

ÉCOLE DOCTORALE des sciences de la vie et de la santé (414)

INCI, CNRS UPR 3212

THÈSE présentée par :

Virginie Gilson

soutenue le : 05 juillet 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

**Interaction du peptide beta amyloïde avec les
membranes plasmiques cellulaires**

THÈSE dirigée par :

Jean De Barry DR, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Serge Bakchine PUPH chef de service au CHU de REIMS, université champagne ardennes

Tangui Maurice DR2 CNRS, Université de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Vincent Lelièvre Président du jury, professeur, université de Strasbourg



Université de Strasbourg

Ecole doctorale des sciences de la vie

Doctorat de neurosciences

Interaction du peptide beta-amyloïde avec les membranes plasmiques

thèse de doctorat

Thèse effectuée sous la direction du Dr Jean de Barry

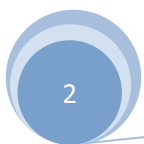
Avec le soutien de la société IHD et de la Région Alsace

Virginie GILSON

Soutenue publiquement le 5 juillet 2013

Composition du jury :

Pr. Serge Bakchine	(Rapporteur externe)
Pr. Frédéric Blanc	(Membre invité)
Dr. Jean de Barry	(Directeur de thèse)
Pr. Vincent Lelièvre	(Président du jury)
Dr. Chantal Mathis	(Membre invité)
Dr. Tangui Maurice	(Rapporteur externe)



Note importante :

Certaines données présentées dans ce manuscrit font l'objet de brevets ou de publications scientifiques en cours de préparation. La diffusion de ce document est par conséquent restreinte.

Merci de votre compréhension

Table des matières

Listes des figures et tableaux	9
Abréviations	13
1. Introduction	19
1.1. La maladie d'Alzheimer de 1906 à nos jours	19
1.1.1. Le premier cas d'Alois Alzheimer	19
1.1.2. Démence présénile ou démence sénile précoce?	19
1.1.3. L'hypothèse cholinergique	21
1.1.4. A la découverte du peptide β -amyloïde et de la protéine Tau	25
1.1.5. L'ère de la génétique	25
1.1.6. Des plaques séniles aux oligomères $A\beta$	33
1.2. Enjeux socio-économiques	33
1.2.1. Prévalence de la maladie d'Alzheimer	33
1.2.2. Facteurs de risque	35
1.2.3. Impact économique	39
1.3. Description de la maladie d'Alzheimer	41
1.3.1. Définitions	41
1.3.2. Symptômes cliniques	45
1.3.3. Anatomopathologie	53
1.3.4. Propagation des lésions neuropathologiques et progression de la maladie	59
1.3.5. Maladie d'Alzheimer et maladies à prions : une pathogénie similaire	61
1.3.6. Diagnostiquer et suivre l'évolution de la maladie d'Alzheimer : les biomarqueurs	69
1.4. La protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer	111
1.4.1. Caractéristiques de la protéine Tau	111
1.4.2. Phosphorylation	113
1.4.3. Agrégation	117
1.4.4. Conséquences sur le trafic axonal	119
1.5. Synthèse du peptide β-amyloïde	119
1.5.1. Métabolisme de APP	119
1.5.2. Monomères, oligomères et fibrilles : les trois états du peptide $A\beta$	123
1.5.3. Facteurs influant sur l'agrégation du peptide $A\beta$	127
1.5.4. Dégradation et clairance	129
1.6. Interrelation entre la voie Tau et la voie amyloïde	131
1.7. Cytotoxicité du peptide $A\beta$	133
1.7.1. Réaction astrocytaire	133
1.7.2. Microglie et neuroinflammation	135
1.7.3. Stress oxydatif	137
1.7.4. Activation des caspases	139
1.7.5. Synaptotoxicité	141
1.8. Hypothèses pour le mode d'action des oligomères	143

1.8.1.	Troubles de l'homéostasie calcique _____	143
1.8.2.	Insertion d'un canal amyloïde dans la membrane plasmique _____	145
1.8.3.	Interaction avec un récepteur membranaire et ouverture de canaux calciques _____	145
1.8.4.	Libération des stocks de calcium intracellulaire _____	149
1.9.	Modèles d'étude de la maladie d'Alzheimer _____	149
1.9.1.	Lignées cellulaires _____	149
1.9.2.	Cultures primaires _____	151
1.9.3.	Modèles animaux _____	153
1.10.	Problématiques _____	157
2.	<i>Partie 1 : Interaction du peptide Aβ avec les membranes plasmiques cellulaires et réponse calcique _____</i>	161
2.1.	Liaison du peptide Aβ sur les membranes plasmiques _____	161
2.1.1.	Cellules PC12 _____	161
2.1.2.	Cultures primaires d'hippocampes de souris _____	163
2.2.	Les oligomères Aβ_{1-42} induisent une augmentation de la [Ca²⁺]_i _____	165
2.2.1.	Cellules PC12 _____	167
2.2.2.	Neurones _____	169
2.2.3.	Astrocytes _____	171
2.3.	L'augmentation de la [Ca²⁺]_i dépend de l'activation des récepteurs NMDA _____	175
2.3.1.	Réponse calcique induite par le NMDA _____	177
2.3.2.	Réponse calcique induite par A β_{1-42} en présence d'inhibiteurs des récepteurs NMDA _____	179
2.4.	Discussion et perspectives _____	185
2.4.1.	Interaction du peptide A β_{1-42} avec les membranes plasmiques _____	185
2.4.2.	Le peptide A β_{1-42} induit des variations de la [Ca ²⁺] _i dans les cellules PC12, les neurones et les astrocytes _____	191
3.	<i>Partie 2 : Effet des faibles concentrations de peptide Aβ_{1-42} sur son adhésion sur la membrane plasmique et sur la réponse calcique induite par les oligomères Aβ_{1-42}. _____</i>	219
3.1.	Analyse biochimique des solutions appliquées sur les cellules _____	219
3.2.	Cellules PC12 _____	223
3.2.1.	Imagerie calcique _____	223
3.2.2.	Immunocytochimie _____	225
3.3.	Cultures primaires _____	227
3.3.1.	Imagerie calcique _____	227
3.3.2.	Immunocytochimie _____	231
3.4.	Discussion et perspectives _____	237
3.4.1.	Le traitement chronique favorise la formation et/ou l'adhésion des oligomères A β sur la membrane plasmique des cellules PC12, des neurones et des astrocytes _____	237
3.4.2.	Le traitement chronique augmente-t-il l'expression membranaire des récepteurs NMDA-NR2B et /ou la libération de calcium intracellulaire dans les cellules PC12 ? _____	241
3.4.3.	Le traitement chronique entraînerait-il une désensibilisation des récepteurs NMDA dans les neurones primaires ? _____	247
3.4.4.	Hypothèses expliquant la disparités des résultats obtenus dans les cellules PC12 et les neurones. _____	255

4. Partie 3 : Caractérisation d'une sonde peptidique	261
4.1. Présentation de la sonde amyloïde A1	261
4.2. Agrégation de la sonde	263
4.2.1. Application de la méthode de Lambert à la sonde A1	263
4.2.2. Influence de la concentration de la sonde A1	267
4.2.3. Influence du pH	269
4.3. Adhésion de la sonde A1 sur la membrane plasmique des neurones	269
4.4. Réponse calcique induite par la sonde A1	271
4.5. Discussion	273
4.5.1. Comparaison entre le peptide A β et la sonde A1	273
4.5.2. Application clinique : un test sanguin pour le diagnostique de la maladie d'Alzheimer	275
5. Conclusion finale	281
6. Matériels et Méthodes	289
6.1. Culture de cellules PC12	289
6.2. Cultures primaires	290
6.3. Préparation de solutions enrichies en monomères ou oligomères et traitements peptidiques	291
6.4. Immunocytochimie	292
6.4.1. Cellules PC12	292
6.4.2. Cultures primaires	293
6.4.3. Anticorps primaires et secondaires	294
6.5. Imagerie calcique	295
6.6. Western blot	297
6.7. Analyses statistiques	298
7. Bibliographie	299
8. Annexes	331

Listes des figures et tableaux

- Figure 1** Dessins de dégénérescences neurofibrillaires par Alois Alzheimer. p. 16
- Figure 2** Estimations de la prévalence des démences dans les différentes régions du monde. p. 30
- Figure 3** Biomarqueurs associés aux trois phases de la maladie d'Alzheimer. p. 38
- Figure 4** Atrophie cérébrale associée à la maladie d'Alzheimer. p. 50
- Figure 5** Lésions neuropathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. p. 52
- Figure 6** Propagation des lésions neuropathologiques dans le tissu cérébral. p. 56
- Figure 7** Voie d'agrégation de la protéine Prion. p. 60
- Figure 8** Différentes voies de transmission cellulaire des agrégats protéiques. p. 64
- Figure 9** Détermination du stade de la maladie d'Alzheimer en TEP-PiB ou en IRM structurelle. p. 72
- Figure 10** Scans TEP-FDG d'un patient Alzheimer. p. 84
- Figure 11** La protéine Tau et ses sites de phosphorylation. p. 110
- Figure 12** Agrégation de la protéine Tau et formation des dégénérescences neurofibrillaires. p. 114
- Figure 13** Trafic intraneuronal de la protéine APP. p. 116
- Figure 14** Voies amyloïdogène et non amyloïdogène. p. 118
- Figure 15** Protéine APP et sites de clivage des sécrétases. p. 120
- Figure 16** Les trois formes du peptide A β . p. 122
- Figure 17.** Schéma récapitulatif des différentes hypothèses pour le mode d'action des oligomères A β . p. 142
- Figure 18** Le récepteur NMDA et ses sites de liaison. p. 144
- Figure 19** Liaison des oligomères A β_{1-42} aux membranes plasmiques des cellules PC12. p. 158

- Figure 20** Liaison du peptide $A\beta_{1-42}$ sur la membrane plasmique des neurones hippocampiques. p. 160-161
- Figure 21** Liaison du peptide $A\beta_{1-42}$ sur la membrane plasmique des neurones hippocampiques. p. 162-163
- Figure 22** L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules PC12 est induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$. p. 164
- Figure 23** L'amplitude de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par le peptide $A\beta_{1-42}$ dans les cellules PC12 dépend de la concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ injectée. p. 164
- Figure 24** Augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les neurones primaires induite par $A\beta_{1-42}$. p. 166-167
- Figure 25** Génération d'oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ et augmentation de l'amplitude et de la fréquence des oscillations calciques préexistantes dans les astrocytes traités avec $A\beta_{1-42}$. p. 168-169
- Figure 26** Le NMDA induit une augmentation régulière de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules PC12 inhibée par les antagonistes des récepteurs NMDA. p. 174
- Figure 27** Le NMDA induit une augmentation régulière de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules PC12. p. 174
- Figure 28** La réponse calcique induite dans les cellules PC12 par les oligomères est inhibée par les antagonistes des récepteurs NMDA. p. 176
- Figure 29** La réponse calcique induite les oligomères $A\beta_{1-42}$ dans les neurones primaires par est inhibée par les antagonistes des récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B. p. 180
- Figure 30** Analyse biochimique des solutions chronique et aigue. p. 218
- Figure 31** L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des cellules PC12 induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$ augmente lorsque les cultures sont préincubées en présence d'une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$. p. 220
- Figure 32** La préincubation des cellules PC12 avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ facilite la formation et/ou l'adhésion des oligomères $A\beta_{1-42}$ sur les membranes plasmiques. p. 224

- Figure 33** L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des neurones induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$ est partiellement inhibée lorsque les cultures primaires de cortex sont préincubées en présence d'une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$. p. 226
- Figure 34** La préincubation des cultures primaires avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ facilite la formation et/ou l'adhésion des oligomères $A\beta_{1-42}$ sur les membranes plasmiques. p. 230-231
- Figure 35** Surexpression membranaire des récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B dans les cellules PC12 traitées avec le peptide $A\beta_{1-42}$. p. 240
- Figure 36** Structure de la sonde peptidique A1. p. 258
- Figure 37** Spectre d'émission de fluorescence de la sonde amyloïde A1. p. 258
- Figure 38** Au contact de la membrane plasmique des cellules PC12 le spectre d'émission de la sonde peptidique A1 se déplace vers des longueurs d'ondes inférieures. p. 260
- Figure 39** La méthode de Lambert favorise l'oligomérisation de la sonde amyloïde A1. p. 262
- Figure 40** Influence de la concentration sur l'agrégation de la sonde amyloïde A1. p. 264
- Figure 41** Influence du pH de la solution sur l'agrégation de la sonde amyloïde A1. p. 266
- Figure 42** Liaison de la sonde A1 aux membranes plasmiques des neurones corticaux. p. 268
- Figure 43** Les oligomères de sonde A1 induisent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des neurones partiellement inhibée lorsque les cultures primaires de cortex sont pré-incubées en présence d'une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ natif. p. 270
- Figure 44** La préincubation des cellules PC12 avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ facilite l'adhésion de la sonde A1 sur les membranes plasmiques. p. 272
- Figure 45** La pré-incubation des globules rouges humains avec du peptide $A\beta_{1-42}$ facilite l'adhésion de la sonde A1 sur les membranes plasmiques (spectrofluorimétrie). p. 274
- Figure 46** Le test amyloïde permet de discriminer les souris TASTPM malades des souris sauvages saines. p. 276

Figure 47 La spécificité et la sensibilité du test amyloïde augmente avec l'âge des souris TASTPM et sauvages. p. 278

Figure 48 Le test amyloïde permet de détecter la maladie d'Alzheimer avec une sensibilité de plus de 83% à et une spécificité de plus de 82%. p. 278

Abréviations

- [Ca⁺⁺]_i** : concentration calcique intracellulaire
- 5,7-DCK** : Acide 5,7-dichlorokynurénique
- AA** : Acide Aminé
- ADAS-Cog** : Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognitive evaluation
- ADDL** : Aβ-derived diffusible ligand
- ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- AFM** : Atomic Force Microscopy (microscopie de force atomique)
- Ag Aβ** : Traitement aigu avec du peptide Aβ
- AMPA** : Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid
- ApoE** : Apo lipoprotéine E
- APP** : Amyloid Precursor Protein
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNmi** : micro ARN
- ATP** : Adénosine triphosphate
- Aβ** : peptide β-amyloïde
- BACE1** : β-site APP cleaving enzyme (β-sécrétase)
- BHE** : Barrière Hémato-encéphalique
- BSA** : Albumine sérique bovine
- CDR** : Clinical Dementia Rating
- Ch Aβ** : Traitement chronique avec du peptide Aβ
- ChAT** : choline acétyl transférase
- CICR** : Calcium induced calcium release (libération de calcium induite par le calcium)
- D-APV (ou D-AP5)** : D-(-)-2-amino-5-phosphonovalerate
- DIV** : Day in vitro (jours in vitro)
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- DNF** : Dégénérescence NeuroFibrillaire
- DSM-IV** : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV edition
- GFAP** : Glial fibrillary acidic protein (marqueur des astrocytes)
- GFAP** : glial fibrillary protein

GtS : Sérum de chèvre

GWAS : Genome-wide association study (étude d'association dans l'ensemble du génome)

HFIP : Hexafluoroisopropanol

HRP : Horse raddish peroxidase

IgG ou IgY : Immunoglobuline G ou Y

IP3 : Inositoltriphosphate

IRM: imagerie par résonance magnétique

IS : Indice spectral

LCR : Liquide céphalo-rachidien

MA : Maladie d'Alzheimer

MADP : Maladie d'Alzheimer à début précoce

MADT : Maladie d'Alzheimer à début tardif

MAP : Microtubule Associated Protein (Protéine Associée aux Microtubule)

MAP2 : Microtubule associated protein 2 (marqueur des neurones)

MCI : Mild Cognitive Impairment (troubles cognitifs légers)

MMSE : Mini Mental State Examination

nbM : Noyau basal de Meynert

NGF : Nerve growth factor

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NMDAR : Récepteur NMDA

NO : Oxyde nitrique

NTP : Neural Thread Protein

OA β : Oligomère A β

PBS : Solution tampon phosphate

PHF : Paired Helical Filament (filament en double hélice)

PiB: Pittsburgh compound B

PIP2 : Phosphoinositol diphosphate

PKC : Protéine Kinase C

PLC : Phospholipase C

PLT : Potentialisation à long terme

PrP^c : Protéine Prion Cellulaire

PrP^{sc} : Protéine Prion Scrapie (anormale)

PS : Plaque Sénile

PS1 : Presenilin 1

PSD-95 : Post synaptique density-95 (protéine localisée dans l'élément post synaptique)

RE : Réticulum endoplasmique

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RPE : Résonance paramagnétique électronique

RyR : Récepteur Ryanodine

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SNC : Système nerveux central

SPECT: Single-photon emission computed tomography

SRM : Spectrométrie par résonance magnétique

STEP : Striatal enriched tyrosine phosphatase

Tau-p : Taux de protéine Tau phosphorylée

Tau-t : Taux de protéine Tau total

TEP : Tomographie par Emission de Positons

TTX : Tetrodotoxine

WT : Wild type (souris sauvages)



Figure 1 Dessins de dégénérescences neurofibrillaires par Alois Alzheimer. [1]

1. Introduction

1.1. La maladie d'Alzheimer de 1906 à nos jours

1.1.1. Le premier cas d'Alois Alzheimer

L'histoire de la maladie d'Alzheimer commence en 1901, lorsque Alois Alzheimer, médecin psychiatre au *Stadtische heilanstalt für Irre und Epileptische* (asile municipal pour maladies mentales et épilepsies), rencontre Auguste Deter alors âgée de 51 ans. Après quelques entretiens avec sa patiente, Alzheimer constate qu'elle souffre de paranoïa, d'une extrême confusion, de désorientation dans le temps et l'espace, d'une détérioration rapide des capacités mnésiques, de troubles du sommeil et d'hallucinations. Son état s'est progressivement dégradé au cours des cinq années où elle fût internée. A sa mort en 1906, Alzheimer réalise des coupes histopathologiques de son cerveau en utilisant la coloration argentique de Bielschowsky et observe dans certaines cellules des agrégats de neurofibrilles aisément discernables de par leur épaisseur et leur coloration particulière (Figure 1) et des petits foyers miliars extracellulaires constitués d'une substance étrange disséminés dans le cortex [1-4].

1.1.2. Démence présénile ou démence sénile précoce?

Lorsque Alzheimer présente ses résultats en 1906 lors de la 52^e réunion de la Société des psychiatres de l'Allemagne du sud-ouest [5], il parle d'un « processus pathologique particulier » sans tout à fait classer ce cas dans la catégorie des démences séniles ni évoquer la possible découverte d'une nouvelle maladie. L'incertitude persiste lorsqu'en 1909 Alzheimer et ses collaborateurs publient une étude portant sur quatre cas dont celui d'Auguste D [6]. En effet, si la plupart des symptômes observés suggèrent une démence sénile, la relative jeunesse des patients et la survenue dans certains cas de symptômes focaux tels que l'aphasie, l'agnosie, et l'apraxie contredisent cette hypothèse. En 1910 Emil Kraepelin, dans la huitième édition de son traité de psychiatrie évoque pour la première fois

le nom de « maladie d'Alzheimer » pour désigner ces cas particuliers de démence en les classant dans la catégorie des démences préséniles [7].

La question de savoir si la maladie d'Alzheimer est réellement une pathologie bien spécifique ou un simple cas particulier de démence sénile a été hautement débattue au cours de la première moitié du XXe siècle. Le doute vient du fait que les lésions décrites par Alzheimer comme étant caractéristiques de sa maladie ont précédemment été observées par d'autres neuropathologistes dans de nombreux cas de démence sénile. En effet, dès 1898 Emil Redlich observe des « scléroses miliaires », qu'il appelle également « plaques », dans le cortex d'une femme de 78 ans atteinte de démence avancée [8]. De même, en 1907, Oskar Fisher publie une étude dans laquelle il décrit dans le cortex cérébral de 12 patients sur 16 atteints de démence sénile la présence de « nécroses miliaires » comparables aux observations de Redlich [9, 10]. De plus, en 1910, Fisher décrit la présence de dégénérescences neurofibrillaires (DNF) dans 17% des cas où les cortex présentent des plaques [10, 11].

La distinction entre maladie d'Alzheimer et démence sénile est progressivement tombée en désuétude dans les années 1970 notamment grâce aux travaux de Martin Roth et de ses collaborateurs montrant que l'on retrouve des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires caractéristiques de la maladie d'Alzheimer dans la plupart des cas de démence sénile et que le développement d'une démence dépend du taux de plaques séniles retrouvé dans le cortex. [12-14]. Depuis cette période le terme « maladie d'Alzheimer » est utilisé pour désigner tous les cas de démence sénile ou présénile associés à la présence de plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires. [1-4]

1.1.3.L'hypothèse cholinergique

En 1974, Drachman et ses collaborateurs observent que l'administration d'une drogue anti cholinergique, la scopolamine, provoque chez des sujets jeunes des troubles mnésiques et cognitifs similaires à ceux observés chez des sujets âgés non déments [15]. L'idée que la MA serait liée à un dysfonctionnement de la neurotransmission cholinergique commence alors à

émerger ; c'est ce qu'on appelle l'hypothèse cholinergique [16, 17]. L'analyse post mortem de tissus cérébraux prélevés chez des patients atteints de la MA a par la suite montré une forte diminution de l'activité de l'enzyme responsable de la synthèse de l'acétylcholine dans les neurones cholinergiques, la choline acétyltransférase (ChAT), dans le cortex et l'hippocampe de ces patients. Cette baisse d'activité est associée à une importante réduction du nombre de neurones cholinergiques appartenant au noyau basal de Meynert (nbM) localisé dans le cerveau antérieur basal qui projettent leurs axones vers le cortex et l'hippocampe, des structures fortement impliquées dans le fonctionnement de la mémoire [18-20]. Par ailleurs, Perry et al. montrent en 1978 qu'il existe une bonne corrélation entre le niveau d'activité de la ChAT, la densité des plaques amyloïdes et la sévérité de la maladie évaluée grâce au score réalisé par les patients au Mini-Mental State Examination (MMSE), un test neuropsychologique (cf. § 1.3.1.3) [21].

Suite à ces découvertes les premières tentatives pour modéliser la MA chez l'animal ont vu le jour. Les chercheurs ont en effet tenté de reproduire chez des rongeurs les déficits mnésiques observés au cours de la MA en réalisant des lésions au niveau du noyau basal magnocellulaire (l'équivalent du nbM chez l'Homme) par injection stéréotaxique d'excitotoxines non spécifiques telles les acides iboténique ou quisqualique [22] ou d'une immunotoxine, la 192-IgG-saporine, visant uniquement les neurones cholinergiques [23, 24]. Les résultats obtenus par différentes équipes sont très variables mais de façon générale une lésion spécifique des neurones cholinergiques innervant l'hippocampe et le cortex provoque des déficits de la mémoire de travail notamment au cours de l'acquisition [25, 26] et des déficits attentionnels [27]. (Revue [28])

Les recherches menées sur cette hypothèse cholinergique ont abouti au développement de traitements. La plupart des molécules ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché, telles que la tacrine, le donépézil, la rivastagmine ou la galantamine, sont des inhibiteurs de la cholinestérase, une enzyme dont le rôle est d'hydrolyser l'acétylcholine libérée dans la fente synaptique [29]. Le but de ces traitements est de compenser la perte des neurones en augmentant la quantité d'acétylcholine dans la fente synaptique des neurones survivants. Ces traitements ne peuvent ni empêcher ni retarder le développement de la MA même s'ils sont pris pendant le stade prodromal [30], cependant s'ils sont prescrits au cours des

premiers stades de la maladie ils peuvent atténuer les symptômes et ralentir le déclin des facultés cognitives [31-33].

1.1.4.A la découverte du peptide β -amyloïde et de la protéine Tau

La structure et la composition des lésions observées dans le cerveau des patients atteints de MA ont été progressivement déterminées au cours de la seconde moitié du XXe. Dans un premier temps la microscopie électronique a révélé que les plaques séniles (PS) sont composées d'un cœur de fibrilles amyloïdes entouré d'une couronne composée de fibrilles et de débris cellulaires et notamment de dendrites et d'axones contenant un nombre anormalement élevé de neurofilaments [34]. En 1984 Glenner et Wong parviennent à isoler un fragment de protéine constituant les fibrilles amyloïdes et à le séquencer partiellement [35]. La séquence complète du peptide β -amyloïde ($A\beta$) sera déterminée en 1985 par Masters et ses collaborateurs [36].

Les DNF quant à elles sont constituées de paires de filaments protéiques entrelacés en forme de double hélice (PHF, paired helical filament) [37, 38]. Le principal constituant de ces DNF est une protéine associée aux microtubules (MAP) nommée Tau découverte en 1975 par Weingarten et al. [39]. La présence de Tau dans les DNF a été déterminée dès 1985 grâce à des anticorps dirigés contre les PHF ou la protéine Tau [40-42], par purification [43] et par séquençage [44]. A la même époque Grundke-Iqbal et al. découvrent que les protéines Tau constituant les PHF sont anormalement phosphorylées ce qui perturbe leur fonction de stabilisation des microtubules [45]. (Revue [46])

1.1.5.L'ère de la génétique

De multiples cas de transmission familiale de la MA ont été décrits au cours du XXe siècle. La communauté scientifique s'est très rapidement rendue compte que l'identification des gènes et donc des protéines impliquées dans ces formes familiales de MA pourrait mener à une meilleure compréhension des mécanismes pathogènes de la maladie y compris dans les

cas de MA sporadique. Mais ce n'est qu'à partir des années 1980 avec l'avènement de la biologie moléculaire qu'a véritablement démarré la quête des gènes impliqués dans le développement de la maladie.

Dans un premier temps, le séquençage du peptide A β en 1985 a permis, par des méthodes de clonage, la découverte d'un gène codant pour une protéine précurseur dont le clivage abouti à la libération du peptide A β . Le gène de cette protéine aujourd'hui connue sous le nom de protéine APP (amyloid precursor protein) a été localisé sur le chromosome 21 [47]. Suite à cette découverte et à de nombreuses études de liaison génétique menées dans plusieurs familles atteintes de la forme familiale précoce de la MA (MADP cf. § 1.3.1.2) [48], le gène APP s'est imposé comme le premier gène candidat pour la MA. En 1991, le séquençage du gène APP dans le génome de ces familles a mis en évidence la survenue de mutations ponctuelles [49].

Cependant dans de nombreux cas de MADP la maladie n'est pas liée à une quelconque mutation sur le chromosome 21, ce qui implique l'existence d'autres loci potentiellement porteurs de mutations provoquant la MA [50, 51]. En 1992, Schellenberg et al. démontrent l'existence d'une liaison génétique de la MA avec le chromosome 14 [52] et en 1995 Sherrington et al. découvrent le gène *presenilin* (PSEN1 ou PS1) localisé sur le bras court du chromosome 14 [53]. La même année le gène *presenilin 2* (PSEN2 ou PS2), localisé sur le chromosome 1, est découvert grâce à sa grande homologie avec le gène PS1 [54, 55].

La grande majorité des cas de MA transmises de façon héréditaire s'expliquent par l'apparition de mutations dans les gènes APP, PS1 ou PS2 [56]. Cependant les cas de MADP sont très rares et dans la plupart des cas de MA ces gènes ne sont pas mutés. Les scientifiques ont alors recherché d'autres gènes dont le polymorphisme ou les mutations augmenteraient le risque de développer une maladie d'Alzheimer chez des individus n'ayant aucune histoire familiale de MA. Ces facteurs de risque génétiques ayant une pénétrance plus faible que les gènes APP, PS1 et PS2 ont été désignés sous le terme de gènes de susceptibilité.

Le premier gène de susceptibilité à avoir été identifié est le gène de l'Apolipoprotéine E (ApoE). En effet, le risque de développer une MA augmente avec le nombre d'allèle apoE $\epsilon 4$ présent dans le génome tandis que l'allèle $\epsilon 2$ aurait plutôt un effet neuroprotecteur [57]. La protéine encodée par le gène ApoE entre dans la composition des lipoprotéines impliquées dans le transport et le métabolisme du cholestérol [58, 59]. L'ApoE serait également l'un des acteurs essentiels de la cascade amyloïde bien que son rôle dans cette cascade ne soit pas encore clairement défini. L'ApoE a la propriété de se lier au peptide A β [60] et pourrait ainsi jouer un rôle de protéine chaperonne en favorisant la formation de feuilletts β [61] et par conséquent la formation de fibrilles et d'oligomères neurotoxiques [62]. Au niveau neuropathologique cela se traduit par une accumulation plus importante de plaques séniles (ou plaques amyloïdes) dans le cerveau des patients porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ [63]. Par ailleurs la présence d'ApoE et plus particulièrement d'ApoE4 dans le cerveau ralentirait la clairance du peptide A β au travers de la barrière hémato-encéphalique (BHE) [64]. (Revue [65-67])

Depuis 2007 de nombreuses études d'association génique dans l'ensemble du génome humain (GWAS) ont été menées afin de déterminer d'autres loci affectés par la survenue de polymorphismes de nucléotide (SNP) fréquemment retrouvés chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer à début tardif (Cf. § 1.2.1). Plusieurs loci dans lesquels se trouveraient des gènes de susceptibilité ont ainsi été identifiés. Parmi ces gènes de susceptibilité potentiels on retrouve les gènes ACE 1 (angiotensine converting enzyme 1), CH25H (cholesterol 25-hydrolase), CHRN2 (nAChR $\beta 2$ subunit), CST3 (cystatin C), GAB2 (Grb2-associated binding protein 2), LMNA (laminin A & C), MAPT (microtubule associated protein tau), PRNP (Prion Protein), SORL1 (sortilin-related receptor), TF (Transferrin) et BIN1 (bridging integrator 1) [68]. Toutefois l'association de certains de ces gènes avec la maladie d'Alzheimer est souvent faible et parfois discutable (Revue [69-72]). En revanche les gènes PICALM (phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein) [68, 73], Clu (clusterine) [68, 73, 74], et CR1 (Complement receptor 1) [68, 74, 75] se sont révélés être fortement associés à la maladie et font par conséquent l'objet d'une attention particulière.

La protéine PICALM est impliquée dans l'endocytose clathrine-dépendante et participerait notamment à l'endocytose de la protéine APP localisée dans la membrane plasmique. Une fois endocytée la protéine APP est redirigée vers les endosomes tardifs où elle est

susceptible d'être clivée par la β -sécrétase BACE1 (cf. §1.5). La modulation de l'expression du gène PICALM aurait donc un impact sur la production et la libération de peptide A β [76].

Outre son rôle dans le métabolisme du cholestérol, la clusterine, également connue sous le nom d'apolipoprotéine J, peut se lier de façon réversible aux formes solubles du peptide A β et participer ainsi à leur transport et à leur agrégation [77-80].

La protéine CR1 se retrouve majoritairement dans la membrane plasmique des érythrocytes ou sous forme soluble dans le plasma. CR1 est connu pour son rôle dans la réponse immunitaire innée. Il s'agit d'un récepteur capable de se lier à des molécules du complément activées telles que C3b par exemple. Le peptide C3b est produit par le clivage de la protéine C3 suite à l'entrée d'un pathogène dans l'organisme. Une fois libéré le peptide C3b se lie de façon covalente au pathogène et provoque son élimination en se liant au récepteur CR1. A l'instar des pathogènes classiques le peptide A β a la propriété d'activer les molécules du complément et de former avec C3b des complexes reconnus par CR1. CR1 participerait ainsi à la clairance périphérique du peptide A β [81, 82].

En conclusion, l'étude des gènes impliqués dans la maladie d'Alzheimer nous permet d'identifier les protéines impliquées dans la pathogénèse de la maladie, de reconstituer les différentes étapes de la voie métabolique physiologique, et de mieux comprendre les différents dérèglements menant au développement de la pathologie. Une meilleure appréhension de ces voies physiologiques et pathologiques faciliterait le développement d'agents thérapeutiques ciblant spécifiquement ces dysfonctionnements tout en limitant le risque d'effets secondaires. De nos jours, le fait que les gènes candidats APP, PSEN1 et PSEN2 ou les principaux gènes de susceptibilité ApoE, Picalm, Clu et CR1 identifiés codent pour des protéines impliquées dans la production, l'agrégation ou la clairance du peptide A β a conduit à la suprématie de l'hypothèse amyloïde qui stipule que le dérèglement du métabolisme de la protéine APP et la production de peptide A β est l'évènement princeps de la MA.

Global Burden of Disease region	Number of studies		Gender	Age group							Standardised prevalence ¹ , for those aged 60 and over
	Potentially eligible studies	Used in meta-analysis (age-specific, age- and gender specific)		60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90+	
ASIA											
Australasia	4	3,0	All	1.8	2.8	4.5	7.5	12.5	20.3	38.3	6.91*
Asia Pacific, High Income	22	14, 10	M	1.4	2.3	3.8	6.4	10.9	18	34.9	6.30*
			F	0.9	1.7	3.1	6.0	11.7	21.7	49.2	
			All	1.0	1.7	2.9	5.5	10.3	18.5	40.1	
Asia, East	34	34, 31	M	0.8	1.3	2.2	4.0	7.3	16.7	26.4	4.98*
			F	0.9	1.6	2.9	5.3	10.0	17.9	38.7	
			All	0.7	1.2	3.1	4.0	7.4	13.3	28.7	
Asia, South	8	7, 6	M	1.0	1.7	2.9	5.3	9.4	16.4	33.7	5.65*
			F	1.5	2.3	3.8	6.5	11	18.1	35.1	
			All	1.3	2.1	3.5	6.1	10.6	17.8	35.4	
Asia, Southeast	6	5, 2	M	1.7	2.6	4.0	6.2	9.8	15	26.4	7.63
			F	1.8	3.0	5.1	9.0	15.9	27.2	54.9	
			All	1.6	2.6	4.2	6.9	11.6	18.7	35.4	
EUROPE											
Europe, Western	56	52, 46	M	1.4	2.3	3.7	6.3	10.6	17.4	33.4	7.29*
			F	1.9	3.0	5.0	8.6	14.8	24.7	48.3	
			All	1.6	2.6	4.3	7.4	12.9	21.7	43.1	
THE AMERICAS											
North America (USA only)	11	8, 6	M	1.3	2.1	3.7	6.8	12.3	21.6	45.2	6.77*
			F	1.0	1.8	3.3	6.4	12.5	23.2	52.7	
			All	1.1	1.9	3.4	6.3	11.9	21.7	47.5	
Latin America	11	11, 10	M	1.0	1.9	3.7	7.0	13.0	24.3	55.0	8.50*
			F	1.0	2.0	4.2	8.4	16.4	32.5	79.5	
			All	1.3	2.4	4.5	8.4	15.4	28.6	63.9	

Figure 2 Estimations de la prévalence des démences dans les différentes régions du monde. La prévalence de la maladie d'Alzheimer varie entre 5 et 7 % dans la population mondiale. Elle augmente avec l'âge et est plus élevée dans la population féminine. [83]

1.1.6.Des plaques séniles aux oligomères A β

Depuis leur découverte par Alois Alzheimer en 1906, les plaques séniles, composées principalement de fibrilles A β insolubles, ont été soupçonnées d'être à l'origine de la dégénérescence des neurones. Cependant dans les années 1990 les scientifiques mettent en évidence la présence dans le cerveau des patients Alzheimer de peptides A β solubles sous forme de monomères ou d'oligomères de taille variable [84, 85] dont la quantité reflète davantage la sévérité de la pathologie que la densité des plaques séniles [86, 87]. Ces oligomères A β sont capables d'adhérer à la membrane plasmique des cellules nerveuses, notamment au niveau des synapses [85, 88], de perturber les phénomènes de plasticité synaptique telle que la potentialisation à long terme (PLT) [78] et d'altérer les performances mnésiques des animaux [89]. Les oligomères A β peuvent également augmenter la conductance des membranes de façon non spécifique [90], provoquer des mouvements calciques [91] et interagir avec des récepteurs aux neurotransmetteurs [92, 93]. Les oligomères A β se sont donc révélés être de véritables neurotoxines jouant un rôle crucial dans tous les aspects de la MA et sont actuellement au cœur de l'attention de la communauté scientifique.

1.2. Enjeux socio-économiques

1.2.1.Prévalence de la maladie d'Alzheimer

Pour mesurer l'impact d'une maladie sur une société deux outils sont fréquemment utilisés, la prévalence et l'incidence. La **prévalence** représente le pourcentage d'individus d'une population atteints par la maladie dans une période définie. La prévalence prend en compte tous les cas déclarés que le diagnostic soit récent ou non, tandis que l'**incidence** représente le nombre de nouveaux cas diagnostiqués dans une population et pour une période de temps donnée.

D'après le rapport mondial sur la maladie d'Alzheimer publié en 2009 [83], la prévalence moyenne de la maladie d'Alzheimer chez les 60 ans et plus varie entre 5 et 7% selon les

régions du monde (Figure 2). En Europe de l'ouest par exemple la prévalence globale est d'environ 7,29%. D'autre part, la prévalence de la MA a deux particularités, elle augmente de façon exponentielle avec l'âge et est plus élevée dans la population féminine (Figure 2). En effet, prenons pour l'exemple dans la population d'Europe de l'ouest des individus appartenant à trois tranches d'âge 60-64 ans, 75-79 ans et 90 ans et plus. Les résultats montrent que la prévalence est égale à 1,4 % pour les hommes et 1,9 % pour les femmes de 60 à 64 ans, à 6,3 % pour les hommes et 8,6 % pour les femmes de 75 à 74 ans et à 33,4 % pour les hommes et 48,3 % pour les femmes de 90 ans et plus.

1.2.2.Facteurs de risque

L'étiologie de la maladie d'Alzheimer est extrêmement complexe. L'élément princeps provoquant le déséquilibre entre la voie non amyloïdogène et la voie amyloïdogène à l'origine de la maladie n'est toujours pas connu, en revanche plusieurs facteurs augmentant le risque de développer la maladie ont été identifiés. Ces facteurs sont d'origine génétique, ce sont les gènes de susceptibilité (cf. § 1.1.5), ou environnementale. Tous ces facteurs de risque ont un impact sur la prévalence de la MA. Une meilleure connaissance des facteurs de risques environnementaux est donc essentielle pour la mise en place de stratégies préventives visant à réduire autant que possible la prévalence de la MA.

L'âge est le principal facteur de risque pour la MA. Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent la prévalence de la MA augmente de façon exponentielle avec l'âge de la population [83] (Figure 2).

Nous avons également évoqué le sexe comme un facteur de risque important pour la MA. Selon les statistiques [83], pour une tranche d'âge donnée les femmes ont en effet plus de risque de développer une MA que les hommes (Figure 2). Cet effet est probablement lié à la chute brutale de la sécrétion des hormones sexuelles, œstrogènes et progestérone, au moment de la ménopause chez la femme, tandis que chez l'homme la sécrétion de testostérone diminue graduellement. Or les œstrogènes exercent un effet neuroprotecteur. Au cours de la MA, ils protègent en effet les neurones contre les effets cytotoxiques du

peptide A β [94-96] et limitent l'accumulation d'A β dans le milieu extracellulaire en favorisant la voie non amyloïdogène et le clivage de la protéine APP par l' α -sécrétase [97-99]. C'est pourquoi des thérapies hormonales mimant l'effet neuroprotecteur des œstrogènes et de la testostérone sont à l'étude pour la prévention de la MA [100, 101]. (Revue [102])

Des facteurs cardiovasculaires tels que l'hypertension [103, 104], le diabète [105-107], et l'hypercholestérolémie [108] augmentent également le risque de développer la maladie. Des études épidémiologiques se sont intéressées à l'éventuel effet préventif de traitements antihypertenseurs et hypocholestérolémiants (statines). Quelques études ont observé une réduction modérée de la prévalence de la maladie chez les patients traités [109-111], cependant la plupart des études n'ont relevé aucun effet préventif associé à ces traitements [108, 112-114]. La disparité des résultats observés dans ces différentes études pourrait s'expliquer par l'existence d'une fenêtre d'intervention restreinte. Il est effectivement possible que l'effet préventif de ces traitements ne s'exerce que s'ils sont administrés à une tranche d'âge ou à un stade pathologique particulier.

De même certains facteurs sociaux et certains modes de vie constituent des facteurs de risque pour la MA. Le risque de développer la maladie est par exemple plus élevé chez les fumeurs [115-117]. A contrario la pratique quotidienne d'exercices physiques [118-121] et cognitifs [119, 122, 123], et un niveau d'éducation élevé [122, 124, 125] sont des facteurs protecteurs vis-à-vis de la MA.

1.2.3.Impact économique

La MA est la première cause de démence dans le monde : en 2010 on estimait le nombre de personnes vivant avec une démence de type Alzheimer à près de 35,6 millions et, avec le vieillissement de la population mondiale, ce chiffre continue d'augmenter. De plus la maladie d'Alzheimer est une maladie extrêmement incapacitante, qui affecte tous les aspects de la vie quotidienne et qui demande une prise en charge très lourde des patients. C'est pourquoi les dépenses liées à cette maladie de part le monde sont faramineuses. Dans un rapport mondial sur la maladie d'Alzheimer publié en 2010, on estimait ces dépenses à près de 604 milliard de dollars par an [124]. A l'heure actuelle plus de 70 % de cette somme est dépensée dans les pays à haut revenus (Europe de l'ouest et Amérique du nord), bien que les deux tiers des personnes atteintes de démences vivent dans les pays à faibles et moyens revenus. Ceci s'explique par le fait que dans ces pays à faibles et moyens revenus la prise en charge des patients repose essentiellement sur les soins prodigués par les familles, donc difficilement quantifiable d'un point de vue économique. Dans les années à venir il faudra donc s'attendre à une augmentation de ces dépenses associée à une amélioration de la prise en charge des patients dans les pays à revenus faibles et moyens.

Les dépenses liées à la maladie d'Alzheimer se répartissent selon plusieurs catégories:

- Les dépenses directes liées à la prise en charge médicale des patients.
- Les dépenses liées à la prise en charge sociale des patients.
- Les coûts indirects liés à perte de productivité des patients ou plus fréquemment de membres de leur famille.

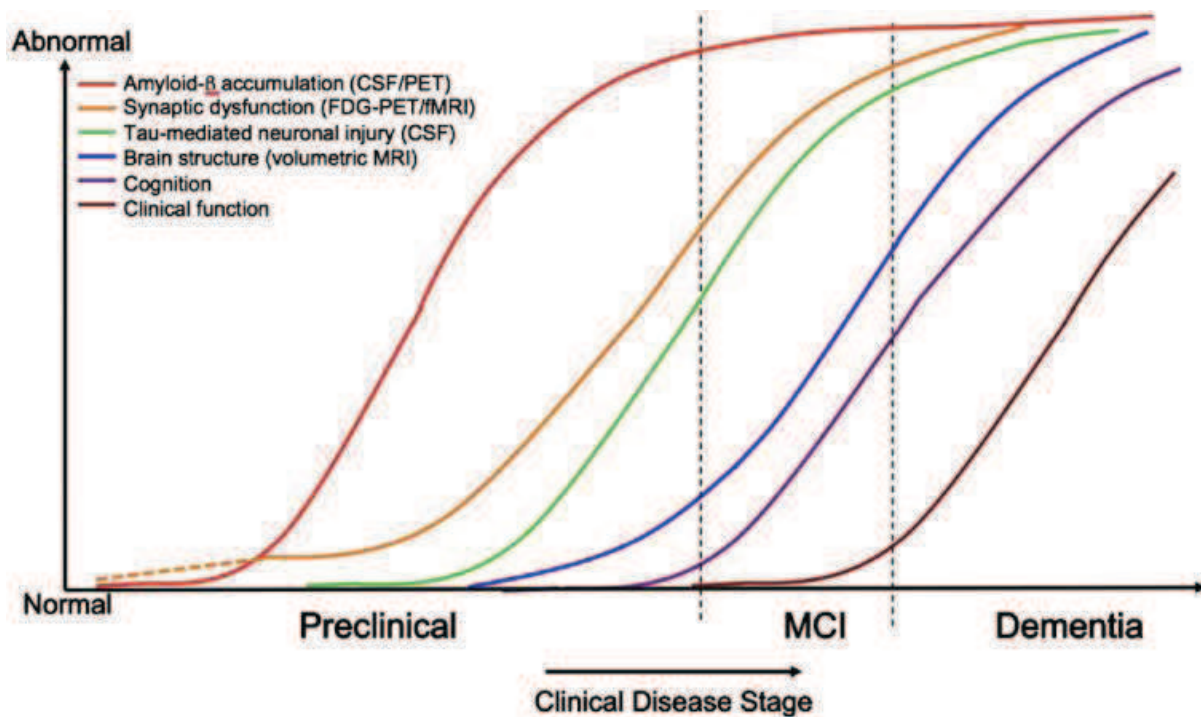


Figure 3 Biomarqueurs associés aux trois phases de la maladie d'Alzheimer. Au stade pré-symptomatique ou préclinique les patients ne présentent ni déficits cognitifs ni atrophie cérébrale, en revanche, le niveau de peptide A β dans le tissu cérébral est élevé. Au stade prodromal ou MCI le cerveau des patients est modérément atrophié et les premiers symptômes cognitifs apparaissent. Au stade de démence les patients présentent une atrophie cérébrale sévère et de nombreux troubles cognitifs dont des troubles mnésiques. (D'après [125, 126])

1.3. Description de la maladie d'Alzheimer

1.3.1. Définitions

1.3.1.1. Une nouvelle définition de la MA

La MA est une maladie neurodégénérative chronique et évolutive du système nerveux central. Sur le plan clinique l'évolution de la maladie peut être divisée en trois phases, le **stade pré-symptomatique**, le **stade prodromal** souvent désigné sous le sigle anglophone MCI (mild cognitive impairment), et enfin le **stade de démence** [127, 128] (Figure 3). Les individus au stade pré-symptomatique n'ont aucun déficit cognitif et aucune atrophie cérébrale n'est détectée en imagerie par résonance magnétique structurale (IRM) (cf. 1.3.3 1.3.6.2.2.1). En revanche, des dépôts amyloïdes peuvent être observés dans le parenchyme cérébral de ces patients en tomographie par émission de positons (TEP) après administration du composé de Pittsburgh-B (PiB) (cf. § 1.3.6.2.1). Ces individus ont un risque accru de développer par la suite des troubles cognitifs et d'entrer ainsi dans la catégorie des patients MCI. Le stade MCI se caractérise par l'apparition de troubles cognitifs trop faibles ou en nombre insuffisant pour atteindre les critères définissant la démence. Cette notion doit toutefois être considérée avec précaution. Il est en effet important de noter que la population des patients MCI est très hétérogène, seuls certains d'entre eux verront leurs performances cognitives décliner jusqu'au développement d'une démence de type Alzheimer, les autres resteront stables. Pour trouver les patients qui risquent de développer une MA, il faut d'abord distinguer deux catégories de patients MCI. La majorité de ces patients, présentant des troubles mnésiques associés ou non à d'autres troubles cognitifs, appartiennent à la catégorie « MCI amnésiques » (aMCI). Par opposition, les patients MCI qui ne présentent aucun trouble mnésique entrent dans la catégorie « MCI non amnésiques » (naMCI). Seule une partie des patients aMCI développera une MA. De façon générale on considère que la maladie d'Alzheimer débute véritablement lorsque la démence se déclare. La démence est définie selon le DSM-IV [129] comme une altération significative de plusieurs fonctions cognitives dont la fonction mnésique.

