

Université de Montréal

Étude de la relation entre les oligomères amyloïde-bêta et la protéine d'adhésion synaptique Neuroligine-1

par Julien Dufort-Gervais

Département de pharmacologie et physiologie de l'Université de Montréal
Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en pharmacologie

Octobre 2018

© Julien Dufort-Gervais, 2018

Résumé

Dans la maladie d'Alzheimer (MA), les pertes synaptiques et la neurodégénérescence, causées en partie par les oligomères amyloïdes-bêta ($A\beta$), sont les meilleurs prédicteurs des troubles de mémoire. Une priorité actuelle est d'identifier un biomarqueur affecté précocement par les $A\beta$. La protéine post-synaptique Neurologine-1 (NL-1) pourrait être une candidate due à son implication dans la plasticité synaptique et la mémoire. La première hypothèse de cette étude est que les dysfonctions synaptiques engendrées par les $A\beta_{01-42}$ pourraient affecter de façon précoce et progressive le niveau de NL-1. L'expression de NL-1 a été mesurée lors d'injections hippocampiques chroniques d' $A\beta_{01-42}$, d'exposition de neurones primaires d'hippocampe aux $A\beta_{01-42}$, ainsi que chez les souris 3xTg. En utilisant 5 ensembles d'amorces informant sur les transcrits de *Nl-1*, une augmentation des niveaux d'ARNm après 2 jours d'injections d' $A\beta_{01-42}$ a été détectée pour 2 ensembles d'amorces, et une diminution d'expression de 3 ensemble d'amorces a été mesuré après 4 jours d'injections. Par contre, aucun changement du niveau protéique n'a été observé. *In vitro*, le niveau de NL-1 diminue après 72h d'exposition aux $A\beta_{01-42}$, concordant avec une diminution de la viabilité des neurones. Finalement, les souris 3xTg femelles démontrent une diminution de NL-1 à 4 mois. Notre deuxième hypothèse stipulant que l'absence de NL-1 entraîne une toxicité accrue des $A\beta_{01-42}$ a été confirmée. Les souris NL-1 KO injectées aux $A\beta_{01-42}$ ont obtenus de plus faibles performances au test de la reconnaissance d'objet et à la piscine de Morris, ainsi qu'une perte neuronale plus importante que les autres groupes testés. Cette étude confirme la relation étroite entre NL-1 et les $A\beta_{01-42}$, apportant possiblement une nouvelle cible thérapeutique ou biomarqueur pour le développement de nouvelles thérapies aux stades précoces de la MA.

Mots-clés : Maladie d'Alzheimer, Neurologine-1, Amyloïde-bêta, mémoire, hippocampe

Abstract

Synaptic loss and neurodegeneration, partly induced by amyloid-beta oligomers (A β), are the best predictors of memory deficits in Alzheimer's disease (AD). An actual priority in the field is to identify a novel biomarker affected early by A β . The post-synaptic protein Neuroligin-1 (NL-1) could be a good candidate due to its roles in synaptic plasticity and memory. The first hypothesis of this study is that the synaptic dysfunctions caused by A β could rapidly and gradually affect the level of NL1. NL-1 expression was measured in chronic hippocampal A β ₁₋₄₂ injections, in primary hippocampal neuronal cultures exposed to A β ₁₋₄₂, and in 3xTg mice. Using 5 sets of probes assessing *NL-1* transcripts, an increase in mRNA levels after 2 days of A β ₁₋₄₂ injections was detected for 2 sets of probes, and a decrease in 3 sets of probes expression were measured after 4 days of injections. However, no change in protein level was observed. *In vitro*, the level of NL-1 decreases after 72 hours of exposure to A β ₁₋₄₂, following the decrease in neuron viability. Finally, female 3xTg mice show a decrease in NL-1 at 4 months. In addition, the second hypothesis that the absence of NL-1 will lead to increased toxicity has been confirmed. A β ₁₋₄₂ injected NL-1 KO mice performed poorly in spatial object recognition and in the Morris water maze, and had greater neuronal loss than all the other groups tested. This study therefore confirms the close relationship between NL-1 and A β ₁₋₄₂, possibly providing a new therapeutic target or biomarker for the development of therapies in the early stages of AD.

Keywords : Alzheimer's disease, Neuroligin-1, Amyloid-beta, memory, hippocampus

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements	xii
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 La maladie d'Alzheimer	1
1.1.1 Historique, statistiques et facteurs de risques	1
1.1.2 Symptômes et progression de la MA.....	3
1.1.3 Traitements et biomarqueurs de la MA	7
1.2 La protéine amyloïde-bêta (A β).....	10
1.2.1 Description et production de l'A β	10
1.2.2 Structure, oligomérisation et agrégation de l'A β	13
1.2.3 Neurotoxicité de l'A β	14
1.2.4 Modèles animaux de la MA	20
1.3 La protéine Neuroligine-1	23
1.3.1 Description de la protéine	23
1.3.2 Rôles de NL-1	26
1.3.3 Caractéristiques du modèle de souris NL-1 KO.....	29
1.4 Relation entre NL-1 et les A β o	31
Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs	35
2.1 Hypothèses.....	35
2.2 Objectifs.....	36
2.2.1 Objectif 1.....	36
2.2.2 Objectif 2.....	37
2.2.3 Contributions de l'auteur	37
Chapitre 3 : Matériels et méthodes	38
3.1 : Objectif 1 : <i>in vivo</i>	38

3.1.1	<i>Animaux</i>	38
3.1.1.1	<i>Souris WT pour injections d'Aβ₀₁₋₄₂</i>	38
3.1.1.2	<i>Souris 3xTg AD</i>	38
3.1.2	<i>Design expérimental</i>	39
3.1.3	<i>Implantation canules</i>	39
3.1.4	<i>Préparation des Aβ₀₁₋₄₂</i>	40
3.1.5	<i>Injections des Aβ₀₁₋₄₂</i>	41
3.1.6	<i>Western Blot</i>	42
3.1.7	<i>PCR quantitative (qPCR)</i>	43
3.1.8	<i>Analyses statistiques</i>	46
3.2	<i>Objectif 1 : in vitro</i>	46
3.2.1	<i>Culture cellulaire</i>	46
3.2.2	<i>Traitement des cellules aux Aβ₀₁₋₄₂</i>	47
3.2.3	<i>Tests de viabilité cellulaire et récolte des cellules</i>	48
3.2.4	<i>Analyses statistiques</i>	49
3.3	<i>Objectif 2</i>	49
3.3.1	<i>Animaux</i>	49
3.3.2	<i>Design expérimental</i>	50
3.3.3	<i>Tests de comportement</i>	51
3.3.3.1	<i>Reconnaissance spatiale d'objets (RSO)</i>	51
3.3.3.2	<i>Labyrinthe en Y</i>	52
3.3.3.3	<i>La piscine de Morris</i>	52
3.3.4	<i>Immunofluorescence (IF)</i>	54
3.3.5	<i>Microscopie et comptage cellulaire</i>	55
3.3.6	<i>Analyses statistiques</i>	56
Chapitre 4	<i>Résultats</i>	58
4.1	<i>Objectif 1</i>	58
4.1.1	<i>Effet des injections chroniques d'Aβ₀₁₋₄₂ sur les variants de NL-1</i>	58
4.1.2	<i>Effet des injections chroniques d'Aβ₀₁₋₄₂ sur la protéine NL-1</i>	60
4.1.3	<i>Progression du niveau de NL-1 dans un modèle 3xTg AD</i>	62
4.1.4	<i>Étude in vitro de l'effet des Aβ₀₁₋₄₂ sur la protéine NL-1</i>	63

4.2 Objectif 2	66
4.2.1 Détermination de l'emplacement du site d'injection.....	66
4.2.2 Effet combiné de la délétion de NL-1 et des A β ₀₁₋₄₂ sur la mémoire	68
4.2.2.1 Reconnaissance spatiale d'objets (RSO).....	68
4.2.2.2 Labyrinthe en Y	71
4.2.2.3 Piscine de Morris	73
4.2.3 Effet combiné de la délétion de NL-1 et des A β ₀₁₋₄₂ sur les pertes neuronales.....	79
Chapitre 5 : Discussion	81
5.1 Résumé des résultats.....	81
5.1.1 Objectif 1.....	81
5.1.2 Objectif 2.....	81
5.2 Effets des injections chroniques d'A β ₀₁₋₄₂ sur NL-1.....	82
5.3 Progression de NL-1 chez les souris 3xTg	87
5.4 Effets des A β ₀₁₋₄₂ sur NL-1 dans le modèle <i>in vitro</i>	90
5.5 Effet synergique de l'absence de NL-1 et des A β ₀₁₋₄₂	95
5.5.1 Mémoire spatiale	95
5.5.2 Mémoire de travail.....	103
5.5.3 Pertes neuronales	105
5.6 Limites	108
5.7 Perspectives.....	109
Chapitre 6 : Conclusion.....	112
Bibliographie	113
Annexe 1 : Tableaux des anticorps et ensembles amorces.....	i
Annexe 2 – Figures supplémentaire.....	iv

Liste des tableaux

Tableau 1 : Informations sur les anticorps utilisés pour le Western blot et l'IF.....Annexe 1

Tableau 2 : Informations sur les ensembles d'amorces utilisés pour le qPCR.....Annexe 1

Liste des figures

Figure 1 : Progression des divers processus pathologiques de la maladie d'Alzheimer.....	4
Figure 2 : Processus de production de l'A β et ses dérivés pathologiques.....	12
Figure 3 : Représentation schématique de NL-1 et ses isoformes.....	25
Figure 4 : Amorces utilisées pour la quantification de NL-1.....	45
Figure 5 : Détermination de la zone de comptage incluant représentation schématique du processus de détermination de la zone de comptage.....	57
Figure 6 : Progression du niveau d'ARNm des variants transcriptionnels de NL-1 en réponse aux injections chroniques d'A β ₁₋₄₂	59
Figure 7 : Progression du niveau protéique de NL-1 en réponse aux injections chroniques d'A β ₁₋₄₂ et dans un modèle de souris 3xTg.....	61
Figure 8 : Étude <i>in vitro</i> de l'effet des A β ₁₋₄₂ sur la viabilité cellulaire et la protéine NL-1...	65
Figure 9 : Emplacement approximatif du site d'injection dans l'hippocampe.....	67
Figure 10 : L'absence de NL-1 combiné aux injections chroniques d'A β ₁₋₄₂ engendre des déficits de mémoire à la RSO.....	69
Figure 11 : Performances au labyrinthe en Y préservés.....	72
Figure 12 : Performances à la piscine de Morris lors de la phase d'entraînement.....	74
Figure 13 : Performances à la piscine de Morris lors de la phase test.....	77
Figure 14 : Comptage neuronal dans le GD après injections chroniques.....	80
Figure supplémentaire 1 : Expression de l'ARNm de molécules d'ancrages en réponse aux injections chroniques d'A β ₁₋₄₂	Annexe 2
Figure supplémentaire 2 : Résultats de l'IC95 lors de la piscine de Morris.....	Annexe 2

Liste des abréviations

3xTg : Modèle de souris triple transgénique de la MA

uM : Micromolaires

AA : Acide aminé

ADNc : ADN complémentaire

A β : Amyloïde-bêta

A β ₁₋₄₀ : Amyloïde-bêta formé de 40 acides aminés

A β ₁₋₄₂ : Amyloïde-bêta formé de 42 acides aminés

A β _{scr} : Amyloïde-bêta scrambled

A β _o : Oligomères amyloïde-bêta

A β _{o1-40} : Oligomères amyloïde-bêta formé de 40 acides aminés

A β _{o1-42} : Oligomères amyloïde-bêta formé de 42 acides aminés

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate

ANOVA : Analyse de variance

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde

ARNm : ARN messenger

Ca²⁺ : Calcium

DI : Indice de discrimination

DLT : dépression à long terme

DRO : Dérivés réactifs à l'oxygène

EEG : Électroencéphalogramme

ENF : Enchevêtrements neurofibrillaires

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GD : Gyrus dentelé

HBSS : Hank's balanced salt solution

HO \cdot : radical hydroxyle

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

IF : Immunofluorescence

IRM : Imagerie par résonance magnétique

kDa : Kilodalton

KO : Knock-out
LCS : Liquide cérebrospinal
MA : Maladie d'Alzheimer
MMP9 : Matrice métalloprotéase 9
MWM : Piscine de Morris
nAChR : Récepteurs nicotinique de l'acétylcholine
ng : Nanogramme
NL-1 : Neuroligine-1
NLs : Les Neuroligines (Famille)
NL-1A : Neuroligine-1 avec insert A
NL-1B : Neuroligine-1 avec insert B
NL-1(-) : Neuroligine-1 sans insert
NL-1AB : Neuroligine-1 avec inserts A et B
NL-1s : Fragment soluble de Neuroligine-1
NL-2 : Neuroligine-2
NL-3 : Neuroligine-3
NL-4 : Neuroligine-4
NL-4Y : Neuroligine-4Y
NL-5 : Neuroligine-5
NMDAR : Récepteurs N-méthyl-D-Aspartate
NREM : Non-Rapid eye movement
NRXNs : Les Neurexines (Famille)
NRXN1- α : Neurexine 1-alpha
NRXN1- β : Neurexine 1-bêta
RNO : Test de reconnaissance du nouvel objet
PLT : Potentialisation à long terme
PSD-95 : Protéine de la densité post-synaptique-95
PSEN1 : Préséniline-1
PSEN2 : Préséniline-2
qPCR : PCR quantitative
REM : Rapid eye movement

RT : Transcription inverse

RSO : Test de reconnaissance spatiale d'objets

SI : Site d'injection

TCL : Troubles cognitifs légers

TEP : Tomographie par émission de positrons

uL : Microlitres

VH : Véhicule

WT : Souris sauvage

Savoir n'est pas être, mais être, c'est savoir...

- Anonyme

Remerciements

N.B. : SVP, veuillez ne pas être vexé de l'ordre de présentation des remerciements. Celui-ci est totalement aléatoire, sauf pour certains/certaines ...

Ce travail de longue haleine est le fruit de mes efforts, mais surtout de beaucoup de personnes exceptionnelles ayant tous contribué à leur façon. Lors des 2 dernières années et demie qui ont filées à la vitesse de l'éclair, j'ai énormément appris tant au niveau technique, scientifique, que sur moi-même, et c'est grâce à vous tous :

Premièrement, j'aimerais remercier mes directeurs de recherche, Dr. Jonathan Brouillette et Dre. Valérie Mongrain, qui ont élaborés ce projet de recherche et m'ont guidé tout au long de ma maîtrise. Vos conseils, votre temps, votre patience et nos discussions ont fait toute la différence pour la réussite de ce projet. Je suis fier de ce travail, et je le dois à vous deux. Merci de m'avoir permis de publier un article en votre compagnie, et j'aspire à beaucoup d'autres !

Jonathan, merci de ta confiance qui va me permettre dans quelques jours d'être ton premier étudiant graduant des études supérieures. Je peux comprendre que m'accorder cette confiance a dû être difficile au début, je t'en remercie énormément. Tes connaissances approfondies sur la maladie d'Alzheimer et ton large bagage expérience m'ont permis d'apprendre énormément en très peu de temps, merci beaucoup.

Valérie, ça fait maintenant plus de 3 ans que nous travaillons ensemble sur divers projets et je ne pourrais pas être plus heureux. Je ne pourrai jamais te remercier assez de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné ma première chance lors de mon stage, mais aussi de m'avoir proposé ce projet de maîtrise. Dès les premiers jours j'ai su que travailler avec toi serait un plaisir quotidien, et j'avais entièrement raison. J'ai pris de l'assurance et de la

confiance au travail, mais aussi en moi à travers les années, et c'est grâce à toi. Merci de ta patience, ton écoute, ton ouverture, tes conseils, ta rapidité phénoménale à commenter les travaux ou demandes de bourses, mais **SURTOUT** ton positivisme, ta joie de vivre et ton sourire quotidien qui permettent de toujours sortir de ton bureau avec un sourire et une attitude positive, même quand rien ne fonctionne. J'espère avoir la chance de pouvoir continuer à travailler avec toi encore des longues années ! MERCI pour tout !!!!

L'environnement de travail compte beaucoup dans les succès d'un laboratoire. J'ai l'incroyable chance d'avoir probablement la meilleure équipe de travail qu'on peut espérer avoir. Les personnes ci-dessous sont non seulement des collègues de travail hors-pair, mais des amis/amies pour le reste de mes jours. Merci pour les nombreux moments de plaisir, arrosés ou non.

Merci aux membres actuels du labo Mongrain : Lydia qui est une source impérisable de « prank », mais surtout d'écoute et de générosité; Neus pour notre passion commune de la musique et ta bonne humeur constante; Morgane pour sa persévérance et ténacité et Cassandra pour sa sagesse tranquille. Mention spéciale à : Chloé pour ton calme légendaire, ton talent indéniable et ton IMMENSE aide avec les souris; Pierre-Gabriel pour son dessin de synapse à la figure 3, mais surtout pour ton intensité et ta joie de vivre !

Merci à la petite équipe du labo Brouillette : David et Christina pour votre soutien, votre aide et votre énergie positive. C'est un travail colossal de travailler dans un jeune laboratoire et commencer de nouveaux projets, mais je crois qu'on se tire plutôt bien d'affaire! Merci aux stagiaires qui m'ont aidé avec le projet : Jean-François et Rafik. Mention spéciale à Laurence qui m'a énormément aidé pour les résultats d'immunofluorescence et qui m'a permis de passer un très bel été 2018. J'espère que mon incroyable voix et les mêmes chansons en boucle ne te manquent pas trop. Merci pour ton beau travail, mais même si j'en ai encore envie, je devrai couper dans mes remerciements un peu.

Merci aux membres passés des laboratoires : Bong Soo, Emma (!!!), Pablo, Bob, four amazing friends that made the lab and Montréal a little more fun ! Mention spéciale à Gabrielle, partenaire de labo initiale qui m'a aidé pour certaines expériences ainsi que Erika et Mélanie pour leur aide, leur expertise, mais surtout leur immense patience et dévouement pour la réussite de nos expériences, un GROS merci ! Merci à certains membres du centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur : Simon (M. Fournier), le plus Mongrain des Warby, Caroline, Louis, Kim. Finalement, merci aux membres du jury d'évaluation, Dr. Éric Thorin et Dr. Jannic Boehm, d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire et merci aux membres du comité de sélection de la bourse J.A. De Sève de m'avoir octroyé la bourse pour l'année 2017.

Afin de maintenir un sain équilibre de vie, il est primordial de s'entourer de famille et d'amis proches sur qui l'on peut se fier. À ce niveau, je suis très choyé : Merci aux Vieux BBQ : Vincent, Charlie, Louis-Karl (Klaude), Édouard, Mathieu, Mikael, Félix et Samuel pour les moments incroyables passés et, ceux à venir. Je vous aime les boys, c'est tout ! Merci à Simon, Jessy, Léa, Kris, Randall, Marc (121312), c'est toujours un plaisir de passer du temps avec vous !

Merci à ma famille : mes oncles et tantes Sophie, Benoit, Manon, David, Paul, Diane; mes cousins/cousines Antoine, Frédérique, Camille, Michael, Noémie; et bien sûr ma sœur Alexia !!!! Merci pour les moments familiaux toujours extrêmement plaisants et bruyants !!

J'aimerais aussi remercier quelques personnes qui ne verront surement jamais ces remerciements, mais qui ont été très importantes pour la réussite de ce mémoire. Merci à Alex Turner pour son génie lyrique et musical qui m'inspire et me fait voir des étoiles, Mike Ward pour les nombreuses heures sous écoute, tous les concepteurs des jeux FIFA 18 et League of Legends, Jermaine Lamarr Cole pour ses discours inspirants, les fondateurs des festivals Osheaga, Primavera Sound, Lollapalooza et Boston Calling, mais surtout, mon chat Mignone aka. Mimi, la plus belle chatte du monde.

Parfois, on rencontre des gens qui vont marquer et guider notre vie sans que l'on s'en rende compte immédiatement. C'est seulement plusieurs années plus tard qu'on constate l'influence qu'on eut ces personnes sur notre chemin. C'est le cas de Monsieur Steven Festekjian qui a été mon professeur de biologie, chimie et physique en secondaire 1, 3 et 5. De par sa passion, ses méthodes d'enseignement audacieuse et son dévouement aux élèves, il a su piquer ma curiosité dès le premier jour, et me transmettre sa passion des sciences. Je me rends compte aujourd'hui que sans Monsieur Festekjian, je n'aurais possiblement jamais eu d'intérêt pour la science, je n'aurais jamais écrit ce mémoire et je n'aurais jamais trouvé cette passion qui me rend heureux d'aller travailler à tous les jours. Alors, Monsieur Festekjian, je vous dis le plus gros des merci d'avoir transmis votre passion au jeune moi, qui fait maintenant du vieux moi, un adulte passionné et accompli.

Les deux prochains paragraphes sont pour les personnes les plus importantes pour moi, désolé pour ceux mentionnés plus haut.

Le plus gros des MERCI à mes parents, Nathalie et Daniel. Votre incommensurable support tout au long de mes études est le plus beau cadeau que vous pouviez me faire. Tant dans le sport, qu'à l'école, et maintenant au travail, vous m'avez toujours encouragé et avez respecté mes choix, tout en sachant bien me guider. Je ne crois pas que j'aurais pu réussir sans vous. Je suis plus que choyé de vous avoir. Merci pour les bons repas lors des soupers en famille, de votre écoute quand ça me tente de parler et de vous inquiéter même si tout va bien. Merci pour tout ! Je vous aime à tous les jours, pour toujours.

Les derniers remerciements sont pour quelqu'un qui compte énormément pour moi, mon amour Mathilde. Merci d'être toujours là pour moi depuis maintenant 4 ans, ton soutien dans tout ce que j'entreprends est extrêmement important pour moi. Merci d'être mon meilleur public, même si selon toi je ne suis pas toujours drôle, merci pour les beaux moments si vite oubliés, merci pour les batailles le matin, ou n'importe quand, merci de m'endurer quand tu étudies et que je te dérange, mais surtout merci de m'endurer moi, pour tout ce que je suis.

Merci d'être toujours partante pour de nouvelles aventures, ou pour rester tranquille à la maison, merci d'être la meilleure partenaire de festival, sauf quand tu vas aux toilettes, merci d'être la plus patiente et la plus conciliante, mais surtout, merci d'être à la fois ma meilleure amie et mon amoureuse. Je n'aurais jamais pu faire tout ce travail sans toi qui me soutient, merci infiniment. Je t'aime plus que tout.

Merci encore à tous, j'espère n'avoir oublié personne. Ce long travail est pour vous tous. Mes quelques années en recherche m'ont appris qu'il faut savoir apprendre des défaites et les oublier, mais surtout, il faut célébrer les accomplissements, qu'ils soient petits ou grands.

Celui-ci en est un grand, bonne lecture.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 La maladie d'Alzheimer

1.1.1 Historique, statistiques et facteurs de risques

La maladie d'Alzheimer (MA) est sans doute une des maladies les plus connues du grand public. Tous ont connu, de près ou de loin, une personne de leur entourage ayant été affectée par cette maladie. La cause principale de la MA serait la neurodégénérescence émergente dans certaines régions du cerveau, comme par exemple, l'hippocampe, centre de la mémoire, ainsi que le cortex préfrontal, régissant les fonctions cognitives supérieures (Fjell et al., 2014; Goldman-Rakic, 1996; Squire, 2004). Cette neurodégénérescence entraîne des conséquences débilantes qui vont progressivement mener à la démence chez les patients, faisant de la MA la forme la plus commune de démence. Cette maladie a été rapportée pour la première fois au début du XXe siècle par le docteur Allemand Aloïs Alzheimer qui fit l'analyse histologique du cerveau d'un de ses patients souffrant de démence (Graeber & Mehraein, 1999; Moller & Graeber, 1998). Il décrira pour la première fois les plaques séniles, constituées principalement de la protéine amyloïde-bêta (A β), ainsi que les enchevêtrements neurofibrillaires (ENF), formées de la protéine Tau hyperphosphorylée, deux observations encore fréquemment utilisées de nos jours en science fondamentale et pour le diagnostic clinique (Haass & Selkoe, 2007; Marksteiner, Hinterhuber, & Humpel, 2007; Spires-Jones & Hyman, 2014).

La MA représente 60 à 80% des cas de démence et touche plus d'un tiers de la population âgée de 85 ans et plus (Alzheimer's Association, 2016; Ferri et al., 2005). Au

Canada, en raison du vieillissement de la population, ce nombre pourrait augmenter de 66% d'ici 2031 (Société Alzheimer Canada, 2018). Il existe certains facteurs de risque de cette maladie. Certains sont incontrôlables, comme le vieillissement, le sexe (prévalence plus élevée chez les femmes (Li & Singh, 2014)), ainsi que certains facteurs génétiques héréditaires tels que la mutation des gènes de l'Apolipoprotéine E, la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et de la préséniline-1 ou -2 (PSEN1; PSEN2) qui entraîneront le développement de la forme familiale de la MA (Alagiakrishnan, Gill, & Fagarasanu, 2012; Dorszewska, Prendecki, Oczkowska, Dezor, & Kozubski, 2016; Panpalli Ates, Karaman, Guntekin, & Ergun, 2016; Wu et al., 2012). Par contre, certains facteurs sont contrôlables, comme par exemple la consommation d'alcool et de cigarettes qui augmenteraient le risque de développer la maladie (Graves et al., 1991). Au contraire, l'activité physique, l'éducation et le maintien de bonnes habitudes de vie auraient un effet protecteur contre la MA (Alzheimer's Association, 2016; Barnard et al., 2014). Ces facteurs contrôlables pourraient influencer le développement de la forme la plus fréquente de la MA, la forme sporadique (Harvey, Skelton-Robinson, & Rossor, 2003), qui se manifeste sans nécessairement avoir de prédisposition génétique, mais qui semble plutôt influencée par l'environnement et le style de vie (Dorszewska et al., 2016; Zetterberg & Mattsson, 2014). Malgré de nombreux efforts pour sensibiliser la population à cette maladie, sa croissance à l'échelle mondiale s'accélère, et semble bien loin de ralentir.

1.1.2 Symptômes et progression de la MA

Les patients atteints de la MA vont traverser un processus s'échelonnant sur plusieurs années, affectant progressivement leurs capacités cognitives, mais aussi leur personnalité et leur autonomie. Le premier stade de la MA est le stade préclinique. Ce stade est très souvent asymptomatique, où les patients vont parfois rapporter certaines pertes de mémoire subjectives, sans que celles-ci affectent leur quotidien (Chong & Sahadevan, 2005; Nitri, 2010). Il est parfois difficile de distinguer ce stade préclinique du vieillissement normal d'un individu, car souvent confondu avec d'autres maladies comme la dépression. Par contre, de plus en plus d'études démontrent que malgré l'absence de symptômes chez les patients, l'accumulation des principaux marqueurs pathologiques de la MA, en l'occurrence les protéines A β et Tau, débutent à ce stade (Fig. 1) (Sperling et al., 2011; Strozyk, Blennow, White, & Launer, 2003; Vos et al., 2013). Ces deux protéines sont impliquées dans les processus de pertes synaptiques et de neurodégénérescence, et sont aussi fréquemment utilisées comme outils diagnostiques de la MA (Haass & Selkoe, 2007; Marksteiner et al., 2007; Spiers-Jones & Hyman, 2014). L'analyse du liquide cébrospinal (LCS) d'individus au stade préclinique démontre une réduction du niveau d'A β formé de 42 acides aminés (A β ₁₋₄₂), ainsi qu'une augmentation de la protéine Tau totale et phosphorylée (Sperling et al., 2011; Strozyk et al., 2003; Vos et al., 2013). De plus, l'utilisation de l'imagerie de tomographie par émission de positrons (TEP) à ce stade permet déjà d'observer une augmentation de l'accumulation d'A β dans le cerveau (Jack et al., 2010; Palmqvist, Mattsson, Hansson, & Alzheimer's Disease Neuroimaging, 2016). Finalement, malgré l'absence de symptômes chez ces individus, le processus de neurodégénérescence semble déjà enclenché au stade préclinique (Fig. 1). À l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), il est possible de voir une diminution de

la matière grise dans l'hippocampe et dans plusieurs régions du cortex cérébral, dont le cortex entorhinal, résultant en une atrophie partielle de ces régions (Besson et al., 2015; Oh, Habeck, Madison, & Jagust, 2014; Sperling et al., 2011). Malgré l'absence apparente de pathologie chez les personnes atteintes, le stade préclinique asymptomatique de la MA pourrait offrir une fenêtre thérapeutique afin de ralentir ou arrêter les processus déjà bien entamés de neurodégénérescence.

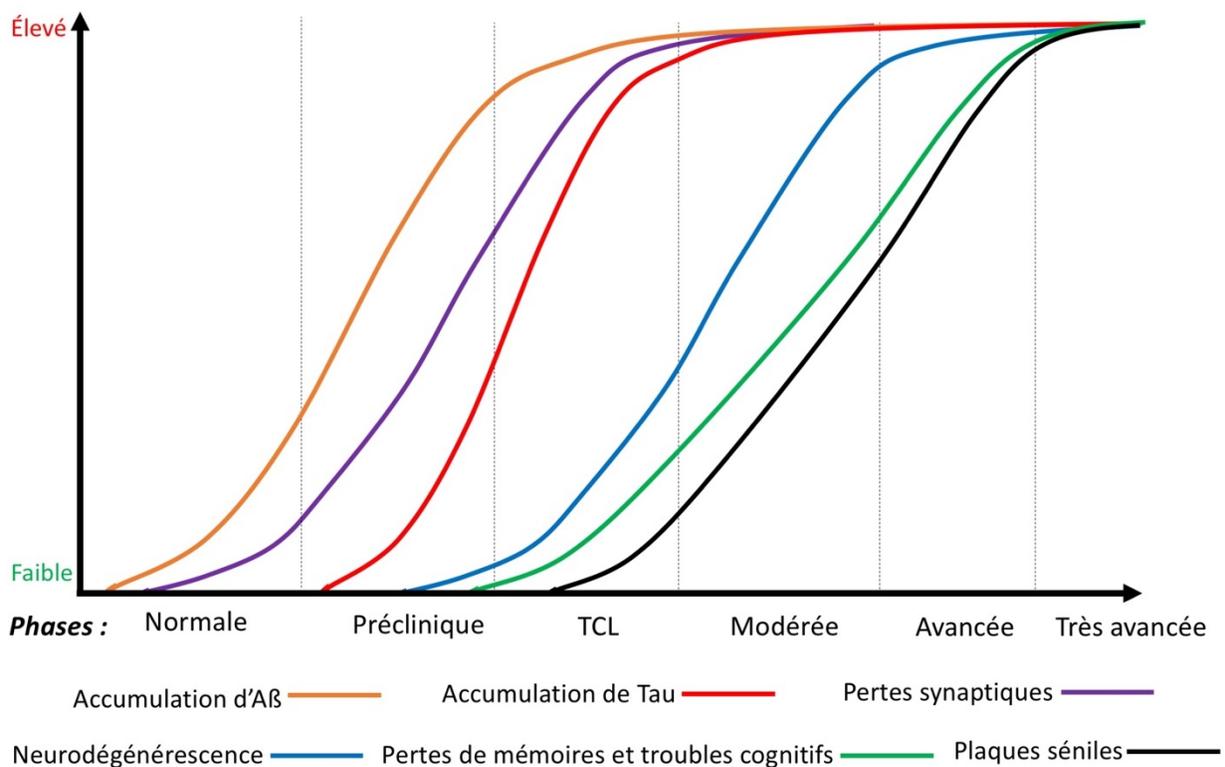


Figure 1 : Progression des divers processus pathologiques de la maladie d'Alzheimer. Courbes de progression des processus pathologiques observés dans les différentes phases de la MA (Normale, préclinique, troubles cognitifs légers (TCL), modérée, avancée et très avancée) . L'axe des y représente le niveau de sévérité, et l'axe des x est la progression à travers le temps. La légende de couleur de chaque courbe est illustrée au bas du graphique. Orange = accumulation d'Aβ; Rouge = Accumulation de Tau; Mauve = Pertes synaptiques; Bleue = neurodégénérescence; Verte = Pertes de mémoire et troubles cognitifs; Noire = Plaques séniles

Après quelques années, les patients atteignent un stade de la MA nommé trouble cognitif léger (TCL). À ce stade, les personnes atteintes commencent à développer certains problèmes cognitifs, sans toutefois souffrir de démence ou perdre leurs habilités fonctionnelles (Fig. 1). Des difficultés dans la prise de décision et la rapidité à trouver un mot ou le nom d'une personne sont parmi les symptômes fréquemment observés chez les individus avec un TCL (Albert et al., 2011). De plus, ce qui distingue la phase préclinique des TCL, est la préoccupation du patient, ou de son entourage, face à ces changements cognitifs (Ahmed et al., 2008). Les biomarqueurs, A β et Tau, ainsi que divers tests neuropsychologiques sont utilisés pour le diagnostic à ce stade (Schmand, Eikelenboom, van Gool, & Alzheimer's Disease Neuroimaging, 2012). Dans certains cas, il est possible de voir l'apparition des premières plaques séniles, ainsi que des ENF dans le cortex cérébral et l'hippocampe (Fig. 1) (Guillozet, Weintraub, Mash, & Mesulam, 2003; Mufson et al., 2012; Thal, Rub, Orantes, & Braak, 2002). L'apparition de ces marqueurs démontre que les processus de neurodégénérescence sont avancés, ce qui se reflète davantage par l'atrophie du cerveau observé en IRM (Granziera et al., 2015; Lewczuk, Mroczko, Fagan, & Kornhuber, 2015; Martinez-Torteya, Trevino, & Tamez-Pena, 2015). En somme, le stade de TCL serait possiblement la dernière chance d'agir sur la progression de la MA, puisqu'aux stades suivants, la neurodégénérescence pourrait être trop avancée et impossible à renverser.

Aux stades suivants, les patients progressent vers les stades modérés et avancés de la MA, qui vont affecter leur vie de façon beaucoup plus marquée. Les pertes de mémoire seront plus fréquentes, allant d'oublis d'informations ou d'événement récent, à l'oubli de souvenir de lointain (Jahn, 2013). D'autres problèmes cognitifs se développent, comme des difficultés

d'apprentissage, de l'aphasie et des déficits d'orientation dans leur environnement (Kirova, Bays, & Lagalwar, 2015). La démence peut aussi entraîner certains changements dans l'humeur et la personnalité des patients, se traduisant en comportements agressif, dépressif et anxieux (Echavarri et al., 2013; Lyketsos et al., 2000). Au stade modéré de la MA, la neurodégénérescence atteint gravement des structures du cerveau essentielles pour le maintien de certaines fonctions cognitives, comme l'hippocampe et le cortex préfrontal (Fig. 1) (Cohen & Klunk, 2014; Larouche, Hudon, & Goulet, 2015). Les plaques séniles et les ENF progressent aussi pour atteindre la région CA1 de l'hippocampe, le cortex entorhinal et l'amygdale (Thal et al., 2002; Thal, Walter, Saido, & Fandrich, 2015). À noter que les régions touchées sont toutes impliquées dans les processus cognitifs affectés chez les patients, soit la mémoire et la cognition (hippocampe et cortex frontal) et le contrôle des émotions (amygdale). À ce stade, les patients sont toujours en moyen d'avoir une certaine autonomie au quotidien, malgré divers aspects de leur vie grandement affectée. Par contre, le pronostic indique une accélération de la progression de la maladie, qui laisse une espérance de vie de 5 à 15 ans aux patients (Tom et al., 2015; Zanetti, Solerte, & Cantoni, 2009).

Les stades avancés de la MA sont les derniers avant la fin de la vie des patients. Au niveau cognitif, les conséquences sont très handicapantes pour les patients qui vont être incapables de reconnaître leur entourage, d'emmagasiner de nouveaux souvenirs et vont avoir besoin d'assistance en permanence (Fig. 1) (Masters et al., 2015; McKhann et al., 2011). La MA n'entraîne pas directement la mort des patients, ceux-ci vont plutôt décéder de maladies tels la pneumonie ou de défaillances cardiaques (Alzheimer's Association, 2016). L'analyse de cerveaux post-mortem permet l'observation d'une atrophie cérébrale et hippocampale

considérable (Perl, 2010). On retrouve aussi des plaques séniles et ENF dans plusieurs régions sous-corticales comme le thalamus, l'hypothalamus et le striatum (Thal et al., 2015). En somme, les symptômes de la MA sont bien caractérisés aux stades modérés et avancés de la maladie. Par contre, l'atteinte de ces stades par les patients pourrait indiquer qu'il est déjà trop tard pour un possible traitement ou ralentissement de la maladie due aux dommages créés par la neurodégénérescence. C'est pourquoi la détection de la maladie aux phases prodromiques (normale et préclinique) est cruciale, et apporterait un vent d'optimisme vis-à-vis un traitement de cette maladie.

1.1.3 Traitements et biomarqueurs de la MA

Malgré que les bases moléculaires de la MA soient amplement étudiées, toujours aucun traitement efficace n'a été développé afin de ralentir ou contrer la maladie. Pourtant, plus d'une centaine de composés ont été testés depuis une dizaine d'années, certains atteignant même les phases 2 et 3 des essais cliniques (Becker, Greig, & Giacobini, 2008; Mehta, Jackson, Paul, Shi, & Sabbagh, 2017). Les raisons d'abandon sont diverses, mais la plus fréquente étant le manque d'efficacité du traitement administré et les effets secondaires indésirables (Mehta et al., 2017). Les principaux types de composés qui ont atteint les essais cliniques sont les anticorps ciblant la protéine A β , les inhibiteurs de la gamma-sécrétase et les composés ciblant la protéine Tau (Mehta et al., 2017; Weller & Budson, 2018).

Malgré ces nombreux échecs, il existe quelques traitements disponibles permettant de traiter partiellement la MA. Du lot, on compte trois inhibiteurs de cholinestérase, Donepezil,

Rivastigmine et Galantamine (Clegg et al., 2002; Weller & Budson, 2018). Ces médicaments vont bloquer la dégradation de l'acétylcholine par la cholinestérase, facilitant ainsi la transmission cholinergique des neurones (Birks, 2006). Ces composés sont recommandés chez les patients aux stades léger à sévère, et ont pour effet de ralentir la progression de la MA (Weller & Budson, 2018). Un autre traitement est donné aux patients aux stades modéré à sévère de la maladie, soit la Memantine. Ce composé agit à la fois comme un antagoniste des récepteurs glutamatergiques post-synaptiques N-méthyle-D-Aspartate (NMDAR), et un agoniste de la dopamine (Alam, Lingenfelter, Bender, & Lindsley, 2017). Il a pour effet de ralentir la progression de la MA et améliorer la qualité de vie des patients, sans toutefois renverser complètement les symptômes. En somme, les quatre médicaments brevetés et prescrits aux patients souffrant de la MA s'administrent tous lors des phases symptomatiques, et n'ont pour effet que de ralentir la progression de la maladie (Mehta et al., 2017).

L'inefficacité des traitements en développement contre la MA démontre la nécessité d'agir extrêmement rapidement dans la progression de la maladie afin d'éviter l'initiation des premiers mécanismes de neurodégénérescence. Pour s'y faire, de plus en plus de recherches se concentrent sur l'identification d'un biomarqueur aux stades très précoces de la MA. Les principaux biomarqueurs présentement utilisés sont centralisés autour des protéines A β et Tau. En effet, une diminution de la concentration d'A β ₁₋₄₂ dans le LCR, et une augmentation de la protéine Tau hyperphosphorylée sont les biomarqueurs les plus couramment utilisés (Sunderland et al., 2003). Une augmentation du ratio plasmatique d'A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀ est aussi utilisée, puisque celui-ci indique une plus grande concentration d'A β ₁₋₄₂, espèce la plus neurotoxique dans la MA (voir section 1.2) (Ritchie et al., 2014). D'autres marqueurs sont

aussi utilisés, comme les méthodes d'imagerie IRM et TEP, qui permettent d'observer respectivement l'atrophie de la matière grise et l'accumulation d'A β dans le cerveau (Tan, Yu, & Tan, 2014). Cependant, tous ces marqueurs sont directement impliqués, ou résultent des processus de neurodégénérescence. La dérégulation plasmatique et dans le LCR de l'A β ou Tau pourraient impliquer que la neurodégénérescence est déjà enclenchée, et pourrait même indiquer qu'il est trop tard pour traiter cette maladie. C'est pourquoi identifier un marqueur affecté de façon précoce par ces protéines permettrait une détection rapide de la MA afin de limiter les dysfonctions et pertes synaptiques, événements corrélant le mieux avec les troubles de mémoire (Crews & Masliah, 2010; Scheff & Price, 2006).

Un marqueur physiologique de la MA de plus en plus reconnu est les altérations du sommeil. Diverses études ont démontrées que le sommeil des patients au stade précoce de la MA serait affecté et pourrait être un bon prédicteur du développement de la maladie (Belleville, Fouquet, Duchesne, Collins, & Hudon, 2014; Schlosser Covell et al., 2012). Par exemple, autant chez les adultes d'âge avancé sans problèmes cognitifs que chez les individus TCL, une longue latence au sommeil et de la somnolence durant le jour serait prédicteur du développement de déclin cognitif (Suh et al., 2018). L'analyse spectrale de l'électroencéphalogramme (EEG) lors des stades de sommeil et à l'éveil démontre un ralentissement de l'activité EEG lors de l'éveil et du sommeil REM (Rapid eye movement) chez les patients TCL (Brayet et al., 2016), ainsi que des changements de puissance dans certaines bandes de l'EEG lors des sommeils REM et NREM (non REM) (Djonlagic et al., 2018). Ces altérations du sommeil sont aussi observées dans plusieurs modèles murins de la

MA, qui présentent différents phénotypes selon la ou les mutations les caractérisant (Dufort-Gervais, Mongrain, & Brouillette, 2018; Kent, Strittmatter, & Nygaard, 2018).

Malgré tous ces biomarqueurs couramment utilisés, la détection de la MA aux stades asymptomatiques reste un défi de taille. L'obtention d'un nouveau biomarqueur fiable, efficace et quantifiables aux stades asymptomatiques de la MA, soit avant le seuil de détection de l'accumulation des protéines A β et Tau (Sperling et al., 2011; Strozyk et al., 2003; Sun et al., 2018; Vos et al., 2013), permettrait de prendre les patients en charge rapidement afin qu'ils puissent rester autonomes et fonctionnels le plus longtemps possible.

1.2 La protéine amyloïde-bêta (A β)

1.2.1 Description et production de l'A β

Comme indiqué précédemment, une des protéines les plus étudiées et mieux caractérisées dans le domaine de la MA est la protéine amyloïde-bêta (A β). Cette protéine a été découverte bien avant qu'elle soit impliquée dans la MA. Elle a d'abord été rapportée comme un amas de cellulose et décrite comme une anomalie macroscopique lors de l'analyse histologique post-mortem d'organes de patients ayant divers pathologies (Sipe & Cohen, 2000). Depuis, la protéine A β est considérée comme un des marqueurs biologiques les plus fiables de la MA, et est utilisée à des fins de diagnostic de la maladie (Graeber & Mehraein, 1999). Cette protéine dérive de la protéine APP, une protéine transmembranaire de type I possédant un large domaine extracellulaire N-terminal, un domaine transmembranaire et un court domaine C-terminal intracellulaire (Fig. 2) (Reinhard, Hebert, & De Strooper, 2005). Bien que ses fonctions physiologiques ne soient pas encore complètement connues, l'APP

semble jouer un rôle dans la formation et le maintien des synapses ainsi que dans la survie et la croissance neuronale (Penke, Bogar, & Fulop, 2017; Turner, O'Connor, Tate, & Abraham, 2003). De plus, le domaine intracellulaire de l'APP a été démontré comme jouant un rôle important dans la plasticité, et la métaplasticité synaptique (Trillaud-Doppia & Boehm, 2018; Trillaud-Doppia, Paradis-Isler, & Boehm, 2016).

