*, 2002, 19, 41, 46, 13539-47.

Cottrell DA., Blakely EL., Johnson MA., Ince PG., Turnbull DM. Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD. *Neurology*, 2001, 57, 260-264.

Coyle JT., Price DL., DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science,* 1983, 219, 1184-1190.

Craft S., Asthana S., Schellenberg G., Baker L., Cherrier M., Boyt AA., Martins RN., Raskind M., Peskind E., Plymate S. Insulin effects on glucose metabolism, memory, and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease differ according to apolipoprotein-E genotype. *Ann. N.Y. Acad. Sci*., 2000, 903**,** 222–228.

Crouch PJ., Blake R., Duce JA., Ciccotosto GD., Li Q-X., Barnham KJ., Curtain CC., Cherny RA., Cappai R., Dyrks T., Masters CL., Trounce IA. Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-B_{1-42}. *J. Neurosci.*, 2005, 25, 672-679.

Cuello AC. Trophic responses of forebrain cholinergic neurons: a discussion. *Prog. Brain Res*., 1993, 98, 265-77

Cummings BJ., Pike CJ., Shankle R., Cotman CW. Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 1996, 17, 6, 921-33.

Cummings JL., Vinters HV., Cole GM., and Khachaturian ZS. Alzheimer's disease : etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatement opportunities. *Neurology*, 1998, 51, S2-17.

Czech C., Lesort M., Tremp G., Terro F., Blanchard V., Schombert B., Carpentier N., Dreisler S., Bonici B., Takashima A., Moussaoui S., Hugon J., Pradier L. Characterization of human *presenilin 1* transgenic rats : increased sensitivity to apoptosis in primary neuronal cultures. *Neuroscience*, 1998, 87, 325-336.

Czech C., Tremp G., Pradier L. Presenilins and Alzheimer's disease : biological functions and pathogenic mechanisms. *Prog Neurobiol*., 2000, 60, 363-384.

Daffner KR., Scinto LFM., Weintraub S., Guinessey JE., Mesulam MM. Diminished curiosity in patients with probable Alzheimer's disease as measured by exploratory eye movements. *Neurology,* 1992, 42, 320-328.

Damjanac M., Rioux-Bilan A., Barrier L., Pontcharraud R., Anne C., Hugon J., Page G. Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res.,* 2007, 1128, 40-49.

Davies P., Maloney AJF. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, 1976; 2, 1403.

Davies RE., Miller S., Herrnstadt C., Ghosh SS., Fahy E., Shinobu LA., Galasko D., Thal LJ., Beal MF., Howell N., and Davis Parker W. Jr. Mutations in mitochondrial cytochrome *c* oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 29, 94, 9, 4526–4531.

De la Monte SM., Chiche J., von dem Bussche A., Sanyal S., Lahousse SA., Janssens SP., Bloch KD. Nitric oxide synthase-3 overexpression causes apoptosis and impairs neuronal mitochondrial function: relevance to Alzheimer's-type neurodegeneration. *Lab. Invest.*, 2003, 83, 2, 287-98.

De la Monte SM., Neely TR., Cannon J., Wands JR. Oxidative stress and hypoxia-like injury cause Alzheimer-type molecular abnormalities in central nervous system neurons. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000, 57, 1471-1481.

De Strooper B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active gamma- Secretase Complex. *Neuron*, 2003, 38, 1, 9-12.

De Strooper B., Beullens M., Contreras B., Levesque L., Craessaerts K., Cordell B., Moechars D., Bollen M., Fraser P., George-Hyslop PS., Van Leuven Fl. Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J. Biol. Chem*., 1997, 272, 6, 3590-8.

DeKosky ST., Harbaugh RE., Schmitt FA., Bakay RAE., Chui HC., Knopman DS., Reeder TM., Shetter AG., Senter HJ., Markesbery WR. Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. *Ann. Neurol.,* 1992, 32, 625-632.

DeKosky ST., Ikonomovic MD., Styren SD., Beckett L., Wisniewski S., Bennet DA., Cochran EJ., Kordower JH., Mufson EJ. Upregulation of cholinetransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.,* 2002, 51, 145-155.

Delacourte A., Sergeant N., Wattez A., Gauvreau D., Robitaille Y. Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann. Neurol*., 1998, 43, 2, 193-204.

Derouesné C., Thibault S., Lagha-Pierucci S., Baudouin-Madec V., Ancri D., Lacomblez L. Decreased awareness of cognitive deficits in patients with mild dementia of the Alzheimer type*. Int J Geriatr Psychiatry*. 1999, 14, 12, 1019-30.

Desgranges B., Eustache F., Rioux P., de la Sayette V., Lechevalier B. Memory disorders in Alzheimer's disease and the organization of human memory. *Cortex*, 1996, 32, 387-412.

Dickerson BC., Salat DH., greve DN., Chua EF., Rand-Giovannetti E., Rentz DM., Bertram L., Mullin K., Tanzi RE., Blacker D., Albert MS., Sperling RA. Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging and AD. *Neurology,* 2005, 65, 404-411.

Dinamarca MC., Arrázola M., Toledo E., Cerpa WF., Hancke J., Inestrosa NC. Release of acetylcholinesterase (AChE) from beta-amyloid plaques assemblies improves the spatial memory impairments in APP-transgenic mice. *Chem. Biol. Interact*., 2008, 25;175, 1-3, 142-149.

Dodart JC., Mathis C., Bales KR., Paul SM., Ungerer A. Early regional glucose hypometabolism in transgenic mice overexpressing the V717F B-amyloid precursor protein. *Neurosci. Lett*., 1999, 277, 49-52.

Dowjat WK., Wisniewski H., Wisniewski T. Alsheimer's disease presinilin-1 expression modulates the assembly of neurofilaments. *Neuroscience,* 2001, 103, 1-8.

Dubois B., Dartigues JF. La maladie d'Alzheimer. Odile Robert, www.frm.org/Scientifique/Sujetsfond/alzheimer/alzheimer.htm. *Fondation pour la Recherche Médicale*, 1998, Bordeaux février.

Dudkin KN., Chueva V., Makarov FN., Bich TG., Roer AE. Impairments in working memory and decision taking processes in monkeys in a model of Alzheimer's disease. *Neurosci. Behav. Physiol*., 2005, 35, 3, 281-9.

Duering M., Grimm MOW., Grimm HS., Schröder J., and Hartmann T. Mean age of onset in familial Alzheimer's disease is determined by amyloid beta 42. *Neurobiology of Aging*, 2005, 26, 6, 785-788.

Duff K., Eckman C., Zehr C., Yu X., Prada C-M., Perez-tur J., Hutton J., Buee L., Harigaya Y., Yager D., Morgan D., Gordon MN., Holcomb L., Refolo L., Zenk B., Hardy J., Younkin S. Increased B-amyloid42(43) in brains of mice expressing mutant *presenilin 1*. *Nature*, 1996, 383, 710-713.

Dumont M., Lalonde R., Ghersi-Egea JF., Fukuchi K., Strazielle C. Regional acetylcholinesterase activity and its correlation with behavioral performances in 15-month old transgenic mice expressing the human C99 fragment of APP. *J. Neural Transmission*, 2006, 113, 9, 1225-41.

Duyckaerts C., Colle MA., Delatour B., Hauw JJ. Maladie d'Alzheimer: les lésions et leur progression. *Rev. Neurol*., 1999, 155, S4, 17-27.

Duyckaerts C., Hauw JJ., Piette F., Rainsard C., Poulain V., Berthaux P., Escourolle R. Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length. *Acta. Neuropathol*., 1985, 66, 1, 72-4.

Dyrks T., Weidemann A., Multhaup G., Salbaum JM., Lemaire HG., Kang J., Müller-Hill B., Masters CL., Beyreuther K. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO. J.,* 1988, 7, 4, 949-57.

Eckert A., Keil U., Marques CA., Bonert A., Frey C., Schussel K., Muller WE. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer’s disease. *Biochem. Pharmacol.,* 2003, 66, 1627–1634.

Eikelenboom P., Bate C., Van Gool WA., Hoozemans JJM., Rozemuller JM., Veerhuis R., Williams A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia,* 2002, 40, 232-239.

Ellman GL., Courtney KD., Andres VJ., Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase in primary cortical neurons. *J. Neurochem*., 1961a, 81, 441-8.

Ellman GL., Courtney KD., Andres VJ., Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961b, 7, 88-95.

Eustache F., Desgranges B., Aupée A.M., Guillery B., Baron, J.C. Functional neuroanatomy of amnesia : positron emission tomography studies. *Microscopy Research and Technique*, 2000, 51, 94-100.

Eustache F., Desgranges B., de la Sayette V., Lalevée C., Giffard B., Piolino P., Viader F., Baron JC. Contribution de la tomographie par émission de positons à la neuro-anatomie fonctionnelle de la maladie d'Alzheimer. *Revue Neurologique (Paris)* 2001, 157, 377-383.

Fodero LR., Mok, SS., Losic D., Martin LL., Aguilar MI., Barrow CJ., Livett BG., Small DH. 7-Nicotinic acetylcholine receptors mediate an AB_{1-42}-induced increase in the level of acetylcholinesterase in primary cortical neurons. *J. Neurochem*., 2004, 88, 1186-1193.

Fodero LR., Saez-Valero J., McLean CA., Martins RN., Beyreuther K., Masters CL., Robertson TA., Small DH. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in APP (sw) Tg2576 transgenic mice occurs prior to amyloid plaque deposition. *J. Neurochem*., 2002, 81, 441-448.

Fontanesi F., Soto IC., Horn D., Barrientos A. Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *Am J Physiol Cell Physiol*., 2006, 291, 6, C1129-47.

Förstl H., Burns .A, Cairns N., Luthert P., Lantos P., Levy R. Organic correlates of depressive symptoms in Alzheimer's dementia. Results of a prospective study, review of the literature. *Nervenarzt.,* 1992, 63, 9, 566-74.