1.3.1.2. Démences précoce et tardive

Selon l'âge du patient lorsque la pathologie débute, il est possible de distinguer deux types de MA. Dans environ 95 % à 99 % des cas la démence se déclare après 65 ans, la maladie est appelée **maladie d'Alzheimer à début tardif** (MADT) ou forme sporadique. L'origine d'une MADT est généralement inconnue mais de plus en plus de facteurs de susceptibilité génétique tel que l'allèle $\epsilon 4$ du gène de l'ApoE et/ou environnementaux tel que le niveau d'éducation ou la pratique régulière d'une activité physique (cf. § 1.1.5 et 1.2.2) sont identifiés. Lorsque la maladie se déclare avant 65 ans on parle de **maladie d'Alzheimer à début précoce** (MADP). Ces formes de MA sont très rares, elles ne représentent en effet que 1 à 5 % des cas, et sont majoritairement liées à une mutation dans les gènes PSEN1, PSEN2 ou APP.

1.3.1.3. Tests neuropsychologiques

La survenue et la sévérité de la démence est évaluée grâce à des tests neuropsychologiques. Il existe de nombreux tests neuropsychologiques mais les plus unanimement reconnus et utilisés dans l'étude de la MA sont le MMSE (Mini Mental State Examination), le CDR (Clinical Dementia Rating) et l'ADAS-Cog (Alzheimer's disease Assessment Scale- cognitive).

Le MMSE est le test le plus couramment utilisé pour l'évaluation clinique des patients. Il permet d'évaluer les différentes fonctions mnésiques (mémoire épisodique, sémantique et de travail) et d'autres fonctions cognitives telles que l'attention, la praxie, l'orientation temporo-spatiale, le langage et les fonctions exécutives. Le score maximum étant de 30 points, un patient est considéré atteint d'une démence légère si son score est compris entre 19 et 24 points, de démence modérée si son score est compris entre 10 et 19 points et de démence sévère si son score est inférieur à 10 points [130].

Le principe de l'ADAS est similaire à celui du MMSE. Au cours de ce test le patient est soumis à une dizaine de tâches. Chaque tâche teste une fonction cognitive donnée et est notée

individuellement suivant un barème à cinq échelons allant de non atteint à sévèrement atteint [131].

Le CDR peut être utilisé en complément du MMSE ou de l'ADAS-Cog car, outre les déficits mnésiques et la désorientation temporo-spatiale, ce test évalue également la capacité du patient à gérer les activités et les problèmes de la vie quotidienne. A l'issue du test une note de 0 à 3 (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3) correspondant à un stade de démence (sujet sain ; démence incertaine ; démence légère ; démence modérée ; ou démence sévère) est attribuée [132, 133].

1.3.2.Symptômes cliniques

1.3.2.1. Troubles mnésiques

De tous les symptômes de la MA, ce sont le plus souvent, les troubles de la mémoire qui incitent les patients et leurs familles à consulter leur médecin. La mémoire est en effet l'une des premières fonctions cognitives atteintes dans la maladie d'Alzheimer et les troubles de la mémoire peuvent avoir de graves conséquences sur la vie quotidienne et sur l'autonomie des patients.

D'un point de vue neuropsychologique la fonction mnésique peut être subdivisée en six systèmes principaux [134-136] :

- La **mémoire épisodique** qui regroupe les souvenirs liés à des événements survenus dans la vie d'un individu dans un contexte spatial et temporel précis. Sur le plan neuroanatomique, les structures cérébrales impliquées dans ce système de mémoire sont les lobes temporaux médians (hippocampe, cortex entorhinal et périrhinal) et le cortex frontal.
- La **mémoire sémantique** comprend toutes les connaissances conceptuelles et factuelles de l'individu telles que la couleur du ciel, le nom des objets ou une date historique par exemple. Ces souvenirs ne sont pas liés au contexte dans lequel ils ont

été mémorisés. Ce système de mémoire fait également intervenir les lobes frontaux et temporaux.

- La **mémoire de travail** correspond à la capacité de garder et traiter une information consciemment pendant un intervalle de temps nécessaire pour réaliser une action comme par exemple lorsque l'on doit retenir un numéro de téléphone avant de pouvoir le composer. La mémoire de travail fait appel à d'autres fonctions cognitives telles que l'attention et la concentration. Ce système de mémoire dépend du cortex préfrontal et de réseaux de régions corticales et sous corticales différents selon le type de tâches entreprises.
- La **mémoire procédurale** est une mémoire implicite liée à l'apprentissage d'habiletés motrices et cognitives. La restitution de ces souvenirs se fait de façon inconsciente et automatique (ex: jouer du piano). Les structures cérébrales sous tendant la mémoire procédurale sont le cortex moteur, les ganglions de la base et le cervelet.
- Le **conditionnement classique simple**. Appelé aussi conditionnement pavlovien, ce conditionnement consiste à associer un stimulus neutre, ne provoquant normalement aucune réponse, à une réponse biologique dite conditionnelle. Ceci est réalisé en présentant de façon simultanée et répétée ce stimulus neutre avec un stimulus inconditionnel provoquant une réponse biologique inconditionnelle. Le stimulus neutre devient alors un stimulus conditionnel capable de déclencher une réponse biologique conditionnelle similaire à la réponse inconditionnelle.
- L'**amorçage**. On parle d'amorçage lorsque la présentation préalable d'un item modifie la réponse du sujet à un nouvel item.

Les deux systèmes de mémoire les plus testés en consultation clinique en cas de suspicion de MA sont la mémoire épisodique et la mémoire sémantique, mais il semble que les autres systèmes soient également affectés par la maladie quoique à des degrés divers.

Les troubles de la mémoire épisodique sont une composante majeure de la MA. Ils apparaissent très précocement, généralement dès le stade prodromal de la maladie, et constituent la première source d'inquiétude pour les patients et leurs proches. Les troubles

de la mémoire épisodique se manifestent par l'incapacité à former de nouveaux souvenirs et une perte progressive des souvenirs plus anciens. [137-139].

La mémoire sémantique est également fortement altérée chez les patients atteints de MA. Les difficultés rencontrées par les patients MA dans ce type de tâches mnésiques s'expliqueraient soit par une destruction du stock de souvenirs sémantiques soit par une incapacité d'accéder à ces souvenirs. A l'heure actuelle la première hypothèse semble privilégiée [140, 141].

Bien que rarement testés en clinique, il semble que la mémoire de travail [142-144] et le conditionnement classique [145, 146] soient atteints dès les premiers stades de la MA.

Pour tester l'impact de la maladie sur l'amorçage on utilise des paradigmes d'amorçage sémantique qui consistent à présenter dans un premier temps au patient un mot appartenant à une catégorie sémantique donnée puis dans un second temps un autre mot appartenant à la même classe sémantique et d'analyser le temps de réponse du patient à la présentation du second mot. Les résultats obtenus dans ces conditions semblent plus controversés. En effet selon les études on peut observer [147] ou non [148] un déficit, et parfois même une amélioration de l'amorçage sémantique [149].

La mémoire procédurale, en revanche, semble globalement préservée en comparaison des autres systèmes mnésiques. [150, 151]

1.3.2.2. Autres troubles cognitifs

Conformément aux critères de diagnostics détaillés dans le DSM-IV, un malade est considéré comme atteint d'une démence de type Alzheimer, lorsqu'il présente une altération de la mémoire associée à d'autres troubles cognitifs parmi lesquels :

- L'aphasie (troubles du langage)
- L'apraxie (incapacité à réaliser un mouvement ou une série de mouvements malgré des fonctions motrices intactes)

- L'agnosie (incapacité à reconnaître malgré des fonctions sensorielles intactes)
- Des perturbations des fonctions exécutives (planification, abstraction, désorientation spatiale et temporelle)

1.3.2.3. Symptômes neuropsychiatriques

En plus des symptômes cognitifs les patients atteints de MA développent très fréquemment des troubles du comportement ou de l'humeur également désignés sous le terme de symptômes neuropsychiatriques [152]. Les symptômes neuropsychiatriques associés à la MA sont l'apathie, la dépression, l'anxiété, l'agitation, l'agressivité, les hallucinations visuelles et auditives, et les troubles du sommeil.

De part leur nature ces symptômes affectent gravement la vie quotidienne des patients qui deviennent incapables de réaliser la plupart des activités les plus élémentaires de la vie quotidienne et demandent donc une prise en charge et une surveillance constante. Tout ceci pèse très lourdement sur les épaules des proches qui prennent soin de ces patients et constitue l'une des premières causes d'institutionnalisation dans des maisons de soins spécialisées [153].

Ces symptômes peuvent se manifester dès le stade prodromal de la maladie [154, 155]. En clinique, l'apparition et la fréquence de ces symptômes ainsi que la détresse ressentie par le soignant sont évalués grâce à un questionnaire rempli par la personne soignant le malade appelé « inventaire neuropsychiatrique » (NPI en anglais) [156].

Dans le but de déterminer les bases neurobiologiques de ces symptômes neuropsychiatriques plusieurs études d'imagerie en tomographie par émission de positons (TEP) ont été menées avec du [¹⁸F] Fluorodeoxyglucose pour mesurer l'activité métabolique dans le cerveau de patients atteints de MA. Ces études révèlent une diminution du métabolisme du glucose dans le gyrus cingulaire antérieur bilatéral, le cortex orbitofrontal médian et dans le thalamus médian de patients souffrant d'apathie [157], et dans le cortex

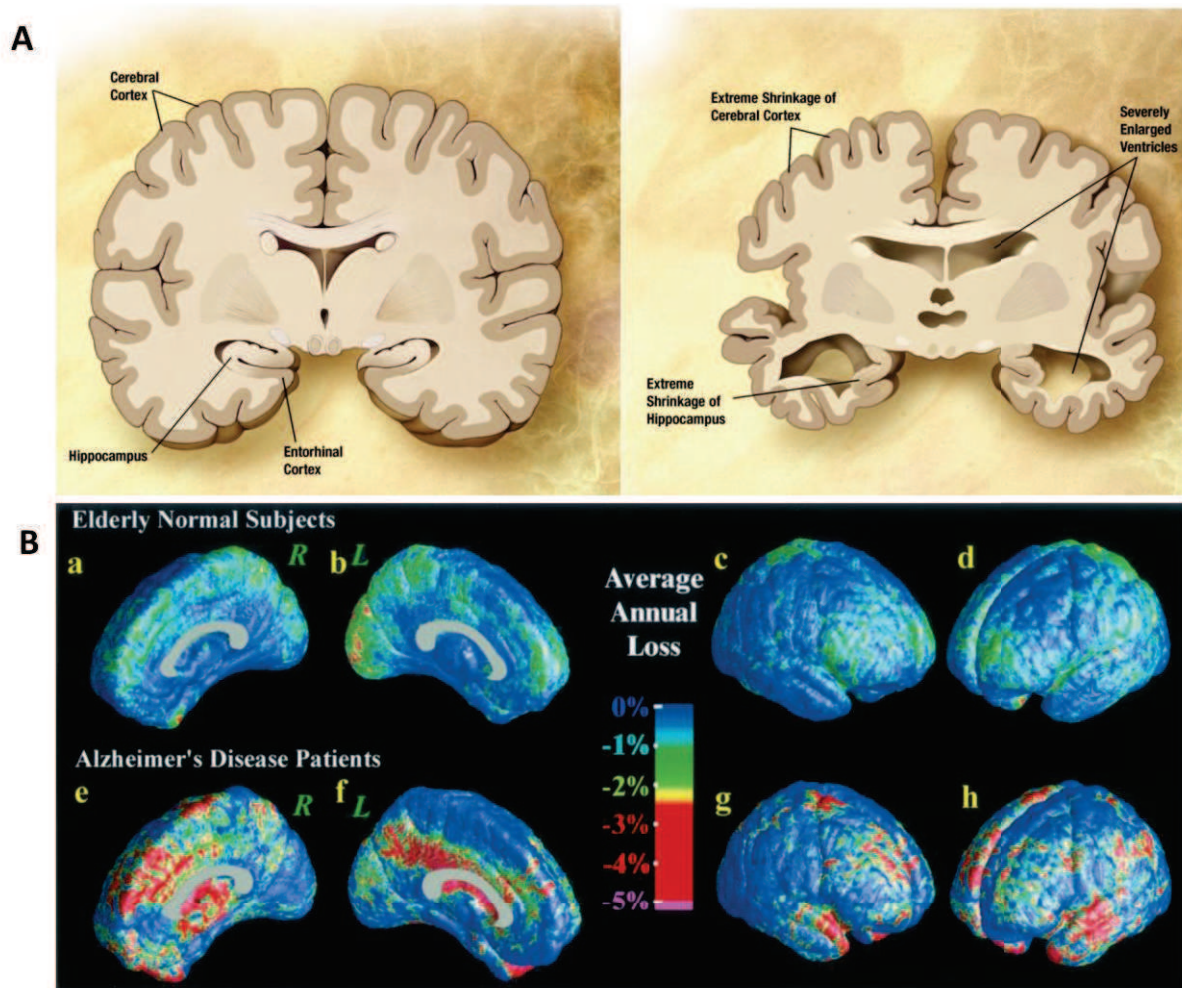


Figure 4 Atrophie cérébrale associée à la maladie d'Alzheimer. La maladie d'Alzheimer se manifeste d'abord par une atrophie bilatérale de l'hippocampe et du cortex entorhinal puis à mesure que la maladie progresse par une atrophie corticale. (A) Représentation schématique. (B) Perte moyenne annuelle de substance grise corticale dans les cerveaux de sujets sains (a, b, c, d) ou de patients Alzheimer (e, f, g, h). Modélisation 3D réalisée à partir de scans IRM (Thompson et al, 2003).

entorhinal bilatéral, le gyrus parahippocampique antérieur, l'insula et le gyrus temporal antérosupérieur gauche de patients souffrant d'anxiété [158].

Par ailleurs il a été montré que les neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert projettent vers ces structures [159]. L'apparition des symptômes neuropsychiatriques pourrait donc être liée à la dégénérescence de ces neurones (cf. § 1.1). Cela expliquerait la relative efficacité des inhibiteurs de la cholinestérase tels que le donépézil dans le traitement de certains symptômes neuropsychiatriques [160, 161].

1.3.3. Anatomopathologie

1.3.3.1. Atrophie cérébrale

Historiquement, avant de pouvoir établir un diagnostic de MA, il fallait attendre que le patient décède afin de pratiquer une autopsie du cerveau à la recherche des lésions caractéristiques de la maladie. La première chose que l'on observait alors était une diminution drastique du volume cérébral global associée à un élargissement des ventricules cérébraux (Figure 4). Ceci étant lié à la dégénérescence massive des cellules nerveuses. De nos jours, il nous est possible de suivre l'évolution du volume cérébral in vivo grâce à des techniques d'imagerie telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la SPECT (Single-photon emission computed tomography), et la tomographie par émission de positons (TEP). Ces méthodes montrent que l'atrophie cérébrale est progressive et ne touche pas toutes les régions cérébrales au même moment. Cette atrophie suit en effet une séquence très stéréotypée. La perte de substance grise est d'abord visible bilatéralement dans le cortex entorhinal et l'hippocampe puis à mesure que la maladie progresse la dégénérescence s'étend aux régions corticales temporales, pariétales, et frontales (revue [162]). Il est toutefois intéressant de noter que les cortex sensoriel et moteur primaires sont relativement préservés y compris dans les stades les plus tardifs de la maladie [163].

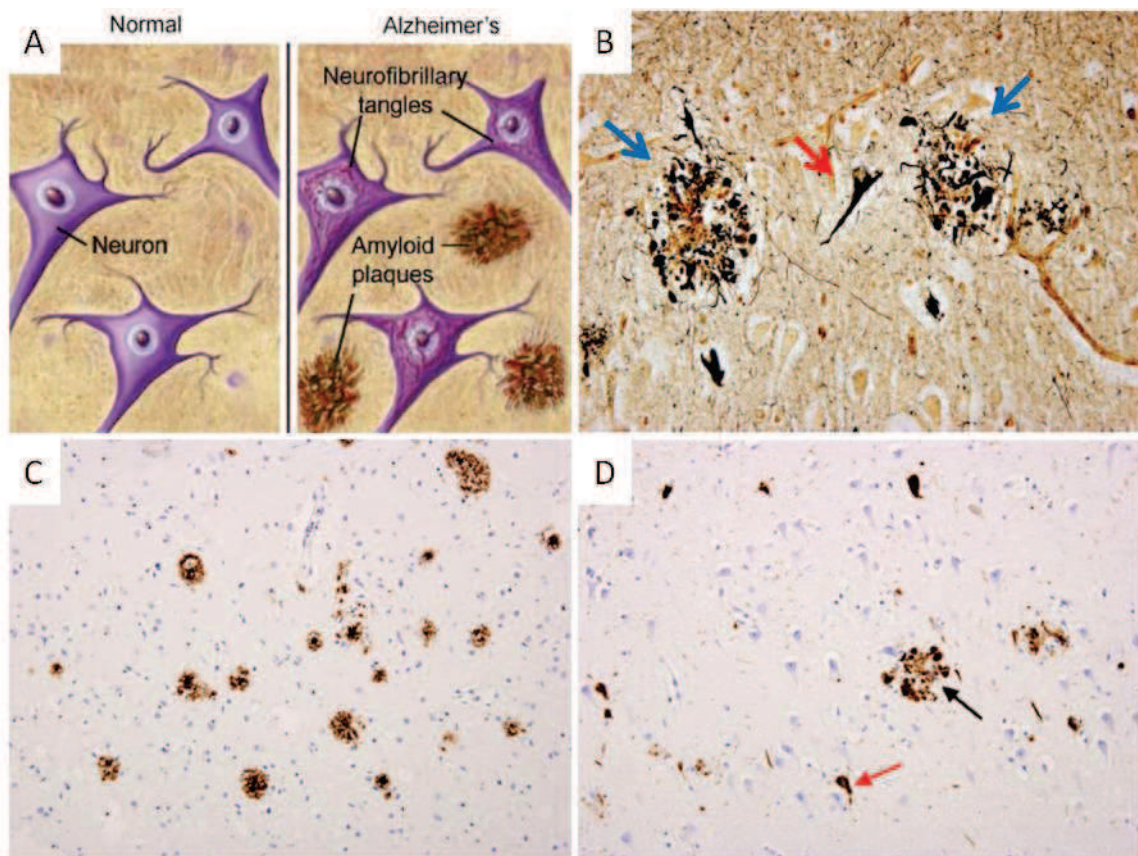


Figure 5 Lésions neuropathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. (A) Représentation schématique. (B) Plaques amyloïdes (flèche bleues) et dégénérescences neurofibrillaires (flèche rouge) révélées par coloration de Bielschowski (cortex temporal humain). (C) Plaques amyloïdes révélées par coloration immunohistochimique avec l'anticorps 4G8 dirigé contre le peptide A β (cortex temporal humain). (D) Dégénérescences neurofibrillaires (flèche rouge) et neurites dystrophiques en périphérie des plaques amyloïdes (flèche noire) révélées par coloration immunohistochimique avec l'anticorps TG-3 dirigé contre la protéine Tau hyperphosphorylée (cortex temporal humain). [164]

1.3.3.2. *Dégénérescences neurofibrillaires*

Les dégénérescences neurofibrillaires sont des inclusions intracellulaires généralement localisées autour du noyau (Figure 5 A, B, et D). Elles sont principalement constituées de fibrilles insolubles composées de filaments hélicoïdaux appariés (PHF), c'est à dire de paires de filaments protéiques de 10 nm de diamètre entrelacés en forme d'hélice avec une période de 80 nm [37, 38]. Ces filaments sont formés par l'agrégation de protéines Tau anormalement phosphorylées. Outre la protéine Tau d'autres protéines, telles que l'ubiquitine [165, 166], la cholinestérase [167] ou encore le peptide A β [168] peuvent se retrouver piégées dans les DNF. En histopathologie, la méthode traditionnellement utilisée pour marquer les DNF est la coloration par imprégnation argentique de Bielschowski (Figure 5B). Cependant, de nos jours on utilise plus couramment des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine tau hyperphosphorylée comme par exemple les anticorps AT8 ou TG-3 (Figure 5D).

Les DNF ne sont pas spécifiques de la MA puisque que l'on retrouve des lésions similaires dans d'autres pathologies telles que la maladie de Niemann-Pick de type C, la sclérose latérale amyotrophique, Cependant il semble que la distribution et la densité de ces DNF soit corrélée avec la sévérité de la démence et l'apparition de certains symptômes de la pathologie (cf. §1.3.4). (Revue [164, 169])

1.3.3.3. *Plaques amyloïdes*

Contrairement aux DNF, les plaques amyloïdes également appelées plaques séniles (PS) se retrouvent dans la matrice extracellulaire (Figure 5 A, B, et C). Il est possible de distinguer deux types de plaques amyloïdes, les plaques diffuses et les plaques neuritiques.

Les plaques neuritiques sont constituées d'un cœur composé majoritairement de peptide A β_{1-42} sous forme fibrillaire et d'une couronne composée de neurites dystrophiques anormalement formées, dilatées, et dotées de lysosomes élargis, de nombreuses mitochondries et de PHF similaires à celles observées dans les DNF. Ces plaques sont

généralement entourées d'astrocytes réactifs et de cellules microgliales activées ce qui montre que des phénomènes inflammatoires ont lieu à proximité des plaques amyloïdes. Le diamètre de ces plaques peut mesurer de 10 à plus de 120 μm .

Les plaques diffuses se retrouvent dans des régions cérébrales moins touchées par la MA telles que le cervelet par exemple [170]. On peut également trouver ce type de plaques dans le cerveau de personnes âgées ne présentant aucun déficit cognitif et qui serait donc dans la phase asymptomatique de la maladie [171]. Les plaques diffuses sont comme leur nom l'indique moins compactes que les plaques neuritiques. Elles sont composées de fibrilles ou de protofibrilles A β moins condensées et de peu ou pas de neurites dystrophiques.

De même que pour les DNF, d'autres protéines, telles que l'ApoE [172] ou la clusterine, peuvent être piégées dans les plaques amyloïdes.

En histopathologie, les plaques séniles peuvent être colorées par imprégnation argentique de Bielschowski (Figure 5B), avec du rouge Congo ou, pour les plaques neuritiques uniquement, avec de la thioflavine S en raison des PHF retrouvées dans la couronne neuritique. Afin de marquer à la fois les plaques neuritiques et les plaques diffuses de façon spécifique il est cependant préférable de réaliser des immunomarquages en utilisant un anticorps primaire dirigé contre le peptide A β (Figure 5C). Les anticorps les plus couramment utilisés pour détecter le peptide A β sont les anticorps 6E10 et 4G8. (Revue [164, 169])

1.3.3.4. Angiopathie amyloïde congophilique

Dans environ 25 % des cas de MA on observe dans la paroi des artérioles, des veinules et des capillaires situés dans les méninges et le cortex des dépôts amyloïdes capables de fixer le rouge congo. Ces lésions appelées angiopathies amyloïdes congophilique (AAC) car elles sont colorées par le rouge congo en immunohistochimie, sont majoritairement composées de peptide A β_{1-40} sous forme fibrillaire. Les AAC sont toxiques pour les cellules musculaires lisses et les péricytes constituant la paroi des vaisseaux sanguins. Ainsi fragilisée la paroi de ces vaisseaux a davantage tendance à se rompre et à provoquer des microhémorragies. (revue [173])

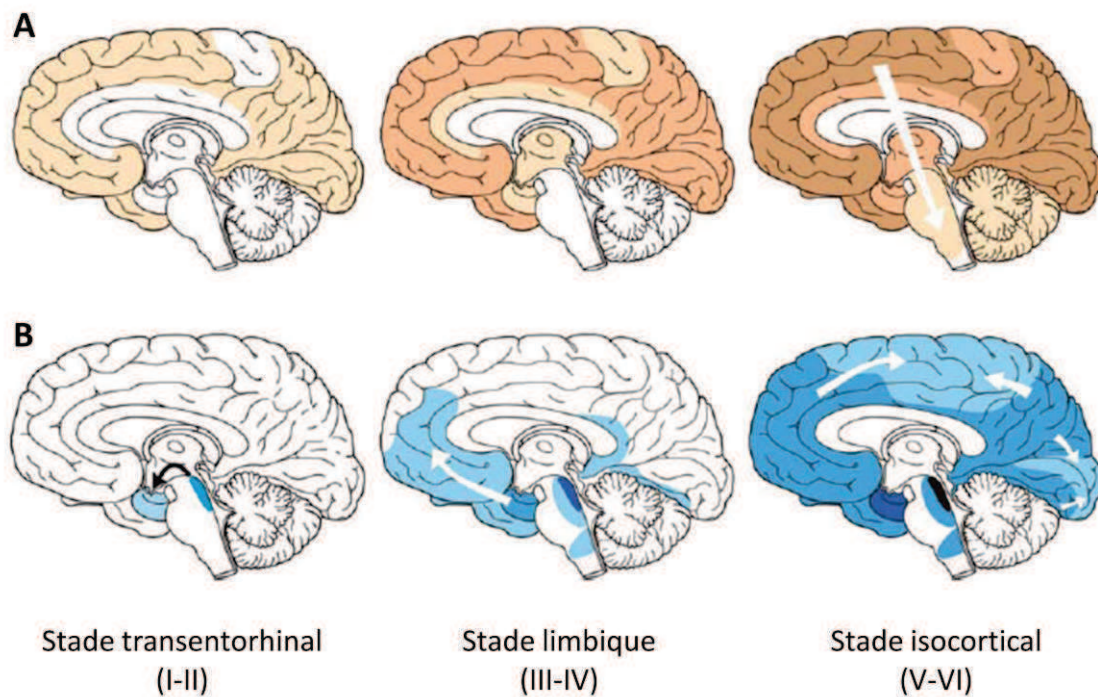


Figure 6 Propagation des lésions neuro-pathologiques dans le tissu cérébral. Les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires se propagent dans le cerveau suivant des schémas hautement reproductibles. Les plaques amyloïdes (A) s'étendent d'abord dans le néocortex puis dans l'allocortex et enfin dans les régions subcorticales. Les DNF se développent d'abord dans le cortex transentorhinal (stades I et II de Braak) puis dans l'hippocampe et le cortex entorhinal (stades III et IV de Braak) et enfin, se propagent dans l'ensemble du cortex (stades III et IV de Braak). [174]

Sur le plan clinique la présence d'AAC dans le cerveau d'un patient n'est pas anodine : il semble que cela contribue à la sévérité de la maladie. Les déficits cognitifs sont en effet plus importants chez les patients atteints d'une MA associée à une AAC [175].

1.3.4. Propagation des lésions neuropathologiques et progression de la maladie

La MA est une maladie évolutive du système nerveux qui se caractérise par le déclin progressif et irréversible des facultés cognitives et par l'apparition de symptômes neuropsychiatriques dont la prévalence augmente avec la progression de la maladie. Au niveau neuropathologique cela se traduit par une augmentation de la densité et une expansion progressive des PS, des DNF et de l'atrophie cérébrale. La distribution très étendue et la densité souvent variable des PS dans les différentes régions cérébrales ne permettent pas de suivre efficacement la progression de la pathologie [176, 177]. La distribution et la densité des DNF en revanche suivent un schéma hautement reproductible d'un patient à l'autre. En se fondant sur ce schéma H. et E. Braak ont défini six stades reflétant la progression de la maladie sur le plan neuropathologique (Figure 6). Les stades I et II sont appelés « stades transentorhinaux » car à ces stades la localisation des DNF est limitée au cortex transentorhinal, l'hippocampe quant à lui n'est que faiblement touché. Aux stades II et III, « stade limbiques », la densité des DNF augmente dans les zones précédemment touchées et les lésions s'étendent au cortex entorhinal et à l'hippocampe tandis que le reste du cortex est relativement épargné. Aux stades V et VI, appelés « stades isocorticaux » les DNF envahissent progressivement l'ensemble du cortex. [176]

La limite de cette classification fondée sur la propagation des DNF est qu'à l'heure actuelle, aucun traceur permettant de visualiser les DNF directement in vivo n'a encore été découvert. Cependant, il est possible de déterminer de façon indirecte dans quel stade de Braak se situe un patient en mesurant le degré d'atrophie des différentes régions cérébrales dont la progression suit le même schéma que les DNF [178]. Par ailleurs, le déclin des performances cognitives est fortement corrélé au taux d'atrophie cérébrale globale [179-181], il est donc possible d'établir un lien entre les stades de Braak et la progression de la maladie sur le plan clinique. Plus précisément il apparait que la nature et la sévérité des

symptômes cliniques dépendent des régions cérébrales touchées par la maladie. Ainsi au début de la maladie, lorsque que les lésions sont limitées au cortex entorhinal et à l'hippocampe, des régions connues pour leur implication dans les processus mnésiques, les patients présentent essentiellement des troubles de la mémoire. Puis à mesure que les lésions s'étendent à d'autres régions corticales d'autres symptômes cognitifs [182, 183] ou neuropsychiatriques apparaissent [157, 158].

1.3.5.Maladie d'Alzheimer et maladies à prions : une pathogénie similaire

Malgré leur grande diversité, les pathologies appartenant à la grande famille des maladies amyloïdes, qui comprend entre autres la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington, présentent de nombreux points communs. Toutes ces pathologies sont liées à l'accumulation de protéines mal conformées formant des agrégats qui se répandent comme une infection à travers le SNC. Ce phénomène est particulièrement frappant dans la maladie d'Alzheimer où, comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, les DNF partant du cortex transentorhinal s'étendent vers les régions adjacentes comme l'hippocampe puis aux régions corticales vers lesquelles les neurones affectés projettent leurs axones. Ceci n'est pas sans rappeler le comportement de la protéine Prion. De nombreux parallèles peuvent ainsi être faits entre la MA et les maladies à prions.

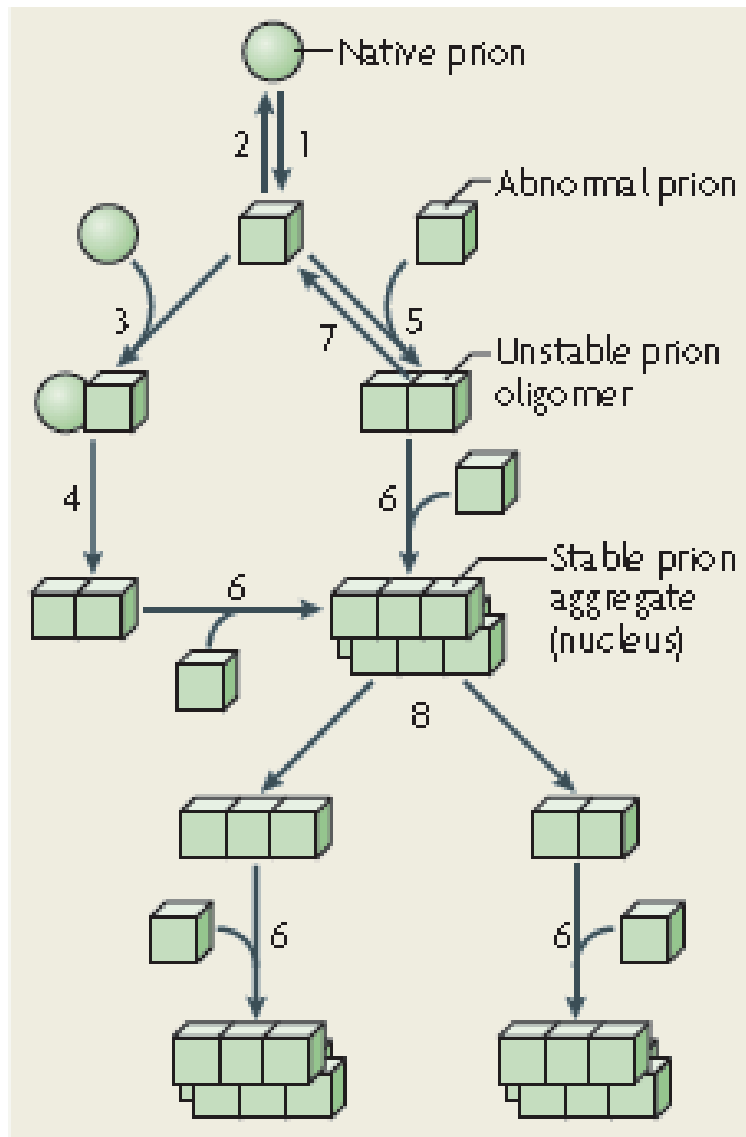


Figure 7 Voie d'agrégation de la protéine Prion. La protéine Prion native (sphère) subit un changement de conformation qui conduit à la formation d'une protéine Prion anormale (cube) (1). Ce changement de conformation est réversible (2). La protéine Prion anormale interagit ensuite avec une protéine Prion native (3) favorisant ainsi son changement de conformation (4) ou avec une autre protéine Prion anormale (5). Le dimère ainsi formé est instable, il peut se dissocier (7) ou grossir en intégrant de nouvelles protéines anormales (6) jusqu'à ce qu'un noyau stable se forme. Ce noyau peut poursuivre son élongation et former des fibrilles par ajout successif de nouvelles protéines anormales (8) ou se fragmenter pour former de nouveaux noyaux stables. [184]

1.3.5.1. Comparaison des voies d'agrégation

Premièrement, dans les maladies à prion on observe un changement de la structure secondaire de la protéine prion cellulaire native (PrP^c) qui passe d'une conformation riche en hélice α à une conformation riche en feuillet β (Figure 7). Cette conformation très hydrophobe et instable dans le milieu extracellulaire favorise la liaison de la protéine alors appelée protéine prion « scrapie » (PrP^{sc}) à une autre protéine prion native ou anormale. L'interaction d'une PrP^{sc} avec une PrP^c induit une conversion de la conformation de cette dernière qui devient anormale. Le dimère produit est toujours instable et continue de lier d'autres protéines PrP^c ou PrP^{sc} jusqu'à constituer un noyau stable qui continuera à s'allonger par ajout successif d'autres protéines pour former des fibrilles [184].

Dans la maladie d'Alzheimer, le peptide $\text{A}\beta$ et la protéine tau suivent des voies analogues à celle de la protéine prion. Le peptide $\text{A}\beta$ subit lui aussi un changement de conformation. En effet, lorsque le peptide $\text{A}\beta$ est localisé dans la membrane plasmique, dans le cours laps de temps suivant le clivage de la protéine APP par la γ -sécrétase, sa structure secondaire est majoritairement composée d'hélices α . Puis dès qu'il est libéré dans un milieu aqueux tel que le milieu extracellulaire sa conformation change et s'enrichit en feuillets β [185-187]. Le peptide s'oligomérisse alors très rapidement. La nature de ces oligomères et les mécanismes conduisant à leur éventuelle agrégation et à la formation des fibrilles sont encore méconnus et très controversés. Il semble toutefois que, comme pour la protéine Prion, certains oligomères constituent des noyaux à partir desquels se forment les fibrilles par ajout successif de monomères ou d'oligomères $\text{A}\beta$ de faible poids moléculaire [186] (Figure 16).

L'oligomérisation de la protéine tau nécessite également un changement de conformation et la formation de feuillets β . Tout comme les oligomères prion et $\text{A}\beta$, ces oligomères de protéine tau subissent ensuite une phase d'élongation aboutissant à la formation de protofilaments puis de filaments appariés ou PHF [188-192] (Figure 12).

1.3.5.2. Transmission de la protéopathie

Deuxièmement, les prionopathies sont des maladies infectieuses c'est-à-dire que la pathologie peut être transmise en administrant à un individu receveur une petite quantité de protéines mal conformées prélevées chez un individu donneur. Jusqu'à très récemment on pensait que cette particularité était spécifique des maladies à prions mais plusieurs études montrent que la MA pourrait de la même façon être transmise d'un individu à un autre [174]. Il est en effet possible d'induire ou de précipiter l'agrégation du peptide A β et l'apparition de plaques séniles dans le cerveau de souris (Tg2576 ou APP23) ou de rats transgéniques (APP21) exprimant le gène de l'APP humaine, en leur injectant des extraits de cerveaux provenant de patients Alzheimer ou d'animaux transgéniques plus âgés. Les PS se développent au niveau du site d'injection et dans les régions reliées au site d'injection par des projections axonales. La génération des PS est vraisemblablement induite par des oligomères A β présents dans ces extraits cérébraux car toute déplétion ou dénaturation préalable de ces oligomères au moyen d'anticorps dirigés contre le peptide A β ou d'acide formique empêche la transmission de la pathologie amyloïde [193-198].

La fibrillation de la protéine tau peut également être induite de façon exogène par une injection intracérébrale d'extraits de cerveaux contenant des agrégats de protéine tau. Des travaux récents ont en effet montré qu'une injection d'extraits provenant de souris P301S exprimant le gène de la protéine tau humaine mutée dans le cerveau de souris Alz17 provoque la formation de DNF au niveau du site d'injection puis dans les régions adjacentes ou interconnectées avec ce foyer primaire. Ceci est d'autant plus frappant que les souris Alz17 qui expriment le gène tau humain non muté ne développent jamais de DNF en conditions normales [199].

1.3.5.3. Transmission cellule à cellule

Nous avons vu au paragraphe précédent que les agrégats de peptide A β ou de protéine Tau peuvent se propager de proche en proche au niveau du site d'injection mais aussi vers des régions reliées à ce site d'injection par des projections axonales. Au niveau cellulaire, Frost

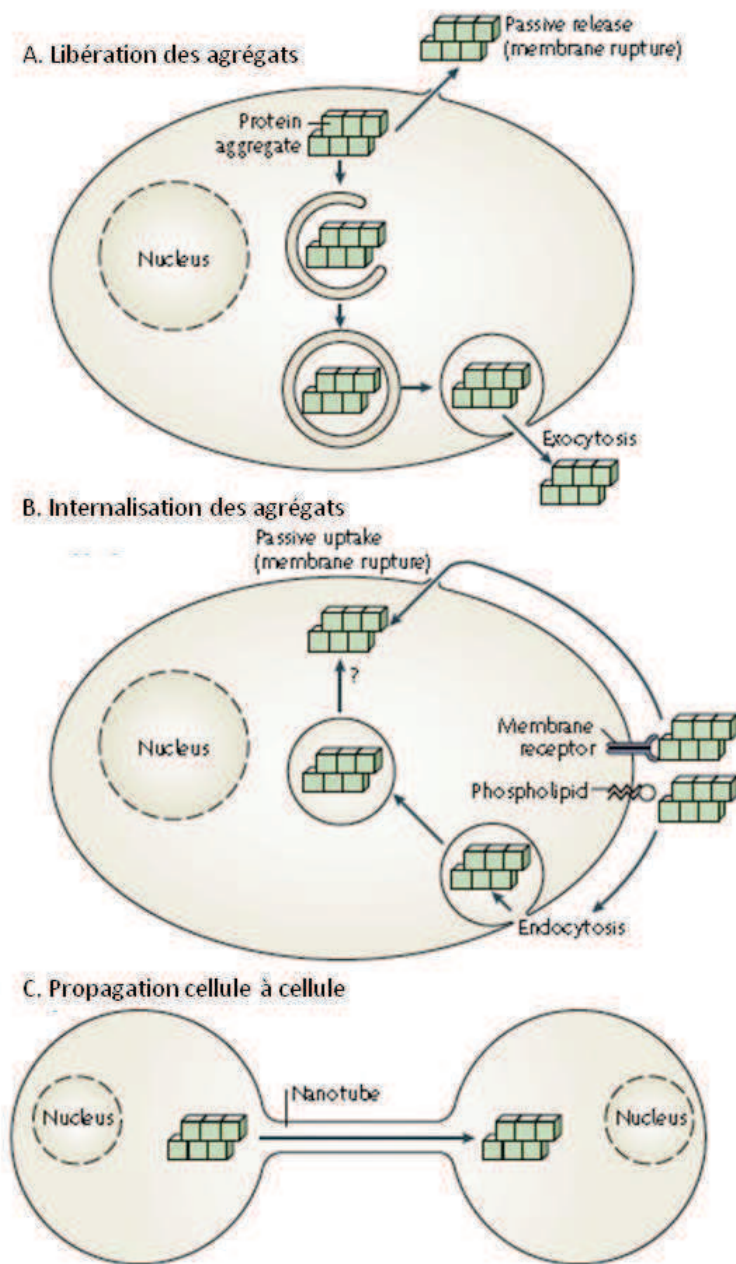


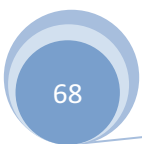
Figure 8 Figure 8. Différentes voies de transmission cellulaire des agrégats protéiques. Les agrégats intra-cellulaires sont libérés dans le milieu extracellulaire par diffusion passive, par exocytose, ou associés à des exosomes (A). Les agrégats sont ensuite endocytés ou pénètrent dans les cellules receveuses par diffusion passive (B). Les agrégats endocytés doivent traverser la membrane endosomique par un processus inconnu pour atteindre le cytosol. Les agrégats peuvent également se propager d'une cellule à une autre en empruntant des nanotubes (C). [184]

et al. ont montré que des agrégats intracellulaires de tau sont parfois transmis d'une cellule à une autre au sein d'une même culture [200]. Plus récemment Nath et al. ont également montré que des oligomères A β injectés dans le cytoplasme d'un neurone se propagent aux neurones et aux astrocytes avec lesquels le neurone donneur a établi des contacts neuritiques [201]. Ceci suggère que ces agrégats sont transmis d'une cellule à une autre et non par simple diffusion dans le milieu extracellulaire. Les mécanismes sous tendant ce transfert d'agrégats de cellule à cellule sont encore méconnus, plusieurs hypothèses ont toutefois été proposées (Revue [184, 202]) (Figure 8).

La première hypothèse suggère que les agrégats sont libérés dans le milieu extracellulaire par exocytose, ou par diffusion passive au travers d'une membrane plasmique potentiellement endommagée ou encore suite à la dégénérescence de la cellule donneuse. Les agrégats seraient ensuite endocytés par une cellule receveuse naïve (Figure 8). Cette hypothèse est étayée par plusieurs études montrant que les agrégats de peptide A β ou de protéine Tau colocalisent avec des marqueurs spécifiques des endosomes tardifs et des lysosomes [200, 201]. Cependant selon cette hypothèse, les agrégats se retrouveraient confinés dans des vésicules intracellulaires tandis que les protéines natives nécessaires pour l'élongation sont généralement localisées dans le cytosol. Cela implique que les agrégats parviennent à quitter les vésicules endosomiques ou lysosomiques par un procédé encore inconnu pour pénétrer dans le cytosol.

D'après la seconde hypothèse, les agrégats pourraient quitter la cellule donneuse en s'associant à des exosomes. Les exosomes sont des petites vésicules d'origine endosomique libérées dans le milieu extracellulaire lors de la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique [203]. Les exosomes sont ensuite endocytés par des cellules receveuses. Ce type de libération a notamment été proposé pour l' α -synucléine (maladie de Parkinson) [204], les protéines prions [205] et récemment une infime quantité de peptide A β a été retrouvée associée à des exosomes [206].