La protéine A β est générée par la voie amyloïdogénique de la cascade de clivage de l'APP (De Strooper, Iwatsubo, & Wolfe, 2012). En premier lieu, le domaine extracellulaire de l'APP va être partiellement clivé par la β -sécrétase, aussi appelé BACE1, libérant un fragment, nommé APP β soluble, dans le milieu extracellulaire (Cai et al., 2001) (Fig. 2). Ce clivage va laisser à la membrane un court fragment d'APP, nommé β CTF, avec domaine extracellulaire partiel et un domaine intracellulaire intact. Ce fragment va à son tour être clivé à deux endroits possible au niveau de la membrane plasmique par la γ -sécrétase, qui va relâcher dans le milieu intracellulaire un fragment nommé AICD, et dans le milieu extracellulaire, un fragment peptidique monomérique nommé A β (Fig. 2) (Zhang, Thompson, Zhang, & Xu, 2011). Par la voie non amyloïdogénique, le clivage de l'APP peut aussi résulter en la relâche d'un fragment peptidique de plus petite taille nommé p3, n'ayant pas de propriétés neurotoxiques (Fig. 2) (Dulin et al., 2008; Kojro & Fahrenholz, 2005). Finalement, la forme peptidique de l'A β va entrer en circulation, s'accumuler et éventuellement contribuer à certains processus de neurodégénérescence observés dans la MA.

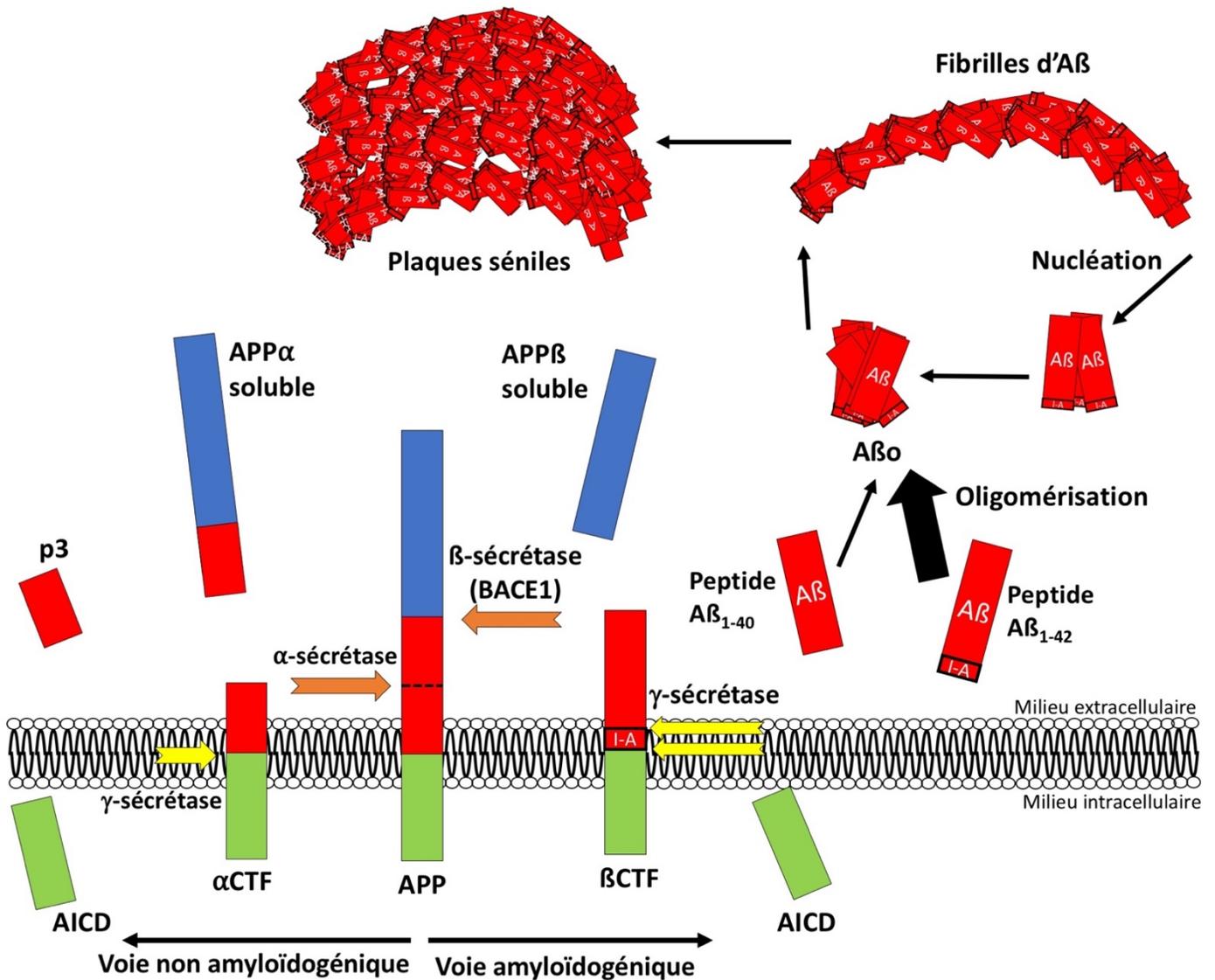


Figure 2 : Processus de production de l'Aβ et ses dérivés. Schéma illustrant les voies amyloïdogénique (droite) et non amyloïdogénique (gauche) du clivage de l'APP. Dans la voie amyloïdogénique, le domaine extracellulaire de l'APP est clivé par la β-sécrétase (BACE1), libérant un fragment, nommé APPβ soluble. Le fragment d'APP restant à la membrane (βCTF) va être clivé à deux positions possibles par la γ-sécrétase (flèches jaune), relâchant dans le milieu intracellulaire un fragment nommé AICD, et les fragments peptidiques monomériques Aβ₁₋₄₀ ou Aβ₁₋₄₂ dans le milieu extracellulaire. Lorsqu'il y a accumulation d'Aβ, ceux-ci vont se lier entre eux pour former les Aβ_o. Ces oligomères vont ensuite s'organiser en structures complexes nommées fibrilles. Un processus de nucléation peut être observé, où des fragments d'Aβ vont se libérer des fibrilles afin d'en produire de nouveaux. Ces fibrilles forment ensuite les plaques séniles qui vont se déposer sur les neurones ou la matrice extracellulaire. Dans la voie non amyloïdogénique, l'α-sécrétase va libérer un fragment, nommé APPα soluble. Le fragment restant à la membrane va être clivé par la γ-sécrétase, relâchant dans le milieu intracellulaire l'AICD, et p3 dans le milieu extracellulaire.

1.2.2 Structure, oligomérisation et agrégation de l'Aβ

Lorsque relâché dans le milieu extracellulaire, le fragment peptidique d'Aβ généré sera sous une forme monomérique, c'est-à-dire non associé avec d'autres peptides Aβ. Les deux formes monomériques de ce peptide générés sont l'Aβ₁₋₄₀, longue de 40 acides aminés (AA), et la forme Aβ₁₋₄₂, longue de 42 AA. La structure de ces deux peptides est très similaire, excepté la région C-terminale de l'Aβ₁₋₄₂ qui possède deux AA supplémentaires, soit une Isoleucine et une Alanine (Fig. 2) (Aleksis, Oleskovs, Jaudzems, Pahnke, & Biverstal, 2017). L'addition de ces deux résidus entraînera la formation de structures secondaires supplémentaires, comme des feuillets-bêta, qui augmenteront son hydrophobicité, sa capacité à s'agréger et son niveau de toxicité, aspect couverts dans les prochaines sections (Hou et al., 2004; Walti, Orts, Vogeli, Campioni, & Riek, 2015).

Lorsqu'il y a accumulation de ces monomères dans l'espace extracellulaire, ceux-ci vont se lier entre eux et former des oligomères Aβ (Aβ_o) de faible poids moléculaire (<50kDa) tels que les dimères, trimères et tétramères (Fig. 2). Ces Aβ_o ont une structure très dynamique et sont solubles dans le milieu extracellulaire, ce qui leurs permet d'être en circulation dans le cerveau (Chen et al., 2017). C'est cette conformation oligomérique de la protéine Aβ qui a été démontré comme étant plus toxique que les peptides monomériques dans la MA (Voir section 1.2.3). Ces petits Aβ_o vont continuer de s'agréger entre eux pour former des fibrilles organisées en longues chaînes hélicoïdales formées principalement de feuillets-bêta (Fig. 2) (Lu et al., 2013; Nelson et al., 2005). La formation de ces fibrilles s'effectue *via* un phénomène de nucléation, où les régions hydrophobiques des Aβ_o se lient entre elles pour former un noyau fibrillaire qui va s'allonger pour former des plus longues fibrilles, nommées

fibrilles matures (Aleksis et al., 2017). De ces fibrilles matures peuvent se libérer certains fragments qui agiront comme nouveau noyau fibrillaire et généreront l'élongation et la formation de nouvelles fibrilles matures (Fig. 2). L'hydrophobicité des deux AA additionnels de l'A β ₁₋₄₂ lui confère une capacité d'agrégation fibrillaire et de nucléation plus rapide que l'A β ₁₋₄₀ (Cohen et al., 2013; Meisl et al., 2014)

L'élongation et l'accumulation d'A β fibrillaire va diminuer leur solubilité, ce qui entraînera leur dépôt sur la matrice extracellulaire ou sur les cellules, produisant les plaques séniles (Fig. 2). Ces plaques sont caractéristiques de la MA puisqu'elles sont toujours observées dans le cerveau post-mortem de patients et utilisées pour le diagnostic de la MA (Graeber & Mehraein, 1999; Wahlster, Niederlander, Kriza, Schaller, & Kolominsky-Rabas, 2013). Comme les A β ₁₋₄₂ ont une capacité d'agrégation beaucoup plus rapide que l'A β ₁₋₄₀, c'est cette espèce qui constitue majoritairement les plaques séniles (Gravina et al., 1995; Iwatsubo et al., 1994; Roher et al., 1993). En somme, la forme A β ₁₋₄₂ représente la forme prédominante dans l'initiation et l'accélération de la MA due à sa structure primaire qui lui confère une hydrophobicité et une toxicité accrue en comparaison à l'A β ₁₋₄₀.

1.2.3 Neurotoxicité de l'A β

Encore de nos jours, les mécanismes sous-jacents à la neurodégénérescence qui survient dans la MA demeurent à être élucidés. La compréhension de ces mécanismes est cruciale pour l'éventuel développement de thérapies efficaces contre cette maladie. Beaucoup d'études ont montrées que la protéine A β est impliquée directement et indirectement dans ces

mécanismes de dégénérescence des neurones. Bien que les plaques séniles ont longtemps été associées à la neurodégénérescence, des études récentes indiquent qu'il n'y a pas de corrélation directe entre les plaques séniles et les pertes synaptiques et neuronales, et ce serait plutôt la forme soluble oligomérique de l'A β qui en serait responsable (Chen et al., 2017; Hsia et al., 1999; Mucke et al., 2000). Également, bien que la forme A β ₁₋₄₀ soit environ 10 fois plus abondante en circulation que la forme l'A β ₁₋₄₂ (Iwatsubo et al., 1994), cette dernière a été démontrée comme étant la plus neurotoxique dans la MA (El-Agnaf, Mahil, Patel, & Austen, 2000; Luheshi et al., 2007; Walsh et al., 2002).

Les mécanismes de neurodégénérescence entraînés par les A β o sont variés. Un des mécanismes souvent rapportés est la déstabilisation de la membrane cellulaire par la formation de pores. En effet, l'A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ peuvent adopter une structure quaternaire en forme de baril hexamérique qui va s'incorporer dans la membrane cellulaire des neurones en interagissant avec les lipides membranaires (Aleksis et al., 2017; Di Scala, Chahinian, Yahi, Garmy, & Fantini, 2014; Serra-Batiste et al., 2016). Ces pores vont provoquer une entrée massive de calcium (Ca²⁺), qui va déstabiliser l'homéostasie calcique et affecter divers mécanismes intracellulaire (Berridge, 2010; Sepulveda et al., 2014; Ullah, Demuro, Parker, & Pearson, 2015). Les peptides d'A β déjà incorporés dans la membrane peuvent aussi s'allonger pour former de plus longues fibrilles, ce qui entraînera une fragmentation membranaire (Sciacca et al., 2012). Finalement, grâce à ces deux AA supplémentaire, l'A β ₁₋₄₂ forme plus facilement et avec plus de stabilité cette structure quaternaire de baril hexamérique que l'A β ₁₋₄₀ (Lendel et al., 2014).

En parallèle, diverses études ont démontrées que l'Aβ peut lier et activer plusieurs récepteurs membranaires. Du lot, on compte les NMDAR et les récepteurs nicotiques d'acétylcholine (nAChR). L'Aβ lie les NMDAR via la sous-unité NR2B du récepteur (Deshpande, Kawai, Metherate, Glabe, & Busciglio, 2009), activant le récepteur et causant une dérégulation intracellulaire de Ca²⁺, entraînant une hyperexcitabilité synaptique et la mort des neurones (Alberdi et al., 2010; Ronicke et al., 2011; Shankar et al., 2007). La liaison de l'Aβ aux nAChRs induit un tout autre mécanisme, où l'activation de ces récepteurs par l'Aβ va initier une cascade signalétique impliquant les protéines ERK et JNK, entraînant une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau (Wang, Li, Benedetti, & Lee, 2003). Les Aβ peuvent aussi lier d'autres types de récepteurs tels que le récepteur de la neurotrophine p75 qui, lorsqu'activé par l'Aβ, transmettent un signal de mort cellulaire en activant la caspase-3 et la caspase-8, et augmente la production de dérivés réactifs à l'oxygène (DRO), qui sont toxiques pour les cellules (Hashimoto et al., 2004). L'Aβ peut aussi intrinsèquement produire des DRO grâce à sa structure secondaire qui lui confère la capacité de réduire certains atomes ferreux (Smith, Cappai, & Barnham, 2007). Ceci engendre la production de DRO, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle (HO⁻), espèces neurotoxiques et reconnues comme entraînant la mort des neurones (Cassagnes et al., 2013; Zhao & Zhao, 2013). De plus, en raison de sa conformation tertiaire, la forme Aβ₀₁₋₄₂ possède un pouvoir réducteur plus efficace, et lui permet aussi de produire des DRO en continue, ce que l'Aβ₁₋₄₀ ne peut pas faire (Irie et al., 2005).

Certains récepteurs ou protéines membranaires peuvent aussi lier l'Aβ afin d'induire leur internalisation dans les neurones. Parmi ceux-ci on compte le récepteur de lipoprotéine de

faible densité et le protéoglycan sulfate héparane qui vont internaliser l'Aβ via la voie des clathrines (Chen et al., 2017; Kanekiyo & Bu, 2014). Une fois internalisé, les Aβ vont être transportés par les systèmes des endosomes et lysosomes, où l'accumulation irrégulière d'Aβ va augmenter la perméabilité membranaire lysosomales, provoquer la relâche du contenu vésiculaire dans le cytoplasme des cellules, et activer les processus d'apoptose (Burdick, Kosmoski, Knauer, & Glabe, 1997; Ditaranto, Tekirian, & Yang, 2001). Le réticulum endoplasmique est aussi affecté par l'accumulation intracellulaire d'Aβ. Cette organelle subit un stress en présence d'Aβ, ce qui aura comme conséquence d'entraîner un mauvais repliement de certaines protéines et affecter l'homéostasie des réserves intracellulaire de Ca²⁺, phénomènes tous impliqués dans le processus de neurodégénérescence (Bahar, Kim, & Yoon, 2016; Popugaeva, Pchitskaya, & Bezprozvanny, 2017; Scheper & Hoozemans, 2015). Finalement, la mitochondrie est elle aussi affectée par l'accumulation intracellulaire d'Aβ. Un niveau élevé d'Aβ active les processus de fragmentation mitochondriale et induit des défaillances qui résulteront en un hypométabolisme, des défaillances synaptiques et la mort des neurones (Barsoum et al., 2006; Oh, Madison, Baker, Rabinovici, & Jagust, 2016; Volgyi, Juhasz, Kovacs, & Penke, 2015).

Un phénomène observé dans la MA qui prend beaucoup d'ampleur en recherche depuis quelques années est la neuroinflammation induite par les Aβ. L'apparition de l'inflammation se fait *via* l'activation microgliale induite par l'Aβ (McGeer & McGeer, 2013). L'activation de la microglie peut être un couteau à double tranchant puisque la microglie joue un rôle neuroprotecteur en étant partiellement responsable de l'élimination et la dégradation de l'Aβ (Go, Kou, Lim, Yang, & Fukuchi, 2016; Penke et al., 2017; Takata et al., 2010). Par contre,

l'activation de la microglie peut aussi avoir un effet toxique pour les neurones puisque l'activation chronique des récepteurs toll-like par l'A β entraîne des dysfonctions du récepteur qui enclenchera les processus d'inflammation (Gambuzza et al., 2014). L'A β peut aussi lier et activer d'autres récepteurs de la microglie comme les récepteurs CD14, CD36, TREM2 et RAGE (Chen et al., 2017; Hickman & El Khoury, 2014), qui activeront la production de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans les processus de neurodégénérescence, comme le facteur de nécrose tumorale-alpha et l'interleukine-1 β (ElAli & Rivest, 2016; Penke et al., 2017). Finalement, il a aussi été démontré que l'activation microgiale est responsable des pertes synaptiques précoces dans un modèle murin de la MA (Hong et al., 2016).

Au-delà de la mort neuronale, il est reconnu que les pertes synaptiques seraient les meilleurs prédicteurs des problèmes de cognition observés chez les patients souffrant de la MA (DeKosky & Scheff, 1990; Terry et al., 1991). Plusieurs études indiquent que ce serait la forme soluble oligomérique de l'A β qui serait responsable de ces pertes synaptiques, et non les plaques séniles. Les processus de dégénérescence synaptique sont variés, et dépendent du niveau d'accumulation de l'A β . À une concentration faible d'A β ₁₋₄₂, il semble se produire un phénomène de facilitation présynaptique, où les neurones vont augmenter leur relâche de vésicules présynaptiques, résultant en une augmentation de l'activité post-synaptique (Abramov et al., 2009; Puzzo et al., 2008). Cette facilitation présynaptique semble dépendante des nAChR, puisque qu'en liant ces récepteurs à la pré-synapse, l'A β va entraîner une augmentation de l'entrée du Ca²⁺ et faciliter la relâche des vésicules présynaptiques (Dineley, Bell, Bui, & Sweatt, 2002; Mucke & Selkoe, 2012; Puzzo et al., 2008). La facilitation présynaptique va ainsi augmenter l'activité des récepteurs post-synaptique NMDAR et

AMPA, induisant une excitotoxicité si le phénomène perdure de façon chronique, comme dans la MA. Cette faible concentration d'A β pourrait s'apparenter à celle retrouvée en circulation aux stades précoces de la MA, ce qui suggère que les pertes synaptiques pourraient être un des premiers événements observés chez les patients.

Lorsque l'accumulation d'A β augmente et atteint des concentrations plus élevées, il y aura un changement des processus de dysfonctions synaptiques. La facilitation synaptique induite aux faibles concentrations d'A β va entraîner la désensibilisation et l'internalisation des NMDAR, résultant en l'effondrement des épines dendritiques (Hsieh et al., 2006; L. Liu et al., 2004; Snyder et al., 2005). La perte de ces récepteurs à la post-synapse va aussi mener à l'activation des récepteurs péri-synaptiques qui engendreront les processus de dépression à long terme (DLT) par les voies p38, PP2B et GSK3 β (Li et al., 2009; Tackenberg & Brandt, 2009; Wang, Walsh, Rowan, Selkoe, & Anwyl, 2004). Les A β peuvent aussi induire une DLT par le blocage de la recapture du glutamate relâché dans la fente synaptique, activant davantage les NMDAR (Li et al., 2009). En contrepartie, plusieurs études ont montrés que les A β affectaient la PLT *in vitro* et *in vivo*, principalement dans le CA1 et le gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe (Yamin, 2009). Cette diminution de la PLT serait donc complémentaire à l'augmentation de la DLT, aussi engendré par les A β , ce qui accélérerait les processus de dysfonctions synaptiques. En somme, il existe une multitude de mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la neurotoxicité des A β . Comme les pertes synaptiques sont un événement précoce et corrèle bien avec les problèmes cognitifs chez les patients souffrants de la MA, cet aspect pourrait être exploité d'avantage afin de développer un biomarqueur et un traitement précoce de la MA.

1.2.4 Modèles animaux de la MA

Afin d'étudier les changements moléculaires et phénotypiques de la MA, divers modèles murins ont été développés afin de faciliter la recherche fondamentale. L'approche la plus souvent utilisée est l'introduction de mutations, préalablement identifiées chez l'humain, dans certains gènes de protéines impliquées dans la MA. Par exemple, une mutation dans la protéine APP, appelé "Swedish" (KM670/671NL) identifié dans la population Suédoise, où les individus ayant cette mutation avaient des pertes de mémoire et démontraient tous les critères de la MA (Mullan et al., 1992). Dans les modèles *in vitro* et murins, cette mutation induit une augmentation de la production et de la sécrétion d'A β , sans toutefois affecter le ratio A β ₁₋₄₀/A β ₁₋₄₂ (Citron et al., 1994; Johnston et al., 1994; Scheuner et al., 1996). La mutation du gène PSEN1 (M146V) est aussi fréquemment utilisée dans les modèles murins. La PSEN1 est une sous-unité de la γ -sécrétase qui est nécessaire pour son activité (Wolfe, 2013), et sa mutation va majoritairement augmenter la sécrétion de l'A β ₁₋₄₂, entraînant une diminution du ratio A β ₁₋₄₀/A β ₁₋₄₂ (Li, Liu, et al., 2016; Murayama et al., 1999). Finalement, la mutation du gène de la protéine Tau (MAPT) (P301L) est utilisé puisque cette mutation va accélérer la formation des ENFs (Barghorn et al., 2000; von Bergen et al., 2001). Bref, ces trois mutations semblent toutes accélérer les processus pathologiques de la MA, ce qui en fait de bons modèles pour la recherche fondamentale.

Un des modèle murins le plus étudié qui utilise ces trois mutations est le modèle de souris triple transgénique de la MA (3xTg). Au niveau moléculaire, ces souris démontrent un développement de la MA accéléré avec une accumulation d'A β intracellulaire dans

l'hippocampe et l'amygdale à 4 mois, et une apparition de dépôt extracellulaire d'A β dans le cortex frontal à 6 mois (Oddo, Caccamo, Kitazawa, Tseng, & LaFerla, 2003). Ces souris présentent aussi des déficits de PLT avant l'apparition des premières plaques d'A β à 6 mois, ainsi qu'une apparition tardive des ENFs à 12 mois (Billings, Oddo, Green, McGaugh, & LaFerla, 2005; Oddo et al., 2003). Au niveau cognitif, l'apparition des problèmes cognitifs corrèle avec l'apparition d'A β intracellulaire à 4 mois, où les souris vont démontrer un déficit de rétention à long terme à la piscine de Morris (Billings et al., 2005) et à 6 mois, ces souris démontrent des déficits de mémoire spatiale au labyrinthe de Barnes (Stover, Campbell, Van Winssen, & Brown, 2015). Ces mutations semblent donc induire divers phénomènes observés dans la MA, mais à un rythme beaucoup plus accéléré dans ce modèle animal.

D'autres modèles utilisent fréquemment une ou plusieurs de ces mutations, comme les modèles APP^{swe}/PSEN1^{dE9}, Tg2576 et J20, qui ont tous des phénotypes moléculaires et comportementaux similaires aux 3xTg (Dufort-Gervais et al., 2018; Jankowsky et al., 2004; Mucke et al., 2000). Cependant, une limite de ces modèles transgéniques est qu'ils possèdent une combinaison de dérèglements de facteurs pathologiques (APP, A β , Tau, PSEN1) et qu'il peut être difficile d'identifier précisément quel de ces facteurs, ou la combinaison de facteurs, entraînent un phénotype donné. Afin d'éviter cet effet confondant des modèles transgéniques, une 2^e génération de modèle murins pour étudier la MA est de plus en plus utilisée. Ces animaux, aussi appelés knock-in, sont modifiés par l'ajout d'une copie du gène d'intérêt, et non par la mutation du gène (Saito et al., 2014; Sasaguri et al., 2017). Ce modèle permet donc de mieux cibler la cause des phénotypes observés et de s'assurer d'avoir un effet dépendant du gène d'intérêt, tout en excluant la contribution d'autres facteurs confondants.

Un modèle utilisé pour étudier plus spécifiquement l'effet des A β dans la MA est l'injection d'A β directement dans le cerveau. Cette méthode consiste à infuser une solution d'A β dans une région cible du cerveau affectée dans la MA (Brouillette et al., 2012). Les A β peuvent être injectés une seule fois à l'aide d'une seringue, ou de manière chronique à l'aide de canules intracrâniennes, qui resteront en place pour une durée déterminée (Brouillette et al., 2012; Sajadi, Provost, Pham, & Brouillette, 2016). Notons qu'une injection chronique (3 à 6 jours) d'A β est nécessaire afin de permettre une accumulation suffisante d'A β pour induire une neurodégénérescence dans l'hippocampe (Brouillette et al., 2012; Sajadi et al., 2016). Cette méthode représente un modèle similaire à ce qui est observé au stade préclinique de la MA, lorsque les A β s'accumulent progressivement avant le début des pertes synaptiques et neuronales dans certaines régions du cerveau comme l'hippocampe et le cortex entorhinal.

Cette technique permet d'étudier l'effet spécifique du composé injectés (Ex. : A β ₁₋₄₂), à une région cible où la canule a été implantée (Ex. : Hippocampe). Par exemple, afin de pouvoir étudier le processus de neurodégénérescence induit par les A β ₁₋₄₂, une injection chronique (1 injection/jour pour 6 jours; 0.2 μ g/ μ L) est effectuée dans l'hippocampe de souris ou de rats (Brouillette et al., 2012; Sajadi et al., 2016). Il a été montré par cette méthode que des pertes neuronales progressives commencent à apparaître sous le site d'injection à partir du 3^{ème} jour. De plus, des déficits de mémoire au test d'évitement passif, au labyrinthe en Y, une hyperphosphorylation de tau, une activation accrue de la caspase 3 et une diminution des NMDAR ont été observés au 6^{ème} jour d'injection dans ce modèle (Brouillette et al., 2012). En somme, cette méthode d'injections chroniques des A β permet de reproduire plusieurs

phénomènes neuropathologiques de la MA, tout en excluant la contribution d'éléments pathologiques autre que l'A β pouvant induire un effet confondant, comme dans les modèles transgéniques. Elle permet aussi une observation et un contrôle temporel de l'effet des A β , aspect très important dans l'étude des stades précoces, et de la progression de la MA.

1.3 La protéine Neuroligine-1

1.3.1 Description de la protéine

La protéine Neuroligine-1 (NL-1) fait partie d'une grande famille de molécule d'adhésion synaptique nommée les Neuroligines (NLs). On compte 4 membres de cette famille chez les rongeurs, soit NL-1, 2, 3 et 4, et un cinquième membre est présent chez l'humain, NL-4Y ou aussi nommé NL-5 (Bemben, Shipman, Nicoll, & Roche, 2015). NL-1, comme les autres NLs, est une protéine transmembranaire de type I composée de trois principaux domaines : un domaine C-terminal intracellulaire comprenant un motif PDZ permettant l'interaction avec certaines protéines intracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine N-terminal extracellulaire (Fig. 3) (Tanaka, Nogi, Yasui, Iwasaki, & Takagi, 2011). Ce domaine extracellulaire est bien conservé à travers les espèces et comprend une séquence homologue à un domaine de l'acétylcholinestérase, sans toutefois en posséder l'activité (Lise & El-Husseini, 2006). Les NLs sont toutes localisées au niveau post-synaptique et interagissent avec leurs partenaires présynaptiques, les Neurexines (NRXNs), *via* leur domaine N-terminal extracellulaire. La NL-1 interagit préférentiellement avec la protéine Neurexine-1 β (NRXN1- β) de façon calcium-dépendante (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko, Nguyen, & Sudhof, 1996). Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire dans le système nerveux central, mais de façon plus marquée dans certaines régions du cerveau comme

l'hippocampe et le cortex cérébral (J. Y. Song, Ichtchenko, Sudhof, & Brose, 1999). De plus, la localisation post-synaptique des NLs varie d'une protéine à l'autre. Par exemple, NL-1 est majoritairement localisée aux synapses excitatrices (glutamatergiques), où elle interagira avec NRXN1- β , alors que la NL-2 est située aux synapses inhibitrices (GABAergique) (Chubykin et al., 2007; J. Y. Song et al., 1999; Varoqueaux, Jamain, & Brose, 2004).

Le domaine extracellulaire de NL-1 peut subir un épissage alternatif qui affectera la structure et le rôle de la protéine. Il a été démontré que deux sites d'épissages alternatif sont présents sur ce domaine, soit l'insert A et l'insert B. NL-1 est donc présente sous 4 isoformes: avec l'insert A (NL-1A), avec l'insert B (NL-1B), sans les deux inserts (NL-1(-)) et avec les deux inserts (NL-1AB) (Fig. 3) (Chih, Gollan, & Scheiffele, 2006; Ichtchenko et al., 1996). La variation des inserts modifie la localisation synaptique de NL-1, ainsi que son interaction avec les NRXNs à la pré-synapse. En effet, NL-1B et NL-1AB sont préférentiellement exprimés aux synapses glutamatergiques excitatrices et interagissent avec NRXN1- β , alors que NL-1A et NL-1(-) se localisent aux synapses inhibitrices GABAergiques et vont interagir avec NRXN1- α (Fig. 3) (Boucard, Chubykin, Comoletti, Taylor, & Sudhof, 2005; Chih et al., 2006; Ichtchenko et al., 1996; Koehnke et al., 2010).

Le domaine extracellulaire de NL-1 peut être la cible d'enzymes qui induiront le clivage et la relâche d'un fragment soluble de la protéine (NL-1s) dans la fente synaptique. Premièrement, une activité neuronale soutenue induit l'activation d'une cascade signalétique impliquant les NMDARs et la protéine kinase Ca²⁺-calmoduline dépendante, activant

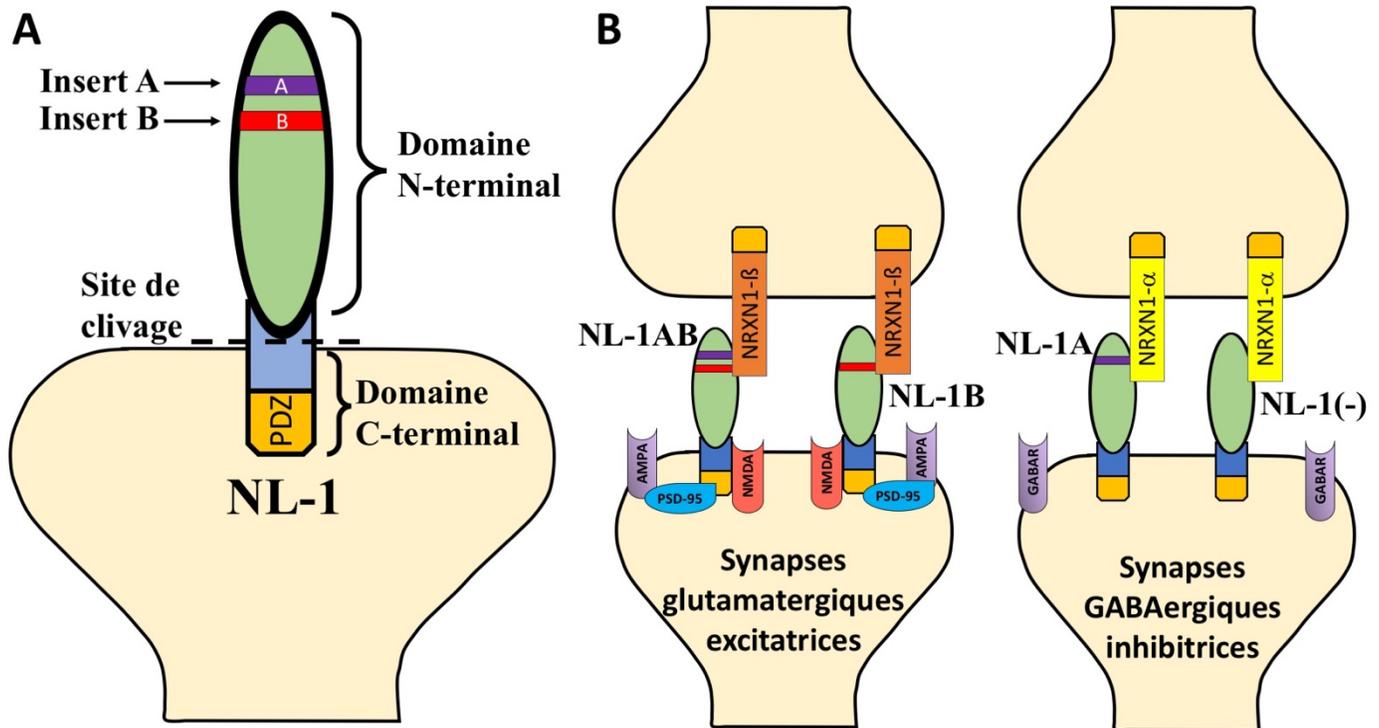


Figure 3 : Représentation schématique de NL-1 et ses isoformes (A) Illustration de NL-1 à la post-synapse et ses différents domaines. Du bas vers le haut : Domaine C-terminal intracellulaire avec son domaine PDZ en orange; Domaine intramembranaire en bleu ; ligne pointillée indiquant le site de clivage qui entraîne la relâche du fragment soluble de NL-1; Domaine N-terminal extracellulaire en vert avec les deux inserts possible, l'insert A (mauve) et l'insert B (rouge) **(B)** Illustration et localisation des 4 isoformes de NL-1. Synapse à gauche : Synapses glutamatergiques excitatrices où sont localisées NL-1AB (gauche) et NL-1B (droite), interagissant avec NRXN1- β . L'interaction avec les récepteurs NMDA et AMPA des deux isoformes est aussi illustré; Synapse à droite : Synapse GABAergique inhibitrice où sont localisées NL-1A (gauche) et NL-1(-) (Droite) interagissant avec NRXN1- α

ultimement la matrice métalloprotéase 9 (MMP9), qui va cliver le domaine N-terminal de NL-1 proche de son domaine transmembranaire (Fig. 3) (Peixoto et al., 2012). Ce clivage est aussi généré *in vivo* par une activité épileptique et par une stimulation sensorielle élevée (Peixoto et al., 2012). De plus, une activité synaptique soutenue a pour effet d'activer une succession de clivage impliquant la métalloprotéase ADAM10 et la γ -sécrétase. ADAM10 va cliver le domaine extracellulaire de NL-1, relâchant NL-1s dans le milieu extracellulaire, et la γ -

sécrétase va ensuite cliver et relâcher le domaine C-terminal de NL-1 dans le milieu intracellulaire (Suzuki et al., 2012). Faits intéressants, ADAM10 et la γ -sécrétase sont toutes deux impliquées dans les processus de clivage de la protéine APP (Asai et al., 2003; O'Brien & Wong, 2011) et la régulation d'ADAM10 pourrait avoir un effet protecteur contre le développement des plaques d'A β et des problèmes cognitifs (Postina et al., 2004; Yuan, Sun, Tan, Yu, & Tan, 2017). Ultimement, le clivage de NL-1 aura pour effet de déstabiliser son partenaire NRXN1- β et de diminuer la force synaptique (Peixoto et al., 2012), ainsi que de diminuer le remodelage et la formation d'épines dendritiques (Suzuki et al., 2012).

1.3.2 Rôles de NL-1

Les rôles joués par NL-1 à la synapse sont variés. Premièrement, NL-1 joue plusieurs rôles aux différents stades du processus de neurogénèse. En effet, le complexe NL-1/NRXN1- β contribue grandement à l'initiation du contact synaptique et la formation initiale des boutons pré et post-synaptiques (Chubykin et al., 2005; Dean et al., 2003; Graf, Zhang, Jin, Linhoff, & Craig, 2004; Scheiffele, Fan, Chih, Fetter, & Serafini, 2000). Pour appuyer ceci, des études *in vitro* de cultures de neurones primaires démontrent que la surexpression ou la diminution de l'expression de NL-1 augmente ou diminue respectivement la formation de synapses (Chih, Engelman, & Scheiffele, 2005; Sara et al., 2005; Wittenmayer et al., 2009). Une fois les synapses formées, NL-1 et NRXN1- β participent à la différenciation des boutons pré- et post-synaptiques en boutons excitateurs ou inhibiteurs (Chih et al., 2005; Graf et al., 2004; Levinson et al., 2005).

Ces études *in vitro* témoignent de l'importance de NL-1 pour l'initiation de la synaptogénèse, mais elle est aussi impliquée dans divers processus de maturation synaptique. Premièrement, NL-1 régule la transmission glutamatergique via son action sur les récepteurs NMDAR. Après l'initiation du contact synaptique, NL-1 initie le recrutement de ces récepteurs au niveau post-synaptique (Barrow et al., 2009; Chih et al., 2005), et contrôle ensuite leur abondance (Budreck et al., 2013). Une fois recrutée, NL-1 interagit directement avec les NDMAR par une interaction directe entre son domaine extracellulaire N-terminal et la sous-unité NR1 (Budreck et al., 2013), ainsi que via une interaction indirecte entre son domaine intracellulaire PDZ, les sous-unités NR1 et NR2B du récepteur et la protéine de la densité post-synaptique-95 (PSD-95), permettant de réguler la transmission glutamatergique (Fig. 3) (Barrow et al., 2009; Irie et al., 1997; J. Y. Song et al., 1999). NL-1 participe aussi au recrutement des récepteurs AMPAR à la post-synapse (Heine et al., 2008; Letellier et al., 2018; Nam & Chen, 2005) via une interaction indirecte par l'intermédiaire de PSD-95 (Fig. 3) (Irie et al., 1997; Mondin et al., 2011; Schnell et al., 2002). Le recrutement de ces deux récepteurs à la post-synapse par NL-1 démontre son importance dans la maturation des synapses nouvellement formées. Aux synapses matures, l'interaction entre NL-1/NRXN1- β permettra la stabilisation du complexe synaptique, afin d'assurer la fluidité et l'efficacité du passage de l'influx nerveux (Bang & Owczarek, 2013; Chen, Tari, She, & Haas, 2010). NL-1 s'impose donc comme une protéine importante aux processus d'initiation, de différenciation et de maturation des synapses.

Outre ses rôles au niveau moléculaire, NL-1 régule certains processus cellulaires, comme la plasticité synaptique. En raison de son rôle dans le fonctionnement des NMDAR,

NL-1 est impliquée dans la PLT. Une diminution partielle ou totale de la PLT est observée dans le KO conditionnel ou total de NL-1 dans la région CA1 de l'hippocampe (Budreck et al., 2013; Jiang et al., 2017; Shipman & Nicoll, 2012), dans le GD de l'hippocampe (Jedlicka et al., 2015; Shipman & Nicoll, 2012), dans le thalamus (Jung et al., 2010) et l'amygdale (Jung et al., 2010; Kim et al., 2008). Ces déficits de la PLT auront certaines répercussions sur les processus de mémoire qui seront couverts dans la prochaine section. Un mécanisme moléculaire des processus de plasticité synaptique présenté par Liu et al. impliquerait le domaine C-terminal intracellulaire de NL-1. En effet, lorsque clivé et relâché dans le milieu intracellulaire, le fragment C-terminal généré va interagir avec les protéines de la cascade LIMK1/cofilin, permettant ainsi la formation et la réorganisation des synapses via le cytosquelette d'actine (Liu et al., 2016). Ces études démontrent bien l'importance de NL-1 dans les processus de plasticité synaptique et les mécanismes sous-jacents.

Due à son importance dans les mécanismes de neuroplasticité et de synaptogénèse, NL-1 a été impliquée dans certaines maladies ou troubles neurologiques. Par exemple, dans les troubles du spectre de l'autisme, diverses mutations des NLs, dont NL-1, ont été détectées chez certains patients vivant avec ce trouble (Autism Genome Project et al., 2007; Nakanishi et al., 2017; Pettem, Yokomaku, Takahashi, Ge, & Craig, 2013; Ylisaukko-oja et al., 2005). Due à son rôle dans le fonctionnement synaptique global, il est possible de croire qu'une mutation de NL-1 pourrait affecter le développement des connections neuronales ou des fonctions synaptiques, ce qui pourrait expliquer certains troubles observés chez ces patients. Finalement, la déstabilisation du complexe NL-1-NRXN est aussi impliquée dans certains troubles neurologiques comme la schizophrénie et le syndrome du X fragile (Dahlhaus & El-

Husseini, 2010; Dean & Dresbach, 2006; Owczarek, Bang, & Berezin, 2015; Rujescu et al., 2009). Ses rôles font de NL-1 une protéine essentielle pour la plasticité synaptique, le fonctionnement, la différenciation et le maintien des synapses, mais peuvent aussi compromettre l'intégrité synaptique si celle-ci est affectée d'une quelconque façon.

1.3.3 Caractéristiques du modèle de souris NL-1 KO

Afin de mieux comprendre le rôle de NL-1 dans les différents processus cellulaires et/ou physiologiques, un modèle de souris NL-1 KO a été généré et étudié depuis plusieurs années. Des études *in vitro* sur des cultures de neurones primaires provenant de souris NL-1 KO ont démontré que l'absence de NL-1 n'affectait pas le nombre, ni la morphologie des synapses, mais c'est plutôt l'efficacité de la transmission synaptique ainsi que la force des synapses qui étaient affectées (Chanda, Hale, Zhang, Wernig, & Sudhof, 2017; Zeidan & Ziv, 2012). Ces phénomènes sont aussi observés dans un modèle de souris où les NL-1, -2 et -3 sont toutes supprimées (Chanda et al., 2017; Varoqueaux et al., 2006). Ces résultats sont curieux compte tenu du rôle de NL-1 dans la synaptogénèse, comme discuté à la section précédente. Une explication de cette apparente contradiction est apportée par Kwon et al. qui proposent un mécanisme de compétition entre cellules voisines. En effet, dans un modèle de NL-1 KO partiel, une cellule exprimant la NL-1 aura un avantage dans le processus de synaptogénèse face à sa voisine si celle-ci n'exprime pas la protéine (Kwon et al., 2012). Comme il n'y aurait pas de compétition de la sorte dans le modèle NL-1 KO puisqu'aucune cellule n'exprime la protéine, il serait donc logique que le nombre de synapses ne soit pas affecté. Il est aussi

possible qu'un mécanisme compensatoire des autres membres de la famille des NLs pourrait justifier la contradiction entre les études *in vivo* et *in vitro*.

La délétion de NL-1 dans le modèle murin va aussi avoir un effet sur différents processus de la mémoire. Premièrement, les souris NL-1 KO démontrent des déficits de mémoire spatiale lorsque testées à la piscine de Morris (Blundell et al., 2010). Malgré une courbe d'apprentissage normale lors des 10 journées d'entraînement, les souris NL-1 KO ne montrent pas de préférence pour le cadran cible lorsque la plateforme est retirée après la phase d'apprentissage. Ces souris passent aussi plus de temps dans le cadran opposé au cadran cible, indiquant un déficit de mémoire spatiale (Blundell et al., 2010). Ce déficit pourrait en partie être expliqué par une diminution de la PLT dans la région CA1 de l'hippocampe de ces souris (Blundell et al., 2010; Budreck et al., 2013; Jiang et al., 2017; Shipman & Nicoll, 2012). Blundell et al. rapportent aussi un comportement stéréotypé et excessivement répétitif de toilettage chez les souris NL-1 KO, s'apparentant à certains comportements autistiques (Lai, Lombardo, & Baron-Cohen, 2014), ce qui pourrait possiblement faire de ces souris un modèle pour étudier l'autisme. Bien qu'une tâche typiquement spatiale, la piscine de Morris implique aussi des éléments de stress ou de peur qui sont principalement dépendant de l'amygdale, et qui peuvent influencer les performances obtenus lors de cette tâche (Akirav, Sandi, & Richter-Levin, 2001; D'Hooge & De Deyn, 2001). Afin de retirer la variable peur/stress de l'équation, il serait intéressant de voir les performances des souris NL-1 KO à d'autres tâches de mémoire spatiale, indépendantes de l'amygdale, comme la reconnaissance spatiale d'objets (RSO) ou le labyrinthe de Barnes (Akirav et al., 2001; Crusio & Schwegler, 2005).