Förstl H., Burns A., Levy R., Cairns N., Luthert P., Lantos P. Neurologic signs in Alzheimer's disease: results of a prospective clinical and neuropathologic study. *Arch. Neurol.,* 1992, 49, 1038-1042.

Franklin KBJ., Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, New York, 1997.

Friedland RP., Budinger TF., Ganz E., Yano Y., Mathis CA., Koss B., Ober BA., Huesman RH., Derenzo SE. Regional cerebral metabolic alterations in dementia of the Alzheimer type: positron emission tomography with [18F]fluorodeoxyglucose. *J. Comput. Assist. Tomogr*.,1983, 7, 4, 590-8.

Frisoni GB., Rozzini L., Gozetti A., Binetti G., Zanetti O., Bianchetti A., Trabucchi M., Cummings JL. Behavioral syndromes in Alzheimer's disease: description and correlates. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.,* 1999., 10, 130-138.

Frisoni GB., Testa C., Zorzan A., Sabattoli F., Beltramello A., Laakso MP. Detection of grey matter loss in mild Alzheimer's disease with voxel based morphometry. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 2002, 73, 657-664.

Frölich L. The cholinergic pathology in Alzheimer's disease-discrepancies between clinical experience and pathophysiological findings. *J. Neural. Transm.,* 2002, 109, 7-8, 1003-13.

Fukuchi K., Sopher B., Furlong CE., Smith AC., Dang N., Martin GM. Selective neurotoxicity of COOH-terminal fragments of the beta-amyloïd precursor protein. *Neurosci. Lett*., 1993, 154, 145-148.

Fukui H. and Moraes CT. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends in Neurosciences ,* 2008, 31, 5.

Fukui H., Diaz F., Garcia S., Moraes CT. Cytochrome c oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS*, 2007, 104, 14163-14168.

Gabbita SP., Lovell MA., Markesbery WR. Increase nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.,* 1998, 71, 2034-2040.

Gabuzda D., Busciglio J., Chen LB., Matsudeira P. and Yankner BA. Inhibition of energy metabolism alteres the processing of amyloid precursor protein and induces the potentially amyloidogenic derivative. *J. Biol. Chem.,* 1994, 269,13623-13628.

Gallez C. Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées au nom de l'Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé. 2005, N : 2454.

Geerlings MI., Launer LJ., de Jong FH., Ruitenberg A., Stijnen T., Van Swieten JC., Hofman A., Witteman JC., Pols HA. and Breteler MM. Endogenous estradiol and risk of dementia in women and men : The Rotterdam study. *Ann. Neurol., 2003,* 53, 607-615.

Gelinas DS., DaSilva K., Fenili D., St George-Hyslop P., McLaurin J. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*., 2004, 5, 101 Suppl 2, 14657-62.

Geula C., Mesulam MM. Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex,* 1996, 6, 165-177.

Geula C., Wu CK., Saroff D., Lorenzo A., Yuan M., Yankner BA. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat. Med.,* 1998, 4, 827–831.

Giannakopoulos P., Bouras C., Kövari E., Shioi J., Tezapsidis N., Hof PR., Robakis NK. Presenilin-1 immunoreactive neurons are preserved in late-onset Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.,* 1997, 150, 429-436.

Gibson GE., Sheu KF., Blass JP., Baker A., Carlson KC., Harding B., Perrino P. Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease, *Arch. Neurol.,* 1988, 45, 8, 836-40.

Gibson GE., Park LC., Sheu KF., Blass JP., Calingasan NY. The alphaketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration. *Neurochem. Int.,* 2000, 36, 97–112.

Gil-Bea FJ., Garcia-Alloza M., Dominguez J., Marcos B., Ramirez MJ. Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit. Neurosci*. Lett.,* 2005, 375, 37-41.

Gleener GG., Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebro-vascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 120, 885-890.

Goate A. Chartier-Harlin MC., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1991, 21, 349, 6311, 704-6.

Goate AM. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Geriatrics*, 1997, 52, Suppl 2, S9-12.

Goekoop R., Scheltens P., Barkhof F., Rombouts SA. Cholinergic challenge in Alzheimer patients and mild cognitive impairment differentially affects hippocampal activation-a pharmacological fMRI study. *Brain,* 2006, 129, 141-57.

Gomez-Isla T., Hollister R., West H., Mui S., Growdon JH., Petersen RC., Parisi JE., Hyman BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol*., 1997, 41, 17-24.

Gomez-Ramos P., Mufson EJ., Moran MA. Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in neurofibrillary tangles, neuropil threads and senile plaques in aged and Alzheimer's brain. *Brain Res.,* 1992, 569, 229-237.

Gonzalez-Lima F., Jones D. Quantitative mapping of cytochrome oxidase activity in the central auditory system of the gerbil: a study with calibrated activity standards and metal-intensified histochemistry. *Brain Res.,* 1994, 660, 34-39.

Gonzalez-Lima F., Valla J., Matos-Collazo S. Quantitative cytochemistry and cellular morphometry of the human inferior colliculus in control and Alzheimer's patients. *Brain Res*., 1997, 752, 117-126.

Gouras GK., Almeida CG., Takahashi RH. Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging,* 2005, 26, 1235-1244.

Gouras GK., Tsai J., Naslund J., Vincent B., Edgar M., Checler F., Greenfield JP., Haroutunian V., Buxbaum JD., Xu H., Greengard P., Relkin NR. Intraneuronal Aβ42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol*., 2000, 156, 15–20.

Gowing E., Roher AE., Woods AS., Cotter RJ., Chaney M., Little SP., Ball MJ. Chemical characterization of A beta 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Biol Chem.,* 1994, 269, 15, 10987-90.

Graham NL., Emery T., Hodges JR. Distinctive cognitive profiles in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry,* 2004, 75, 61-71.

Graybiel AM. The basal ganglia. *Trends Neurosci.,* 1995, 18, 60-62.

Grilli M., Diodato E., Lozza G., Brusa R., Casarini M., Uberti D., Rozmahel R., Westaway D., St George-Hyslop P., Memo M., Ongini E. Presenilin-1 regulates

the neuronal threshold to excitotoxicity both physiologically and pathologically. *PNAS*., 2000, 97, 12822-12827.

Groenewegen HJ., Witter MP. Thalamus. In Paxinos G, editor. *The rat nervous system. San Diego: Elsevier*, 2004, 407-53.

Guo Q., Fu W., Sopher BL., Miller MW., Ware CB., Martin GM., Mattson MP. Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in *presenilin-1* mutant knock-in mice. *Nature Med.,* 2005, 5, 101-106.

Guo Q., Furukawa K., Sopher BL., Pham DG., Xie J., Robinson N., Martin GM., Mattson MP. Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. *Neuroreport*, 1996, 20, 8, 1, 379-83.

Guo Q., Sebastian L., Sopher BL., Miller MW., Ware CB., Martin GM., Mattson MP. Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid B-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J. Neurochem*., 1999, 72, 1019-1029.

Haass C., Schlossmacher MG., Hung AY., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski BL., Lieberburg I., Koo EH., Schenk D., Teplow DB. Amyloid β-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 1992, 359, 322-325.

Haier RJ., Alkire MT., White NS., Uncapher MR., Head E., Lott IT., Cotman CW. Temporal cortex hypermetabolism in Down syndrome prior to the onset of dementia. *Neurology*, 2003, 61, 1673-1679.

Hallanger AE., Levey AI., Lee HJ., Rye DB., Wainer BH. The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol*., 1987, 1; 262, 1,105-24.

Hamblet NS., Ragland B., Ali M., Conyers B., Castora FJ. Mutations in mitochondrial-encoded cytochrome c oxidase subunits I, II, and III genes detextedin Alzheimer's disease using single-strand conformation polymorphism. *Electrophoresis*, 2006, 27, 398-408.

Hansson CA., Frykman S., Farmery MR., Tjernberg LO., Nilsberth C., Pursglove SE., Ito A., Winblad B., Cowburn RF., Thyberg J., Ankarcrona M. Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 51654-51660.

Hardy J., Cowburn R., Barton A., Reynolds G., Dodd P., Wester P., O'Carroll AM., Lofdahl E., Winblad B. A disorder of cortical GABAergic innervation in Alzheimer's diseas. *Neurosci. Lett.,* 1987,14,73, 2, 192-6.

Hardy J. Amyloid, the presinilins and Alzheimer’s disease. *Trends Neurosci*., 1997a, 20, 154-159.

Hardy J., Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, 297, 5580, 353-6.

Hardy J. The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997b, 94, 2095-2097.

Hardy J., Adolfsson R., Alafuzoff I., Bucht G., Marcusson J., Nyberg P., Perdahl E., Wester P., Winblad B. Transmitter deficits in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.,* 1985, 7, 545-563.

Harper JD., Lansbury PT Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem*., 1997, 66, 385-407.

Hart DJ., Craig D., Compton SA., Critchlow S., Kerrigan BM., McIlroy SP., Passmore AP. A retrospective study of the behavioural and psychological symptoms of mid and late phase Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry,* 2003, 18, 1037-1042.

Haxby JV. and. Rapoport SI. Abnormalities of regional brain metabolism in Alzheimer's disease and their relation to functional impairment, *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry* 1986**,** 10**,** 427–438.

Heckers S., Geula C., Mesulam MM. Cholinergic innervation of the human thalamus: dual origin and differential nuclear distribution. *J. Comp. Neurol*., 1992, 325, 68-82.

Heimer L., Ahleid GF., de Olmos JS., Groenewegen HJ., Haber SN., Harlan RE., Zahm DS. The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *J Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 1997, 9, 354-381.

Helmes E., Ostbye T. Beyond memory impairment: cognitive changes in Alzheimer's disease. *Arch. Clin. Neuropsychol.,* 2002, 17, 179-193.

Herholtz K., Weisenbach S., Zündorf G., Lenz O., Schröder H., Bauer B., Kalbe E., Heiss WD. In vivo study of acetylcholinesterase in basal forebrain, amygdala, and cortex in mild to moderate Alzheimer disease. *Neuroimage*, 2004, 21, 136-143.