Les agrégats pourraient également être transférés d'une cellule à une autre en empruntant des ponts membranaires reliant les deux cellules appelés nanotubes [207] (Figure 8). Ces



nanotubes sont impliqués dans le transfert intercellulaire des protéines prions [208] mais la possibilité que les oligomères A β ou Tau puissent être transférés de la même façon reste à démontrer.

1.3.5.4. Conclusion

En conclusion, il existe de nombreux points communs entre les processus qui mènent à l'agrégation et la propagation des protéines malformées dans la MA et dans les maladies à prions. Comparer les résultats obtenus dans la MA avec les découvertes faite dans l'étude des maladies à prions pourrait donc nous permettre d'élucider les mécanismes physiopathologiques qui régissent l'agrégation du peptide A β et de la protéine Tau et la propagation de ces agrégats dans l'ensemble du système nerveux central. Cependant il faut garder à l'esprit que les protéines Prion, Tau et APP sont des protéines très différentes qui possèdent des propriétés propres ; par exemple Tau est une protéine intracellulaire tandis que PrP^c et APP sont des protéines intramembranaires. Il existe donc certainement des différences importantes dans les cascades métaboliques de ces protéines. De plus le fait que deux types d'oligomères A β , fibrillaires et préfibrillaires semblent coexistent suggère l'existence d'une seconde voie d'oligomérisation pour le peptide A β (cf. §1.5.2).

1.3.6. Diagnostiquer et suivre l'évolution de la maladie d'Alzheimer : les biomarqueurs

1.3.6.1. Les biomarqueurs : pourquoi et comment ?

De part leur prévalence, qui augmente de façon exponentielle avec l'âge, et la très coûteuse prise en charge des patients qu'elles réclament, les différents types de démences constituent un problème de santé publique majeur. Pourtant on estime que seuls 20 à 50 % des malades atteints de démence sont diagnostiqués. Ce phénomène peut sans doute être mis sur le compte d'un défaut d'information de la population, qui pense couramment que les troubles de la mémoire sont une conséquence inéluctable du vieillissement. Les malades et leurs familles tardent donc souvent à consulter un médecin spécialiste des troubles de la

mémoire, or dans leur intérêt il est préférable de diagnostiquer la maladie le plus tôt possible. Certains traitements thérapeutiques capables d'atténuer certains symptômes ou de ralentir la progression de la maladie, comme les inhibiteurs de cholinestérase par exemple, sont en effet plus efficaces dans les premiers stades de la pathologie (démence légère et modérée). De plus un accompagnement et une formation plus précoce des parents chargés de prendre soin des malades pourraient réduire le stress et la détresse fréquemment ressentis par ces soignants face à l'évolution de la maladie. Il paraît donc essentiel de développer un véritable test de dépistage accessible à tous et permettant de déceler la maladie le plus précocement possible.

A l'heure actuelle, la procédure à suivre pour établir un diagnostic de MA est très longue et parfois pénible pour les patients. Avant de pouvoir conclure à une démence de type Alzheimer le patient doit d'abord subir de nombreux tests et examens afin d'écartier toutes les autres pathologies pouvant être à l'origine d'une démence (démences vasculaire, démences fronto-temporale, maladie de Parkinson, ...). De plus, le diagnostic de MA ne peut pas être établi avec certitude au cours de la vie du patient. Jusqu'à présent pour confirmer ce diagnostic il faut attendre le décès du patient afin de réaliser une autopsie qui révélerait la présence dans le tissu cérébral des lésions caractéristiques de la MA (cf. § 1.3.3). Cependant le fait que les DNF ne soient pas spécifiques de la MA et la découverte récente que des PS peuvent être retrouvées dans le cerveau d'individus ne présentant aucun signe clinique de démence [209, 210] ont quelque peu ébranlé ces certitudes. Il devient de plus en plus difficile d'établir avec certitude un diagnostic de MA, d'où la nécessité de définir de nouveaux critères de diagnostic fiables et accessibles in vivo.

Par ailleurs, au vu de l'ampleur du marché que constitue la maladie d'Alzheimer, l'industrie pharmaceutique consacre de gros moyens humains et financiers au développement de nouvelles molécules qui permettraient d'enrayer la progression de la maladie ou d'améliorer les conditions de vie des malades. Cependant alors que ces molécules arrivent dans la phase 3 de leur développement, c'est-à-dire dans la phase des essais cliniques chez les malades, les difficultés rencontrées pour sélectionner précisément les patients atteints de la MA, contraignent les industriels à constituer de larges cohortes composées de profils très hétérogènes. Ceci multiplie les risques encourus par les patients qui participent à ces

essais cliniques et les risques de rejet de molécules qui ne seraient efficaces que pour certains profils. De plus les industriels rencontrent également des difficultés pour évaluer l'efficacité thérapeutique de ces molécules. Pour cela, il conviendrait de trouver des variables biologiques aisément quantifiables qui refléteraient l'évolution de la maladie et l'efficacité des traitements administrés aux malades.

Il devient donc primordial pour le dépistage et la recherche clinique, de découvrir des marqueurs biologiques ou biomarqueurs détectables *in vivo* et montrant une bonne sensibilité et une bonne spécificité pour la maladie d'Alzheimer. Pour être utilisables ces biomarqueurs doivent avoir une valeur quantifiable, dont les variations traduisent une évolution physiologique liée au vieillissement normal ou une évolution pathologique liée à la progression de la maladie. Ils devraient en outre permettre de mesurer l'efficacité thérapeutique des agents pharmacologiques développés par les firmes pharmaceutiques. Suivre l'évolution de la maladie implique que la mesure de ces biomarqueurs soit reproductible d'un laboratoire à un autre et non invasive, afin qu'elle puisse être répétée dans le temps sans provoquer de séquelles ou de douleur aux patients. De plus il serait préférable que les tests ou les prélèvements de fluides biologiques soient peu coûteux et simples à réaliser notamment en dehors de l'hôpital par des personnels soignant proches des malades tels que les médecins traitants ou les infirmières à domicile. Ceci suppose que les prélèvements et les biomarqueurs soient suffisamment stables pour être transportés et conservés en attendant d'être analysés.

1.3.6.2. Neuroimagerie

1.3.6.2.1. Distribution et densité des plaques amyloïdes

L'hypothèse amyloïde qui est à l'heure actuelle l'hypothèse prédominante dans l'étiologie de la MA soutient que l'évènement initiateur de la maladie est une perturbation de la voie métabolique de la protéine APP provoquant une surproduction de peptide A β qui se dépose ensuite dans le tissu cérébral sous forme de fibrilles. Suivant cette hypothèse, détecter la présence de peptide A β dans le cerveau des personnes âgées pourrait donc nous permettre

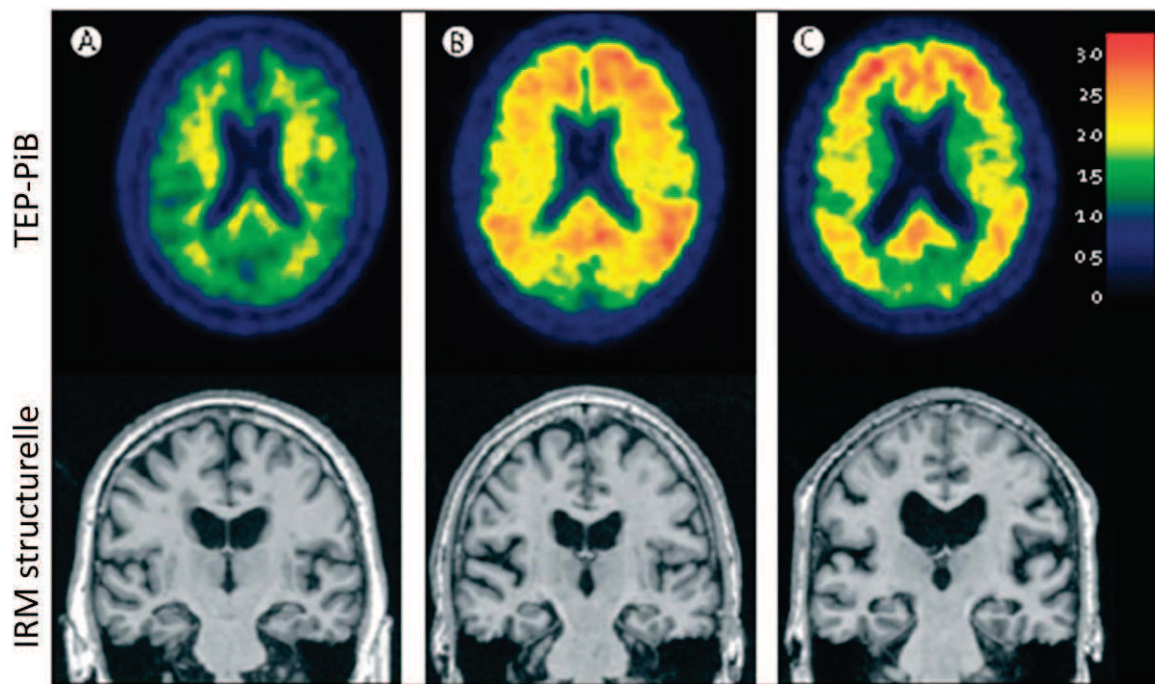


Figure 9 Détermination du stade de la maladie d'Alzheimer en TEP-PiB ou en IRM structurelle. (A) Cerveau d'un sujet âgé cognitivement sain sans trace de dépôts amyloïdes en TEP-PiB (panel supérieur) ou d'atrophie cérébrale en IRM structurelle (panel inférieur). (B) Cerveau d'un patient au stade pré-symptomatique présentant de nombreux dépôts amyloïdes (scan TEP-PiB positif, panel supérieur) mais pas d'atrophie cérébrale (panel inférieur). (C) Cerveau d'un patient atteint de démence de type Alzheimer présentant de nombreux dépôts amyloïdes (scan TEP-PiB positif, panel supérieur) et une atrophie cérébrale significative. [125]

de dépister précocement la maladie. Dans cette optique, des dérivés de la thioflavine-T (colorant couramment utilisé pour marquer les PS sur des coupes histologiques) capables de traverser la barrière hémato encéphalique ont été développés. C'est ainsi qu'a été découvert le N-méthyl[¹¹C]2-(4-méthylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole plus couramment connu sous le nom de composé de Pittsburg-B (PiB). Le signal émit par le PiB via la désintégration de son noyau de carbone radioactif est visualisable in vivo grâce à la technique de tomographie par émission de positrons (TEP-PiB) (Figure 9, panel supérieur).

Une fois injecté dans le sang par voie intraveineuse le PiB est très rapidement incorporé dans le cerveau où il se lie de façon spécifique aux fibrilles A β localisées dans les plaques amyloïdes et dans les lésions amyloïdes angiopathiques. Dans le cerveau humain le PiB se fixe principalement au niveau des régions communément associées à la présence de dépôts amyloïdes [176, 211]. Cette méthode permet ainsi de visualiser la distribution et d'estimer la quantité des plaques séniles dans le tissu cérébral des patients Alzheimer [212].

D'après l'étude publiée par Klunk et ses collaborateurs qui décrit les résultats obtenus lors de la première utilisation du PiB chez l'Homme, la quantité de PiB incorporée dans le tissu cérébral est significativement différente entre les sujets contrôles sains et les patients Alzheimer [211] (Figure 9A et 9C, panel supérieur). Ces résultats ont été nuancés par des études publiées ultérieurement selon lesquelles 20 à 30 % des sujets cognitivement sains montraient un niveau élevé de PiB lié [213, 214] (Figure 9B, panel supérieur). Cependant des études longitudinales ont révélé que ces sujets « sains » PiB-positifs ont, par rapport aux sujets « sains » PiB-négatifs, un risque accru de développer des troubles cognitifs [215] et un amincissement cortical qui révélerait un début de neurodégénérescence [216, 217]. Loin d'être anodine la présence d'un signal PiB et donc de PS dans le cerveau de certains patients considérés comme sains serait donc le signe que ces patients bien que cognitivement sains et donc pré-symptomatiques, commencent à développer une maladie d'Alzheimer.

De même près de 50 à 65 % des patients MCI présentent un niveau de PiB lié équivalent à celui observé chez les patients Alzheimer [218]. Ces patients MCI PiB-positif ont un risque accru de conversion vers une MA à court et moyen terme. A contrario les patients MCI PiB-

négatif ne développent que très rarement une MA [219, 220]. Cette technique de TEP-PiB permettrait donc de distinguer les patients dès le stade prodromal de la maladie.

Le PiB se liant de façon spécifique au peptide A β , cette méthode peut également être très utile pour réaliser le diagnostic différentiel de la MA. En effet des études ont montré que les niveaux de PiB lié sont très faibles chez des patients atteints de démence associée à la maladie de Parkinson [221] ou de démences fronto-temporale et en particulier de démence sémantique [222]. En revanche Il est plus difficile de distinguer les patients atteints par la MA de ceux atteints par une démence à corps de Lewy (DCL) car ces derniers présentent fréquemment de nombreux dépôts amyloïdes en plus des corps de Lewy. Cependant la quantité de PiB lié retrouvée dans le cerveau des patients DCL est généralement moindre que celle retrouvée dans le cerveau des patients MA.

Par ailleurs la TEP-PiB permet d'estimer l'effet biologique des thérapies anti-amyloïde. L'objectif de ces thérapies est de réduire la charge amyloïde contenue dans le cerveau des patients en dissolvant les plaques et en neutralisant les oligomères A β . Pour cela l'une des approches étudiées est l'utilisation d'anticorps dirigés contre le peptide A β . C'est le cas par exemple du Bapineuzumab, un anticorps monoclonal anti-A β , qui fait l'objet de plusieurs essais cliniques. Dans l'un de ces essais les auteurs ont pu observer grâce au marqueur PiB une diminution significative de la charge amyloïde dans le cerveau des patients ayant reçu le traitement [223].

Pour conclure, la TEP-PiB présente une bonne sensibilité et une relativement bonne spécificité pour la MA. Elle pourrait permettre de dépister et éventuellement de traiter les personnes à risque pour la maladie d'Alzheimer bien avant que les neurones ne commencent à dégénérer et que les premiers symptômes cognitifs n'apparaissent. Le fait que le signal PiB soit très élevé dès les premiers stades de la maladie ne permet pas de suivre la progression de la maladie, en revanche, cela permet de mieux sélectionner les patients à inclure dans les essais cliniques et d'évaluer l'efficacité des traitements anti-amyloïde. L'inconvénient majeur de cette technique réside dans le fait que le PiB est marqué avec un atome de carbone radioactif (^{11}C) qui a une durée de vie très courte (≈ 20 minutes)

ce qui limite son utilisation aux rares centres de recherche ou hospitaliers équipés d'un cyclotron. Pour pallier à cet inconvénient des analogues du PiB marqués avec un atome de fluor radioactif (^{18}F) ayant une demi vie plus longue (≈ 120 minutes) sont en cours de développement.

1.3.6.2.2. Neurodégénérescence et atrophie cérébrale

1.3.6.2.2.1. Imagerie par résonance magnétique structurale

A l'heure actuelle, il n'existe aucun marqueur ou méthode non invasive qui permettrait de visualiser spécifiquement l'apparition et l'expansion des DNF in vivo. Cependant la formation de DNF dans les neurones entraîne une déstabilisation des microtubules et une perturbation du trafic axonal ce qui aboutit à la disparition des synapses et finalement à la dégénérescence des neurones affectés. A un niveau supérieur l'apparition des DNF dans une structure cérébrale s'accompagne donc d'une atrophie de cette structure. Cette atrophie peut être observée en imagerie par résonance magnétique structurale ou tomographique (Figure 9, panel inférieur).

Les premières structures affectées par les DNF sont l'hippocampe et le cortex entorhinal [176]. De nombreux chercheurs ont donc entrepris de suivre l'évolution du volume de l'hippocampe et des régions corticales adjacentes dans certains cas et de mesurer une vitesse d'atrophie chez des patients atteints de MA ou de MCI. Bien qu'elle varie d'une étude à une autre (voir ci-dessous), la vitesse d'atrophie hippocampique est significativement plus élevée chez les patients Alzheimer ou MCI que chez les sujets contrôles sains [162, 224, 225]. De plus la mesure du taux d'atrophie de l'hippocampe et du cortex temporal notamment permet de différencier les patients aMCI qui développent une MA des aMCI stables [226]. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'il n'existe aucun consensus dans la communauté scientifique quant aux méthodes d'analyse à employer pour mesurer ce taux d'atrophie hippocampique. En effet les régions prises en compte (Hippocampe, cortex entorhinal ou trans-entorhinal...) varient d'une étude à une autre, les délimitations de ces régions ne sont pas toujours clairement établies et parfois mesurées

manuellement. Il existe de plus une multitude de méthodes pour calculer le volume de ces régions et le taux d'atrophie (voxel-based morphometry, fluid registration, Jacobian changes ...) [227]. Tout ceci entraîne une extrême variabilité des taux d'atrophie mesurés d'une étude à une autre et rend délicate l'utilisation de ce taux d'atrophie hippocampique en tant que biomarqueur standard.

Afin de s'affranchir des variations interindividuelles et inter laboratoires liées à une délimitation parfois approximative des différentes structures cérébrales, certains auteurs préconisent plutôt de mesurer le taux d'atrophie globale du cerveau. Le taux d'atrophie globale est significativement plus élevé chez les patients Alzheimer (1,4-2,2 %/an) que chez les sujets contrôles sains (0,7 %/an). En revanche le taux d'atrophie globale est moins efficace que le taux d'atrophie hippocampique pour différencier les patients MCI des sujets contrôles sains et pour déterminer quels patients MCI ont plus de risque de développer une MA [225].

L'IRM structurale permet également de mesurer le taux d'élargissement des ventricules. Ce taux varie de 5 à 16 % chez les patients Alzheimer à 1,5 à 3 % chez les sujets contrôles sains [162]. Le bon contraste entre le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le tissu cérébral permet une bonne reproductibilité des mesures et permet d'estimer la progression de la maladie, cependant ce taux peut être affecté par des variations physiologiques liée à l'hydratation par exemple [224].

Plus récemment les avancées technologiques ont permis de mettre au point une méthode d'imagerie cérébrale sériée permettant de cartographier l'ensemble du cerveau en trois dimensions et par conséquent de mesurer l'épaisseur du cortex en tout point du cerveau. La dégénérescence des neurones liée à la formation des DNF se traduit en effet par un amincissement de l'épaisseur corticale (Figure 4B). Cet amincissement cortical débute au niveau des cortex entorhinal et temporal puis s'étend aux autres régions corticales en suivant une séquence très stéréotypée, similaire à la séquence d'expansion des DNF décrite par Braak et Braak en 1991 [176], et spécifique de la MA. De plus, la perte de substance grise

dans ces différentes régions cérébrales est corrélée à l'apparition ou l'aggravation des déficits cognitifs. [163]

L'IRM structurale permet donc, grâce à la mesure des taux d'atrophie hippocampique et globale et à l'émergence de méthodes permettant d'évaluer l'amincissement cortical, de suivre la progression de la maladie dans le temps et à travers l'ensemble du cerveau dès l'apparition des premiers symptômes cognitifs au stade prodromal [228]. Une diminution de la vitesse d'atrophie cérébrale ou corticale pourrait également permettre de mesurer l'efficacité thérapeutique de certains traitements visant à ralentir la progression de la maladie. Cependant, mesurer un taux d'atrophie implique de réaliser au minimum deux scans séparés par un intervalle de temps de 6 à 18 mois. Les délais d'attente avant d'obtenir un diagnostic fiable ou les résultats concernant l'efficacité d'un traitement au cours d'un essai clinique en utilisant cette technique, seraient donc extrêmement longs.

1.3.6.2.2.2. *Spectroscopie par résonance magnétique*

La spectroscopie par résonance magnétique (SRM) est une méthode non invasive basée à l'instar de l'IRM sur les propriétés de résonance magnétique nucléaire de l'atome d'hydrogène. Cette technique permet de mesurer la concentration in situ de différents composés parmi lesquels la créatinine, le glutamate, le N-acétyl-aspartate (NAA), et le myoinositol.

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du SNC. Quelques études suggèrent qu'une libération excessive de glutamate au cours de la MA provoquerait une excitotoxicité et par conséquent la dégénérescence des neurones [229]. Toutefois en SRM on observe une diminution de la concentration de glutamate dans les cerveaux des patients Alzheimer et dans une moindre mesure chez les patients MCI [230].

Le N-acétyl-aspartate est un acide aminé cytosolique synthétisé principalement dans les neurones [231]. Le NAA est donc considéré comme un marqueur de survie neuronale. La concentration de NAA est significativement réduite dans les régions cérébrales affectées par

la MA (hippocampe, cortex temporal, gyrus cingulaire postérieur, ...). Cette réduction est plus prononcée chez les patients Alzheimer que chez les patients MCI [230, 232].

Le myoinositol est quant à lui considéré comme un marqueur glial. La concentration de myoinositol a tendance à augmenter dans le cerveau des patients ce qui suggère la formation d'une gliose réactionnelle [233, 234]

En conclusion, la SRM est une méthode très sensible, permettant de suivre et de quantifier objectivement la dégénérescence des neurones et le développement de la gliose réactionnelle. De plus cette méthode a une valeur prédictive car elle permet d'identifier les patients MCI ayant le plus de risque d'évoluer vers la MA [232, 235].

1.3.6.2.3. Altération du métabolisme du glucose et du flux sanguin cérébral

La fonction des neurones est d'intégrer et de transmettre les informations provenant du monde extérieur et de l'organisme. Ces phénomènes se déroulent principalement au niveau des synapses. Cette activité synaptique peut être perturbée par l'adhésion d'oligomères de peptide A β au niveau des épines dendritiques ou par la déstabilisation des microtubules liée à une hyper phosphorylation des protéines Tau. L'activité synaptique serait donc un bon indicateur de l'état de santé des neurones.

Actuellement pour visualiser l'activité synaptique on utilise des méthodes indirectes fondées sur l'observation et la quantification du métabolisme du glucose ou des variations du flux sanguin cérébral. L'activité synaptique nécessite en effet une importante consommation d'énergie fournie par l'hydrolyse de molécules d'adénosine tri phosphate (ATP). L'ATP est produit au cours du métabolisme oxydatif du glucose, qui induit une augmentation très localisée du flux sanguin cérébral.

L'observation du métabolisme du glucose est possible grâce à l'utilisation d'un traceur radioactif le [^{18}F]fluoro-désoxyglucose (FDG) visualisable en TEP. Le FDG est un analogue non

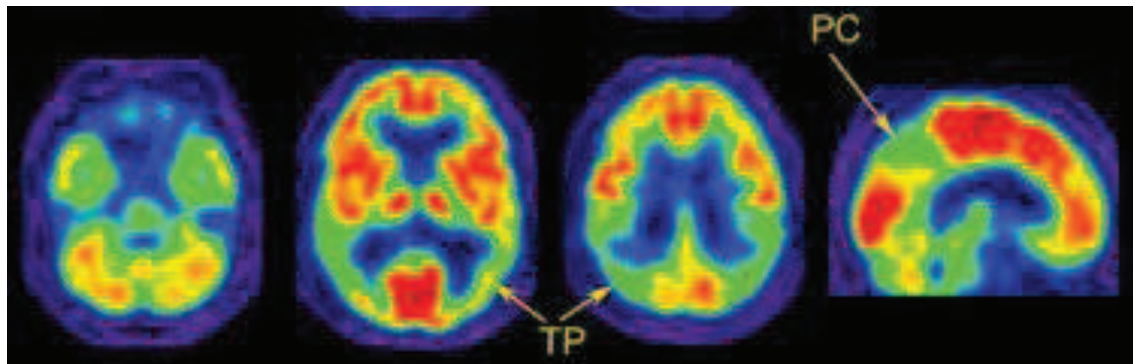


Figure 10 Scans TEP-FDG d'un patient Alzheimer. Les patients Alzheimer présentent un hypométabolisme au niveau des cortex temporo-pariétal (TP) et cingulaire postérieur (PC). [236]

hydrolysable du glucose, il s'accumule donc dans les régions cérébrales où la demande en glucose est importante. Le débit sanguin cérébral quant à lui est visualisable en IRM fonctionnelle grâce notamment aux propriétés diamagnétique de l'hémoglobine.

Ces techniques ont permis de mettre en évidence dans le cerveau de patients Alzheimer un hypométabolisme du glucose associé à une hypoperfusion des tissus cérébraux dans le cingulum postérieur et les cortex temporaux, pariétaux, et préfrontaux [236-240] (Figure 10). Ces altérations métaboliques, qui reflètent une altération des activités synaptiques des neurones avant qu'ils ne dégénèrent, sont fortement corrélées à une diminution des performances cognitives des patients [238, 239]. De plus ce biomarqueur aurait également une valeur prédictive. Une diminution du métabolisme du glucose dans l'hippocampe et le cortex temporal permettrait en effet de prédire l'apparition des premiers symptômes cognitifs chez des sujets cognitivement sains [241] ou une conversion vers le stade de démence chez des patients MCI [242].

D'un point de vue diagnostique, ce test TEP-FDG n'a qu'une spécificité de 73 à 78 % pour une sensibilité de 94 % [237]. Ce n'est pas suffisant pour établir avec certitude un diagnostic de MA. Cependant associée à d'autres biomarqueurs plus spécifiques de la maladie, la TEP-FDG peut être très utile pour orienter le diagnostic différentiel de la MA.

1.3.6.3. Dosage de molécules d'intérêt dans les fluides biologiques

1.3.6.3.1. Biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien

De tous les fluides biologiques contenant d'éventuels biomarqueurs de la MA, le plus étudié à l'heure actuelle est sans aucun doute le liquide céphalorachidien (LCR). Le LCR, produit dans les ventricules cérébraux par le plexus choroïde, est en contact étroit avec le parenchyme cérébral. Il joue un rôle primordial dans la clairance, au niveau central, des toxines et des déchets métaboliques produits par le système nerveux central qui seront ensuite éliminés en périphérie dans la circulation sanguine. Parmi les métabolites rejetés dans le LCR, on retrouve trois biomarqueurs internationalement reconnus et validés : le

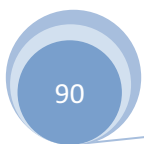
peptide A β , la protéine Tau sous toutes ses formes (Tau-t) et la protéine Tau phosphorylée (Tau-p), mais aussi d'autres biomarqueurs potentiels encore à l'étude. En recherche clinique ces biomarqueurs sont aisément accessibles in vivo en réalisant une ponction lombaire et ils sont quantifiables par des méthodes ELISA.

1.3.6.3.1.1. A β_{1-42}

Le clivage protéolytique de la protéine APP suivant la voie amyloïdogène conduit à la formation de peptide A β_{1-40} ou A β_{1-42} . Ces peptides sont libérés dans le milieu extracellulaire où ils peuvent soit s'agréger jusqu'à former des fibrilles insolubles qui se déposent dans le tissu nerveux, soit se retrouver sous forme soluble dans le LCR. Le taux de peptide A β_{1-42} est fortement diminué dans le LCR des patients Alzheimer ($\approx 50\%$) par rapport aux sujets sains contrôles [243, 244]. A contrario le taux de peptide A β_{1-40} dans le LCR des patients et des sujets sains est équivalent. Ceci pourrait s'expliquer par une diminution de la clairance du peptide A β_{1-42} qui a davantage tendance à s'agréger et à s'accumuler dans le tissu cérébral sous forme de plaques séniles [245]. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le taux d'A β_{1-42} est inférieur dans le LCR de sujets cognitivement sains porteurs de l'allèle ApoE4 par rapport à celui de sujets cognitivement sains non porteur de cet allèle [246] (cf. § 1.1.5).

Cette diminution du taux d'A β_{1-42} dans le LCR se retrouve également chez les patients MCI qui déclinent vers la MA [247, 248]. Ce biomarqueur a donc une bonne valeur prédictive et présente une bonne sensibilité (86 %) et une bonne spécificité (90 %) pour la MA lorsque l'on compare des patients Alzheimer et des sujets contrôles sains [243, 249]. En revanche si l'on compare les taux mesurés chez des patients Alzheimer avec ceux mesurés chez des patients souffrant d'autres formes de démences la spécificité de ce biomarqueur chute. En effet une diminution modérée du taux d'A β dans le LCR est également observée dans des cas de démence fronto-temporale [250], de démence à corps de Lewy [251], et de sclérose latérale amyotrophique [252].

La principale limite quant à l'utilisation de ce biomarqueur tient au fait que les résultats obtenus sont parfois très variables d'un laboratoire à un autre. Ces différences peuvent



s'expliquer, d'une part, par une grande hétérogénéité des protocoles de préparation et de conditionnement des échantillons précédant la mesure proprement dite. D'autre part, le taux d'A β ₁₋₄₂ mesuré dans le LCR d'un individu varie selon l'heure à laquelle a été effectué le prélèvement et selon le niveau d'activité de cet individu. [253]. Actuellement les protocoles de manipulation des échantillons sont en cours d'harmonisation. Toutefois la nécessité de réaliser des prélèvements à heure fixe et dans les mêmes conditions au cours des études longitudinales et transversales, demeure une contrainte importante pour les patients et les expérimentateurs.

1.3.6.3.1.2. *Tau Totale*

La protéine Tau possède six isoformes dont l'activité est finement régulée notamment par des cycles de phosphorylation-déphosphorylation au niveau des 85 sites de phosphorylation potentiels contenus dans la séquence protéique. Tau peut par conséquent adopter de nombreuses conformations différentes (cf. § 1.4.1). Grâce à des kits ELISA capables de détecter l'ensemble de ces conformations, il est possible de mesurer le taux total des protéines Tau (Tau-t). Ce taux Tau-t est 2 à 3 fois plus élevé dans le LCR des patients Alzheimer par rapport aux sujets contrôles sains [244, 254-256]. Ce test permet de différencier les patients Alzheimer des sujets contrôles avec une sensibilité de 90 % et une spécificité de 81 % [249]. De même, on retrouve un taux Tau-t élevé dans le LCR de 90 % des patients MCI qui développeront par la suite la MA et dans celui de seulement 10 % des patients MCI stables [247]

Toutefois, Tau-t serait davantage un indicateur de neurodégénérescence qu'un biomarqueur spécifique de la MA. Tau est en effet une protéine intracellulaire qui n'est vraisemblablement libérée dans le milieu extracellulaire qu'après lyse des neurones. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le LCR de patients souffrants d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Creutzfeldt-Jacob [257] ou ayant subi un traumatisme crânien [257] contient également un taux de Tau-t très supérieur à la normale.

1.3.6.3.1.3. *Tau Phosphorylée*

Au cours de la MA une dérégulation des cycles de phosphorylation-déphosphorylation provoquent une hyperphosphorylation des protéines Tau. En utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre certains épitopes phosphorylés on observe que le niveau de Tau phosphorylée (Tau-p) au niveau des acides aminés 181 et 231 est significativement plus élevé dans le LCR des patients Alzheimer que dans celui des sujets contrôles. La sensibilité de ce test ELISA est en moyenne de 80 % pour une spécificité de 92 % [249]. Plus important encore, contrairement au taux Tau-t, le taux Tau-p est très faible dans le LCR des patients souffrant de démence vasculaire, de démence front-temporale, de démence à corps de lewy, ou de dépression [255, 258-260]. Tau-p est donc plus spécifique de la MA que Tau-t et peut être très utile pour établir le diagnostic différentiel de la MA.

De plus, chez les patients MCI, le taux de Tau-p dans le LCR est corrélé au déclin cognitif observé [261, 262] et permet de prédire le développement de la MA au cours des 18 mois suivant la ponction lombaire dans environ 80 % des cas de conversion des MCI en MA [263].

1.3.6.3.1.4. *Combinaison des trois biomarqueurs principaux*

Afin de contourner les problèmes de spécificité et de sensibilité qui se posent lorsque l'on considère ces trois biomarqueurs individuellement, il est possible de les combiner en calculant des ratios tels que $A\beta_{1-42}/\text{Tau-t}$ ou $A\beta_{1-42}/\text{Tau-p}$. Ainsi combinés ces biomarqueurs permettent de différencier les patients Alzheimer des sujets contrôles et des patients atteints d'autres démences [243] et de distinguer les patients au stade prodromal sur le point de développer la maladie [264] avec une sensibilité et une spécificité supérieure à 80 %.

Ces trois biomarqueurs du LCR combinés permettent donc de diagnostiquer et de suivre la progression de la maladie d'Alzheimer. Ils présentent de plus l'avantage de pouvoir être facilement quantifiés grâce à des kits ELISA et ce dans tous les centres hospitaliers équipés pour pratiquer des ponctions lombaires.

1.3.6.3.1.5. *Autres biomarqueurs du LCR*

La libération et l'interaction du peptide A β soluble avec les membranes plasmiques neuronales ou gliales entraîne l'activation ou la dérégulation de nombreuses voies métaboliques intracellulaires qui conduisent à la génération d'un stress oxydatif, à une modification du niveau d'expression de certains gènes et à des modifications post traductionnelles. Toutes ces perturbations provoquent in fine la dégénérescence des neurones, le développement d'une réponse inflammatoire et la libération dans le milieu extracellulaire puis dans le LCR de nombreuses molécules qui constituent autant de biomarqueurs potentiels de la MA.

Certaines de ces molécules sont liées au métabolisme de la protéine APP et sont relativement spécifiques de la MA. C'est le cas par exemple de la β -sécrétase BACE1 dont la concentration et l'activité augmentent dans le LCR des patients Alzheimer et des patients MCI par rapport aux sujets contrôle [265, 266]. De même le niveau de clusterine, une apolipoprotéine connue pour se lier au peptide A β , augmente dans le LCR des patients [267].

La plupart de ces biomarqueurs potentiels ne sont pas spécifiques de la MA. Ce sont des molécules libérées dans le milieu extracellulaire en cas de neurodégénérescence ou de maladie inflammatoire d'origines diverses. Parmi ces molécules on retrouve des facteurs neurotrophiques tels que le NGF (nerve growth factor) dont le niveau augmente dans le LCR des patients Alzheimer [268, 269] et le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) dont la concentration est au contraire diminuée au cours de la MA [270-272].

Le stress oxydant induit par A β provoque la peroxydation des protéines et des lipides et des dommages à l'ADN. C'est pourquoi le niveau de produits issus de l'oxydation des lipides, des protéines et des nucléotides tels que la 3-nitrotyrosine (3NT) [273] les F2-isoprostanes [274-276], et la 8-hydro-2'-deoxyguanosine (8-OHDG) [277, 278], ont tendance à augmenter dans le LCR des malades.

L'inflammation du SNC est très précoce au cours de la MA et joue un rôle majeur dans la pathophysiologie de la maladie. Certaines cytokines pro-inflammatoires contribueraient directement à la dégénérescence des neurones [279]. Une variation de la concentration des molécules inflammatoires permettrait donc de détecter précocement la maladie et d'estimer l'ampleur de la neurodégénérescence. Quelques études ont montré une augmentation du niveau de certaines cytokines et chimiokines (TGF- β , TNF α , IL-1, IL-6, ...) dans le LCR des patients. Cependant ces résultats ne sont pas toujours reproductibles d'un laboratoire à un autre. Par conséquent aucun de ces marqueurs inflammatoires n'a encore été validé en tant que biomarqueur pour le diagnostic de la MA ([280]. (Revue [281] [282]).

Le fait que l'hypercholestérolémie soit un facteur de risque et l'allèle $\epsilon 4$ de l'ApoE un gène de susceptibilité majeur de la MA souligne le rôle prépondérant que jouent les lipides dans la pathophysiologie de la MA. Le métabolisme des phospholipides, des sphingolipides, des gangliosides et du cholestérol est effectivement altéré au cours de la MA et cela se traduit par une variation des niveaux des métabolites lipidiques libérés dans les fluides biologiques.

Dans le cerveau, pour maintenir l'homéostasie, le cholestérol en excès est converti en 24S-hydroxycholesterol (24OHC) dans les neurones par une cholestérol 24-hydroxylase (CYP46A1) ou en 27-hydroxycholesterol (27OHC) par une stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) dans les autres cellules de l'organisme. La majeure partie du 24OHC produit par les neurones traverse la BHE et est directement libéré dans la circulation sanguine. Seul 1 % de la quantité de 24OHC produite dans le cerveau est sécrétée dans le LCR. Cette petite fraction de 24OHC dans le LCR augmente au cours d'une maladie neurodégénérative telle que la MA. De plus il existe une corrélation entre le taux de 24OHC et les taux de Tau-P et Tau-T dans le LCR [283, 284]. De même le taux de 27OHC augmente dans le LCR des patients Alzheimer et MCI [285]. (Revue [286]).

Les phospholipides, les sphingolipides et les gangliosides sont des composants majeurs des membranes plasmiques cellulaires et ils jouent un rôle prépondérant dans la transduction des signaux extracellulaires et dans la régulation de la protéolyse des protéines membranaires telles que l'APP par exemple. Malgré leur implication bien connue dans la

pathophysiologie de la MA, relativement peu d'études se sont intéressées à ces lipides en tant que biomarqueurs potentiels. Pourtant il est possible d'observer une réduction du taux de phospholipides et de leurs métabolites [287] ainsi qu'une augmentation du taux de sphingomyéline [288, 289] dans le LCR de patients Alzheimer. (Revue [290])

Cette liste de biomarqueurs potentiels de la MA dans le LCR n'est pas exhaustive, de nombreuses autres molécules font actuellement l'objet d'investigations (Revue [291]). Prises individuellement, aucune de ces molécules ne permet d'établir sans équivoque un diagnostic de MA. De ce fait l'approche la plus répandue actuellement consiste à développer des kits permettant d'analyser conjointement ces différents biomarqueurs et les trois biomarqueurs principaux décrits précédemment afin de mieux caractériser le profil de chaque patient. Ceci permettrait non seulement d'établir un diagnostic avec plus de certitude mais également de personnaliser le traitement fourni au patient, en fonction du stade de la pathologie par exemple, et ainsi de réduire le risque d'apparition d'effets secondaires indésirables.

1.3.6.3.2. Biomarqueurs sanguins

Les recherches menées à partir du LCR ont abouti à la découverte et au développement de trois biomarqueurs permettant de diagnostiquer et de prédire avec une relative fiabilité le développement de la MA. Cependant le prélèvement de LCR par ponction lombaire est une procédure invasive et potentiellement douloureuse qui exige une hospitalisation du patient et qui provoque dans certains cas des effets secondaires indésirables. C'est pourquoi, actuellement, de nombreuses études recherchant des biomarqueurs détectables dans le sang des malades sont en cours.

1.3.6.3.2.1. $A\beta$

Le principal biomarqueur potentiel recherché dans le plasma est le peptide $A\beta$. Les peptides détectés dans le plasma ont deux origines possibles. Une fraction de ces peptides est d'origine centrale et est libérée dans le sang après avoir transité par le LCR (cf. 1.3.6.3.1.1). La seconde et majeure partie de ces peptides est d'origine périphérique et est produite dans

le sang par les plaquettes. Les plaquettes possèdent en effet tout l'équipement enzymatique pour métaboliser l'APP et libérer des fragments solubles de la protéine APP (APP β et APP α) et des peptides A β [292, 293]. Il est toutefois intéressant de noter que les peptides A β libérés par les plaquettes sont essentiellement composés de 40 AA [294, 295] tandis que les peptides A β d'origine centrale sont majoritairement composés de 42 AA.

Quelle que soit l'origine de ces peptides, il est pour le moment difficile d'établir une corrélation entre le taux plasmatique d'A $\beta_{1-40/42}$ et le risque de développer la maladie [296]. Les résultats obtenus sont en effet très contradictoires. Différentes études ont relevé une augmentation [297], une diminution [298] ou encore aucune différence [299] entre les taux de peptide A β_{1-42} mesurés dans le sang de patients Alzheimer ou dans le sang de sujets contrôles. Plusieurs études suggèrent en revanche que le rapport A β_{1-42} /A β_{1-40} serait diminué et corrélé au déclin cognitif chez les patients MCI qui évoluent vers la MA [300-302].

Outre le fait que ces résultats soient encore très controversés, la très faible concentration de peptide A β (\approx 10% de la concentration d'A β dans le LCR) et la présence dans le plasma de nombreuses protéines, telle que l'albumine sérique [303], qui piègent le peptide A β circulant et les fragments Fc des anticorps compliquent considérablement le dosage du taux plasmatique d'A β par la méthode ELISA. C'est pourquoi les scientifiques s'accordent sur le fait que le taux plasmatique d'A β_{1-42} n'est pas à ce jour un biomarqueur fiable pour le diagnostic de la MA.

1.3.6.3.2.2. Altérations du protéome et du transcriptome

En dépit des difficultés que rencontrent les scientifiques pour doser efficacement le taux plasmatique d'A β , celui-ci varie suffisamment chez les patients Alzheimer pour induire un effet biologique sur les cellules. Cet effet biologique se traduit essentiellement par une modification du niveau d'expression de nombreux gènes et par des modifications post traductionnelles de protéines.

La plupart des gènes codent pour des protéines que l'on peut identifier et quantifier grâce aux techniques modernes telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse et les méthodes de chromatographie en phase liquide ou gazeuse. Des études protéomiques comparant la composition du plasma provenant de patients Alzheimer ou de sujets contrôles ont ainsi révélé une augmentation de l'expression de certaines protéines, parmi lesquelles l' α 2-Macroglobuline (α 2M) [304], le facteur H du complément (CFH) [304], l' α 1-antitrypsine [305], l' α -1-antichymotrypsine (α 1ACT) [306, 307] et une diminution de l'expression de l'Apolipoprotéine A1 (ApoA1) [308, 309]. (Revue [310])

De même, le niveau d'expression de la clusterine est augmenté dans le plasma de patients ayant un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer [311]. Cette concentration plasmatique de clusterine est étroitement associée au taux d'atrophie du cortex entorhinal et au score obtenu au test MMSE [312].

La présence de peptide A β dans le milieu extracellulaire entraîne également une répression de l'expression de gènes codants pour une classe particulière de micro ARN (ARN_{mi}) [313]. Les ARN_{mi} sont de petits ARN non codant de 20 à 25 nucléotides dont le rôle est de réguler l'expression d'autres gènes en se liant aux séquences régulatrices non traduites situées en 3' (3'UTR). Les ARNmi dont le niveau d'expression est modifié au cours de la MA (miR-29, miR-15, miR-107, miR-181, miR-146, miR-9, miR-101, miR-106, ...) sont particulièrement impliqués dans la régulation de gènes liés à la MA tels que BACE1, APP et MAPT (Revue [314]). Une étude publiée récemment par Geekiyange et ses collaborateurs montre que ces ARNmi, quantifiés par RT-PCR, sont significativement sous exprimés dans le sérum des patients Alzheimer et des patients MCI [315].

Au cours de la MA de nombreuses voies de transduction et de régulation intracellulaires sont perturbées et de nombreuses protéines, et en particulier des enzymes, subissent des modifications post traductionnelles ou des changements de conformations qui affectent leur activité. C'est le cas par exemple de la protéine kinase C (PKC). L'interaction du peptide A β avec la membrane plasmique des érythrocytes induit en effet un influx d'ions calcium qui provoque des changements de conformation et la relocalisation à la membrane plasmique

de la PKC. Ces changements de conformations peuvent être mis en évidence grâce à des sondes fluorescentes et constituer ainsi un biomarqueur potentiel pour le diagnostic de la MA [316].

1.3.6.3.2.3. Marqueurs de stress oxydatif

Plusieurs équipes ont tenté de mettre en évidence une variation des niveaux plasmatiques de métabolites issus de l'oxydation des lipides et des protéines similaire à celle observable dans le LCR des patients Alzheimer. Une étude a montré une hausse du taux d'isoprostanes dans le plasma des patients Alzheimer et MCI [317]. Ces résultats n'ont cependant pas pu être reproduits dans plusieurs études publiées ultérieurement [318-321]. De plus la concentration plasmatique d'isoprostanes est également influencée par d'autres facteurs systémiques induisant un stress oxydatif indépendamment de la MA. Le taux d'isoprostanes plasmatique ne constitue donc pas un biomarqueur fiable.

1.3.6.3.2.4. Marqueurs inflammatoires

Dans le cadre de l'étude Rotterdam, Engelhart et al. ont réalisé des prélèvements sanguins chez des sujets cognitivement sains au début de l'étude et ont montré que les sujets présentant une augmentation de la concentration sanguine des protéines inflammatoires α 1-antichymotrypsine, IL-6 et CRP (C-reactive protein), ont un risque accru de développer une démence de type Alzheimer [322]. Par ailleurs il serait possible de prédire et de diagnostiquer la MA avec près de 90 % de certitude en dosant la concentration plasmatique de 18 protéines parmi lesquelles on retrouve essentiellement des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance [323].

L'activation de la réponse inflammatoire se traduit aussi par une augmentation du taux de protéines et de facteurs du complément circulant dans le plasma des patients tels que CFH (complement factor H) C3 et C4 [324, 325]. De plus cette variation de la concentration plasmatique de la protéine C3 est corrélée à une augmentation du taux d'atrophie cérébral globale [325] et à la sévérité du déficit cognitif évalué par le test MMSE [326].