En plus des déficits de mémoire spatiale, les souris NL-1 KO présentent aussi divers changements comportementaux et physiologiques. Par exemple, les souris NL-1 KO démontrent des déficits d'interactions sociales, ainsi qu'un déficit au test de nouveauté sociale (Blundell et al., 2010; El Helou et al., 2013). Certaines altérations du sommeil comme une difficulté à soutenir l'éveil, une augmentation de la durée du sommeil NREM et des changements dans la qualité du sommeil sont aussi observés chez ce modèle (El Helou et al., 2013; Massart et al., 2014). Ces changements pourraient être expliqués par le fait que la transcription du gène de *Nl-1* est cyclique et régulé par les protéines de l'horloge (Hannou et al., 2018), qui sont responsables de la régulation du cycle circadien de 24 heures (Takahashi, 2016). Finalement, la réponse hémodynamique du cortex somatosensoriel suite à une stimulation périphérique est significativement plus faible, et un pic d'oxyhémoglobine plus rapide en réponse à cette stimulation est observé chez les souris NL-1 KO, ce qui signifie que NL-1 est aussi impliquée dans la régulation des processus hémodynamiques cérébraux (Belanger-Nelson et al., 2015). Tous ces changements observés dans le modèle de souris NL-1 KO confirment l'importance de la présence et de l'intégrité de NL-1 au niveau post-synaptique. Ces changements illustrent aussi la vulnérabilité synaptique si un facteur extérieur ou une mutation viendrait affecter cette protéine, ce qui pourrait potentiellement entraîner ou accélérer certains processus neuropathologiques.

1.4 Relation entre NL-1 et les A β

De plus en plus d'études rapportent une relation entre l'A β et NL-1. Une première étude a démontré que l'injection intra-hippocampale d'A β ₁₋₄₀ fibrillaire diminue le niveau

protéique et d'ARNm de NL-1 chez le rat (Bie et al., 2014). Cette diminution est associée avec un changement des mécanismes épigénétiques dans la région du promoteur de NL-1. En effet, la présence d'A β ₁₋₄₀ augmente l'activité et l'interaction entre l'histone déacétylase HDAC2 et la protéine MeCP2, qui lie les régions méthylée de l'ADN. Ceci diminue l'acétylation de l'histone H3 et augmente la méthylation de la région promotrice du gène, deux processus qui résulteront en une diminution de l'expression de NL-1 (Bie et al., 2014). L'augmentation de l'activité de HDAC2 et MeCP2 entraîne des déficits de mémoire à la piscine de Morris, qui sont renversés par la suppression de l'activité de ce complexe (Bie et al., 2014). Afin de compléter ceci, une récente étude *in vitro* a démontré une diminution du niveau protéique de NL-1 après un traitement de culture de neurones primaires d'hippocampe aux peptides A β ₁₋₄₂ (Kim et al., 2018).

Bien que l'étude de Bie et al. soit intéressante plusieurs questions restent en suspens afin de mieux comprendre le rôle de NL-1 dans la MA. Tout d'abord, cette étude a utilisé une dose élevée (20 μ g) d'A β ₁₋₄₀ fibrillaires, alors que ce sont les A β ₀₁₋₄₂ qui sont reconnus comme étant les plus neurotoxiques et s'accumulent précocement dans les stades précliniques de la MA. Deuxièmement, comme une seule injection d'A β ₁₋₄₀ fibrillaires a été effectuée à cette concentration élevée, ceci ne permet pas de savoir si l'accumulation progressive d'A β est associée à une diminution progressive de la NL-1 dans le cerveau. Cette question est d'une importance particulière car si tel est le cas, la NL-1 pourrait servir de marqueur biologique précoce de la MA. De plus, puisque que la NL-1 est essentielle pour le maintien des synapses matures fonctionnelles, cette protéine pourrait servir de cible thérapeutique afin de contrer le

dysfonctionnement et les pertes synaptiques, qui sont les corrélats prédisant le mieux le déclin cognitif des patients souffrant de la MA.

D'autres études ont aussi démontrées que NL-1 et les A β interagissent par des interactions protéine-protéine. Cette interaction a été démontrée par un co-marquage des deux protéines en immunofluorescence, par immunoprécipitation et un test de liaison sur plaque (Brito-Moreira et al., 2017; Dinamarca, Di Luca, Godoy, & Inestrosa, 2015). De plus, les A β lient une courte séquence, nommé peptide IG, bien conservé sur différentes protéines de la famille des NRXNs. Cette séquence est présente au site d'interaction entre NL-1 et les NRXNs, et l'ajout de ce peptide dans le milieu de culture de neurones primaires réduit significativement la liaison des A β aux neurones (Brito-Moreira et al., 2017). Finalement, l'utilisation d'anticorps anti-NL-1 diminue la liaison des A β aux neurones, ainsi que le stress oxydatif, les pertes dendritiques et synaptiques engendré par les A β (Brito-Moreira et al., 2017). Un traitement avec l'anti-NL-1 empêche aussi les déficits de mémoire au test de reconnaissance du nouvel objet chez les souris ayant reçu une seule injection intracerebroventriculaire d'A β (Brito-Moreira et al., 2017).

NL-1 semble aussi jouer un rôle neuroprotecteur face aux A β . En effet, la co-incubation de concentration croissante du fragment extracellulaire NL-1s avec les A β a pour effet d'empêcher la diminution de la viabilité des neurones, et ce de façon dose dépendante (Dinamarca et al., 2015). Ce fragment empêche aussi la diminution de la protéine PSD-95 observée lorsque des tranches organotypiques d'hippocampe sont incubées avec des A β

(Dinamarca et al., 2015). Hypothétiquement, il est possible que NL-1s lie et séquestre les A β , empêchant ainsi leur liaison aux synapses et la mort neuronale subséquente.

Chez l'humain, une mutation induisant un changement de cadre de lecture dans le gène de NL-1 a été rapportée chez des patients souffrant de la MA (Tristan-Clavijo et al., 2015). Cette mutation induit l'expression d'une protéine NL-1 avec un domaine N-terminal extracellulaire tronqué, qui s'accumule dans le réticulum endoplasmique, ce qui aurait pour effet de diminuer la formation de synapses glutamatergiques et affecter la PLT (Tristan-Clavijo et al., 2015). Finalement, le niveau plasmatique de NL-1 diminue progressivement avec l'apparition de la MA, et celle-ci corrèle bien avec la diminution des performances cognitives chez les patients (Goetzl, Abner, Jicha, Kapogiannis, & Schwartz, 2018). Bref, la relation entre les A β et la protéine NL-1 semble être impliquée dans les défaillances synaptiques et neuronales, deux événements observés aux stades précoces de la MA. Cette interaction pourrait donc ouvrir une piste pour le développement d'un biomarqueur à des fins diagnostiques ou un traitement pour les individus aux phases prodromiques de la MA, une première dans le domaine.

Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs

2.1 Hypothèses

À la lumière des études présentées à la section 1.4, et de l'implication des $A\beta_{0-42}$ dans les dysfonctions synaptiques, l'hypothèse principale de ce projet est que la protéine d'adhésion post-synaptique NL-1 serait affectée précocement par les $A\beta_{0-42}$ et ce, possiblement dès la phase asymptomatique de la MA. De plus, les $A\beta_{0-42}$ induiraient une diminution rapide et progressive de NL-1, ce qui contribuerait aux pertes synaptiques et aux troubles de mémoire dès les débuts de la MA. Ces hypothèses se basent sur les rôles démontrés de NL-1 dans la synaptogénèse, la plasticité synaptique et la mémoire (voir section 1.3.2), ainsi que sur l'effet des $A\beta_{1-40}$ fibrillaires *in vivo* et des peptides $A\beta_{1-42}$ sur l'expression de NL-1 *in vitro* (Bie et al., 2014; Kim et al., 2018).

Subséquentement, en raison des rôles démontrés de NL-1 dans la structure et la force synaptique (voir section 1.3.2), ainsi que le potentiel rôle neuroprotecteur de NL-1 face aux $A\beta_0$ (Dinamarca et al., 2015), nous pensons que l'absence de la NL-1, dans un modèle murin NL-1 KO, aggraverait les pertes synaptiques et neuronales ainsi que les déficits de mémoire engendrés par l'administration chronique d' $A\beta_{0-42}$ dans l'hippocampe. Ceci impliquerait que la NL-1 aurait un rôle modulateur de la neurotoxicité des $A\beta_{0-42}$.

2.2 Objectifs

Ayant deux hypothèses distinctes, ce projet de recherche est séparé en deux objectifs, ayant pour but commun de mieux comprendre la relation des A β , plus spécifiquement les A β ₀₁₋₄₂, avec la protéine NL-1.

2.2.1 Objectif 1

Le premier objectif a pour but d'observer la progression temporelle de l'effet des A β ₀₁₋₄₂ sur NL-1. Ceci permettra d'évaluer si NL-1 est affectée rapidement et progressivement par les A β ₀₁₋₄₂. Pour y arriver, nous utiliseront trois différents modèles soit, deux modèles *in vivo* murin, et un modèle *in vitro* de culture de neurones primaires. Dans le premier modèle *in vivo*, des injections hippocampiques chroniques d'A β ₀₁₋₄₂ seront effectuées pour 2, 4 et 6 jours, et les niveaux protéique et d'ARNm de NL-1 seront évalués à ses différents temps. Dans le second modèle *in vivo*, le niveau protéique de NL-1 sera évalué dans l'hippocampe de souris 3xTg, ayant 4, 12 et 18 mois. L'hippocampe sera principalement ciblée dans cette étude puisque NL-1 est fortement exprimée dans cette région (J. Y. Song et al., 1999), et l'hippocampe est l'une des premières régions touchées par les A β ₀₁₋₄₂ dans la MA (Braak & Braak, 1996; Markesbery, 2010). Pour le modèle *in vitro*, des cultures de neurones primaires seront traitées aux A β ₀₁₋₄₂ pour 48 et 72 heures, et le niveau protéique de NL-1 ainsi que la viabilité cellulaire seront mesurés. L'utilisation des différents modèles permettra de mieux comprendre le décours temporel de l'effet des A β ₀₁₋₄₂ sur NL-1.

2.2.2 Objectif 2

Le but du second objectif est d'identifier l'effet de l'absence de NL-1 sur la neurotoxicité des A β ₀₁₋₄₂. Pour ce faire, un modèle de souris NL-1 KO sera utilisé. Ces souris seront injectées chroniquement aux A β ₀₁₋₄₂ durant 4 jours et seront soumises à une batterie de tests de mémoire, afin de voir si les A β ₀₁₋₄₂ auront un effet plus néfaste sur la mémoire en absence de NL-1. Les pertes neuronales seront ensuite évaluées à l'aide de l'analyse histologique post-mortem du cerveau de ces mêmes souris. Cet objectif permettra de mieux comprendre le rôle de NL-1 dans la neurotoxicité des A β ₀₁₋₄₂.

2.2.3 Contributions de l'auteur

Julien Dufort-Gervais a effectué et analysé toutes les expériences qui seront décrites dans ce mémoire, allant de l'implantation de canules, aux tests de comportements, aux analyses moléculaires et au génotypage des souris. Le texte, les figures et tableaux de ce mémoire ont aussi été créés par l'auteur.

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

3.1 : Objectif 1 : *in vivo*

3.1.1 *Animaux*

3.1.1.1 *Souris WT pour injections d'A β ₀₁₋₄₂*

41 souris mâles de souche C57BL/6J (B6) de Jackson Laboratories ont été utilisées pour l'objectif 1. Ces souris avaient un accès libre à de la nourriture et de l'eau et étaient hébergées dans un cycle de 12h lumière/12h obscurité, à une température d'environ 22-25°C pour la durée de l'expérience. Les souris étaient âgées de 13 semaines lors du début des expériences, soit lors de la chirurgie d'implantation de canule. Les manipulations sur ces souris ont été approuvées par le comité d'éthique de l'expérimentation animale du Centre de Recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

3.1.1.2 *Souris 3xTg AD*

Des échantillons protéiques de lysat d'hippocampe de souris 3xTg (APP^{swe}, PS1M146V, tauP301L), et non transgénique (WT) nous ont été gracieusement offerts par le laboratoire du Dr. Frédéric Calon de l'Université Laval. Ces souris sont de souche C57BL6/129SvJ et sont produites par le laboratoire du Dr. Calon. Les échantillons d'hippocampe proviennent de souris mâles et femelles, ayant 4, 12 et 18 mois. Un total de 80 échantillons ont été reçus et analysés.

3.1.2 *Design expérimental*

Afin d'observer le décours temporel du niveau de NL-1, nous avons effectué des injections chroniques d'A β ₀₁₋₄₂ dans l'hippocampe des souris B6 (section 3.1.1.1) pour une durée de 2, 4 et 6 jours (Fig. 6A). Un groupe contrôle (J0) a subi la chirurgie d'implantation de canules, mais n'ont pas reçu d'injections. 24h après le deuxième jour d'injections (J2), 6 souris injectées à l'A β ₀₁₋₄₂ et 6 souris injectées à la solution véhicule (VH) ont été sacrifiées. Similairement, 24h après le quatrième (J4) et le sixième (J6) jours d'injections, 6 souris injectées à l'A β ₀₁₋₄₂ et 6 souris injectées au véhicule (VH) ont été sacrifiées (Fig. 6A). Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et l'hippocampe de chaque hémisphère est isolé puis coupé le plus proche possible du site d'injection. Les hippocampes sont ensuite déposés rapidement sur glace sèche et entreposé au congélateur -80°C jusqu'à utilisation. Un échantillon de cortex proche du site d'injection, ainsi que le cervelet de chaque hémisphère, ont aussi été récoltés. Les hippocampes de l'hémisphère droit ont été utilisés pour le qPCR (Section 3.1.7) et de l'hémisphère gauche pour le Western blot (Section 3.1.6).

3.1.3 *Implantation canules*

Le protocole d'implantation de canule a été adapté pour les souris à partir de la procédure décrite précédemment (Sajadi et al., 2016). Brièvement, les souris sont anesthésiées à l'aide d'un mélange de Kétamine/Xylazine (120mg/kg; 10mg/kg), puis installées sur un appareil stéréotaxique et maintenue sous anesthésie grâce à l'isoflurane. À l'aide d'une incision et de l'ouverture de la peau du crâne, les coordonnées stéréotaxiques du bregma et du lambda sont mesurées. Ces coordonnées permettront d'effectuer un trou sur chaque

hémisphère du crâne à 0,23 cm rostral ou caudal du bregma et 0,15 cm latéral gauche et droit du bregma, où seront insérées les canules pour injection bilatérale. Trois vis sont aussi insérées dans le crâne afin de stabiliser le montage et du ciment dentaire est ajouté afin de solidifier et ancrer le montage sur la tête des souris. Les souris ont une période de récupération de 7 jours post-chirurgie avant le début des expériences.

3.1.4 Préparation des $A\beta_{1-42}$

La préparation de la solution d' $A\beta_{1-42}$ se fait selon un protocole décrit par Brouillette et al. 2012. Brièvement, la solution d' $A\beta_{1-42}$ synthétique (rPeptide, Cat. No. A-1163-2) est mise en suspension dans un solution d'hexafluoropropanol (HFP) (Acros organics, Cat. No. 147541000) afin de s'assurer que la protéine est bien sous forme monomérique. Le HFP est ensuite complètement évaporé avec de l'azote gazeux et remise en suspension dans le DMSO (Sigma-Aldrich, Cat. No. D-4540). La solution est passée dans une colonne HiTrap desalting (GE Healthcare, Cat. No. 17-1408-01) préalablement équilibrée à l'aide d'une solution de Tris-EDTA (50 mM Tris, 1mM EDTA). La colonne va permettre de dissocier le DMSO de l' $A\beta_{1-42}$ afin d'obtenir une solution finale pure en $A\beta_{1-42}$. Deux fractions de 400 uL sont éluées de la colonne et quantifiées rapidement à l'aide du kit "BCA protein assay" (Thermo Fisher, Cat. No. 23225). La concentration d' $A\beta_{1-42}$ moyenne de la concentration des solutions d' $A\beta_{1-42}$ utilisées dans cette étude est de 0,28 ug/uL. La solution est rapidement entreposé à -80°C afin de limiter l'oligomérisation de la solution. Lors de chaque expérience, la solution d' $A\beta_{1-42}$ doit être sortie à température pièce 1h avant l'utilisation afin d'assurer

l'oligomérisation de la solution, sans toutefois générer des complexes de trop haut poids moléculaire (Brouillette et al., 2012).

3.1.5 Injections des $A\beta_{01-42}$

La procédure d'injection est décrite par (Sajadi et al., 2016). Brièvement, l'injection se fait à l'aide d'une pompe osmotique, des seringues de 10uL (Hamilton, Cat. No. 14815279), et des tubes. Les solutions d' $A\beta_{01-42}$, de VH (50 mM Tris, 1 mM EDTA) ou d' $A\beta_{Scf}$ sont introduites à l'extrémité libre des tubes et les tubes sont insérés à l'extrémité ouverte de la canule. La pompe va ensuite injecter à vitesse constante (0.2 uL/min) la solution directement dans la canule des souris qui sont éveillées, et peuvent se déplacer librement dans leur cage. Pour l'objectif 1, 1 uL d' $A\beta_{01-42}$ ou de VH Tris-EDTA ont été injectés sur une période de 5 minutes, et les tubes sont laissés en place pour 2 minutes afin de favoriser l'infusion et éviter le reflux. Pour l'objectif 2, 2 uL d' $A\beta_{01-42}$ ou d' $A\beta_{Scf}$ ont été injectés sur une période de 10 minutes, et les tubes ont été laissés en place pour 5 minutes. Comme nous avons obtenus un effet subtil sur le niveau protéique de NL-1 avec le volume de 1 uL injecté pour l'objectif 1, nous avons ajusté la dose injectée pour l'objectif 2 à 2 uL, soit la même qui a été démontrée comme neurotoxique à 6 jours d'injections, comme discuté à la section 1.2.4 (Brouillette et al. 2012). Après le retrait des tubes, des bouchons sont posés sur la canule afin d'empêcher celle-ci de se bloquer et d'éviter le reflux des injections.

3.1.6 Western Blot

Pour l'extraction protéique, les échantillons d'hippocampes sont homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de type Potter dans 200 uL de tampon RIPA 1X (Thermo Fisher, Cat. No 89901) 0.5% CHAPS (Fisher BioReagents, Cat. No. BP571-1) et inhibiteur de phosphatase et protéase (Thermo scientific Cat. No. A32961). Une fois homogénéisés, les échantillons sont soniqués (0.8s ON, 0.8s OFF; 18 fois) à amplitude 20%. Après agitation sur un rotateur à 4°C pendant 1h, les échantillons sont centrifugés 20 min à 4°C à une vitesse de 14000 g. Le surnageant est conservé comme étant la fraction des protéines totales. La concentration protéique est ensuite quantifiée à l'aide du kit Pierce BCA protein assay.

Les échantillons de protéines sont ensuite tous dilués à 1,5 ug/uL dans le RIPA 1X et 20% du volume final désiré de LDS 4X (Thermo Fisher, Cat. No. NP 007), puis chauffés à 75°C pour 10 min. Un volume équivalent de chaque échantillon (30 uL) est chargé dans un gel Bolt 4-12% Bis-Tris Plus de 12 puits (Thermo Fisher, Cat. No. NW04122BOX) et migré à 100V pour environ 90 minutes. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon-P^{sq}, Cat. No. ISEQ00010, Pores 0,2um), dans du tampon de transfert NuPAGE-Méthanol, pour 1h30 à 100V. La membrane est ensuite bloquée à l'aide du Odyssey Blocking Buffer (PBS) (LiCor, Cat. No. 927-40000) à température pièce pour 1h et incubée jusqu'au lendemain à 4°C avec les anticorps primaires anti-NL-1 (Millipore, Cat. No. MABN742, 1 :1000) et anti-GAPDH (Cell signaling technology, Cat. No. 5174, 1 :1000) (voir Annexe 1; Tableau 1) dilué dans du Odyssey Blocking Buffer (PBS) et 0.2% de Tween 20 (Fisher BioReagents, Cat. No. BP337-500). Le lendemain, la membrane est lavée avec du PBS-T 1X (0.1% Tween 20), 4 fois 5 minutes. Finalement, la membrane est incubée avec les

anticorps secondaires correspondant à la souche de l'anticorps primaire (LiCor, IRDye 800CW, IRDye 680RD, HRP linked antibody) (voir Annexe 1; Tableau 1) dilué dans du Odyssey Blocking Buffer (PBS) + 0.2% de Tween 20 + 0.01% SDS pour 1h à température pièce. La membrane est lavée, séchée à l'air libre et révélée à l'aide de l'appareil Odyssey CLx (LiCor, Cat. No. 9140) avec le logiciel Image Studio 3.1. Pour la révélation en chimioluminescence, après les lavages de l'anticorps secondaire, la membrane est incubé 5 min dans un mélange 1 : 1 de SuperSignal West Femto Luminol Enhancer solution (Thermo Scientific, Cat. No. 1859022) et SuperSignal West Femto Stable Peroxide buffer (Thermo Scientific, Cat. No. 1859023). La membrane est ensuite mise dans un plastique transparent et révélée à l'aide d'un appareil de chimioluminescence. La quantification des bandes est effectuée avec le logiciel Image J.

3.1.7 PCR quantitative (qPCR)

La procédure complète du qPCR est effectuée comme (El Helou et al., 2013). Brièvement, l'ARNm des hippocampes est extraite à l'aide du kit RNeasy Lipid Tissue mini kit (Qiagen, Cat no. 74804). Ce kit utilise le Trizol (Qiazol) comme agent homogénéisant et le chloroforme pour séparer la phase organique et l'ARNm après l'homogénéisation. Après une centrifugation de 12000g, 15 minutes à 4°C, le surnageant est récolté et un volume équivalent d'éthanol 70% est ajouté. L'ARNm liée à la colonne est ensuite lavée avec des tampons de lavage et élué de la colonne avec de l'eau RNase Free. La pureté et la concentration de l'ARNm sont évaluées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop2000, et l'intégrité à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose RNAase free 0,8%.

L'ARNm est ensuite converti en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'une transcription inverse (RT). Les concentrations de tous les échantillons sont uniformisées à 100 ng/uL avec de l'eau RNAase free. Cinq uL de chaque échantillon d'ARNm est chauffé à 65°C pendant 10 minutes dans un thermocycleur. Ensuite, 15 uL d'un mélange constitué d'eau RNAse Free, First Strand buffer (Invitrogen Cat No. Y02321); DTT 0,1M (Invitrogen Cat No. Y00147); Random Primer 50 uM (Invitrogen Cat No. 100026484); dNTP 10mM (Sigma Cat No. 1001836730); RNAzin 40U/uL (Promega Cat No. N281B); Superscript II (Invitrogen Cat No. 100004925); est ajouté à chaque échantillon d'ARNm. Le programme suivant est utilisé pour la transcription inverse dans le thermocycleur : 10 min à 25 °C / 60 min à 42°C.

L'expression des différents gènes est ensuite mesurée par qPCR. L'ADNc obtenue par RT est diluée à une concentration de 5 ng/uL avec de l'eau RNAase free. La quantification des gènes se fait dans une plaque 384 puits où sont mélangés l'eau RNAase Free; TaqMan Fast advanced Master Mix (Applied biosystems Cat No. 4444557); Amorces et sondes pour chaque gène (voir Annexe 1; Tableau 2). Cinq différentes ensembles de sondes ont été utilisés afin de quantifier l'expression de NL-1 tel qu'effectué précédemment (El Helou et al., 2013; Hannou et al., 2018; Massart et al., 2014). *NL-1A* correspond à la séquence avec l'insert A et *NL-1B* avec l'insert B, tandis que *NL-1NA* correspond à la séquence sans l'insert A et *NL-1NB* sans l'insert B (Fig. 4). *NL-1C* correspond à une séquence commune pouvant contenir seulement l'insert A ou B, les deux, ou aucun (Fig. 4). Due à une trop grande distance entre les deux inserts qui ne peuvent être ciblés par une même sonde, il est important de noter que la présence ou l'absence d'un insert est indépendante de l'autre insert. Quatre gènes contrôles (*GusB*, *Actin*, *TBP* et *Rps9* (voir Annexe 1; Tableau 2)) sont quantifiés afin de normaliser les valeurs pour les 5

variants de NL-1 quantifiés. Finalement, l'ADNc est ajouté dans les puits, résultant en un volume total de 10 uL par puit. L'expression génique est mesurée à l'aide de l'appareil Viia 7 (Thermo-Fisher) et le cycle qPCR est le suivant : 2 min à 50°C, 20 sec à 95°C, 40X (1 sec à 95°C / 20 sec à 60°C). L'analyse des résultats se fait via le logiciel Expression Suite qui va rapporter l'expression des gènes en quantité relative par rapport à un échantillon du groupe contrôle (J2 VH).

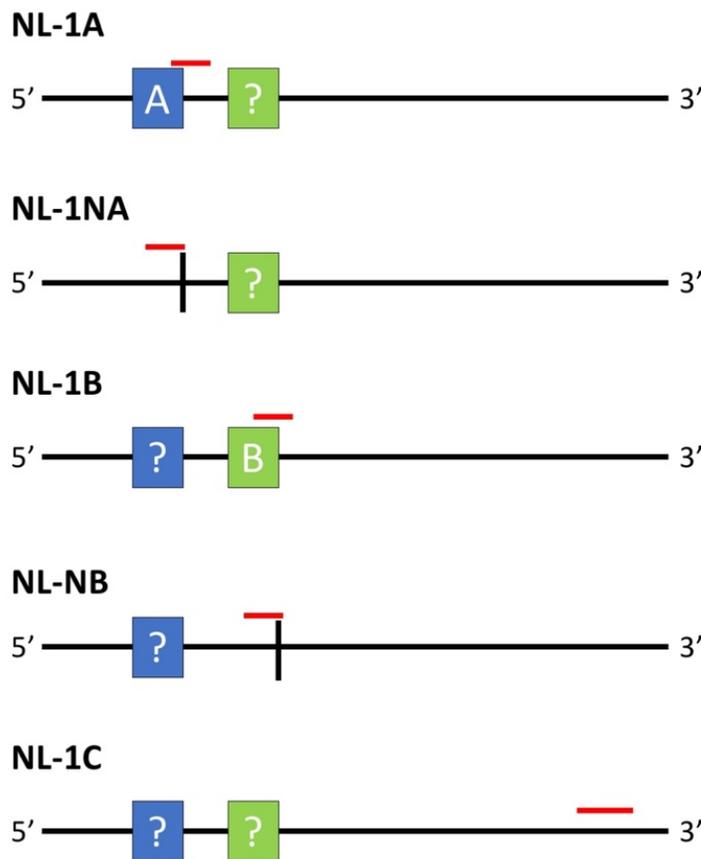


Figure 4 : Amorces utilisées pour la quantification de *NL-1*
 Illustration de l'emplacement des différents ensembles d'amorces pour les variants de *NL-1*. La boîte bleu correspond à l'insert A et la boîte verte à l'insert B. La ligne rouge indique l'emplacement de l'amorce sur la séquence. Le point d'interrogation dans les boîtes indique que la présence ou l'absence du second insert ne peut être évaluée due à la trop grande distance entre les inserts (>300 nucléotides). Figure adaptée de (Hannou et al., 2018)

3.1.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques utilisées sont l'ANOVA (Analyse de variance) à 2 voies où, pour les souris WT injectées, les deux variables comparées sont les jours d'injections (J2, J4, J6) et le traitement (A β ₀₁₋₄₂ ou VH). Pour les souris 3xTg, les variables comparées sont le génotype (WT ou 3xTg) et l'âge (4, 12 et 18 mois). S'il y a interaction entre les variables ($p < 0,05$), des comparaisons planifiées des moyennes des moindres carrés sont effectués entre les variables, et rapportés avec un $p < 0,05^*$ $p < 0,001^{**}$ $p < 0,0001^{***}$. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide des logiciels GraphPad Prism 6.0, Statistica et JMP 14.

3.2 : Objectif 1 : *in vitro*

3.2.1 Culture cellulaire

La procédure de mise en culture a été effectuée comme décrite dans Brouillette et al. 2012. Des embryons de rates gestantes (Jackson Laboratories) de 18 jours (E18) sont utilisés pour démarrer la culture cellulaire. La ratte gestante est sacrifiée par guillotine et les embryons sont transférés dans un plat de pétri contenant du milieu de dissection Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma Cat. No. H1641), Heps (Gibco, Cat. No. 15630-080), Pen/Strep/Ampho (Gibco, Cat. No. 15240-062), NaHCO₃ (Gibco, Cat. No. 25080-094). À l'aide d'un microscope, l'hippocampe du cerveau des embryons est extrait et transféré dans un tube contenant du HBSS à 37°C. Lorsque 6 hippocampes sont extraits, une solution de trypsine 2,5% (Life Technologies, Cat no. 15090-046) est ajoutée au tube contenant les hippocampes et le tube est incubé sur une plaque chauffante à 37°C, vibrant à 900 rpm pour 15 minutes. Le mélange de HBSS et de trypsine est ensuite retiré du tube et jeté. Les

hippocampes sont ensuite lavés deux fois dans 1 mL d'HBSS et après le deuxième lavage, 500 mL d'HBSS est ajouté au tube pour trituration. Sept-huit aller/retour sont effectués avec une aiguille 21G (BD, Cat no. 305167) et une seringue 1 mL (BD, Cat. No. 309659), et le même processus est effectué avec un aiguille 25G (BD, Cat No. 305127). Lorsque la solution est bien homogène, 40 uL est pipeté dans chaque puit d'une plaque de 12 puits (Costar, Cat. No.3513) avec un fond préalablement recouvert de poly-D lysine hydrobromide (Sigma, Cat. No. P6407-5MG), contenant 1 mL de milieu de culture initial MEM-HS (MEM (Sigma, Cat. No. M0275), Horse Serum (Sigma, Cat. No. H1138), NaHCO₃, D-Glucose (Sigma, Cat. No. BP-250) GlutaMax (Sigma, Cat. No. RNBD9302), Pen/Strep/Ampho). La plaque est entreposée dans un incubateur à 37°C avec 5% d'O₂ jusqu'au lendemain, où le milieu de culture initial MEM-HS est remplacé par 2 mL de milieu de culture de maintien Neurobasal Medium (Neurobasal medium (Gibco, Cat. No. 21103-049), B27 supplement (Gibco, Cat. No. 17504-044), GlutaMax, Pen/Strep/Ampho).

3.2.2 Traitement des cellules aux A β ₁₋₄₂

Sept jours après la mise en culture, les cellules sont traitées aux A β ₁₋₄₂, au VH ou à l'H₂O. Les cellules sont traitées à deux concentrations d'A β ₁₋₄₂ soit 2 et 4 uM, pour une durée de 48 et 72h. Le milieu de culture retiré des puits, puis la concentration d'A β ₁₋₄₂ désirée est ajoutée dans le puit. Le volume du puit est ensuite complété à 1 mL avec du milieu Neurobasal, préalablement chauffé à 37°C. Un volume équivalent de VH ou d'H₂O correspondant à celui de l'A β ₁₋₄₂ est ajouté dans d'autres puits afin de comparer les différentes conditions. L'H₂O est utilisée à titre de contrôle et pour normaliser les résultats.

3.2.3 Tests de viabilité cellulaire et récolte des cellules

Afin de mesurer la viabilité des cellules, le CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent (Promega, Cat No. G358B) est utilisé. Deux cents uL de la solution de CellTiter est ajouté à chaque puits et, 200 uL de chaque puits sont pipetés dans une plaque 96 puits afin de servir de solution de calibration. La plaque est ensuite retournée à l'incubateur et incubée durant 2h. Après l'incubation, 200 uL de chaque puit, en duplicata, est transféré dans la plaque 96 puits. La plaque 96 puits est ensuite incubée pour 10 minutes à 37°C, puis une lecture à 490 nm est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre Enspire (Perkin-Elmer). Les valeurs obtenues pour les puits contenant de l'eau sont utilisées comme valeur correspondant à 100% de la viabilité, et les différentes conditions sont normalisées en fonction de cette valeur.

Dans certains puits, les cellules ont été récoltées afin de faire des analyses Western blot. Pour récolter les cellules, le milieu de culture est totalement aspiré du puit, et le puit est rincé avec 1 mL de PBS 1X. Cent quarante uL de RIPA-CHAPS 1X est ajouté au puit, et les cellules sont décollées du fond à l'aide d'une spatule en métal. Le liquide contenant les cellules détachées est aspiré, mis dans un tube 1,5 mL et rapidement transféré à -80°C. L'extraction protéique et le Western blot sont effectués comme décrit à la section 3.1.6.

3.2.4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques utilisées sont l'ANOVA à 2 voies, où les deux variables comparées sont les temps de traitement (48 et 72h) et le type de traitement (A β ₀₁₋₄₂ ou VH). S'il y a interaction entre ces deux variables ($p < 0,05$), des comparaisons planifiées des moyennes des moindres carrés sont effectués entre les variables, et rapportés avec un $p < 0,05^*$ $p < 0,001^{**}$ $p < 0,0001^{***}$. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide des logiciels GraphPad Prism 6.0, Statistica et JMP 14.

3.3 : Objectif 2

3.3.1 Animaux

Des souris KO pour le gène de *NL-1* (B6;129-Nlgn1^{tm1Bros}/J) et des souris sauvages (WT) de mêmes portées ont été utilisés pour l'objectif 2. Ces souris ont été achetées de Jackson laboratory et croisées sur fond génétiques C57BL/6J directement à l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. La mutation originale a été décrite précédemment (Varoqueaux et al., 2006). Le génotypage de cette colonie de souris est assuré directement à l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal selon le protocole de Jackson Laboratory (https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5_MASTER_PROTOCOL_ID,P5_JRS_CODE:23390,009611). Les souris sont tous des mâles, âgées entre 14 et 33 semaines au premier jour d'injection et elles avaient un accès libre à de la nourriture et de l'eau, étaient gardées dans un cycle de 12h lumière/12h obscurité et à une température d'environ 22-25°C pour la durée entière de l'expérience. Les manipulations sur ces souris ont été approuvées par le comité d'éthique de l'expérimentation animale du centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

3.3.2 Design expérimental

Pour l'objectif 2, les souris de génotype WT et KO ont été séparées au hasard en 4 groupes. Un groupe de souris WT est injecté à l'A β scrambled (A β _{scr}) (WT VH) et un autre groupe aux A β ₀₁₋₄₂ (WT A β). L'A β _{scr} correspond à un peptide ayant les mêmes AA que l'A β , mais dans le désordre et n'ayant aucune toxicité (Brouillette et al., 2012). Similairement, un groupe de souris KO est injecté à l'A β _{scr} (KO VH) et un autre groupe aux A β ₀₁₋₄₂ (KO A β). Afin de simplifier et d'uniformiser la présentation des données, l'A β _{scr} sera décrit comme la condition VH tout au long de l'objectif 2, ce qui diffère de l'objectif 1 où la condition VH était un tampon Tris-EDTA. Le déroulement des expériences est illustré à la figure 10. Pour commencer, les souris subissent la chirurgie d'implantation bilatérale de canules, comme décrite à la section 3.1.3. Deux jours après la chirurgie, les souris sont manipulées durant 5 minutes, pour 5 jours consécutifs, afin de les habituer à la présence et la manipulation par les expérimentateurs. Les souris sont ensuite injectées chroniquement pour 4 jours consécutifs afin d'obtenir une dose intermédiaire à la dose ayant été démontrée comme neurotoxique de 6 jours (Brouillette et al., 2012) (voir section 1.2.4). Elles sont ensuite soumises à une batterie de tests de mémoire constituée de la reconnaissance spatiale d'objets (RSO) (Section 3.3.3.2), le labyrinthe en Y (Section 3.3.3.3) et la piscine de Morris (Section 3.3.3.4). Vingt-quatre heures après le dernier test, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et le cerveau est récolté en entier, rapidement gelé sur glace sèche, et entreposé à -80°C. La durée totale de l'expérience (chirurgie au sacrifice) est de 22 jours.

3.3.3 Tests de comportement

3.3.3.1 Reconnaissance spatiale d'objets (RSO)

La RSO se déroule dans une arène de plastique opaque mesurant 90cm x 90cm, avec un fond recouvert de litière. Les quatre murs de l'arène possèdent un indice visuel différent, comme illustré à la figure 10B. Deux objets différents disposés dans deux coins adjacents sont collés au fond de l'arène. L'expérience se déroule sur deux jours. La première journée, les souris sont introduites au centre de l'arène, et explorent l'arène et les objets pour une durée de 5 minutes. Vingt-quatre heures plus tard, un des deux objets est déplacé au coin opposé de l'arène (Fig. 10B) et les souris sont de nouveau introduites dans l'arène pour 5 minutes. Le nombre d'interactions avec les objets (défini comme un toucher du museau ou un reniflement de l'objet par la souris) est compté par un expérimentateur aveugle au génotype et au traitement de la souris. Les déplacements de la souris sont monitorés à l'aide d'une caméra installée au-dessus de l'arène, et le logiciel d'acquisition Smart (Harvard Apparatus) est utilisé afin de suivre et d'analyser le temps passé dans chaque zone, la distance et la vitesse des souris au cours de l'expérience. Le temps d'interaction avec les objets est déterminé en définissant une zone autour de l'objet qui détectera la souris seulement lorsque celle-ci interagit avec l'objet. L'indice de discrimination (DI) est calculé avec le temps ou le nombre d'interaction selon la formule suivante : $(\text{objet mobile} - \text{objet immobile}) / (\text{objet mobile} + \text{objet immobile})$. Les murs de l'arène et les objets sont nettoyés avec de l'éthanol 70% et la litière dans le fond de l'arène est mélangée entre chaque souris afin d'éviter les indices olfactifs de la souris précédente.

3.3.3.2 *Labyrinthe en Y*

Le test du labyrinthe en Y se déroule dans un labyrinthe en forme d'Y fait de bois, avec un fond recouvert de litière (Fig. 11A). Les trois bras sont des rectangles de même dimension avec un centre triangulaire équilatéral. Un indice visuel différent est placé à l'extrémité de chacun des bras. Premièrement, les souris ont été introduites dans un bras de départ, qui est alterné entre chaque souris. Pour les 5 premières minutes, la souris peut explorer le labyrinthe librement, mais un des bras est bloqué avec l'aide d'une planche de bois (Fig. 11A) (le bras bloqué est alterné entre chaque souris). Les souris sont ensuite retournées dans leur cage pour 5 minutes. La planche de bois est alors retirée, et le troisième bras devient donc accessible. La souris est réintroduite dans le Y-maze pour 5 minutes, où elle peut explorer librement tous les bras. Les déplacements de la souris sont monitorés à l'aide d'une caméra et le logiciel d'acquisition Smart (Harvard Apparatus) est utilisé afin de suivre et d'analyser le temps passé dans chaque bras au cours de l'expérience. Le temps passé dans chaque bras est déterminé en définissant chaque bras comme une zone indépendante. Le temps passé dans le nouveau bras correspond au bras qui était fermé lors des 5 premières minutes, et le temps passé dans les autres bras correspond à la moyenne du temps passé dans les deux autres bras. Les murs du labyrinthe sont nettoyés avec de l'éthanol 70% et la litière est mélangée entre chaque souris afin d'éviter les indices olfactifs laissés par la souris précédente.

3.3.3.3 *La piscine de Morris*

La piscine de Morris s'effectue dans une piscine de 180 cm de diamètre remplie d'eau et de peinture blanche non toxique. La température de l'eau est monitorée et gardée à 24°C +/- 1°C lors des tests. Quatre indices visuels différents sont installés autour de la piscine, soit au Nord (N), au Sud (S), à l'Ouest (O) et à l'Est (E) (Fig. 12A). Pour l'analyse, la piscine est

séparée en 4 quadrants égaux : NO, NE, SO, SE. Le test s'effectue sur 5 jours. Les 4 premiers jours sont une phase d'entraînement, où les souris doivent apprendre à trouver une plateforme submergée dans la piscine, à l'aide des indices visuels. La plateforme est submergée d'environ 1 cm sous l'eau et se trouve toujours dans le cadran NE, qui sera appelé le cadran cible (Fig. 13A). Les souris ont 3 essais par jours, avec 30 min entre chaque essai, et chaque essai est d'un maximum de 60 secondes. Si la souris n'atteint pas la plateforme en 60 secondes, elle est guidée jusqu'à celle-ci, et doit rester sur la plateforme 10 secondes avant d'être retirée de la piscine. Le temps (latence) et la distance pour atteindre la plateforme sont calculés automatiquement par le logiciel Smart. L'emplacement de départ des souris est différent à chaque essai, sans être trop proche de la plateforme.

Le cinquième jour (Phase test), la plateforme est retirée de la piscine et les souris ont 60 secondes pour explorer la piscine (Fig. 13A). Le temps passé dans chaque cadran ainsi que le nombre de fois que la souris traverse la zone où était la plateforme (Zone 2x plus grand que lors de la phase test) est mesuré automatiquement avec le logiciel Smart. Un dernier test de 3 essais (Cued) est aussi effectué cette cinquième journée afin de s'assurer de la capacité visuelle des souris. Lors de ce test, la plateforme est réintroduite dans la piscine dans un cadran différent, et ne sera pas submergée par l'eau, donc visible. Les souris ont 3 essais de 30 secondes pour trouver la plateforme et toutes les données sont acquises en temps réel grâce au logiciel Smart. Tout au long de l'expérience, entre chaque essai, la piscine est brassée, nettoyée, et la plateforme frottée afin d'éviter les indices olfactifs.

3.3.4 Immunofluorescence (IF)

Afin de faire du marquage en immunofluorescence (IF), les cerveaux ont été préalablement coupés à l'aide d'un cryostat HM525NX (Thermo Scientific, Cat. No. 956640). Une coupe sagittale est effectuée afin de séparer l'hémisphère gauche et droit, et seulement un hémisphère est utilisé pour l'IF. La température de coupe est de -20°C et des coupes coronales de 10 µm sont effectuées et montées sur lame Super Frost Plus (Fisher Scientific, Cat. No. 12-550-15). Ceci a été effectué d'environ ~100 µm antérieur au site d'injection, jusqu'au milieu du site d'injection. Les coupes sont montées en série sur 6 lames, jusqu'à 4 coupes par lame. Les lames sont ensuite entreposées à -80°C jusqu'à utilisation.

Pour l'IF, les lames sont fixées 15 min dans une solution de formaline 10% (Sigma-Aldrich, Cat No. HT501128) et lavées avec du PBS 1X (Cell Signaling Technology, Cat. No. 9808S). Une solution de blocage (PBS 1X; 5% Normal goat serum (Cell Signaling Technology, Cat. No. 5425); 0.3%, Triton X-100 (Fisher BioReagents, Cat. No. BP151-500)) est appliquée pour 60 min à température ambiante. La solution de blocage est retirée et l'anticorps primaire anti-NeuN (Cell Signaling, Cat. No. 24307) (Annexe 1; Tableau 1) préalablement dilué dans une solution (PBS 1X/1%, BSA/0.3% (Fisher BioReagents, Cat. No. BP1600-100), Triton X-100) est appliqué et incubé à 4°C jusqu'au lendemain. Les lames sont lavées dans du PBS 1X/0.5% Tween 20. L'anticorps secondaire (Annexe 1; Tableau 1) incubé 90 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les lames sont ensuite lavées, séchées et une goutte de Prolong Gold Antifade DAPI (Cell signaling technology, Cat No. 8961S) est déposée au centre de chaque coupe. Les lames sont recouvertes d'une lamelle (Thermo scientific, Cat No. 102455), et séchées 24h à température pièce à l'abri de la lumière.

3.3.5 Microscopie et comptage cellulaire

Un microscope à fluorescence Zeiss Axio Imager 2, une caméra monochrome, des objectifs 2.5X, 20X, 40X, 63X et 100X et le logiciel Stereoinvestigator (MBF Bioscience) sont utilisés afin de faire l'acquisition des images d'IF. Des filtres de longueur d'onde 488 nm et 350 nm (DAPI) sont utilisés afin d'exciter les fluorochromes de l'anticorps secondaire utilisé (Annexe 1; Tableau 1). Les images obtenues avec l'objectif 2,5X ont permis de déterminer l'emplacement de la canule et la profondeur approximative du site d'injection pour chaque animal (Fig. 5).