Hess HH., Pope A. Ultramicrospectrophotometric determination of cytochrome oxidase for quantitative histochemistry. *J. Biol. Chem.*, 1953, 204, 295-306.

Hevner RF., Wong-Riley MTT. A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: Histochimical, densitometric and Biochemical studies. *Neuroscience*, 1995, 65, 2, 313-342.

Hevner RF., Wong-Riley MTT. Mitochondrial and nuclear gene expression for cytochrome oxidase subunits are disproportionately regulated by functional activity in neurons. *J. Neurosci.*, 1993, 13, 1805-1819.

Hirai K., Aliev G., Nunomura A., Fujioka H., Russell RL., Atwood CS., Johnson AB., Kress Y., Vinters HV., Tabaton M., Shimohama S., Cash AD., Siedlack SL., Harris PLR., Jones PK., Petersen RB., Perry G., Smith MA. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.,* 2001, 21, 3017-3023.

Hofman A., Ott A., Breteler MM., Bots M., Slooter AJ., Van Hars-Kamp F., Van Duijn CN., Van Broeckhoven C. and Grobbee DE. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam study. *Lancet.,* 1997, 394, 151-154.

Holmes A. Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.,* 2001, 25, 261-273.

Honer WG. Pathology of presynaptic proteins in Alzheimer's disease: more than simple loss of terminals. *Neurobiol Aging,* 2003, 24, 8, 1047-62.

Hope BT., Michael GJ., Knigge KM., and Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *PNAS*, 1991, 88, 2811-2814.

Hoyer S., Lannert H., Latteier E., and Meisel Th. Relationship between cerebral energymetabolism in parietotemporal cortex and hippocampus and mental activityduring aging in rats. *J. Neural. Transm.,* 2004, 111, 575–589.

Hoyer S. Brain energy metabolism and its significance for Alzheimer's disease. *In Alzheimer's Disease*: Basic mecanisms diagnosis and therapeutic strategies. Iqbal, K., McLachlan, D.R.C., Winblad, B., Wisniewski, H.N. eds. Wiley, New York, 1991, 53-57.

Hu L., Wong TP., Cote SL., Bell KF., Cuello AC. The impact of Aβ- plaques on cortical cholinergic and non-cholinergic presynaptic boutons in Alzheimer's disease-like transgenic mice. *Neuroscience,* 2003, 121, 421-432.

Huff FJ., Boller F., Lucchelli F., Querriera R., Beyer J., Belle S. The neurologic examination in patients with probable Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.,* 1987, 44, 929-932.

Hunt PR., Aggleton JP. An examination of the spatial working memory deficit following neurotoxic medial dorsal thalamic lesions in rats. *Behav. Brain Res*., 1998, 97,129-41.

Hynd MR., Scott HL., Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int*., 2004, 45, 583-595.

Iadecola C., Zhang F., Niwa K., Eckman C., Turner SK., Fischer E., Younkin S., Borchelt DR., Hsiao KK., Carlson GA. SODI rescues cerebral endothial dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Nature Neurosci*., 1999, 2, 157-161.

Ikeda S., Allsop D., Glenner GG. Morphology and distribution of plaque and related deposits in the brains of Alzheimer's disease and control cases. An

immunohistochemical study using amyloid beta-protein antibody. *Lab. Invest.,* 1989, 60, 1, 113-22.

Inestrosa NC., Alvarez A., Perez CA., Moreno RD., Vicente M., Linker C., Casanueva OI., Soto C., Garrido J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron,* 1996, 16, 881-891.

Inestrosa NC., Dinamarca MC.and Alvarez A. Amyloid–cholinesterase interactions Implications for Alzheimer's disease. *FEBS Journal* , 2008, 275, 625–632.

Iverfeldt K., Walaas SI., Greengard P. Altered processing of Alzheimer amyloid precursor protein in response to neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 4146-4150.

Ivins KJ., Bui ETN., Cotman CW. B-Amyloid induces local neurite degeneration in cultured hippocampal neurons: evidence for neuritic apoptosis. *Neurobiol. Dis.,* 1998, 5, 365-378.

Iwatsubo T., Mann DM., Odaka A., Suzuki N., Ihara Y. Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome. *Ann. Neurol.,* 1995, 37, 3, 294-9. Comment in: *Ann. Neurol*., 1995, 37, 3, 287-8.

Iwatsubo T., Okada A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N., Ihara Y. Visualization of Aβ42 (43) and Aβ40 in senile plaque with end-specific Aβ monoclonals: Evidence that an initially deposited species is Aβ42(43). *Neuron*, 1994, 13, 45-53.

Jack CR., Petersen RC., Xu Y., O'Brien PC., Smith GE., Ivnik RJ., Tangalos EG., Kokmen E. Rate of medial temporal lobe atrophy in typical aging and Alzheimer's disease. *Neurology,* 1998, 51, 993-999.

Jacobs DM., Sano M., Dooneief G., Marder K., Bell K.L., Stern Y. Neuropsychological detection and characterization of preclinical Alzheimer's disease. *Neurology,* 1995, 45, 957-962.

Jankowsky JL., Fadale DJ., Anderson J., Xu GM., Gonzales V., Jenkins NA., Copeland NG., Lee MK., Younkin LH., Wagner SL., Younkin SG., Borchelt DR. Mutant presinilins specifically elevte the levels of the 42 residue ß-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γsecretase. *Human Molecular Genitics*, 2004, 13, 2, 159-170.

Janus C., D'Amelio S., Amitay O., Chishti MA., Strome R., Fraser P., Carlson GA., Roder JC., St. George-Hyslop P., Westaway D. Spatial learning in transgenic mice expressing presenilin 1 (*PS1*) transgenes. *Neurobiol. Aging,* 2000, 21, 541-549.

Jarrett JT., Berger EP., Lansbury PT. Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 1993, 32, 18, 4693-7.

Jarrett JT., Lansbury PT. Jr. Seeding one-dimensional crystallization of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie. *Cell*, 1993, 73, 6, 1055-8.

Jazi R., Lalonde R., Qian S., Strazielle C. Regional brain evaluation of acetylcholinesterase activity in *PS1/*A246E transgenic mice. *Neurosci. Res.,* 2009, 63,106-14.

Jellinger KA. Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 2004, 75, 511-512.

Johnson AB., Blum NR. Nucleoside phosphatase activities associated with the tangles and plaques of alzheimer's disease: a histochemical study of natural and experimental neurofibrillary tangles. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*., 1970,29, 3, 463-78.

Johnson KA, Albert MS. Perfusion in prodromal AD. *Neurobiol. Aging*, 2000, 21, 289-292.

Joyce JN., Kaeger C., Ryoo H. and Goldsmith S. Dopamine D2 receptors in the hippocampus and amygdala in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.,* 1993, 154, 171-174.

Juottonen K., Laakso MP., Inausti R., Lehtovirta M., Pitänen A., Partanen K., Soininen H. Volumes of the entorhinal and perirhinal cortices in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 1998, 19, 15-22.

Kaether C., Lammich S., Edbauer D., Ertl M., Rietdorf J., Capell A., Steiner H., Haass C. Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J. Cell. Biol*., 2002, 158, 3, 551-61.

Kalaria RN. Cerebrovascular degeneration is related to amyloid-beta protein deposition in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.*, 1997, 26, 826, 263-71.

Kamino K., Sato S., Sakaki Y., Yoshiiwa A., Nishiwaki Y., Takeda M., Tanabe H., Nishimura T., Ii K., St George-Hyslop PH., Miki T., Ogihara T. Three different mutations of presiniline 1 gene in early onset Alzheimer's disease families. *Neurosci. Lett.,* 1996, 208, 195-198.

Kang D., Hamasaki N. Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer. *Curr Med Chem*., 2005;12, 4, 429-41.

Kang DE., Soriano S., Frosch MP., Collins T., Naruse S., Sisodia SS., Leibowitz G., Levine F., Koo EH. Presenilin 1 facilitates the constitutive turnover of -catenin: differential activity of Alzheimer's disease-linked PS1 mutants in the B-catenin-signalling pathway. *J. Neurosci*., 1999, 19, 4229-4237.

Kang J., Lemaire HG., Unterbeck A., Salbaum JM., Masters CL., Grzeschik KH., Multhaup G., Beyreuther K., Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 1987, 19-25, 325, 6106, 733-6.

Kantarci K., Jack CR. Jr. Neuroimaging in Alzheimer disease: an evidence-based review. *Neuroimaging Clin N Am*., 2003, 13, 2, 197-209.

Kar S., Slowikowski SP., Westaway D., Mount HT. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Psychiatry Neurosci.,* 2004 , 29, 6, 427-41.

Karas GB., Scheltens P., Rombouts SARB., Visser PJ., van Schijindel RA., Fox NC., Barkhof F. Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *NeuroImage,* 2004; 23, 708-16.

Khan SM., Cassarino DS., Abramova NN., Keeney PM., Borland MK., Trimmer PA., Krebs CT., Bennett JC., Parks JK., Swerdlow RH., Parker WD., Jr. and Bennett JP. Alzheimer's disease cybrids replicate beta-amyloid abnormalities throughcell death pathways. Jr. *Ann. Neurol.*, 2000, 48, 148–155.

Kimberly WT., LaVoie MJ. Ostaszewski BL., et al. {gamma}-Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*., 2003, 27, 100, 11, 6382-7.

Kish SJ., Bergeron C., Rajput A., Dozic S., Mastrogiacomo F., Chang LJ., Wilson JM., DiStefano LM., Nobrega JN. Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J. Neurochem*., 1992, 59, 2, 776-9.

Kish SJ., Mastrogiacomo F., Gutman M., Furukawa Y., Taanman J-W., Dozic S., Pandolfo M., Lamarche J., DiStefano L., Chang L-J. Decreased brain protein levels of cytochrome oxidase subunits in Alzheimer's disease and in hereditary spinocerebellar ataxia disorders: a nonspecific change? *J Neurochem.*, 1999, 72, 700-707.

Kish SJ. Brain energy metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex and cytochrome oxidase. *Ann. N. Y. Acad Sci*., 1997, 26, 826, 218-28.