Le dosage des protéines inflammatoires pour diagnostiquer la MA semble donc être une piste prometteuse pour le développement d'un test sanguin pour le diagnostic de la MA. Cependant comme nous l'avons vu précédemment dans le LCR, ces facteurs sont peu spécifiques de cette maladie et les résultats obtenus dans différents laboratoires ne sont pas toujours reproductibles, c'est pourquoi à ce jour, aucun test fondé sur la détection et la quantification des protéines inflammatoires n'a encore été reconnu et validé par l'ensemble la communauté scientifique.

1.3.6.3.2.5. Altération du lipidome

La grande majorité des oxystérols produits par les neurones (24OHC) sont directement libérés dans la circulation sanguine sans entrer dans le LCR [327]. Le taux de 24OHC relevé dans le plasma dépend du nombre de neurones métaboliquement actifs. Contrairement au taux céphalo-rachidien, le taux plasmatique de 24OHC serait donc un indicateur de survie neuronale. Ce taux diminue dans le plasma des patients atteints de maladies neurodégénératives telle que la MA [328, 329]. (Revue [286])

Avec l'essor de la métabolomique et le développement de la spectrométrie de masse, quelques études préliminaires montrant une différence entre le profil phospholipidique plasmatique des patients Alzheimer et celui des sujets contrôles, ont été publiées [330, 331]. Toutefois les résultats les plus intéressants ont été obtenus en comparant les niveaux plasmatiques de sphingolipides. Le plasma des patients Alzheimer contiendrait en effet davantage de céramides et moins de sphingomyéline que celui des sujets contrôles [332, 333]

1.3.6.3.3. Biomarqueurs urinaires

L'urine est Le troisième fluide biologique utilisable pour la recherche de biomarqueurs de la MA. Le prélèvement d'urine est moins invasif que prélèvement de LCR ou de plasma, néanmoins sa haute teneur en sels et sa faible concentration en protéines limitent

l'utilisation de ce fluide pour des analyses protéomiques [334]. Quelques biomarqueurs potentiels ont toutefois été proposés. (Revue [310])

Les isoprostanes peuvent être détectés dans les urines. Cependant si quelques études ont montré une augmentation du taux d'isoprostanes dans les urines des patients Alzheimer [335, 336], des études plus récentes n'ont montré aucune différence significative entre les taux d'isoprostanes relevés dans les urines des patients Alzheimer ou des sujets contrôles [318, 320, 337].

La détection de la protéine NTP (Neural Thread Protein) au moyen de kits ELISA [338, 339] semble plus prometteuse. Le taux urinaire de cette protéine est en effet significativement plus élevé chez les patients Alzheimer que chez les sujets contrôles [338-340]. De plus une protéine NTP spécifiquement associée à la MA, l'AD7c-NTP, a été identifiée et détectée dans le LCR des patients à un taux supérieur à celui observé dans le LCR des sujets contrôles et corrélé à la sévérité de la maladie [341, 342].

1.3.6.4. Electrophysiologie in vivo

L'électrophysiologie in vivo permet grâce à des électrodes placées sur le crâne des sujets de mesurer l'activité électrique du système nerveux au repos ou en réponse à une stimulation externe. Chez l'Homme les techniques les plus couramment utilisées sont l'électroencéphalographie (EEG) et le potentiel de réponse évoquée (PRE). L'utilisation en recherche clinique de ces techniques non invasives et peu coûteuses a connu un grand essor ces dernières années grâce notamment au développement technologique et à la simplification des méthodes d'analyse. Ces méthodes d'électrophysiologie présentent un grand intérêt pour le diagnostic et le suivi de la MA car dès le stade prodromal chaque stade de la maladie se distingue par une combinaison de biomarqueurs neurophysiologiques spécifiques (Revue [343]).

En EEG les patients MCI se distinguent en effet des sujets contrôles par une diminution de l'activité delta et par une augmentation de l'activité thêta [344-346]. En ERP, l'apparition des

premiers symptômes mnésiques se traduit par une diminution de la réponse P600 lors d'une tâche de répétition de mots [347]. Il est également possible de discriminer au sein de ces patients MCI ceux qui évolueront vers la MA. Ceux-ci présentent en effet une augmentation de la latence et une diminution de l'amplitude de l'onde P300 [348, 349].

La maladie d'Alzheimer, est quant à elle, associée à une augmentation des activités delta et thêta [344, 346, 350] et une diminution de l'activité α en EEG [351, 352] et à une atténuation du potentiel N400 en ERP [353].

1.4. La protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer

La protéine Tau participe à la polymérisation et à la stabilisation des microtubules, des éléments du cytosquelette impliqués dans le maintien de la forme des cellules et le transport intracellulaire. Dans les neurones le rôle de la protéine Tau est crucial car les microtubules sont indispensables à la formation des dendrites et de l'axone et au transport axonal des protéines. Malheureusement, au cours de la MA, la protéine Tau subit de nombreuses modifications post traductionnelles qui l'empêche de remplir ses fonctions et qui entraînent son agrégation et la formation des dégénérescences neurofibrillaires.

1.4.1. Caractéristiques de la protéine Tau

Le gène de la protéine Tau, localisé sur le chromosome 17q21, mesure 100 kb et contient 16 exons. Ce seul gène encode six isoformes de Tau composées de 352 à 441 acides aminés par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10. [354, 355]

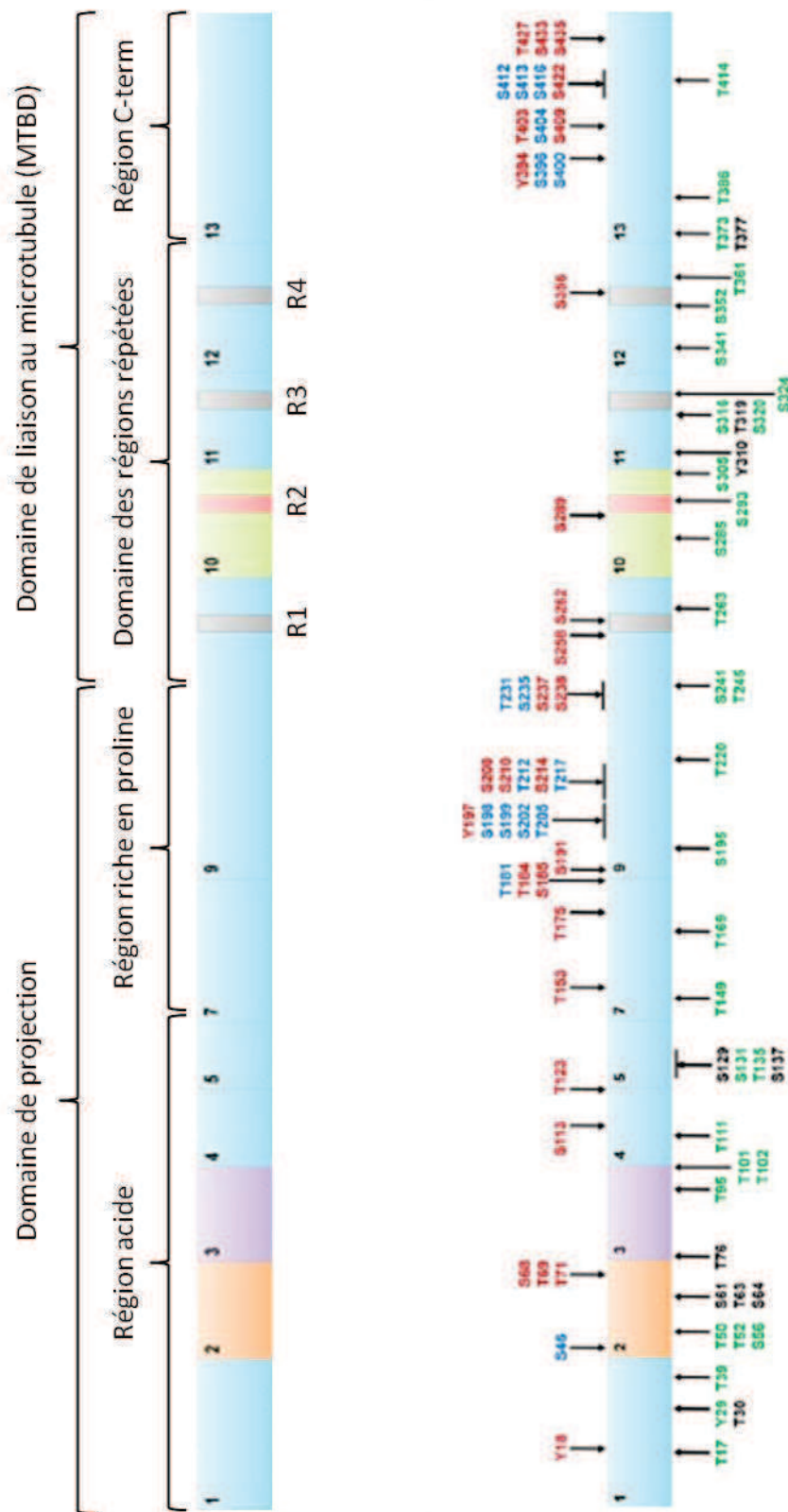


Figure 11 La protéine Tau et ses sites de phosphorylation. Les sites phosphorylés dans le cerveau des patients Alzheimer sont indiqués en rouge, les sites phosphorylés dans le cerveau des sujets sains sont indiqués en verts et les sites phosphorylés dans les deux cas sont indiqués en bleu. [356]

La protéine Tau comporte un domaine de projection et un domaine de liaison aux microtubules (MTBD) (Figure 11). Le domaine de projection comprend une région riche en proline. Ce domaine joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'interaction de Tau avec les microtubules et d'autres protéines du cytosquelette et de la membrane plasmique grâce à la présence de nombreuses sérines et thréonines qui constituent des sites de phosphorylation potentiels. Le domaine MTBD comporte une région acide à l'extrémité C-terminale de la protéine et une région composée de trois ou quatre régions répétées (R1-R4) selon les isoformes. Ce sont ces régions répétées composées d'une trentaine d'acides aminés qui permettent à Tau de se lier aux microtubules et de les stabiliser. Chaque région répétée contient un motif KXGS qui peut être phosphorylé au niveau de la sérine. Une phosphorylation au niveau de ces motifs réduit l'affinité de Tau pour les microtubules et favorise sa libération dans le cytosol.

La séquence peptidique de Tau contient également deux motifs, ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ et ³⁰⁶VQIVYK³¹¹, de six acides aminés situés en amont des régions R2 et R3, qui ont tendance à former des feuillets β lorsque la protéine est tronquée ou hyperphosphorylée [190, 357]. (Revue [189, 356])

1.4.2. Phosphorylation

Au cours de la MA, la protéine Tau subit de nombreuses modifications post traductionnelles (glycosylation, glycation, clivage, polyamination, ubiquitination, nitration) qui influent sur son agrégation mais de toutes ces modifications la plus importante dans la pathogénèse de la maladie est sans aucun doute la phosphorylation (Revue [356]).

La séquence peptidique de la protéine tau contient 85 sites de phosphorylation potentiels parmi lesquels 45 sérines, 35 thréonines et 5 tyrosines [358-360] (Figure 11). La phosphorylation de Tau a un impact sur sa fonction de stabilisation des microtubules mais aussi sur son agrégation. En effet l'addition d'un groupement phosphate sur l'un des 208 premiers AA défavorise l'agrégation de Tau tandis qu'une phosphorylation des résidus de l'extrémité C-terminale la favorise [361].

Le niveau de phosphorylation de Tau est le fruit d'un équilibre entre l'activité des protéines kinases et l'activité des phosphatases. Les protéines kinases capables de phosphoryler Tau sont très nombreuses. Parmi celles-ci on retrouve la GSK-3 β (glycogen synthase-3 β), la MAPK (mitogen activated protein kinase), la cdk5 (cyclin dependent protein kinase-5), la PKA (protein kinase cAMP dependent), la PKB/Akt (protein kinase B), la PKC (protein kinase C), la CaMKII (Camodulin-dependent protein kinase II), la CK-1 (casein kinase), la DYRK1A (dual-specificity tyrosine phosphorylation and regulated kinase 1A) ... [356, 362]

Dans les conditions physiologiques la phosphorylation de Tau est transitoire et réversible grâce à l'action des phosphatases. La Phosphatase PP-2A contribue à plus de 70 % à la déphosphorylation de Tau. Le reste des protéines Tau phosphorylées est essentiellement pris en charge par PP1 et PP5 et dans une moindre mesure par PP-2B [363].

Dans le cerveau des patients Alzheimer, l'expression et l'activité des protéines kinases GSK3 β , CDK5, DYRK1A, CK1 et p38 sont augmentées tandis que l'activité de PP-2A est diminuée de 50 % et celles de PP5 et PP1 de 20 % [363, 364]. Ce déséquilibre provoque une hyperphosphorylation des protéines Tau et leur libération dans le cytosol des neurones.

Les protéines Tau hyperphosphorylées libérées dans le cytosol subissent des modifications conformationnelles [365, 366] et notamment la formation de structure en feuillets β au niveau des motifs ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ et ³⁰⁶VQIVYK³¹¹, qui favorisent la formation des oligomères et des protomères de Tau [190, 357].

Cependant, environ 40 % des protéines tau hyperphosphorylées ne forme pas d'agrégats et reste libre dans le cytosol. Ces protéines Tau hyperphosphorylées solubles sont relativement toxiques pour les cellules car elles interagissent avec les protéines Tau normales et d'autres protéines associées aux microtubules (MAP 1A/B et MAP2), les séquestrent dans le cytosol et les empêchent de jouer leur rôle de stabilisateurs des microtubules [367-369].

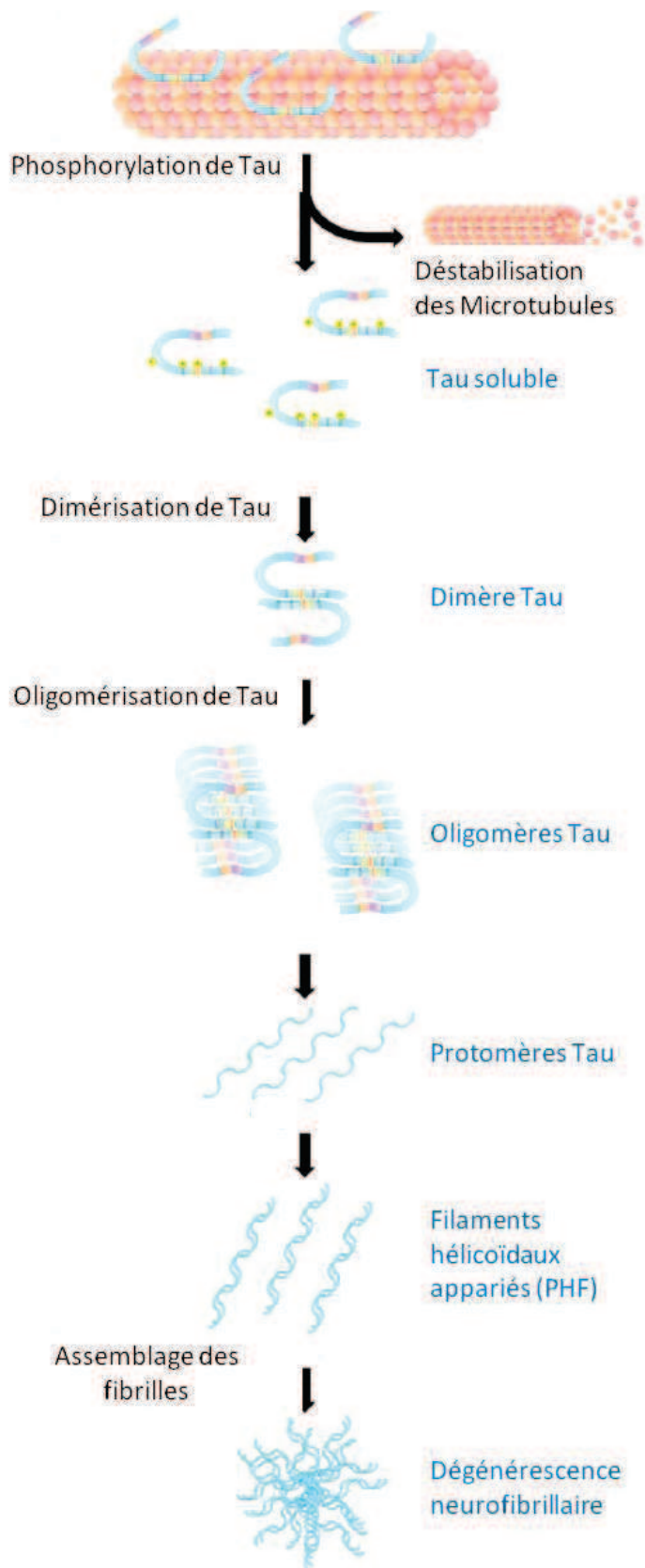


Figure 12 Agrégation de la protéine Tau et formation des dégénérescences neurofibrillaires.

La phosphorylation anormale des protéines Tau provoque leur libération dans le cytosol où elles se dimérisent et s'oligomérisent. Ces oligomères agissent comme des noyaux à partir desquels les protomères se forment par élongation. Les protomères s'apparient ensuite pour former les filaments hélicoïdaux appariés qui constituent les dégénérescences neurofibrillaires. [356]

1.4.3. Agrégation

Dans les DNF, ces lésions caractéristiques de la MA, les protéines Tau apparaissent agrégées sous forme de filaments protéiques hélicoïdaux appariés. La cascade d'évènements qui mène à la formation de ces agrégats commence avec la dissociation des protéines Tau associées aux microtubules. Cette dissociation est provoquée par la phosphorylation de sérines et de thréonines situées dans les régions MTBD. Une fois libérées dans le cytosol les protéines Tau subissent des modifications post traductionnelles (phosphorylation, clivage ...) [356] qui induisent des changements de conformation et la formation de feuilletts β [190]. Cet enrichissement en feuilletts β hydrophobes favorise la formation de dimères stables à partir desquels des oligomères de plus grande taille se forment par nucléation de nouvelles protéines Tau. Ces oligomères de grande taille, composés d'environ 40 Tau [188], subissent ensuite un phénomène d'élongation qui aboutit à la formation de filaments protéiques appelés protomères. Pour finir ces protomères s'apparient pour former les PHF qui constituent les DNF (Figure 12). (Revue [189])

La présence d'une quantité exacerbée d'oligomères solubles de Tau a été mise en évidence dans le cerveau des patients Alzheimer [192, 370]. Ces oligomères ont longtemps été considérés comme de simples intermédiaires dans la formation des filaments de Tau, mais des études récentes révèlent qu'ils jouent probablement un rôle plus actif dans la maladie. Il semble que chez des souris transgéniques exprimant la mutation P301S, les pertes neuronales et les déficits comportementaux sont davantage liés à l'accumulation d'oligomères Tau qu'à la présence de DNF [371]. De plus ces oligomères induisent une neurodégénérescence, et des dysfonctionnements synaptiques et mitochondriaux lorsqu'ils sont injectés dans les hippocampes de souris sauvages [372] et une augmentation de la concentration calcique intracellulaire dans des cellules en culture [373]. A contrario les fibrilles ne semblent pas toxiques pour les neurones : l'élongation des oligomères serait donc plutôt neuroprotectrice [372, 374, 375].

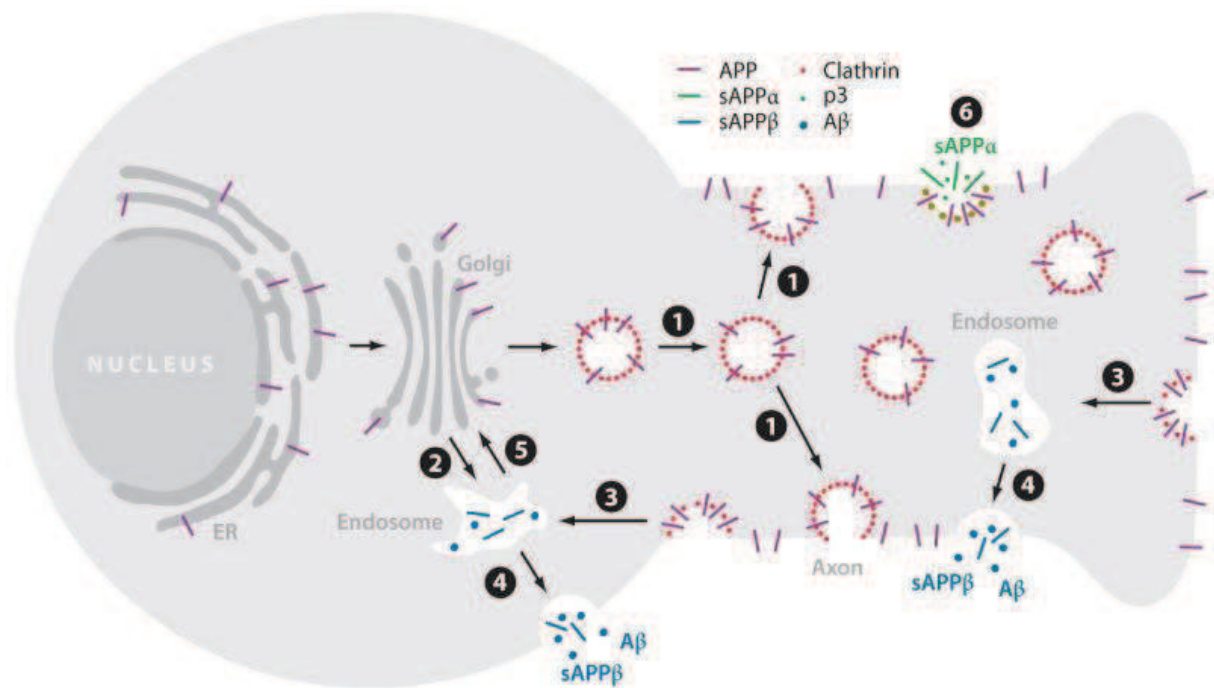


Figure 13 Trafic intraneuronal de la protéine APP. La protéine APP est produite dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi puis transportée le long de l'axone vers la membrane plasmique (1) ou vers les endosomes (2). Une fois dans la membrane plasmique APP est clivée par une α -sécrétase (6) ou réinternalisée dans les endosomes où elle est clivée par une β -sécrétase. Les peptides A β produits dans les endosomes sont ensuite libérés dans le milieu extracellulaire par exocytose. [376]

1.4.4. Conséquences sur le trafic axonal

Le transport axonal ou dendritique est essentiel à la fonction et à la survie des neurones. Il permet de transporter des protéines, des lipides, des vésicules synaptiques ou des organites (mitochondries, lysosomes, ...) du soma où s'effectuent la plupart des voies anaboliques vers les synapses et inversement. Le transport axonal requiert la présence de microtubules stables, ceux-ci servent en effet de rails sur lesquels des protéines motrices (kinésines et dynéines) transportent différents cargos. La protéine Tau en tant que stabilisatrice des microtubules influe sur ce transport axonal. Il a notamment été montré qu'une surexpression de Tau normale ou hyperphosphorylée perturbe le transport axonal des peroxysomes rendant la cellule vulnérable au stress oxydatif [377], de la protéine APP et des mitochondries [377, 378]. Ces perturbations provoquent la dégénérescence des synapses puis des neurones. (Revue [379])

1.5. Synthèse du peptide β -amyloïde

1.5.1. Métabolisme de APP

Le gène de la protéine APP est localisé sur le chromosome 21 et comporte 18 exons. Trois isoformes peuvent être obtenues par épissage alternatif des exons 7 et 8 : APP770, APP751 et APP695. APP est une protéine ubiquitaire mais l'isoforme APP695 est préférentiellement exprimée dans les neurones.

APP est une protéine transmembranaire de type I transloquée dans le réticulum endoplasmique au cours de la traduction. APP est ensuite transportée vers les endosomes précoces ou vers la membrane plasmique via la voie de sécrétion ou par transport antérograde le long de l'axone [380]. Les protéines APP localisées dans la membrane plasmique peuvent ensuite être réinternalisées par endocytose clathrine-dépendante et redirigées vers les endosomes tardifs [376] (Figure 13).

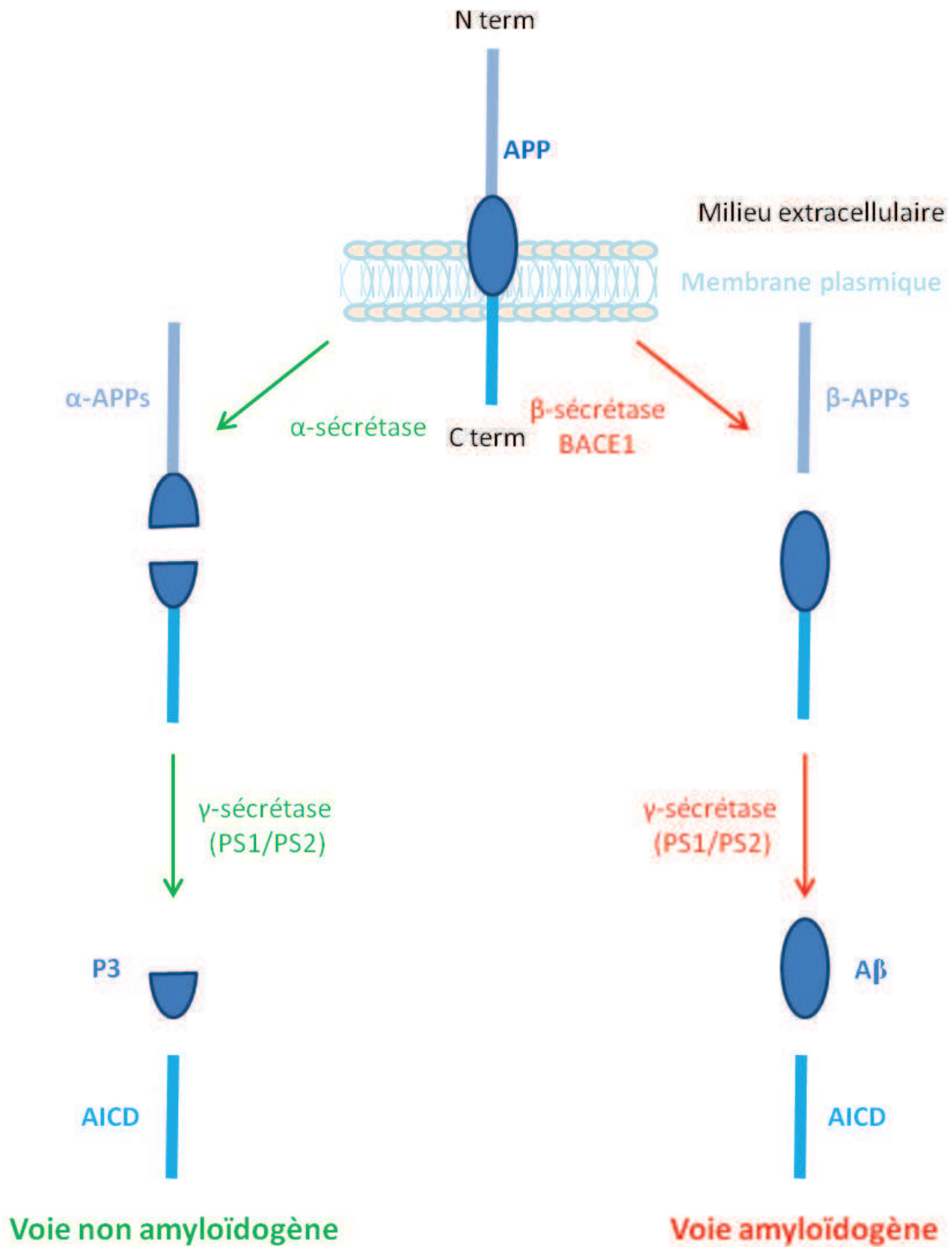


Figure 14 Voies amyloïdogène et non amyloïdogène. Dans la voie non amyloïdogène la protéine APP est clivée par une α -sécrétase puis par une γ -sécrétase. Cette voie aboutit à la production d'un peptide P3 non pathogène. Dans la voie amyloïdogène la protéine APP est clivée par une β -sécrétase qui provoque la libération du peptide A β .

Au cours de son transfert vers la membrane APP poursuit sa maturation qui consiste notamment à additionner un oligosaccharide sur le groupement amine d'une asparagine (N-glycosylation) ou sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine (O-glycosylation) [169]. La maturation d'APP implique également des clivages par des sécrétases. APP peut être métabolisées suivant deux voies antagonistes, la voie non amyloïdogène et la voie amyloïdogène (Figure 14).

Dans la voie non amyloïdogène l'APP est d'abord clivée par une α -sécrétase puis par le complexe γ -sécrétase. La fonction α -sécrétase est assurée par ADAM-10, ADAM-9 et ADAM-17 [381-383]. Les membres de la famille ADAM sont des métalloprotéases et des désintégrines transmembranaires de type I localisées dans la membrane plasmique (Figure 13). Les α -sécrétases clivent APP au niveau du 17^{ème} acide aminé, c'est-à-dire au milieu de la séquence du peptide A β (Figure 15), et génère un peptide sAPP- α libéré dans le milieu extracellulaire et un fragment transmembranaire C83 subséquemment clivé par la γ -sécrétase pour générer un peptide P3 et le fragment intracellulaire AICD (APP Intracytoplasmic Domain).

La γ -sécrétase est un complexe composé de quatre protéines transmembranaires, NCT (nicastrin), APH-1 (anterior pharynx-defective-1), PEN-2 (presenilin enhancer-2) et PS1 ou PS2 (préséniline). NCT est une protéine membranaire de type I chargée de reconnaître les substrats du complexe γ -sécrétase [384]. Les présénilines sont composées de 9 domaines transmembranaires et sont parfois clivées au niveau de la grande boucle cytoplasmique reliant les domaines transmembranaires 6 et 7 [385]. Les présénilines sont responsables de l'activité protéolytique du complexe. PEN-2 et APH-1 sont impliqués dans l'endoprotéolyse des présénilines et dans la stabilisation du complexe γ -sécrétase [386]. (Revue [387])

Dans la voie amyloïdogène le premier clivage est effectué par la β -sécrétase BACE1 (β -site APP cleaving enzyme). BACE1 est une protéase transmembranaire de type I qui clive l'APP au niveau du 11^{ème} acide aminé et génère un peptide sAPP- β et un fragment terminal C99. De même que dans la voie non amyloïdogène le fragment C99 est ensuite clivé par la γ -sécrétase et libère le fragment AICD et le peptide A β [388]. En fonction du site de clivage

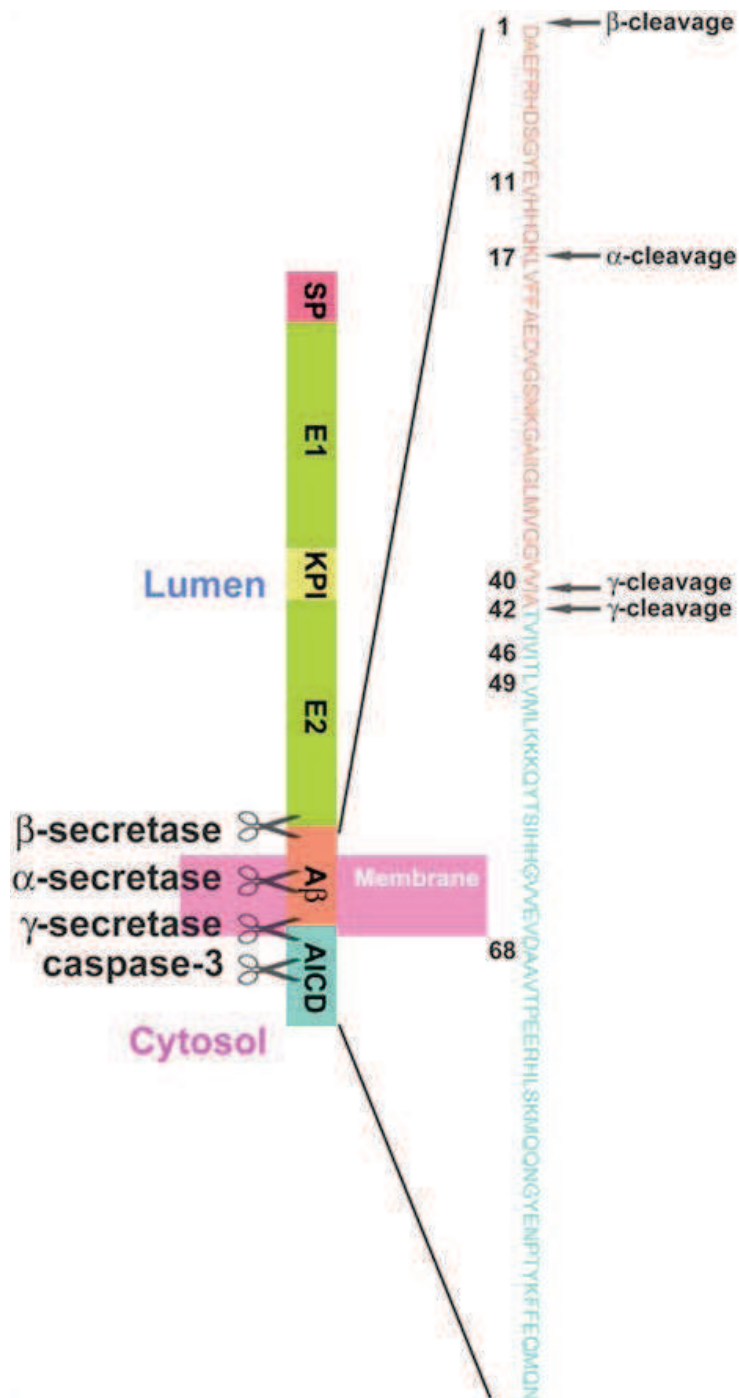


Figure 15 Protéine APP et sites de clivage des sécrétases. La γ -sécrétase possède deux sites de clivage potentiels. En fonction du site de clivage le peptide $A\beta$ produit sera composé de 40 ou de 42 acides aminés. [389]

de la γ -sécrétase la taille du peptide $A\beta$ produit varie de 37 à 43 acides aminés (Figure 15), les formes les plus courantes étant les peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$. Ces différentes formes ne sont pas équivalentes en termes de pathogénicité. En effet le peptide $A\beta_{1-42}$, qui a davantage tendance à s'oligomériser, semble plus toxique que le peptide $A\beta_{1-40}$ par exemple. La production de peptide $A\beta_{1-42}$ est augmentée par l'apparition de mutations dans les gènes APP, PS1 et PS2 qui modifient le site de clivage de la γ -sécrétase [387].

La présence de BACE1 peut être détectée dans la membrane plasmique où elle colocalise et interagit avec l'APP [390]. Cependant BACE1 est préférentiellement localisée et active dans les vésicules trans-golgiennes et les endosomes [388, 391]. L'essentiel du peptide $A\beta$ serait alors produit à partir de protéines APP ré-intériorisées par endocytose [392] (Figure 13), s'accumulerait [393, 394] et s'oligomériserait dans la lumière de ces vésicules [395]. Pour finir ces peptides $A\beta$ sont libérés soit dans le cytosol où ils pourront interagir avec des protéines ou des organites intracellulaires, soit par exocytose dans le milieu extracellulaire.

1.5.2. Monomères, oligomères et fibrilles : les trois états du peptide $A\beta$

Immédiatement après le clivage de l'APP lorsque le peptide $A\beta$ est encore inséré dans la membrane lipidique ou vient d'être libéré dans la lumière de la vésicule ou dans le milieu extracellulaire, il est sous forme monomérique. Cependant la séquence peptidique d' $A\beta$ est très riche en AA hydrophobes, les monomères sont par conséquent très instables dans les liquides biologiques. Dans ces milieux hydrophiles, la structure secondaire des monomères initialement amorphe ou riche en hélice alpha dans les membranes biologiques (Figure 16 A) s'enrichit très rapidement en feuillets β [187]. Ces changements de conformations permettent aux monomères de s'associer pour former des oligomères.

Bien que la diversité de taille et de conformation et l'instabilité des oligomères $A\beta$ compliquent considérablement les études structurales, il a été montré que la structure secondotertiaire des oligomères est en effet composée à 47-58 % de feuillets β antiparallèles [185] (Figure 16 B). Ces oligomères sont composés d'un nombre variable de

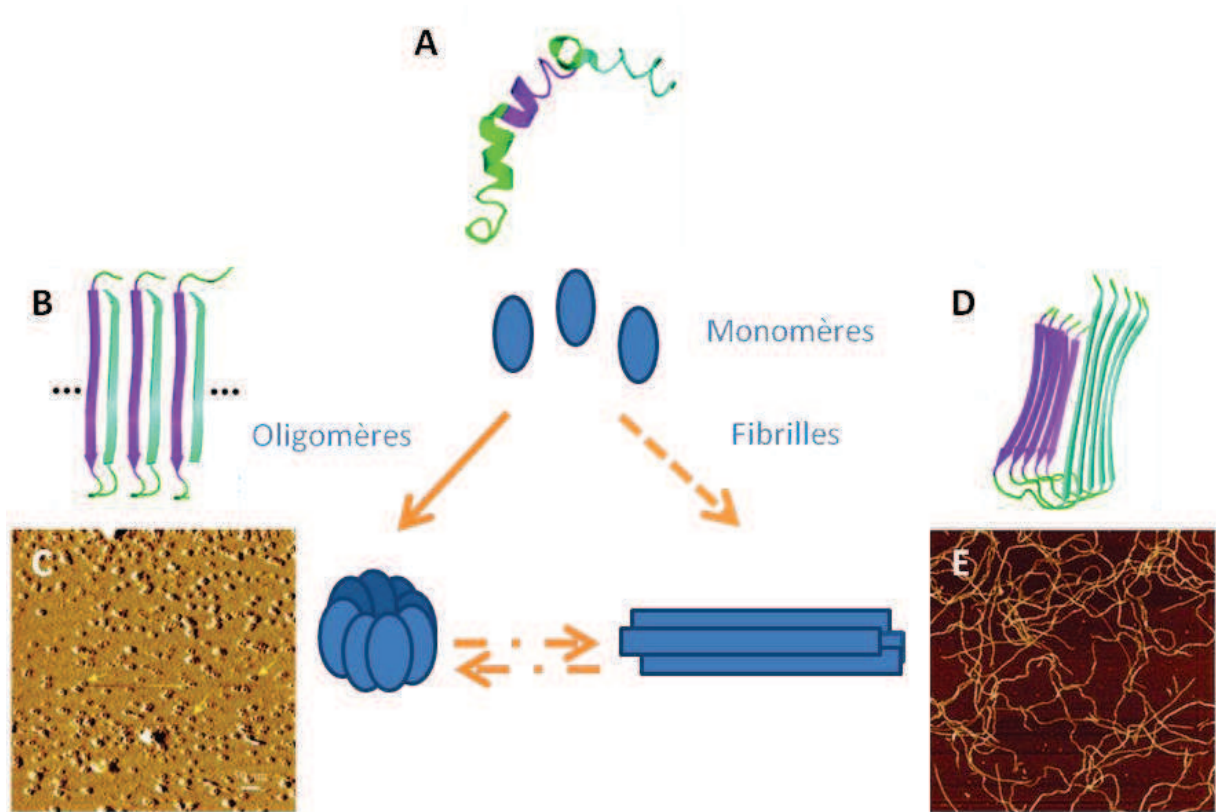


Figure 16 Les trois formes du peptide A β . Lorsqu'ils sont libérés dans le milieu extracellulaire les monomères A β s'agrègent très rapidement pour former des oligomères solubles ou des fibrilles insolubles. La (ou les) voie(s) d'agrégation menant à la formation de ces deux dernières formes est (sont) très controversée(s). Certains auteurs affirment que les oligomères et les fibrilles se forment selon des voies indépendantes [396] d'autres affirment que les fibrilles se forment par élongation à partir d'une sous catégorie spécifique d'oligomères [397]. (A) Représentation schématique de la structure des monomères A β , composée à 50-70 % d'hélice α [185]. (B) Représentation schématique de la structure des oligomères A β , composée à 47-58 % de feuillets β antiparallèles [185]. (C) Représentation en microscopie à force atomique (AFM) d'oligomères [398]. (D) Représentation schématique de la structure des fibrilles A β , composée à 75 % de feuillets β parallèles [185]. (E) Représentation en AFM de fibrilles A β [399].

monomères A β unis par des liaisons hydrophobes résistantes en conditions dénaturantes et notamment en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) [78]. Les observations en microscopie à force atomique (AFM) des oligomères révèlent que ce sont des structures sphériques ou discoïdales d'environ 4 à 20 nm de diamètre [399-402] (Figure 16 C).

Le terme oligomère englobe plusieurs types d'agrégats de taille et de conformation différente décrits dans la littérature sous les termes de dimères, trimères, ADDLs (A β -derived diffusible ligands), A β *56, protofibrilles, ou oligomères annulaires. Selon une classification proposée récemment, ces différents oligomères A β pourraient être classés suivant deux catégories représentant deux voies d'agrégation distinctes [397, 403], les oligomères préfibrillaires et les oligomères fibrillaires. Ces deux classes d'oligomères se distinguent notamment par leur structure quaternaire, ils sont en effet reconnus par des anticorps conformationnels différents. Les oligomères préfibrillaires, reconnus par l'anticorps A11 [401], sont composés de 2 à 12 monomères A β [404]. Les dodécamères ainsi formés sont relativement stables et résistants à la fibrillisation [396] ; ils peuvent cependant subir un changement de conformation « en bloc » pour former des protofibrilles et des fibrilles [397]. Le poids moléculaire des oligomères fibrillaires varie de 10 à plus de 500 kDa. De plus Les oligomères fibrillaires ne sont pas reconnus par l'anticorps A11 mais par un anticorps conformationnel dirigés contre les fibrilles A β , l'anticorps OC [404]. Ces observations ont amené certains auteurs à émettre l'hypothèse que les oligomères fibrillaires constitueraient des noyaux à partir desquels se formeraient les fibrilles par élongation en recrutant des monomères ou des oligomères de petites taille à leurs extrémités [397]. Cette hypothèse n'a cependant pas pu être étayée avec certitude. Au contraire, une étude récente suggère que la nucléation des oligomères fibrillaires par recrutement de monomères A β conduit à la formation de nouveaux oligomères fibrillaires et non à la formation de fibrilles [405].

Les fibrilles sont probablement constituées par nucléation et élongation des oligomères de nature indéterminée [186]. Sur le plan structurel, les fibrilles sont composées à 75 % de feuillets β parallèles (Figure 16 D), tous les résidus hydrophobes étant alignés. La formation des fibrilles nécessite donc une réorganisation structurale des feuillets beta antiparallèles des oligomères [185, 186, 406, 407]. Contrairement aux monomères et aux oligomères, les

fibrilles sont insolubles, c'est pourquoi elles se déposent dans le tissu cérébral et forment des plaques amyloïdes. Jusqu'à la découverte des oligomères et de leur cytotoxicité, on considérait les fibrilles comme la forme la plus cytotoxique du peptide A β . Les fibrilles seraient au contraire relativement inertes [91] et la fibrillisation des oligomères serait en ce sens neuroprotectrice.

1.5.3. Facteurs influant sur l'agrégation du peptide A β

L'orientation du peptide A β vers une voie d'agrégation menant à la formation d'oligomères ou de fibrilles ainsi que la taille et le nombre des agrégats formés dans une solution, peuvent être influencés in vitro et in vivo par différents paramètres. Pour étudier ces paramètres in vitro il faut dans un premier temps produire une solution de peptide A β exempte de tout agrégat. Cela est possible en dissolvant le peptide A β lyophilisé dans de l'hexafluoroisopropanol (HFIP). En détruisant les feuilletts beta et en déstabilisant les liaisons hydrophobes le HFIP provoque en effet la dissociation des oligomères, des protofibrilles et des fibrilles. Les peptides A β sont alors sous forme monomérique avec une structure secondaire composée d'environ 50 à 70 % d'hélice alpha et de 30 à 50 % de repliements aléatoires [399].

La concentration et le temps d'incubation du peptide A β dans une solution ont une grande influence sur son agrégation. En effet dans des conditions expérimentales équivalentes par ailleurs, le nombre et la taille des oligomères ou des fibrilles augmentent avec le temps d'incubation. De plus, pour un temps d'incubation donné, plus la concentration en A β est élevée plus la taille des agrégats formés dans la solution est importante. La concentration et le temps d'incubation influent indifféremment sur la formation des oligomères et des fibrilles au contraire d'autres facteurs tels que la température, le pH et la force ionique de la solution qui favorisent selon les conditions la formation d'oligomères ou de fibrilles. La formation d'oligomères est en effet favorisée dans des solutions à basse température (4°C), à pH neutre et à force ionique physiologique tandis qu'une température plus élevée (37°C), un pH acide et une force ionique faible favorisent la fibrillisation du peptide A β [399].

En pratique in vitro le peptide A β , préalablement « monomérisé » dans une solution de HFIP, est dilué dans du milieu de culture conservé à 4°C pendant 24 heures pour générer une solution enrichie en oligomères ou dans une solution d'acide chlorhydrique à 10 mM conservés à 37°C pendant 24 heures pour générer une solution enrichie en fibrilles. Ces conditions ne sont toutefois pas compatibles avec la physiologie des cellules, il est donc vraisemblable qu'in vivo d'autres facteurs interviennent pour moduler l'agrégation d'A β .