Le comptage neuronal (marquage NeuN) a été effectué à l'aide du Logiciel Neurolucida (MBF Bioscience). Premièrement, l'objectif 2,5X est utilisé afin de déterminer l'emplacement de la canule (Fig. 5A). L'objectif 20X était ensuite utilisé afin d'identifier approximativement la profondeur du site d'injection (Fig. 5B). Lorsque celui-ci était identifié et à l'aide de l'objectif 40X, une zone de 500 um de largeur (largeur moyenne de la trace de la canule déterminé au préalable) directement sous le site d'injection dans le GD, était définie (Fig. 5C). L'aire de la zone tracée est similaire à travers les différents groupes (Fig. 14B). Aussi, afin de s'assurer que la profondeur du site d'injection n'est pas un facteur pouvant influencer le comptage cellulaire, la distance approximative entre le milieu du site d'injection et le début de la zone de comptage a été mesuré en utilisant la fonction "measure line" du programme StereoInvestigator. Cette distance était similaire entre les 4 différents groupes (Fig. 14C). Comme il n'y a pas ou peu de superposition de cellule à 10 um, et que le marquage était bien défini, la fonction "Detect Cells" du programme Neurolucida est capable de discerner chaque cellules individuelles. Cette fonction permet donc de faire un comptage

cellulaire fiable, dans une zone sous le site d'injection et reproductible d'un animal à l'autre, qui a été validé par un comptage manuel des cellules par les expérimentateurs. Trois à quatre coupes par lames ont été comptées, la moyenne de ces coupes est calculée et analysée selon le génotype et le traitement de la souris.

3.3.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques utilisées sont l'ANOVA à 2 voies, où les deux variables comparées sont le génotype (WT ou KO) et le traitement (A β ₀₁₋₄₂ ou VH). S'il y a interaction entre ces deux variables ($p < 0,05$), des comparaisons planifiées des moyennes des moindres carrés sont effectués entre les variables, et rapportés avec un * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. Certaines analyses du MWM nécessitaient un 3-way ANOVA avec la variable essai (1 à 12) ou jour (1 à 4) ajoutée aux génotypes et traitements. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0, Statistica et JMP 14.

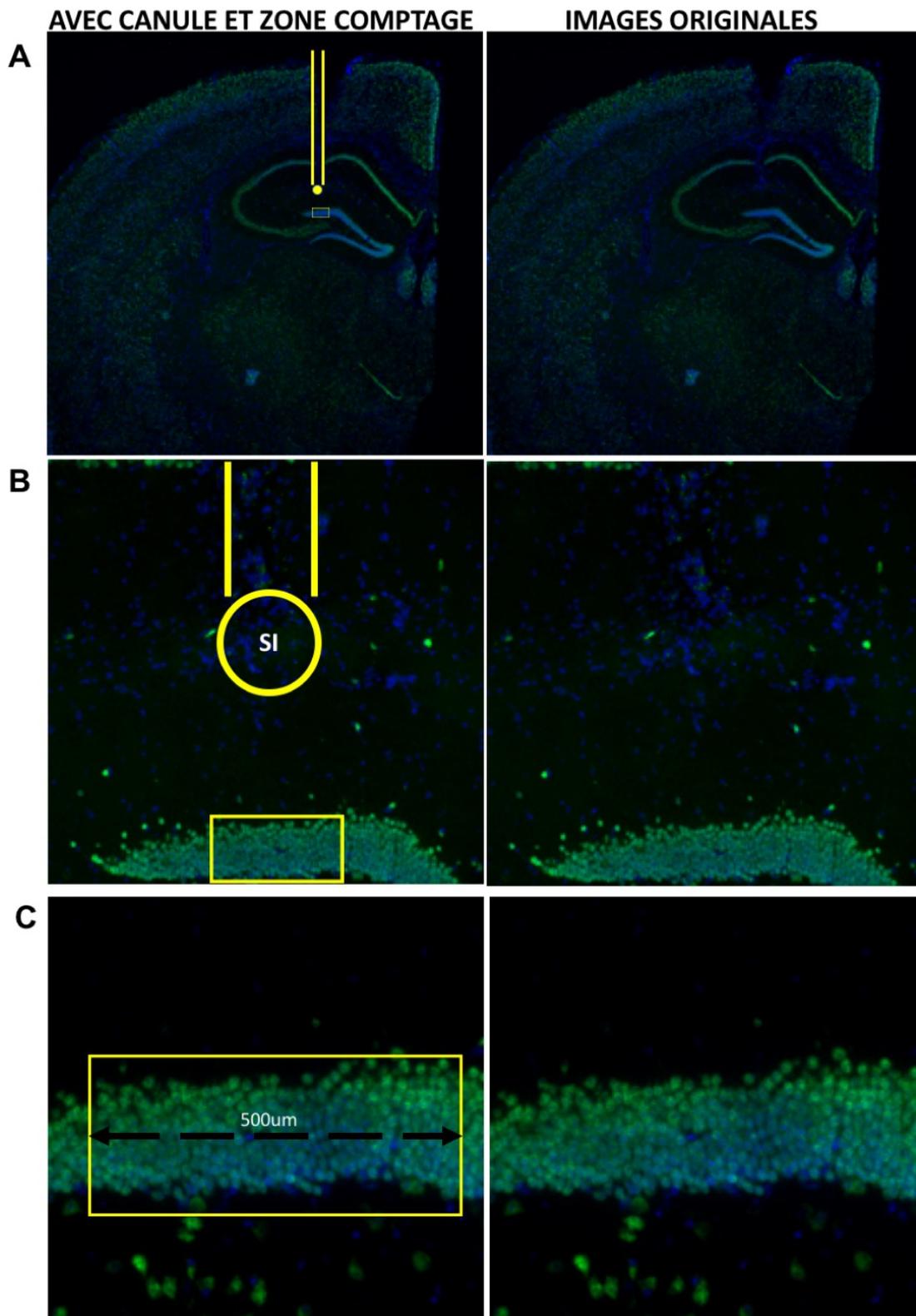


Figure 5 : Détermination de la zone de comptage Représentation schématique du processus de détermination de la zone de comptage. **(A)** Grossissement 2.5X, Colonne de gauche = illustration schématique de la canule, du site d'injection (SI) et de la zone de comptage en jaune. Colonne droite = images originales. **(B)** Grossissement 20X Colonne de gauche = illustration schématique de la canule, le SI (Rond) et la zone de comptage dans le GD (rectangle) **(C)** Grossissement 40X Colonne de gauche = illustration schématique de la zone de comptage dans le GD. Largeur de la zone = 500um

Chapitre 4 : Résultats

4.1 Objectif 1

4.1.1 Effet des injections chroniques d'A β ₀₁₋₄₂ sur les variants de *NL-1*

Afin d'observer la progression temporelle des différents variants de transcription de *NL-1*, des injections chroniques hippocampiques d'A β ₀₁₋₄₂ chez la souris ont été effectuées. La durée des injections est de 2, 4 ou 6 jours consécutifs, résultant en 6 groupes distincts selon le temps d'injections (J2, J4, J6) et le traitement administré (A β ₀₁₋₄₂ ou VH (Tris-EDTA)) (Fig. 6A). Les deux hippocampes ont ensuite été extraites afin d'analyser les niveaux d'ARNm et protéique de *NL-1* en réponse aux injections chroniques. Pour l'ARNm, comme décrit à la section 3.1.7, cinq ensembles de sondes ont été utilisées afin de quantifier l'expression de *NL-1*, soit *NL-1A*, *NL-1B*, *NL-1NA*, *NL-1NB* et *NL-1C* (Fig. 4, Annexe 1, Tableau 1). Ces sondes permettent de quantifier l'absence ou la présence d'un insert (A ou B), indépendamment de l'autre, due à un éloignement trop grand entre les inserts (Fig. 4). Par exemple, *NL-1A* possède l'insert A, mais il est impossible de savoir si l'insert B est présent ou pas. Pour sa part, *NL-1C* correspond à une sonde pouvant cibler toutes les différentes combinaisons d'inserts.

L'injection chronique d'A β ₀₁₋₄₂ dans l'hippocampe affecte l'expression de certains ensembles de sondes utilisé afin de quantifier *NL-1*. Après deux jours d'injections, *NL-1NA* et *NL-1C* démontrent une augmentation de l'expression chez les animaux injectés aux A β ₀₁₋₄₂ (Fig. 6C et F), et une tendance dans le même sens est observée pour *NL-1NB* (p=0,06) (Fig. 6E). Paradoxalement, à 4 jours d'injections, une diminution de l'expression de *NL-1NA*, *NB*, *C* est observée (Fig. 6C,E,F).

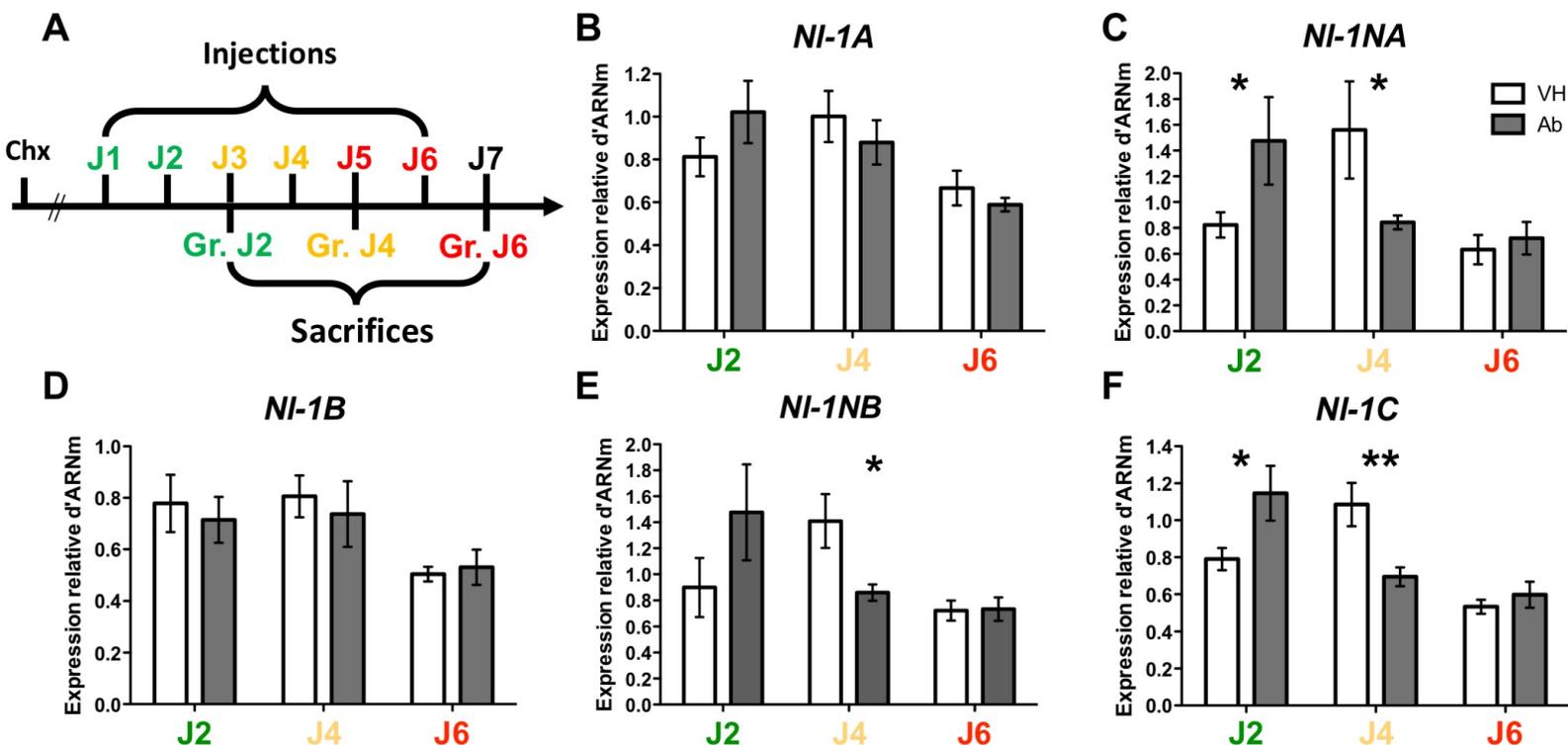


Figure 6 : Progression du niveau d'ARNm des variants transcriptionnels de *NI-1* en réponse aux injections chroniques d'Aβ₁₋₄₂ (A) Ligne du temps illustrant le design expérimental des injections chroniques d'Aβ₁₋₄₂. Gr. J2 (Vert) = Groupe injecté 2 jours, sacrifié 24h après la 2^{ème} injection. Gr. J4 (Jaune) = Groupe injecté 4 jours, sacrifié 24h après la 4^{ème} injection. Gr. J6 (Rouge) = Groupe injecté 6 jours, sacrifié 24h après la 6^{ème} injection (B) Expression du variant de transcription *NI-1A* dans l'hippocampe lors d'injections chroniques. Pas d'effet du traitement, mais un effet du jour significatif observé. Effet traitement (VH ou Aβ₁₋₄₂) : $F_{1,30} = 0.0009$, $p = 0.98$; Effet jours d'injections (J2, J4, J6) : $F_{2,30} = 5.9$, $p = 0.007$; Interaction traitements vs jours : $F_{2,30} = 1.57$, $p = 0.22$. (C) Expression du variant de transcription *NI-1NA*. Augmentation de l'expression au J2, et diminution au J4 chez le groupe injecté aux Aβ₁₋₄₂. Interaction traitements vs jours: $F_{2,29} = 4.67$, $p = 0.018$; J2 VH vs Aβ $p = 0.05^*$; J4 VH vs Aβ $p = 0.032^*$ (D) Expression du variant de transcription *NI-1B*. Pas d'effet du traitement, mais un effet du jour significatif observé. Effet traitement : $F_{1,30} = 0.23$, $p = 0.64$; Effet jours d'injection : $F_{2,30} = 4.83$, $p = 0.015$; Interaction traitements vs jours : $F_{2,30} = 0.18$, $p = 0.84$ (E) Expression du variant de transcription *NI-1NB*. Diminution de l'expression au J4 chez le groupe injecté aux Aβ₁₋₄₂. Interaction traitements vs jours : $F_{2,28} = 3.45$, $p = 0.046$; J2 VH vs Aβ $p = 0.061$; J4 VH vs Aβ $p = 0.045^*$ (F) Expression du variant de transcription *NI-1C*. Augmentation de l'expression au J2 et diminution au J4 chez le groupe injecté aux Aβ₁₋₄₂. Interaction traitements vs jours : $F_{2,28} = 8.0$, $p = 0.0018$; J2 VH vs Aβ $p = 0.01^*$; J4 VH vs Aβ $p = 0.0076^{**}$; N=5-6 pour chaque groupe. Barre blanche = souris injectées au VH et barres grise = souris injectées aux Aβ₁₋₄₂. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne (ESM)

Finalement, après 6 jours d'injections, aucun changement de l'expression des 5 transcrits n'est observé (Fig. 6). Ceci pourrait s'expliquer par la diminution de l'expression chez les contrôles au J6, et appuyé par un effet significatif du jour. Les résultats observés à 2 et 4 jours d'injections chroniques semblent démontrer un effet bi phasique des A β ₀₁₋₄₂ sur certains ensembles de sondes de *NL-1* où, dans l'aiguë, l'expression de ceux-ci serait augmentée, pour ensuite être diminuée si les injections sont prolongées. Bref, les A β ₀₁₋₄₂ semblent modifier l'expression de certains variants de transcription de *NL-1*, et cet effet varie en fonction du nombre d'injections hippocampiques administrées.

4.1.2 Effet des injections chroniques d'A β ₀₁₋₄₂ sur la protéine NL-1

Chez ces mêmes souris, l'hippocampe du second hémisphère a été utilisé afin d'observer la progression du niveau de la protéine NL-1 en réponse aux injections chroniques d'A β ₀₁₋₄₂. La quantification des protéines a été effectuée par Western blot, et le niveau de NL-1 a été normalisé en fonction d'une protéine contrôle, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Fig. 7A). La quantification du Western blot démontre que les injections chroniques d'A β ₀₁₋₄₂ n'ont pas eu d'effet significatif sur le niveau protéique NL-1 à travers les différents jours d'injections (Fig. 7B). Donc, ces résultats indiquent que, contrairement à l'ARNm, les injections chroniques d'A β ₀₁₋₄₂ dans l'hippocampe ne semblent pas affecter le niveau protéique de NL-1 dans ce modèle.

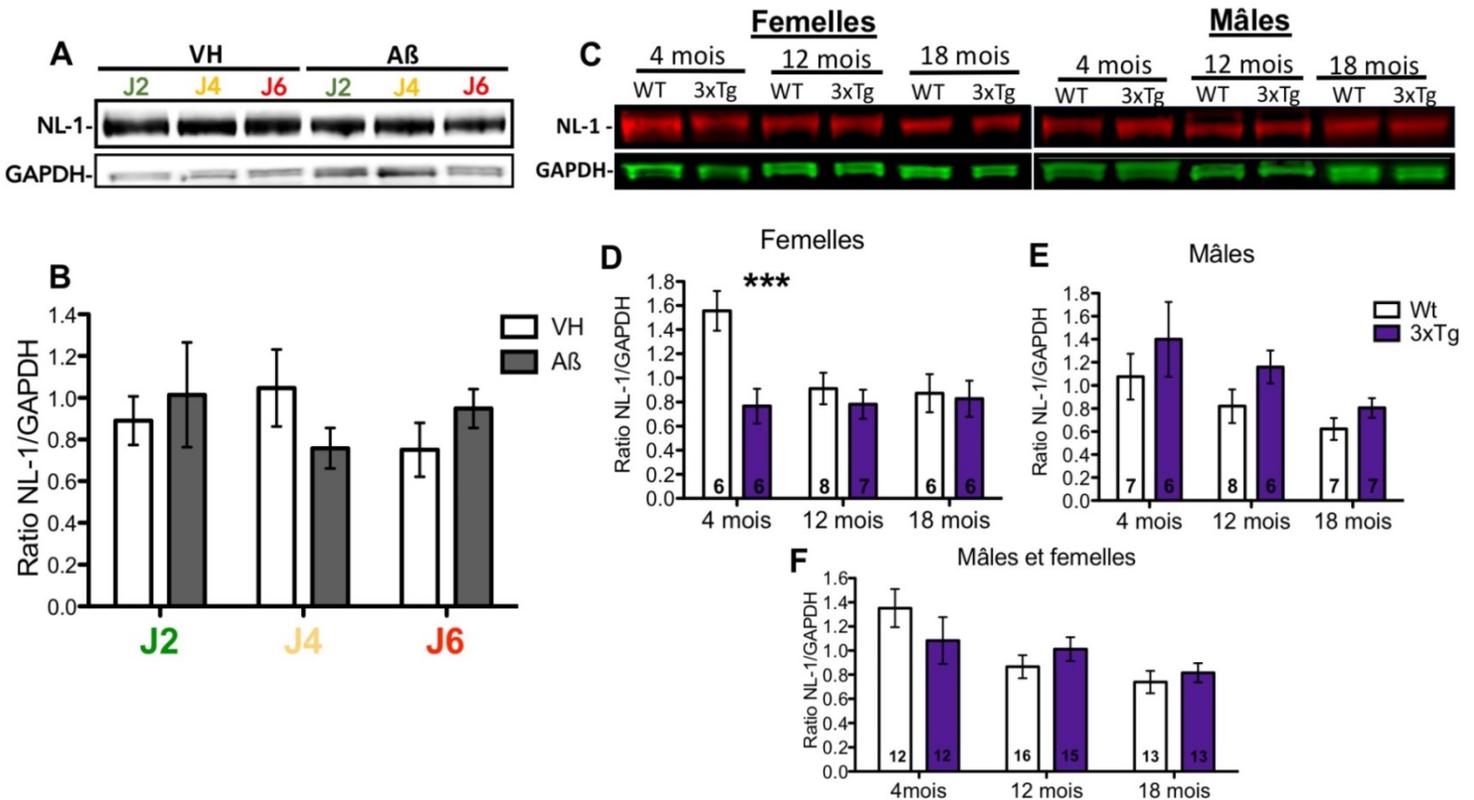


Figure 7 : Progression du niveau protéique de NL-1 en réponse aux injections chroniques d'Aβ₀₁₋₄₂ et dans un modèle de souris 3xTg (A) Western blot de NL-1 (haut) et GAPDH (bas). Les trois premières bandes correspondent aux souris injectées au VH à J2 (vert), J4 (jaune) et J6 (rouge), et les trois suivantes correspondent aux souris injectées aux Aβ₀₁₋₄₂ (B) Quantification de l'intensité des bandes de Western blot chez les souris injectées chroniquement. Le niveau protéique hippocampique de NL-1 est obtenu en normalisant l'intensité des bandes de NL-1, par la protéine GAPDH. Aucun changement du niveau protéique observé. Effet traitement (VH ou Aβ) : $F_{1,28} = 0.0008$, $p = 0.93$; Effet jours d'injections (J2, J4, J6) : $F_{2,28} = 0.22$ $p = 0.8$; Interaction traitements vs jours : $F_{2,28} = 1.59$, $p = 0.22$. $N=5-6$ pour chaque groupe. Barre blanche = VH et barres grise = Aβ. (C) Western blot pour NL-1 (rouge) et GAPDH (vert) chez les souris 3xTg. Les images sont séparées entre les femelles (gauche) et les mâles (droite) et représentent des souris de deux génotypes (WT et 3xTg) à chaque âge (4, 12 et 18 mois) (D) Quantification du Western blot pour les souris femelles seulement. Niveau protéique de NL-1 dans l'hippocampe obtenu normalisant l'intensité des bandes de NL-1/GAPDH. Diminution du niveau protéique à 4 mois seulement. Interaction génotype vs âge : $F_{2,33} = 3.8$, $p = 0.03$. 4 mois WT vs 3xTg $p = 0.0007^{***}$ (E) Quantification du Western blot pour les souris mâles seulement. Pas d'effet du génotype, mais un effet de l'âge significatif est observé. Effet génotype : $F_{1,35} = 3.9$, $p = 0.057$; Effet âge: $F_{2,35} = 4.4$ $p = 0.019$; Interaction génotype vs âge: $F_{2,35} = 0.12$, $p = 0.88$. (F) Quantification du Western blot pour les souris femelles et mâles. Pas d'effet des génotypes, mais un effet de l'âge significatif est observé. Effet génotype : $F_{1,74} = 0.02$, $p = 0.88$; Effet âge : $F_{2,74} = 6.2$ $p = 0.003$; Interaction génotype vs âge : $F_{2,74} = 1.59$, $p = 0.21$. N indiqué sur les bandes pour chaque groupe. Barres blanche = WT et barres mauve = 3xTg. Les barres d'erreurs correspondent à l'ESM

4.1.3 Progression du niveau de NL-1 dans un modèle 3xTg AD

Un second modèle *in vivo* a été utilisé afin de quantifier la progression de NL-1 en présence d'A β . Des souris 3xTg (modèle décrit à la section 1.2.4) mâles et femelles ont été sacrifiées à 4, 12 et 18 mois, et le niveau de la protéine NL-1 a été quantifié dans l'hippocampe de ces souris par Western blot (Fig. 7C). Le sacrifice des souris de différents sexes à différents âges permet d'observer la progression temporelle de NL-1 dans ce modèle, ainsi que les différences d'expression entre les mâles et les femelles. Premièrement, les souris femelles 3xTg démontrent une diminution marquée du niveau de NL-1 à seulement 4 mois (Fig. 7D). Cette diminution n'est toutefois pas observée chez les mâles au même âge (Fig. 7E). De plus, autant chez les femelles que chez les mâles, aucun changement de l'expression protéique de NL-1 n'est observé à 12 et 18 mois entre les génotypes (Fig. 7D-E). Finalement, lorsque les mâles et les femelles sont combinés, aucun changement d'expression de NL-1 entre les génotypes n'est observé à tous les âges (Fig. 7F). Par contre, pour toutes les analyses, un effet significatif de l'âge des animaux démontre que le niveau de NL-1 dans l'hippocampe diminue globalement avec l'âge des souris, peu importe le génotype (Fig. 7D-F). En somme, la diminution marquée de NL-1 observée uniquement chez les femelles de 4 mois semble démontrer que la protéine est rapidement affectée par les processus pathologiques de la MA. Aussi, le fait que cette diminution de NL-1 n'est pas observé chez les mâles, démontrent une variation entre les sexes du profil d'expression de NL-1 dans ce modèle. Finalement, la diminution globale de NL-1 avec l'âge pourrait signifier que le vieillissement de ces souris affecte le niveau d'expression de cette protéine. Bref, ces résultats illustrent que le niveau protéique NL-1 dans l'hippocampe des souris 3xTg est exclusivement diminué chez les femelles de 4 mois, et que la diminution observée est marquée.

4.1.4 Étude *in vitro* de l'effet des A β ₁₋₄₂ sur la protéine NL-1

Afin de mieux cerner les effets des A β ₁₋₄₂ sur la protéine NL-1, un modèle *in vitro* de culture de neurones primaire d'hippocampe a aussi été utilisé. Dans un premier temps, l'expression temporelle du niveau protéique de NL-1 en réponse aux traitements d'A β ₁₋₄₂ a été déterminée par Western blot de 13 à 16 jours après la mise en culture des cellules (Fig. 8A). L'observation visuelle des bandes et la quantification illustre une augmentation progressive du niveau de la protéine avec le temps, confirmée par un effet du temps en culture significatif (Fig. 8B). Il est aussi possible d'observer qu'à ces temps en culture, les traitements d'A β ₁₋₄₂ n'ont pas d'effet sur le niveau de la protéine NL-1. Cette augmentation progressive de NL-1 aux temps en culture plus longs pourrait masquer un effet des A β ₁₋₄₂ dû à la plus grande expression de la protéine. Pour remédier à ceci, les traitements illustrés dans les prochains résultats ont été effectués 7 jours après la mise en culture, comme décrit dans Brouillette et al. 2012, afin de viser un niveau d'expression plus faible de NL-1.

L'hypothèse étant que le niveau protéique de NL-1 serait diminué avant la mort neuronale, une dose et un temps de traitement où la toxicité des A β ₁₋₄₂ est moindre ont été déterminées. Pour s'y faire, les cultures de neurones primaires d'hippocampe ont été traitées à deux concentrations d'A β ₁₋₄₂, soit 2 μ M et 4 μ M, ainsi qu'à deux durées de traitement, 48 et 72h. Dans un premier temps, une dose plus faible de 2 μ M d'A β ₁₋₄₂ n'entraîne aucun changement de viabilité des cellules à 48h de traitement (Fig. 8C), mais lorsque le traitement est poursuivi jusqu'à 72h, la même dose de 2 μ M induit une diminution de la viabilité des cellules d'environ 32% (Fig. 8C), résultat répliqué de Brouillette et al. 2012. Lorsque la dose est augmenté à 4 μ M d'A β ₁₋₄₂, la diminution de viabilité des cellules est observable dès 48h,

et aussi à 72h (Fig. 8E). Ces résultats démontrent un effet dose et temps dépendant de l'A β ₁₋₄₂ sur la viabilité des cultures de neurones primaires d'hippocampe.

Comme la dose de 2 uM d'A β ₁₋₄₂ semble induire une diminution de la viabilité des cellules seulement à 72h, mais pas à 48h de traitement, c'est cette dose qui a été utilisée afin de quantifier le niveau de la protéine NL-1 en réponse aux traitements. Les cellules ont donc été récoltées après 48h et 72h de traitement avec 2 uM d'A β ₁₋₄₂ et le niveau protéique de NL-1 a été mesuré par Western blot (Fig. 8D). Une diminution du niveau de NL-1 est observée lorsque les cellules sont traitées aux A β ₁₋₄₂ pour 72h (Fig. 8F), soit lorsqu'une diminution de la viabilité cellulaire est observé (Fig. 8C). Par contre, aucun changement du niveau de la protéine n'est observé lorsque les cellules sont traitées durant 48h avec l'A β ₁₋₄₂ (Fig. 8F). Ces résultats démontrent que, contrairement à notre hypothèse, dans ce modèle *in vitro*, la diminution de NL-1 n'est pas un événement en amont de la diminution de viabilité cellulaire. Toutefois, une baisse du niveau de la protéine est bel et bien observée en présence d'A β ₁₋₄₂ à 72h de traitement, concordant avec l'apparition de la neurodégénérescence, appuyant ainsi les résultats observés dans les modèles *in vivo* et *in vitro* (Bie et al., 2014; Kim et al., 2018).

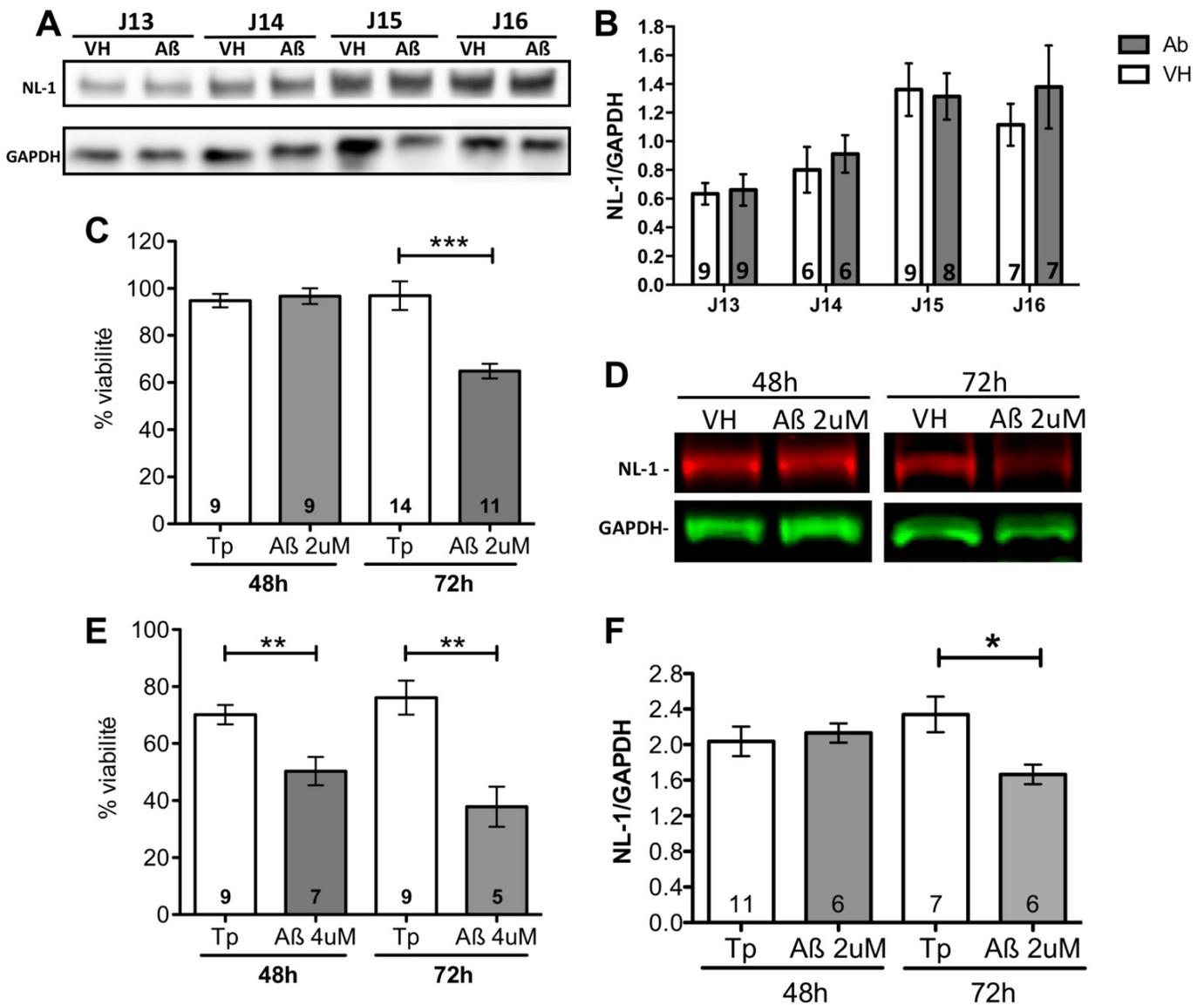


Figure 8 : Étude *in vitro* de l'effet des Aβ₁₋₄₂ sur la viabilité cellulaire et la protéine NL-1 (A) Western blot pour NL-1 (haut) et GAPDH (bas) chez les cultures de neurones primaires. Les images représentent les jours en culture (J13 à J16) selon le traitement (Aβ₁₋₄₂ ou VH) **(B)** Quantification de l'intensité des bandes de Western blot du niveau de NL-1 lors des différents jours en culture. Le niveau protéique de NL-1 est obtenu en normalisant l'intensité des bandes par celles de GAPDH. Une augmentation progressive du niveau de NL-1 est observée, confirmée par un effet du temps significatif. Aucune effet du traitement aux Aβ₁₋₄₂ est observé. Effet temps (J12 à J15) : $F_{3,53} = 8.52$, $p = 0.0001$; Effet traitement (Aβ₁₋₄₂ ou VH) : $F_{1,53} = 0.56$, $p = 0.45$; Interaction temps vs traitement : $F_{3,53} = 0.33$, $p = 0.8$. **(C)** Viabilité cellulaire des cultures de neurones primaires d'hippocampe en réponse à une concentration de 2 uM d'Aβ₁₋₄₂, à 48 et 72h de traitement. Diminution de la viabilité cellulaire à 72h, mais pas à 48h. Interaction Traitement vs Temps : $F_{1,39} = 12.6$, $p = 0.001$; 72h Tp vs Aβ 2uM $p = 0.0003^{***}$ **(D)** Western blot pour NL-1 (rouge) et GAPDH (vert) chez les cultures de neurones

primaires. Les images sont séparées entre 48h de traitement (gauche) et 72h (droite) et représentent les cellules traitées au VH ou à 2 uM d'Aβ₀₁₋₄₂ **(E)** Viabilité cellulaire des cultures de neurones primaires d'hippocampe en réponse à une concentration de 4 uM d'Aβ₀₁₋₄₂, à 48 et 72h de traitement. Diminution de la viabilité cellulaire à 48 et 72h. Interaction Traitement vs Temps : $F_{1,28} = 4.38$, $p = 0.045$; 48h Tp vs Aβ 4uM $p = 0.0042^{**}$, 72h Tp vs Aβ 4uM $p = 0.0018^{**}$ **(F)** Quantification de l'intensité des bandes de Western blot. Le niveau protéique de NL-1 est obtenu en normalisant l'intensité des bandes de NL-1/GAPDH. Une diminution du niveau de NL-1 à 72h en réponse aux Aβ₀₁₋₄₂ est observé. Interaction Traitement vs Temps : $F_{1,22} = 5.43$, $p = 0.029$; 72h Tp vs Aβ 2uM $p = 0.017^*$. N indiqué sur les bandes pour chaque groupe. Barres blanches = VH et barres grises = Aβ. Les barres d'erreurs correspondent à l'ESM.

4.2 Objectif 2

4.2.1 Détermination de l'emplacement du site d'injection

Le second objectif consistait à étudier l'effet de la délétion de NL-1 sur la neurotoxicité des Aβ₀₁₋₄₂, afin de mieux comprendre le rôle de NL-1 dans ce processus. Pour s'y faire, l'effet des Aβ₀₁₋₄₂ chez des souris WT et KO pour la NL-1 sera comparé, afin d'identifier si ceux-ci ont un effet plus délétère en absence de NL-1. Quatre groupes distincts ont été étudiés, soit un groupe de souris WT injectées à l'Aβ_{scr} (WT VH) et un autre aux Aβ₀₁₋₄₂ (WT Aβ), un groupe de KO injectées à l'Aβ_{scr} (KO VH) et un autre groupe aux Aβ₀₁₋₄₂ (KO Aβ). Par soucis de simplicité et de clarté, tout au long de l'objectif 2, l'Aβ_{scr} sera décrit comme la condition VH. Ces souris ont suivi un protocole expérimental illustré à la figure 10A. Brièvement, les souris ont été injectées chroniquement durant 4 jours et ont été soumises à une batterie de tests comportementaux, surtout axés sur la mémoire spatiale, dont les résultats seront décrits individuellement dans les prochaines sections. Les 4 jours d'injections dans cet objectif permettent d'obtenir une dose intermédiaire d'Aβ₀₁₋₄₂ à celle de 6 jours (Voir section 1.2.4) pour voir si l'absence de NL-1 aura un effet synergique sur les processus de

dégénérescence et les déficits de mémoire induit par les A β ₁₋₄₂. Après le sacrifice des souris, le site d'injection a été déterminé approximativement pour chaque souris afin de s'assurer le plus possible de l'homogénéité interindividuelle. Le site d'injection est observable à l'aide d'un marquage du cerveau au crésyl violet, ou en immunofluorescence en marquant la protéine NeuN (Fig. 5). L'emplacement approximatif des sites d'injections pour chaque groupe de souris est illustré à la figure 9. Cette figure illustre que le site d'injection est plutôt semblable d'une souris à l'autre, soit entre la couche de cellule du CA1 et la couche granulaire

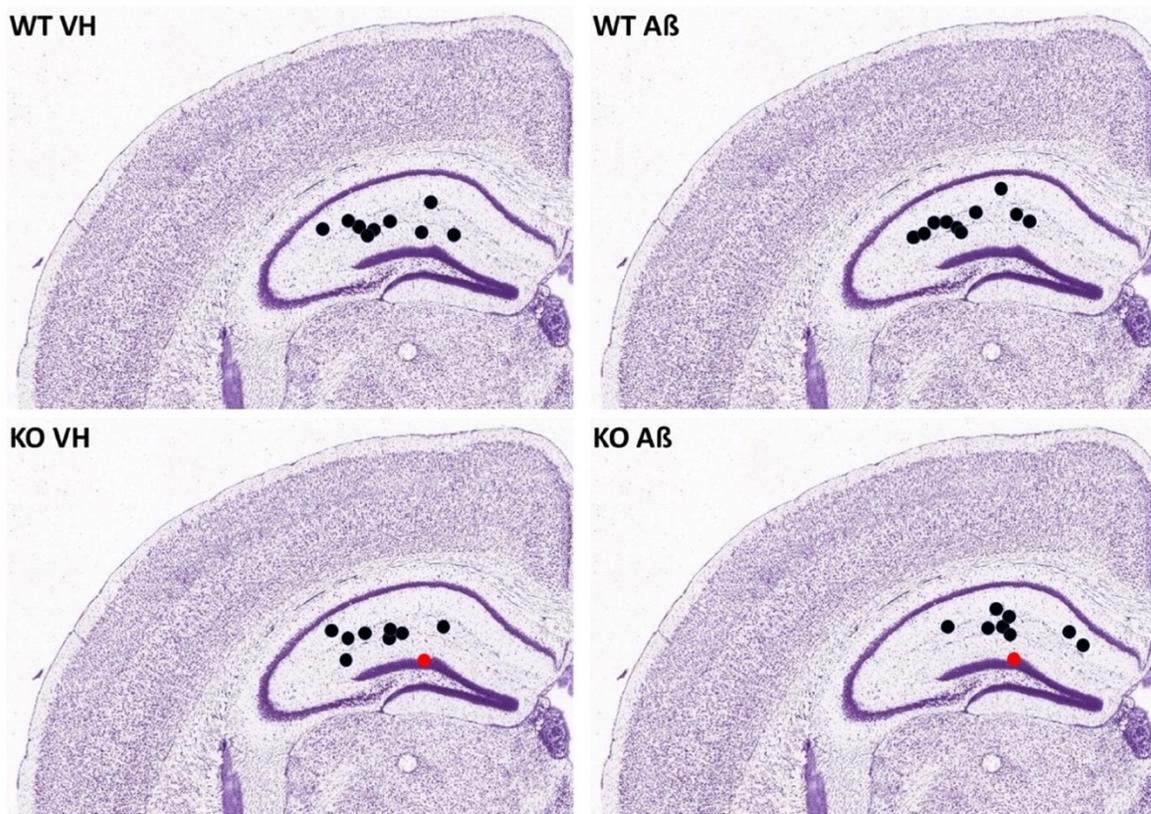


Figure 9 : Emplacement approximatif des sites d'injection dans l'hippocampe Schéma illustrant l'emplacement approximatif des sites d'injection dans l'hippocampe des souris des 4 groupes utilisées pour l'objectif 2. Le groupe correspondant à chaque panneau est inscrit dans le coin supérieur gauche. Le site d'injection est illustré par un point noir, et se trouve principalement entre la couche de cellule du CA1 et le GD. Les points rouges correspondent aux souris qui ont été exclues de l'expérience en raison d'une destruction mécanique du GD par la canule. Les sites d'injections qui n'entraient pas dans l'hippocampe et qui ont été retirés des analyses ne sont pas illustrés sur ce schéma. Illustration de l'hippocampe marqué au crésyl violet provient du Allan mouse brain atlas.

du GD. Deux souris ont subi une destruction mécanique de la couche granulaire du GD par la canule (point rouge Fig. 9) et ont été retirées des analyses. Aussi, une autre souris a été retirée des analyses puisque la canule était trop rostrale et n'entrait pas dans l'hippocampe. Situer le site d'injection dans l'hippocampe des souris permet donc de s'assurer d'analyser les souris ayant un site d'injection le plus homogène possible, et permet d'exclure des analyses celles ayant une position aberrante.

4.2.2 Effet combiné de la délétion de NL-1 et des A β ₀₁₋₄₂ sur la mémoire

4.2.2.1 Reconnaissance spatiale d'objets (RSO)

Afin de vérifier si l'absence de NL-1 aggrave les déficits de mémoire engendrés par l'administration d'A β ₀₁₋₄₂ dans l'hippocampe, les souris ont été soumises à une batterie de tests comportementaux. Le premier test effectué est le test de reconnaissance spatiale d'objets (RSO). Ce test implique la mémoire spatiale, où les souris explorent une arène contenant deux objets différents la première journée, et 24h plus tard, un des deux objets est déplacé (Fig. 10B). Comme les rongeurs ont une tendance naturelle à explorer d'avantage la nouveauté, ceux-ci vont interagir plus souvent et plus longtemps avec l'objet qui a été déplacé. Au contraire, un nombre ou un temps d'interactions égale ou plus faible avec l'objet déplacé indiquera des déficits de mémoire. Les souris des 4 groupes ont effectué ce test, et le nombre d'interaction et le temps d'interaction avec l'objet mobile (M) et immobile (I) (Fig. 10B) ont été mesurés. L'indice de discrimination (DI) a aussi été calculé. Ce coefficient rapporte la capacité des souris à discriminer l'objet mobile de celui immobile. Un coefficient de 1 indique une interaction totale avec l'objet mobile, et -1 indique que la souris n'a aucunement interagit avec l'objet mobile.