Klingner M., Apelt J., Kumar A., Sorger D., Sabri O., Steinbach J., Scheunemann M., Schliebs R. Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with B-amyloid plaque pathology. *Int. J. Dev. Neurosci.,* 2003, 21, 357-369.

Klunk WE., Panchalingam K., Moossy J., McClure RJ., Pettegrew JW., N-acetyl-L-aspartate and other amino acid metabolites in Alzheimer's disease brain: A preliminary proton nuclear magnetic resonance study. *Neurology*, 1992, 42, 1578-1585.

Kobayashi K., Yasoshima Y. The central noradrenaline system and memory consolidation. *Neuroscientist*, 2001, 7, 5, 371-6

Koelle GB., Friendenwald JS. A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* 1949, 70, 617-622.

Kovacs DM., Fausett HJ., Page KJ., Kim TW., Moir RD., Merriam DE., Hollister RD., Hallmark OG., Mancini R., Felsenstein KM., Hyman BT., Tanzi RE., Wasco W. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat. Med*., 1996, 2, 2, 224-229.

Kovacs DM., Mancini R., Henderson J., Na SJ., Schmidt SD., Kim TW., Tanzi RE. Staurosporine-induced activation of caspase-3 is potentiated by presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutations in human neuroglioma cells*. J. Neurochem*., 1999, 73, 6, 2278-85.

Kudo T., Imaizumi K., Tanomukai H., Katayama T., Sato N., Nakamura Y., Tanaka T., Kashiwagi Y., Jinno Y., Tohyama M., Takeda M. Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging*, 2000, 21, 215-224.

Kuhl DE., Koeppe RA., Minoshima S., Snyder SE., Ficaro EP., Foster NL., Frey KA., Kilbourn MR., Frey KA., Kilbourn MR. *In vivo* mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology,* 1999, 52, 691-699.

Laakso MP., Soininen H., Partanen K., Lehtovirta M., Hallikainen M., Hänninen T., Helkala E.-L., Riekkinen PJ. Jr. MRI of the hippocampus in Alzheimer's disease: sensitivity, specificity, and analysis of the incorrectly classified subjects. *Neurobiol. Aging,* 1998, 19, 23-31.

LaFerla FM., Troncoso JC., Strickland DK., Kawas CH., Jay G. Neuronal cell death in Alzheimer’s disease correlates with apoE uptake intracellular Aβ stabilization. *J. Clin. Invest*., 1997, 100, 310-320.

Lah JJ., Heilman CJ., Nash NR., Rees HD., Yi H., Counts SE., Levey AI. Light and electron microscopic localization of presenilin-1 in primate brain. *J. Neurosci*., 1997, 17, 6, 1971-80.

Lahiri DK., Utsuki T., Chen D., Farlow MR., Shoaib M., Ingram DK., Greig NH. Nicotine reduces the secretion of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein containing beta-amyloid peptide in the rat without altering synaptic proteins. *Ann N Y Acad Sci.,* 2002, 965, 364-72.

Lalonde R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci. Biobehav. Rev.,* 2002, 26, 91-104.

Lalonde R., Dumont M., Staufenbiel M., Sturchler-Pierrat C., Strazielle C. Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res.*, 2002, 956, 36-44.

Lalonde R., Jazi R., Strazielle C. Neurobehavioral characteristics of presenilin transgenic mice. In: Sun, M.-K., (Ed.). *Cognitive Sciences*, 2006, 1, 169-204.

Lalonde R., Qian S., Strazielle C. Transgenic mice expressing the PS1-A246E mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination*. Behav. Brain Res*., 2003, 6, 138, 1, 71-9.

Lalonde R., Strazielle C. Motor performance of spontaneous murine mutations with cerebellar atrophy. Crusio W., Gerlai R. (Eds). Handbook of Moleculargenetic Techniques for Brain and Behavior Research, *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*, 1999, 13, 627-37, Elsevier, Amsterdam.

Lalonde R., Strazielle C. PS1 knockin mice with the Japanese I213T mutation: Effects on exploratory activity, motor coordination, and spatial learning. *Behavioural Brain Research,* 2005, 162, 182–190.

Lalowski M., Golabek A., Lemere CA., Selkoe DJ., Wisniewski HM., Beavis RC., Frangione B., Wisniewski T. The nonamyloidogenic p3 fragment (amyloid beta17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *J. Biol. Chem*., 1996, 27, 271, 52, 33623-31.

Larson EB., Kukull WA., Teri L., McCormick W., Pfanschmidt M., van Belle G., Sumi M. University of Washington Alzheimer's Disease Patient Registry (ADPR): 1987-1988. Aging (Milano), 1990, 2, 4, 404-8.

Lassmann H., Bancher C., Breitschopf H., Wegiel J., Bobinski M., Jellinger K., Wisniewski HM. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta. Neuropathol*., 1995, 89, 35-41.

Lee SC., Liu W., Roth P., Dickson DW., Berman JW., Brosnan CF. Macrophage. colony-stimulating factor in human fetal astrocytes and microglia. Differential regulation by cytokines and lipopolysaccharide, and modulation of class II MHC on microglia. *J Immunol., 1993,* 150, 594-604.

Leissring MA., Akbari Y., Fanger CM., Cahalan MD., Mattson MP., LaFerla FM. Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice*. J. Cell Biol*., 2000, 15;149, 4, 793-8.

Leutner S., Czech C., Schindowski K., Touchet N., Eckert A., Müller WE. Reduced antioxidant enzyme activity in brains of mice transgenic for human presenilin-1 with single or multiple mutations. *Neurosci. Lett.,* 2000, 292, 87-90.

Lewis HD., Beher D., Smith D., Hewson L., Cookson N., Reynolds DS., Dawson GR., Jiang M., Van der Ploeg LH., Qian S., Rosahl TW., Kalaria RN., Shearman MS. Novel aspects of accumulation dynamics and A beta composition in transgenic models of AD. *Neurobiol. Aging*, 2004, 25, 9, 1175-85.

Lin MT., Pan SP., Lin JH., Yang YL. Central control of blood pressure by nitrergic mechanisms in organum vasculosum laminae terminalis of rat brain. *Br J. Pharmacol.,* 1999, 127, 6, 1511-7.

Lin MT., Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature,* 2006, 443, 787–795.

Lin MT., Simon DK., Ahn CH., Kim LM., Beal MF. High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Gene.t*, 2002, 11, 133-145.

Ling Y., Morgan K., Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol*., 2003, 35, 11, 1505-35.

Lippa CF., Nee LE., Mori H., St George-Hyslop PH. Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease [letter]. *Lancet.,* 1998, 352, 1117-1118.

Loo DT., Copani A., Pike CJ., Whittemore ER., Walencewicz AJ., Cotman CW. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1993, 1, 90, 17, 7951-5.

Lovell MA., Gabbita SP., Markesbery WR. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J. Neurochem.,* 1999, 72, 771–776.

Lovell MA., Xiong S., Xie C., Davies P., Markesbery WR. Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuroncultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3. *J. Alzheimers Dis*., 2004, 6, 659–671.

Lucas-Meunier E., Fossier P., Baux G., Amar M. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch.,* 2003, 446, 1, 17-29.

Lyness SA., Zarow C., Chui HC. Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurobiol. Aging,* 2003, 24, 1-23.

Lyras L., Cairns NJ., Jenner A., Jenner P., Halliwell B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease.ell B. *J. Neurochem.,* 1997, 68, 5, 2061-9.

Manczak M., Park BS., Jung Y., Reddy PH. Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease. *NeuroMol. Med*., 2006, 5, 147-163.

Mann DM., Yates PO. and Marcyniuk B. Dopaminergic neurotransmitter systems in Alzheimer's disease and in Down's syndrome at middle age. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.,* 1987, 50, 341-344.

Marambaud P., Wen PH., Dutt A., Shioi J., Takashima A., Siman R., Robakis NK. A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. Cell, 2003, 5;114, 5, 635-45.

Martorana A., Stefani A., Palmieri MG., Esposito Z., Bernardi G., Sancesario G., Pierantozzi M. L-dopa modulates motor cortex excitability in Alzheimer's disease patients. *J. Neural. Transm. PMID*, 2008, 18, 59, 47-53

Masafumi S., Naruhiko S., Tatsuya M., Satoru F., Maho MK., Takashi K., Masatoshi T., Yasuo I., Hiroshi I., and Akihiko T. Enzymatic Characteristics of I213T Mutant Presenilin-1/γ-secretase in Cell Models and Knock-in Mouse Brains: FAD-linked Mutation Impairs γ-site Cleavage of APP-CTFβ. *J. Biol. Chem*., 2008, 283, 24, 16488-16496.

Masliah E., Mallory M., Ge N., Alford M., Veinbergs I., Roses AD. Neurodegeneration in the central nervous system ofapoE-deficient mice., *Exp. Neurol.,* 1995,136, 2, 107-22.

Masliah E., Honer WG., Mallory M., Voight M., Kushner P., Hansen L., Terry R. Topographical distribution of synaptic-associated proteins in the neuritic plaques of Alzheimer's disease hippocampus. *Acta Neuropathol.,* 1994, 87, 135–142

Mastrogiacomo F., Bergeron C., Kish SJ. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.,* 1993, 61, 6, 2007-14.

Matsumoto T., Nakane M., Pollock JS., Kuk JE., and Förstermann A. Correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neuroscience letters*, 1993, 155, 61-64.

Mattson MP., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I., Rydel RE. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.,* 1992, 12, 376-389.

Maurer I., Zierz S., and Moller HJ. A selective defect of cytochrome oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol. Aging*, 2000, 21, 455-462.

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRA work group under the Department of Health and Human Services task force on Alzheimer's disease. *Neurology,* 1984, 34, 939-944.

Mecocci P., MacGarvey U., Beail MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 1994, 36, 609-616.

Melo JB., Agosinho P., Oliveira CR. Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by beta-peptide. *Neurosci. Res*., 2003, 45, 117-127.