Les membranes biologiques et plus particulièrement les lipides qui composent les microdomaines lipidiques dans la membrane plasmique favorisent l'oligomérisation et la fibrillisation [408-410]. Il a notamment été montré qu'une augmentation de la concentration en ganglioside GM1, un constituant de ces microdomaines lipidiques, augmente le taux d'oligomérisation d'A β [408, 411, 412]. Le cholestérol quant à lui ne module pas directement l'oligomérisation d'A β , en effet une déplétion en cholestérol n'empêche pas la formation des oligomères [408]. Cependant il influence indirectement l'agrégation d'A β en modulant son interaction avec la membrane plasmique [413] et en favorisant la formation de clusters de gangliosides GM1 [414].

Dans le milieu intracellulaire, des protéines chaperonnes se lient aux peptides A β , participent au remodelage de leur structure secondaire, et favorisent ou non leur agrégation. L'ApoE joue un rôle prépondérant dans la formation des fibrilles [62, 415, 416] tandis que la clusterine est plutôt associée à la formation des oligomères [80]. A contrario les protéines HSP (Heat Shock Protein) ralentissent l'agrégation du peptide A β_{1-42} de façon dose-dépendante [417].

1.5.4. Dégradation et clairance

L'accumulation de peptide A β dans le cerveau est couramment associée à une augmentation de la production du peptide mais cela pourrait également être lié à une diminution de l'efficacité des voies de dégradation et/ou de clairance des peptides. Le peptide A β peut en effet être éliminé du cerveau de plusieurs façons : par phagocytose par les cellules microgliales [418], par drainage périvasculaire vers le LCR [419, 420], en traversant la BHE

grâce aux récepteurs LRP1 (low-density- lipoprotein receptor related protein 1) [421] ou à la P-glycoprotéine [422], ou par dégradation enzymatique [423]. Les enzymes capables de dégrader l'A β sont des métalloendopeptidases, telles que la néprilysine (NEP), les ECE-1 et ECE-2 (endothelin-converting enzyme), l'ACE (angiotensin-converting enzyme), l'IDE (insulin-degrading enzyme), des métalloprotéinases telles la MMP-2, la MMP-9 (matrix metalloproteinase proteins 2 et 9), et des protéases telles la plasmine, la protéine basique de la myéline et APEH (acyl peptide hydrolase), cathepsines B,D et S [423].

1.6. Interrelation entre la voie Tau et la voie amyloïde

Le peptide A β et la protéine Tau étant les deux protéines caractéristiques de la MA, leurs voies de synthèse et d'agrégation ainsi que leurs effets cytotoxiques ont été largement étudiés depuis un siècle. Bien que généralement étudiées indépendamment l'une de l'autre ces voies sont interconnectées. (Revue [424])

Ces liens entre l'amyloïdose et la tauopathie ont tout d'abord été mis en évidence grâce à des observations histopathologiques de cerveaux d'animaux modèles de la MA (cf. § 1.9.3). En effet dans le cerveau des souris transgéniques exprimant le gène APP humain muté (souris APP23) la formation de dépôts amyloïdes est suivie d'une hyperphosphorylation des protéines Tau [425]. De plus la dégénérescence neurofibrillaire est exacerbée dans le cerveau de souris portant à la fois le gène APP humain muté et le gène Tau humain muté (mutation P301L) en comparaison de souris ne portant que le gène Tau muté [426]. De même une injection intracrânienne d'A β administrée à des souris transgéniques P301L aggrave la pathologie Tau [427, 428]. Tout ceci suggère qu'A β stimule l'hyperphosphorylation de Tau. Plus récemment il a été montré que les oligomères A β induisent l'hyperphosphorylation de Tau au niveau de sites spécifiques de la MA en augmentant notamment les niveaux d'expression et d'activation de la GSK3 et la PI3 kinase [428-432]. Réciproquement il semble que Tau réduise la production d'A β en influant sur l'activité de la γ -sécrétase [433].

Tau est par ailleurs un intermédiaire essentiel de l'action cytotoxique du peptide A β . Une réduction de l'expression de Tau dans des cultures primaires d'hippocampes issus de souris déficientes pour le gène tau réduit l'impact du peptide A β sur le trafic axonal, la potentialisation à long terme et la survie cellulaire [434-436].

A β et Tau peuvent également agir de façon synergique pour perturber une fonction essentielle à la survie cellulaire. A β et Tau sont par exemple tous les deux capables de perturber la respiration cellulaire qui se déroule dans les mitochondries. A β inhibe préférentiellement le complexe IV tandis que Tau inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire. Leur action conjointe potentialise le dysfonctionnement des mitochondries [437].

1.7. Cytotoxicité du peptide A β

1.7.1. Réaction astrocytaire

Les astrocytes, cellules gliales du système nerveux central, jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement du système nerveux. Les astrocytes structurent la substance grise grâce à leurs nombreux prolongements cytoplasmiques qui relient les vaisseaux sanguins cérébraux, les membranes neuronales, et les éléments pré et post synaptiques. Les astrocytes ont également un rôle métabolique, en effet en fonction de l'activité synaptique, ils fournissent aux neurones l'énergie dont ils ont besoin sous forme de lactate produit par glycolyse dans les astrocytes [438, 439] et régulent localement le flux sanguin en libérant des substances vasoactives [440-442]. De plus ils participent à l'homéostasie du cerveau en recyclant les excédants d'ions K⁺ et de neurotransmetteurs dont le glutamate libérés au cours de l'activité synaptique. Enfin ils forment avec les neurones des réseaux neurogliaux susceptibles de moduler à distance la transmission synaptique. En effet les astrocytes participent avec les éléments pré et post synaptiques à la formation de synapses tripartites. Les astrocytes expriment des transporteurs permettant la réabsorption de glutamate, des canaux ioniques et des récepteurs aux neurotransmetteurs (NMDA, mGluR, ...) activés en cas de libération de glutamate dans la fente synaptique. L'activation de ces récepteurs et de ces transporteurs

induit un influx d'ions Na^+ et Ca^{2+} dans le cytoplasme des astrocytes et provoque la formation de vagues calciques qui à leur tour déclenchent la libération de gliotransmetteurs tels que le glutamate, l'ATP, la D-sérine, le GABA et la taurine. De plus Les astrocytes forment un syncytium grâce à l'existence de nombreuses jonctions GAP, ces mouvements ioniques intracellulaires peuvent ainsi se propager d'un astrocyte à autre. (Revue [443, 444])

L'implication des astrocytes dans la pathogénèse de la MA a été évoquée dès les années 1900 par Alois Alzheimer. Il est en effet possible d'observer dans le cerveau des patients Alzheimer une astrogliose caractérisée par une hypertrophie cellulaire et par une expression accrue de GFAP (glial fibrillary protein) et de S100B autour des plaques amyloïdes [445]. Le peptide $\text{A}\beta$ issu d'extraits de cerveaux malades provoque une astrogliose réactive lorsqu'il est appliqué sur des cellules gliales en culture [446]. La réaction astrocytaire perturbe la fonction métabolique des astrocytes [447, 448], réduit leur capacité à phagocytter et éliminer l' $\text{A}\beta$ [449], et diminue l'expression et l'activité des transporteurs du glutamate [447, 450]. Tout ceci peut conduire indirectement à la dégénérescence des neurones. Malheureusement les astrocytes réactifs peuvent également provoquer la mort des neurones de façon plus directe en libérant des facteurs neurotoxiques. Par exemple des oscillations calciques induites par le peptide $\text{A}\beta$ provoquent la production et la libération d'oxyde nitrique (NO) et de radicaux libres oxygénés neurotoxiques [451-453]. De plus les astrocytes réactifs participent à la réponse inflammatoire en libérant des cytokines et des facteurs pro-inflammatoires [444, 454, 455].

1.7.2. Microglie et neuroinflammation

Les cellules microgliales ne représentent que 10 % environ de l'ensemble des cellules du SNC mais ce sont les actrices principales de la réponse neuroinflammatoire. Lors de l'invasion d'un pathogène, d'un trauma crânien ou du développement d'une tumeur, ces cellules de l'immunité innée s'activent, migrent vers la zone lésée ou infectée, phagocytent les débris cellulaires et les pathogènes et libèrent des facteurs inflammatoires [456].

Dans le cerveau des patients Alzheimer de nombreuses cellules microgliales activées entourent les plaques amyloïdes et les DNF. Le niveau d'activation de la microglie est corrélé à la progression de la maladie sur le plan neuropathologique et clinique [457, 458].

Le peptide A β est capable de se lier et d'activer les cellules microgliales en interagissant avec des récepteurs membranaires [459, 460]. Les récepteurs Toll-Like 2 et 4 (TLR2 et TLR4) [461-463] et RAGE (receptor for advanced end glycation) [464-466] se sont par exemple révélés capables de reconnaître l'A β et de déclencher l'activation des cellules microgliales et la libération de facteurs pro inflammatoires. Lorsqu'elles sont activées les cellules microgliales expriment de nombreux récepteurs à leur surface tels que les récepteurs scavenger (SR de type-A et de type B1, CD36, CD40) [467, 468], des protéines et des récepteurs du complément (C1q, C3, C1qR, CR3, CR4, et CR5aR) [469, 470], et les récepteurs FPRL-1 (formyl peptide receptor like) [471, 472]. Ces récepteurs sont capables de reconnaître A β et participent à son internalisation dans le cytoplasme des cellules microgliales.

Dans le cerveau des patients Alzheimer l'activation des cellules microgliales entraîne la libération de facteurs inflammatoires : IL-1 (interleukines 1) [445], TNF α (tumor necrosis factor alpha) [473, 474], d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'ion superoxyde [475, 476], et de NO [477]. Ces facteurs provoquent la dégénérescence des neurones [459]. De plus, IL-1 favorise la production d'A β en augmentant l'expression de BACE1 [478, 479] et la formation des DNF en favorisant l'hyperphosphorylation de Tau par les kinases [480, 481].

1.7.3. Stress oxydatif

Une grande partie des dommages observés dans le cerveau des malades sont provoqués par un stress oxydatif. Ce stress oxydatif est provoqué par l'A β qui induit une production excessive et la libération de ROS par les astrocytes [452], la microglie [452, 475, 476] et les neurones [92, 482]. Dans les conditions physiologiques les mitochondries et la chaîne respiratoire sont la principale source de ROS dans les cellules. La production excessive de ROS au cours de la MA serait donc liée à un dysfonctionnement des mitochondries induit par l'A β . L'A β est importé et s'accumule dans les mitochondries notamment au niveau des crêtes

[483]. Il a également été montré que l'A β perturbe le fonctionnement de la chaîne respiratoire en inhibant l'activité de la cytochrome C oxydase (COX) localisée dans le complexe IV et provoque une augmentation de la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [484, 485].

Les ROS provoquent une oxydation et une nitration des protéines qui altèrent leur fonction [486] et favorise leur dégradation par les protéasomes [487], une peroxydation des lipides membranaires et une oxydation de l'ADN mitochondrial et génomique qui provoque des cassures des brins d'ADN [488]. (Revue [489])

1.7.4.Activation des caspases

Les caspases sont des protéases impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la mort cellulaire, la plasticité synaptique et la différenciation. Les caspases sont produites sous formes de pro enzymes activées après protéolyse. Les caspases initiatrices sont activées par la voie intrinsèque ou mitochondriale : en réponse à un stress intracellulaire les mitochondries libèrent du cytochrome C qui participe à la formation de l'apoptosome qui clive la procaspase-9 ; ou par la voie extrinsèque : des facteurs de stress extracellulaires comme le TNF- α se lient à des récepteurs de mort cellulaire comme le récepteur Fas dont le domaine intracellulaire FADD clive la procaspase-8. Les caspases initiatrices activées clivent et activent les caspases effectrices telle que la caspase 9 qui à leur tour clivent des protéines essentielles à la survie cellulaire, provoquant ainsi l'apoptose, ou des protéines impliquées dans d'autres fonctions cellulaires. [490]

Une augmentation du niveau de caspase-3 a été relevée dans le cerveau des patients Alzheimer [491]. Cette augmentation peut être reproduite in vitro en appliquant du peptide A β sur des neurones en culture [492, 493]. Des signes de dégénérescence cellulaire par apoptose ont été observés dans ces cellules [492, 494]. Cependant il a récemment été mis en évidence à partir de tissus humain et animaux que la caspase-3 s'accumule plus spécifiquement dans l'élément post synaptique et provoque un dysfonctionnement et une dégénérescence des synapses plutôt que l'apoptose de la cellule [495, 496]. La caspase-3 est

impliquée dans les mécanismes régissant la disponibilité des récepteurs AMPA (alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid) dans la synapse [496-498] et participe au clivage de nombreuses protéines synaptiques telles que la PSD-95, la CaMKII, et la calcineurine A.

Les protéines APP et Tau sont également des substrats de la caspase-3. La caspase-3 clive l'APP au niveau du domaine intracellulaire et libère un fragment cytotoxique C31 [498-500]. Le clivage de Tau par les caspases favorise son agrégation et accélère par conséquent la formation des DNF et la dégénérescence des neurones affectés [501-504].

1.7.5.Synaptotoxicité

Les déficits cognitifs observés chez les patients Alzheimer sont corrélés à un important dysfonctionnement et à la disparition des synapses du SNC [505]. Des quantifications immunohistologiques de protéines synaptiques telle que la synaptophysine ont permis d'estimer que 30 à 45 % des synapses disparaissent dans le cerveau des patients [505-508]. Cette perte synaptique serait liée à l'action intra et extracellulaire du peptide A β . En effet d'une part l'A β perturbe le trafic axonal et le transport des mitochondries vers les terminaisons synaptiques. Les mitochondries ont pour fonction de fournir sous forme d'ATP l'énergie nécessaire au fonctionnement de certaines protéines telle que la PKA et au maintien des gradients ioniques impliqués dans la transmission synaptique. Une mauvaise localisation des mitochondries peut par conséquent provoquer des dysfonctionnements neuronaux [509]. D'autre part des oligomères A β appliqués de façon exogène sur des cultures neuronales ou des tranches aigues d'hippocampe colocalisent avec les protéines PSD-95 et synaptophysine [88], inhibent la potentialisation à long terme et diminuent les capacités mnésiques chez les animaux [78, 510].

1.8. Hypothèses pour le mode d'action des oligomères

1.8.1. Troubles de l'homéostasie calcique

Le peptide A β est au cœur de la maladie d'Alzheimer. L'hyperproduction et l'agrégation de ce peptide provoquent l'hyperphosphorylation de Tau, la formation des DNF, la disparition des synapses, la neuroinflammation et la dégénérescence des neurones qui se traduisent au niveau comportemental par le développement de graves déficits cognitifs et de troubles neuropsychologiques.

Comme nous l'avons vu au paragraphe précédant la toxicité du peptide A β affecte tous les types cellulaires, interagit avec une multitude de molécules et perturbe de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. On peut alors se demander comment un même peptide de 42 acides aminés peut-il provoquer de si nombreux dysfonctionnements ? Existe-t-il un point commun entre tous ces dysfonctionnements ? Le point commun de tous les troubles induits par l'A β est probablement l'altération de la concentration calcique intracellulaire. Les ions calcium (Ca²⁺) sont des messagers intracellulaires très polyvalents, ils sont impliqués dans la régulation de presque toutes les fonctions ou réactions cellulaires. La [Ca²⁺]_i est très faible dans le cytosol des cellules au repos mais celle-ci peut rapidement et fortement augmenter en réponse à un stimulus intra ou extracellulaire. Les ions Ca²⁺ libérés dans le cytosol induisent alors des changements de conformations et l'activation de protéines enzymatiques impliquées dans des voies de signalisation très variées.

De nombreuses observations ont montré que l'homéostasie calcique est perturbée au cours de la MA [511-513]. L'interaction de l'A β sous forme oligomérique avec la membrane plasmique des cellules neuroblastiques SH-5YSY provoque une augmentation de la [Ca²⁺]_i cytosolique, rendant ces cellules plus sensibles à l'excitotoxicité [91]. De même l'A β induit une augmentation de la [Ca²⁺]_i dans les astrocytes en culture qui entraîne une augmentation de l'expression des protéines GFAP et S100B et par conséquent une gliose réactionnelle [514].

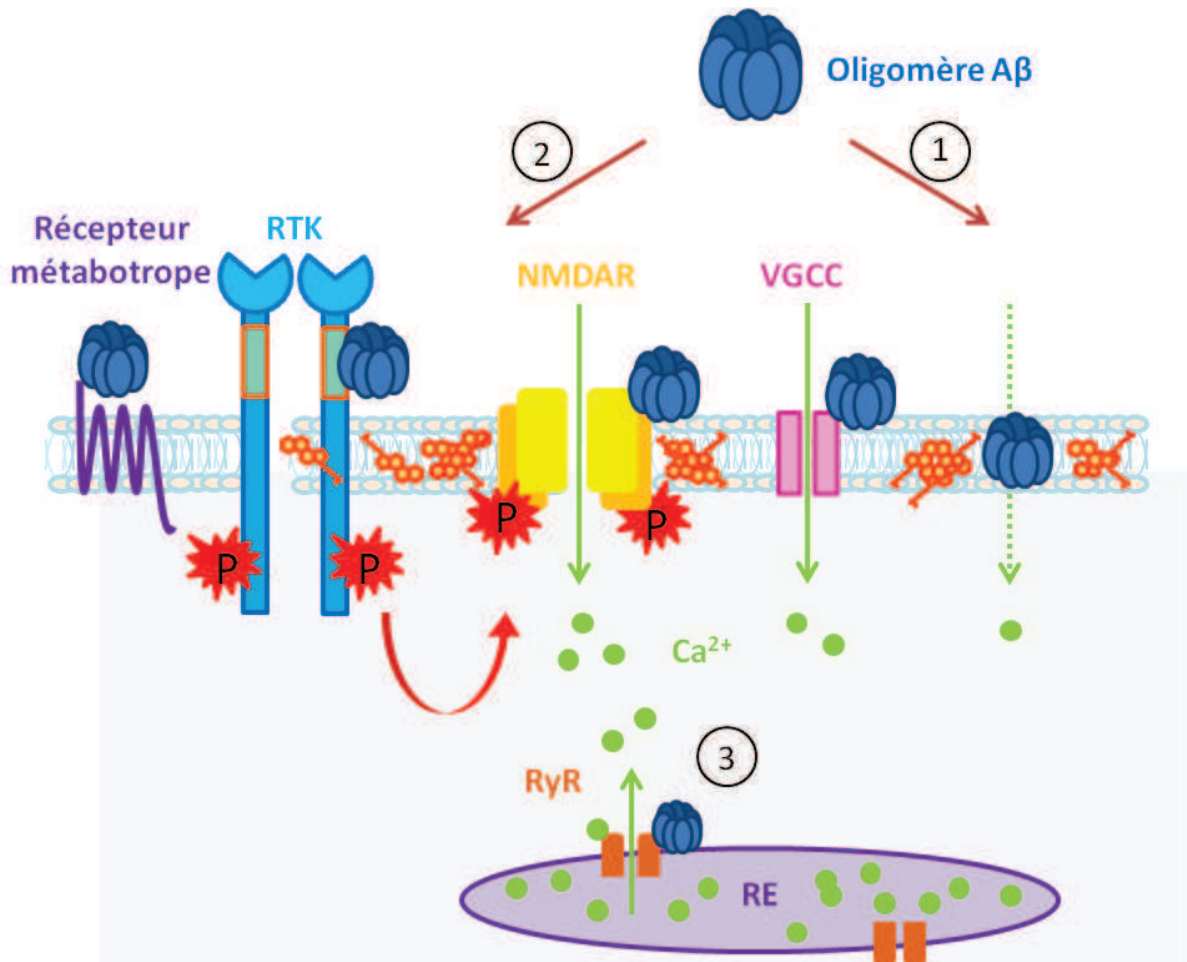


Figure 17 . Schéma récapitulant les différentes hypothèses pour le mode d'action des oligomères Aβ. Les oligomères Aβ peuvent perturber l'homéostasie calcique des cellules selon plusieurs voies hypothétiques. (1) Les oligomères Aβ s'insèrent dans la membrane plasmique en formant des pores perméables aux ions Ca²⁺. (2) Les oligomères Aβ interagissent avec des récepteurs ou des canaux ioniques membranaires perméables aux ions Ca²⁺ (ex : récepteurs NMDA (NMDAR), canaux calciques voltage-dépendant (VGCC)) ou qui activent des récepteurs ou des canaux ioniques perméables aux ions Ca²⁺. (ex : récepteurs tyrosine-kinase (RTK), récepteurs métabotropes). (3) Les oligomères Aβ stimulent la libération du calcium stocké notamment dans le réticulum endoplasmique (RE) en activant les récepteurs IP3 ou ryanodine (RyR).

Quelle est l'origine de ces ions Ca^{2+} ? Proviennent-ils du milieu extracellulaire ou sont-ils libérés par les organites intracellulaires ? Plusieurs hypothèses ont été avancées pour répondre à cette question (Revue [515]).

1.8.2.Insertion d'un canal amyloïde dans la membrane plasmique

La première hypothèse qui expliquerait l'influx d'ion calcium induit par l'A β serait que les oligomères A β en s'insérant dans la membrane plasmique formeraient un canal perméable notamment aux ions calcium (Figure 17). Lorsqu'on les observe en microscopie de force atomique (Figure 16), les oligomères sont en effet capables de s'incorporer dans des bicouches lipidiques et ont une forme discoïdale avec un pore central d'environ 1 à 2 nm de diamètre très similaire à la forme d'un canal membranaire [398, 516-518]. De plus cette hypothèse est appuyée par les observations de Kaye et al. montrant que les oligomères A β augmentent la conductivité de bicouches lipidiques synthétiques de façon dose-dépendante [90]. Cependant il reste à démontrer que les oligomères A β peuvent s'intégrer dans les membranes plasmiques cellulaires et que ces canaux amyloïdes sont perméables aux ions calcium in vivo.

1.8.3.Interaction avec un récepteur membranaire et ouverture de canaux calciques

La seconde hypothèse envisagée serait que les oligomères A β se lieraient à la membrane plasmique sans s'y intégrer et activeraient des canaux ou des récepteurs ionotropes laissant entrer le calcium extracellulaire (Figure 17).

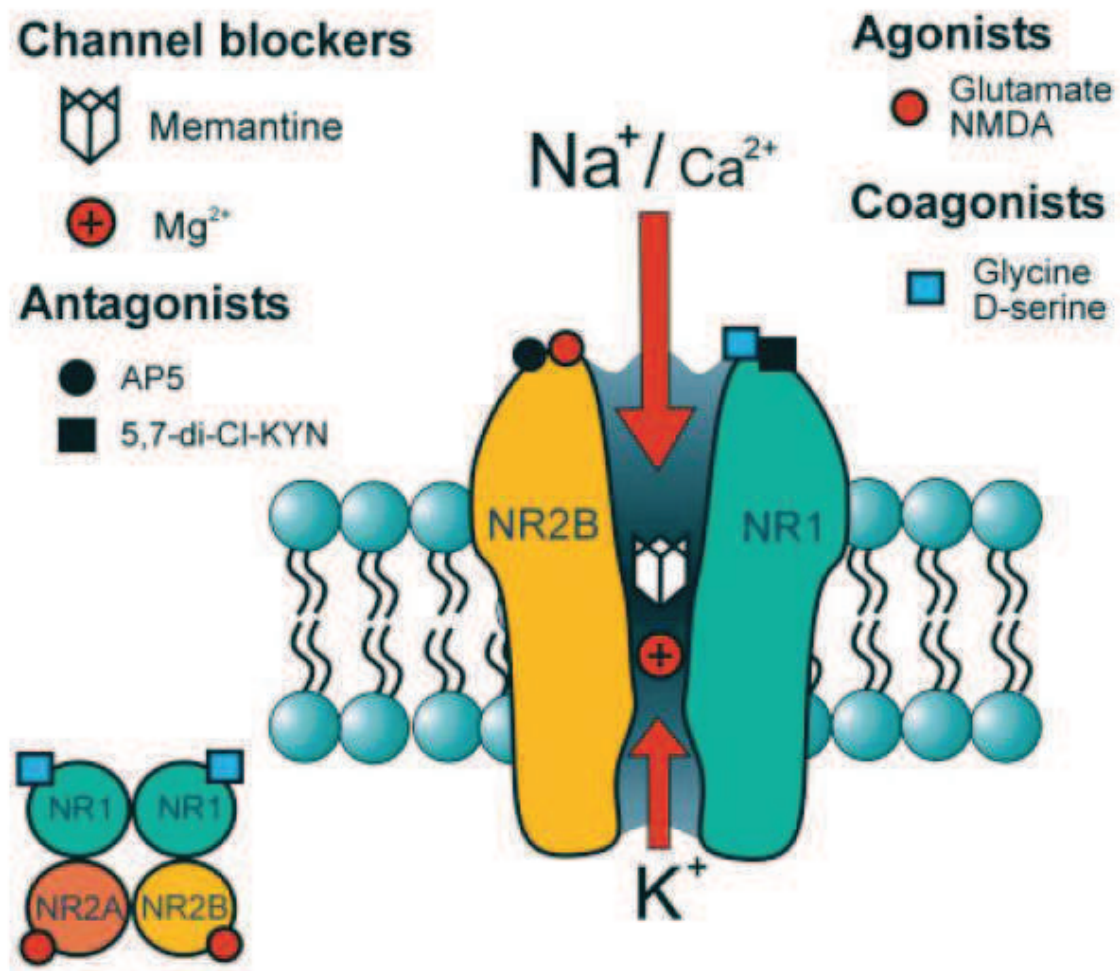


Figure 18 Le récepteur NMDA et ses sites de liaison. Le NMDAR est constitué de quatre sous unités délimitant un pore perméable au sodium (Na⁺) et au calcium (Ca²⁺). Le NMDAR peut être inhibé par des antagonistes compétitifs tels que le D-AP5, ou des bloqueurs du canal tels que la Mémantine. [519]

1.8.3.1. Canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux ioniques voltage-dépendants spécifiques du calcium (VGCC) constituent l'une des principales voies d'entrée du calcium extracellulaire dans la cellule. Il existe trois types de canaux VGCC : les canaux de type N et T à haut seuil d'ouverture et à faible conductance, les canaux de type L à haute conductance, et les canaux de type P/Q. Ces différents canaux semblent sensibles à l'action du peptide A β . L'influx de calcium médié par les canaux de type N, T et L serait en effet plus élevé en présence d'A β [520, 521] tandis que l'activité des canaux de type P/Q semble réduite [522].

1.8.3.2. Récepteur nicotinique

Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine sont composés de cinq sous unités (α , β , δ , ou ϵ) délimitant un pore central perméable aux ions Na $^+$, K $^+$ et Ca $^{2+}$ [523, 524]. Le peptide A β se lie avec une forte affinité aux récepteurs nicotiniques contenant la sous unité alpha7 [93]. De plus il a été montré récemment que l'augmentation de la [Ca $^{2+}$]_i induite par les oligomères A β est partiellement inhibée par la varénicline, un agoniste partiel des récepteurs nicotiniques [525].

1.8.3.3. Récepteur NMDA

Les récepteurs NMDA (NMDAR) sont des récepteurs glutamatergiques composés le plus souvent de deux sous unités NR1 et deux sous unités NR2 et d'un pore central hautement perméable au Ca $^{2+}$ [519, 526] (Figure 18). Ces récepteurs sont fortement impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique, de mémorisation et d'excitotoxicité. La Mémantine, un antagoniste des NMDARs, est utilisée pour traiter certains cas de MA. Cela a incité la communauté scientifique à s'interroger sur le rôle potentiel de ces récepteurs dans la physiopathologie de la MA. Une interaction fonctionnelle entre les NMDARs et le peptide A β a ainsi été mise en évidence. La Mémantine bloque en effet l'augmentation de la [Ca $^{2+}$]_i et la production de ROS induite par les oligomères A β [92].

1.8.4. Libération des stocks de calcium intracellulaire

Le peptide A β pourrait également augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ en stimulant la libération de calcium stocké dans le réticulum endoplasmique des cellules (Figure 17). Les ions Ca^{2+} des réservoirs sont libérés dans le cytosol après ouverture du canal des récepteurs à l'IP3 (inositol triphosphate) ou des récepteurs ryanodine. L'ouverture des récepteurs-canaux IP3 est déclenchée par la fixation d'une molécule d'IP3 au niveau du site de liaison du récepteur. Cette molécule est produite à partir d'un phosphoinositol diphosphate (PIP2) par la phospholipase C, elle-même activée par une protéine G α suite à l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G. La libération de calcium par les récepteurs ryanodine est déclenchée quant à elle par la liaison d'ions calcium sur les récepteurs. Ce phénomène est nommé libération de calcium induite par le calcium. La liaison du peptide A β sur les récepteurs ryanodine augmenterait leur probabilité d'ouverture et donc l'influx d'ions calcium dans le cytosol [527].

1.9. Modèles d'étude de la maladie d'Alzheimer

La MA est une maladie humaine très complexe provoquée par l'action cytotoxique de deux protéines différentes et du système inflammatoire. Afin de mieux comprendre la pathogenèse et l'étiologie de cette maladie de nombreux modèles cellulaires et animaux ont été développés.

1.9.1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont issues de cellules tumorales. Le principal avantage de ces cellules est de pouvoir se répliquer indéfiniment in vitro. Il est donc facile de les maintenir en culture et d'obtenir un grand nombre de cellules sans qu'il soit nécessaire de sacrifier des animaux. Ces cellules sont particulièrement utiles pour déterminer les différents acteurs membranaires ou intracellulaires impliqués dans la réponse cellulaire induite par l'A β et la protéine Tau hyperphosphorylée ou pour étudier leur impact sur la survie cellulaire. Toutefois ces lignées sont par définition composées de cellules immortalisées issues d'un

même clone dont la physiologie diffère probablement de celles des cellules nerveuses natives. En outre ces cultures homogènes ne permettent pas d'étudier les interactions entre différents types cellulaires.

Les lignées cellulaires les plus utilisées dans l'étude de la MA sont la lignée PC12 et la lignée SH-5YSY.

La lignée PC12 (Pheochromocytoma cells) a été établie à partir d'une tumeur prélevée sur une glande surrénale de rat. Ces cellules cessent de se diviser et de se différencier jusqu'à adopter un phénotype neuronal lorsqu'elles sont cultivées en présence de NGF (Nerve Growth Factor) [528].

La lignée SH-5YSY est issue d'un neuroblastome d'origine humaine. Ces cellules ont la propriété de se diviser par mitose et de se différencier en émettant des prolongements neuritiques. De plus ces neuroblastes possèdent la machinerie enzymatique nécessaire pour synthétiser et dégrader des neurotransmetteurs tels que la dopamine, l'acétylcholine, ou le GABA [529, 530].

1.9.2.Cultures primaires

Les cultures primaires sont réalisées à partir de tissus vivants dissociés à l'aide d'enzymes. Dans le cadre de l'étude de la pathogénèse de la MA les cultures primaires sont généralement réalisées à partir de cortex ou d'hippocampes prélevés sur des embryons de rats ou de souris. Les cultures obtenues sont hétérogènes, elles comportent tous les types cellulaires qui composaient la structure cérébrale prélevée : des neurones ou neuroblastes, des cellules gliales et des cellules microgliales. Ces trois types cellulaires sont impliqués dans la pathogénèse de la MA. Les cultures primaires permettent ainsi d'étudier l'effet biologique induit par le peptide A β ou la protéine Tau hyperphosphorylée et les communications entre ces différents types cellulaires en conditions pathologiques. Toutefois il est impossible avec ce type de culture de reconstituer les connexions existant entre les différentes structures cérébrales et donc de modéliser l'impact de la pathologie sur les réseaux neuronaux.

1.9.3. Modèles animaux

La maladie d'Alzheimer est une maladie humaine, les espèces animales développant spontanément des pathologies comparables à la MA sont en effet très rares (chien, microcèbe, octodon). Au cours du siècle qui s'est écoulé depuis la découverte de cette maladie, les scientifiques ont donc créé des animaux modèles présentant une ou plusieurs caractéristiques de la maladie. Ces modèles animaux ont été développés afin d'étudier la pathogénèse de la maladie à l'échelle cérébrale et son impact au niveau comportemental et pour tester l'effet thérapeutique de thérapies ou d'agents pharmacologiques lors d'études précliniques.

1.9.3.1. Modèles induits

Dans un premier temps les chercheurs ont tenté de modéliser la maladie chez des animaux initialement sains en injectant des agents pharmacologiques visant à léser des structures cérébrales ou des groupes de neurones soupçonnés d'être affectés par la maladie ou en induisant la formation de plaques séniles ou de DNF.

Les premiers modèles animaux induits par des agents pharmacologiques ont été créés dans les années 80 et 90 par injection de drogues excitotoxiques telles que les acides iboténique ou kaïnique [22, 28] ou de neurotoxines spécifiques telles que la 192-IgG-saporine [23, 24, 28] dans le cerveau basal antérieur pour détruire les neurones cholinergiques (cf. § 1.1.3).

Plus récemment il a été montré qu'une injection intra-cérébro-ventriculaire du fragment 25-35 du peptide A β induit chez les rongeurs le développement d'une pathologie similaire à la MA. Une injection d'A β ₂₅₋₃₅ modifie en effet le métabolisme de l'APP et provoque une hyperphosphorylation de Tau, une altération du système cholinergique, une neuroinflammation, un stress oxydatif et une neurodégénérescence [531].

1.9.3.2. Animaux transgéniques

La découverte des protéines et des gènes impliqués dans la maladie a favorisé la création d'animaux transgéniques exprimant un ou plusieurs gènes humains mutés ou tronqués. (Revue [425, 532])

Suite à l'identification des mutations du gène APP dans le génome des patients souffrant de la forme familiale de la MA plusieurs lignées de souris transgéniques surexprimant le gène APP humain muté ont vu le jour. Games et al ont ainsi créé une lignée de souris transgéniques, nommée PDAPP, ayant intégré le gène APP avec la mutation V717F sous le contrôle du promoteur PDGF (platelet derived growth factor) [533]. Le groupe de Hsiao a quant à lui développé la lignée Tg2576 dans laquelle le gène APP portant la mutation swedish (K670N/M671L) est placé sous le contrôle du promoteur de la protéine prion du hamster [534]. Tandis que dans la lignée APP23 le gène APP portant lui aussi la mutation swedish est sous le contrôle du promoteur neuronal Thy-1 [535]. Toutes ces lignées transgéniques ont en commun le fait que la surexpression du gène APP muté s'accompagne d'une production de peptide A β augmentant avec l'âge de l'animal et qui s'accumule dans le tissu cérébral sous forme de plaques séniles.

Des lignées de souris transgéniques portant le gène PS1 humain muté sous le contrôle de divers promoteurs ont également été développées. Toutefois bien qu'une augmentation du taux d'A β ₁₋₄₂ ait été relevée, les plaques séniles ne se développent pas dans le cerveau de ces souris [536-538]. En revanche la formation des plaques est plus précoce et plus étendue dans le cerveau des souris portant conjointement le gène PS1 muté et le gène APP muté [539].

Par ailleurs il existe des lignées de souris transgéniques exprimant le gène humain de la protéine Tau. Dans la lignée Alz17 le gène tau n'est pas muté et la formation des DNF n'a lieu que si elle est induite par l'injection d'extraits de cerveaux contenant des DNF [199]. En revanche les lignées de souris transgéniques portant le gène tau humain avec une mutation P301L ou P301S développent spontanément des DNF [540, 541].

Dernièrement des souris triplement transgéniques (3xTgAD) portant les mutations APP_{swedish}, Tau_{P301L} et PS1_{M146V} ont été développées. Ces souris présentent à la fois une accumulation intraneuronale d'Aβ, des plaques amyloïdes qui apparaissent vers l'âge de 6 mois et des DNF [542].

1.10. Problématiques

Le peptide Aβ est produit par clivages successifs de la protéine APP par la beta-sécrétase puis par la gamma-sécrétase. De nombreuses découvertes suggèrent que l'Aβ serait essentiellement produit dans des vésicules intracellulaires (Cf. § 1.5.1) cependant une grande partie de ces peptides est libérée dans le milieu extracellulaire où ils s'agrègent et s'accumulent sous forme d'oligomères dans un premier temps puis sous forme de plaques séniles. Des essais thérapeutiques fondés sur l'injection d'anticorps dirigés contre le peptide Aβ ont montré que la dissolution des plaques amyloïdes entraîne une libération d'oligomères Aβ dans la matrice extracellulaire [543]. Ces oligomères extracellulaires, solubles et cytotoxiques interagissent avec la membrane plasmique des cellules nerveuses. L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier cette interaction et ses conséquences sur la physiologie cellulaire.

Dans la première partie de ce travail nous avons tenté de répondre à ces questions : Le peptide Aβ adhère-t-il ou s'insère-t-il dans la membrane plasmique des cellules nerveuses ? Cette interaction dépend-t-elle de la composition lipidique des membranes ou de la présence de protéines ou de récepteurs spécifiques à la surface des cellules ? Quelles sont les conséquences de cette interaction sur l'homéostasie calcique de la cellule ? Dans cette optique nous avons appliqué des solutions de peptide Aβ₁₋₄₂ synthétique dans le milieu extracellulaire de cellules PC12 et de cultures primaires de cellules nerveuses puis nous avons observé la liaison du peptide sur les membranes en immunocytochimie et les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ en imagerie calcique. Nous nous sommes également intéressés au rôle du récepteur NMDA dans la liaison et la cytotoxicité du peptide Aβ₁₋₄₂.

L'évolution de la MA est corrélée au niveau neuropathologique à la progression dans le tissu nerveux des lésions caractéristiques de la maladie : les DNF et les plaques amyloïdes. Ces lésions s'étendent de proche en proche ou vers les régions cérébrales reliées par des projections axonales (cf. § 1.3.4 et 1.3.5). On peut alors imaginer que les formes solubles et toxiques de Tau ou d'A β sont libérées au niveau des extrémités axonales des neurones affectés et diffusent dans le milieu extracellulaire, formant ainsi un gradient de concentration des régions touchées par la maladie vers les régions saines. Mais quelles sont les conséquences de l'installation d'un tel gradient pour les cellules nerveuses ? Un premier contact avec de faibles concentrations de peptide A β influence-t-il l'interaction ultérieure d'une plus grande concentration d'A β avec les membranes plasmiques ? Dans la seconde partie de ce travail nous avons cherché à mettre en évidence qu'une pré-incubation avec de faibles concentrations de peptide A β favorise la liaison du peptide et la réponse calcique induite dans les cellules lorsque de plus fortes concentrations d'A β sont ajoutées dans le milieu extracellulaire.

Enfin dans le cadre d'une collaboration avec l'entreprise Innovative Health Diagnostics (IHD) nous avons participé à la caractérisation d'une sonde amyloïde développée pour réaliser des tests de diagnostic de la MA. Nous avons notamment tenté de démontrer que la sonde amyloïde A1 s'oligomérisait et interagissait avec les membranes plasmiques de la même façon que le peptide A β_{1-42} .

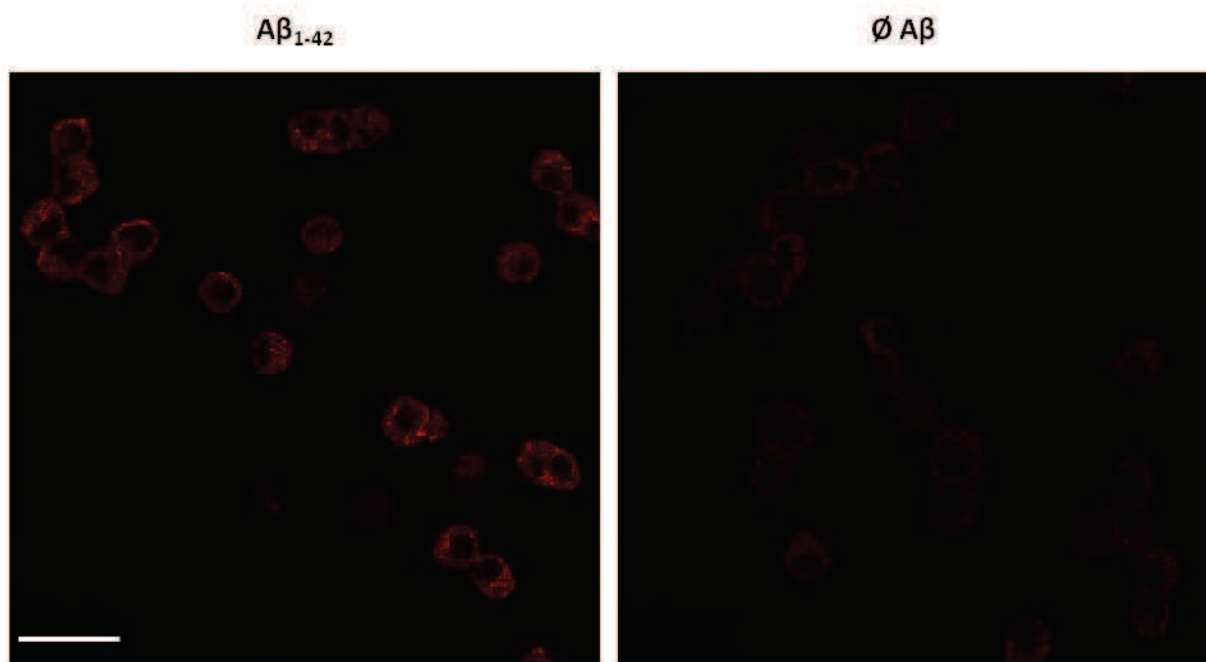


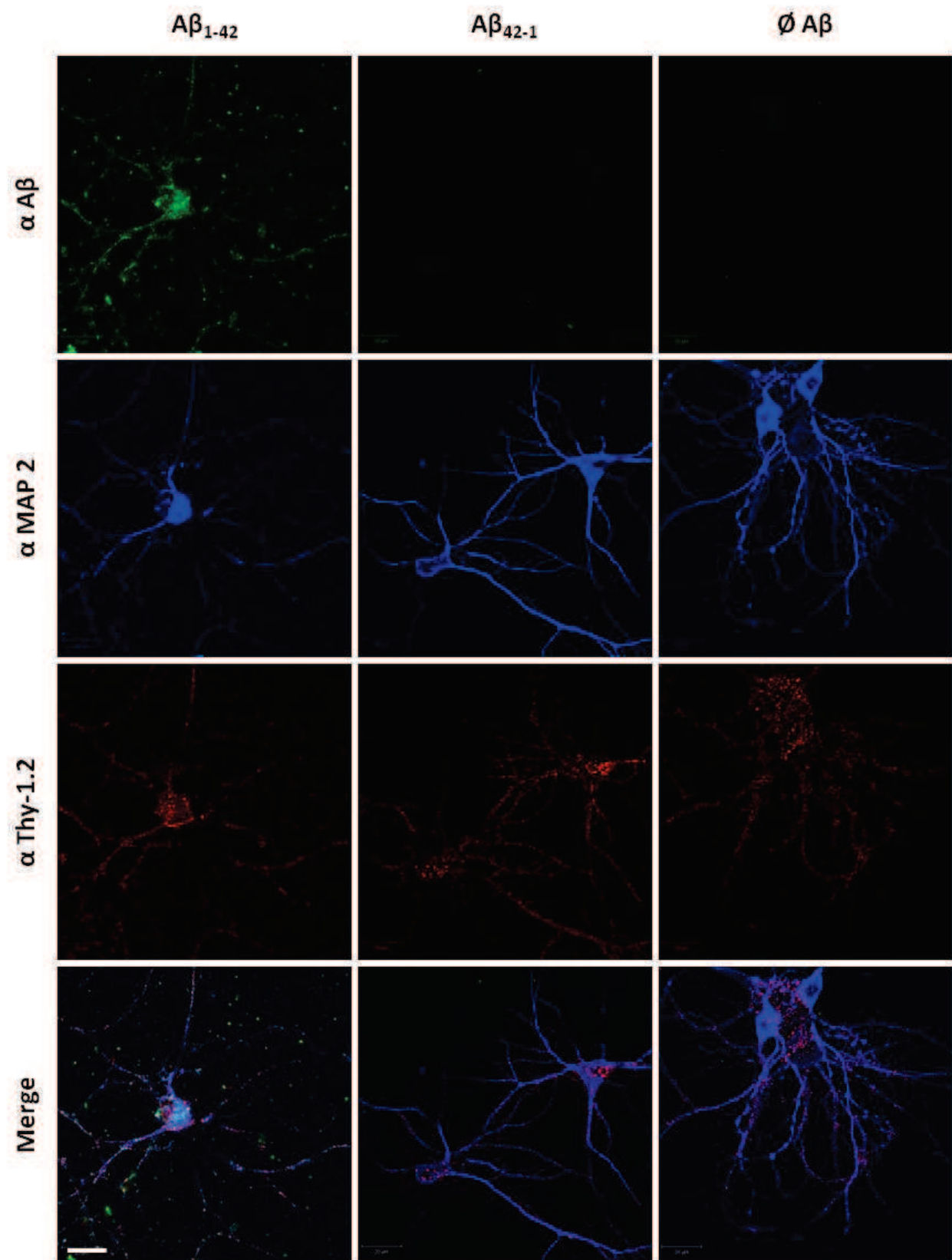
Figure 19 Liaison des oligomères Aβ₁₋₄₂ aux membranes plasmiques des cellules PC12. Les cellules PC12 en culture ont été traitées avec une solution de peptide Aβ₁₋₄₂ ou du solvant seul pendant 10 minutes à température ambiante. Les oligomères Aβ₁₋₄₂ liés sur les membranes plasmiques ont été révélés avec l'anticorps A11 dirigé spécifiquement contre les oligomères Aβ. Microscopie confocale (barre d'échelle 20 μm).