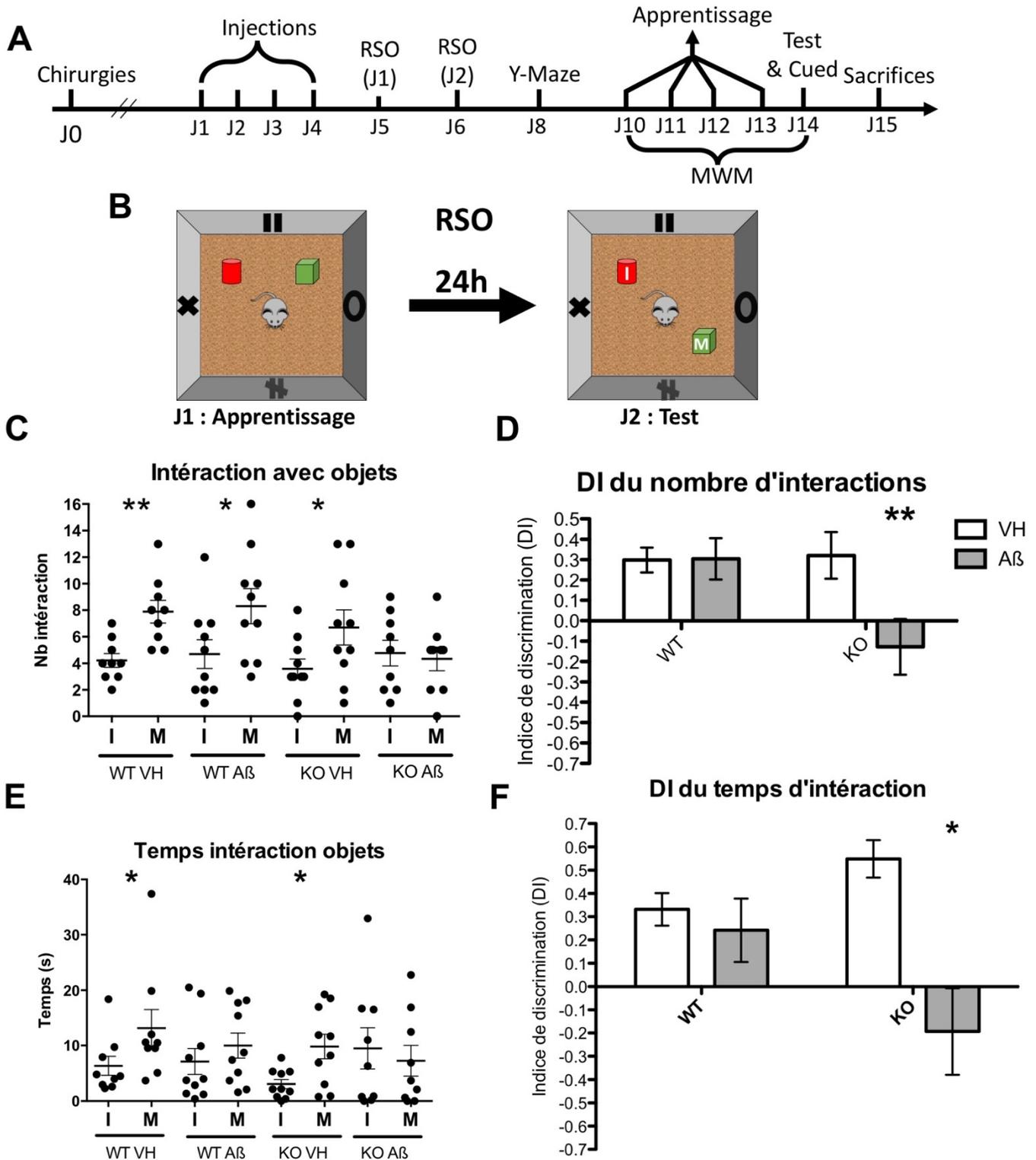


Figure 10 : L'absence de NL-1 combiné aux injections chroniques d'Aβ₀₁₋₄₂, engendre des déficits de mémoire au test de la RSO (A) Ligne du temps du design expérimental de l'objectif 2. Les souris reçoivent 4 jours d'injections chroniques avant d'effectuer une batterie de tests, constituée

dans l'ordre du RSO (2 jours), labyrinthe en Y (1 jour) et la piscine de Morris (5 jours). Les souris sont finalement sacrifiées 24h après le dernier jour de la piscine de Morris. **(B)** Schéma de la procédure pour la RSO. Le premier jour, les souris explorent une arène contenant 4 indices visuels et 2 objets différents pour 5 minutes. 24h plus tard, un des deux objets est changé d'emplacement dans la boîte (Objet mobile (M)) et l'autre reste au même endroit (Objet immobile (I)). Les souris explorent de nouveau durant 5 minutes **(C)** Nombre total d'interactions avec l'objet M et I pour les quatre groupes. Tous les groupes démontrent un plus grand nombre d'interaction avec l'objet M, sauf le groupe KO Aβ. WT VH M vs I p=0.0042** ; WT Aβ M vs I p=0.01* KO VH M vs I p=0.02* KO Aβ M vs I p=0.6 **(D)** DI du nombre d'interaction pour les quatre groupes. Le groupe KO Aβ démontre un DI significativement plus bas que tous les autres groupes. Interaction Génotype vs Traitement : $F_{1,34} = 4.48$, $p = 0.04$. WT VH vs KO Aβ p=0.0014** ; WT Aβ vs KO Aβ p=0.0023** ; KO VH vs KO Aβ p=0.0017** **(E)** Temps d'interactions avec l'objet M et I pour les quatre groupes. Les groupes injectés au VH démontrent un plus grand nombre d'interaction avec l'objet M, mais pas les groupe injectés aux Aβ₀₁₋₄₂. WT VH M vs I p=0.016* ; WT Aβ M vs I p=0.3 KO VH M vs I p=0.01* KO Aβ M vs I p=0.5 **(F)** DI du temps d'interaction pour les quatre groupes. Le groupe KO Aβ démontre un DI significativement plus bas que les groupes WT VH et KO VH, mais pas WT Aβ. Interaction Génotype vs Traitement : $F_{1,34} = 4.23$, $p = 0.04$. WT VH vs KO Aβ p=0.04* ; WT Aβ vs KO Aβ p=0.07 ; KO VH vs KO Aβ p=0.001* N= 9-10 par groupes. Barres blanche = VH et barres grise = Aβ. Les barres d'erreurs correspondent à l'ESM.

Premièrement, les groupes ont tous interagité un plus grand nombre de fois avec l'objet qui a été déplacé, excepté le groupe KO Aβ qui a montré un nombre d'interaction similaire entre les deux objets (Fig. 10C). Le groupe KO Aβ présente aussi une valeur de DI significativement inférieure à tous les autres groupes (Fig. 10D). Ces résultats démontre que, comparativement aux trois autres groupes, les souris KO Aβ ne semblent pas en mesure de discriminer efficacement l'objet qui a été déplacé après la première journée, supposant un déficit de mémoire spatiale. Pour sa part, l'analyse du temps d'interaction avec les objets démontre que les souris WT VH et KO VH ont tous deux interagité plus longtemps avec l'objet mobile qu'avec l'objet immobile (Fig. 10E). Cependant, chez les groupes WT Aβ et KO Aβ, aucune différence significative n'est observée pour le temps d'interaction entre les deux objets (Fig. 10E). Par contre, le calcul du DI démontre que les souris KO Aβ ont un coefficient significativement plus faible que les WT VH et KO VH, et une forte tendance est observée

dans ce même sens avec le groupe WT A β ($p = 0.07$) (Fig. 10F). Ensemble, ces résultats semblent démontrer que l'injection hippocampique d'A β_{01-42} affecte exclusivement les performances au test de la RSO des souris NL-1 KO, supposant un effet synergique de l'effet des A β_{01-42} et l'absence de NL-1 sur les déficits de mémoire spatiale.

4.2.2.2 Labyrinthe en Y

Le second test effectué est le labyrinthe en Y. Dans ce test, les souris doivent explorer un labyrinthe en forme de Y avec un bras fermé pour 5 min, avant d'être retournées dans leur cage pour 5 autres min (Fig. 11A). Le bras fermé est ensuite ouvert, et les souris sont libres d'explorer les trois bras pour 5 min. La préférence à la nouveauté des souris devrait entraîner un temps d'exploration du bras fermé plus élevé que les autres bras. Ce test implique principalement la mémoire de travail dû au court laps de temps entre les temps d'exploration du labyrinthe (Dudchenko, 2004; Wolf, Bauer, Abner, Ashkenazy-Frolinger, & Hartz, 2016). En analysant la totalité du 5 min lorsque les souris sont réintroduite dans le labyrinthe, seul le groupe KO VH n'ont pas de préférence significative pour le nouveau bras (Fig. 11B). Ce résultat est curieux puisque les souris du même génotype injectées aux A β_{01-42} , ont bien discriminée le nouveau bras des autres. Par contre, en analysant seulement les 2 premières min d'exploration, tous les groupes ont exploré le nouveau bras significativement plus longtemps (Fig. 11C). Ces résultats démontrent que peu importe le génotype ou le traitement administré aux souris, les performances au Y-maze, lorsque les 2 premières min d'exploration sont analysées, ne sont pas affectées. Ceci pourrait indiquer que la mémoire de travail, qui dépend principalement du cortex préfrontal (Bai, Liu, Yi, Li, & Tian, 2012; Yang, Shi, Wang, Peng, &

Li, 2014), ne semble pas affecté par les injections hippocampiques d'Aβ₀₁₋₄₂, et que l'absence de NL-1 n'entraîne pas de déficits additionnels de ce type de mémoire.

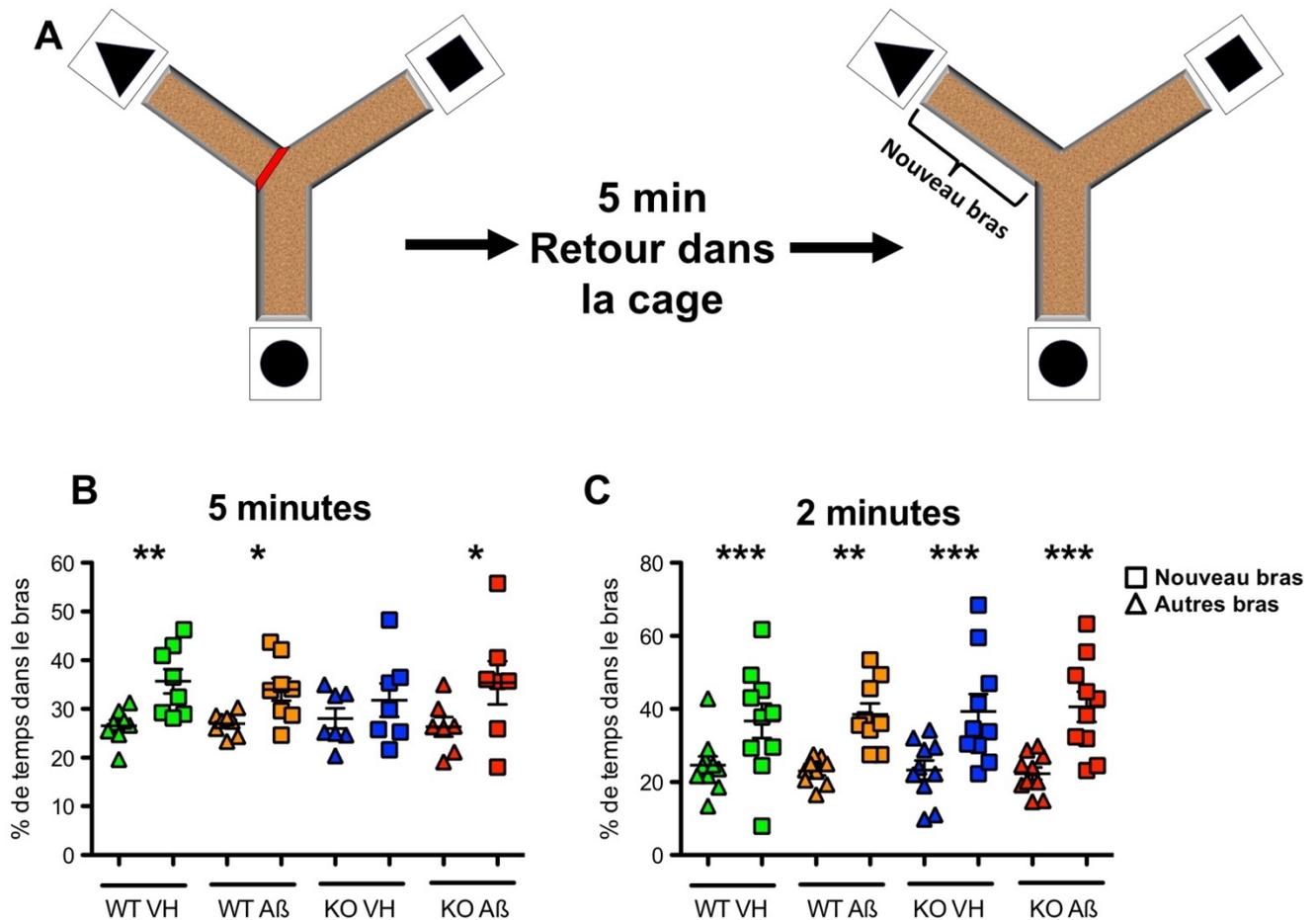


Figure 11 : Performances au labyrinthe en Y préservées (A) Schéma de la procédure pour le labyrinthe en Y. Les souris explorent un labyrinthe en Y avec 3 indices visuels différents au bout de chaque bras et un bras fermé pour 5 min. Les souris sont retournées dans leur cage pour 5 min et de nouveau introduites dans le labyrinthe pour 5 min, mais les 3 bras sont accessibles. Le pourcentage de temps passé dans chaque bras est mesuré. **(B)** Pourcentage de temps passé dans le nouveau vs les autres bras pour les 5 min. Seul le groupe KO VH ne passe pas plus de temps dans le nouveau bras. WT VH Nouveau vs Autres $p=0.009^{**}$; WT Aβ Nouveau vs Autres $p=0.04^{*}$; KO VH Nouveau vs Autres $p=0.3$; KO Aβ Nouveau vs Autres $p=0.02^{*}$. **(C)** Pourcentage de temps passé dans le nouveau vs les autres bras pour les 2 première minutes. Tous les groupes passent plus de temps dans le nouveau bras. WT VH Nouveau vs Autres $p=0.0003^{***}$; WT Aβ Nouveau vs Autres $p=0.001^{**}$; KO VH Nouveau vs Autres $p=0.0005^{***}$; KO Aβ Nouveau vs Autres $p<0.0001^{***}$. $N=9-10$ Vert=WT VH, Orange=WT Aβ, Bleu=KO VH, Rouge=KO Aβ. Les barres d'erreurs correspondent à l'ESM

4.2.2.3 Piscine de Morris

Le dernier test ayant été effectué est celui de la piscine de Morris. Ce test implique principalement la mémoire spatiale, et se déroule en deux phases. Lors de la première phase, les souris doivent apprendre la localisation d'une plateforme submergée dans une piscine remplie d'eau à l'aide d'indices visuels placés autour de la piscine (Fig. 12A). Cette phase d'entraînement se déroule sur 4 jours, et les souris ont 3 essais de 60 sec par jour pour trouver la plateforme. Si l'apprentissage se fait normalement, le temps de latence et la distance jusqu'à la plateforme devraient progressivement diminuer au fil des essais. Une augmentation du temps de latence ou de la distance pour se rendre à la plateforme représentent donc des indices de déficits d'apprentissage spatial.

À priori, les résultats obtenus lors de la phase d'entraînement atteste que tous les groupes semblent avoir un apprentissage normal puisqu'ils ont tous obtenus des résultats similaire pour la latence et de la distance jusqu'à la plateforme à travers les 4 jours d'apprentissage (Fig. 12B et C). De plus, un effet significatif du jour ($p < 0,0001$) démontre une diminution progressive de la latence et la distance à la plateforme, indiquant un apprentissage normal de tous les groupes (Fig. 12B et C). Des analyses plus poussées peuvent être effectuées afin de regarder certain paramètres pouvant sous tendre à certains déficits cognitif. Par exemple, analyser le 1^{er} essai de chaque jour permet d'observer des déficits de rétention de la mémoire (Billings et al., 2005). L'analyse du 1^{er} essai démontre une interaction significative entre le jour d'entraînement et le traitement administré. L'ANOVA à 3 niveaux démontre qu'au jour 3 uniquement, peu importe leur génotype, les souris injectées aux A β ₀₁₋₄₂ ont un temps de latence plus élevé que les souris injectées au VH (Fig. 12D). Bien que cet effet ne

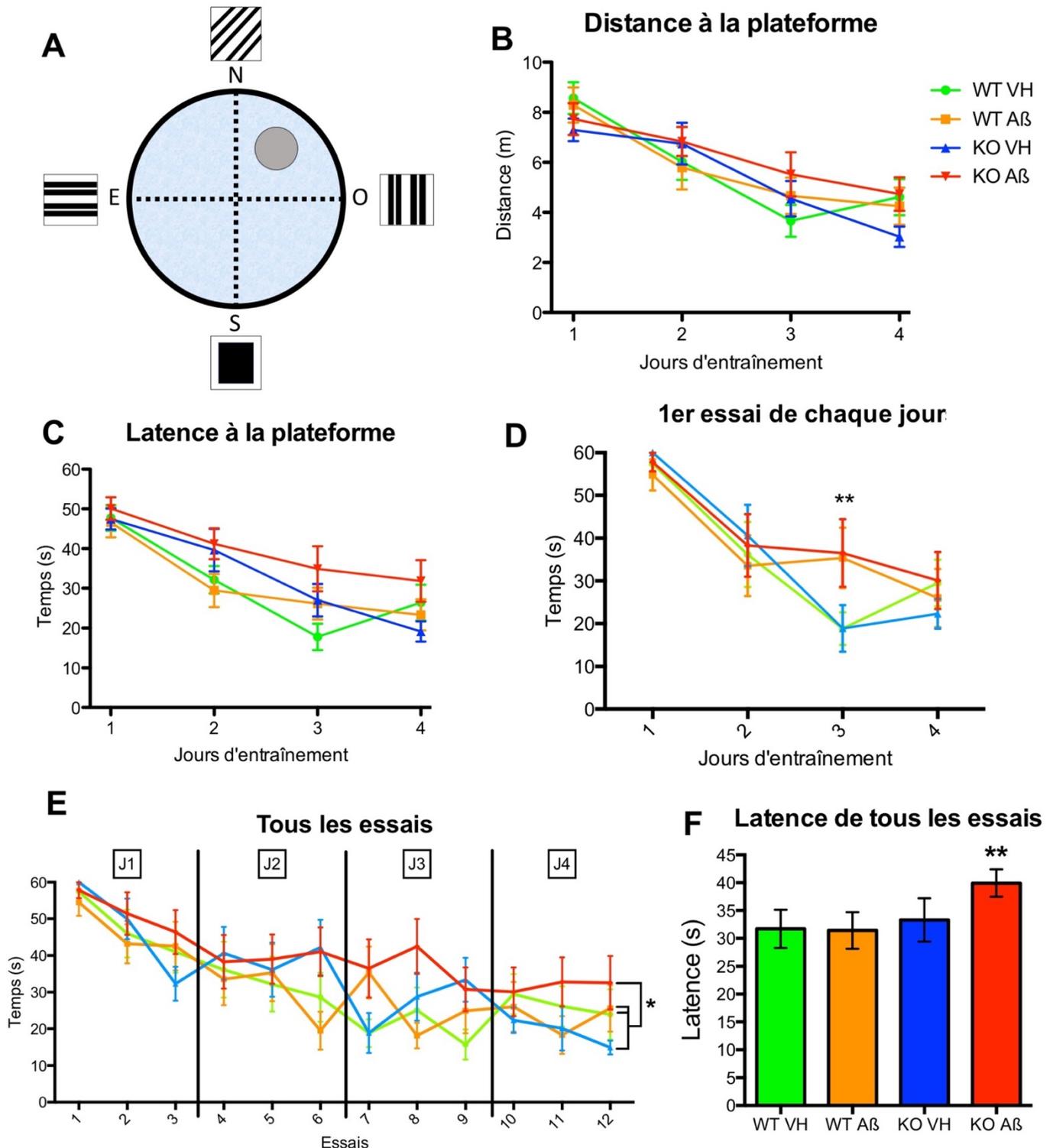


Figure 12 : Performances à la piscine de Morris lors de la phase d'entraînement (A) Schéma du montage expérimental de la piscine de Morris lors de la phase d'entraînement. Les souris doivent trouver une plateforme submergée à l'aide de 4 indices visuels. La piscine est séparée en 4 cadrans égaux nommés en fonction des points cardinaux. Les souris ont 3 essais de 60 sec par jour, durant 4

jours. La latence et la distance jusqu'à la plateforme sont mesurées. **(B)** Distance à la plateforme lors de la phase d'entraînement. Aucune différence significative entre les différents groupes, mais un apprentissage normal est observé chez tous les groupes. Effet jour (1 à 4) : $F_{3,151} = 25,2$, $p < 0.0001$; Effet génotype (WT ou VH): $F_{1,151} = 0.045$ $p = 0.83$; Effet traitement (VH ou A β) : $F_{1,151} = 1.8$ $p = 0.41$; Interaction jour vs génotype : $F_{3,151} = 1.82$, $p = 0.145$; Interaction jour vs traitement : $F_{3,151} = 0.5$, $p = 0.67$; Interaction génotype vs traitement : $F_{1,151} = 1.21$, $p = 0.27$; Interaction jour vs génotype vs traitement : $F_{3,159} = 0.43$, $p = 0.73$ **(C)** Latence à la plateforme lors de la phase d'entraînement. Aucune différence significative entre les différents groupes, mais un apprentissage normal est observé chez tous les groupes. Effet génotype global observé, les souris KO ayant un temps de latence globalement plus élevé. Effet jours : $F_{3,159} = 30$, $p < 0.0001$; Effet génotype : $F_{1,159} = 5.4$ $p = 0.02$; Effet traitement : $F_{1,159} = 1.8$ $p = 0.18$; Interaction jour vs génotype : $F_{3,159} = 1.15$, $p = 0.33$; Interaction jour vs traitement : $F_{3,159} = 0.86$, $p = 0.46$; Interaction génotype vs traitement : $F_{1,159} = 1.12$, $p = 0.26$; Interaction jour vs génotype vs traitement : $F_{3,159} = 0.43$, $p = 0.73$ **(D)** Latence à la plateforme lors du premier essai de chaque jour lors de la phase d'entraînement. Temps de latence plus élevé chez les souris injectées aux A β_{01-42} , peu importe leur génotype, au jour 3 est observé. Effet jours : $F_{3,151} = 24.6$, $p < 0.0001$; Effet génotype : $F_{1,151} = 0.44$ $p = 0.5$; Effet traitement : $F_{1,151} = 1.8$ $p = 0.18$; Interaction jours vs génotype : $F_{3,151} = 0.2$, $p = 0.89$; Interaction jours vs traitement : $F_{3,151} = 2.95$, $p = 0.03$ J3 VH vs A β $p=0.0018^{**}$ Interaction génotype vs traitements : $F_{1,151} = 0.44$, $p = 0.5$; Interaction jours vs génotype vs traitement : $F_{3,151} = 0.2$, $p = 0.89$ **(E)** Latence à la plateforme de chaque essai lors de la phase d'entraînement. Interaction génotype et traitement indiquant une latence globalement plus élevée à la plateforme chez les KO A β comparativement aux trois autres groupes. Effet essai (1 à 12) : $F_{11,455} = 11.6$, $p < 0.0001$; Effet génotype : $F_{1,455} = 8.44$ $p = 0.004$; Effet traitement : $F_{1,455} = 3.3$ $p = 0.07$; Interaction essai vs génotype : $F_{11,455} = 1.11$, $p = 0.34$; Interaction essai vs traitement : $F_{1,455} = 1.02$, $p = 0.43$; Interaction génotype vs traitement : $F_{1,455} = 3.94$, $p = 0.047^{*}$; KO A β vs WT VH $p=0.0012^{**}$, KO A β vs WT A β $p=0.0006^{***}$, KO A β vs KO VH $p=0.0074^{**}$; Interaction essai vs génotype vs traitement : $F_{11,455} = 0.64$, $p=0.79$ **(F)** Graphique illustrant l'interaction génotype vs traitement du panneau E de la latence globale à la plateforme de chaque essai lors de la phase d'entraînement. N=9-10 par groupes. Vert = WT VH; Orange = WT A β ; Bleu = KO VH; Rouge = KO A β . Les barres d'erreurs correspondent à l'ESM

soit pas spécifique à un seul groupe, ce résultat démontre un effet des A β_{01-42} sur la rétention de la mémoire au 3^{ème} jour d'entraînement. Il est aussi possible d'analyser le temps de latence pour chaque essai séparément afin de potentiellement observer un effet global du génotype ou du traitement. L'ANOVA à 3 niveaux démontre une interaction significative entre les variables génotype et traitement, qui peut être interprétée par une augmentation globale de la latence du groupe KO A β comparativement aux trois autres groupes (Fig. 12E-F). En somme

bien qu'à première vue il semble y avoir un apprentissage normal chez tous les groupes de souris (Fig. 12B-C), une analyse plus approfondie permet de montrer que l'injection d'A β ₀₁₋₄₂ a un effet sur la rétention de la mémoire au jours 3 (Fig. 12D) De plus, le groupe de souris KO A β présente un temps de latence globalement plus élevé que les autres groupes lors de la phase d'entraînement (Fig. 12E-F), ce qui pourrait suggérer un déficit de mémoire et d'apprentissage exclusivement chez ce groupe.

La seconde phase de la piscine de Morris, la phase test, est effectuée au 5^{ème} jour. Lors de cette phase, la plateforme est retirée de la piscine et la distribution du temps dans les différents cadrans est analysée (Fig. 13A). Si les souris passent la majorité de leur temps dans le cadran où était la plateforme (Cadrans cible), ceci indique qu'elles ont mémorisées l'emplacement de la plateforme. Le nombre de passage à travers la zone où était la plateforme est aussi mesuré comme un indice d'apprentissage de l'emplacement de celle-ci. Pour cette variable, les résultats ne démontrent pas de variation significative entre les 4 groupes (Fig. 13B). Par contre, un effet significatif du traitement indique que les souris injectées aux A β ₀₁₋₄₂, peu importe leur génotype, traversent la zone plateforme moins souvent que ceux injectés au VH. En analysant le temps passé dans le cadran cible vs les autres cadrans, des résultats semblables sont obtenus, avec un effet significatif du traitement aux A β ₀₁₋₄₂ (Fig. 13C). À noter que seulement les deux groupes injectés avec le VH ont obtenus des résultats au test de l'IC95 significativement plus élevé que le seuil du 25% de chance (indiqué par un # sur la figure 13C; Figure supplémentaire 2 pour IC95).

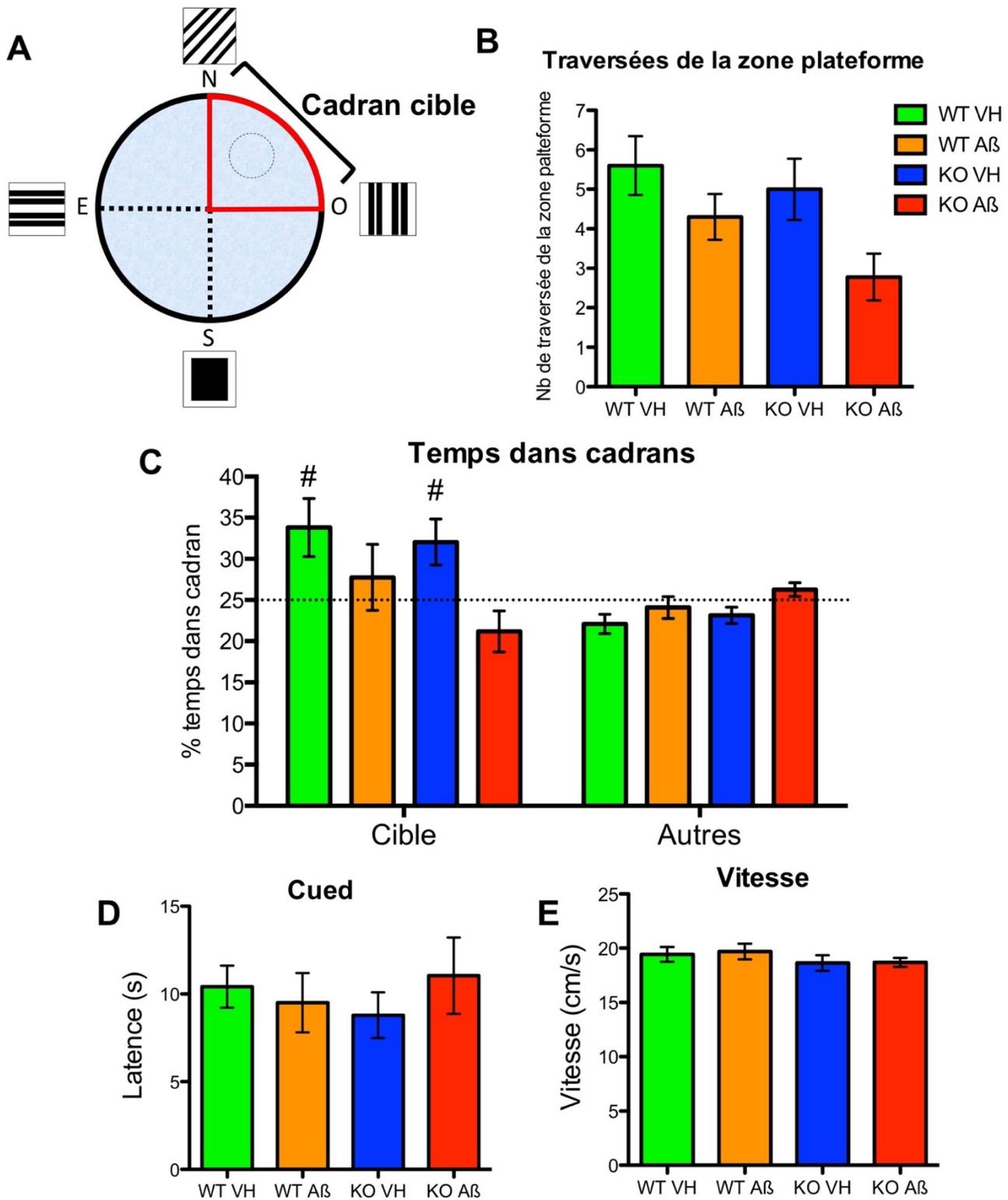


Figure 13 : Performances à la piscine de Morris lors de la phase test (A) Schéma du montage expérimental de la piscine de Morris lors de la phase test. La plateforme est retirée de la piscine et les souris explorent la piscine pour 60 secondes. La zone plateforme est indiquée en pointillé, le cadran

cible (NO) correspond au cadran où était la plateforme. Le pourcentage de temps passé dans chaque cadran, le nombre de fois que les souris traversent la zone plateforme et la vitesse des souris sont mesurés. **(B)** Nombre de traversée de la zone plateforme lors de la phase test. Effet du traitement A β est observé. Effet génotype (WT ou KO) : $F_{1,39} = 2.16$, $p = 0.15$; Effet traitement (VH ou A β) : $F_{1,39} = 6.2$ $p = 0.017$; Interaction génotype vs traitement : $F_{1,39} = 0.08$, $p = 0.77$. **(C)** Pourcentage de temps passé dans le cadran cible et les autres cadrans lors de la phase test. Effet du traitement A β est observé pour le temps passé dans le cadran cible. Effet cadran (Cible ou Autres) : $F_{1,77} = 6.36$, $p < 0.013^*$; Effet génotypes : $F_{1,77} = 0.84$ $p = 0.36$; $F_{1,77} = 0.41$, $p = 0.52$; # = Différence significative du 25% de chance au test d'IC95. Effet traitements : $F_{1,77} = 2.15$ $p = 0.14$; Interaction cadran vs génotypes : $F_{1,77} = 3.38$, $p = 0.07$; Interaction cadran vs traitements : $F_{1,77} = 8.6$, $p = 0.0045$; Cible VH vs A β $p = 0.0027$; Interaction génotype vs traitement : $F_{1,77} = 0.1$, $p = 0.74$; Interaction cadran vs génotype vs traitement : $F_{1,77} = 0.4$, $p = 0.5$ **(D)** Latence à la plateforme lors du cued. Aucune différence significative entre les différents groupes. Effet génotype (WT ou KO) : $F_{1,33} = 0.0008$, $p = 0.97$; Effet traitement (VH ou A β) : $F_{1,33} = 0.2$ $p = 0.65$; Interaction génotype vs jours : $F_{1,33} = 0.78$, $p = 0.38$. **(E)** Vitesse moyenne lors du test. Aucune différence significative entre les groupes. Effet génotype (WT ou KO) : $F_{1,35} = 1.8$, $p = 0.18$; Effet traitement (VH ou A β) : $F_{1,35} = 0.06$ $p = 0.8$; Interaction génotype vs jours : $F_{1,35} = 0.02$, $p = 0.87$. N= 9-10 par groupes. Droite Vert = WT VH, Orange = WT A β , Bleu = KO VH, Rouge = KO A β . Les barres d'erreurs correspondent à l'ESM

Après la phase test la capacité motrices et visuelles des souris sont aussi évaluées à l'aide d'un test contrôle (cued) lors duquel la plateforme est rendue visible et est positionnée à un nouvel emplacement dans la piscine. Les souris ont 3 essais de 30 sec pour trouver la plateforme. Les résultats ne démontrent aucune différence significative entre les groupes (Fig. 13D). La vitesse dans la piscine lors du test probe est aussi mesurée afin de s'assurer des capacités motrices des souris, et encore une fois, aucune différence entre les groupes n'a été observée (Fig. 13E). Ces deux derniers résultats indiquent donc que les souris n'ont aucun déficit visuel et/ou moteur. En somme, les résultats obtenus lors de la phase test démontrent un effet nocif des A β_{01-42} sur les performances à la piscine de Morris, mais cet effet ne semble pas exacerbé par l'absence de NL-1 chez le groupe KO A β .

4.2.3 Effet combiné de la délétion de NL-1 et des A β ₀₁₋₄₂ sur les pertes neuronales

Afin de quantifier l'effet de la délétion de NL-1 sur la neurotoxicité des A β ₀₁₋₄₂ au niveau cellulaire, un comptage neuronal a été effectué dans une zone du GD sous le site d'injection. La détermination de cette zone est décrite à la section 3.3.5 et illustrée à la figure 5. L'aire de la zone ainsi que la distance approximative du SI à la zone de comptage ont été mesurés afin de s'assurer d'une constance entre chaque comptage. Comme illustré à la figure 14B-C, la moyenne des aires des zones de comptage, ainsi que la distance en le SI et la zone de comptage ne varie pas d'un groupe à l'autre. Afin de faire le comptage des neurones, les tranches de cerveaux ont été marquées à l'aide d'un anticorps ciblant la protéine NeuN, protéine présente chez la grande majorité des neurones du système nerveux central (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015). Le marquage en immunofluorescence permet de distinguer individuellement chaque neurone, ce qui facilite la tâche pour le comptage cellulaire (Fig. 14A). Les résultats du comptage neuronal démontrent un nombre de neurones diminué chez les souris KO A β , comparativement aux 3 autres groupes (Fig. 14D). Ceci implique que les A β ₀₁₋₄₂ diminueraient le nombre de neurones seulement chez les souris n'exprimant pas la NL-1, et n'aurait aucun effet chez les souris WT après 4 jours d'injections chroniques. En somme, ces résultats appuient les résultats obtenus aux tests comportementaux, qui semblent démontrer que l'absence de NL-1, combiné à l'injection d'A β ₀₁₋₄₂, entraînerait un effet plus délétère de ceux-ci.

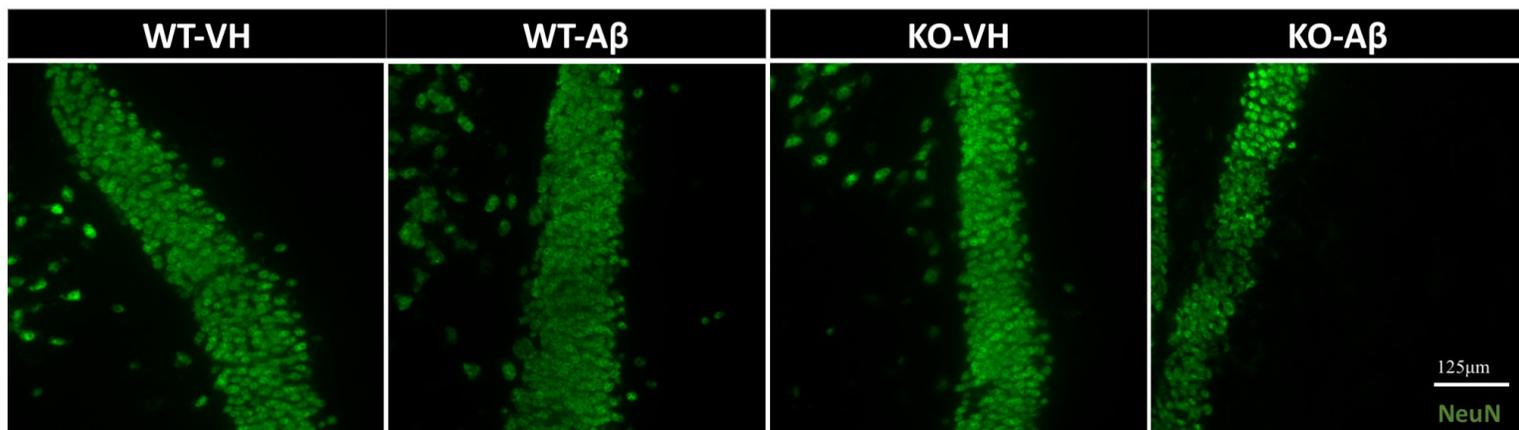
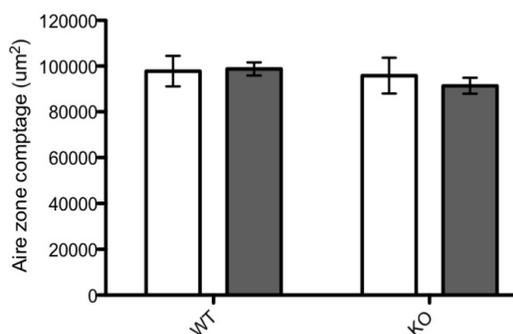
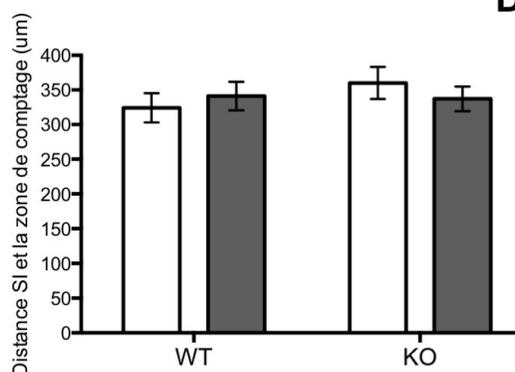
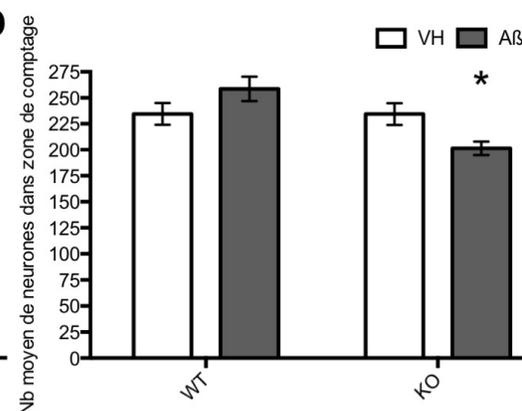
A**B****C****D**

Figure 14 : Comptage neuronal dans le GD après injections chroniques (A) Image de microscopie à grossissement 40X représentant un exemple pour chacun des groupes de l'emplacement dans le GD où le comptage a été effectué. Les tranches de cerveaux de 10 μm ont été marquées avec l'anticorps NeuN, marquant principalement le corps cellulaire des neurones, et un anticorps secondaire fluorescent, émettant à une longueur d'onde de 488 nm, permet l'observation en vert de ce marquage. **(B)** Aire de la zone de comptage en μm² pour les 4 groupes de souris. Les aires ne sont pas différentes entre les différents groupes. Effet génotype (WT ou KO) : $F_{1,19} = 0.62$, $p = 0.44$; Effet traitement (VH ou Aβ) : $F_{1,19} = 0.07$ $p = 0.79$; Interaction génotype vs traitement : $F_{1,19} = 0.19$, $p = 0.66$. **(C)** Distance approximative entre le site d'injection (SI) et la zone de comptage pour les 4 groupes de souris. La moyenne des distances est similaire entre chaque groupe. Effet génotype : $F_{1,19} = 0.6$, $p = 0.45$; Effet traitement: $F_{1,19} = 0.02$ $p = 0.89$; Interaction génotype vs traitement : $F_{1,19} = 0.92$, $p = 0.35$. **(D)** Nombre de neurones moyen dans la zone de comptage pour les 4 groupes de souris. Diminution significative du nombre de neurones exclusivement chez les souris KO Aβ comparativement aux 3 autres groupes. Interaction génotype vs traitement : $F_{1,20} = 8.1$, $p = 0.01$; WT VH vs KO Aβ $p = 0,02^*$; WT Aβ vs KO Aβ $p = 0,0016^{**}$; KO VH vs KO Aβ $p = 0,02^*$. N= 6 par groupe. Barre blanche = VH Barre grise = Aβ. Les barres d'erreurs correspondent à l'ESM.

Chapitre 5 : Discussion

5.1 Résumé des résultats

5.1.1 Objectif 1

Le premier objectif de ce projet de maîtrise a permis de montrer que les A β ₀₁₋₄₂ affectent la protéine d'adhésion post-synaptique NL-1 de plusieurs façons. Premièrement, les injections chroniques hippocampiques d'A β ₀₁₋₄₂ ont fait varier le niveau d'expression de plusieurs ensembles de sondes utilisées pour quantifier l'expression de *Nl-1* à 2 et 4 jours d'injections, mais n'ont eu aucun effet sur son niveau protéique. Chez les souris 3xTg, le niveau protéique de NL-1 chez les femelles était fortement diminué à 4 mois, mais pas chez les mâles. Une diminution globale du niveau de NL-1 avec l'âge, peu importe le génotype, a aussi été observée chez ces souris. Finalement, dans le modèle *in vitro*, une diminution du niveau protéique de NL-1 a été observée après 72h de traitements aux A β ₀₁₋₄₂, suivant la diminution de la viabilité cellulaire.

5.1.2 Objectif 2

Les résultats du deuxième objectif semblent supporter notre hypothèse stipulant que l'absence de la NL-1 pourrait potentialiser la toxicité des A β ₀₁₋₄₂. En effet, le groupe de souris NL-1 KO injectées aux A β ₀₁₋₄₂ ont obtenus les performances les plus faibles au test de reconnaissance spatiale d'objet de tous les groupes testés. Des résultats similaires ont aussi été obtenus au test de la piscine de Morris, lors de la phase d'entraînement, et une tendance lors de la phase test. Par contre, la mémoire de travail de ces souris n'a pas été affectée lorsque testée dans le labyrinthe en Y. Finalement, l'analyse histologique des cerveaux a permis de démontrer que la combinaison de l'absence de NL-1 et des injections d'A β ₀₁₋₄₂ entraîne une

diminution du nombre de neurones dans le GD sous le site d'injection, résultats appuyant les performances plus faibles de ce groupe aux tests de mémoire.

5.2 Effets des injections chroniques d'A β ₁₋₄₂ sur NL-1

Les injections hippocampiques chroniques d'A β ₁₋₄₂ ont été effectuées afin d'observer la progression de NL-1 à travers le temps, avec comme hypothèse que cette molécule serait affectée de façon précoce et progressive. Premièrement, l'expression de différents variants d'ARNm de *NL-1* a été modifiée par les injections lors des jours 2 et 4. L'expression des ensembles de sondes *NL-INA* et *C* a significativement augmentée au jour 2, tandis *NL-INA*, *NB* et *C* ont tous diminués au jour 4 (Fig. 6). Contrairement à notre hypothèse, c'est plutôt une augmentation précoce de certains transcrits de *NL-1* qui est observé après 2 jours d'injections. Cette augmentation pourrait résulter d'un mécanisme de défense cellulaire en réponse aux A β ₁₋₄₂, où les synapses augmenteraient la transcription de *NL-1* afin que celle-ci contribue à stabiliser le complexe synaptique, déstabilisé par l'A β ₁₋₄₂. Ce phénomène est observé chez le vers *C. Elegans* qui, en présence de toxines induisant un stress mitochondrial, vont se défendre en augmentant leurs niveaux d'ARNm et protéique de NL-1 (Staab, Evgrafov, Knowles, & Sieburth, 2014). Ce mécanisme neuroprotecteur endogène a aussi été observé pour les protéines PIAS1 et Mcl-1, dont la transcription est augmentée dans l'hippocampe en présence d'A β ₁₋₄₂ (Tao, Hsu, Ma, Cheng, & Lee, 2017). La poursuite des injections jusqu'à 4 jours induit une diminution d'expression de 3 ensembles de sondes de *NL-1*, résultats en accord avec notre hypothèse (Fig. 6). L'étude précédente de Bie. et al. avait démontré une diminution de l'ARNm en présence d'une forte dose d'A β ₁₋₄₀ fibrillaire, qui pouvait s'expliquer par une

modification de certains mécanismes épigénétiques (Voir section 1.4). Bien que cette étude n'a pas quantifié les différents variants de transcriptions de *Nl-1*, et que l'espèce d'A β injectée est différente, nos résultats semblent démontrer que l'A β ₀₁₋₄₂ a un effet similaire sur l'expression de plusieurs variants d'ARNm de *Nl-1*. Toutefois, il est impossible de dire si ce changement d'expression résulte d'une modification des mécanismes épigénétiques.