Mesulam MM. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learning and Memory*, 2004, 11, 43-49.

Mesulam MM., Geula C. Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: observations based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.,* 1988, 275, 216-240.

Mesulam MM., Mufson EJ., Wainer BH., Levey AI. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on the alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience,* 1983, 10, 1185-1201.

Meunier JM., Shvaloff A. Neurotransmetteurs. *MASSON*, 1992, ISBN: 2-225-82606-4.

Minoshima S., Foster NL., Kuhl DE. Posterior cingulate cortex in Alzheimer's disease. *Lancet*., 1994, 344, 895.

Miranda S., Opazo C., Larrondo LF., Muñoz FJ., Ruiz F., Leighton F., Inestrosa NC. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol*., 2000; 62, 6, 633-48.

Mirra SS., Heyman A., McKeel D., Sumi SM., Crain BJ., Brownlee LM., Vogel FS., Hughes JP., van Belle G., Berg L. The consortium to establish the registry for Alzheimer's diseasea (CERAD) part II standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*, 1991, 41, 479-486.

Monacelli AM., Cushman LA., Kavcic V., Duffy CJ. Spatial disorientation in Alzheimer's disease: the remembrance of things passed. *Neurology,* 2003, 61, 1491-1497.

Moncada S., Bolaños JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem.,* 2006, 97, 6, 1676-89.

Moran MA., Mufson EJ., Gomez-Ramos P. Colocalization of cholinesterases with β amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Act. Neuropathol*., 1993, 85, 362-369.

Mori T., Paris D., Town T., Rojiani AM., Sparks DL., Delledonne A., Crawford F., Abdullah LI., Humphrey JA., Dickson DW., Mullan MJ. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP_{sw} mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 2001, 60, 778-785.

Morris JC. Challenging assumptions about Alzheimer's disease: mild cognitive impairment and the cholinergic hypothesis. *Ann. Neurol.,* 2002, 51, 143-144.

Morris RGM., Garrud P., Rawlins JNP., O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature,* 1982, 292, 681-683.

Moulard B., Sefiani A., Laamri A., Malafosse A., Camu W. Apolipoprotein E genotyping in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: evidence for a major influence on the clinical presentation and prognosis. *J. Neurol. Sci*., 1996, 139, 34-7.

Moussaoui S., Czech C., Pradier L., Blanchard V., Bonici B., Gohin M., Imperato A., Revah F. Immunohistochemical analysis of presenilin-1 expression in the mouse brain, *FEBS Lett.,* 1996, 383, 3, 219-22.

Mufson EJ., Ginsberg SD., Ikonomovic MD., DeKosky ST. Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction *J Chem. Neuroanat*., 2003, 26, 4, 233-42.

Mufson EJ., Kehr AD., Wainer BH., Mesulam MM. Cortical effects of neurotoxic damage to the nucleus basalis in rats: persistent loss of extrinsic cholinergic input and lack of transsynaptic effect upon the number of somatostatin-

containing, cholinesterase-positive, and cholinergic cortical neurons. *Brain Res.,* 1987, 417, 385-88.

Müller DM., Mendla K., Farber SA., Nitsch RM. Muscarinic M1 receptor agonists increase the secretion of the amyloid precursor protein ectodomain. *Life Sci.,* 1997, 60, 13-14, 985-91.

Nagy Z., Esiri MM., LeGris M., Matthews PM. Mitochondrial enzyme expression in the hippocampus in relation to Alzheimer-type pathology. *Acta. Neuropathol.*, 1999, 97, 346-354.

Nakano Y., Kondoh G., Kudo T., Imaizumi K., Kato M., Miyazaki JI., Tohyama M., Takeda J., Takeda M. Accumulation of murine amyloid β42 in a gene-dosage-dependent manner in PS1 (Knock-in) mice. *European Journal of Neuroscience*, 1999, 11, 2577-2581.

Näslund J., Haroutunian V., Mohs R., Davis KL., Davies P., Greengard P., Buxbaum JD. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. J.A.M.A., 2000, 22, 29; 283, 12, 1571-7.

Nitsch RM., Rossner S., Albrecht C., Mayhaus M., Enderich J., Schliebs R., Wegner M., Arendt T., von der Kammer H. Muscarinic acetylcholine receptors activate the acetylcholinesterase gene promoter. *J. Physiol. Paris*, 1998, 92, 3-4, 257-64.

Niwa K., Kasawa K., Younkin L., Younkin SG., Carlson GA., Iadecola C. Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol*., 2002a, 283, H315-H323.

Niwa K., Kasawa K., Younkin SG., Carlson GA., Iadecola C. Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiol. Dis*., 2002b, 9, 61-68.

Niwa K., Carlson GA., Iadecola C. Exogenous Abeta1-40 reproduces cerebrovascular alterations resulting from amyloid precursor protein overexpression in mice. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.*, 2000, 20, 1659-1668.

Nordberg A. PET studies and cholinergic therapy in Alzheimer's disease, *Rev. Neurol., (Paris)*, 1999; 155, 4, S53-63.

Nordberg A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol. Psychiatry*, 2001, 1;49, 3, 200-10.

Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj EK., Jones PK., Ghanbari H., Wataya T., Shimohama S., Chiba S., Atwwod CS., Petersen RB., Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2001, 60, 759-767.

Nunomura A., Perry G., Pappolla MA., Wade R., Hirai K., Chiba S., Smith MA. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J. Neuroscience*, 1999; 19: 1959-64.

Nyback H., Nyman H., Blomqvist G., Sjogren I. and Stone-Elander S. Brain metabolism in Alzheimer's dementia : Studies of ^{11}C-deoxyglucose accumulation CFS monoamine metabolites and neuropsychological test performances in patients and healthy subjects. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.,* 2001, 54, 672-678.

Okamura N., Funaki Y., Tashiro M., Kato M., Ishikawa Y., Maruyama M., Ishikawa H., Meguro K., Iwata R., Yanai K. *In vivo* visualization of donepezil binding in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.,* 2007;65, 472-79.

Pak K., Chan SL., Mattson MP. Presenilin-1 mutation sensitizes oligodendrocytes to glutamate and amyloid toxicities, and exacerbates white matter damage and memory impairment in mice. *Neuromolecular Med*., 2003, 3, 1, 53-64.

Palmert MR., Podlisny MB., Golde TE., Cohen ML., Kovacs DM., Tanzi RE., Gusella JF., Whitehouse PJ., Witker DS., Oltersdorf T. The beta amyloid protein precursor: mRNAs, membrane-associated forms, and soluble derivatives. *Prog. Clin. Biol. Res*., 1989, 317, 971-84.

Pappert EJ., Goetz CJ., Stebbins M., Belden M., Carvey PM. 5-Hydroxytryptamine-induced myoclonus in guinea pigs: mediation through 5-HT1/2 receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.,* 1998, 347, 51-56.

Parent A., Linden DJ., Sisodia SS., Borchelt DR. Synaptic transmission and hippocampal long-term potentiation in transgenic mice expressing FAD-linked presenilin 1. *Neurobiol. Dis.,* 1999, 6, 56–62.

Paris D., Town T., Mori T., Parker TA., Humphrey J., Mullan M. Soluble B-amyloid peptides mediate vasoactivity via activation of a pro-inflammatory pathway. *Neurobiol Aging*, 2000, 21, 183-197.

Parker WD., Davis RE. Primary mitochondrial DNA defects as a causative event in Alzheimer's disease.in:Mitochondria and free radicals in neurodegenerative disease (Beal MF, Howell N, Bodis-Wollner I, eds), *New York: Wiley-Liss*,1997, 319-333.

Parker WD., Filley CM., Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology*, 1990, 40, 1302-1303.

Parker WD., Parks J., BA., Filley CM., .Kleinschmidt-DeMasters BK. Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology*, 1994, 44, 1090-1096.

Parker WD., Parks JK. Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain: Purification and characterization. *Neurology*, 1995, 45, 482-486.

Parks JK., Smith T., Trimer PA., Bennett JP Jr., Parker WD Jr. Neurotoxic AB peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA- receptor and nitric-oxid-synthase mechanisms, and inhibit complexe IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro. *Journal of neurochemistry*, 2001, 76, 1050-1056.

Pasquier F., Bail L., Lebert F., Pruvo JP., Petit H. Determination of medial temporal lobe atrophy in early Alzheimer's disease with computed tomography. *Lancet.*, 1994, 2; 343, 8901, 861-2.

Pasternak SH., Bagshaw RD., Guiral M., Zhang S., Ackerley CA., Pak BJ., Callahan JW., Mahuran DJ. Presenilin, Nicastrin and Beta-Amyloid Production in the Endosomal/ Lysosomal System: Toward a Unifying Model of Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.,* 2003, 18, 278, 29, 26687-94.

Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, San Diego, 1986.

Pedersen WA., Guo Q., Hartman BK., Mattson MP. Nerve growth factor-independent reduction in choline acetyltransferase activity in PC12 cells expressing mutant presenilin-1. *J. Biol. Chem.,* 1997, 272, 22397-22400.

Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease and related disorders. *Neurol. Clin*., 2000, 18, 847-864,.

Perry E., Martin-Ruiz C., Lee M., Griffiths M., Johnson M., Piggott M., Haroutunian V., Buxbaum JD., Nãsland J., Davis K., Gotti C., Clementi F., Tzartos S., Cohen O., Soreq H., Jaros E., Perry R., Ballard C., McKeith I., Court J. Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, 393, 215-22.

Perry EK., Perry RH., Tomlinson BE., Blessed G., Gibson PH. Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic 'compartment' of pyruvate dehydrogenase. *Neurosci Lett*., 1980,15, 18, 1, 105-10.

Perry EK., Morris CM., Court JA., Cheng A., Fairbairn AF., McKeith IG. Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. *Neuroscience*, 1995, 64, 385-95.

Perry G., Richey P., Siedlak SL., Galloway P., Kawai M., Cras P. Basic fibroblast growth factor binds to filamentous inclusions of neurodegenerative diseases. *Brain Res.,* 1992, 8;579, 2, 350-2.