2. Partie 1 : Interaction du peptide A β avec les membranes plasmiques cellulaires et réponse calcique

2.1. Liaison du peptide A β sur les membranes plasmiques

2.1.1. Cellules PC12

Dans un premier temps nous avons souhaité vérifier si le peptide A β_{1-42} synthétique appliqué de façon exogène dans le milieu extracellulaire est capable d'interagir avec les membranes plasmiques des cellules nerveuses. Les cellules de la lignée tumorale PC12 peuvent être aisément maintenues en culture et présentent la particularité de se différencier et d'adopter un phénotype de type neuronal lorsqu'elles sont traitées avec du NGF. Elles représentent donc un bon modèle cellulaire pour réaliser des études préliminaires de cytotoxicité du peptide A β . Pour vérifier si l'A β_{1-42} se lie aux membranes des cellules en utilisant la technique de l'immunocytochimie nous avons appliqué sur des cellules PC12 une solution de PBS contenant 1 μ M de peptide A β_{1-42} synthétique pendant 10 minutes à température ambiante. Cette solution a été préparée en dissolvant le peptide A β_{1-42} sous forme de poudre lyophilisée dans du DMSO puis en diluant cette solution stock dans du PBS. Le peptide A β_{1-42} n'ayant été ni dissout dans du HFIP ni centrifugé afin d'éliminer les agrégats de peptide comme le préconise la méthode de Lambert [78], la solution appliquée sur les cellules contenait vraisemblablement peu de monomères, de nombreux oligomères de haut poids moléculaire, des protofibrilles et des fibrilles A β . L'anticorps A11 utilisé dans cette série d'expériences est un anticorps conformationnel spécifiquement dirigé contre les oligomères de peptide amyloïde [401]. Les images obtenues en microscopie confocale (Figure 19) montrent que la fluorescence émise par les cellules PC12 traitées avec la solution peptidique est plus intense que celle émise par les cellules contrôles traitées avec une



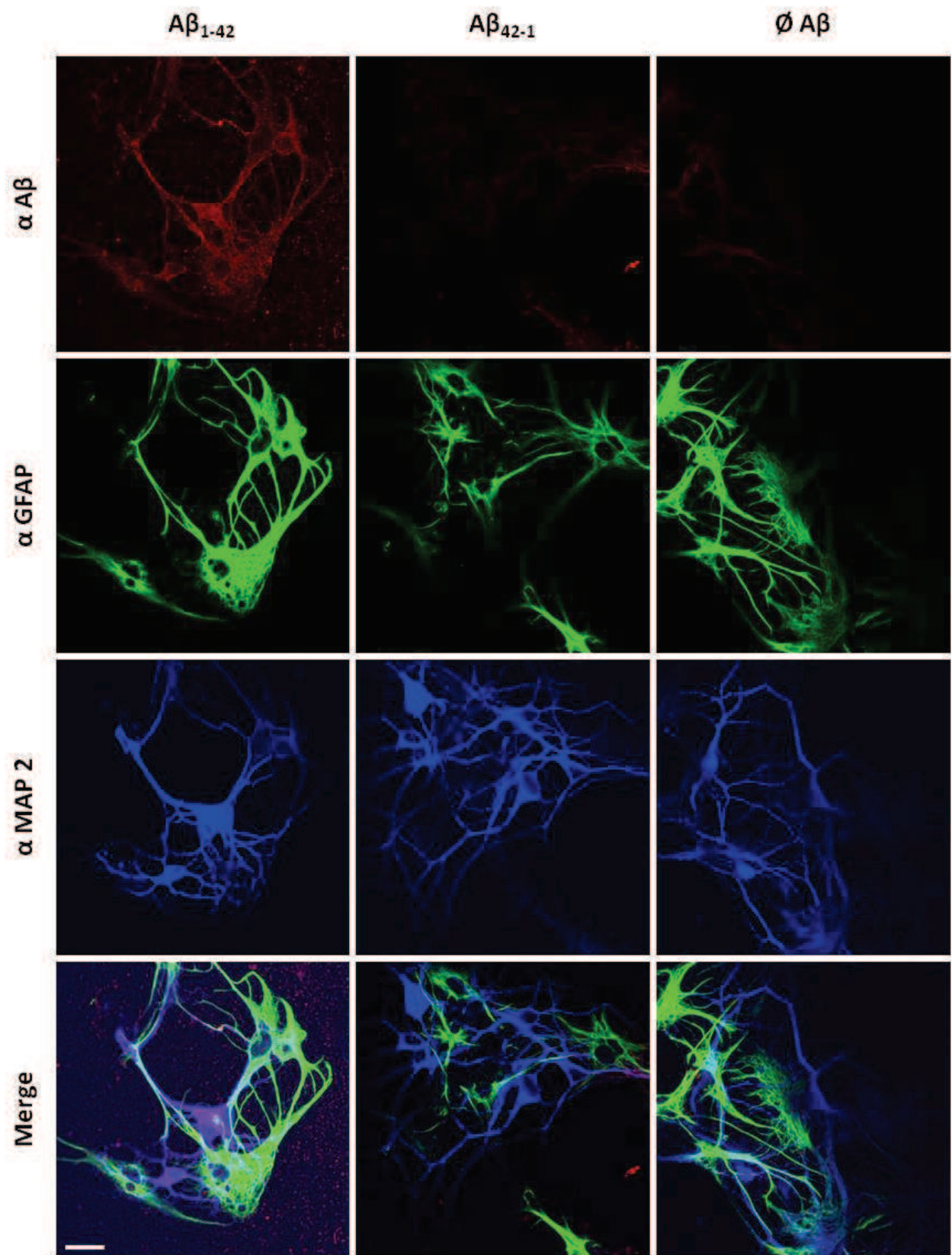
solution de PBS sans $A\beta_{1-42}$, les oligomères de peptide $A\beta_{1-42}$ sont donc capables de se lier sur la membrane plasmique des cellules PC12. De plus le marquage des cellules PC12 n'est pas homogène, le signal est en effet ponctiforme ce qui suggère que les oligomères se lieraient préférentiellement au niveau de domaines membranaires spécifiques.

2.1.2. Cultures primaires d'hippocampes de souris

Par la suite nous avons reproduit ces expériences avec un modèle cellulaire plus proche de la physiologie animale, les cultures primaires de cellules nerveuses. Les cultures primaires utilisées pour cette série d'expérience ont été réalisées à partir d'hippocampes prélevés sur des embryons de souris OF1 au stade E18. Ces cultures primaires, essentiellement composées de neurones et de cellules gliales tels que les astrocytes, ont été traitées pendant 10 minutes avec une solution tampon HEPES contenant du peptide $A\beta_{1-42}$ (1 μ M) ou du peptide inverse $A\beta_{42-1}$ à 37°C. Pour préparer ces solutions les peptides $A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{42-1}$ conservés sous forme de film HFIP ont été dissous dans du DMSO puis dilués dans du tampon HEPES et conservés à 4°C pendant 16 heures. Ces conditions favorisent la formation d'oligomères et limitent la formation de protofibrilles et de fibrilles ([399], Figure 30). Les résultats obtenus en immunocytochimie sont représentés sur les figures 20 et 21. Sur ces images les astrocytes sont identifiés grâce à un anticorps dirigé contre la protéine GFAP (Figure 21), les neurones grâce à des anticorps dirigés contre MAP2 (Figures 20 et 21), une protéine associée aux microtubules, ou contre Thy-1.2 (Figure 20), une glycoprotéine associée à la membrane plasmique, tandis que les peptides $A\beta$ liés sur les membranes sont visualisés grâce aux anticorps séquentiels $\alpha A\beta$ (Figure 20) et 6E10 (Figure 21).

La fluorescence émise par les cellules traitées avec le peptide $A\beta_{1-42}$ est plus intense que celle

Figure 20 Liaison du peptide $A\beta_{1-42}$ sur la membrane plasmique des neurones hippocampiques. Les cultures primaires d'hippocampes de souris (7 DIV) ont été incubées avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (1 μ M), du peptide $A\beta_{42-1}$ (1 μ M) ou du solvant seul ($\emptyset A\beta$) pendant 10 minutes à 37°C. Les neurones ont été doublement marqués grâce à des anticorps anti-Map2 (bleu) et anti-Thy.1 (rouge). Les peptides $A\beta$ liés sur les membranes plasmiques ont été mis en évidence grâce à un anticorps séquentiel dirigé contre le peptide $A\beta$ (vert).



émise par les cellules traitées avec le peptide $A\beta_{42-1}$ ou avec le solvant seul ($\emptyset A\beta$) (Figures 20 et 21). Ceci montre que le peptide $A\beta_{1-42}$ adhère aux membranes plasmiques des neurones hippocampiques. A l'instar que ce que nous avons observé précédemment avec les cellules PC12, le marquage des neurones par l'anticorps $\alpha A\beta$ (Figures 20) est relativement ponctiforme suggérant que les oligomères ciblent des domaines membranaires particuliers.

Les astrocytes semblent également faiblement marqués par l'anticorps 6E10 (Figure 21). Il est donc probable que les oligomères $A\beta_{1-42}$ interagissent également avec la membrane des astrocytes.

2.2. Les oligomères $A\beta_{1-42}$ induisent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$

Les expériences d'immunocytochimie nous ont permis de mettre en évidence que le peptide $A\beta_{1-42}$ sous forme oligomérique interagit avec les membranes plasmiques des cellules nerveuses. Nous nous sommes ensuite interrogés sur les conséquences d'une telle interaction sur la physiologie des cellules PC12, des neurones et des astrocytes. Selon une étude publiée par Kaye et al. en 2004 l'interaction des oligomères $A\beta$ avec des bicouches lipidiques provoquerait en fonction de la concentration d'oligomères injectés dans le milieu une augmentation de la conductance de ces membranes artificielles [90, 544]. Selon cette étude cette variation de conductance ne serait pas sélective d'un type d'ion en particulier, toutefois la même équipe a montré ultérieurement que, contrairement aux monomères et aux fibrilles, l'addition d'oligomères $A\beta$ dans le milieu extracellulaire de cellules SH-SY5Y

Figure 21 Liaison du peptide $A\beta_{1-42}$ sur la membrane plasmique des neurones hippocampiques. Les cultures primaires d'hippocampes de souris (9 DIV) ont été incubées avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (1 μ M), du peptide $A\beta_{42-1}$ (1 μ M) ou du solvant seul ($\emptyset A\beta$) pendant 10 minutes à 37°C. Les neurones ont été marqués grâce à un anticorps dirigé contre la protéine Map2 (bleu) et les astrocytes grâce à un anticorps dirigé contre la protéine GFAP (vert). Les peptides $A\beta$ liés aux membranes plasmiques ont été mis en évidence grâce à l'anticorps 6E10 dirigé contre le peptide $A\beta$ (rouge).

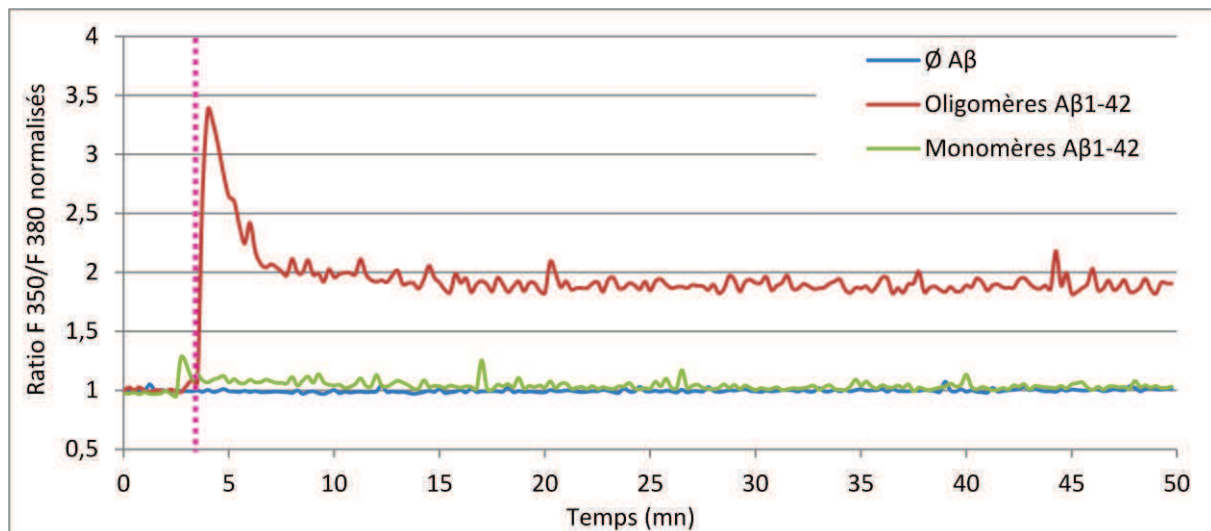


Figure 22 L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules PC12 est induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$. Les traces montre l'évolution de la fluorescence moyenne dépendante de la $[Ca^{2+}]_i$ émise par l'ensemble des cellules PC12 différenciées chargées en Fura 2 traitées avec une solution enrichie en oligomères $A\beta_{1-42}$ (1 μM) ou en monomères $A\beta_{1-42}$ (1 μM) , ou du solvant sans peptide ($\emptyset A\beta$) à $t \approx 3$ minutes (droite pointillée). Seuls les oligomères $A\beta_{1-42}$ induisent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$.

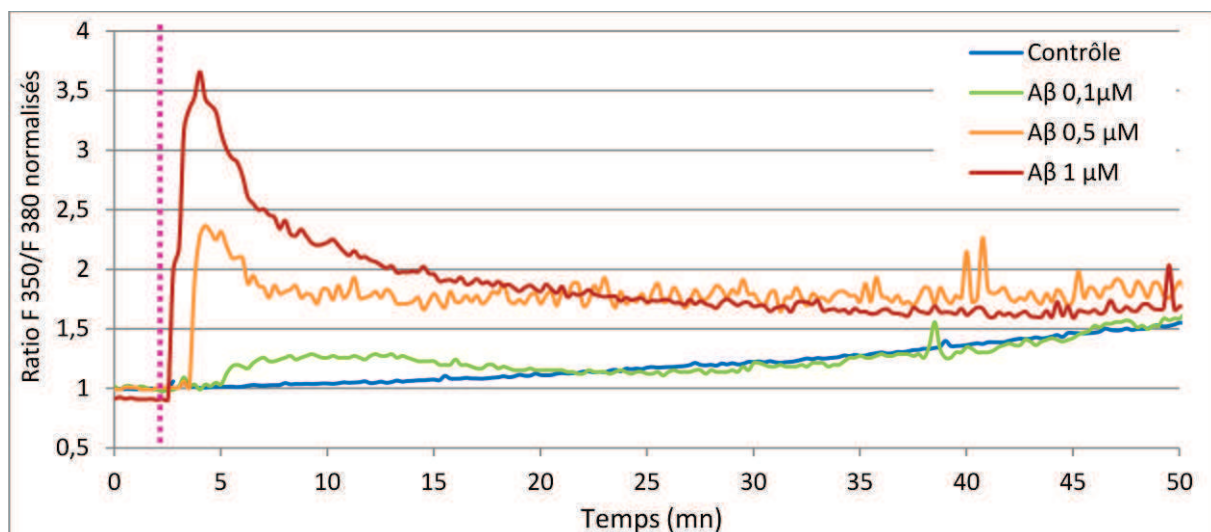


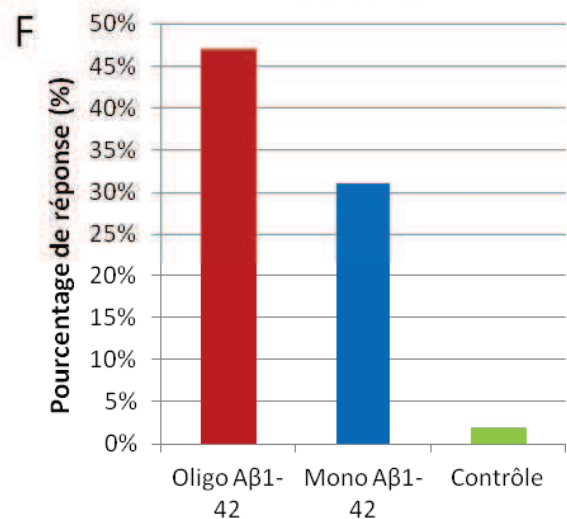
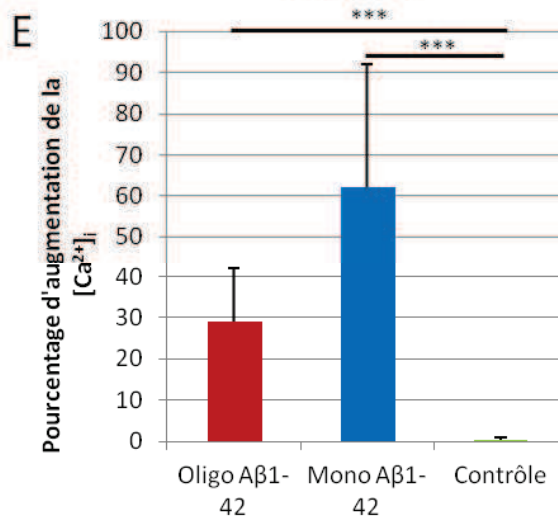
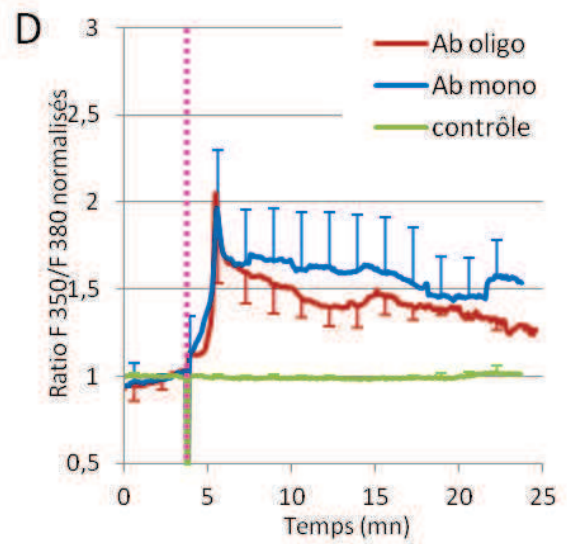
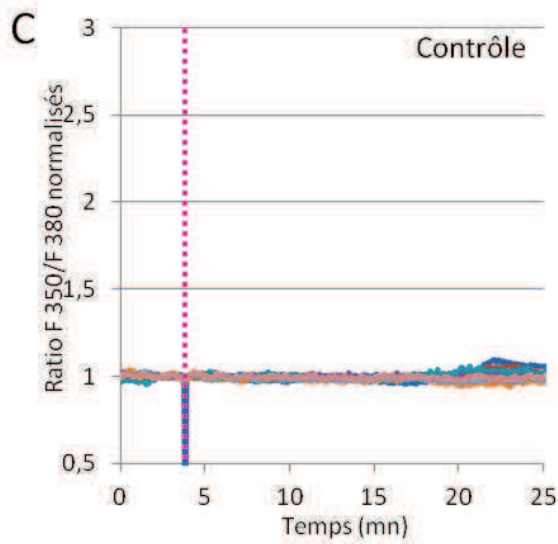
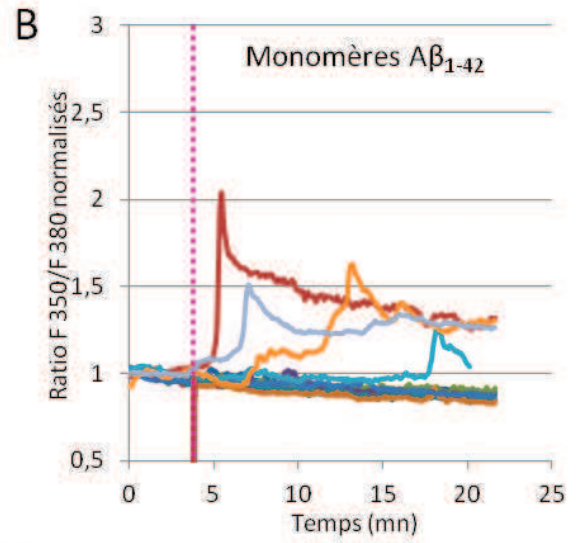
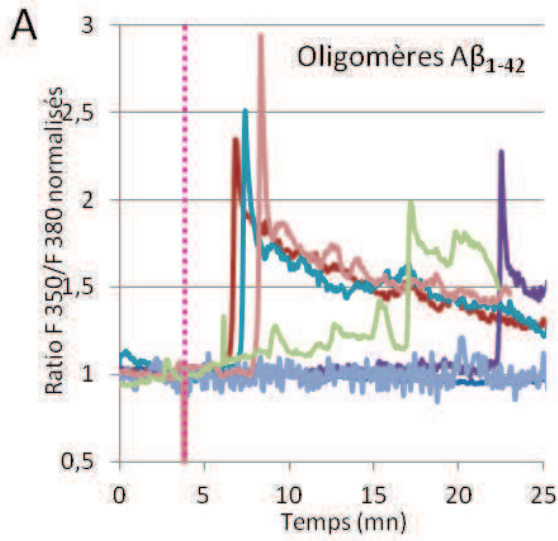
Figure 23 L'amplitude de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par le peptide $A\beta_{1-42}$ dans les cellules PC12 dépend de la concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ injectée. Les traces montre l'évolution de la fluorescence moyenne dépendante de la $[Ca^{2+}]_i$ émise par l'ensemble des cellules PC12 appartenant aux différents groupes expérimentaux. Les solutions contenant différentes concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$ ou le solvant seul (contrôle) ont été injectées à $t \approx 3$ mn (droite pointillée) dans le milieu extracellulaire des cellules PC12 différenciées chargées en Fura 2.

provoque une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ [91]. Nous avons donc décidé d'enregistrer les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ provoquées dans nos cellules par l'addition de peptide $A\beta_{1-42}$ en utilisant la sonde ratiométrique Fura 2. La particularité de cette sonde est que la longueur d'onde d'excitation de la fluorescence varie en présence d'ions Ca^{2+} dans le milieu. En effet les molécules de Fura 2 liées aux ions Ca^{2+} ont une longueur d'onde d'excitation de 340 nm tandis que les molécules de Fura 2 libre ont une longueur d'onde d'excitation de 380 nm. Dans ces conditions toute augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ se traduit par une augmentation du rapport des intensités de fluorescence émises par les cellules lorsqu'elles sont excitées à 380 nm et à 350 nm (F350/380).

2.2.1. Cellules PC12

L'injection d'une solution enrichie en oligomères $A\beta_{1-42}$ (1 μ M) dans le milieu extracellulaire des cellules PC12 provoque un pic d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ suivi d'une phase de décroissance et enfin d'une phase de plateau (Figure 22). En revanche l'addition d'une solution de monomères $A\beta_{1-42}$ (1 μ M) ou de solvant sans peptide (contrôle) n'induit pas de variation de la $[Ca^{2+}]_i$. Ceci indique que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est bien induite par l'addition d'oligomères dans le milieu extracellulaire et non par la présence d'un éventuel contaminant dans le solvant ou par un effet mécanique (Figure 22).

L'amplitude de la réponse calcique induite par les oligomères $A\beta$ dans les cellules PC12 dépend de la concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ dans la solution appliquée sur les cellules (Figure 23). En effet lorsque nous appliquons sur les cellules une concentration finale de 0,5 μ M de peptide $A\beta_{1-42}$ l'amplitude du pic est réduite de 35 % par rapport au pic obtenu lorsque nous appliquons une concentration finale de 1 μ M de peptide $A\beta_{1-42}$ tandis que l'amplitude du plateau subséquent est équivalente. En revanche en présence de 0,1 μ M de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire la $[Ca^{2+}]_i$ augmente faiblement et revient rapidement au niveau basal (Gilson et al., soumis, voir annexes).

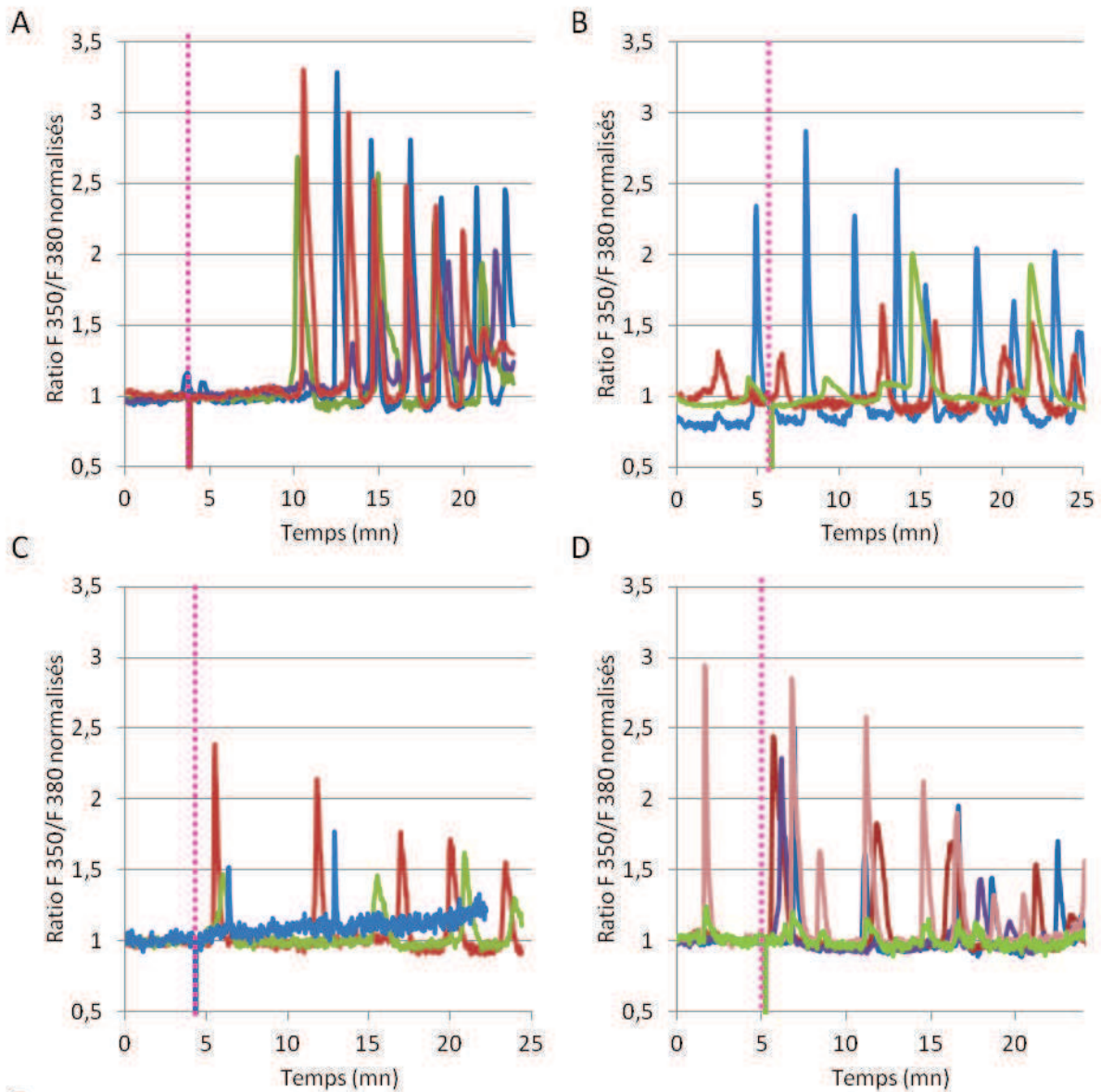


2.2.2.Neurones

Tout comme pour les cellules PC12, l'injection d'une solution enrichie en oligomères $A\beta_{1-42}$ (1 μM) dans le milieu extracellulaire des neurones primaires d'hippocampes de souris provoque dans 47 % (n = 32) (Figure 24 F) des cellules une augmentation brutale de la $[Ca^{2+}]_i$. Le profil de cette réponse calcique est similaire à celui observé dans les cellules PC12, elle se compose d'un pic d'une amplitude moyenne de $2,04 \pm 0,41$ UA suivi d'une phase de décroissance rapide et d'une phase de plateau correspondant à une augmentation de 30 ± 13 % (Figure 24 E) par rapport à la $[Ca^{2+}]_i$ basale (Figure 24 A, D, et E). Le délai de latence moyen est d'environ $5 \pm 2,45$ minutes, cependant si l'on observe les traces individuelles séparément nous constatons que les réponses calciques dans les différents neurones d'une même boîte de culture ne sont pas synchrones, le délai de latence et l'amplitude de la réponse calcique varient en effet d'un neurone à l'autre.

Contrairement à ce qui était attendu, nous avons également observé des réponses calciques neuronales après injection d'une solution de peptide $A\beta_{1-42}$ monomérisé dans le milieu extracellulaire des cultures primaires (Figure 24 B et D). L'amplitude moyenne du pic et du plateau de la réponse calcique ($1,97 \pm 0,39$ UA et $1,62 \pm 0,30$ UA Figure 24 E) ainsi que le délai de latence moyen ($4,77 \pm 3,19$ minutes) mesurés dans ces conditions ne diffère pas significativement de ceux obtenus après l'addition d'oligomères $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire. Toutefois le taux de réponse cellulaire dans cette condition (31 %, n=42) est

Figure 24 Augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les neurones primaires induite par $A\beta_{1-42}$. (A, B et C) Traces individuelles représentant la fluorescence émise par les neurones primaires. Une solution enrichie en oligomères (1 μM) (A), en monomères $A\beta_{1-42}$ ((B) ou du solvant sans peptide (C) a été injectée dans le milieu extracellulaire (μM) des cultures primaires d'hippocampes de souris (10 DIV) à $t \approx 4$ minutes (droite pointillée). (D) Courbes représentant la fluorescence moyenne émise par l'ensemble des cellules traitées avec les oligomères $A\beta_{1-42}$, les monomères $A\beta_{1-42}$ ou le solvant. Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne. (E) Le pourcentage d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est calculé en soustrayant la moyenne des valeurs de la ligne de base à la moyenne des valeurs obtenues entre la 6^{ème} et la 11^{ème} minute d'enregistrement (phase de plateau). (F) Pourcentage de cellules montrant une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ après l'injection de peptide ou de solvant.



E

	Temps de latence moyen (mn)	Amplitude moyenne avant injection	Amplitude moyenne après injection	Intervalle de temps moyen entre 2 pics avant injection (mn)	Intervalle de temps moyen entre 2 pics après injection (mn)
$A\beta_{1-42}$	$8,20 \pm 2,58$	$1,34 \pm 0,30$	$1,77 \pm 0,54$	$4,36 \pm 1,41$	$2,28 \pm 0,99$
		$p < 0,001$		$p = 0,002$	
$A\beta_{42-1}$	$1,58 \pm 0,45$	$1,73 \pm 0,15$	$1,58 \pm 0,45$	$3,26 \pm 0,18$	$3,46 \pm 1,38$
		NS		NS	
$\emptyset A\beta$	$2,33 \pm 1,84$	$2,09 \pm 1,20$	$1,60 \pm 0,48$	$5,13 \pm 0,04$	$4,16 \pm 1,20$
		NS		$p < 0,005$	
$A\beta_{1-42}$ vs $A\beta_{42-1}$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$
$A\beta_{1-42}$ vs $\emptyset A\beta$	$p < 0,001$	NS	$p < 0,05$	NS	$p < 0,001$
$A\beta_{42-1}$ vs $\emptyset A\beta$	NS	NS	NS	$p = 0,06$	NS

légèrement inférieur à celui observé lorsque nous avons injecté une solution d'oligomères $A\beta_{1-42}$. Le très faible taux de réponse obtenu lorsque l'on applique le solvant seul dans le milieu extracellulaire (2 %, n = 58) implique que ces réponses calciques sont bien induites par l'addition de peptide $A\beta_{1-42}$ (Figure 24 C et F). En revanche il est possible que des oligomères se soient formés dans la solution de peptide monomérisé ou dans le milieu extracellulaire après la dissolution du film HFIP dans le DMSO puis dans le solvant. La quantité d'oligomères formés dans la solution de monomères serait alors plus faible que dans la solution d'oligomères ce qui expliquerait que le taux de réponse soit lui aussi plus faible. Des analyses par western blot montrant la présence d'oligomères dans des solutions peptidiques préparées dans des conditions comparables confortent cette hypothèse (Figure 30).

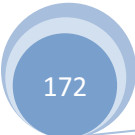
2.2.3. Astrocytes

Le fait que le peptide $A\beta_{1-42}$ semble également se fixer sur la membrane plasmique des astrocytes (Figure 21, § 2.1.2) nous a incité à nous interroger sur l'effet que cette interaction pourrait avoir sur la régulation de la $[Ca^{2+}]_i$ des astrocytes.

Dans nos cultures primaires les astrocytes sont fréquemment couplés aux neurones, par conséquent pour éviter que les astrocytes ne soient stimulés par une éventuelle hyperactivité neuronale en présence de peptide $A\beta_{1-42}$ nous avons réalisé ces expériences d'imagerie calcique en présence de tétrodothine (TTX, $1.10^{-7}M$).

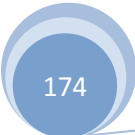
Dans les astrocytes la détection d'un stimulus chimique ou mécanique entraîne la formation

Figure 25 Génération d'oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ et augmentation de l'amplitude et de la fréquence des oscillations calciques préexistantes dans les astrocytes traités avec $A\beta_{1-42}$. Traces individuelles représentant la fluorescence émise par les astrocytes primaires suite à l'injection (droite pointillée) de peptide $A\beta_{1-42}$ (A, B), de peptide $A\beta_{42-1}$ (C) ou de solvant sans peptide (D) dans le milieu extracellulaire des cultures primaires d'hippocampe de souris (10 DIV). (E) Tableau de statistiques.



de vagues ou oscillations calciques consistant en des augmentations périodiques de la $[Ca^{2+}]_i$ séparées par un retour à la $[Ca^{2+}]_i$ basale (Revue [545]). L'addition de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire induit la formation d'oscillations calciques dans environ 33 % ($n = 248$) des cellules enregistrées tandis que les injections de peptide inverse $A\beta_{42-1}$ ou de milieu extracellulaire sans peptide $A\beta$ n'induisent des oscillations calciques que dans respectivement 9,5 % ($n = 157$) et 9,4 % ($n = 185$) des cellules (Figure 25). Le temps de latence moyen entre l'injection de la solution de peptide $A\beta_{1-42}$ et le sommet du premier pic d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est de $8,2 \pm 2,58$ minutes (Figure 25 E). Ce délai de latence moyen est significativement plus élevé ($p < 0,001$) que ceux observés lorsque nous avons ajouté une solution de peptide $A\beta_{42-1}$ ou le solvant seul ($1,58 \pm 0,45$ et $2,33 \pm 1,84$; $p = 0,33$) (Figure 25 E).

Par ailleurs dans certaines cellules la $[Ca^{2+}]_i$ oscille dès le début de l'enregistrement, nous avons alors cherché à savoir si l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$, de peptide $A\beta_{42-1}$ ou de solvant influe sur l'amplitude et la fréquence des oscillations. Pour cela nous avons comparé l'amplitude et la fréquence moyenne des oscillations calciques observées dans les cellules avant (amplitudes et fréquences de base) et après l'injection d' $A\beta_{1-42}$, d' $A\beta_{42-1}$ ou de solvant. Nous avons ainsi observé une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'amplitude moyenne des oscillations calciques observées après l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$. Celle-ci est en effet égale à $1,34 \pm 0,3$ UA avant l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$ et à $1,77 \pm 0,54$ UA après l'injection (Figure 25 E). En revanche les amplitudes moyennes des oscillations observées dans les cellules traitées avec du peptide $A\beta_{42-1}$ ou du solvant ($\emptyset A\beta$) ne diffèrent pas significativement des amplitudes basales correspondantes ($p = 0,12$ et $p = 0,67$ respectivement Figure 25 E). En mesurant et en moyennant les intervalles de temps entre deux pics, nous avons également constaté que la fréquence des oscillations augmente significativement après une injection de peptide $A\beta_{1-42}$ tandis qu'elle n'augmente pas ou de façon modérée après une injection de peptide $A\beta_{42-1}$ ou de solvant. L'intervalle de temps entre deux pic varie de $4,36 \pm 1,41$ minutes à $2,28 \pm 0,99$ minutes dans les cellules traitées avec le peptide $A\beta_{1-42}$ contre $3,26 \pm 0,18$ minutes à $3,46 \pm 1,38$ minutes dans les celles traitées avec le peptide inverse et $5,13 \pm 0,04$ minutes à $4,16 \pm 1,20$ minutes dans celles traitées avec le solvant.



D'après ces résultats il semble donc que l'injection d'une solution dans le milieu extracellulaire provoque très rapidement (≈ 2 minutes) dans toutes les conditions une réponse calcique non spécifique dans environ 10% des astrocytes. Nous n'avons pas réussi à déterminer avec certitude l'origine de cette réponse non spécifique, nous supposons toutefois que celle-ci serait induite par une stimulation mécanique provoquée par l'injection d'un liquide dans le milieu extracellulaire ou à un stress osmotique lié à la présence de peptide $A\beta_{1-42/42-1}$ ou de trace de BSA dans la solution injectée. Cependant le pourcentage de cellules oscillantes nettement plus élevé lorsque l'on ajoute du peptide $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire suggère que le peptide $A\beta_{1-42}$ a bien un effet excitateur sur les astrocytes. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'on ne voit apparaître une réponse retardée que lorsque les cellules sont traitées avec le peptide $A\beta_{1-42}$, certaines cellules ne présentent en effet des oscillations calciques qu'environ 8 minutes après l'injection. De plus l'amplitude et la fréquence de ces oscillations sont plus élevées en présence de peptide $A\beta_{1-42}$ qu'en présence de peptide $A\beta_{42-1}$ ou de solvant seul.

2.3. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dépend de l'activation des récepteurs NMDA

Par la suite nous avons tenté de déterminer l'origine des ions calcium impliqués dans la réponse calcique des neurones. Ces ions calcium peuvent provenir soit des réservoirs intracellulaires de calcium (réticulum endoplasmique, mitochondries, ...) soit du milieu extracellulaire. Les ions Ca^{2+} des réservoirs sont libérés dans le cytosol après ouverture des récepteurs-canaux de l'IP3 (inositol triphosphate) ou des récepteurs ryanodine (cf. § 1.8.4). Les ions calcium situés dans le milieu extracellulaire ont quant à eux trois voies d'entrées potentielles dans la cellule : via des récepteurs ionotropes, via les canaux calciques, ou via des pores amyloïdes formés par l'insertion éventuelle d'oligomères $A\beta$ dans la membrane plasmique. Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes efforcés de déterminer le rôle éventuel des récepteurs NMDA dans la réponse calcique induite par le peptide $A\beta$. Nous avons choisi de nous intéresser à ces récepteurs car ils sont hautement exprimés dans les neurones, perméables au calcium, et jouent un rôle pivot dans les processus de plasticité synaptique. La Mémantine, un antagoniste des NMDARs, est couramment utilisé en clinique

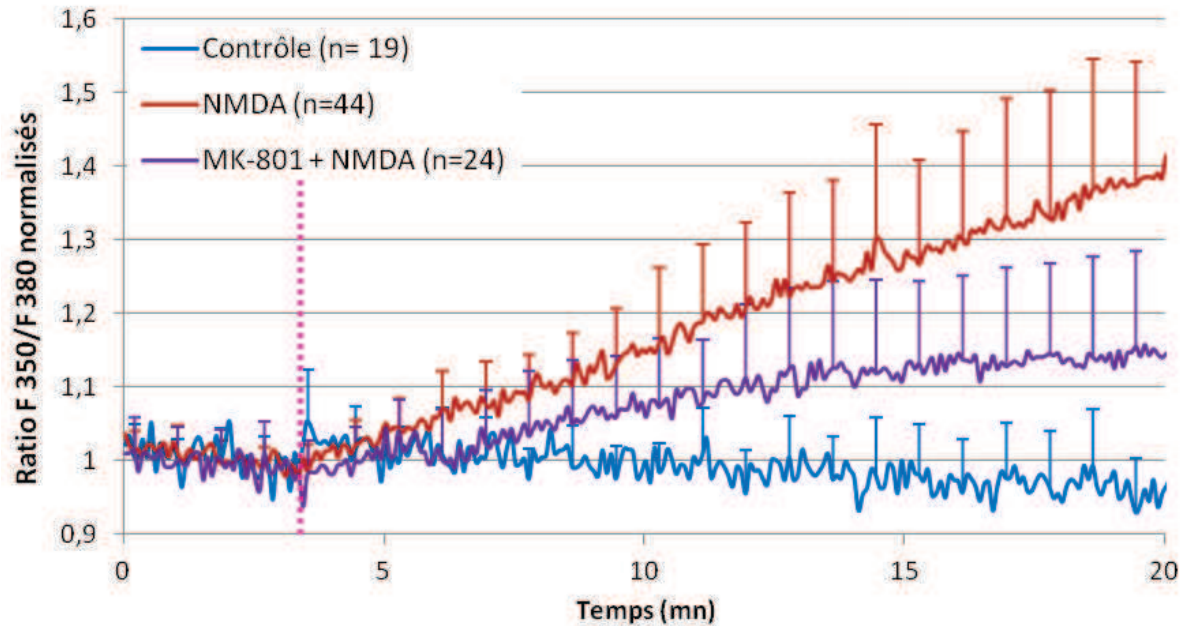


Figure 26 Le NMDA induit une augmentation régulière de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules PC12 inhibée par les antagonistes des récepteurs NMDA. Fluorescence moyenne émise par les cellules PC12 différenciées en réponse à l'injection extracellulaire de NMDA (10 μ M) ou de solvant (droite pointillée) en présence ou non de MK-801. Le MK-801 (10 μ M) est ajouté dans le milieu extracellulaire avant le début de l'enregistrement.

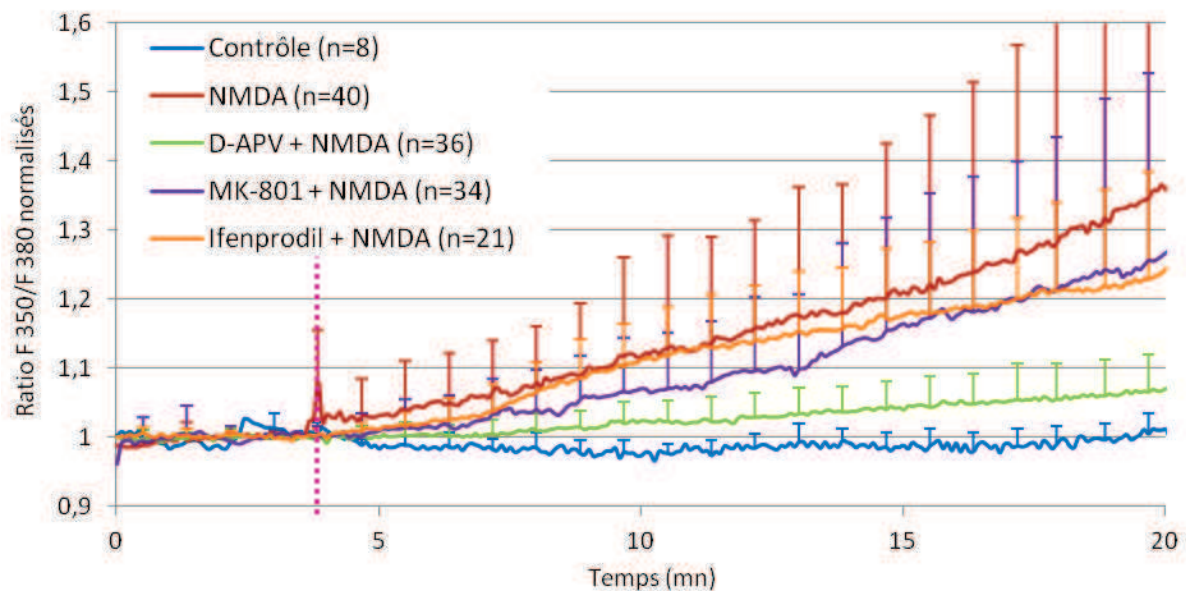


Figure 27 Le NMDA induit une augmentation régulière de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les neurones primaires inhibée par les antagonistes des récepteurs NMDA. Fluorescence moyenne émise par les neurones hippocampiques primaires (10 DIV) en réponse à l'injection extracellulaire de NMDA (1 μ M) ou de solvant (droite pointillée) en présence ou non d'antagonistes des récepteurs NMDA. Le D-APV (10 μ M), le MK-801 (10 μ M), et l'ifenprodil (5 μ M) sont ajoutés dans le milieu extracellulaire avant le début de l'enregistrement.

pour atténuer les symptômes de patients atteints par la MA. De plus il a récemment été montré in vitro que la Mémantine réduit le stress oxydatif induit par les ADDLs en bloquant l'influx d'ions calcium via les NMDARs [92].