Globalement lors des jours 2 et 4 après l'injection d'A β ₀₁₋₄₂, il semble y avoir un effet bi-phasique des injections d'A β ₀₁₋₄₂ où, dans l'aiguë après deux jours d'injections, l'expression de *Nl-1* est rapidement augmentée par l'A β ₀₁₋₄₂, alors qu'à 4 jours, une augmentation d'expression est observée (Fig. 6). Cette variation bi-phasique confirme que l'A β ₀₁₋₄₂ affecte l'expression des différents variants de *Nl-1* différemment du VH dans notre modèle d'injections chroniques. Finalement, aucune variation d'expression n'est observée lors du 6^{ème} jour d'injections. Ceci semble être due au fait que l'expression de *Nl-1* des animaux injectés avec le VH semble aussi diminuée en comparaison au jour 4. Ce résultat est difficilement explicable, mais il est possible de penser que l'injection du VH ait affecté l'expression des différents transcrits de *Nl-1* entre les jours 4 et 6, ce qui pourrait potentiellement masquer un effet du traitement aux A β ₀₁₋₄₂ lors du jour 6. Ce type d'expression bi-phasique a été observé chez d'autres protéines synaptiques dans un modèle murin de la MA. En effet, les protéines gephyrin et VIAAT, ainsi que la sous-unité gamma-2 du récepteur GABA-A sont fortement exprimés chez les souris APP/PS1 de 1 à 3 mois, et diminue à 12 mois (Kiss et al., 2016). En somme, cette expression bi-phasique chez les souris injectées aux A β ₀₁₋₄₂ supporte notre hypothèse qui énonçait que l'ARNm de *Nl-1* serait affectée de façon rapide et progressive par les A β ₀₁₋₄₂.

La quantification de l'ARNm permet d'étudier comment réagissent les différents variants d'ARNm de *NL-1* aux injections chroniques. Comme expliqué à la section 1.3.1, NL-1 est présente sous 4 isoformes, dépendamment de la présence des inserts A ou B (Fig. 3). Les différentes fonctions de ces isoformes sont peu connues. Par contre, les inserts vont dicter la localisation et la nature de son interaction présynaptique avec les NRXNs (Boucard et al., 2005; Chih et al., 2006; Ichtchenko et al., 1996; Koehnke et al., 2010). La quantification par qPCR ne permet pas de distinguer formellement les différents isoformes de NL-1 due à la trop grande distance entre les inserts qui ne permet pas la construction d'amorces assez longue pour couvrir cette distance. Cependant, la présence ou l'absence d'un des inserts, indépendamment de l'autre, peut être quantifiée (Fig. 4). À la lumière des résultats obtenus, comme les ensembles d'amorces quantifiant la présence de l'un ou l'autre des inserts de NL-1 (*NL-1A* et *B*) n'ont pas été modifiés, et que les ensembles d'amorces quantifiant l'absence des inserts (*NL-1NB* et *NA*) ont tous les deux subi des modifications de leur expression similaire (Fig. 6), il est possible de penser que l'isoforme NL-1(-) serait le plus affecté par les injections chroniques d'A β ₀₁₋₄₂. L'isoforme sans insert de NL-1 a été démontré comme étant principalement présentes aux synapses GABAergique inhibitrices (Fig. 3) (Chih et al., 2006; Huang & Scheiffele, 2008). Connaissant les rôles de plus en plus émergent du système GABAergique dans la MA (Giovannetti & Fuhrmann, 2018; Li, Sun, et al., 2016; Villette & Dutar, 2017), il est possible que NL-1 soit impliquée dans les défaillances du système GABAergiques induites par la toxicité des A β ₀₁₋₄₂ aux synapses inhibitrices. Finalement, les injections d'A β ₀₁₋₄₂ semblent spécifiquement affecter *NL-1* puisque chez ces mêmes souris, l'expression d'autres molécules synaptiques, comme les ephrines et Eph, a été quantifiée (Annexe 2 – Figure supplémentaire 1) et aucune de celles-ci ont subi des changements

d'expressions significatifs à travers les différents jours d'injections. En somme, ces résultats démontrent que, comme le stipulait notre hypothèse, l'expression génique de *NL-1*, plus précisément la forme sans insert NL-1 (-), semble spécifiquement affectée par les injections chroniques hippocampique d'A β ₀₁₋₄₂, et ce de façon précoce et progressive, avec un patron d'expression bi-phasique.

Chez ces mêmes souris, l'hippocampe de l'autre hémisphère a été utilisé afin de quantifier les niveaux protéiques de NL-1 en réponse aux injections chroniques. Contrairement à notre hypothèse, l'injection d'A β ₀₁₋₄₂ n'a eu aucun effet significatif sur le niveau protéique de NL-1 à travers les différents jours d'injections (Fig. 7A-B). Ce résultat contraste avec les niveaux d'ARNm décrit plus tôt (Fig. 6). Cette différence d'expression entre l'ARNm et la protéine peut s'expliquer de plusieurs façons. Du point de vue moléculaire, ce phénomène est couramment observé, et peut révéler de dysfonction post-transcriptionnelle (Koussounadis, Langdon, Um, Harrison, & Smith, 2015; Schedel et al., 2004). Par exemple, une augmentation de la dégradation de l'ARNm, une dysfonction du système de traduction ou même une dégradation directe de la protéine peut être à la source de cette discordance entre les niveaux d'ARNm et de la protéine (Wang, 2008). Du point de vue technique, divers aspects peuvent expliquer cette différence. Premièrement, l'anticorps utilisé pour cibler NL-1 en Western blot ne permet pas de discriminer les différentes isoformes comme il est possible de faire pour les variants de transcription par qPCR. Ceci pourrait donc masquer un effet des injections d'A β ₀₁₋₄₂ sur le niveau de la protéine d'un ou plusieurs isoformes (Fig. 3). Aussi, un échantillonnage trop grand autour du site d'injection pourrait avoir eu pour effet de diluer l'effet local des A β ₀₁₋₄₂ sur la protéine NL-1. Pour y remédier, l'utilisation de coupe au cryostat permettrait de

mieux échantillonner le cerveau directement sous le site d'injection. Par ailleurs, l'extraction de protéines utilisée résulte en un échantillon des protéines totales. Il serait préférable d'extraire les protéines synaptiques, ou même post-synaptiques, afin d'observer spécifiquement l'effet des $A\beta_{0-42}$ sur NL-1 aux synapses, et non à d'autres endroits, comme sur les astrocytes (Stogsdill et al., 2017). Finalement, le faible nombre d'échantillons pourrait diminuer la puissance statistique, puisqu'une tendance à un patron d'expression similaire à l'ARNm semble être observé (Fig. 6B).

Les résultats obtenus pour cette expérience divergent avec ceux rapportés par Bie et al. qui démontrait une diminution du niveau protéique de NL-1 en présence d' $A\beta_{1-40}$ fibrillaire (Bie et al., 2014). Plusieurs différences sont à noter entre les deux études afin de mieux comprendre les résultats. Les principales distinctions sont le type d'injection (simple et chronique) ainsi que la concentration et le type d' $A\beta$ injecté, sans compter le modèle murin utilisé (souris et rat). Notre étude a utilisé les $A\beta_{0-42}$, contrairement aux $A\beta_{1-40}$ fibrillaire, puisque ceux-ci ont été identifiés comme étant les plus neurotoxiques et s'accumulent précocement dans la MA. Il est donc possible que les $A\beta_{0-42}$ aient un effet moins puissant sur cette protéine que les $A\beta_{1-40}$ fibrillaire. Aussi, l'injection simple d'une concentration élevée d' $A\beta_{1-40}$ fibrillaire de Bie et al. réplique moins fidèlement l'accumulation progressive d' $A\beta$ tel qu'observé dans la MA. Ces différences méthodologiques pourraient donc être à la source des divergences entre les deux études. Une poursuite des injections afin d'atteindre une concentration similaire d' $A\beta_{1-40}$ fibrillaire injectées dans l'étude précédente pourrait avoir pour effet de diminuer la protéine NL-1.

En somme, les résultats obtenus lors des injections chroniques hippocampiques d'A β ₀₁₋₄₂ ont partiellement confirmé notre hypothèse. En accord avec celle-ci, les niveaux d'ARNm de 3 ensembles d'amorces ciblant les variants de *NL-1* ont été modifiés précocement par les A β ₀₁₋₄₂, tandis que contrairement à notre hypothèse, le niveau protéique n'a pas été affecté. L'utilisation de la fraction protéique synaptique, d'un plus grand nombre d'animaux, ainsi que l'utilisation d'anticorps ciblant les isoformes de NL-1 permettrait de venir confirmer notre hypothèse en entier et affirmer que, tant l'ARNm que la protéine NL-1, sont affectées de façon précoce et progressive par les injections chroniques hippocampiques d'A β ₀₁₋₄₂.

5.3 Progression de NL-1 chez les souris 3xTg

Toujours dans l'hypothèse que NL-1 serait diminuée de façon précoce et progressive dans la MA, le niveau protéique de NL-1 a été quantifié dans l'hippocampe de souris 3xTg mâles et femelles ayant 4, 12 et 18 mois, afin d'observer la progression du niveau de la protéine à travers le temps. Les résultats ont démontré une diminution marquée de l'expression de NL-1 chez les femelles de 4 mois, mais aucun changement chez les mâles ou lorsque les deux sexes sont combinés (Fig. 7C à E). Cette diminution rapide à 4 mois chez les femelles est très intéressante puisqu'elle est observée avant l'apparition des premières plaques séniles à 6 mois dans ce modèle (Oddo et al., 2003). Cette diminution de NL-1 corrèle plutôt avec l'accumulation intracellulaire d'A β dans l'hippocampe, ainsi que les déficits de PLT et de rétention à long terme observé à la piscine de Morris (Billings et al., 2005; Oddo et al., 2003). Ceci pourrait donc signifier que la diminution de NL-1 serait un événement précoce survenant

en amont de l'apparition des plaques séniles, et que cette diminution pourrait être liée aux déficits de mémoire observés au même âge.

Cette diminution rapide à 4 mois du niveau protéique de NL-1 n'est pas observée chez les mâles. Cette différence entre les sexes pourrait être due à une compensation différente des autres NLs chez les femelles. En effet, deux membres de la famille de NLs sont encodés sur les chromosomes X, soit NL-3 et NL-4 (Vincent et al., 2004). En raison de la copie d'extra de ces gènes chez les femelles, il est possible qu'il y ait un mécanisme de compensation de ces deux NLs différent de chez les mâles. Effectivement, en présence d'A β , NL-3 ou -4 pourraient compenser pour la perte de NL-1 à la synapse de façon plus efficace et rapide que chez les mâles en raison de cette double copie du gène, ce qui résulterait en une diminution plus hâtive du niveau de NL-1 chez les femelles. Chez les mâles, cette compensation serait moindre et le système se régulerait en augmentant son expression de NL-1 pour retrouver le niveau basal. Ce type de compensation est observé chez les souris NL-1 KO qui expriment fortement la NL-3 (Dang et al., 2018), possiblement afin de compenser pour l'absence de NL-1 puisque ces deux protéines sont structurellement et fonctionnellement similaires (Chih et al., 2005; Ichtchenko et al., 1996). Cette hypothèse pourrait aussi apporter une piste concernant la prévalence de la MA plus élevée chez les femmes (Li & Singh, 2014), qui pourrait être due à un mécanisme de compensation similaire des NLs, ou de d'autres protéines ayant leur gène sur un des chromosomes sexuels.

Un autre résultat intéressant obtenu chez les souris 3xTg est la diminution du niveau de NL-1 avec l'âge. Effectivement, un effet d'âge significatif est observé en analysant seulement les mâles et lorsque les mâles et femelles sont combinés (Fig. 7E-F). De plus, une très forte tendance ($p=0,06$) est observé en ce sens chez les femelles. Cet effet d'âge démontre une diminution progressive de NL-1 à travers le temps, et ce indépendamment du génotype. À ce jour, aucune étude n'a caractérisé la progression de NL-1 dans le vieillissement normal, comme observé ici. Par contre, diverses études ont montré qu'il y a une détérioration synaptique graduelle avec l'âge (Bertoni-Freddari, Fattoretti, Casoli, Meier-Ruge, & Ulrich, 1990; Desbois, Cook, Emmons, & Bulow, 2015; Toth et al., 2012). Ceci pourrait sous-tendre à une diminution graduelle de NL-1 avec l'âge, qui pourrait faire en sorte de déstabiliser progressivement les synapses et les rendre plus vulnérables à certains phénomènes extérieurs, comme par exemple, l'accumulation d'A β . Les conditions pathologiques de la MA pourraient faire en sorte d'accélérer cette diminution progressive de NL-1, ce qui entraînerait les pertes synaptiques et neuronales beaucoup plus rapidement que lors du vieillissement normal. En somme, l'analyse du niveau protéique de NL-1 chez les souris 3xTg démontre une diminution rapide et marquée de NL-1 dans l'hippocampe des souris femelles seulement, phénomène pouvant possiblement être expliqué par une compensation des autres membres de la famille des NLs. Comme l'A β intracellulaire est déjà observable à 4 mois, il serait intéressant d'observer le niveau protéique de NL-1 à un âge encore plus précoce (2-3 mois) chez ce modèle. Ceci permettrait de confirmer que NL-1 est affectée de façon précoce par les A β et ce, avant même la détection des premières traces d'accumulation d'A β dans le cerveau.

5.4 Effets des A β ₁₋₄₂ sur NL-1 dans le modèle *in vitro*

Un troisième et dernier modèle a été utilisé afin de tester notre première hypothèse. Ce modèle *in vitro* utilise des cultures de neurones primaires d'hippocampe qui sont traitées aux A β ₁₋₄₂ selon différents temps et différentes doses. Afin de pouvoir déterminer si la diminution de NL-1 précède la mort neuronale comme stipulé dans notre hypothèse, 3 paramètres ont dû être déterminés soit, le temps en culture avant l'administration du traitement, la dose et le temps optimal de traitement aux A β ₁₋₄₂. Premièrement, de 13 à 16 jours après la mise en culture des cellules, le niveau de NL-1 semble augmenter progressivement (Fig. 8A-B). Cette augmentation progressive pourrait s'expliquer par l'augmentation de la formation des connections synaptiques entre les neurones qui est accélérée à ces temps en culture. De plus, les A β ₁₋₄₂ ne semblent pas avoir d'effet sur l'expression de NL-1 à ces temps. Afin de remédier à cela, nous avons décidé de faire les traitements à 7 jours après la mise en culture, comme ce qui a été effectué par Brouillette et al., où il a été démontré que les A β ₁₋₄₂ ont un effet neurotoxique (Brouillette et al., 2012). Les autres paramètres importants à déterminer sont la dose et le temps du traitement à administrer, et suite aux résultats obtenus, la dose optimale choisie pour quantifier la progression de NL-1 est de 2 μ M d'A β ₁₋₄₂.

Le niveau protéique de NL-1 a donc été mesuré à 48h après l'application des A β ₁₋₄₂, où aucune mort neuronale n'est observée, et à 72h, avec l'hypothèse que le niveau protéique serait diminué dès 48h. Les résultats obtenus sont contraires à l'hypothèse, puisque le niveau de NL-1 est diminué à 72h, mais pas à 48h (Fig. 8F). On observe donc que la diminution de viabilité des cellules et le niveau protéique de NL-1 diminuent simultanément. Cette

diminution du niveau de NL-1 en présence d'A β ₁₋₄₂ supporte les résultats obtenus précédemment dans un modèle *in vivo* (Bie et al., 2014), mais surtout ceux *in vitro* rapportant aussi une diminution du niveau protéique et de l'ARNm de NL-1 en culture de neurones primaires après un traitement de 2 μ M de peptides A β ₁₋₄₂ (Kim et al., 2018). Il est toutefois à noter que cette diminution protéique de NL-1 pourrait être expliquée par une diminution du nombre de synapses et de neurones engendrée par la toxicité des A β ₁₋₄₂, et non par une modification des mécanismes épigénétiques (Bie et al., 2014). Dans tous les cas, cette diminution du niveau protéique de NL-1 apporte une autre évidence que cette molécule est affectée par les A β ₁₋₄₂, et ceci pourrait apporter une nouvelle piste concernant l'implication des A β ₁₋₄₂ dans les pertes synaptiques. NL-1 s'ajoute donc à plusieurs autres protéines affectées par les A β en culture de neurones primaires. Du lot, on compte les protéines synaptiques PSD-95, synapsine-1 et spinophilline ainsi que la sous-unité NR2B des NMDAR dont leur expression protéique est diminuée en présence d'A β (Brouillette et al., 2012; Jin & Selkoe, 2015). À l'inverse, certaines protéines pro-apoptotiques comme la Caspase-3 et BAX voient leur expression grandement augmentée, ce qui témoigne de l'activation des processus d'apoptose induit par l'A β (Brouillette et al., 2012; Hu et al., 2015). Ceci apporte un argument supplémentaire indiquant que NL-1 est bel et bien impliquée dans les processus de dégénérescence synaptiques et neuronales induites par les A β ₁₋₄₂ dans ce modèle *in vitro*.

Un autre aspect intéressant de nos résultats est que le niveau de NL-1 ne semble pas être affecté par les A β ₁₋₄₂ lorsque ceux-ci sont traités après un plus long temps de mise en culture (13 à 16 jours) et traités dans les mêmes conditions. Comme le niveau d'expression de NL-1 semble augmenter progressivement avec le temps, il est possible que cette augmentation

joue un rôle neuroprotecteur en atténuant la toxicité des A β ₁₋₄₂ (Dinamarca et al., 2015). En effet, il a été démontré que le fragment soluble de NL-1, généré par le clivage de la protéine, cible et séquestre les A β ₁₋₄₂ pour potentiellement atténuer leur toxicité. Un niveau d'expression de NL-1 plus élevé pourrait donc possiblement protéger davantage contre la toxicité des A β ₁₋₄₂, empêchant ainsi la diminution du niveau protéique de NL-1 et les pertes neuronales subséquentes.

De plus, nous avons observé que la diminution protéique de NL-1 ne semble pas être un événement en amont de la neurodégénérescence, mais semble plutôt suivre celle-ci. Puisque qu'une diminution de la viabilité des cellules est observée à 72h mais pas à 48h de traitement des A β ₁₋₄₂, il serait intéressant d'aussi déterminer le niveau protéique de NL-1 à d'autres temps intermédiaires, par exemple 54 et 60h, afin de connaître plus précisément le moment où le niveau de NL-1 est affecté dans le processus de neurodégénérescence. De plus, comme pour les études *in vivo*, il serait intéressant de quantifier le niveau de NL-1 seulement aux synapses, ce qui pourrait apporter des résultats différents et plus spécifique.

Finalement, il est possible que les A β ₁₋₄₂ soient capables d'induire des modifications sur NL-1 qui n'ont pas été analysées dans le contexte de la présente étude, n'y des précédentes. Par exemple, une augmentation du clivage de NL-1 pourrait être engendrée en présence d'A β ₁₋₄₂, phénomènes observés lors d'une activité neuronale soutenue et lors d'activité épileptique (Peixoto et al., 2012; Suzuki et al., 2012). Ce clivage résulterait en la relâche du fragment NL-1s dans le milieu extracellulaire, ce qui aurait pour effet de

déstabiliser l'interaction avec la pré-synapse, diminuer la force synaptique, le remodelage et la formation d'épines dendritiques (Peixoto et al., 2012; Suzuki et al., 2012). Dans la MA, un des phénomènes induit par l'A β est la surstimulation des neurones induite par la dérégulation de certains récepteurs à la post-synapse, qui résulte en une excitotoxicité (voir section 1.2.3) (Ong, Tanaka, Dawe, Ittner, & Farooqui, 2013). Cette surstimulation neuronale pourrait donc s'apparenter à une activité neuronale soutenue, qui a été démontré comme provoquant un relâche accrue de NL-1s (Peixoto et al., 2012). Bien que ceci reste à être testé, il est probable que par ce mécanisme de surstimulation, l'A β provoque une augmentation du clivage de NL-1 résultant en une augmentation de la relâche du fragment soluble de la protéine en circulation.

L'augmentation des processus de clivage de NL-1 en présence d'A β ₀₁₋₄₂ pourraient être étudié *in vitro* en quantifiant NL-1s dans le milieu de culture (Suzuki et al., 2012). Ceci a été tenté dans le cadre de cette étude par Western blot, mais la technique n'était pas assez sensible. Des modifications dans l'extraction protéique, ou l'utilisation d'une technique alternative comme la chromatographie en phase liquide à haute performance pourrait permettre de pallier au manque de sensibilité et détecter NL-1s dans le milieu de culture des cellules (Brito-Moreira et al., 2011; Polazzi et al., 2015). Si la relâche de ce fragment NL-1s est augmentée dans ces conditions, ceci pourrait sous-tendre un mécanisme neuroprotecteur endogène des neurones face aux A β ₀₁₋₄₂, puisque ce fragment a été identifié comme atténuant l'effet toxique de ces oligomères sur les pertes synaptiques et neuronales (Dinamarca et al., 2015). De plus, si ce clivage induit par les A β ₀₁₋₄₂ est un événement précoce, la libération de NL-1s en circulation dans le LCR, ou même le sang, pourrait être utilisé comme biomarqueur précoce de la MA. Ce marqueur pourrait être quantifié de routine dans le sang, et une

augmentation de sa présence en circulation indiquerait un risque accru de développer la MA. En somme, les résultats obtenus dans notre modèle *in vitro* démontrent que NL-1 est diminuée en présence des A β ₀₁₋₄₂, et que cette diminution s'observe au même moment que la diminution de viabilité des neurones, et non en amont de celle-ci. Ces résultats appuient donc ceux que nous avons obtenus dans les modèles *in vivo*, où une modification de l'expression de l'ARNm suite aux injections chroniques, ainsi que de la protéine NL-1 chez les 3xTg, sont observées, ce qui confirme l'impact des A β ₀₁₋₄₂ sur NL-1.

Pour conclure l'objectif 1, les trois modèles présentés dans cette étude (injections chroniques hippocampique d'A β ₀₁₋₄₂, 3xTg et culture de neurones primaires) ont tous démontré des modifications dans l'expression de NL-1, confirmant ainsi en partie notre hypothèse. Par contre, d'autres études devront être effectuées afin de confirmer que le niveau protéique de NL-1 est affectée de façon précoce par les A β ₀₁₋₄₂ dans notre modèle d'injections chroniques d'A β ₀₁₋₄₂, et en culture de neurones primaires. Ceci renforcerait l'idée que NL-1 puisse agir de cible thérapeutique aux stades précoces de la MA. Comme NL-1 joue un rôle dans le maintien de l'intégrité des synapses, la diminution de son expression pourrait entraîner des dysfonctionnements et pertes synaptiques, deux corrélats prédisant le mieux le déclin cognitif chez les patients souffrant de la MA. Cibler NL-1 et stabiliser sa présence aux synapses pourrait potentiellement être un traitement efficace aux stades précoces de la MA. De plus, la détection de NL-1s pourrait potentiellement être développée comme le premier biomarqueur précoce de la MA. Il permettrait un dépistage rapide et spécifique de la maladie, afin d'entamer le traitement des patients le plus rapidement possible, dans l'espoir de ralentir ou stopper la progression de la maladie avant que celle-ci ne deviennent trop handicapante.

5.5 Effet synergique de l'absence de NL-1 et des A β ₁₋₄₂

Le deuxième objectif de ce projet consistait à vérifier l'effet synergique de l'absence de NL-1 et des A β ₁₋₄₂ sur les performances aux tests de mémoire ainsi que sur les pertes neuronales. L'hypothèse est que ces deux facteurs combinés auront un effet plus considérable sur les variables analysées. Pour s'y faire, des souris WT ou KO pour NL-1 ont été injectées chroniquement durant 4 jours aux A β ₁₋₄₂ ou au VH (A β _{Scr}), et ont passé une batterie de tests de mémoire, avant qu'un comptage neuronal *post-mortem* dans le GD de l'hippocampe soit effectué. Les 4 jours d'injections effectuées dans cette étude permettent d'obtenir une dose plus faible d'A β ₁₋₄₂ que la dose de 6 jours d'injections chroniques précédemment démontrée comme induisant une neurodégénérescence marquée dans l'hippocampe et des déficits de mémoire chez les souris WT (Brouillette et al., 2012). Ce protocole d'injection de 4 jours a donc été utilisé afin de déterminer si l'absence de NL-1 avait des effets précoces et synergiques sur le processus de neurodégénérescence et les déficits de mémoire spatiale induit par les A β ₁₋₄₂.

5.5.1 Mémoire spatiale

Le test de la RSO a été utilisé puisqu'il implique la mémoire spatiale qui est dépendante de l'hippocampe, région ciblée par les injections (Best, White, & Minai, 2001; Karlsson & Frank, 2008). Ce test est parfois utilisé avec les modèles murins transgéniques de la MA afin d'attester les déficits de mémoire spatiale. Par exemple, les souris 3xTg performant significativement moins bien lors de ce test que les souris sauvages dès 6 mois d'âge (Davis, Easton, Eacott, & Gigg, 2013; Mann et al., 2018), phénotype aussi observé chez les souris

double transgénique APP/PS1 (Hoeijmakers et al., 2018; Sierksma et al., 2014). Par contre, l'utilisation de modèles transgéniques ne permet pas de savoir de quelle région du cerveau génère ce déficit, ainsi que si celui-ci est entraîné par l'accumulation d'A β , ou de d'autres protéines pathologiques, comme la protéine Tau, aussi présente dans ces modèles (Oddo et al., 2003; Porquet et al., 2015). Le modèle d'injections chroniques utilisé dans cette étude permettra de savoir spécifiquement si l'hippocampe est impliquée dans les déficits de mémoire spatiale, et si ce sont les A β ₀₁₋₄₂ qui en sont responsable.

Les résultats de notre étude lors de ce test démontrent qu'uniquement le groupe KO A β a moins interagit avec l'objet déplacé lors de la deuxième journée d'exploration (Fig. 10B-C). Tous les autres groupes ont interagit un plus grand nombre de fois avec l'objet mobile, ce qui confirme la validité du test pour ces groupes. Similairement, les souris KO A β ont passé moins de temps à interagir avec l'objet mobile que les souris des deux génotypes injectées au VH, et une forte tendance est aussi observé avec le groupe WT A β ($p=0,07$) (Fig. 10D-E).

Premièrement, l'absence de NL-1 chez les souris KO ne semble pas affecter les performances lors de ce test, puisque les groupes KO VH et WT VH ont performé de façon similaire. Comme ce test n'a jamais été effectué chez ce modèle de souris mutante, ces résultats permettent donc d'affirmer que l'absence de NL-1 n'affecte pas la mémoire spatiale lors du test de la RSO. Ces résultats supposent également que seul le groupe KO A β démontre des déficits de mémoire spatiale lors du test de la RSO. Ce déficit semble illustrer que la dose d'A β ₀₁₋₄₂ administrée dans l'hippocampe s'avère insuffisante pour induire des déficits de

mémoire spatiale chez les souris WT. Très peu d'études ont démontrées l'effet d'injections hippocampiques chroniques sur les performances au test de la RSO. Le modèle d'injection intracérébral le plus couramment utilisé consiste en une seule injection intracerebroventriculaire d'une forte dose d'A β . Chez ce modèle, plusieurs études montrent que les souris ont des déficits de mémoire spatiale au test de la RSO après l'injections de peptides A β_{1-42} (Han et al., 2013; Jiang, He, Peng, Jin, Wang, Han, et al., 2015; Jiang, He, Peng, Jin, Wang, Mu, et al., 2015; Zhang, Xu, et al., 2015). Comme pour les modèles transgénique, ce modèle ne permet pas de savoir spécifiquement si l'hippocampe est responsable des déficits de mémoire spatiale observés, puisque l'injection intracerebroventriculaire diffuse à plusieurs structures du cerveau (Kim, Lee, Chung, Kim, & Kim, 2016). Cependant, une étude a démontré qu'en injectant l'A β_{1-42} directement dans l'hippocampe, les mêmes déficits étaient obtenus au test de la RSO qu'avec une injection intracerebroventriculaire (Zhang, Xu, et al., 2015). Ceci pourrait donc impliquer que c'est l'action de l'A β_{1-42} spécifiquement dans l'hippocampe qui serait responsable des déficits de mémoire spatiale.

Contrairement à ces études, nos résultats démontrent que les souris WT n'ont pas de déficits de mémoire spatiale après 4 jours d'injections hippocampiques chroniques d'A β_{1-42} . Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la dose unique injectée dans les ventricules ou dans l'hippocampe est beaucoup plus élevée que la dose injectée de façon chronique dans notre étude. Par contre, comme stipulé dans notre hypothèse, l'absence de NL-1 chez les souris KO semble potentialiser la toxicité de cette faible dose d'A β_{1-42} , résultant en une diminution des performances au test de la RSO uniquement chez ce groupe. En somme, la faible dose d'A β_{1-42} .

$A\beta_{1-42}$ injecté chroniquement dans l'hippocampe n'affecte pas les souris WT, comme le fait une injection unique intracerebroventriculaire. Par contre, l'injection chronique permet une meilleure sensibilité afin d'observer l'effet synergique des $A\beta_{1-42}$ et de l'absence de NL-1 sur les déficits de mémoire spatiale lors du test de la RSO.

Un autre test mesurant les capacités mnésiques spatiales effectué est la piscine de Morris. Ce test se déroule en deux phases, où dans la première, les souris doivent faire un apprentissage progressif sur 4 jours. Dans notre étude, les 4 groupes de souris semblent avoir un apprentissage normal et au même rythme, puisque le temps de latence et la distance jusqu'à la plateforme diminue de façon similaire et progressive à travers les 4 jours d'entraînement (Fig. 12B-C). Ceci indiquerait qu'aucun groupe ne semble avoir des déficits d'apprentissage lors de ce test, peu importe le génotype ou le traitement administré.

Premièrement, ces résultats concordent avec ceux obtenus chez les souris NL-1 KO qui stipulent que l'absence de cette protéine résulte en un apprentissage normal lors de la phase d'entraînement à la piscine de Morris (Blundell et al., 2010). Cependant, plusieurs études démontrent que l'injection intra-hippocampique d' $A\beta_{1-42}$ entraîne des déficits lors de la phase d'apprentissage de la piscine de Morris (Sun, Qi, & Gao, 2018; Wang, Li, Ni, & Song, 2017; Zamani, Parviz, Roghani, & Mohseni-Moghaddam, 2018), ce qui diverge des résultats obtenus dans notre étude. Comme pour le test de la RSO ces études utilisent toutes une seule injection d'une forte dose d' $A\beta_{1-42}$, ce qui reproduit moins fidèlement l'accumulation progressive d' $A\beta$ observée au stade préclinique de la MA, comme il est possible de faire avec les injections

chroniques. Il est donc possible que la dose injectée après 4 jours d'injections chroniques ne soit pas assez puissante afin d'induire ces déficits d'apprentissage, et expliquerait les divergences entre les études présentées ici et la nôtre. Cependant, l'analyse avancée du premier essai de chaque jour dénote un temps de latence significativement plus élevé chez les deux groupes ayant été injectés aux $A\beta_{01-42}$ lors du troisième jour d'apprentissage. L'analyse du premier essai rapporte les déficits de rétention de la mémoire, puisqu'il y a presque 24h entre le dernier essai du jour précédent et le premier du jour suivant (Billings et al., 2005). Cet effet subtil de l' $A\beta_{01-42}$ est en accord avec la littérature, où l'apparition des premiers signes de déficits d'apprentissage induit par l'injection hippocampique d' $A\beta_{1-42}$ se fait majoritairement lors des jours 3 ou 4 de la piscine de Morris (Sun et al., 2018; Wang et al., 2017).

Un autre résultat intéressant est obtenu lorsque tous les essais de chaque jour sont comparés entre eux. Une interaction significative entre les variables traitements et génotypes est observée et lorsque décortiquée, cette interaction indique que le groupe NL-1 KO injecté aux $A\beta_{01-42}$ a un temps de latence globale plus élevé que les trois autres groupes (Fig. 12F). Cet effet global de la latence plus élevée chez le groupe KO $A\beta$, pourrait indiquer certains problèmes d'apprentissage induit par l' $A\beta_{01-42}$ à la piscine de Morris, exclusivement chez ce groupe. Ceci semble indiquer que, comme lors du test de la RSO, l'effet de la faible dose d' $A\beta_{01-42}$ injectée dans l'hippocampe est potentialisé par l'absence de NL-1, et induit des déficits d'apprentissage similaire à une injection hippocampique simple d'une forte dose, comme rapporté dans plusieurs études (Sun et al., 2018; Wang et al., 2017; Zamani et al., 2018). En somme, bien qu'à première vue les résultats semblent indiquer un apprentissage normal chez les 4 groupes de souris, une analyse plus poussée des résultats démontre des

déficits de rétention induit par les $A\beta_{01-42}$ au jour 3. Également, comme le stipule notre hypothèse, un effet synergique de l'absence de NL-1 et des $A\beta_{01-42}$ semble nuire à l'apprentissage des souris lorsque la latence globale est analysée, ce qui suppose une toxicité accrue des $A\beta_{01-42}$ chez ce groupe.

La seconde phase de la piscine de Morris permet de tester si les souris ont bien mémorisées l'emplacement de la plateforme après la phase d'entraînement. Lors de cette phase, la plateforme est retirée de la piscine, et le nombres de passages dans la zone plateforme, ainsi que le temps passé dans chaque cadrans sont mesurés. Premièrement, les souris injectées aux $A\beta_{01-42}$, peu importe leur génotype, démontrent une diminution du nombres de passages à travers la zone où était la plateforme, en comparaison avec les souris injectées avec le VH (Fig. 13B). Bien que cet effet ne soit pas spécifique à un seul groupe, ces résultats illustrent que les $A\beta_{01-42}$ entraînent des déficits de mémoire spatiale, qui se manifestent en une diminution du nombre de passage à travers la zone plateforme, comme rapporté dans d'autres études ayant effectuée une injections simple d' $A\beta_{1-42}$ dans l'hippocampe (Tang et al., 2014; Zhang, Hu, Wu, Zhang, & Zhang, 2015).

Par la suite, l'analyse du temps passé dans les différents cadrans lors de la phase test indique aucune différence significative entre les 4 groupes, malgré que le groupe KO $A\beta$ semble passer moins de temps dans le cadran cible que les autres groupes (Fig. 13C). De plus, les groupes injectés au VH passent significativement plus de temps dans le cadran cible que le seuil du 25% de chance, ce qui témoigne d'un certain apprentissage pour ces 2 groupes, et

confirme la validité du test. Ce résultat semble diverger avec la littérature, où les souris NL-1 KO ont démontré des déficits lors de la phase test de la piscine de Morris en n'ayant pas de préférence pour le cadran cible (Blundell et al., 2010). Ce paradoxe entre les deux études pourrait être dû à une méthodologie différente pour le même test. En effet, l'étude précédente a effectué une phase d'entraînement différente avec 4 essais par jours pour 11 jours, et un intervalle d'une minute entre chaque essai (Blundell et al., 2010).

Comme observé précédemment, les deux groupes injectés aux A β ₁₋₄₂ ont moins bien performés lors de la phase test, démontré par un effet simple significatif du traitement, et ont obtenu un pourcentage de temps dans le cadran cible au seuil du 25% de chance. Ceci démontre que les injections d'A β ₁₋₄₂ affectent les performances à la piscine de Morris chez les groupes WT A β et KO A β , sans avoir un effet exacerbant sur un de ceux-ci. Ces résultats concordent de nouveau avec la littérature, où plusieurs études ont montrées que l'injection d'A β ₁₋₄₂ dans l'hippocampe affecte grandement la capacité des souris à discriminer le cadran cible des autres cadrans (Sun et al., 2018; Tang et al., 2014; Wang et al., 2017; Zamani et al., 2018). Ceci confirme donc que l'hippocampe semble être une structure essentielle pour le maintien des fonctions cognitives lors du test de la piscine de Morris, et que l'accumulation d'A β est suffisante pour induire ces déficits. Plus précisément, c'est la forme oligomérique soluble de l'A β ₁₋₄₂ qui semble la plus toxique, puisque l'injection hippocampale de la forme fibrillaire n'entraîne pas de déficits lors de la phase test (Borbely et al., 2014). Finalement, même si aucun résultats significatifs démontrent ceci, il semble y avoir une tendance indiquant que le groupe KO A β performe moins bien que les autres groupes lors de la phase test. En augmentant le nombre d'animaux de chaque groupe, il est possible qu'une interaction

significative démontrerait que le groupe KO A β a moins bien performé lors de la phase test, ce qui appuierait les résultats obtenus lors de la phase d'entraînement, et au test de la RSO.

Un facteur confondant qui pourrait entrer en cause lors de la piscine de Morris est l'effet anxiogène que ce test engendre chez les souris, qui peut être observé par une augmentation plasmatique de corticostérone, et des changements d'expression de certains récepteurs de glucocorticoïdes (Aguilar-Valles et al., 2005; Harrison, Hosseini, & McDonald, 2009). Cette réponse anxiogène est générée en partie par l'amygdale, qui est impliquée dans les processus de mémoire lors de la piscine de Morris (Adhikari et al., 2015; Hadad-Ophir, Albrecht, Stork, & Richter-Levin, 2014; Maldonado, Espejo, Martijena, & Molina, 2014). Comme les injections d'A β ₀₁₋₄₂ ciblent seulement l'hippocampe, il est possible que l'amygdale puisse participer et renforcer les processus mnésiques à la piscine de Morris, venant ainsi diminuer la sensibilité de ce test comparé à la RSO qui est moins anxiogène. Ce phénomène pourrait donc venir masquer l'effet synergique entre les A β ₀₁₋₄₂ et l'absence de NL-1, comme observé dans le test de la RSO. Afin d'éviter l'implication de l'amygdale, l'utilisation de test au sol, et non dans l'eau, qui sont moins anxiogène serait à prioriser, comme par exemple, le labyrinthe de Barnes (Harrison et al., 2009). En résumé, la piscine de Morris a permis d'observer que l'injection d'A β ₀₁₋₄₂ induit des déficits de mémoire lors des deux phases de ce test, et que les souris KO A β semblent spécifiquement plus affectées lors de la phase d'entraînement, mais pas lors de la phase test. Dû aux facteurs anxiogènes et de l'implication de l'amygdale à la piscine de Morris, il est possible de conclure que le test de la RSO s'avère plus sensible dans notre étude afin d'observer l'effet plus puissant et synergique existant entre les A β ₀₁₋₄₂ et l'absence de NL-1 sur les déficits de mémoire spatiale.

5.5.2 Mémoire de travail

Les souris ont aussi été testées au labyrinthe en Y, test impliquant majoritairement la mémoire de travail (Dudchenko, 2004; Wolf et al., 2016). Ce test peut être analysé en tenant compte de l'entièreté des 5 minutes, ou seulement les 2 premières minutes. Lors des 5 minutes, seul le groupe KO VH n'a pas plus exploré le nouveau bras de manière significative comme attendu (Fig. 11B). Ce résultat s'explique difficilement compte tenu du fait que les souris du même génotype, mais injectées aux A β ₀₁₋₄₂, ont exploré d'avantage le nouveau bras, alors que le contraire pourrait être attendu. C'est pourquoi il est possible d'analyser les 2 premières minutes d'exploration afin d'observer la réaction à la nouveauté de manière plus sensible et sur un plus court laps de temps, puisque les souris tendent à se désintéresser du nouveau bras rapidement, et à explorer de moins en moins le labyrinthe plus le temps avance. Avec cette analyse, les 4 groupes ont significativement explorés le nouveau bras plus longtemps que les autres bras (Fig. 11C).

À première vue, ces résultats sont contraire à notre hypothèse, puisqu'aucun groupes a obtenus de plus faibles performances lors de ce test. Cependant, ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que ce test implique la mémoire de travail qui est principalement contrôlée par le cortex préfrontal (Bai et al., 2012; Liu et al., 2014; Yang et al., 2014). Comme les injections effectuées ciblent exclusivement l'hippocampe, région moins impliquée dans les processus cognitifs requis pour ce test, il est donc logique qu'aucun déficits ne soit observés chez les 4 groupes. Par contre, il a été démontré que dans ce même modèle d'injections chroniques que 6 jours d'injections induisaient des déficits de mémoire lors de ce test (Brouillette et al., 2012). Des résultats similaires sont aussi obtenus lors d'une injection simple

d'une forte dose d'A β ₁₋₄₂ dans l'hippocampe (Bahaeddin, Yans, Khodaghali, Hajimehdipoor, & Sahranavard, 2017; P. He et al., 2013; Tang et al., 2014). Ceci supporte le choix de 4 jours d'injections comme étant une dose d'intermédiaire d'A β ₁₋₄₂ n'affectant pas la mémoire de travail. Ceci démontre aussi la validité de ce modèle afin d'illustrer la progression de l'effet des A β ₁₋₄₂ qui, après 6 jours d'injections chroniques ou lors d'une injection d'une forte dose, semble se propager et affecter différentes régions et réseaux neuronaux du cerveau que ceux directement ciblés par les injections. La propagation de la forte dose d'A β ₁₋₄₂ du site d'injection dans l'hippocampe aux différentes structures impliquées dans la mémoire de travail pourrait se faire selon un mécanisme de transmission cellule à cellule par transport axonal (He et al., 2018; Nath et al., 2012; Song et al., 2014). De plus, comparativement aux peptides monomériques d'A β ₁₋₄₂, les A β ₁₋₄₂ semblent se propager plus efficacement et entraînent une augmentation plus marquée des processus apoptotiques dans les régions interconnectées du cerveau (He et al., 2018). Ce phénomène de propagation est aussi observé chez la protéine Tau (Mohamed, Herrou, Plouffe, Piperno, & Leclerc, 2013), et dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou d'Huntington (Brundin, Melki, & Kopito, 2010).

En somme, les performances préservées de tous les groupes lors du test du labyrinthe en Y permettent de confirmer l'effet localisé des injections d'une dose intermédiaire d'A β ₁₋₄₂ dans l'hippocampe. Comme décrit précédemment, le test de la RSO permettrait une plus grande sensibilité pour voir l'effet des A β ₁₋₄₂ dans l'hippocampe, dû à l'implication de cette région dans la mémoire spatiale (Best et al., 2001; Karlsson & Frank, 2008).

5.5.3 Pertes neuronales

Afin d'apporter une piste de réponse moléculaire aux résultats obtenus lors des tests de mémoire, un comptage cellulaire dans le GD de l'hippocampe a été effectué. Le comptage a été effectué dans la couche granulaire du GD puisque le site d'injection est situé au-dessus de celle-ci, et avec le flux du liquide lors des injections, c'est cette structure qui est la plus susceptible d'être affectée par les A β ₀₁₋₄₂ (Fig. 9). Effectivement, après 6 jours d'injections chroniques, il a été démontré que les A β ₀₁₋₄₂ induisaient une mort neuronale importante et une augmentation de l'activation de la caspase-3 dans le GD (Brouillette et al., 2012). Des zones similaires pour chaque groupe ont donc été déterminées dans le GD, à une distance similaire sous le site d'injection afin d'effectuer un comptage neuronale en IF de coupes de cerveau marquées avec l'anticorps NeuN (Fig. 5 et 14B-C). En accord avec notre hypothèse, le comptage neuronal démontre une diminution du nombre de neurones exclusivement chez le groupe KO A β (Fig. 14D). Ces résultats appuient ceux des tests de la reconnaissance spatiale d'objets et de la piscine de Morris, auxquels les souris NL-1 KO injectées aux A β ₀₁₋₄₂ ont obtenus de plus faibles performances que tous les autres groupes. Ces déficits de mémoire pourraient donc être engendrés par cette diminution neuronale au niveau du GD, causée par la toxicité accrue des A β ₀₁₋₄₂ lorsque NL-1 n'est pas exprimée.