Petersen RC., Doody R., Kurz A., Mohs RC., Morris JC., Rabins PV., Ritchie K., Rossor M., Thal L., Winblad B. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol.*, 2001, 58, 12, 1985-92.

Petry S., Cummings JL., Hill MA., Shapira J. Personality alterations in dementia of the Alzheimer type. *Arch. Neurol*., 1988, 45, 1187-1190,

Pettegrew JW., Panchalingam K., Klunk WE., McClure RJ., Muenz LR. Alterations of cerebral metabolism in probable Alzheimer's disease: a preliminary study. *Neurobiol Aging,* 1994, 15, 117-132.

Pettersson AF., Engardt M., Wahlund LO. Activity and balance in subjects with mild Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Dis.,* 2002, 13, 213-216.

Pettit DL., Shao Z., Yakel JL. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J. Neurosci.,* 2001, 1;21, 1, RC120.

Philippu A., Prast H. Role of histaminergic and cholinergic transmission in cognitive processes. Drug News Perspect., 2001, 14, 9, 523-9.

Pike CJ., Burdick D., Walencewicz AJ., Glabe CG., Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci*., 1993, 13, 4, 1676-87.

Pillot T., Drouet B., Queillé S., Labeur C., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Pinçon-Raymond M., Chambaz J. The nonfibrillar B-amyloid peptide induces apopoptic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J. Neurochem*., 1999, 73, 1626-1634.

Pilorge T. Dossier Zoom du CNRS, Avril 1997. http://www.cnrs.fr/SDV/M3.html.

Poirier J., Minnich A., Davignon J. Apolipoprotein E. synaptic plasticity and Alzheimer's disease. *Ann. Med*., 1995, 27, 6, 663-70.

Pomara N., Singh R., Deptula D., Chou JCY., Schwartz MB. and LeWitt PA. Glutamate and other CSF amino acids in Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiat.,* 1992, 149, 251-254.

Price DL., Sisodia SS. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci*., 1998, 21, 479-505.

Price JL. Thalamus. In G Paxinos (ed), The Rat Nervous System. *Academic Press*, New York, 1995, 629-648.

Priller C., Dewachter I., Vassallo N., Pace C., Palluch S., Kretzschmar H.A., Van Leuven F , Herms J. Mutant presenilin 1 alters synaptic transmission in cultured hippocampal neurons*. J. Biol. Chem.,* 2007, 12, 282, 2, 1119-1127.

Procter AW., Palmer AM., Francis PJ., Lowe SL., Neary D., Murphy E., Doshi R. and Bowen DM. Evidence of glutamatergique denervation and possible abnormal metabolism in Alzheimer’s disease. *T. Neurochem.,* 1988*,* 50, 790-802.

Qian S., Jiang P., Guan XM., Singh G., Trumbauer ME., Yu H., Chen HY., Van de Ploeg LH., Zheng H. Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates Abeta1-42/43 expression. *Neuron*, 1998, 20, 3, 611-617.

Qiu X., Yuan C., Mei Z. Two point mutations in mitochondrial DNA of cytochrome c oxidase coexist with normal mtDNA in a patient with Alzheimer's disease. *Brain Research*, 2001, 893, 261-263.

Raina AK., Hochman A., Zhu X., Rottkamp A., Nunomura A., Siedlak SL., Boux H., Castellani R., Perry G., Smith MA. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta. Neurpathol.,* 2001,101, 305-310.

Rainville C., Amieva H., Lafont S., Dartigues JF., Orgogozo JM., Fabrigoule C. Executive function deficits in patients with dementia of the Alzheimer's type: a study with a Tower of London task. *Arch. Clin. Neuropsychol.,* 2002, 17, 513-530.

Raisman R., Cash R., Agid Y. Parkinson's disease: decreased density of 3H-imipramine and 3H-paroxetine binding sites in putamen. *Neurology*, 1986, 36, 4, 556-60.

Rapoport SI. Functional brain imaging in the resting state and during activation in Alzheimer's disease : implications for disease mechanisms involving oxidative phosphorylation. *Ann. N.Y Acad. Sci.*, 1999, 893:138-153.

Rapoport SI., Dawson HN., Binder LI., Vitek MP., Ferreira A. Tau is essential to B-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 2002, 99, 6364-6369.

Rapoport SI., Hatanpaa K., Brady DR. and Chandrasekaran K. Brain energy metabolism, cognitive function and down-regulated oxidative phosphorylation in Alzheimer disease. *Neurodegeneration,* 1996, 5, 473-476

Reader TA., Strazielle C. Quantitative autoradiography of monoamine uptake sites and receptors in rat and mouse brain. In: Boulton AA., Baker GB., Bateson AN. (Eds.), *Neuromethods, Cell Neurobiology Techniques,* 1999*,* 33, *Humana Press, Totowa*, 1-51.

Reddy PH. Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: Implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2006, 96, 1-13.

Reddy PH., Beal MF. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res. Rev.,* 2005, 49, 3, 618–632.

Reddy PH., McWeeney S., Park BS., Manczak M., Gutala RV., Partovi D., Jung Y., Yau V., Searles R., Mori M., Quinn J. Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 2004, 13, 1225-1240.

Rees T., Hammond PI., Soreq H., Younkin S., and Brimijoin S. Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol. Aging,* 2003, 24, 777–787.

Refolo LM., Pappolla MA., LaFrancois J., Malester B., Schmidt SD., Thomas-Bryant T., Tint GS., Wang R., Mercken M., Petanceska SS., Duff KE. A cholesterol-

lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*., 2001, 8, 5, 890-9.

Reiman EM., Caselli RJ., Yun LS., Chen K., Bandy D., Minoshima S., Thibodeau SN., Osborne D. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. *N Engl. J. Med.*, 1996, 334, 752-758.

Reiman EM., Lane RD., Ahern GL., Schwartz GE., Davidson RJ., Friston KJ., Yun LS., Chen K. Neuroanatomical correlates of externally and internally generated human emotion. *Am. J. Psychiatry*, 1997, 154, 918-925.

Reisine TD., Soubrie P., Artaud F., Glowinski J. Involvement of lateral habenula-dorsal raphe neurons in the differential regulation of striatal and nigral serotoninergic transmission in cats. *J. Neurosci.*, 1982, 2, 1062-1071.

Reyes AE., Chacón MA., Dinamarca MC., Cerpa W., Morgan C., Inestrosa NC. Acetylcholinesterase-Abeta complexes are more toxic than Abeta fibrils in rat hippocampus: effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis, and neuronal cell loss. Am. J. Pathol., 2004, 164, 6, 2163-74.

Reyes AE., Perez DR., Alvarez A., Garrido J., Gentry MK., Doctor BP., Inestrosa NC. A monoclonal antibody against acetylcholinesterase inhibits the formation of amyloid fibrils induced by the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 1997, 27, 232, 3, 652-5.

Richter C., Park JW., Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1988, 85, 6465-6467.

Rissman RA., Poon WW., Blurton-Jones M., Oddo S., Torp R., Vitek MP., LaFerla FM., Rohn TT., Cotman CW. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J. Clin. Invest*., 2004, 114, 1, 121-30.

Robakis NK., Ramakrishna N., Wolfe G., Wisniewski HM. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 12, 4190-4.

Rocchi A., Pellegrini S., Siciliano G., Murri L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull*., 2003, 30;61, 1, 1-24.

Rogaev EI., Sherrington R., Rogaeva EA., Levesque G., Ikeda M., Liang Y., Chi H., Lin C., Holman K., Tsuda T Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 1995, 376, 6543, 775-8.

Rogers DC., Fisher EMC., Brown SDM., Peters J., Hunter AJ., Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm. Genome,* 1997, 8, 711-713.

Rombouts SARB., Barkhof F., Witter MP., Scheltens P. Unbiased whole-brain analysis of gray matter loss in Alzheimer's disease. *Neurosc.i Lett.,* 2000, 285, 231-233.

Sberna G., Saez-Valero J., Beyreuther K., Masters CL., Small DH. The -amyloid protein of Alzheimer's disease increases acetylcholinesterase expression by increasing intracellular calcium in embryonal carcinoma P19 cells. *J. Neurochem*., 1997, 69, 1177-1184.

Sberna G., Saez-Valero J., Li QX., Czech C., Beyreuther K., Masters CL., McLean CA., Small DH. Acetylcholinesterase is increased in the brains of transgenic mice expressing the C-terminal fragment (CT100) of the -amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J. Neurochem*., 1998, 71, 723-731.

Scahill RI., Schott JM., Stevens JM., Rossor MN., Fox NC. Mapping the evolution of regional atrophy in Alzheimer's disease: unbiased analysis of fluid-registered serial MRI*. Proc Natl. Acad. Sci*. USA., 2002, 99, 4703-4707.

Schenk D., Hagen M., Seubert P. Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.,* 2004, 16, 5, 599-606.

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

Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird TD., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy-Lahad E., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R., Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D., Younkin S. Secreted amyloid B-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med*., 1996, 2, 864-870.

Schliebs R., Rossner S., Bigl V. Immunolesion by 192IgG-saporin of rat basal forebrain cholinergic system: a useful tool to produce cortical cholinergic dysfunction. *Prog. Brain Res.,* 1996, 109, 253-64.

Schliebs R., Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm*., 2006, 113, 1625-1644.

Schmaljohann J., Minnerop M., Karwath P., Gündisch D., Falkai P., Guhlke S., Wüllner U. Imaging of central nAChReptors with 2-[18F]F-A85380 optimized synthesis and in vitro evaluation in Alzheimer's disease. *Applied. Rad. Isotop*., 2004, 61, 12135-40.

Schmued LC., Hopkins KJ. Fluoro-Jade B. high affinity fluorescent marker for the localisation of neuronal degeneration. *Brain Research*, 2000, 874, 123-130.

Schubert D., LaCorbiere M., Saitoh T., Cole G. Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1989, 86, 6, 2066-9.

Schwab C., Hosokawa M., and McGreer PL. Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. *Experimental Neurology*, 2004, 188, 52-64.