2.3.1. Réponse calcique induite par le NMDA

2.3.1.1. Cellules PC12

Avant de tester notre hypothèse selon laquelle le peptide $A\beta_{1-42}$ induirait un influx d'ions calcium dans les cellules via les NMDARs nous avons souhaité vérifier si les cellules que nous utilisons comme modèle expriment à leur surface des récepteurs NMDA fonctionnels. Pour cela nous avons opté pour la technique de l'imagerie calcique. En injectant du NMDA (1.10^{-5} M) dans le milieu extracellulaire d'un premier groupe de cellules PC12 nous avons observé une augmentation progressive et régulière de la $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 26). La $[Ca^{2+}]_i$ en présence de NMDA est significativement plus élevée que la $[Ca^{2+}]_i$ des cellules contrôles (sans traitement pharmacologique) dès la sixième minute d'enregistrement ($p < 0,005$). Pour vérifier que cette réponse calcique était bien liée à l'ouverture des canaux NMDA nous avons injecté du MK-801, un antagoniste bloquant le canal des NMDARs, dans le milieu extracellulaire du second groupe de cellules PC12 avant le début de l'enregistrement ($[MK-801] = 1.10^{-5}$ M). Nous avons alors constaté une diminution significative de l'amplitude de la réponse calcique induite par l'injection de NMDA ($p < 0,05$). De plus la $[Ca^{2+}]_i$ n'est significativement plus élevée que la $[Ca^{2+}]_i$ contrôle qu'à partir de $t \approx 8,5$ minutes ($p < 0,005$). Le NMDA induit donc dans les cellules PC12 une réponse calcique partiellement inhibée en présence d'antagonistes spécifiques des NMDARs ; cela confirme que les cellules PC12 expriment bien des NMDARs fonctionnels à leur surface.

2.3.1.2. Neurones

De même que dans les cellules PC12, une injection de NMDA dans le milieu extracellulaire des cultures primaires d'hippocampe de souris à $t \approx 4$ minutes provoque dans les neurones une augmentation progressive de la $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 27). Cette augmentation est significative à

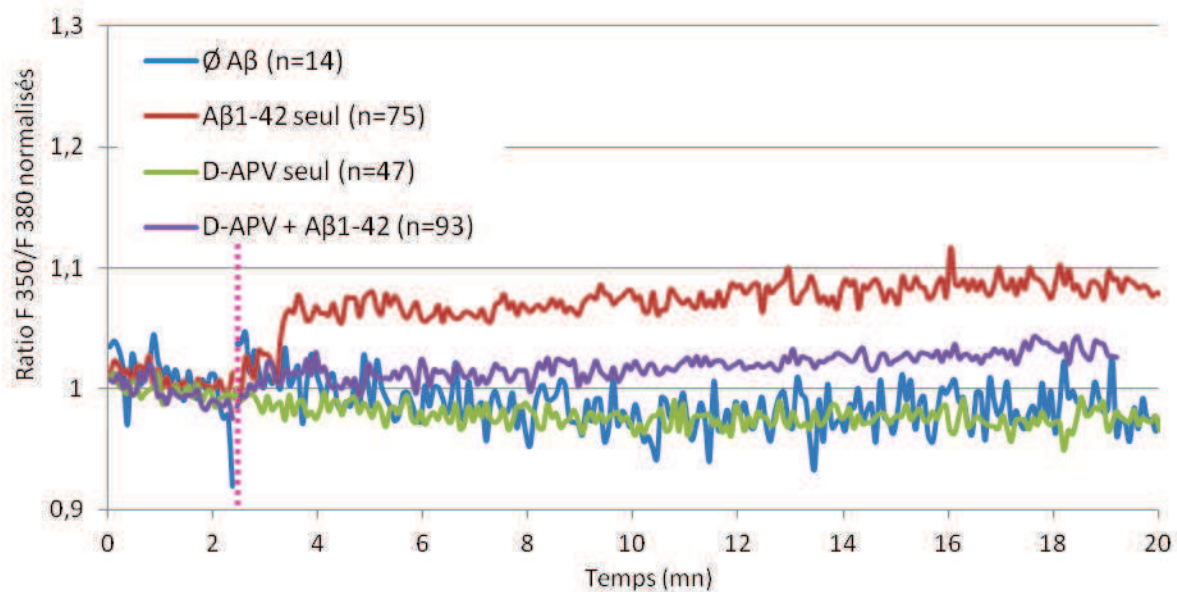


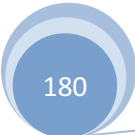
Figure 28 La réponse calcique induite dans les cellules PC12 par les oligomères est inhibée par les antagonistes des récepteurs NMDA. Fluorescence moyenne émise par les cellules PC12 différenciées en réponse à l'injection extracellulaire de peptide Aβ₁₋₄₂ (1 μM) ou de solvant (droite pointillée) en présence ou non de D-APV. Le D-APV (10 μM) est ajouté dans le milieu extracellulaire avant le début de l'enregistrement.

partir de $t \approx 5,5$ minutes. Trois groupes de cellules ont été préalablement traités avec des antagonistes des NMDARs : du MK-801 (1.10^{-5} M), du D-2-amino-5-phosphonovalérate (D-APV, 1.10^{-5} M) et de l'ifenprodil (5.10^{-6} M). Le DAPV, un inhibiteur compétitif des NMDARs, se fixe sur la sous unité NR2 au niveau du site de liaison du glutamate tandis que l'ifenprodil inhibe spécifiquement les NMDARs contenant la sous unité NR2B en se fixant sur un site de liaison différent de celui de l'agoniste. Comme précédemment la présence de MK-801 ou de D-APV dans le milieu extracellulaire augmente le délai de latence et réduit l'amplitude de la réponse calcique induite par le NMDA ($p < 0,05$ et $p < 0,05$ respectivement). L'inhibition de la réponse calcique par le D-APV est plus importante que celle exercée par le MK-801. Ceci est probablement lié au fait que le DAPV empêche la liaison du NMDA et donc l'activation des récepteurs tandis que le MK-801 ne peut se fixer dans le canal que lorsqu'il est ouvert. Enfin l'inhibition de la réponse calcique par l'ifenprodil est plus faible et n'est significative qu'entre le moment de l'injection et $t = 7,5$ minutes ($p < 0,05$). Ceci implique que les NMDARs contenant la sous unité NR2B ne jouent qu'un rôle mineur dans l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ induite par le NMDA et/ou que le défaut d'activation de ces récepteurs est compensé par une activation accrue d'autres sous types de récepteurs NMDA exprimés à la surface des neurones primaires.

2.3.2. Réponse calcique induite par $A\beta_{1-42}$ en présence d'inhibiteurs des récepteurs NMDA

2.3.2.1. Cellules PC12

Afin de tester en imagerie calcique l'hypothèse selon laquelle le peptide $A\beta_{1-42}$ induirait un influx d'ions calcium dans la cellule via l'ouverture du canal des NMDARs nous avons constitué quatre groupes de cellules PC12. Dans les groupes « D-APV » seul et « D-APV + $A\beta_{1-42}$ » nous avons ajouté du D-APV ($10 \mu\text{M}$) dans le milieu extracellulaire avant le début de l'enregistrement. Trois minutes environ après le début de l'enregistrement deux groupes de cellules, dont l'un des groupes prétraités avec du D-APV, ont été traités avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (groupes « $A\beta$ seul » et « D-APV + $A\beta$ ») tandis que les deux derniers groupes ont été traités avec le solvant seul (groupes « D-APV seul » et « Contrôle ») (Figure 28). Nous n'avons



observé aucune variation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les groupes « D-APV seul » et « Contrôle », les pourcentages de réponse sont nuls dans les deux conditions ($n = 47$ et $n = 23$ respectivement) et il n'existe aucune différence significative entre ces deux groupes ($p = 0,33$) ce qui exclue l'éventualité d'un effet biologique non spécifique lié à la simple addition de solvant ou de D-APV. En revanche l'addition de peptide $A\beta_{1-42}$ induit dans $41 \pm 1,18$ % ($n = 66$) des cellules observées une augmentation significative de la $[Ca^{2+}]_i$ par rapport à la condition « contrôle » et « D-APV seul) ($p = 0,006$ et $p > 0,001$). En présence de D-APV le pourcentage de réponse induite par $A\beta_{1-42}$ est fortement réduit (9 %, $n = 80$) et la réponse calcique moyenne, inhibée à $94 \pm 1,5$ %, ne diffère pas significativement de celle obtenue dans les groupes « contrôle » et « D-APV seul) ($p = 0,35$ et $p = 0,10$). Ces résultats indiquent que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par les oligomères $A\beta$ dans les cellules PC12 nécessite l'activation des NMDARs et semblent exclure toute implication des canaux calciques dépendants du voltage.

2.3.2.2. *Neurones*

A la suite de ces expériences préliminaires sur les cellules PC12, nous avons testé notre hypothèse sur des neurones hippocampiques issus de cultures primaires. Parmi les six groupes de cultures primaires que nous avons défini, quatre ont été traités avec différents agents pharmacologiques antagonistes des NMDARs : le D-APV (10 μ M), l'acide 5,7-Dichlorokynurenique (5,7-DCK, 10 μ M)), la Mémantine (10 μ M), et le MK-801 (10 μ M). Le D-APV et le 5,7-DCK sont des antagonistes compétitifs se fixant respectivement sur les sites de liaison du glutamate (sous unité NR2) et de la glycine (sous unité NR1), tandis que la Mémantine et le MK-801 bloquent le canal du récepteur. Les agents pharmacologiques ont été ajoutés dans le milieu extracellulaire 20 minutes avant le début de l'enregistrement puis quatre minutes environ après le début de l'enregistrement une solution d'oligomères $A\beta_{1-42}$ (10 μ M) a été injectée dans le milieu extracellulaire de telle sorte que la concentration finale de peptide dans le milieu soit de 1 μ M. Le groupe « $A\beta$ seul » n'a reçu que le traitement peptidique et le groupe « contrôle » n'a reçu ni traitement peptidique ni traitement pharmacologique mais une injection de solvant sans peptide à $t \approx 4$ minutes.

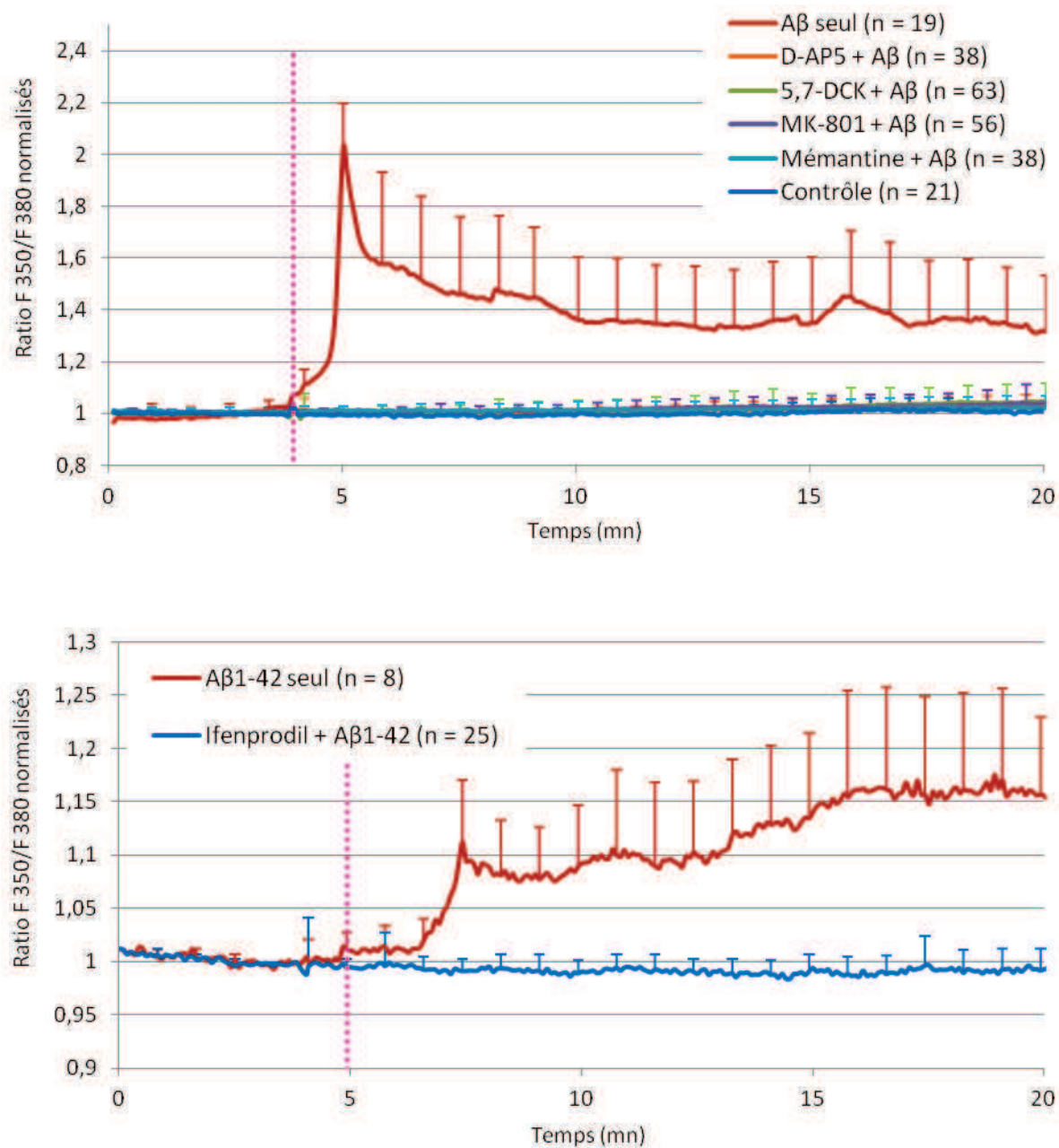
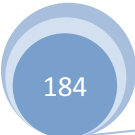


Figure 29 La réponse calcique induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$ dans les neurones primaires est inhibée par les antagonistes des récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B. Fluorescence moyenne émise par les neurones hippocampiques primaires (10 DIV) en réponse à l'injection extracellulaire de peptide $A\beta_{1-42}$ ($1\mu\text{M}$) ou de solvant (droite pointillée) en présence ou non d'antagonistes des récepteurs NMDA. Le D-APV ($10\mu\text{M}$), le 5,7-DCK ($10\mu\text{M}$), le MK-801 ($10\mu\text{M}$), la mémantine ($10\mu\text{M}$), et l'ifenprodil ($5\mu\text{M}$) sont ajoutés dans le milieu extracellulaire avant le début de l'enregistrement.

Les résultats présentés [Figure 29 A](#) montrent qu'une pré-incubation des neurones hippocampiques avec les antagonistes des NMDARs inhibe significativement la réponse calcique induite par le peptide $A\beta_{1-42}$ ($p = 0,001$ en présence de D-APV et de 5,7-DCK, et $p = 0,02$ en présence de Mémantine et de MK-801). En effet la courbe moyenne obtenue après l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$ en présence de D-APV, de 5,7-DCK, de MK-801 ou de Mémantine ne diffère pas significativement de la courbe contrôle. De plus le pourcentage de cellules montrant une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ suite à l'injection d' $A\beta_{1-42}$ n'est que de 10 % en présence de D-APV, de 12 % en présence de 5,7-DCK, de 6 % en présence de Mémantine et de 7 % en présence de MK-801, contre 49 % en l'absence de traitement pharmacologique et 2 % en absence de tout traitement pharmacologique et peptidique (contrôle).

Les NMDARs sont des hétérotétramères composés de sous-unités NR1, NR2 et plus rarement de sous unités NR3. De plus la sous-unité NR2 possède quatre variants dont l'expression varie au cours du développement et à travers l'ensemble du système nerveux central : NR2A, NR2B, NR2C, et NR2D. Les propriétés fonctionnelles des NMDARs sont fortement influencées par le type de sous-unités NR2 qui les composent [546], c'est pourquoi nous avons tenté de déterminer quelles sous-unités NR2 constituent les NMDARs impliqués dans la réponse calcique induite par le peptide $A\beta_{1-42}$. Dans cette optique nous avons ajouté de l'ifenprodil (5 μ M) un antagoniste sélectif des NMDARs contenant la sous unité NR2B dans le milieu extracellulaire des neurones hippocampiques primaires avant le début de l'enregistrement. La courbe moyenne obtenue après l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$ en présence d'ifenprodil est significativement inférieure à celle obtenue en absence de traitement pharmacologique ($p = 0,02$) ([Figure 29 B](#)). Nous n'avons observé une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ que dans 6 % ($n = 33$) des neurones prétraités avec de l'ifenprodil contre 48 % ($n = 21$) en absence d'ifenprodil. Il est intéressant de noter que ce pourcentage de réponse obtenu en présence d'ifenprodil est comparable à ceux obtenus précédemment en présence de MK-801 ou de Mémantine. Ceci suggère que les NMDARs impliqués dans la réponse calcique induite par le peptide $A\beta_{1-42}$ contiennent au minimum une sous unité NR2B.

En bref ces résultats obtenus dans des cultures primaires d'hippocampes confirment que la présence de NMDARs fonctionnels est indispensable à l'induction d'une augmentation de la



$[Ca^{2+}]_i$ par le peptide $A\beta_{1-42}$. De plus le fait que la réponse calcique soit inhibée en présence d'ifenprodil suggère que tous les NMDARs impliqués dans cette réponse calcique sont composés d'au minimum une sous-unité NR2B.

2.4. Discussion et perspectives

2.4.1. Interaction du peptide $A\beta_{1-42}$ avec les membranes plasmiques

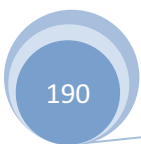
Nous avons dans un premier temps souhaité vérifier si le peptide $A\beta_{1-42}$ synthétique peut interagir avec les membranes biologiques. Nos résultats obtenus en immunocytochimie confirment que le peptide $A\beta$ se lie aux membranes des cellules PC12 différenciées, des neurones hippocampiques primaires et des astrocytes. Au vu des résultats obtenus en immunocytochimie sur les cellules PC12 avec l'anticorps A11 (spécifique des oligomères) (Figure 19) et de l'analyse biochimique des solutions appliquées sur les cultures primaires nous en déduisons que l'essentiel du peptide $A\beta$ lié sur les membranes de nos cellules est sous forme d'oligomères de haut poids moléculaire (≈ 64 kDa). Nous ne pouvons cependant pas exclure que des monomères ou des oligomères de faible poids moléculaire se fixent également sur les membranes des cellules nerveuses. En effet d'une part en analysant en western blot les solutions de peptides appliquées sur les cellules PC12 ou les cultures primaires, nous avons détecté dans certaines conditions une faible quantité de monomères ou d'oligomères $A\beta_{1-42}$ de faibles poids moléculaires (dimères, tétramères) qui pourraient également se lier aux membranes plasmiques (Figure 30). L'absence ou la quantité relativement réduite de monomères détectés dans les solutions grâce à cette méthode pourrait s'expliquer par un défaut de sensibilité lié à l'utilisation d'un anticorps primaire (6E10) qui reconnaît avec plus d'affinité les oligomères de haut poids moléculaire ou à une vitesse de migration différentielle des espèces de hauts et de faibles poids moléculaire au cours de la phase de transfert sur les membranes de nitrocellulose. D'autre part afin d'attester ou d'exclure avec certitude l'adhésion des monomères sur les membranes plasmiques en immunocytochimie nous aurions besoin d'anticorps primaires spécifiquement

dirigés contre ces monomères. Malheureusement de tels anticorps primaires n'existent pas encore à notre connaissance.

Nous avons également remarqué que le peptide A β n'est pas réparti de façon homogène sur la surface des membranes plasmiques des cellules PC12 différenciées et des neurones hippocampiques. Ces résultats rappellent ceux obtenus par Gong et al en 2003 [85]. Ils ont en effet observé que des oligomères A β préparés in vitro ou issus de cerveaux de patients Alzheimer se lient de façon ponctiforme aux membranes de neurones hippocampiques de rat en culture. Cette répartition évoque l'existence de microdomaines membranaires favorisant l'adhésion et/ou l'agrégation du peptide A β . Les oligomères A β pourraient notamment se fixer préférentiellement au niveau des radeaux lipidiques, des microdomaines membranaires enrichis notamment en cholestérol et hautement spécialisés dans l'endocytose ou la réception de signaux extracellulaires. Quelques études ont montré que certains lipides membranaires tels que les phosphatidylcholines, les sphingomyélines [547] ou les gangliosides GM1 sont capables d'interagir avec le peptide A β et donc de lui permettre de s'ancrer sur les membranes [411, 412]. Le cholestérol favoriserait également la liaison du peptide A β sur les membranes, et son action cytotoxique, en permettant la formation de radeaux lipidiques enrichis en gangliosides GM1 [414, 548]. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus par notre équipe en traitant des cellules PC12 avec un chélateur du cholestérol : la méthyl- β -cyclodextrine. La méthyl- β -cyclodextrine a la propriété d'extraire et de piéger le cholestérol contenu dans les membranes plasmiques et donc de déstabiliser les radeaux lipidiques membranaires [549]. En présence de méthyl- β -cyclodextrine l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par les oligomères A β_{1-42} est en effet réduite d'environ 40 % (données non montrées), ce qui pourrait s'expliquer par une diminution du nombre d'oligomères fixés sur la membrane plasmique des cellules. Les synapses constituent également des domaines membranaires très spécialisés au niveau desquels les oligomères A β sont susceptibles de se fixer. Les résultats obtenus par Lacor et al. en 2004, montrent que plus de 90 % des oligomères A β_{1-42} appliqués sur des neurones hippocampiques en culture se fixent au niveau de synapses contenant la protéine post-synaptique PSD-95 [88, 550]. Par ailleurs les oligomères A β interagissent avec de nombreuses protéines membranaires qui pourraient faciliter leur adhésion sur les membranes plasmiques telles que la protéine Prion cellulaire (Prp^C) [551, 552], le récepteur

EphB2 [553], le récepteur p75NTR [554, 555], ou les récepteurs scavenger et RAGE dans les astrocytes. Malheureusement nos résultats ne nous permettent pas de déterminer si les oligomères $A\beta_{1-42}$ liés sur les membranes plasmiques de nos cellules PC12 et de nos neurones hippocampiques se sont fixés au niveau des synapses ou des radeaux lipidiques. Afin de répondre à cette question nous prévoyons de réaliser des expériences complémentaires. Tout d'abord nous allons réaliser des coimmunomarquages avec des anticorps dirigés contre les oligomères $A\beta$ et contre la protéine PSD-95 afin de déterminer si nos oligomères se fixent au niveau des synapses. Ensuite nous envisageons de pré-incuber nos cellules avec de la méthyl- β -cyclodextrine. Dans l'hypothèse où le peptide $A\beta$ se fixerait au niveau de ces radeaux lipidiques nous observerions alors une diminution significative de la liaison du peptide $A\beta$ sur les membranes plasmiques.

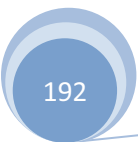
Il nous reste également à déterminer si les oligomères $A\beta$ adhèrent simplement à la surface des cellules ou s'ils s'insèrent dans les membranes plasmiques. Plusieurs éléments soutiennent cette seconde hypothèse. Tout d'abord la séquence peptidique du peptide $A\beta_{1-42}$ et la conformation second-tertiaire des oligomères sont très riches en acides aminés et en feuilletts β hydrophobes [185, 186]. Par ailleurs il a été montré que l'application d'oligomères $A\beta$ sur des bicouches lipidiques synthétiques provoque une augmentation de la conductance de ces bicouches lipidiques proportionnelle à la concentration de peptide appliquée [90, 544]. L'une des hypothèses avancées pour expliquer cette augmentation de conductance des bicouches lipidiques suggère que des oligomères $A\beta$ insérés dans ces bicouches formeraient des pores non sélectifs autorisant le passage de cations monovalents et divalents. D'après des observations en microscopie à force atomique (AFM) en trois dimensions [517, 556] et des tentatives de modélisation [518, 557, 558] les oligomères $A\beta$ auraient en effet l'aspect de canaux dotés d'un pore central et seraient capables de s'insérer dans les bicouches lipidiques. Toutefois ces études ont été menées in vitro sur des bicouches lipidiques synthétiques dont la composition et le métabolisme diffèrent de celles des membranes plasmiques biologiques et les auteurs ont fréquemment recours à la sonication ou au chauffage des solutions afin d'induire ou de favoriser l'insertion des oligomères dans les bicouches lipidiques. Dans ces conditions nous pouvons nous demander si ces observations sont réellement pertinentes d'un point de vue physiopathologique. Les oligomères $A\beta$ seraient-ils réellement capables de s'insérer dans les membranes plasmiques



cellulaires dans des conditions de concentration et de température compatibles avec la biologie cellulaire ? Afin de répondre à cette question nous envisageons dans un premier temps, grâce aux techniques d'électrophysiologie, de vérifier si la conductance des membranes de nos cellules neuronales et gliales est modifiée en présence notamment d'inhibiteurs des canaux et des récepteurs ionotropes calciques, potassiques et sodiques. Si cette augmentation de conductance est avérée nous essaierons ensuite de déterminer si elle peut être inhibée en présence d'anticorps dirigés contre les oligomères A β ou éventuellement d'inhibiteurs des canaux amyloïdes en cours de développement [516, 559, 560]. Enfin nous souhaiterions également observer les membranes de nos cellules en microscopie à force atomique à la recherche de structures similaires à celles observées par Lal et al. dans les bicouches lipidiques synthétiques [517, 556]. Par ailleurs nous projetons en collaboration avec une équipe de chimistes de l'université de Strasbourg d'analyser l'insertion du peptide A β sous forme monomérique ou oligomérique dans les membranes grâce à une nouvelle approche : la résonance paramagnétique électronique (RPE). Le principe de cette méthode est fondé sur l'utilisation d'une sonde (Spin Label) qui sera greffée sur des molécules de peptide A β_{1-42} . Une solution contenant des monomères ou des oligomères ainsi marqués sera ensuite appliquée sur une bicouche lipidique synthétique placée dans un champ magnétique externe (Bz) graduel et perpendiculaire à la bicouche lipidique de telle sorte que les conditions de résonance varient selon que la sonde est positionnée en surface ou dans la bicouche lipidique. Le signal émis par la sonde varie en fonction du champ magnétique Bz et donc en fonction de la position des monomères ou des oligomères dans la membrane.

2.4.2. Le peptide A β_{1-42} induit des variations de la [Ca $^{2+}$]_i dans les cellules PC12, les neurones et les astrocytes

Dans les neurones et les astrocytes les ions Ca $^{2+}$ sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la libération de neurotransmetteurs et de gliotransmetteurs, le maintien de l'excitabilité de la membrane plasmique, l'expression des gènes, la différenciation, la croissance neuronale, la production de radicaux libres oxygénés et enfin l'apoptose. D'où la nécessité pour ces cellules de réguler très finement et de maintenir la



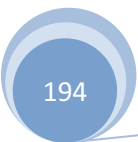
$[Ca^{2+}]_i$ à des concentrations physiologiques. Cependant de très nombreuses études ainsi que les résultats que nous avons obtenus montrent que le peptide $A\beta_{1-42}$ induit des variations de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les neurones et les cellules gliales [511, 561].

2.4.2.1. Cellules PC12 et neurones

2.4.2.1.1. Une réponse calcique induite par les oligomères $A\beta$

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'application dans le milieu extracellulaire des cellules PC12 différenciées et des neurones primaires d'une solution contenant une concentration importante de peptide $A\beta_{1-42}$ (1 μ M) provoque dans les minutes qui suivent une augmentation rapide de la $[Ca^{2+}]_i$ suivie d'un retour progressif à la $[Ca^{2+}]_i$ basale (Figures 22, 23 et 24). Comme nous l'attendions, étant donné que nos cellules PC12 traitées avec du NGF se différencient et expriment un phénotype neuronal, cette réponse calcique induite par $A\beta_{1-42}$ est comparable dans les cellules PC12 différenciées et les neurones. Toutefois nous avons constaté que l'amplitude de cette réponse calcique est plus faible dans les neurones (Figures 24). Ceci pourrait éventuellement s'expliquer par une légère différence dans les protocoles expérimentaux utilisés pour les deux types cellulaires : les neurones hippocampiques sont traités avec 4 μ M de Fura-2 contre 2 μ M pour les cellules PC12. Nous pensons cependant que cette différence peut être liée à une régulation différente de l'activité des NMDARs dans ces deux types cellulaires. Les cellules PC12 et les cultures primaires d'hippocampes sont issues d'espèces (rat et souris) et de tissus (glandes surrénales et tissu nerveux) différents, il est donc vraisemblable que la composition des membranes plasmiques ou le métabolome intracellulaire diffèrent dans ces deux types cellulaires et que cela freine l'entrée de Ca^{2+} ou favorise la recapture ou l'extrusion du Ca^{2+} entrant dans les neurones.

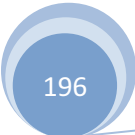
D'autre part il apparaît que toutes les formes du peptide $A\beta$ ne sont pas capables d'induire une réponse calcique dans les cellules PC12 et les neurones. Nous avons en effet constaté que contrairement aux oligomères $A\beta_{1-42}$ qui induisent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans environ 75 % des cellules PC12, les monomères $A\beta_{1-42}$ n'induisent pas ou très peu de



réponse calcique dans ces cellules. La différence entre les pourcentages de réponse cellulaire obtenue après application d'une solution enrichie en oligomères ou en monomères sur des neurones hippocampiques primaires est moins évidente mais ceci est certainement lié à la présence d'oligomères A β nouvellement formés dans la solution de monomères A β . Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec des neuroblastes SH-5YSY par Demuro et collaborateurs en 2005 [91] et corroborent l'hypothèse généralement répandue selon laquelle les oligomères seraient la forme la plus neurotoxique du peptide A β , responsable du développement de la maladie d'Alzheimer.

2.4.2.1.2. Les récepteurs NMDA : des acteurs essentiels de la réponse calcique induite par les oligomères A β

Le rôle essentiel des récepteurs NMDA dans les processus d'apprentissage et de mémorisation et dans les phénomènes d'excitotoxicité a rapidement conduit la communauté scientifique à s'interroger sur l'implication éventuelle de ces récepteurs dans la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer. Au cours des dernières années de nombreux liens entre les NMDARs et les effets délétères du peptide A β ont ainsi été établis. Les traitements pharmacologiques avec des antagonistes des NMDARs inhibent en effet le déficit de potentialisation à long terme [92, 562], la production de ROS [92], et la disparition des épines dendritiques [563, 564] induites in vitro par le peptide A β et diminuent les symptômes cognitifs et la charge amyloïde (plaques amyloïdes) chez les animaux transgéniques [562]. Dans cette étude nous avons montré que les antagonistes des NMDARs bloquent également la réponse calcique induite par l'A β_{1-42} dans les cellules neuronales. Tout ceci démontre que l'activation des NMDARs localisés dans la membrane plasmique des neurones est une condition préalable à la plupart des dysfonctionnements cellulaires induits par les oligomères A β_{1-42} . Cependant la réponse calcique induite par les oligomères A β est différente de celle induite par le NMDA (Figures 19 à 26). En présence de NMDA nous avons en effet observé une augmentation progressive de la $[Ca^{2+}]_i$ tandis qu'en présence d' A β_{1-42} la $[Ca^{2+}]_i$ augmente très rapidement, chute jusqu'à atteindre un plateau puis diminue lentement jusqu'à atteindre, notamment dans les cellules PC12, une valeur proche de la $[Ca^{2+}]_i$ basale tout ceci alors que les oligomères A β_{1-42} sont toujours présents dans le milieu

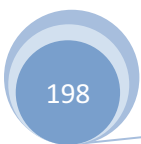


extracellulaire. Il semble donc qu'en réponse à l'application de peptide $A\beta_{1-42}$ les NMDARs soit dans un premier temps activés puis que ceux-ci se désensibilisent. Cette apparente désensibilisation des NMDARs en présence d' $A\beta_{1-42}$ pourrait s'expliquer de plusieurs façons : (1) par une auto-désensibilisation des récepteurs liée à leur activité (2) par des modifications post-traductionnelles des NMDARs, (3) par internalisation des NMDARs, ou (4) par des altérations de l'environnement lipidique des NMDARs.

En effet l'influx de calcium au travers du canal des NMDAR entraîne leur propre inactivation. Cette désensibilisation lente induite par les ions Ca^{2+} est partielle et dépend de la concentration de calcium entrant et de la $[Ca^{2+}]_i$ [565].

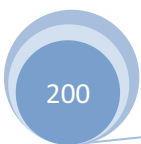
Par ailleurs la probabilité d'ouverture des NMDARs est potentialisée en cas de phosphorylation des sous unités NR1 et NR2 par des Tyrosines-kinases telles que Src et Fyn [566-568] ou par des Sérine/Thréonine-kinases telles que la PKC [569] et la protéine kinase calcium/calmodulin-dépendante II (CaMKII) [570]. A contrario des phosphatases telles que les phosphatases 1 et 2A [571], la calcineurine [572], et la STEP (striatal enriched tyrosine phosphatase) [573] déphosphorylent les NMDARs et réduisent ainsi leur activité (revue [574]). De plus d'autres récepteurs possédant une activité tyrosine-kinase tel que le récepteur EphB2 par exemple peuvent également moduler l'activité des NMDARs [575-577]. L'activité de ces kinases, de ces phosphatases et de ces récepteurs tyrosine-kinase peut être modifiée en présence de peptide $A\beta$. Il a notamment été montré que l'activité de la PKC est inhibée par l' $A\beta$ [578, 579]. Les oligomères $A\beta$ sont capables de se lier aux récepteurs EphB2 et d'induire leur dégradation provoquant ainsi un déficit de potentialisation à long terme lié à un défaut d'activation des NMDARs [553]. A l'inverse l'activité de la STEP qui déphosphoryle les sous unités NR2B est augmentée dans les neurones en culture traités avec l' $A\beta_{1-42}$ ou issus de souris transgéniques APP_{swe} [573, 580]. En favorisant la déphosphorylation des NMDARs le peptide $A\beta$ réduirait donc leur probabilité d'ouverture et l'influx d'ions Ca^{2+} .

A plus long terme ces altérations de l'activité des kinases et des phosphatases induites par le peptide influeraient également sur le niveau d'expression des NMDARs dans la membrane



plasmique. La déphosphorylation des récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B par la STEP favorise en effet leur internalisation par endocytose clathrine-dépendante entraînant une diminution du niveau d'expression des sous unités NR1 et NR2B à la surface des neurones corticaux en culture traités avec l' $A\beta_{1-42}$ ou provenant de souris transgéniques exprimant le gène APP humain muté [573, 580].

Une grande partie des NMDARs (50 à 60 %) exprimés à la surface des cellules est localisée dans des microdomaines membranaires riches en cholestérol appelés radeaux lipidiques [581]. De nombreuses protéines sont localisées et interagissent au niveau des radeaux lipidiques. Parmi celles-ci on retrouve des protéines qui permettent l'ancrage des NMDARs au niveau de ces radeaux (PSD-95, ...) et qui modulent son activité (kinases de la famille Src, ...) [582]. La quantité de cholestérol contenue dans les membranes plasmiques des cellules peut être réduite en traitant les cellules avec de la méthyl- β -cyclodextrine ou des statines. Dans les neurones de tels traitements réduisent le pourcentage de mort neuronale induite par l'addition de NMDA dans le milieu extracellulaire [583, 584] ce qui indique que l'activité des récepteurs NMDA dépend de leur localisation dans ces radeaux lipidiques. De plus notre équipe a mis en évidence qu'un prétraitement des cellules PC12 avec de la méthyl- β -cyclodextrine réduit de 40 % l'amplitude de la réponse calcique induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$ (données non montrées). Au vu de nos résultats et de ces observations tirées de la littérature nous en déduisons que la méthyl- β -cyclodextrine inhibe l'entrée de Ca^{2+} via les NMDARs induite par l' $A\beta_{1-42}$ en déstabilisant les radeaux lipidiques dans lesquels sont localisés ces récepteurs. Dans ces conditions il est possible d'imaginer que toute altération de la structure et/ou du fonctionnement des radeaux lipidiques induite par l' $A\beta_{1-42}$ entraînerait une désactivation des NMDARs. Hors les peptides $A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{1-40}$ augmentent l'activité de la sphingomyélinase et diminuent l'activité de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase) entraînant une diminution des niveaux membranaires de sphingomyéline et de cholestérol, deux constituants majeurs des radeaux lipidiques [585-587]. De plus l'activation des NMDARs par l' $A\beta_{1-42}$ entraîne la production de ROS [92] qui peuvent stimuler l'activité de la sphingomyélinase [588-590] et modifier la fluidité de la membrane plasmique en oxydant les phospholipides et les protéines membranaires [591, 592].



2.4.2.1.3. Les sous unités NR2B

L'existence de différents variant d'épissage pour les sous unités NR1 et NR2 introduit une grande hétérogénéité au sein de la famille des récepteurs sensibles au NMDA. Le type de sous unité NR2 composant les différents sous types de NMDARs détermine leur sensibilité à différents agents pharmacologiques, leur probabilité d'ouverture, et leur interaction avec des molécules de signalisation intracellulaires [593, 594].

Ces différents sous types de NMDARs peuvent être exprimés à la surface des cellules PC12 différenciées et des neurones. Une activation sélective de ces différents sous types par le NMDA et les oligomères $A\beta_{1-42}$ pourrait également expliquer pourquoi les réponses calciques induites par le NMDA et les oligomères $A\beta_{1-42}$ sont différentes. En accord avec cette hypothèse nous avons observé que l'ifenprodil bloque complètement la réponse induite par le peptide $A\beta$ tandis que la réponse calcique induite par le NMDA n'est que faiblement inhibée par cet antagoniste sélectif des NMDARs contenant la sous unité NR2B (Figures 27 et 29). Il semble donc que le NMDA active différents sous types de NMDARs alors que seuls les NMDARs contenant la sous unité NR2B sont activés en présence d'oligomères $A\beta_{1-42}$. Ceci concorde avec le fait que l'inhibition exercée par les oligomères $A\beta$ sur la PLT est bloquée lorsque les tranches d'hippocampes ont été traitées avec de l'ifenprodil ou du Ro 25-6981 (antagoniste sélectif des NMDARs contenant la sous unité NR2B) [595, 596] ou proviennent de souris transgéniques pour lesquelles l'expression neuronale du gène codant pour la sous unité NR2 est invalidée [596, 597].

Les patrons d'expression des différentes sous unités NR2 dans le cerveau du rat évoluent au cours du développement. Il est toutefois intéressant de noter qu'à l'âge adulte les sous unités NR2B sont fortement exprimées dans l'hippocampe et le cortex [598], deux structures cérébrales fortement affectées au cours de la maladie d'Alzheimer. A contrario les récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B sont faiblement exprimés dans des structures cérébrales relativement préservées par la maladie telles que le cervelet par exemple [598].



Il a également été proposé qu'au niveau subcellulaire les NMDARs-NR2B seraient préférentiellement localisés et actifs au niveau des sites extrasynaptiques et les NMDARs-NR2A au niveau synaptique [599-602]. Parallèlement à cela il semble que contrairement aux NMDARs synaptiques dont l'activation aurait un effet neuroprotecteur, les NMDARs extrasynaptiques soient associés à des voies de signalisation pro-apoptotique [602, 603]. En activant spécifiquement les NMDARs-NR2B extrasynaptiques les oligomères $A\beta_{1-42}$ favoriseraient donc l'apoptose des cellules [604-607]. Cette ségrégation des NMDARs contenant les sous unités NR2A ou NR2B entre les sites synaptiques et extrasynaptiques n'est toutefois pas absolue. Les NMDARs sont extrêmement mobiles dans la membrane plasmique [608-610]. Des NMDARs-NR2B ont ainsi été retrouvés dans les sites synaptiques [611, 612] et des NMDARs-NR2A dans les sites extrasynaptiques [613].

De nos jours les patients atteints d'une forme modérée ou sévère de maladie d'Alzheimer sont traités avec de la Mémantine, un antagoniste non sélectif de tous les sous types de NMDARs. Elle bloque donc aussi bien les NMDARs impliqués dans les processus de potentialisation à long terme et de plasticité synaptique que ceux impliqués dans l'excitotoxicité induite par le peptide $A\beta$. Ce défaut de spécificité de la Mémantine est sans doute la source des nombreux effets secondaires liés au traitement. Au vu de nos résultats nous pouvons envisager que l'administration d'agents pharmacologiques qui bloqueraient spécifiquement les NMDARs contenant la sous unité NR2B [614, 615] ou qui limiteraient l'interaction de ces récepteurs avec les oligomères $A\beta_{1-42}$ pourrait ralentir l'évolution de la maladie tout en réduisant le risque d'effets secondaires indésirables.

2.4.2.1.4. Autres sources de calcium

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que la présence d'antagonistes des NMDARs dans le milieu extracellulaire inhibe complètement la réponse calcique induite par l' $A\beta_{1-42}$. Ceci indique que l'activation des ces récepteurs par l' $A\beta$ est une étape obligatoire pour l'induction de cette réponse. Cependant l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire par les canaux



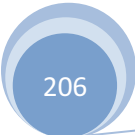
NMDA n'explique peut être pas à elle seule l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par le peptide. Nous ne pouvons en effet pas exclure que l'entrée de Ca^{2+} consécutive à l'ouverture des NMDARs entraîne la libération d'ions Ca^{2+} contenus dans les réservoirs intracellulaires. Ce phénomène appelé libération de calcium induite par le calcium (CICR) fait intervenir des récepteurs ryanodine sensibles au Ca^{2+} et localisés dans les membranes du réticulum endoplasmique [616, 617], des mitochondries [618-620] et de l'enveloppe nucléaire [621, 622]. En accord avec cette hypothèse il a été montré que la quantité de Ca^{2+} libérée par les récepteurs ryanodine après activation des NMDARs est plus importante dans les neurones de souris triplement transgéniques (3xTg-AD) que dans les neurones des souris sauvages [623] (cf. § 3.4.2).

Par ailleurs les NMDARs ne sont pas uniquement perméables aux ions Ca^{2+} ; ils permettent également l'entrée d'ions Na^+ et la sortie d'ions K^+ . Le passage de ces ions Na^+ et K^+ à travers le canal des NMDARs pourrait entraîner une dépolarisation de la membrane plasmique suffisante pour provoquer l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (VGCC) et l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire.

Afin de vérifier ces hypothèses nous suggérons de vérifier si la réponse calcique induite par le peptide est modifiée en présence de thapsigargine un inhibiteur de la pompe SERCA (Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) provoquant une déplétion des réservoirs intracellulaires de calcium ou en présence d'inhibiteurs spécifiques des récepteurs ryanodine (dantrolène) ou des canaux calciques voltage-dépendants (ω -agatoxine, ω -conotoxine, nifédipine ...).

2.4.2.1.5. Hypothèses supplémentaires

Pour conclure, nous nous sommes efforcés de démontrer dans cette première partie que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$ dans les cellules PC12 et les neurones est liée à l'ouverture des canaux des récepteurs NMDA. Toutefois plusieurs points d'interrogation restent à éclaircir.



Premièrement l'ouverture des NMDARs est conditionnée par la fixation d'un ligand, le glutamate ou le NMDA, sur le site de liaison de la sous unité NR2. Au cours de nos expériences nous n'avons rajouté ni glutamate ni NMDA dans le milieu extracellulaire de nos cellules PC12 et de nos cultures primaires, nous nous demandons par conséquent par quel(s) ligand(s) sont activés les récepteurs NMDA dans nos conditions expérimentales ? Dans le cas des cultures primaires d'hippocampe nous pouvons supposer que du glutamate est libéré dans le milieu extracellulaire par les neurones, les astrocytes ou les cellules microgliales en réponse à un stress ou à l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$. Cette libération de glutamate pourrait notamment survenir suite à une entrée très localisée de Ca^{2+} extracellulaire liée à l'activation de canaux calcique voltage-dépendant de type P/Q, N et L par le peptide $A\beta$ [624-626]). De même il a été suggéré que les cellules PC12 pourraient libérer du glutamate par exocytose dépendante du calcium [627] mais il reste à confirmer que les cellules PC12 différenciées que nous utilisons soient réellement capables de libérer du glutamate et/ou d'exprimer des canaux calciques à leur surface. Nous pouvons également envisager l'éventualité que le peptide $A\beta$ provoque lui-même l'ouverture des NMDARs en se liant sur l'une de leurs sous-unités. Il est toutefois peu probable que l' $A\beta$ se substitue au glutamate en se fixant sur le même site de liaison, car dans ce cas nous aurions probablement obtenu une réponse calcique fortement inhibée par le D-APV et seulement faiblement inhibée par l'ifenprodil comparable à celle que nous avons obtenue en injectant du NMDA dans le milieu extracellulaire. En revanche d'après nos résultats et des expériences de co-immunoprécipitation [628] $A\beta$ interagirait et se lierait spécifiquement sur la sous unité NR2B, nous ne pouvons cependant pas affirmer si cette interaction peut entraîner un changement de conformation suffisant pour provoquer l'ouverture des canaux NMDA.