Bien qu'il soit possible de penser que cette diminution de neurones résulte d'une mort neuronale accrue, le comptage des neurones grâce au marquage de la protéine NeuN ne permet pas d'affirmer ceci avec certitude. Pour quantifier la mort neuronale, un marquage de la caspase-3 clivée, forme activée de la protéine, ainsi qu'une coloration au fluoro Jade-B, marquant les neurones en dégénérescence, permettrait de plus fidèlement observer l'activation

des processus de mort neuronale dans ce modèle d'injections chroniques (Brouillette et al., 2012; Schmued & Hopkins, 2000). Un autre point important à noter est l'absence de diminution du nombre de neurones dans le GD des souris WT injectée aux A β ₀₁₋₄₂. Ce résultat apporte une confirmation supplémentaire qu'une injection chronique de 4 jours constitue une dose intermédiaire d'A β ₀₁₋₄₂ qui ne semble pas entraîner de diminution neuronale, comme observée après 6 jours d'injections (Brouillette et al., 2012), où par l'injection simple d'une forte dose A β ₀₁₋₄₂ (Wang et al., 2017; Zamani et al., 2018). Encore une fois, ceci permet d'appuyer davantage l'hypothèse que l'absence de NL-1 potentialise l'effet des A β ₀₁₋₄₂ puisque cette dose intermédiaire de 4 jours d'injections affecte les souris NL-1 KO, mais pas les souris exprimant la protéine.

Bien que ceci reste à être évalué, diverses raisons pourraient expliquer l'effet plus puissant des A β ₀₁₋₄₂ en absence de NL-1. Premièrement, l'absence de NL-1 à la post-synapse résulte en une efficacité moindre de la transmission et de la force des synapses (Chanda et al., 2017; Zeidan & Ziv, 2012) qui, additionné à la toxicité des A β ₀₁₋₄₂, pourrait faire en sorte que les synapses et neurones soient plus vulnérables. Ceci résulterait donc en une augmentation de la mort neuronale et des processus de neurodégénérescence induits par les A β ₀₁₋₄₂. De plus, il a été démontré que l'absence de NL-1 affecte les processus de PLT dans le CA1 et le GD (Budreck et al., 2013; Jedlicka et al., 2015; Shipman & Nicoll, 2012), tout comme l'accumulation d'A β dans l'hippocampe (Yamin, 2009). La combinaison de ces deux phénomènes pourrait entraîner une accélération des processus de neurodégénérescence générés par ces dysfonctions synaptiques (Rowan, Klyubin, Cullen, & Anwyl, 2003). Afin de tester ceci, il serait intéressant de regarder certains marqueurs synaptiques dans notre modèle

d'injections chroniques, comme les protéines PSD-95 ou synaptophysine, souvent utilisées afin de quantifier les pertes synaptiques en réponse aux A β o (Tu, Okamoto, Lipton, & Xu, 2014; Wang et al., 2016; Yuki et al., 2014). Ceci permettrait d'observer spécifiquement la possible accélération de dysfonctions synaptiques engendrées par la combinaison des A β o₁₋₄₂ et de l'absence de NL-1.

Une autre explication possible pourrait impliquer l'effet neuroprotecteur de NL-1 face aux A β o₁₋₄₂. En effet, dans un modèle *in vitro* et *ex vivo*, le domaine extracellulaire soluble de NL-1 a été démontré comme ayant un effet neuroprotecteur contre les A β o₁₋₄₂ (Dinamarca et al., 2015). En liant et séquestrant les A β o₁₋₄₂, NL-1 semble moduler leur toxicité de façon dose dépendante. Dans le modèle de souris NL-1 KO, l'absence de ce mécanisme neuroprotecteur pourrait permettre une toxicité plus puissante et rapide des A β o₁₋₄₂. En somme, la diminution neuronale exclusivement observée chez le groupe KO A β semble apporter une explication au niveau cellulaire des résultats obtenus lors des tests de mémoire, qui suggère un effet synergique accru de la toxicité des A β o₁₋₄₂ en absence de NL-1.

Pour résumer l'objectif 2, les résultats obtenus indiquent que, comme l'énonçait notre hypothèse, l'absence de NL-1 semble aggraver les déficits de mémoire et les pertes neuronales engendrés par une administration chronique de 4 jours d'A β o₁₋₄₂ dans l'hippocampe. Ceci s'observe par une diminution marquée des performances au test de la RSO, ainsi que certains déficits lors de la piscine de Morris. Pour appuyer ceci, des pertes neuronales plus importantes sont observées lors de l'injection d'A β o₁₋₄₂ seulement chez les souris NL-1 KO. Ces résultats

apportent plus d'informations concernant le rôle de NL-1 dans la toxicité des A β ₀₁₋₄₂. Son intégrité et sa présence à la post-synapse semblent importante afin d'atténuer, ou tout au moins moduler la toxicité des A β ₀₁₋₄₂, puisque son absence entraîne une toxicité accrue dans ce modèle d'injections chroniques.

5.6 Limites

Diverses limites peuvent être relevées de notre étude. Premièrement, le fait qu'aucun outil ne soit disponible afin de quantifier directement les 4 différentes isoformes de NL-1 (présentées à la section 1.3.1) lors des injections chroniques de l'objectif 1 limite grandement les conclusions qu'il est possible de tirer concernant ces isoformes. Au niveau protéique, il serait intéressant et utile de développer des anticorps permettant de cibler séparément les isoformes de NL-1, afin de potentiellement observé l'effet spécifique à certains variants, observé en qPCR. Aussi, comme il est impossible de quantifier en même temps la présence ou l'absence des deux inserts à l'aide de la méthode Taqman utilisée dans cette étude (Fig. 4), une alternative serait d'utiliser la technique Sybr-Green qui, à l'aide de combinaisons de paires d'amorces ciblant les différents inserts, pourrait permettre de pallier à cette limite (Ponchel et al., 2003; Tajadini, Panjehpour, & Javanmard, 2014). Bref, ces deux outils permettraient potentiellement de mieux comprendre et localiser les effets qu'ont les A β ₀₁₋₄₂ sur les différents variants d'ARNm, et sur les isoformes de NL-1.

Concernant le comptage neuronal, bien que les sites d'injections soient similaires d'une souris à l'autre, et que l'aire de la zone de comptage est similaire chez tous les groupes (Fig.

14B), l'emplacement sur la couche granulaire du GD varie légèrement entre chaque souris. Comme la couche granulaire a une morphologie différente chez chaque souris, et qu'elle varie aussi latéralement (Amaral, Scharfman, & Lavenex, 2007), il est possible que l'épaisseur de la couche de cellules où ont été déterminé les zones de comptage ne soit pas totalement la même d'une souris à l'autre.

Finalement, le design expérimental de l'objectif 2 ne permettait pas d'observer l'activation des processus de neurodégénérescence, ni l'accumulation des $A\beta_{01-42}$ dans le cerveau en raison des 10 jours entre la dernière injection et le sacrifice des souris. Dans ce laps de temps, les processus de neurodégénérescence sont déjà terminés, et l' $A\beta_{01-42}$ a été éliminé par les systèmes de clairance endogènes (Brouillette et al., 2012). Pour pallier à ceci, il faudrait sacrifier les souris 24h après la dernière injection, ce qui permettrait d'observer les processus de neurodégénérescence en cours à l'aide du fluoro Jade-B ou de l'activation de la caspase-3, ainsi que l'accumulation d' $A\beta_{01-42}$ qui peut être observée en ciblant les oligomères avec un anticorps (Brouillette et al., 2012).

5.7 Perspectives

Afin de compléter ou poursuivre cette étude, diverses expériences pourraient être effectuées. Comme énoncé plus tôt, la détection du fragment clivé de NL-1 dans le milieu de culture du modèle *in vitro* permettrait potentiellement de développer cette protéine comme un nouveau biomarqueur de la MA. Il serait d'autant plus intéressant de déterminer si la présence de ce fragment est augmentée dans le sang des souris injectées chroniquement aux $A\beta_{01-42}$ ou

dans un modèle transgénique de la MA. Si cette détection s'avère assez sensible et spécifique, ce biomarqueur sanguin permettrait un dépistage rapide de la MA en effectuant une simple prise de sang avant que la neurodégénérescence occasionne des problèmes de mémoire de plus en plus graves. Aussi, comme la MA touche majoritairement les femmes (Li & Singh, 2014), et que NL-1 chez les souris femelles 3xTg semblent être affectées rapidement par les processus pathologiques, il serait intéressant de voir si les injections chroniques d'A β ₀₁₋₄₂ chez les femelles affecteraient plus rapidement et sévèrement les niveaux de protéine et d'ARNm de NL-1. Si ceci s'avère véridique, NL-1 pourrait donc jouer un rôle dans le développement préférentiel de la MA chez les femmes comparativement aux hommes.

Bien que l'effet plus puissant des A β ₀₁₋₄₂ en absence de NL-1 sur la mémoire ait été démontré dans cette étude, certaines expériences permettraient de confirmer d'avantage notre hypothèse. Par exemple, comme dans l'objectif 1, il serait important de développer un modèle *in vitro* de culture de neurones primaires d'hippocampe n'exprimant pas NL-1. Des traitements aux A β ₀₁₋₄₂ pourrait être effectués à 48h, où aucune diminution de la viabilité n'a été observée avec une dose de 2 μ M, afin d'observer si l'absence de NL-1 sera suffisante pour induire de la mort neuronale à ce temps. Aussi, il serait intéressant d'ajouter des groupes de souris hétérozygotes pour le gène de NL-1 dans l'objectif 2. La présence d'une seule copie du gène de NL-1 pourrait réduire l'effet de toxicité accrue des A β ₀₁₋₄₂ observé dans cette étude, sans toutefois l'éliminer complètement, puisque le niveau de NL-1 qui serait sous le niveau basal. Ceci apporterait une meilleure caractérisation concernant le rôle de NL-1 dans la toxicité des A β ₀₁₋₄₂. Finalement, les souris pourraient être injectées chroniquement pour 2 ou 3 jours, au lieu de 4 lors de l'objectif 2, ce qui pourrait permettre de confirmer qu'une dose

encore plus faible d'A β ₁₋₄₂ est suffisante pour induire des déficits de mémoire similaire. Ceci permettrait aussi de réduire les déficits chez le groupe WT A β obtenus lors de la piscine de Morris, et potentiellement mettre en évidence ceux des souris KO A β .

Un marqueur physiologique qui serait pertinent d'étudier dans notre modèle est les altérations du sommeil générées par les A β ₁₋₄₂. Parmi ces altérations, on compte une diminution de la durée du sommeil NREM et REM, une fragmentation du sommeil et des modifications de l'activité EEG lors du sommeil et de l'éveil (Dufort-Gervais et al., 2018; Petit, Gagnon, Fantini, Ferini-Strambi, & Montplaisir, 2004). Comme discuté à la section 1.1.3, ces altérations semblent débiter dès les stades précoces et pourrait être prédicteurs du développement de la MA (Belleville et al., 2014; Schlosser Covell et al., 2012). Bien que les souris NL-1 KO présentent des altérations intrinsèques du sommeil (El Helou et al., 2013), il est possible que l'injection d'A β ₁₋₄₂ entraîne le développement d'altérations du sommeil différentes, et potentiellement plus rapide que chez les souris KO injectées avec le VH. Comme les processus de mémoire sont étroitement influencés par le sommeil, et vice versa (Abel, Havekes, Saletin, & Walker, 2013; Ackermann & Rasch, 2014; Rasch & Born, 2013), ceci pourrait donc apporter une explication supplémentaire justifiant l'effet plus aversif des A β ₁₋₄₂ en absence de NL-1 sur la mémoire spatiale, comme observé dans cette étude.

Chapitre 6 : Conclusion

Cette étude apporte de nouvelles informations concernant la relation entre les A β ₀₁₋₄₂ et la protéine d'adhésion post-synaptique Neurologine-1. Les 3 modèles utilisés dans cette études ont démontrés que les niveaux d'ARNm ou protéiques de NL-1 étaient modifiés en présence d'A β ₀₁₋₄₂. De plus, en absence de NL-1, les A β ₀₁₋₄₂ semblent avoir une toxicité exacerbée, comme en témoigne les déficits de mémoire, ainsi que les pertes neuronales accrues chez les souris NL-1 KO injectées aux A β ₀₁₋₄₂. En intégrant les deux objectifs, il est possible de penser que, dans un premier temps, l'accumulation d'A β ₀₁₋₄₂ va rapidement diminuer le niveau d'expression de NL-1 à la synapse. Cette diminution du niveau de NL-1 va progressivement potentialiser l'effet toxique des A β ₀₁₋₄₂ qui, en s'accumulant, vont diminuer d'avantage le niveau de NL-1, et devenir de plus en plus neurotoxiques. Donc, comme NL-1 semble affectée et impliquée dans la toxicité des A β ₀₁₋₄₂, la stabilisation de NL-1 à la synapse à l'aide d'un traitement pharmacologique permettrait potentiellement d'empêcher ou ralentir les pertes synaptiques, qui sont les meilleurs prédicteurs des troubles de mémoire dans la MA (DeKosky & Scheff, 1990; Terry et al., 1991). Finalement, s'il s'avère que la relâche en circulation du fragment extracellulaire de NL-1 soit un bon prédicteur de l'accumulation des A β ₀₁₋₄₂, ce fragment pourrait servir de biomarqueur aux stades asymptomatiques de la MA, permettant ainsi de prédire rapidement le développement de cette maladie. Cette éventualité suscite beaucoup d'espoir car le dépistage précoce de la MA est une étape cruciale afin de développer un traitement qui arrêterait ou ralentirait la maladie avant que la neurodégénérescence crée des troubles cognitifs majeurs (Paterson, Toombs, Slattery, Schott, 2014), qui finissent par isoler socialement les personnes âgées et leur enlever toute forme d'autonomie.

Bibliographie

- Abel, T., Havekes, R., Saletin, J. M., & Walker, M. P. (2013). Sleep, plasticity and memory from molecules to whole-brain networks. *Curr Biol*, 23(17), R774-788. doi:10.1016/j.cub.2013.07.025
- Abramov, E., Dolev, I., Fogel, H., Ciccotosto, G. D., Ruff, E., & Slutsky, I. (2009). Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci*, 12(12), 1567-1576. doi:10.1038/nn.2433
- Ackermann, S., & Rasch, B. (2014). Differential effects of non-REM and REM sleep on memory consolidation? *Curr Neurol Neurosci Rep*, 14(2), 430. doi:10.1007/s11910-013-0430-8
- Adhikari, A., Lerner, T. N., Finkelstein, J., Pak, S., Jennings, J. H., Davidson, T. J., . . . Deisseroth, K. (2015). Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. *Nature*, 527(7577), 179-185. doi:10.1038/nature15698
- Aguilar-Valles, A., Sanchez, E., de Gortari, P., Balderas, I., Ramirez-Amaya, V., Bermudez-Rattoni, F., & Joseph-Bravo, P. (2005). Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology*, 82(5-6), 306-319. doi:10.1159/000093129
- Ahmed, S., Mitchell, J., Arnold, R., Dawson, K., Nestor, P. J., & Hodges, J. R. (2008). Memory complaints in mild cognitive impairment, worried well, and semantic dementia patients. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 22(3), 227-235. doi:10.1097/WAD.0b013e31816bbd27
- Akirav, I., Sandi, C., & Richter-Levin, G. (2001). Differential activation of hippocampus and amygdala following spatial learning under stress. *Eur J Neurosci*, 14(4), 719-725.
- Alagiakrishnan, K., Gill, S. S., & Fagarasanu, A. (2012). Genetics and epigenetics of Alzheimer's disease. *Postgrad Med J*, 88(1043), 522-529. doi:10.1136/postgradmedj-2011-130363
- Alam, S., Lingenfelter, K. S., Bender, A. M., & Lindsley, C. W. (2017). Classics in Chemical Neuroscience: Memantine. *ACS Chem Neurosci*, 8(9), 1823-1829. doi:10.1021/acchemneuro.7b00270
- Alberdi, E., Sanchez-Gomez, M. V., Cavaliere, F., Perez-Samartin, A., Zugaza, J. L., Trullas, R., . . . Matute, C. (2010). Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*, 47(3), 264-272. doi:10.1016/j.ceca.2009.12.010
- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., . . . Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7(3), 270-279. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.008
- Aleksis, R., Oleskovs, F., Jaudzems, K., Pahnke, J., & Biverstal, H. (2017). Structural studies of amyloid-beta peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie*, 140, 176-192. doi:10.1016/j.biochi.2017.07.011

- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*, *163*, 3-22. doi:10.1016/S0079-6123(07)63001-5
- Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., & Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun*, *301*(1), 231-235.
- Association, A. s. (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, *12*(4), 459-509.
- Autism Genome Project, C., Szatmari, P., Paterson, A. D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., . . . Meyer, K. J. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet*, *39*(3), 319-328. doi:10.1038/ng1985
- Bahaeddin, Z., Yans, A., Khodagholi, F., Hajimehdipoor, H., & Sahranavard, S. (2017). Hazelnut and neuroprotection: Improved memory and hindered anxiety in response to intra-hippocampal Abeta injection. *Nutr Neurosci*, *20*(6), 317-326. doi:10.1080/1028415X.2015.1126954
- Bahar, E., Kim, H., & Yoon, H. (2016). ER Stress-Mediated Signaling: Action Potential and Ca(2+) as Key Players. *Int J Mol Sci*, *17*(9). doi:10.3390/ijms17091558
- Bai, W., Liu, T., Yi, H., Li, S., & Tian, X. (2012). Anticipatory activity in rat medial prefrontal cortex during a working memory task. *Neurosci Bull*, *28*(6), 693-703. doi:10.1007/s12264-012-1291-x
- Bang, M. L., & Owczarek, S. (2013). A matter of balance: role of neurexin and neuroligin at the synapse. *Neurochem Res*, *38*(6), 1174-1189. doi:10.1007/s11064-013-1029-9
- Barghorn, S., Zheng-Fischhofer, Q., Ackmann, M., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2000). Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry*, *39*(38), 11714-11721.
- Barnard, N. D., Bush, A. I., Ceccarelli, A., Cooper, J., de Jager, C. A., Erickson, K. I., . . . Squitti, R. (2014). Dietary and lifestyle guidelines for the prevention of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *35* Suppl 2, S74-78. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.033
- Barrow, S. L., Constable, J. R., Clark, E., El-Sabeawy, F., McAllister, A. K., & Washbourne, P. (2009). Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev*, *4*, 17. doi:10.1186/1749-8104-4-17
- Barsoum, M. J., Yuan, H., Gerencser, A. A., Liot, G., Kushnareva, Y., Graber, S., . . . Bossy-Wetzel, E. (2006). Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J*, *25*(16), 3900-3911. doi:10.1038/sj.emboj.7601253
- Becker, R. E., Greig, N. H., & Jacobini, E. (2008). Why do so many drugs for Alzheimer's disease fail in development? Time for new methods and new practices? *J Alzheimers Dis*, *15*(2), 303-325.
- Belanger-Nelson, E., Freyburger, M., Pouliot, P., Beaumont, E., Lesage, F., & Mongrain, V. (2015). Brain hemodynamic response to somatosensory stimulation in Neuroligin-1 knockout mice. *Neuroscience*, *289*, 242-250. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.12.069
- Belleville, S., Fouquet, C., Duchesne, S., Collins, D. L., & Hudon, C. (2014). Detecting early preclinical Alzheimer's disease via cognition, neuropsychiatry, and neuroimaging:

- qualitative review and recommendations for testing. *J Alzheimers Dis*, 42 Suppl 4, S375-382. doi:10.3233/JAD-141470
- Bemben, M. A., Shipman, S. L., Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2015). The cellular and molecular landscape of neuroligins. *Trends Neurosci*, 38(8), 496-505. doi:10.1016/j.tins.2015.06.004
- Berridge, M. J. (2010). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Arch*, 459(3), 441-449. doi:10.1007/s00424-009-0736-1
- Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Casoli, T., Meier-Ruge, W., & Ulrich, J. (1990). Morphological adaptive response of the synaptic junctional zones in the human dentate gyrus during aging and Alzheimer's disease. *Brain Res*, 517(1-2), 69-75.
- Besson, F. L., La Joie, R., Doeuvre, L., Gaubert, M., Mezenge, F., Egret, S., . . . Chetelat, G. (2015). Cognitive and Brain Profiles Associated with Current Neuroimaging Biomarkers of Preclinical Alzheimer's Disease. *J Neurosci*, 35(29), 10402-10411. doi:10.1523/JNEUROSCI.0150-15.2015
- Best, P. J., White, A. M., & Minai, A. (2001). Spatial processing in the brain: the activity of hippocampal place cells. *Annu Rev Neurosci*, 24, 459-486. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.459
- Bie, B., Wu, J., Yang, H., Xu, J. J., Brown, D. L., & Naguib, M. (2014). Epigenetic suppression of neuroligin 1 underlies amyloid-induced memory deficiency. *Nat Neurosci*, 17(2), 223-231. doi:10.1038/nn.3618
- Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45(5), 675-688. doi:10.1016/j.neuron.2005.01.040
- Birks, J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD005593. doi:10.1002/14651858.CD005593
- Blundell, J., Blaiss, C. A., Etherton, M. R., Espinosa, F., Tabuchi, K., Walz, C., . . . Powell, C. M. (2010). Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J Neurosci*, 30(6), 2115-2129. doi:10.1523/JNEUROSCI.4517-09.2010
- Borbely, E., Horvath, J., Furdan, S., Bozso, Z., Penke, B., & Fulop, L. (2014). Simultaneous changes of spatial memory and spine density after intrahippocampal administration of fibrillar abeta1-42 to the rat brain. *Biomed Res Int*, 2014, 345305. doi:10.1155/2014/345305
- Boucard, A. A., Chubykin, A. A., Comoletti, D., Taylor, P., & Sudhof, T. C. (2005). A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron*, 48(2), 229-236. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.026
- Braak, H., & Braak, E. (1996). Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*, 165, 3-12.
- Brayet, P., Petit, D., Frauscher, B., Gagnon, J. F., Gosselin, N., Gagnon, K., . . . Montplaisir, J. (2016). Quantitative EEG of Rapid-Eye-Movement Sleep: A Marker of Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Clin EEG Neurosci*, 47(2), 134-141. doi:10.1177/1550059415603050
- Brito-Moreira, J., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., Ribeiro, F. C., Ledo, J. H., Diniz, L. P., . . . Ferreira, S. T. (2017). Interaction of amyloid-beta (Abeta) oligomers with neurexin 2alpha and neuroligin 1 mediates synapse damage and memory loss in mice. *J Biol Chem*, 292(18), 7327-7337. doi:10.1074/jbc.M116.761189

- Brito-Moreira, J., Paula-Lima, A. C., Bomfim, T. R., Oliveira, F. B., Sepulveda, F. J., De Mello, F. G., . . . Ferreira, S. T. (2011). Abeta oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons. *Curr Alzheimer Res*, 8(5), 552-562.
- Brouillette, J., Caillierez, R., Zommer, N., Alves-Pires, C., Benilova, I., Blum, D., . . . Buee, L. (2012). Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid-beta1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *J Neurosci*, 32(23), 7852-7861. doi:10.1523/JNEUROSCI.5901-11.2012
- Brundin, P., Melki, R., & Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4), 301-307. doi:10.1038/nrm2873
- Budreck, E. C., Kwon, O. B., Jung, J. H., Baudouin, S., Thommen, A., Kim, H. S., . . . Kim, J. H. (2013). Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(2), 725-730. doi:10.1073/pnas.1214718110
- Burdick, D., Kosmoski, J., Knauer, M. F., & Glabe, C. G. (1997). Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A beta 1-42, in differentiated PC12 cells. *Brain Res*, 746(1-2), 275-284.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Wong, P. C. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci*, 4(3), 233-234. doi:10.1038/85064
- Cassagnes, L. E., Herve, V., Nepveu, F., Hureau, C., Faller, P., & Collin, F. (2013). The catalytically active copper-amyloid-Beta state: coordination site responsible for reactive oxygen species production. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52(42), 11110-11113. doi:10.1002/anie.201305372
- Chanda, S., Hale, W. D., Zhang, B., Wernig, M., & Sudhof, T. C. (2017). Unique versus Redundant Functions of Neuroligin Genes in Shaping Excitatory and Inhibitory Synapse Properties. *J Neurosci*, 37(29), 6816-6836. doi:10.1523/JNEUROSCI.0125-17.2017
- Chen, Tari, P. K., She, K., & Haas, K. (2010). Neurexin-neuroligin cell adhesion complexes contribute to synaptotropic dendritogenesis via growth stabilization mechanisms in vivo. *Neuron*, 67(6), 967-983. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.016
- Chen, Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*, 38(9), 1205-1235. doi:10.1038/aps.2017.28
- Chih, B., Engelman, H., & Scheiffele, P. (2005). Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*, 307(5713), 1324-1328. doi:10.1126/science.1107470
- Chih, B., Gollan, L., & Scheiffele, P. (2006). Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron*, 51(2), 171-178. doi:10.1016/j.neuron.2006.06.005
- Chong, M. S., & Sahadevan, S. (2005). Preclinical Alzheimer's disease: diagnosis and prediction of progression. *Lancet Neurol*, 4(9), 576-579. doi:10.1016/S1474-4422(05)70168-X
- Chubykin, A. A., Atasoy, D., Etherton, M. R., Brose, N., Kavalali, E. T., Gibson, J. R., & Sudhof, T. C. (2007). Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory

- synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron*, 54(6), 919-931. doi:10.1016/j.neuron.2007.05.029
- Chubykin, A. A., Liu, X., Comoletti, D., Tsigelny, I., Taylor, P., & Sudhof, T. C. (2005). Dissection of synapse induction by neuroligins: effect of a neuroligin mutation associated with autism. *J Biol Chem*, 280(23), 22365-22374. doi:10.1074/jbc.M410723200
- Citron, M., Vigo-Pelfrey, C., Teplow, D. B., Miller, C., Schenk, D., Johnston, J., . . . Selkoe, D. J. (1994). Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(25), 11993-11997.
- Clegg, A., Bryant, J., Nicholson, T., McIntyre, L., De Broe, S., Gerard, K., & Waugh, N. (2002). Clinical and cost-effectiveness of donepezil, rivastigmine, and galantamine for Alzheimer's disease. A systematic review. *Int J Technol Assess Health Care*, 18(3), 497-507.
- Cohen, & Klunk. (2014). Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET. *Neurobiol Dis*, 72 Pt A, 117-122. doi:10.1016/j.nbd.2014.05.001
- Cohen, Linse, S., Luheshi, L. M., Hellstrand, E., White, D. A., Rajah, L., . . . Knowles, T. P. (2013). Proliferation of amyloid-beta42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(24), 9758-9763. doi:10.1073/pnas.1218402110
- Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 19(R1), R12-20. doi:10.1093/hmg/ddq160
- Crusio, W. E., & Schwegler, H. (2005). Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav Brain Funct*, 1(1), 3. doi:10.1186/1744-9081-1-3
- D'Hooge, R., & De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev*, 36(1), 60-90.
- Dahlhaus, R., & El-Husseini, A. (2010). Altered neuroligin expression is involved in social deficits in a mouse model of the fragile X syndrome. *Behav Brain Res*, 208(1), 96-105. doi:10.1016/j.bbr.2009.11.019
- Dang, R., Qi, J., Liu, A., Ren, Q., Lv, D., Han, L., . . . Jia, Z. (2018). Regulation of hippocampal long term depression by Neuroligin 1. *Neuropharmacology*, 143, 205-216. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.09.035
- Davis, K. E., Easton, A., Eacott, M. J., & Gigg, J. (2013). Episodic-like memory for what-where-which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 33(3), 681-698. doi:10.3233/JAD-2012-121543
- De Strooper, B., Iwatsubo, T., & Wolfe, M. S. (2012). Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(1), a006304. doi:10.1101/cshperspect.a006304
- Dean, C., & Dresbach, T. (2006). Neuroligins and neuroligins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci*, 29(1), 21-29. doi:10.1016/j.tins.2005.11.003
- Dean, C., Scholl, F. G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., & Scheiffele, P. (2003). Neuroligin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci*, 6(7), 708-716. doi:10.1038/nn1074

- DeKosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*, 27(5), 457-464. doi:10.1002/ana.410270502
- Desbois, M., Cook, S. J., Emmons, S. W., & Bulow, H. E. (2015). Directional Trans-Synaptic Labeling of Specific Neuronal Connections in Live Animals. *Genetics*, 200(3), 697-705. doi:10.1534/genetics.115.177006
- Deshpande, A., Kawai, H., Metherate, R., Glabe, C. G., & Busciglio, J. (2009). A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. *J Neurosci*, 29(13), 4004-4015. doi:10.1523/JNEUROSCI.5980-08.2009
- Di Scala, C., Chahinian, H., Yahi, N., Garmy, N., & Fantini, J. (2014). Interaction of Alzheimer's beta-amyloid peptides with cholesterol: mechanistic insights into amyloid pore formation. *Biochemistry*, 53(28), 4489-4502. doi:10.1021/bi500373k
- Dinamarca, M. C., Di Luca, M., Godoy, J. A., & Inestrosa, N. C. (2015). The soluble extracellular fragment of neuroligin-1 targets Abeta oligomers to the postsynaptic region of excitatory synapses. *Biochem Biophys Res Commun*, 466(1), 66-71. doi:10.1016/j.bbrc.2015.08.107
- Dineley, K. T., Bell, K. A., Bui, D., & Sweatt, J. D. (2002). beta -Amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 277(28), 25056-25061. doi:10.1074/jbc.M200066200
- Ditaranto, K., Tekirian, T. L., & Yang, A. J. (2001). Lysosomal membrane damage in soluble Abeta-mediated cell death in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 8(1), 19-31. doi:10.1006/nbdi.2000.0364
- Djonlagic, I., Aeschbach, D., Harrison, S. L., Dean, D., Yaffe, K., Ancoli-Israel, S., . . . Redline, S. (2018). Associations between quantitative sleep EEG and subsequent cognitive decline in older women. *J Sleep Res*. doi:10.1111/jsr.12666
- Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Dezor, M., & Kozubski, W. (2016). Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*, 13(9), 952-963.
- Dudchenko, P. A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 28(7), 699-709. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.09.002
- Dufort-Gervais, J., Mongrain, V., & Brouillette, J. (2018). Bidirectional relationships between sleep and amyloid-beta in the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*. doi:10.1016/j.nlm.2018.06.009
- Dulin, F., Leveille, F., Ortega, J. B., Mornon, J. P., Buisson, A., Callebaut, I., & Colloc'h, N. (2008). P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett*, 582(13), 1865-1870. doi:10.1016/j.febslet.2008.05.002
- Echavarri, C., Burgmans, S., Uylings, H., Cuesta, M. J., Peralta, V., Kamphorst, W., . . . Verhey, F. R. (2013). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Alzheimers Dis*, 33(3), 715-721. doi:10.3233/JAD-2012-121003
- El Helou, J., Belanger-Nelson, E., Freyburger, M., Dorsaz, S., Curie, T., La Spada, F., . . . Mongrain, V. (2013). Neuroligin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(24), 9974-9979. doi:10.1073/pnas.1221381110

- El-Agnaf, O. M., Mahil, D. S., Patel, B. P., & Austen, B. M. (2000). Oligomerization and toxicity of beta-amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(3), 1003-1007. doi:10.1006/bbrc.2000.3051
- ElAli, A., & Rivest, S. (2016). Microglia in Alzheimer's disease: A multifaceted relationship. *Brain Behav Immun*, 55, 138-150. doi:10.1016/j.bbi.2015.07.021
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., . . . Scazufca, M. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366(9503), 2112-2117. doi:10.1016/S0140-6736(05)67889-0
- Fjell, A. M., McEvoy, L., Holland, D., Dale, A. M., Walhovd, K. B., & Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2014). What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol*, 117, 20-40. doi:10.1016/j.pneurobio.2014.02.004
- Gambuzza, M. E., Sofò, V., Salmeri, F. M., Soraci, L., Marino, S., & Bramanti, P. (2014). Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 13(9), 1542-1558.
- Giovannetti, E. A., & Fuhrmann, M. (2018). Unsupervised excitation: GABAergic dysfunctions in Alzheimer's disease. *Brain Res*. doi:10.1016/j.brainres.2018.11.042
- Go, M., Kou, J., Lim, J. E., Yang, J., & Fukuchi, K. I. (2016). Microglial response to LPS increases in wild-type mice during aging but diminishes in an Alzheimer's mouse model: Implication of TLR4 signaling in disease progression. *Biochem Biophys Res Commun*, 479(2), 331-337. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.073
- Goetzl, E. J., Abner, E. L., Jicha, G. A., Kapogiannis, D., & Schwartz, J. B. (2018). Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease. *FASEB J*, 32(2), 888-893. doi:10.1096/fj.201700731R
- Goldman-Rakic, P. S. (1996). The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 351(1346), 1445-1453. doi:10.1098/rstb.1996.0129
- Graeber, M. B., & Mehraein, P. (1999). Reanalysis of the first case of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 249 Suppl 3, 10-13.
- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S. X., Linhoff, M. W., & Craig, A. M. (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*, 119(7), 1013-1026. doi:10.1016/j.cell.2004.11.035
- Granziera, C., Daducci, A., Donati, A., Bonnier, G., Romascano, D., Roche, A., . . . Krueger, G. (2015). A multi-contrast MRI study of microstructural brain damage in patients with mild cognitive impairment. *Neuroimage Clin*, 8, 631-639. doi:10.1016/j.nicl.2015.06.003
- Graves, A. B., van Duijn, C. M., Chandra, V., Fratiglioni, L., Heyman, A., Jorm, A. F., . . . et al. (1991). Alcohol and tobacco consumption as risk factors for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol*, 20 Suppl 2, S48-57.
- Gravina, S. A., Ho, L., Eckman, C. B., Long, K. E., Otvos, L., Jr., Younkin, L. H., . . . Younkin, S. G. (1995). Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J Biol Chem*, 270(13), 7013-7016.

- Guillozet, A. L., Weintraub, S., Mash, D. C., & Mesulam, M. M. (2003). Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, *60*(5), 729-736. doi:10.1001/archneur.60.5.729
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, *7*(2), 42-47.
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(2), 101-112. doi:10.1038/nrm2101
- Hadad-Ophir, O., Albrecht, A., Stork, O., & Richter-Levin, G. (2014). Amygdala activation and GABAergic gene expression in hippocampal sub-regions at the interplay of stress and spatial learning. *Front Behav Neurosci*, *8*, 3. doi:10.3389/fnbeh.2014.00003
- Han, R. W., Zhang, R. S., Xu, H. J., Chang, M., Peng, Y. L., & Wang, R. (2013). Neuropeptide S enhances memory and mitigates memory impairment induced by MK801, scopolamine or Aβ(1-42) in mice novel object and object location recognition tasks. *Neuropharmacology*, *70*, 261-267. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.02.002
- Hannou, L., Belanger-Nelson, E., O'Callaghan, E. K., Dufort-Gervais, J., Ballester Roig, M. N., Roy, P. G., . . . Mongrain, V. (2018). Regulation of the Neuroligin-1 Gene by Clock Transcription Factors. *J Biol Rhythms*, *33*(2), 166-178. doi:10.1177/0748730418761236
- Harrison, F. E., Hosseini, A. H., & McDonald, M. P. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res*, *198*(1), 247-251. doi:10.1016/j.bbr.2008.10.015
- Harvey, R. J., Skelton-Robinson, M., & Rossor, M. N. (2003). The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *74*(9), 1206-1209.
- Hashimoto, Y., Kaneko, Y., Tsukamoto, E., Frankowski, H., Kouyama, K., Kita, Y., . . . Nishimoto, I. (2004). Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75^{NTR}/PLAIDD. *J Neurochem*, *90*(3), 549-558. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02513.x
- He, Zheng, M., Liu, Q., Shi, Z., Long, S., Lu, X., . . . Yao, X. (2018). Injected Amyloid Beta in the Olfactory Bulb Transfers to Other Brain Regions via Neural Connections in Mice. *Mol Neurobiol*, *55*(2), 1703-1713. doi:10.1007/s12035-017-0446-1
- He, P., Ouyang, X., Zhou, S., Yin, W., Tang, C., Laudon, M., & Tian, S. (2013). A novel melatonin agonist Neu-P11 facilitates memory performance and improves cognitive impairment in a rat model of Alzheimer' disease. *Horm Behav*, *64*(1), 1-7. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.04.009
- Heine, M., Thoumine, O., Mondin, M., Tessier, B., Giannone, G., & Choquet, D. (2008). Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroligin contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(52), 20947-20952. doi:10.1073/pnas.0804007106
- Hickman, S. E., & El Khoury, J. (2014). TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*, *88*(4), 495-498. doi:10.1016/j.bcp.2013.11.021
- Hoeijmakers, L., Amelanchik, A., Verhaag, F., Kotah, J., Lucassen, P. J., & Korosi, A. (2018). Early-Life Stress Does Not Aggravate Spatial Memory or the Process of

- Hippocampal Neurogenesis in Adult and Middle-Aged APP/PS1 Mice. *Front Aging Neurosci*, 10, 61. doi:10.3389/fnagi.2018.00061
- Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., . . . Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, 352(6286), 712-716. doi:10.1126/science.aad8373
- Hou, L., Shao, H., Zhang, Y., Li, H., Menon, N. K., Neuhaus, E. B., . . . Zagorski, M. G. (2004). Solution NMR studies of the A beta(1-40) and A beta(1-42) peptides establish that the Met35 oxidation state affects the mechanism of amyloid formation. *J Am Chem Soc*, 126(7), 1992-2005. doi:10.1021/ja036813f
- Hsia, A. Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G. Q., Tatsuno, G., Hu, K., . . . Mucke, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), 3228-3233.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., & Malinow, R. (2006). AMPAR removal underlies A beta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*, 52(5), 831-843. doi:10.1016/j.neuron.2006.10.035
- Hu, W. Y., He, Z. Y., Yang, L. J., Zhang, M., Xing, D., & Xiao, Z. C. (2015). The Ca(2+) channel inhibitor 2-APB reverses beta-amyloid-induced LTP deficit in hippocampus by blocking BAX and caspase-3 hyperactivation. *Br J Pharmacol*, 172(9), 2273-2285. doi:10.1111/bph.13048
- Huang, & Scheiffele, P. (2008). GABA and neuroligin signaling: linking synaptic activity and adhesion in inhibitory synapse development. *Curr Opin Neurobiol*, 18(1), 77-83. doi:10.1016/j.conb.2008.05.008
- Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., & Sudhof, T. C. (1995). Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell*, 81(3), 435-443.
- Ichtchenko, K., Nguyen, T., & Sudhof, T. C. (1996). Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *J Biol Chem*, 271(5), 2676-2682.
- Irie, Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., . . . Sudhof, T. C. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. *Science*, 277(5331), 1511-1515.
- Irie, Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Ohashi, R., . . . Shirasawa, T. (2005). Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng*, 99(5), 437-447. doi:10.1263/jbb.99.437
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., & Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, 13(1), 45-53.
- Jack, C. R., Jr., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Shaw, L. M., Aisen, P. S., Weiner, M. W., . . . Trojanowski, J. Q. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*, 9(1), 119-128. doi:10.1016/S1474-4422(09)70299-6
- Jahn, H. (2013). Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*, 15(4), 445-454.
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., . . . Borchelt, D. R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42

- residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet*, 13(2), 159-170. doi:10.1093/hmg/ddh019
- Jedlicka, P., Vnencak, M., Krueger, D. D., Jungenitz, T., Brose, N., & Schwarzacher, S. W. (2015). Neuroligin-1 regulates excitatory synaptic transmission, LTP and EPSP-spike coupling in the dentate gyrus in vivo. *Brain Struct Funct*, 220(1), 47-58. doi:10.1007/s00429-013-0636-1
- Jiang, He, Z., Peng, Y. L., Jin, W. D., Wang, Z., Han, R. W., . . . Wang, R. (2015). Kisspeptin-13 enhances memory and mitigates memory impairment induced by Abeta1-42 in mice novel object and object location recognition tasks. *Neurobiol Learn Mem*, 123, 187-195. doi:10.1016/j.nlm.2015.05.010
- Jiang, He, Z., Peng, Y. L., Jin, W. D., Wang, Z., Mu, L. Y., . . . Wang, R. (2015). Phoenixin-14 enhances memory and mitigates memory impairment induced by Abeta1-42 and scopolamine in mice. *Brain Res*, 1629, 298-308. doi:10.1016/j.brainres.2015.10.030
- Jiang, Polepalli, J., Chen, L. Y., Zhang, B., Sudhof, T. C., & Malenka, R. C. (2017). Conditional ablation of neuroligin-1 in CA1 pyramidal neurons blocks LTP by a cell-autonomous NMDA receptor-independent mechanism. *Mol Psychiatry*, 22(3), 375-383. doi:10.1038/mp.2016.80
- Jin, M., & Selkoe, D. J. (2015). Systematic analysis of time-dependent neural effects of soluble amyloid beta oligomers in culture and in vivo: Prevention by scyllo-inositol. *Neurobiol Dis*, 82, 152-163. doi:10.1016/j.nbd.2015.05.020
- Johnston, J. A., Cowburn, R. F., Norgren, S., Wiehager, B., Venizelos, N., Winblad, B., . . . O'Neill, C. (1994). Increased beta-amyloid release and levels of amyloid precursor protein (APP) in fibroblast cell lines from family members with the Swedish Alzheimer's disease APP670/671 mutation. *FEBS Lett*, 354(3), 274-278.
- Jung, S. Y., Kim, J., Kwon, O. B., Jung, J. H., An, K., Jeong, A. Y., . . . Kim, J. H. (2010). Input-specific synaptic plasticity in the amygdala is regulated by neuroligin-1 via postsynaptic NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(10), 4710-4715. doi:10.1073/pnas.1001084107
- Kanekiyo, T., & Bu, G. (2014). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid-beta clearance in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, 6, 93. doi:10.3389/fnagi.2014.00093
- Karlsson, M. P., & Frank, L. M. (2008). Network dynamics underlying the formation of sparse, informative representations in the hippocampus. *J Neurosci*, 28(52), 14271-14281. doi:10.1523/JNEUROSCI.4261-08.2008
- Kent, B. A., Strittmatter, S. M., & Nygaard, H. B. (2018). Sleep and EEG Power Spectral Analysis in Three Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: APP/PS1, 3xTgAD, and Tg2576. *J Alzheimers Dis*, 64(4), 1325-1336. doi:10.3233/JAD-180260
- Kim, Jung, S. Y., Lee, Y. K., Park, S., Choi, J. S., Lee, C. J., . . . Kim, J. H. (2008). Neuroligin-1 is required for normal expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(26), 9087-9092. doi:10.1073/pnas.0803448105
- Kim, Lee, D. K., Chung, B. R., Kim, H. V., & Kim, Y. (2016). Intracerebroventricular Injection of Amyloid-beta Peptides in Normal Mice to Acutely Induce Alzheimer-like Cognitive Deficits. *J Vis Exp*(109). doi:10.3791/53308
- Kim, Lim, H., Lee, D., Choi, S. J., Oh, W., Yang, Y. S., . . . Jeon, H. B. (2018). Thrombospondin-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal

- stem cells rescues neurons from synaptic dysfunction in Alzheimer's disease model. *Sci Rep*, 8(1), 354. doi:10.1038/s41598-017-18542-0
- Kirova, A. M., Bays, R. B., & Lagalwar, S. (2015). Working memory and executive function decline across normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*, 2015, 748212. doi:10.1155/2015/748212
- Kiss, E., Gorgas, K., Schlicksupp, A., Gross, D., Kins, S., Kirsch, J., & Kuhse, J. (2016). Biphasic Alteration of the Inhibitory Synapse Scaffold Protein Gephyrin in Early and Late Stages of an Alzheimer Disease Model. *Am J Pathol*, 186(9), 2279-2291. doi:10.1016/j.ajpath.2016.05.013
- Koehnke, J., Katsamba, P. S., Ahlsen, G., Bahna, F., Vendome, J., Honig, B., . . . Jin, X. (2010). Splice form dependence of beta-neurexin/neuroigin binding interactions. *Neuron*, 67(1), 61-74. doi:10.1016/j.neuron.2010.06.001
- Kojro, E., & Fahrenholz, F. (2005). The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem*, 38, 105-127.
- Koussounadis, A., Langdon, S. P., Um, I. H., Harrison, D. J., & Smith, V. A. (2015). Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep*, 5, 10775. doi:10.1038/srep10775
- Kwon, H. B., Kozorovitskiy, Y., Oh, W. J., Peixoto, R. T., Akhtar, N., Saulnier, J. L., . . . Sabatini, B. L. (2012). Neuroigin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number. *Nat Neurosci*, 15(12), 1667-1674. doi:10.1038/nn.3256
- Lai, M. C., Lombardo, M. V., & Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *Lancet*, 383(9920), 896-910. doi:10.1016/S0140-6736(13)61539-1
- Larouche, E., Hudon, C., & Goulet, S. (2015). Potential benefits of mindfulness-based interventions in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an interdisciplinary perspective. *Behav Brain Res*, 276, 199-212. doi:10.1016/j.bbr.2014.05.058
- Lendel, C., Bjerring, M., Dubnovitsky, A., Kelly, R. T., Filippov, A., Antzutkin, O. N., . . . Hard, T. (2014). A hexameric peptide barrel as building block of amyloid-beta protofibrils. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53(47), 12756-12760. doi:10.1002/anie.201406357
- Letellier, M., Sziber, Z., Chamma, I., Saphy, C., Papisideri, I., Tessier, B., . . . Thoumine, O. (2018). A unique intracellular tyrosine in neuroigin-1 regulates AMPA receptor recruitment during synapse differentiation and potentiation. *Nat Commun*, 9(1), 3979. doi:10.1038/s41467-018-06220-2
- Levinson, J. N., Chery, N., Huang, K., Wong, T. P., Gerrow, K., Kang, R., . . . El-Husseini, A. (2005). Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroigin-induced synaptic specificity. *J Biol Chem*, 280(17), 17312-17319. doi:10.1074/jbc.M413812200
- Lewczuk, P., Mroczko, B., Fagan, A., & Kornhuber, J. (2015). Biomarkers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a current perspective. *Adv Med Sci*, 60(1), 76-82. doi:10.1016/j.advms.2014.11.002
- Li, Hong, S., Shepardson, N. E., Walsh, D. M., Shankar, G. M., & Selkoe, D. (2009). Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*, 62(6), 788-801. doi:10.1016/j.neuron.2009.05.012

- Li, Liu, K., Qiu, Y., Ren, Z., Dai, R., Deng, Y., & Qing, H. (2016). Effect of Presenilin Mutations on APP Cleavage; Insights into the Pathogenesis of FAD. *Front Aging Neurosci*, 8, 51. doi:10.3389/fnagi.2016.00051
- Li, & Singh, M. (2014). Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*, 35(3), 385-403. doi:10.1016/j.yfrne.2014.01.002
- Li, Sun, H., Chen, Z., Xu, H., Bu, G., & Zheng, H. (2016). Implications of GABAergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*, 8, 31. doi:10.3389/fnagi.2016.00031
- Lise, M. F., & El-Husseini, A. (2006). The neuroligin and neurexin families: from structure to function at the synapse. *Cell Mol Life Sci*, 63(16), 1833-1849. doi:10.1007/s00018-006-6061-3
- Liu, Bai, W., Yi, H., Tan, T., Wei, J., Wang, J., & Tian, X. (2014). Functional connectivity in a rat model of Alzheimer's disease during a working memory task. *Curr Alzheimer Res*, 11(10), 981-991.
- Liu, Zhou, Z., Dang, R., Zhu, Y., Qi, J., He, G., . . . Xie, W. (2016). Neuroligin 1 regulates spines and synaptic plasticity via LIMK1/cofilin-mediated actin reorganization. *J Cell Biol*, 212(4), 449-463. doi:10.1083/jcb.201509023
- Liu, L., Wong, T. P., Pozza, M. F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., . . . Wang, Y. T. (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*, 304(5673), 1021-1024. doi:10.1126/science.1096615
- Lu, J. X., Qiang, W., Yau, W. M., Schwieters, C. D., Meredith, S. C., & Tycko, R. (2013). Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell*, 154(6), 1257-1268. doi:10.1016/j.cell.2013.08.035
- Luheshi, L. M., Tartaglia, G. G., Brorsson, A. C., Pawar, A. P., Watson, I. E., Chiti, F., . . . Crowther, D. C. (2007). Systematic in vivo analysis of the intrinsic determinants of amyloid Beta pathogenicity. *PLoS Biol*, 5(11), e290. doi:10.1371/journal.pbio.0050290
- Lyketsos, C. G., Steinberg, M., Tschanz, J. T., Norton, M. C., Steffens, D. C., & Breitner, J. C. (2000). Mental and behavioral disturbances in dementia: findings from the Cache County Study on Memory in Aging. *Am J Psychiatry*, 157(5), 708-714. doi:10.1176/appi.ajp.157.5.708
- Maldonado, N. M., Espejo, P. J., Martijena, I. D., & Molina, V. A. (2014). Activation of ERK2 in basolateral amygdala underlies the promoting influence of stress on fear memory and anxiety: influence of midazolam pretreatment. *Eur Neuropsychopharmacol*, 24(2), 262-270. doi:10.1016/j.euroneuro.2013.10.005
- Mann, A., Gondard, E., Tampellini, D., Milsted, J. A. T., Marillac, D., Hamani, C., . . . Lozano, A. M. (2018). Chronic deep brain stimulation in an Alzheimer's disease mouse model enhances memory and reduces pathological hallmarks. *Brain Stimul*, 11(2), 435-444. doi:10.1016/j.brs.2017.11.012
- Markesbery, W. R. (2010). Neuropathologic alterations in mild cognitive impairment: a review. *J Alzheimers Dis*, 19(1), 221-228. doi:10.3233/JAD-2010-1220
- Marksteiner, J., Hinterhuber, H., & Humpel, C. (2007). Cerebrospinal fluid biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease: beta-amyloid(1-42), tau, phospho-tau-181 and total protein. *Drugs Today (Barc)*, 43(6), 423-431. doi:10.1358/dot.2007.43.6.1067341
- Martinez-Torteya, A., Trevino, V., & Tamez-Pena, J. G. (2015). Improved Diagnostic Multimodal Biomarkers for Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Biomed Res Int*, 2015, 961314. doi:10.1155/2015/961314

- Massart, R., Freyburger, M., Suderman, M., Paquet, J., El Helou, J., Belanger-Nelson, E., . . . Mongrain, V. (2014). The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes. *Transl Psychiatry*, 4, e347. doi:10.1038/tp.2013.120
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15056. doi:10.1038/nrdp.2015.56
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2013). The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathol*, 126(4), 479-497. doi:10.1007/s00401-013-1177-7
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Jr., Kawas, C. H., . . . Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7(3), 263-269. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.005
- Mehta, D., Jackson, R., Paul, G., Shi, J., & Sabbagh, M. (2017). Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015. *Expert Opin Investig Drugs*, 26(6), 735-739. doi:10.1080/13543784.2017.1323868
- Meisl, G., Yang, X., Hellstrand, E., Frohm, B., Kirkegaard, J. B., Cohen, S. I., . . . Knowles, T. P. (2014). Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation kinetics of the Aβ40 and Aβ42 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(26), 9384-9389. doi:10.1073/pnas.1401564111
- Mohamed, N. V., Herrou, T., Plouffe, V., Piperno, N., & Leclerc, N. (2013). Spreading of tau pathology in Alzheimer's disease by cell-to-cell transmission. *Eur J Neurosci*, 37(12), 1939-1948. doi:10.1111/ejn.12229
- Moller, H. J., & Graeber, M. B. (1998). The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 248(3), 111-122.
- Mondin, M., Labrousse, V., Hosy, E., Heine, M., Tessier, B., Levet, F., . . . Thoumine, O. (2011). Neurexin-neuroigin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds. *J Neurosci*, 31(38), 13500-13515. doi:10.1523/JNEUROSCI.6439-10.2011
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., . . . McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci*, 20(11), 4050-4058.
- Mucke, L., & Selkoe, D. J. (2012). Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(7), a006338. doi:10.1101/cshperspect.a006338
- Mufson, E. J., Binder, L., Counts, S. E., DeKosky, S. T., de Toledo-Morrell, L., Ginsberg, S. D., . . . Scheff, S. W. (2012). Mild cognitive impairment: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*, 123(1), 13-30. doi:10.1007/s00401-011-0884-1
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., & Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*, 1(5), 345-347. doi:10.1038/ng0892-345

- Murayama, O., Tomita, T., Nihonmatsu, N., Murayama, M., Sun, X., Honda, T., . . . Takashima, A. (1999). Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, *265*(1), 61-63.
- Nakanishi, M., Nomura, J., Ji, X., Tamada, K., Arai, T., Takahashi, E., . . . Takumi, T. (2017). Correction: Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism. *PLoS Genet*, *13*(10), e1007035. doi:10.1371/journal.pgen.1007035
- Nam, C. I., & Chen, L. (2005). Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(17), 6137-6142. doi:10.1073/pnas.0502038102
- Nath, S., Agholme, L., Kurudenkandy, F. R., Granseth, B., Marcusson, J., & Hallbeck, M. (2012). Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of beta-amyloid. *J Neurosci*, *32*(26), 8767-8777. doi:10.1523/JNEUROSCI.0615-12.2012
- Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. O., Riek, C., Grothe, R., & Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, *435*(7043), 773-778. doi:10.1038/nature03680
- Nitrini, R. (2010). Preclinical diagnosis of Alzheimer's disease: Prevention or prediction? *Dement Neuropsychol*, *4*(4), 259-261. doi:10.1590/S1980-57642010DN40400002
- O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*, *34*, 185-204. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., & LaFerla, F. M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *24*(8), 1063-1070.
- Oh, H., Habeck, C., Madison, C., & Jagust, W. (2014). Covarying alterations in Aβ deposition, glucose metabolism, and gray matter volume in cognitively normal elderly. *Hum Brain Mapp*, *35*(1), 297-308. doi:10.1002/hbm.22173
- Oh, H., Madison, C., Baker, S., Rabinovici, G., & Jagust, W. (2016). Dynamic relationships between age, amyloid-β deposition, and glucose metabolism link to the regional vulnerability to Alzheimer's disease. *Brain*, *139*(Pt 8), 2275-2289. doi:10.1093/brain/aww108
- Ong, W. Y., Tanaka, K., Dawe, G. S., Ittner, L. M., & Farooqui, A. A. (2013). Slow excitotoxicity in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, *35*(4), 643-668. doi:10.3233/JAD-121990
- Owczarek, S., Bang, M. L., & Berezin, V. (2015). Neurexin-Neuroligin Synaptic Complex Regulates Schizophrenia-Related DISC1/Kal-7/Rac1 "Signalosome". *Neural Plast*, *2015*, 167308. doi:10.1155/2015/167308
- Palmqvist, S., Mattsson, N., Hansson, O., & Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2016). Cerebrospinal fluid analysis detects cerebral amyloid-β accumulation earlier than positron emission tomography. *Brain*, *139*(Pt 4), 1226-1236. doi:10.1093/brain/aww015
- Panpalli Ates, M., Karaman, Y., Guntekin, S., & Ergun, M. A. (2016). Analysis of genetics and risk factors of Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, *325*, 124-131. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.03.051
- Paterson, R. W., Toombs, J., Slattery, C. F., Schott, J. M., & Zetterberg, H. (2014). Biomarker modelling of early molecular changes in Alzheimer's disease. *Mol Diagn Ther*, *18*(2), 213-227. doi:10.1007/s40291-013-0069-9

- Peixoto, R. T., Kunz, P. A., Kwon, H., Mabb, A. M., Sabatini, B. L., Philpot, B. D., & Ehlers, M. D. (2012). Transsynaptic signaling by activity-dependent cleavage of neuroligin-1. *Neuron*, 76(2), 396-409. doi:10.1016/j.neuron.2012.07.006
- Penke, B., Bogar, F., & Fulop, L. (2017). beta-Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. *Molecules*, 22(10). doi:10.3390/molecules22101692
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*, 77(1), 32-42. doi:10.1002/msj.20157
- Petit, D., Gagnon, J. F., Fantini, M. L., Ferini-Strambi, L., & Montplaisir, J. (2004). Sleep and quantitative EEG in neurodegenerative disorders. *J Psychosom Res*, 56(5), 487-496. doi:10.1016/j.jpsychores.2004.02.001
- Pettem, K. L., Yokomaku, D., Takahashi, H., Ge, Y., & Craig, A. M. (2013). Interaction between autism-linked MDGAs and neuroligins suppresses inhibitory synapse development. *J Cell Biol*, 200(3), 321-336. doi:10.1083/jcb.201206028
- Polazzi, E., Mengoni, I., Pena-Altamira, E., Massenzio, F., Virgili, M., Petralla, S., & Monti, B. (2015). Neuronal Regulation of Neuroprotective Microglial Apolipoprotein E Secretion in Rat In Vitro Models of Brain Pathophysiology. *J Neuropathol Exp Neurol*, 74(8), 818-834. doi:10.1097/NEN.0000000000000222
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., . . . Markham, A. F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*, 3, 18. doi:10.1186/1472-6750-3-18
- Popugaeva, E., Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2017). Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease - A therapeutic opportunity? *Biochem Biophys Res Commun*, 483(4), 998-1004. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.053
- Porquet, D., Andres-Benito, P., Grinan-Ferre, C., Camins, A., Ferrer, I., Canudas, A. M., . . . Pallas, M. (2015). Amyloid and tau pathology of familial Alzheimer's disease APP/PS1 mouse model in a senescence phenotype background (SAMP8). *Age (Dordr)*, 37(1), 9747. doi:10.1007/s11357-015-9747-3
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., . . . Fahrenholz, F. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*, 113(10), 1456-1464. doi:10.1172/JCI20864
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fa, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O. (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci*, 28(53), 14537-14545. doi:10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008
- Rasch, B., & Born, J. (2013). About sleep's role in memory. *Physiol Rev*, 93(2), 681-766. doi:10.1152/physrev.00032.2012
- Reinhard, C., Hebert, S. S., & De Strooper, B. (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J*, 24(23), 3996-4006. doi:10.1038/sj.emboj.7600860
- Ritchie, C., Smailagic, N., Noel-Storr, A. H., Takwoingi, Y., Flicker, L., Mason, S. E., & McShane, R. (2014). Plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta for the diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive

- impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev*(6), CD008782. doi:10.1002/14651858.CD008782.pub4
- Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Woods, A. S., Cotter, R. J., Gowing, E., & Ball, M. J. (1993). beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(22), 10836-10840.
- Ronicke, R., Mikhaylova, M., Ronicke, S., Meinhardt, J., Schroder, U. H., Fandrich, M., . . . Reymann, K. G. (2011). Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging*, *32*(12), 2219-2228. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.011
- Rowan, M. J., Klyubin, I., Cullen, W. K., & Anwyl, R. (2003). Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *358*(1432), 821-828. doi:10.1098/rstb.2002.1240
- Rujescu, D., Ingason, A., Cichon, S., Pietilainen, O. P., Barnes, M. R., Touloupoulou, T., . . . Collier, D. A. (2009). Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet*, *18*(5), 988-996. doi:10.1093/hmg/ddn351
- Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., . . . Saido, T. C. (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, *17*(5), 661-663. doi:10.1038/nn.3697
- Sajadi, A., Provost, C., Pham, B., & Brouillette, J. (2016). Neurodegeneration in an Animal Model of Chronic Amyloid-beta Oligomer Infusion Is Counteracted by Antibody Treatment Infused with Osmotic Pumps. *J Vis Exp*(114). doi:10.3791/54215
- Sara, Y., Biederer, T., Atasoy, D., Chubykin, A., Mozhayeva, M. G., Sudhof, T. C., & Kavalali, E. T. (2005). Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *J Neurosci*, *25*(1), 260-270. doi:10.1523/JNEUROSCI.3165-04.2005
- Sasaguri, H., Nilsson, P., Hashimoto, S., Nagata, K., Saito, T., De Strooper, B., . . . Saido, T. C. (2017). APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J*, *36*(17), 2473-2487. doi:10.15252/embj.201797397
- Schedel, J., Distler, O., Woenckhaus, M., Gay, R. E., Simmen, B., Michel, B. A., . . . Gay, S. (2004). Discrepancy between mRNA and protein expression of tumour suppressor maspin in synovial tissue may contribute to synovial hyperplasia in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, *63*(10), 1205-1211. doi:10.1136/ard.2003.006312
- Scheff, S. W., & Price, D. A. (2006). Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. *J Alzheimers Dis*, *9*(3 Suppl), 101-115.
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., & Serafini, T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, *101*(6), 657-669.
- Scheper, W., & Hoozemans, J. J. (2015). The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta Neuropathol*, *130*(3), 315-331. doi:10.1007/s00401-015-1462-8
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., . . . Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-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*, *2*(8), 864-870.

- Schlosser Covell, G. E., Dhawan, P. S., Lee Iannotti, J. K., Hoffman-Snyder, C. R., Wellik, K. E., Caselli, R. J., . . . Demaerschalk, B. M. (2012). Disrupted daytime activity and altered sleep-wake patterns may predict transition to mild cognitive impairment or dementia: a critically appraised topic. *Neurologist*, *18*(6), 426-429. doi:10.1097/NRL.0b013e318272f7ef
- Schmand, B., Eikelenboom, P., van Gool, W. A., & Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2012). Value of diagnostic tests to predict conversion to Alzheimer's disease in young and old patients with amnesic mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*, *29*(3), 641-648. doi:10.3233/JAD-2012-111703
- Schmued, L. C., & Hopkins, K. J. (2000). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, *874*(2), 123-130.
- Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Brecht, D. S., & Nicoll, R. A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(21), 13902-13907. doi:10.1073/pnas.172511199
- Sciacca, M. F., Kotler, S. A., Brender, J. R., Chen, J., Lee, D. K., & Ramamoorthy, A. (2012). Two-step mechanism of membrane disruption by Abeta through membrane fragmentation and pore formation. *Biophys J*, *103*(4), 702-710. doi:10.1016/j.bpj.2012.06.045
- Sepulveda, F. J., Fierro, H., Fernandez, E., Castillo, C., Peoples, R. W., Opazo, C., & Aguayo, L. G. (2014). Nature of the neurotoxic membrane actions of amyloid-beta on hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *35*(3), 472-481. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.035
- Serra-Batiste, M., Ninot-Pedrosa, M., Bayoumi, M., Gairi, M., Maglia, G., & Carulla, N. (2016). Abeta42 assembles into specific beta-barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(39), 10866-10871. doi:10.1073/pnas.1605104113
- Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., & Sabatini, B. L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci*, *27*(11), 2866-2875. doi:10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007
- Shipman, S. L., & Nicoll, R. A. (2012). A subtype-specific function for the extracellular domain of neuroligin 1 in hippocampal LTP. *Neuron*, *76*(2), 309-316. doi:10.1016/j.neuron.2012.07.024
- Sierksma, A. S., van den Hove, D. L., Pfau, F., Philippens, M., Bruno, O., Fedele, E., . . . Prickaerts, J. (2014). Improvement of spatial memory function in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice after chronic inhibition of phosphodiesterase type 4D. *Neuropharmacology*, *77*, 120-130. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.09.015
- Sipe, J. D., & Cohen, A. S. (2000). Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol*, *130*(2-3), 88-98. doi:10.1006/jsbi.2000.4221
- Smith, D. G., Cappai, R., & Barnham, K. J. (2007). The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta*, *1768*(8), 1976-1990. doi:10.1016/j.bbamem.2007.02.002
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., . . . Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*, *8*(8), 1051-1058. doi:10.1038/nn1503

- Song, Shim, S., Kim, D. H., Won, S. H., Joo, S., Kim, S., . . . Yoon, S. Y. (2014). beta-Amyloid is transmitted via neuronal connections along axonal membranes. *Ann Neurol*, *75*(1), 88-97. doi:10.1002/ana.24029
- Song, J. Y., Ichtchenko, K., Sudhof, T. C., & Brose, N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(3), 1100-1105.
- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., . . . Phelps, C. H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, *7*(3), 280-292. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.003
- Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*, *82*(4), 756-771. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.004
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem*, *82*(3), 171-177. doi:10.1016/j.nlm.2004.06.005
- Staab, T. A., Evgrafov, O., Knowles, J. A., & Sieburth, D. (2014). Regulation of synaptic nlg-1/neuroligin abundance by the skn-1/Nrf stress response pathway protects against oxidative stress. *PLoS Genet*, *10*(1), e1004100. doi:10.1371/journal.pgen.1004100
- Stogsdill, J. A., Ramirez, J., Liu, D., Kim, Y. H., Baldwin, K. T., Enustun, E., . . . Eroglu, C. (2017). Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis. *Nature*, *551*(7679), 192-197. doi:10.1038/nature24638
- Stover, K. R., Campbell, M. A., Van Winssen, C. M., & Brown, R. E. (2015). Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, *289*, 29-38. doi:10.1016/j.bbr.2015.04.012
- Strozyk, D., Blennow, K., White, L. R., & Launer, L. J. (2003). CSF Aβ₄₂ levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology*, *60*(4), 652-656.
- Suh, S. W., Han, J. W., Lee, J. R., Byun, S., Kwon, S. J., Oh, S. H., . . . Kim, K. W. (2018). Sleep and cognitive decline: A prospective nondemented elderly cohort study. *Ann Neurol*, *83*(3), 472-482. doi:10.1002/ana.25166
- Sun, Qi, J. S., & Gao, R. (2018). Physical exercise reserved amyloid-beta induced brain dysfunctions by regulating hippocampal neurogenesis and inflammatory response via MAPK signaling. *Brain Res*, *1697*, 1-9. doi:10.1016/j.brainres.2018.04.040
- Sun, B. L., Li, W. W., Zhu, C., Jin, W. S., Zeng, F., Liu, Y. H., . . . Wang, Y. J. (2018). Clinical Research on Alzheimer's Disease: Progress and Perspectives. *Neurosci Bull*. doi:10.1007/s12264-018-0249-z
- Sunderland, T., Linker, G., Mirza, N., Putnam, K. T., Friedman, D. L., Kimmel, L. H., . . . Cohen, R. M. (2003). Decreased beta-amyloid₁₋₄₂ and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA*, *289*(16), 2094-2103. doi:10.1001/jama.289.16.2094
- Suzuki, K., Hayashi, Y., Nakahara, S., Kumazaki, H., Prox, J., Horiuchi, K., . . . Iwatsubo, T. (2012). Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron*, *76*(2), 410-422. doi:10.1016/j.neuron.2012.10.003

- Tackenberg, C., & Brandt, R. (2009). Divergent pathways mediate spine alterations and cell death induced by amyloid-beta, wild-type tau, and R406W tau. *J Neurosci*, *29*(46), 14439-14450. doi:10.1523/JNEUROSCI.3590-09.2009
- Tajadini, M., Panjehpour, M., & Javanmard, S. H. (2014). Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*, *3*, 85. doi:10.4103/2277-9175.127998
- Takahashi, J. S. (2016). Molecular Architecture of the Circadian Clock in Mammals. In P. Sassone-Corsi & Y. Christen (Eds.), *A Time for Metabolism and Hormones*. Cham (CH).
- Takata, K., Kitamura, Y., Saeki, M., Terada, M., Kagitani, S., Kitamura, R., . . . Shimohama, S. (2010). Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*, *285*(51), 40180-40191. doi:10.1074/jbc.M110.142356
- Tan, C. C., Yu, J. T., & Tan, L. (2014). Biomarkers for preclinical Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, *42*(4), 1051-1069. doi:10.3233/JAD-140843
- Tanaka, H., Nogi, T., Yasui, N., Iwasaki, K., & Takagi, J. (2011). Structural basis for variant-specific neuroligin-binding by alpha-neurexin. *PLoS One*, *6*(4), e19411. doi:10.1371/journal.pone.0019411
- Tang, S. S., Ji, M. J., Chen, L., Hu, M., Long, Y., Li, Y. Q., . . . Hong, H. (2014). Protective effect of pranlukast on Abeta(1-42)-induced cognitive deficits associated with downregulation of cysteinyl leukotriene receptor 1. *Int J Neuropsychopharmacol*, *17*(4), 581-592. doi:10.1017/S1461145713001314
- Tao, C. C., Hsu, W. L., Ma, Y. L., Cheng, S. J., & Lee, E. H. (2017). Epigenetic regulation of HDAC1 SUMOylation as an endogenous neuroprotection against Abeta toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Differ*, *24*(4), 597-614. doi:10.1038/cdd.2016.161
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., . . . Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, *30*(4), 572-580. doi:10.1002/ana.410300410
- Thal, D. R., Rub, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, *58*(12), 1791-1800.
- Thal, D. R., Walter, J., Saito, T. C., & Fandrich, M. (2015). Neuropathology and biochemistry of Abeta and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, *129*(2), 167-182. doi:10.1007/s00401-014-1375-y
- Tom, S. E., Hubbard, R. A., Crane, P. K., Haneuse, S. J., Bowen, J., McCormick, W. C., . . . Larson, E. B. (2015). Characterization of dementia and Alzheimer's disease in an older population: updated incidence and life expectancy with and without dementia. *Am J Public Health*, *105*(2), 408-413. doi:10.2105/AJPH.2014.301935
- Toth, M. L., Melentijevic, I., Shah, L., Bhatia, A., Lu, K., Talwar, A., . . . Driscoll, M. (2012). Neurite sprouting and synapse deterioration in the aging *Caenorhabditis elegans* nervous system. *J Neurosci*, *32*(26), 8778-8790. doi:10.1523/JNEUROSCI.1494-11.2012

- Trillaud-Doppia, E., & Boehm, J. (2018). The Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain Is an Effector Molecule of Metaplasticity. *Biol Psychiatry*, *83*(5), 406-415. doi:10.1016/j.biopsych.2016.12.015
- Trillaud-Doppia, E., Paradis-Isler, N., & Boehm, J. (2016). A single amino acid difference between the intracellular domains of amyloid precursor protein and amyloid-like precursor protein 2 enables induction of synaptic depression and block of long-term potentiation. *Neurobiol Dis*, *91*, 94-104. doi:10.1016/j.nbd.2016.02.016
- Tristan-Clavijo, E., Camacho-Garcia, R. J., Robles-Lanuza, E., Ruiz, A., van der Zee, J., Van Broeckhoven, C., . . . Scholl, F. G. (2015). A truncating mutation in Alzheimer's disease inactivates neuroligin-1 synaptic function. *Neurobiol Aging*, *36*(12), 3171-3175. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.09.004
- Tu, S., Okamoto, S., Lipton, S. A., & Xu, H. (2014). Oligomeric Aβ-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, *9*, 48. doi:10.1186/1750-1326-9-48
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*, *70*(1), 1-32.
- Ullah, G., Demuro, A., Parker, I., & Pearson, J. E. (2015). Analyzing and Modeling the Kinetics of Amyloid Beta Pores Associated with Alzheimer's Disease Pathology. *PLoS One*, *10*(9), e0137357. doi:10.1371/journal.pone.0137357
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., . . . Brose, N. (2006). Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*, *51*(6), 741-754. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.003
- Varoqueaux, F., Jamain, S., & Brose, N. (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol*, *83*(9), 449-456. doi:10.1078/0171-9335-00410
- Villette, V., & Dutar, P. (2017). GABAergic Microcircuits in Alzheimer's Disease Models. *Curr Alzheimer Res*, *14*(1), 30-39.
- Vincent, J. B., Kolozsvari, D., Roberts, W. S., Bolton, P. F., Gurling, H. M., & Scherer, S. W. (2004). Mutation screening of X-chromosomal neuroligin genes: no mutations in 196 autism probands. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *129B*(1), 82-84. doi:10.1002/ajmg.b.30069
- Volgyi, K., Juhasz, G., Kovacs, Z., & Penke, B. (2015). Dysfunction of Endoplasmic Reticulum (ER) and Mitochondria (MT) in Alzheimer's Disease: The Role of the ER-MT Cross-Talk. *Curr Alzheimer Res*, *12*(7), 655-672.
- von Bergen, M., Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2001). Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *J Biol Chem*, *276*(51), 48165-48174. doi:10.1074/jbc.M105196200
- Vos, S. J., Xiong, C., Visser, P. J., Jasielec, M. S., Hassenstab, J., Grant, E. A., . . . Fagan, A. M. (2013). Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*, *12*(10), 957-965. doi:10.1016/S1474-4422(13)70194-7
- Wahlster, P., Niederlander, C., Kriza, C., Schaller, S., & Kolominsky-Rabas, P. L. (2013). Clinical assessment of amyloid imaging in Alzheimer's disease: a systematic review of the literature. *Dement Geriatr Cogn Disord*, *36*(5-6), 263-278. doi:10.1159/000351679
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., . . . Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit

- hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), 535-539. doi:10.1038/416535a
- Walti, M. A., Orts, J., Vogeli, B., Campioni, S., & Riek, R. (2015). Solution NMR studies of recombinant Aβ(1-42): from the presence of a micellar entity to residual beta-sheet structure in the soluble species. *ChemBiochem*, 16(4), 659-669. doi:10.1002/cbic.201402595
- Wang. (2008). Discrepancy between mRNA and protein abundance: insight from information retrieval process in computers. *Comput Biol Chem*, 32(6), 462-468. doi:10.1016/j.compbiolchem.2008.07.014
- Wang, Li, W., Benedetti, N. J., & Lee, D. H. (2003). Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *J Biol Chem*, 278(34), 31547-31553. doi:10.1074/jbc.M212532200
- Wang, Li, Y., Ni, C., & Song, G. (2017). Honokiol Attenuates Oligomeric Amyloid beta1-42-Induced Alzheimer's Disease in Mice Through Attenuating Mitochondrial Apoptosis and Inhibiting the Nuclear Factor Kappa-B Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*, 43(1), 69-81. doi:10.1159/000480320
- Wang, Walsh, D. M., Rowan, M. J., Selkoe, D. J., & Anwyl, R. (2004). Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci*, 24(13), 3370-3378. doi:10.1523/JNEUROSCI.1633-03.2004
- Wang, Yu, L., Yang, H., Li, C., Hui, Z., Xu, Y., & Zhu, X. (2016). Oridonin Attenuates Synaptic Loss and Cognitive Deficits in an Aβ1-42-Induced Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One*, 11(3), e0151397. doi:10.1371/journal.pone.0151397
- Weller, J., & Budson, A. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res*, 7. doi:10.12688/f1000research.14506.1
- Wittenmayer, N., Korber, C., Liu, H., Kremer, T., Varoqueaux, F., Chapman, E. R., . . . Dresbach, T. (2009). Postsynaptic Neuroligin1 regulates presynaptic maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(32), 13564-13569. doi:10.1073/pnas.0905819106
- Wolf, A., Bauer, B., Abner, E. L., Ashkenazy-Frolinger, T., & Hartz, A. M. (2016). A Comprehensive Behavioral Test Battery to Assess Learning and Memory in 129S6/Tg2576 Mice. *PLoS One*, 11(1), e0147733. doi:10.1371/journal.pone.0147733
- Wolfe, M. S. (2013). Toward the structure of presenilin/gamma-secretase and presenilin homologs. *Biochim Biophys Acta*, 1828(12), 2886-2897. doi:10.1016/j.bbamem.2013.04.015
- Wu, L., Rosa-Neto, P., Hsiung, G. Y., Sadovnick, A. D., Masellis, M., Black, S. E., . . . Gauthier, S. (2012). Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Can J Neurol Sci*, 39(4), 436-445.
- Yamin, G. (2009). NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. *J Neurosci Res*, 87(8), 1729-1736. doi:10.1002/jnr.21998
- Yang, S. T., Shi, Y., Wang, Q., Peng, J. Y., & Li, B. M. (2014). Neuronal representation of working memory in the medial prefrontal cortex of rats. *Mol Brain*, 7, 61. doi:10.1186/s13041-014-0061-2

- Ylisaukko-oja, T., Rehnstrom, K., Auranen, M., Vanhala, R., Alen, R., Kempas, E., . . . Jarvela, I. (2005). Analysis of four neuroligin genes as candidates for autism. *Eur J Hum Genet*, *13*(12), 1285-1292. doi:10.1038/sj.ejhg.5201474
- Yuan, X. Z., Sun, S., Tan, C. C., Yu, J. T., & Tan, L. (2017). The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, *58*(2), 303-322. doi:10.3233/JAD-170061
- Yuki, D., Sugiura, Y., Zaima, N., Akatsu, H., Takei, S., Yao, I., . . . Setou, M. (2014). DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease. *Sci Rep*, *4*, 7130. doi:10.1038/srep07130
- Zamani, E., Parviz, M., Roghani, M., & Mohseni-Moghaddam, P. (2018). Key mechanisms underlying netrin-1 prevention of impaired spatial and object memory in Abeta1-42 CA1-injected rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. doi:10.1111/1440-1681.13020
- Zanetti, O., Solerte, S. B., & Cantoni, F. (2009). Life expectancy in Alzheimer's disease (AD). *Arch Gerontol Geriatr*, *49 Suppl 1*, 237-243. doi:10.1016/j.archger.2009.09.035
- Zeidan, A., & Ziv, N. E. (2012). Neuroligin-1 loss is associated with reduced tenacity of excitatory synapses. *PLoS One*, *7*(7), e42314. doi:10.1371/journal.pone.0042314
- Zetterberg, H., & Mattsson, N. (2014). Understanding the cause of sporadic Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*, *14*(6), 621-630. doi:10.1586/14737175.2014.915740
- Zhang, Hu, W. H., Wu, D. L., Zhang, K., & Zhang, J. G. (2015). Behavioral effects of deep brain stimulation of the anterior nucleus of thalamus, entorhinal cortex and fornix in a rat model of Alzheimer's disease. *Chin Med J (Engl)*, *128*(9), 1190-1195. doi:10.4103/0366-6999.156114
- Zhang, Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*, *4*, 3. doi:10.1186/1756-6606-4-3
- Zhang, Xu, H. J., Jiang, J. H., Han, R. W., Chang, M., Peng, Y. L., . . . Wang, R. (2015). Endomorphin-1 attenuates Abeta42 induced impairment of novel object and object location recognition tasks in mice. *Brain Res*, *1629*, 210-220. doi:10.1016/j.brainres.2015.10.028
- Zhao, Y., & Zhao, B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*, *2013*, 316523. doi:10.1155/2013/316523

Annexe 1 : Tableaux des anticorps et ensembles amorces

Tableau 1 : Information sur les anticorps utilisés pour le western blot et l'IF

Anticorps	Hôte	Utilisation	Compagnie	Cat. No.	Dilution	Primaire ou secondaire
Neuroigin-1 Clone 1C9.1	Souris	Western Blot	Millipore	MABN742	1 :1000	Primaire
Neuroigin-1 Clone 4C12	Souris	Western Blot	Synaptic System	129 111	1 :1000	Primaire
GAPDH (D16H11) XP	Lapin	Western Blot	Cell Signaling	5174	1 :1000	Primaire
HRP-linked antibody	Lapin	Western Blot	Cell Signaling	7074	1 :1000	Secondaire
HRP-linked antibody	Souris	Western Blot	Cell Signaling	7076	1 :1000	Secondaire
IRDye 800CW	Lapin	Western Blot	LiCor	925-32211	1 :15000	Secondaire
IRDye 680RD	Souris	Western Blot	LiCor	925-68070	1 :15000	Secondaire
NeuN (D4G40) XP	Lapin	IF	Cell Signaling	24307	1:1000	Primaire
Alexa Fluor 488 Conjugate	Lapin	IF	Cell Signaling	4340	1:1000	Secondaire

Tableau 2 : Information sur les ensembles d'amorces utilisé pour le qPCR

Gène	Sens	Compagnie	Séquence (5'-3')
Actine	Fwd	Operon	CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT
Actine	Rev	Operon	CACAGCCTGGATGGCTACGT
Actine	Probe	Operon	[6-FAM]TTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATG[TAMRA-6-FAM]
GusB	Fwd	Operon	ACGGGATTGTGGTCATCGA
GusB	Rev	Operon	TGACTCGTTGCCAAAACCTCTGA
GusB	Probe	Operon	[6-FAM]AGTGTCCCGGTGTGGGCATTGTG[TAMRA-6-FAM]
NL-1A	Fwd	Microsynth	ACGGTGCTGAAGATGAAG
NL-1A	Rev	Microsynth	CAGTACCTTCCATGTAAGAG GAGAATGTACCTTCCATGAC
NL-1A	Probe	Eurogentec	6FAM TCC-CAA-ACC-AGT-GAT-GGT-GTA-CAT-CCA BHQ1
NL-1NA	Fwd	Microsynth	GGATGTGGTTTCATCATAAC
NL-1NA	Rev	Microsynth	TGTCCCGAATATCATCTTC GAAGATGATATTCGGGAGA
NL-1NA	Probe	Eurogentec	6FAM TCC-AAG-ACC-AGA-GTG-AAG-ACT-GTC BHQ1
NL-1B	Fwd	Microsynth	GGTAACCGTTGGAGCAATTCA
NL-1B	Rev	Microsynth	AACAGCCCTTCCAGCTGG CCAGCTGGAAAGGGCTGTT
NL-1B	Probe	Eurogentec	6FAM-CCA-AAG-GAC-TTT-TTC-AAC-GAG-CAA-TAG-CTC-A BHQ1
NL-1NB	Fwd	Microsynth	CACTGTGTTTGGATCAGG
NL-1NB	Rev	Microsynth	AAAAGTCCTTCAGAATAATGGG
NL-1NB	Probe	Eurogentec	6FAM GGT-TCA-TGT-GTC-AAC-CTG-CTG-ACT BHQ1
NL-1C	Fwd	Microsynth	TCCTTGCAATTTCTCCAAGA
NL-1C	Rev	Microsynth	TTGGGTTTGGTATGGATGAA AAGTAGGTATGGTTTGGGTT
NL-1C	Probe	Eurogentec	6FAM TGG-TGA-CCC-AAA-TCA-ACC-AGT-TCC BHQ1

Rps9	Fwd	operon	TTGACCTAAAGACCATTGCACTTC
Rps9	Rev	operon	TTCTCATGATGACTGCAGCAA
Rps9	Probe	operon	[6-FAM]TGCAAGAAATGCTGAATATAATCCCAAGCG[TAMRA-6-FAM]
TBP	Fwd	operon	TTGACCTAAAGACCATTGCACTTC
TBP	Rev	operon	TTCTCATGATGACTGCAGCAA
TBP	Probe	operon	[6-FAM]TGCAAGAAATGCTGAATATAATCCCAAGCG[TAMRA-6-FAM]

Annexe 2 – Figures supplémentaire

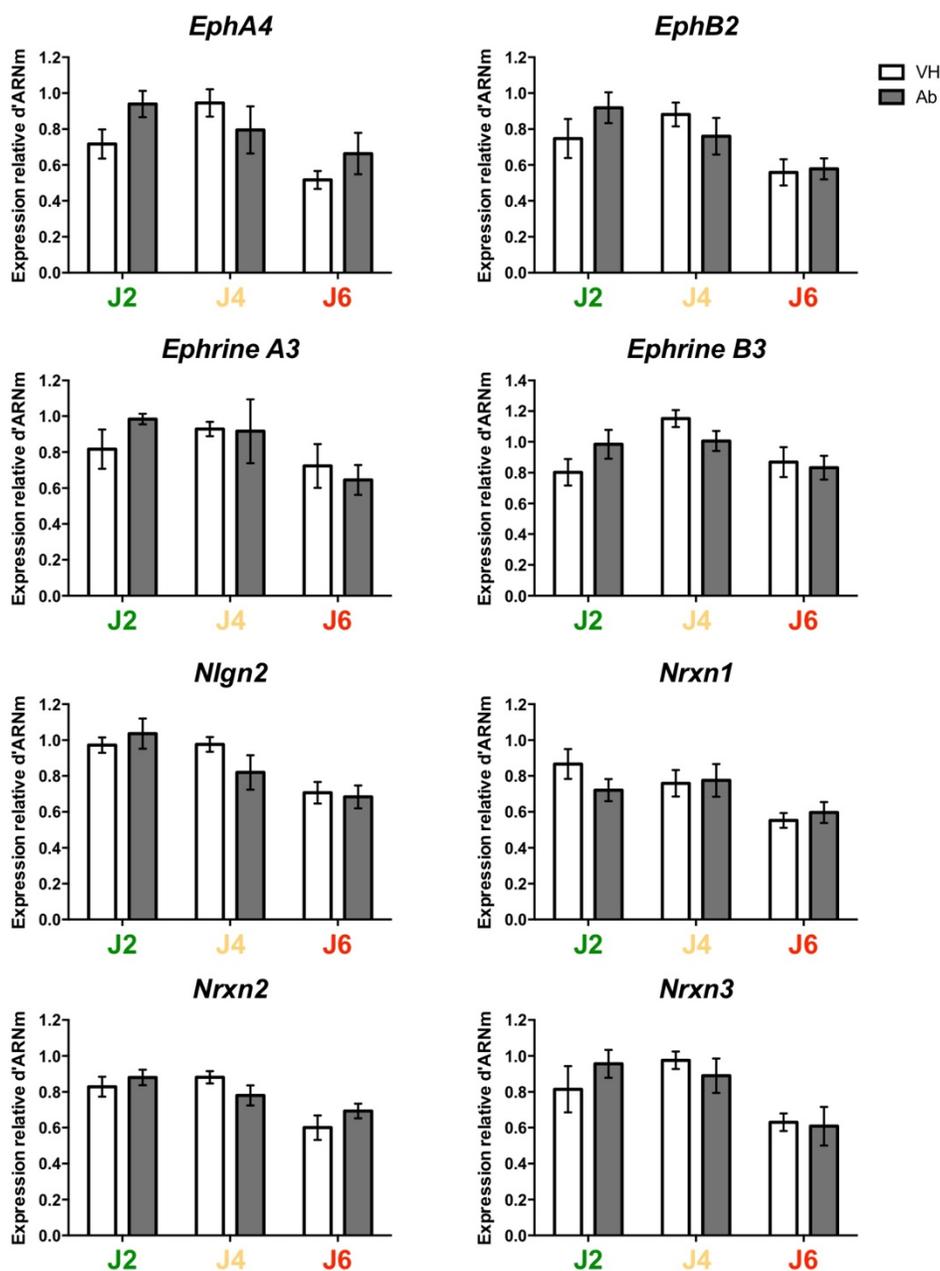


Figure supplémentaire 1 : Expression de l'ARNm de molécules d'ancrages en réponse aux injections chroniques d'Aβ₁₋₄₂ Niveau d'expression d'autres molécules synaptiques lors des injections chroniques hippocampique d'Aβ₁₋₄₂ lors de l'objectif 1. Aucun changement n'a été observés pour tous les gènes quantifiés présumant un effet relativement spécifique sur NL-1.

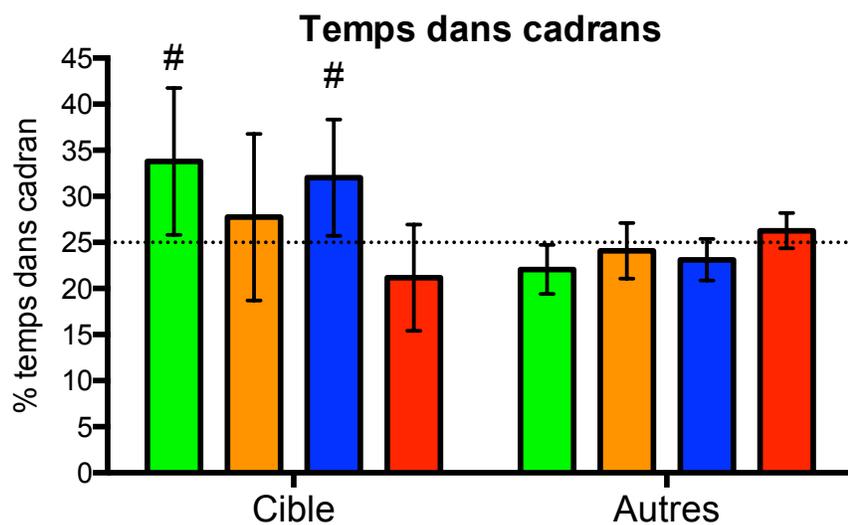


Figure supplémentaire 2 : Résultats de l'IC95 lors de la piscine de Morris Graphique illustrant les barre d'erreurs de l'IC95 qui permet d'affirmer que les groupes WT VH (vert) et KO VH (bleu) ont un pourcentage de temps dans le cadran significativement plus grande que le 25% de chance qui correspond à la ligne pointillé sur le graphique