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

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*., 2001, 81, 2, 741-66.

Selkoe DJ. Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol*., 1994, 4, 5, 708-16.

Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*, 1999, 399, A23-A31.

Senanarong V., Cummings JL., Fairbanks L., Mega M., Masterman DM., O'Connor SM., Strickland TL. Agitation in Alzheimer's disease is a manifestation of frontal lobe dysfunction. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord*., 2004, 17, 14-20.

Seo H., Ferree AW., Isacson O. Cortico-hippocampal APP and NGF levels are dynamically altered by cholinergic muscarinic antagonist or M1 agonist treatment in normal mice. *Eur. J. Neurosci.,* 2002, 15, 498-505.

Seo J., Kim S., Kim H., Park CH., Jeong S., Lee J., Choi SH., Chang K., Rah J., Koo J., Kim E., Suh Y. Effects of nicotine on APP secretion and Abeta- or CT(105)-induced toxicity. *Biol. Psychiatry*., 2001, 1, 49, 3, 240-7.

Seubert P., Oltersdorf T., Lee MG., Barbour R., Blomquist C., Davis DL., Bryant K., Fritz LC., Galasko D., Thal LJ. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature*, 1993, 21, 361, 6409, 260-3.

Shearman MS., Ragan CI., Iversen LL. Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*., 1994, 15, 91, 4, 1470-4.

Shen J., Bronson RT., Chen DF., Xia W., Selkoe DJ., Tonegawa S. Skeletal and CNS defects in presenilin-1 deficient mice. *Cell*, 1997, 89, 629-639.

Sherrington R., Rogaev EI., Liang Y., Rogaeva EA., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1995, 375, 6534, 754-60.

Shinotoh H., Namba H., Fukushi K., Nagatsuka S., Tanaka N., Aotsuka A., Ota T., Tanada, S., Irie T. Progressive loss of cortical acetylcholinesterase activity in association with decline in Alzheimer's disease: a positron emission tomography study. *Ann. Neurol.,* 2000, 48, 194-200.

Silveyra MX., Evin G., Montenegro MF., Vidal CJ., Martınez S., Culvenor JG., and Saez-Valero J. Presenilin 1 Interacts with Acetylcholinesterase and Alters Its Enzymatic Activity and Glycosylation. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28, 9, 2908–2919.

Simic G., Kostović I., Winblad B., Bogdanović N. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease*. J Comp Neurol*., 1997, 24, 379, 4, 482-94.

Simonian NA., Hyman BT. Functional alterations in Alzheimer's disease: diminution of cytochrome oxidase in the hippocampal formation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*., 1993, 52, 580-585.

Simonian NA., Hyman BT. Functional alterations in Alzheimer's disease: selective loss of mitochondrial -encoded cytochrome oxidase mRNA in the hippocampal formation. *J Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1994, 53, 508-512.

Simpson MD., Cross AJ., Slater P. and Deakin JF. Loss of cortical GABA uptake sites in Alzheimer’s disease. *J. Neural. Transm.,* 1988, 71, 219-226.

Sisodia SS., Koo EH., Beyreuther K., Unterbeck A., Price DL. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*. 1990, 27, 248, 4954, 492-5.

Sisodia SS. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.,* 1992, 1, 89, 13, 6075-9.

Sisodia SS., Kim SH., Thinakaran G. Function and dysfunction of the presenilins. *Am. J. Hum. Genet.,* 1999, 65, 7-12.

Sisodia SS. and Price D. Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer’s disease. *F.A.S.E.B. J.,* 1995, 9, 366-370.

Sjöbeck M., Englund E. Alzheimer's disease and the cerebellum: a morphologic study on neuronal and glial changes. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.,* 2001, 12, 211-218.

Small DH., McLean CA. Alzheimer's disease and the amyloid beta protein: What is the role of amyloid? *J. Neurochem*., 1999, 73, 2, 443-9.

Small GW., Ercoli LM., Silverman DH., Huang SC., Komo S., Bookheimer SY., Lavretsky H., Miller K., Siddarth P., Rasgon NL., Mazziotta JC., Saxena S., Wu HM., Mega MS., Cummings JL., Saunders AM., Pericak-Vance MA., Roses AD., Barrio JR., Phelps ME. Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, 97, 6037-6042.

Small GW., Mazziotta JC., Collins MT., Baxter LR., Phelps ME., Mandelkern MA., Kaplan A., La Rue A.,Adamson CF. Chang L. Apolipoprotein E type 4 allele and cerebral glucose metabolism inrelatives at risk for familial Alzheimer disease. *J.A.M.A.,* 1995, 273, 942–947.

Smiley JF., Morrell F., Mesulam MM. Cholinergic synapses in human cerebral cortex: an ultrastructural study in serial sections. *Exp. Neurol.,* 1997,144, 2, 361-8.

Smith JA., Knight RG. Memory processing in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia,* 2002, 40, 666-682.

Soto C., Frangione B. Two conformational states of amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett*., 1995, 17,186, 2-3, 115-8.

St George-Hyslop PH. Molecular genetics of Alzheimer’s disease. *Biol. Psychiatry,* 2000, 47, 183-199.

Steckler T., Inglis W., Winn P., Sahgal A. The pedunculopontine tegmental nucleus: a role in cognitive processes? *Brain Res. Rev.,* 1994, 19, 298-318.

Steininger TL., Rye DB., Wainer BH. Afferent projections to the cholinergic pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent midbrain extrapyramidal area in the albino rat. Retrograde tracing studies. *J Comp Neurol*, 1992, 321, 515-543.

Stewart VC., Heales SJ. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med*., 2003, 1, 34, 3, 287-303

Stokin GB., Lillo C., Falzone TL., Brusch RG., Rockenstein E., Mount SL., Raman R., Davies P., Masliah E., Williams DS., Goldstein LS. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Science*, 2005, 307, 5713, 1282-8.

Strazielle C., Dumont M., Fukuchi K., Lalonde R. Transgenic mice expressing the human C99 terminal fragment of beta APP: effects on cytochrome oxidase activity in skeletal muscle and brain. *J. Chem. Neuroanat*., 2004, 27, 4, 237-46.

Strazielle C., Krémarik P., Ghersi-Egea JF., Lalonde R. Regional brain variations of cytochrome oxidase activity and motor coordination in Lurcher mutant mice. *Exp brain Res*., 1998, 121, 35-45.

Strazielle C., Sturchler-Pierrat C., Staufenbiel M., Lalonde R. Regional brain cytochrome oxidase activity in beta-amyloid precursor protein transgenic mice with the Swedish mutation. *Neuroscience*, 2003, 118, 4, 1151-63.

Strittmatter WJ., Roses AD., Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 23, 92, 11, 4725-7.

Su JH., Kesslak JP., Head E., Cotman CW. Caspase-cleaved amyloid precursor protein and activated caspase-3 are co-localized in the granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. *Acta Neuropathol*., 2002, 104, 1-6.

Sun X., Beglopoulos V., Mattson MP., Shen J. Hippocampal spatial memory impairments caused by the familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 M146V mutation. *Neurodegener. Dis.,* 2005, 2, 6-15.

Swerdlow RH., Parks JK., Cassarino DS., Maguire DJ., Maguire RS., Bennett JP., Davis RE., Parker WD. Cybrids in Alzheimer's disease: A cellular model of disease? *Neurology,* 1997, 49, 918-925.

Sze CI., Troncoso JC., Kawas C., Mouton P., Price DL. and Martin LJ. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 56**,** 1997, 933–944

Takahashi M., Tsujioka Y., Yamada T., Tsuboi Y., Okada H., Yamamoto T., Liposits Z. Glycosylation of microtubule-associated protein tau in Alzheimer's disease brain. *Acta. Neuropathol*., 1999, 97, 6, 635-41.

Takahashi RH., Milner TA., Li F., Nam EE., Edgar MA., Yamaguchi H., Beal MF., Xu H., Greengard P., Gouras GK. Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am. J. Pathol*., 2002, 161, 5, 1869-79.

Takashima A., Murayama O., Kohno T., Honda T., Yasutake K., Nihonmatsu N., Mercken M., Yamagushi H., Sugihara S. and Wolozin B. Presenilin 1 associates with glycogen synthase quinase-3 beta and its substrate tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 1998, 95, 9637-9641.

Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 2001, 122, 1961-1969.

Tanemura K., Chui DH., Fukuda T., Murayama M., Park JM., Akagi T., Tatebayashi Y., Miyasaka T., Kimura T., Hashikawa T., Nakano Y., Kudo T., Takeda M., Takashima A. Formation of Tau Inclusions in Knock-in Mice with Familial Alzheimer Disease (FAD) Mutation of Presenilin 1 (PS1). *J. Biol. Chem*., 2006, 281, 8, 5037–5041.

Teipel SJ., Born C., Ewers M., Bokde ALW., Reiser MF., Möller HJ., Hampel H. Multivariate deformation-based analysis of brain atrophy to predict Alzheimer's disease in mild cognitive impairment. *Neuroimage*, 2007, 38, 13-24.

Terro F., Czech C., Esclaire F., Elyaman W., Yardin C., Baclet MC., Touchet N., Tremp G., Pradier L., Hugon J. Neuron Overexpressing Mutant Presinilin-1 Are More Sensetive to Apoptosis Induced By Endoplasmic Reticulum-Golgi Stress. *Neuroscience Res*., 2002, 69, 530-539.

Terry RD., Masliah E., Salmon DP., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen LA., Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol*., 1991, 30, 572-580.

Troncoso JC., Sukhov RR., Kawas CH., Koliatsos VE. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease: correlations with senile plaques and disease progression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*., 1996, 55, 1134-1142.

Utsuki T., Shoaib M., Holloway HW., Ingram DK., Wallace WC., Haroutunian V., Sambamurti K., Lahiri DK., Greig NH. Nicotine lowers the secretion of the Alzheimer's amyloid beta-protein precursor that contains amyloid beta-peptide in rat. *J. Alzheimers Dis*., 2002, 4, 5, 405-15.

Valla J., Berndt JD., Gonzalez-Lima F. Energy hypometabolism in posterior cingulate cortex of Amzheimer's patients: superficial laminar cytochrome oxidase associated with disease duration. *J. Neurosci.*, 2001, 21, 4923-4930.

Valla J., Gonzalez-Lima F., Reiman EM. FDG autoradiography reveals developmental and pathological effects of mutant amyloid in PDAPP transgenic mice *Int. J. Dev. Neurosci*., 2008, 26, 3-4, 253–258.

Valla J., Schneider LE., Reiman EM. Age and transgene-related changes in regional cerebral metabolism in PS APP mice. *Brain Res.,* 2006, 1116, 194–200.

Van der Werf YD., Witter MP., Groenewegen HJ. The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res. Rev*., 2002; 39,107-40.

Van Gassen G., Annaert W. and Van Broeckhoven C. Binding partners of Alzheimer's disease proteins: are they physiologically relevant? *Neurobiol. Dis.,* 2000, 7, 135-51.

Van Groen T., Kadish I., Michael WJ. Role of the anterodorsal and anteroventral nuclei of the thalamus in spatial memory in the rat. *Behav. Brain Res*., 2002, 132, 19-28.

Varadarajan S., Yatin S., Aksenova M., Butterfield DA. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J. Struct. Biol.,* 2000, 130, 2-3, 184-208.

Vaucher E., Fluit P., Chishti MA., Westaway D., Mount HT., Kar S. Object recognition memory and cholinergic parameters in mice expressing human presenilin 1 transgenes. *Exp. Neurol*., 2002, 175, 2, 398-406.

Verwer RWH., Jansen KA., Sluiter AA., Pool CW., Kamphorst W., Swaab DF. Decreased hippocampal metabolic activity in Alzheimer patients is not reflected in the immunoreactivity of cytochrome oxidase subunits. *Exp. Neurol*., 2000, 163, 440-451.

Vickers JC., Dickson TC., Adlard PA., et al. The cause of neuronal degeneration in Alzheimer’s disease, *Prog. Neurobiol*., 2000, 60, 139-165.

Vincent SR., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience,* 1992, 46, 755-784.

Vito P., Lacana E., and D’Adamo L. Interfering with apoptosis: Ca^{+2} binding protein ALG-2 and Alzheimer’s disease gene ALG-3. *Science,* 1996, 271, 521-525.

Vonsattel JP., Myers RH., Hedley-Whyte ET., Ropper AH., Bird ED., Richardson EP Jr. Amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study. *Ann. Neurol*., 1991, 30, 5, 637-49.

Walsh RN., Cummins RA. The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull.,* 1976, 83, 482-504.

Walter J., Capell A., Grünberg J., Pesold B., Schindzielorz A., Prior R., Podlisny MB., Fraser P., Hyslop PS., Selkoe DJ., Haass C. The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Mol. Med*., 1996, 2, 6, 673-91.

Wang J., Xiong S., Xie C., Markesbery WR., Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.,* 2005, 93, 953-962.

Wang R., Meschia JF., Cotter RJ., Sisodia SS. Secretion of the beta/A4 amyloid precursor protein. Identification of a cleavage site in cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem*., 1991, 5, 266, 25, 16960-4.

Weidemann A., König G., Bunke D., Fischer P., Salbaum JM., Masters CL., Beyreuther K. Identification., biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 1989, 7, 57, 1, 115-26.

Weinshenker D. Functional consequences of locus coeruleus degeneration in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, 2008, 5, 342-345.

Weintraub S., Mesulam MM. Four neuropsychological profiles in dementia. In: H Spinnler, F Boller (eds), *Handbook of neuropsychology*, 1993, 8, 253-282.

Wevers A., Burghaus L., Moser N., Witter B., Steinlein O.K., Schütz U., Achnitz B., Krempel U., Nowacki S., Pilz K., Stoodt J., Lindstrom J., De Vos RAI., Jansen Steur ENH., Schröder, H. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer’s disease: postmortem investigations and experimental approaches. *Behav. Brain Res*., 2000, 113, 207-215.

Whitehouse PJ., Price DL., Struble RG., Clark AW., Coyle JT., Delong MR. Alzheimer’s disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science,* 1982, 215, 1237-1239.

Whitehouse PJ., Martino AM., Antuono PG., Lowenstein PR., Coyle JT., Price DL., Kellar KJ. Nicotinic acetylcholine binding sites in Alzheimer's disease. *Brain Res.,* 1986, 371, 46-51.

Winn P., Brown VJ., Inglis WL. On the relationships between the striatum and the pedunculopontine nucleus. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 1997, 11, 241-261.

Wisniewski H., Terry RD. Hirano A. Neurofibrillary pathology. *J.Neuropathol. Exp. Neurol.,* 1970, 29, 163-176.

Wisniewski T., Lalowski M., Golabek A., Vogel T., Frangione B. Is Alzheimer's disease an apolipoprotein E amyloidosis? *Lancet*., 1995, 15, 345, 8955, 956-8.

Wittenburg N., Eimer S., Lakowski B., Röhrig S., Rudolph C., Baumeister R. Presenilin is required for proper morphology and function of neurons in C. *elegans. Nature*, 2000, 20,406, 6793, 306-9.

Wolfe MS. {gamma}-Secretase-Intramembrane Protease with a Complex. *Sci Aging Knowl. Environ*., 2003, 19, 11, PE7.

Wolfe MS., Xia W., Ostaszewki BL., Diehl TS., Kimberly WT., Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and B-secretase activity. *Nature,* 1999, 398, 513-517.

Wong CW., Quaranta V., Glenner GG. Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., 1985, 82, 24, 8729-32.

Wong PC., Zheng H., Chen H., Becher MW., Sirinathsinghji DJ., Trumbauer ME., Chen HY., Price DL., Van der Ploeg LH., Sisodia SS. Presenilin 1 is required for Notch1 and DII1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature*, 1997, 387, 6630, 288-92.

Wong TP., Debeir T., Duff K., Cuello AC. Reorganization of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus in transgenic mice carrying mutated presenilin-1 and amyloid precursor protein transgenes. *J. Neurosci*., 1999, 19, 2706–2716.

Wong-Riley MTT. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochimistry. *Brain Res.,* 1979, 171, 11-28.

Wong-Riley M., Antuono P., Ho KC., Egan R., Hevner R., Liebl W., Huang Z., Rachel R., Jones J. Cytochrome oxidase in Alzheimer's disease: biochemical, histochemical, and immunohistochemical analyses of the visual and other systems. *Vision. Res*., 1997, 37, 24, 3593-608.

Wong-Riley MTT. Cytochrome oxidase an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neuroscience*, 1989, 12, 94-101.

Xia W., Zhang J., Ostaszewski BL. Presenilin 1 regulates the processing of ß-protein in endoplasmic reticulum and golgi. *Biochemistry*, 1998, 37, 16465-71.

Yamaguchi H., Maat-Schieman MLC., van Duinen SG., Prins FA., Neeskens P., Natté R., Roos RAC. Amyloid B protein (AB) starts to deposit as plasma membrane-bound form in diffuse plaques of brains from hereditary cerebral hemorrhage with amyloid-Dutch type, Alzheimer disease and nondemented aged subjects. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*., 2000, 59, 723-732.

Yan SD., Chen X., Fu J., Chen M., Zhu H., Roher A., Slattery T., Zhao L., Nagashima M., Morser J., Migheli A., Nawroth P., Stern D., Schmidt AM. RAGE and amyloid-

beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 1996, 22, 382, 6593, 685-91. Comment in: *Nature*, 1996, 22, 382, 6593, 674-5.

Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*, 1996,16, 5, 921-32.

Yankner BA., Dawes LR., Fisher S., Villa-Komaroff L., Oster-Granite ML., Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*, 1989, 28, 245, 4916, 417-20.

Yates CM., Butterworth J., Tennant M.C., Gordon A. Enzyme activities in relation to pH and lactate in post-mortem brain in Alzheimer-type and other dementias. *J. Neurochem.,* 1990, 55, 1624-1630.

Younkin SG., Goodridge B., Katz J., Lockett G., Nafziger D., Usiak MF., Younkin LH. Molecular forms of acetylcholinesterases in Alzheimer's disease, *Fed. Proc*., 1986, 45, 13, 2982-8.

Zakzanis KK., Graham SJ., Campbell Z. A meta-analysis of structural and functional brain imaging in dementia of the Alzheimer's type: a neuroimaging profile. *Neuropsychol. Rev*., 2003;13, 1-18.

Zarow C., Lyness SA., Mortimer JA., Chui HC. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch. Neurol.*, 2003, 60, 337-341.

Zékri O. Pharmacologie de la maladie d'Alzheimer, 1999, http://www.med.univ-rennes1.fr/etud/pharmaco/alzheimer.htm.

Zhang C., Wong-Riley MTT. Expression and regulation of NMDA receptor subunit R1 and neuronal nitric oxide synthase in cortical neuronal cultures: correlation with cytochrome oxidase. *J Neurocytol.*, 1999, 28, 525-539.

Zhang Z., Hartmann H., Do VM., Abramowski D., Sturchler-Pierrat C., Staufenbiel M., Sommer B., van de Wetering M., Clevers H., Saftig P., De Strooper B., He X., Yankner BA. Destabilization of B-catenin by mutations in *presenilin-1* potentiates neuronal apoptosis. *Nature*, 1998, 395, 698-702.

Zheng WH., Bastianetto S., Mennicken F., Ma W., Kar S. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience,* 2002, 115, 1, 201-11.

Zhu X., Perry G., Moreira PI., Aliev G., Cash AD., Hirai K., Smith MA. Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J Alzheimer's Dis*, 2006, 9, 147-153.

Zweig RM., Ross CA., Hedreen JC., Steele C., Cardillo JE., Whitehouse PJ., Folstein MF. and Price DL. The neuropathology of aminergic nuclei in Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol.,* 1988, 24, 233-242.

http://www.theses.ulaval.ca