Par ailleurs dans les conditions physiologiques les canaux des récepteurs NMDA localisés dans des membranes plasmiques au potentiel de repos sont obstrués par un ion magnésium (Mg^{2+}) qui empêche tout passage d'ions K^+ , Na^+ , ou Ca^{2+} . Ce blocage Mg^{2+} n'est levé que lorsque les cellules sont dépolarisées. Nous aurions pu contourner ce problème en effectuant nos enregistrements d'imagerie calcique dans un milieu extracellulaire dépourvu de Mg^{2+} . Cependant bien que nous n'ayons pas pris cette précaution nous avons tout de même enregistré une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l' $A\beta_{1-42}$ et dépendante de l'activation des NMDARs ce qui suggère que l'injection d' $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire

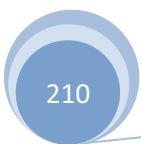


entraîne une dépolarisation des cellules ou une modification de la conformation des NMDARs suffisante pour libérer l'ion Mg^{2+} obstruant le canal. Plusieurs études ont proposé que les oligomères $A\beta$ formeraient en s'insérant dans les membranes plasmiques des canaux amyloïdes (cf. § 1.8.2, [90, 398, 516-518]) perméables aux ions K^+ et Na^+ et Ca^{2+} et qui pourraient donc induire une dépolarisation des cellules. De plus la présence de peptide $A\beta$ dans le milieu extracellulaire entraînerait également une hyperactivation des récepteurs glutamatergiques AMPA (Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) [629, 630]. Il est également possible que la liaison des oligomères sur les sous unité NR2B entraîne un changement de conformation du pore des récepteurs suffisant pour provoquer la libération du Mg^{2+} . Enfin la phosphorylation des récepteurs NMDA par des protéines intracellulaires telles que la PKC peut également réduire l'inhibition des canaux NMDA par le Mg^{2+} [631]. Par extension les récepteurs possédant une fonction tyrosine-kinase tel que le récepteur EphB2 dont l'expression et l'activité sont modulées par l' $A\beta$ [553] ou dont la stimulation entraînerait l'activation de protéines kinases intracellulaires ciblant les NMDARs pourraient également favoriser l'activation et l'ouverture du canal des NMDARs.

2.4.2.2. Astrocytes

2.4.2.2.1. $A\beta_{1-42}$ induit des variations de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les astrocytes

D'après les résultats que nous avons obtenus le peptide $A\beta_{1-42}$ influe également sur la $[Ca^{2+}]_i$ des astrocytes. L' $A\beta_{1-42}$ est capable d'induire des oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ dans des astrocytes « au repos » et d'augmenter la fréquence et l'amplitude des oscillations existantes dans les astrocytes « actifs ». Nous avons également constaté que les oscillations calciques des astrocytes contenus dans une même boîte de culture sont relativement synchrones ce qui suggère l'existence d'une communication entre ces différents astrocytes et que ces variations de la $[Ca^{2+}]_i$ se transmettent d'un astrocyte à l'autre. Tous ces résultats concordent avec les données publiées dans la littérature par d'autres équipes. Haughey et Mattson ont en effet montré en 2003 que la présence d' $A\beta_{1-42}$ dans le milieu augmente

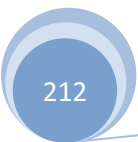


l'amplitude, la rapidité et la distance de propagation des vagues calciques induites par stimulation mécanique des astrocytes. De plus cet effet du peptide sur l'amplitude et la rapidité des vagues calciques est aboli en présence de suramine, un inhibiteur des récepteurs purinergiques (P2R) de l'ATP [632]. Par ailleurs Chow et al. ont montré que l'Aβ₁₋₄₂ induit la formation de vagues calciques dans les cultures pures d'astrocytes avec un délai de latence d'environ dix minutes [514]. L'Aβ induit également la formation de vagues calciques astrocytaires in vivo. Dans le cerveau de souris transgéniques (APP^{swe}:PS1ΔE9) des vagues calciques se forment en effet dans des astrocytes localisés à proximité des plaques amyloïdes et se propagent radialement à d'autres astrocytes [633].

2.4.2.2.2. Origine et transmission des oscillations calciques dans les astrocytes

Des oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ se forment dans les astrocytes en réponse à une stimulation électrique, mécanique ou pharmacologique. Ces stimulations entraînent successivement l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) tels que les récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR) ou les récepteurs purinergiques de l'ATP (P2R), l'activation de la phospholipase C (PLC), la production d'inositol triphosphate (IP3), l'ouverture des récepteurs sensibles à l'IP3 localisés dans la membrane du réticulum endoplasmique et enfin la libération dans le cytosol des ions Ca^{2+} initialement stockés dans ces réservoirs intracellulaires [634-637]. Le retour à une $[Ca^{2+}]_i$ basale s'effectue grâce à la ré-internalisation du Ca^{2+} dans les mitochondries et le RE et à l'intervention des protéines liant le Ca^{2+} [638, 639]. Cependant les ions Ca^{2+} libérés activent d'autres récepteurs IP3 [640-642] et stimulent à nouveau la PLC et la production d'IP3 [643, 644] provoquant une nouvelle augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. (Revue [545])

Ces oscillations calciques intracellulaires peuvent être transmises à des astrocytes voisins ou relativement distants sous forme de vagues calciques intercellulaires suivant deux voies distinctes et synergiques. La première voie de transmission de ces vagues calciques intercellulaires identifiée dans les astrocytes est le transfert de Ca^{2+} directement du cytosol d'un astrocyte vers celui d'un autre à travers les jonctions communicantes gap. Les jonctions



gap sont des canaux intercellulaires constitués par la jonction de deux héli-canaux de connexine. Leur rôle dans la transmission des vagues calciques a été mis en évidence par des expériences de superfusion rapide et par l'utilisation de bloqueurs des jonctions gap [645, 646]. Par la suite une seconde voie de transmission des vagues calciques intercellulaires a été identifiée. Cette voie extracellulaire est bloquée par la suramine et implique la libération d'ATP par les astrocytes stimulés et l'activation des récepteurs purinergiques métabotropes P2Y₁R et P2Y₂R [647, 648]. (Revue [545])

2.4.2.2.3. Oscillations calciques et A β ₁₋₄₂ : hypothèses

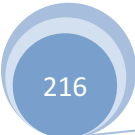
Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'injection de peptide A β ₁₋₄₂ dans le milieu extracellulaire des cultures primaires d'hippocampes de souris peut entraîner la formation d'oscillations calciques intracellulaires dans les astrocytes et augmente l'amplitude et la fréquence des oscillations calciques dans les astrocytes préalablement activés. De plus nous avons vu au paragraphe précédent que la formation des oscillations calciques est liée à l'activation des récepteurs mGluR ou des récepteurs purinergiques. Nous en avons déduit que le peptide A β ₁₋₄₂ provoque de façon directe ou non l'activation des mGluR ou des P2R des astrocytes. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que la suramine bloque l'augmentation de l'amplitude et de la vitesse de propagation des vagues calciques induites par l'A β ₁₋₄₂ [632]. De plus l'A β provoque la redistribution et un regroupement des mGluR dans les neurones [649] et à plus long terme une augmentation de l'expression des mGluR dans les astrocytes [650].

Le peptide A β est connu pour stimuler la libération de glutamate par les neurones et la microglie [651-653] et pour inhiber le recyclage de ce neurotransmetteur par les astrocytes [447, 450, 654]. Nous avons réalisé nos expériences sur des cultures primaires d'hippocampes composées notamment de neurones et d'astrocytes, nous pouvons par conséquent émettre l'hypothèse que l'A β ₁₋₄₂ active indirectement les mGluR des astrocytes en augmentant la concentration extracellulaire de glutamate. L'activation des mGluR provoquerait des oscillations calciques intracellulaires et une libération importante d'ATP par les astrocytes stimulés qui activeraient ainsi d'autres astrocytes. En accord avec cette



hypothèse nous avons observé au cours d'expériences préliminaires en présence de tétrodotoxine (TTX) ou de methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG, antagoniste spécifique des mGluR) une réduction du pourcentage de cellules présentant des oscillations calciques en réponse à l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire (données non présentées). Cette hypothèse est par ailleurs étayée par une étude publiée par Pastis et al. montrant que la stimulation électrique des neurones entraîne la formation d'oscillations calciques intracellulaires dans les astrocytes avoisinants. Cette réponse des astrocytes à la stimulation des neurones est abolie en présence de TTX ou MCPG [655]. De plus la fréquence des oscillations calciques astrocytaires dépend de la concentration extracellulaire de glutamate ou d'acide 1-Aminocyclopentane-*trans*-1,3-dicarboxylique (t-ACPD, agoniste des mGluR) [655, 656]. Il serait intéressant afin de confirmer cette hypothèse de mesurer la quantité de glutamate libéré dans nos cultures primaires en réponse à l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire.

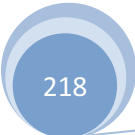
L'hypothèse selon laquelle l' $A\beta$ provoque des oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ des astrocytes en stimulant la libération de glutamate par les neurones est néanmoins remise en question par des études montrant que l' $A\beta$ est capable d'induire une réponse calcique intracellulaire et des vagues calciques spontanées dans des cultures pures d'astrocytes [514]. La possibilité d'une libération vésiculaire de glutamate et d'ATP dépendante du Ca^{2+} a été mise en évidence dans les astrocytes [657-659], nous ignorons cependant si l' $A\beta$ peut induire dans les astrocytes une réponse calcique suffisante pour provoquer une libération de glutamate et d'ATP et par conséquent l'activation des mGluR et des P2R. Néanmoins l'augmentation de l'amplitude et de la vitesse de propagation des vagues par le peptide $A\beta_{1-42}$ est réduite en présence de suramine ce qui suggère que le peptide $A\beta$ provoque bel et bien une libération accrue d'ATP par les astrocytes. Par ailleurs nous ignorons quels récepteurs ou canaux calciques sont impliqués dans l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ initiale induite par l' $A\beta_{1-42}$ dans les astrocytes. En plus des récepteurs mGluR et P2R les astrocytes expriment une grande variété de canaux ioniques et de récepteurs membranaires tels que les récepteurs NMDA [660] et des canaux calciques dépendant du voltage de type L, N et R [661] dont l'activité est modulée par le peptide $A\beta$. Afin de mieux cerner les voies de signalisations impliquées dans ce cas de figure nous suggérons dans un premier temps de vérifier si les inhibiteurs des



récepteurs mGluR, P2R et NMDA et des canaux calciques dépendants du voltage empêchent la formation des oscillations calciques intracellulaires dans les astrocytes puis de mesurer la concentration extracellulaire de glutamate et d'ATP avant et après injection de peptide $A\beta_{1-42}$.

2.4.2.2.4. Conséquences de l'activation des astrocytes sur les neurones

Il existe une relation très étroite entre les astrocytes et les neurones. Nous avons vu précédemment qu'une stimulation électrique de activité des neurones entraîne l'activation des astrocytes voisins via la formation d'oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ [655]. Réciproquement l'activation des astrocytes pourrait avoir des conséquences sur l'activité et la survie neuronale. Les oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ entraînent en effet la libération par exocytose de gliotransmetteurs et en particulier de glutamate [657-659]. Le glutamate libéré par les astrocytes a ensuite la possibilité de se lier aux récepteurs AMPA (Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) ou NMDA neuronaux provoquant ainsi la dépolarisation des neurones et une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ [655, 662].



3. Partie 2 : Effet des faibles concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$ sur son adhésion sur la membrane plasmique et sur la réponse calcique induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$.

Les plaques amyloïdes sont essentiellement composées de peptide $A\beta$ sous forme fibrillaire. Néanmoins des études fondées sur l'utilisation d'anticorps en tant qu'agent thérapeutique ont montré que les fibrilles $A\beta$ peuvent se dissocier pour former des oligomères $A\beta$ solubles. Les plaques amyloïdes pourraient donc constituer une source de peptide $A\beta$ à partir desquelles des oligomères diffuseraient dans le tissu nerveux en formant un gradient de concentration. La plupart des études portant sur les effets toxiques du peptide $A\beta$ utilisent de fortes concentrations d' $A\beta$ (1 à 10 μM) correspondant à ce que l'on pourrait éventuellement retrouver à proximité des plaques amyloïdes. Mais qu'en est-il des faibles concentrations de peptide situées à l'autre extrémité de ce gradient de concentration ? Ces faibles concentrations d' $A\beta$ ont-elles aussi un effet toxique sur les cellules nerveuses ?

3.1. Analyse biochimique des solutions appliquées sur les cellules

Afin de modéliser la formation d'un tel gradient de concentration in vitro nous avons dans un premier temps exposé de façon prolongée (≈ 20 heures) des cellules PC12 différenciées et des cultures primaires de cellules nerveuses à de faibles concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$ ou $A\beta_{42-1}$. Pour ces traitements que nous avons appelés « chroniques » (« Ch $A\beta$ ») nous avons utilisé du peptide $A\beta_{1-42}$ ou $A\beta_{42-1}$ monomérisé puis conservés sous forme de film HFIP que nous avons dissout dans du DMSO ($[A\beta]_{\text{DMSO}} = 1 \text{ mM}$) puis immédiatement dilué dans le milieu de culture à 37°C ($[A\beta]_{\text{Ch}} = 5 \text{ nM}, 10 \text{ ou } 50 \text{ nM}$). A l'issue de ce « traitement chronique » nous avons fait subir à nos cellules un « traitement aigu » (« Ag $A\beta$ ») en injectant une concentration plus élevée de peptide $A\beta_{1-42}$ ou $A\beta_{42-1}$ ($[A\beta]_{\text{Ag}} = 200 \text{ nM ou } 1 \mu\text{M}$). Pour le traitement aigu nous avons préalablement préparé une solution enrichie en

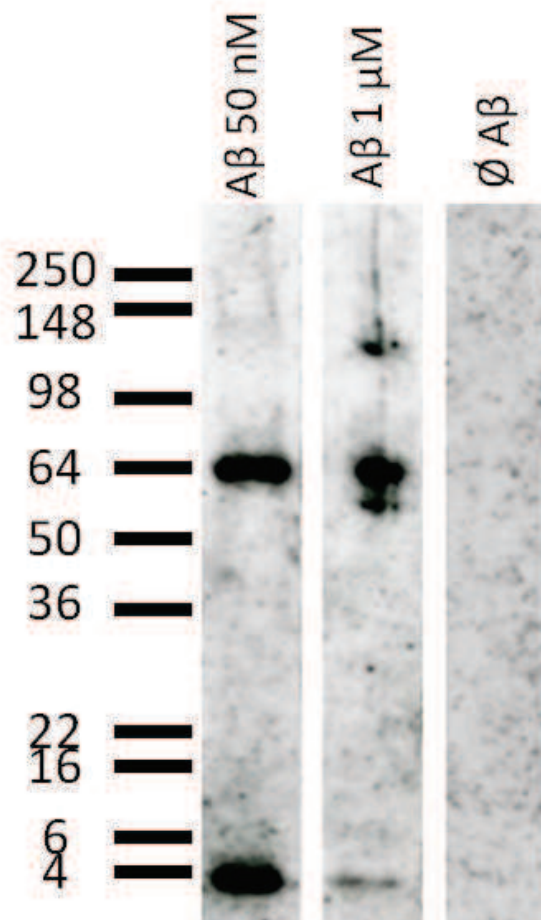


Figure 30 Analyse biochimique des solutions chronique et aigue. La révélation du Western blot avec l'anticorps 6E10 fait apparaître deux bandes migrant à environ 4 et 64 kDa correspondant respectivement au poids moléculaire des monomères et des dodécamères $A\beta_{1-42}$. Piste (1) solution chronique de peptide $A\beta_{1-42}$ préalablement monomérisée diluée dans du milieu RPMI à 37°C. Piste (2) solution aigue de peptide $A\beta_{1-42}$ oligomérisé dilué dans du PBS (1 μ M) à température ambiante. Piste (3) solution contrôle contenant du solvant (DMSO) dilué dans du PBS.

oligomères A β en diluant du peptide A β_{1-42} ou A β_{42-1} à une concentration de 100 μ M dans une solution tampon d'HEPES conservée à 4°C pendant 24 heures. Cette solution a ensuite été diluée dans du PBS ou dans une solution tampon HEPES à température ambiante pour le traitement aigu.

Au cours de la préparation des solutions utilisées pour ces traitements chroniques et aigus de nombreux paramètres tels que la concentration de peptide A β ou la température peuvent influencer sur la cinétique d'agrégation du peptide A β [399]. Nous avons par conséquent procédé à une analyse biochimique par Western blot de ces solutions telles qu'elles sont appliquées sur les cellules afin de définir plus précisément sous quelle(s) forme(s) se présente(nt) le peptide A β dans ces deux types de solutions. Pour cette analyse nous avons donc préparé comme décrit précédemment une solution de peptide A β_{1-42} monomérisé dilué dans du milieu de culture RPMI à 37°C à une concentration de 50 μ M, une solution de peptide A β_{1-42} oligomérisé diluée dans une solution tampon PBS à température ambiante à une concentration de 1 μ M, et une solution contrôle ne contenant que du DMSO dilué dans du tampon PBS à une concentration équivalente à celle retrouvée dans la solution de peptide A β_{1-42} à 1 μ M (Figure 30). Pour les besoins de cette analyse toutes les solutions ont été subséquemment rediluées de telle sorte que la quantité de peptide A β_{1-42} déposée dans chaque puits soit de 10 μ g.

En utilisant l'anticorps 6E10 pour révéler la présence des différentes formes du peptide A β , nous avons ainsi détecté dans la piste correspondant à la solution de peptide A β_{1-42} appliquée sur les cellules au début du traitement chronique (A β 50 μ M) deux bandes d'épaisseur équivalente migrant à environ 4 et 64 kDa. L'apparition de ces deux bandes révèle respectivement la présence dans cette solution de monomères ou de dimères et d'oligomères de haut poids moléculaires (dodécamères). Dans la piste correspondant à la solution appliquée sur les cellules au cours d'un traitement aigu (A β 1 μ M) nous détectons également ces deux bandes, toutefois l'épaisseur de la bande migrant à 4 kDa est nettement plus faible voire même inexistante comparativement à celle détectée dans la piste précédente. En revanche l'épaisseur de la bande située à 64 kDa paraît plus importante dans cette piste. Ceci indique que la quantité de monomères/dimères contenue dans la solution

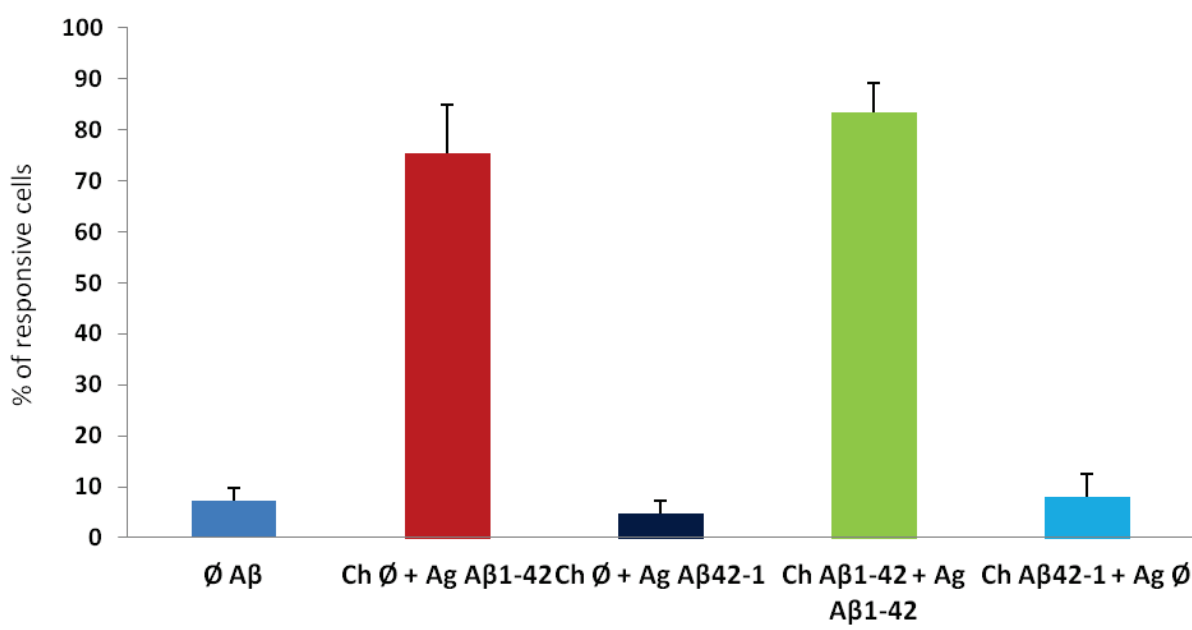
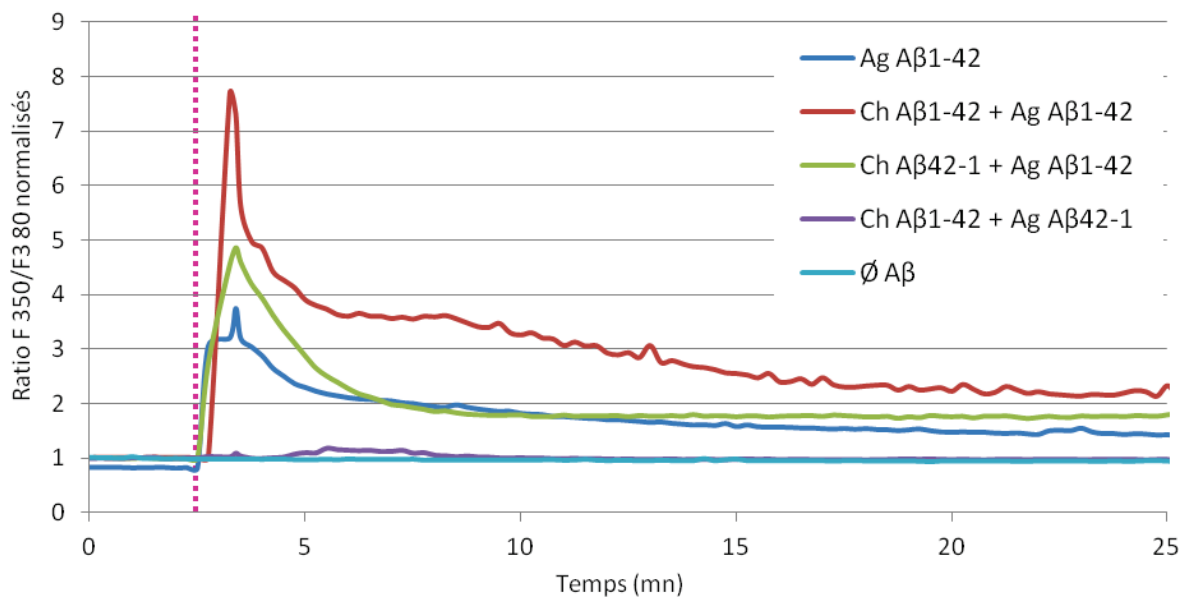


Figure 31 L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des cellules PC12 induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$ augmente lorsque les cultures sont pré-incubées en présence d'une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$. Avant le début de l'enregistrement les cultures de cellules PC12 différenciées ont incubé à 37 °C pendant 20 h environ dans du milieu de culture contenant du solvant ou une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ (Ch $A\beta_{1-42}$, 10 nM). Les oligomères $A\beta_{1-42}$ (1 μ M) sont ajoutés dans le milieu extracellulaire 2,5 minutes après le début de l'enregistrement (droite pointillée). A) traces moyennes représentant la fluorescence moyenne émise par l'ensemble des cellules enregistrées. B) Pourcentage de cellules montrant une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ après l'injection de peptide ou de solvant.

appliquée sur les cellules au cours du traitement aigu diminue tandis que celles des oligomères de hauts poids moléculaire augmente.

3.2. Cellules PC12

3.2.1. Imagerie calcique

Afin d'évaluer l'effet éventuel d'une pré-exposition des cellules à de faibles concentrations de peptide A β sur la réponse calcique induite par l'injection ultérieure d'une forte concentration d'A β dans le milieu extracellulaire, nous avons dans un premier temps maintenu des cultures de cellules PC12 pendant 20 heures à 37°C dans du milieu de culture contenant une faible concentration de peptide A β_{1-42} (« Ch A β_{1-42} ») ou de peptide inverse A β_{42-1} (« Ch A β_{42-1} ») ($[A\beta_{1-42/42-1}]_{Ch} = 10 \text{ nM}$) ou uniquement le solvant classiquement utilisé pour dissoudre les peptides A β , le DMSO. Les cellules ont été lavées puis préparées en vue d'un enregistrement en imagerie calcique. Enfin au cours de l'enregistrement nous avons injecté dans le milieu extracellulaire des cellules PC12 du milieu extracellulaire contenant une concentration élevée de peptide A β_{1-42} (« Ag A β_{1-42} ») ou de peptide A β_{42-1} (« Ag A β_{1-42} ») de telle sorte que la concentration finale de peptide dans le milieu extracellulaire soit de 1 μM .

A l'instar de ce que nous avons décrit dans la partie 1 l'injection d'une forte concentration de peptide A β_{1-42} ($[A\beta_{1-42}]_{Ag} = 1 \mu\text{M}$) dans le milieu extracellulaire provoque dans les cellules PC12 différenciées un pic d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ suivie d'une phase de décroissance très lente de la $[Ca^{2+}]_i$ formant un plateau (Figure 31). En revanche nous n'avons pas observé de réponse calcique significative dans les cellules PC12 différenciées traitées uniquement avec une forte concentration de peptide A β_{42-1} ($[A\beta_{42-1}]_{Ag} = 1 \mu\text{M}$) (données non montrées) ou dans les cellules PC12 traitées de façon chronique avec une faible concentration de peptide A β_{1-42} ($[A\beta_{1-42}]_{Ch} = 10 \text{ nM}$) puis en aigu avec une forte concentration de A β_{42-1} (Figure 31). Ces observations et le fait que l'injection de solvant seul dans le milieu extracellulaire n'induit pas davantage de réponse calcique indiquent que l'augmentation de

la $[Ca^{2+}]_i$ est spécifiquement induite par l'injection d'une forte concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire.

Par ailleurs nous avons observé une potentialisation de la réponse calcique induite par l'injection d'une forte concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ lorsque les cellules sont pré-incubées en présence d'une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ ($[A\beta_{1-42}]_{Ch} = 10 \text{ nM}$) (Figure 31). Cette potentialisation se traduit par une augmentation d'environ 65 % de l'amplitude moyenne du pic d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et une augmentation de 75 % de la $[Ca^{2+}]_i$ au cours de la phase de décroissance lente par rapport à la réponse calcique induite par $A\beta_{1-42}$ dans les cellules non prétraitées. En revanche la réponse calcique induite par le traitement aigu avec $A\beta_{1-42}$ dans les cellules PC12 pré-incubées en présence d'une faible concentration de peptide $A\beta_{42-1}$ ($[A\beta_{42-1}]_{Ch} = 5 \text{ nM}$) (Figure 31) ne diffère pas significativement de celle induite en absence de traitement chronique. Ceci montre que la potentialisation de la réponse calcique obtenue en cas de traitement chronique des cellules PC12 avec le peptide $A\beta_{1-42}$ est spécifiquement liée à l'action du peptide $A\beta_{1-42}$.

3.2.2. Immunocytochimie

Au vu de ces résultats nous avons émis l'hypothèse qu'une pré-exposition des cellules PC12 à une faible concentration permettrait au peptide $A\beta_{1-42}$ d'adhérer à la membrane plasmique sous forme de monomères ou d'oligomères de faible poids moléculaire incapables d'induire l'ouverture des NMDARs, mais qui pourraient faciliter l'agrégation et/ou l'adhésion d'une plus grande quantité d'oligomères de haut poids moléculaire au moment du traitement chronique avec une forte concentration de peptide $A\beta_{1-42}$. Ce supplément d'oligomères pourrait alors recruter et activer davantage de récepteurs NMDA. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons reproduit ces conditions expérimentales en utilisant cette fois la technique de l'immunocytochimie. Selon les conditions expérimentales les cultures de cellules PC12 ont été traitées ou non de façon chronique avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ ou de peptide $A\beta_{42-1}$ pendant environ 20 heures ($[A\beta_{1-42}]_{Ch}$ et $[A\beta_{42-1}]_{Ch} = 5 \text{ nM}$) puis en aiguë avec une concentration plus élevée de peptide $A\beta_{1-42}$ ou de peptide $A\beta_{42-1}$ pendant 10 minutes ($[A\beta_{1-42/42-1}]_{Ag} = 200 \text{ nM}$). Les cellules ont ensuite été

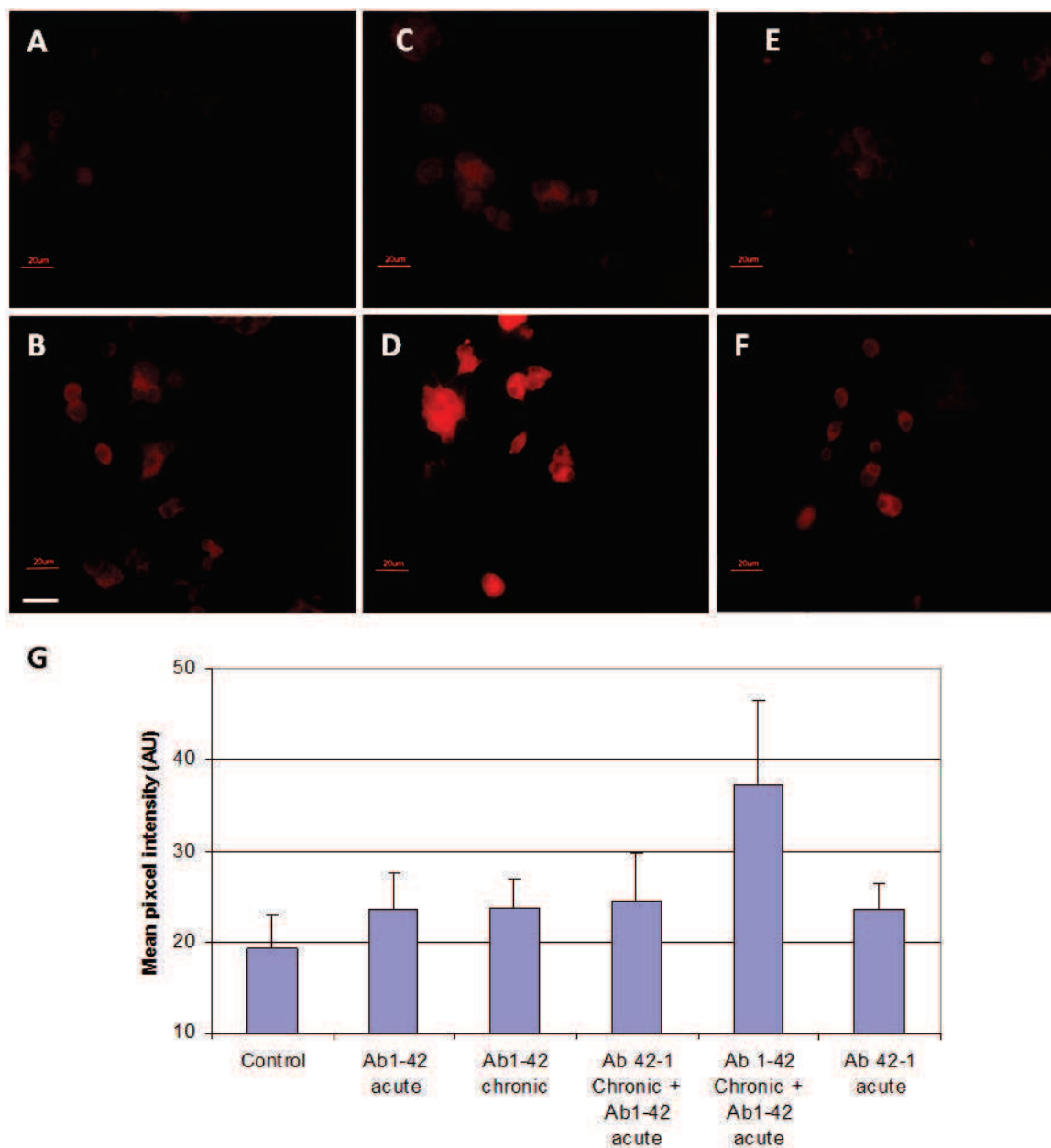


Figure 32 La préincubation des cellules PC12 avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ facilite la formation et/ou l'adhésion des oligomères $A\beta_{1-42}$ sur les membranes plasmiques. Les cellules PC12 en culture ont été préincubées avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (5 nM, C,D), du peptide $A\beta_{42-1}$ (5 nM, E, F) ou du solvant seul (A, B) pendant 16 heures à 37°C. Les cellules ont ensuite été traitées en aigu avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (200 nM, B,D,F) ou du solvant seul (A) pendant 10 minutes. (A-F) Microscopie à épifluorescence avec l'anticorps A11 (anti-oligomères $A\beta_{1-42}$). (G) Quantification de l'intensité de fluorescence émise par les cellules.

fixées et incubées en présence d'anticorps primaires et secondaires. Pour cette série d'expérience nous avons utilisé l'anticorps A11 qui reconnaît spécifiquement les oligomères $A\beta_{1-40/42}$ (Figure 32). Les images obtenues en microscopie à épifluorescence ainsi que la quantification de l'intensité de fluorescence émise par les cellules (mesurée grâce au logiciel ImageJ) montrent que le signal émis par les cellules PC12 ayant reçu uniquement un traitement chronique avec du peptide $A\beta_{1-42}$ ou du peptide $A\beta_{42-1}$ (Figure 32 C et E) n'est pas significativement différent de celui émis par les cellules contrôles n'ayant reçu aucun traitement peptidique (Figure 32 A et G); ceci montre que lors d'un traitement chronique les oligomères $A\beta$ ne se forment pas ou n'adhèrent pas aux membranes des cellules PC12. De même l'intensité de la fluorescence émise par les cellules qui n'ont subi qu'un traitement aigu avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (Figure 32 B) et les cellules traitées de façon chronique avec le peptide $A\beta_{42-1}$ puis en aigu avec le peptide $A\beta_{1-42}$ (Figure 32 F) est légèrement supérieure mais ne diffère pas significativement de celle émise par les cellules contrôles (Figure 32 A et G). En revanche le signal émis par les cellules qui ont subi un traitement chronique avec une faible concentration de peptide ($[A\beta_{1-42}]_{Ch} = 5 \text{ nM}$) avant de subir un traitement aigu avec une concentration plus élevée de peptide $A\beta_{1-42}$ ($[A\beta_{1-42}]_{Ag} = 200 \text{ nM}$) (Figure 32 D) est significativement plus élevé que celui émis par les cellules contrôles et les cellules ayant reçu exclusivement un traitement chronique ou un traitement aigu. Tout ceci suggère que l'exposition des cellules PC12 à une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ est insuffisante pour permettre la formation et/ou l'adhésion d'oligomères de haut poids moléculaire sur la membrane plasmique. En revanche une pré-exposition des cellules à de faibles concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$ favorise l'adhésion d'une plus grande quantité d'oligomères $A\beta_{1-42}$ sur les membranes plasmiques lors d'un traitement ultérieur avec une concentration plus importante de peptide $A\beta_{1-42}$.

3.3. Cultures primaires

3.3.1. Imagerie calcique

A la suite des résultats encourageants que nous avons obtenus avec les cellules PC12 nous avons reproduit ces expériences avec des cultures primaires de cortex de souris OF1. Pour le

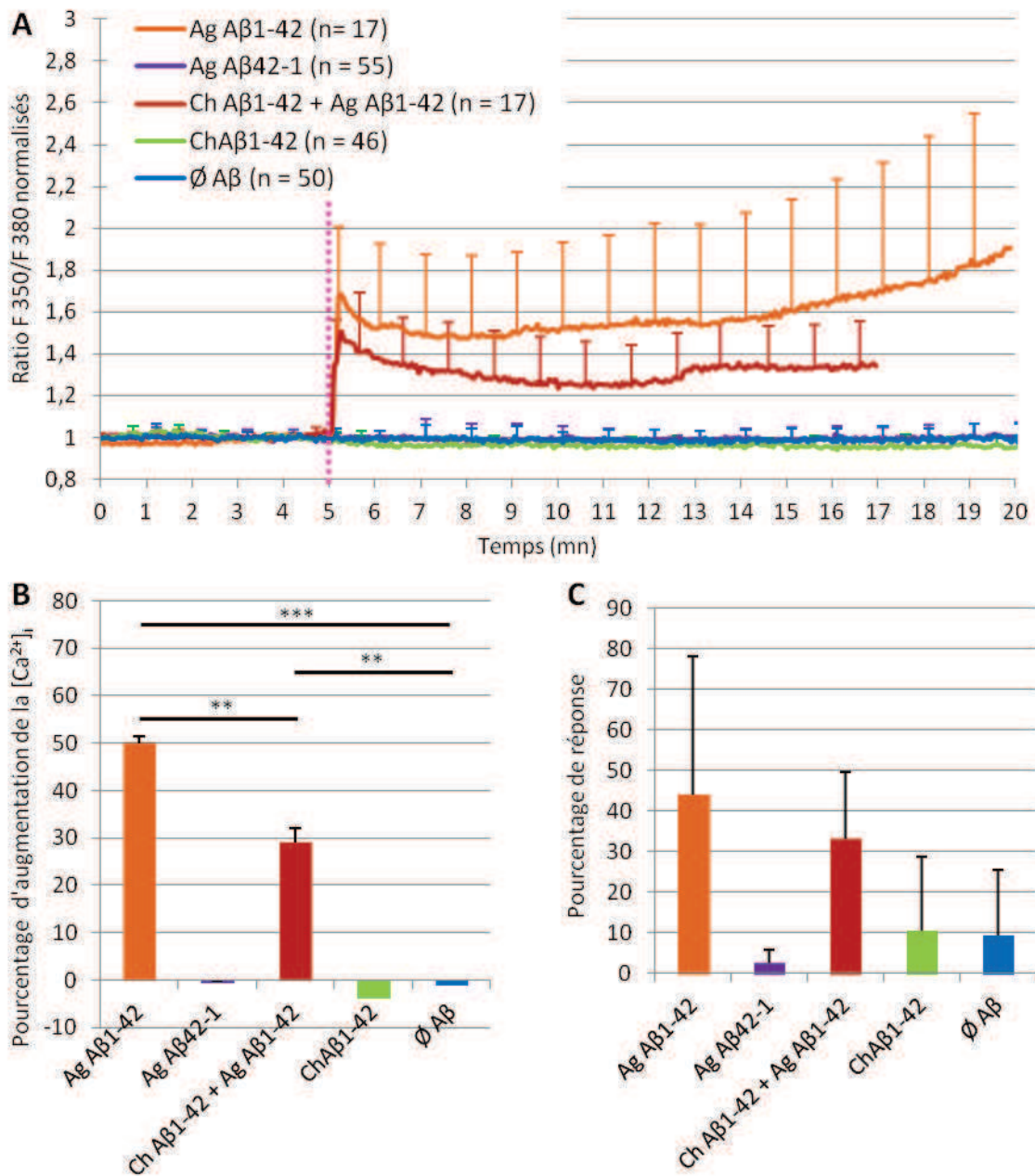


Figure 33 L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des neurones induite par les oligomères A β ₁₋₄₂ est partiellement inhibée lorsque les cultures primaires de cortex sont pré-incubées en présence d'une faible concentration de peptide A β ₁₋₄₂. Avant le début de l'enregistrement les cultures primaires de cortex de souris (10 DIV) ont été incubées à 37 °C pendant 20 h environ dans du milieu de culture contenant du solvant (\emptyset A β) ou une faible concentration de peptide A β ₁₋₄₂ (Ch A β ₁₋₄₂, 50 nM). Les oligomères A β ₁₋₄₂ (1 μ M) sont ajoutés dans le milieu extracellulaire 5 minutes après le début de l'enregistrement (droite pointillée). (A) Fluorescence moyenne émise par l'ensemble des cellules enregistrées. (B) Le pourcentage d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est calculé en soustrayant la moyenne des valeurs de la ligne de base à la moyenne des valeurs obtenues entre la 6^{ème} et la 11^{ème} minute d'enregistrement (phase de plateau). (C) Pourcentage de cellules montrant une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ après l'injection de peptide ou de solvant.

traitement chronique des cultures primaires nous avons utilisé du peptide $A\beta_{1-42}$ monomérisé et conservé sous forme de film peptidique (après dissolution dans l'HFIP) dilué dans le milieu de culture immédiatement après sa re-solubilisation dans le DMSO ($[A\beta_{1-42}]_{ch} = 50 \text{ nM}$). Pour le traitement aigu effectué environ 5 minutes après le début de l'enregistrement d'imagerie calcique nous avons injecté une solution enrichie en oligomères $A\beta_{1-42}$ ou $A\beta_{42-1}$ dans le milieu extracellulaire de manière à ce que la concentration finale de peptide $A\beta$ dans le milieu extracellulaire soit de $1 \mu\text{M}$. Dans cette seconde partie nous avons choisi de délaissier les astrocytes pour nous concentrer sur l'analyse des variations de $[Ca^{2+}]_i$ dans les neurones corticaux.

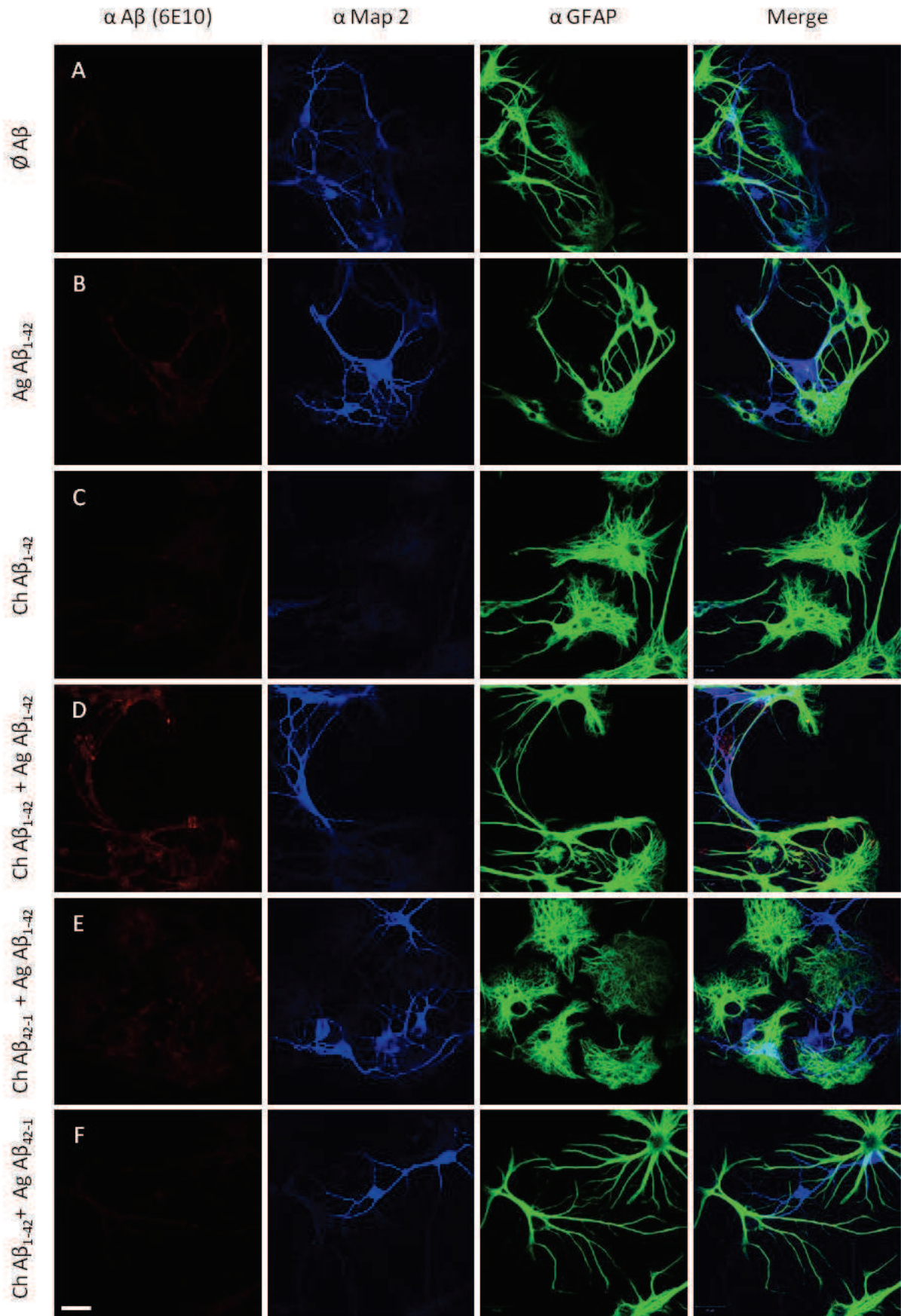
Conformément aux résultats obtenus précédemment dans les cultures de cellules PC12 et dans les cultures primaires d'hippocampes de souris, l'injection d'oligomères $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire provoque une augmentation significative de la $[Ca^{2+}]_i$ ($50 \pm 1,5 \%$ $p < 0,001$, [Figure 33 B](#)) dans $44 \pm 33 \%$ ([Figure 33 C](#)) des neurones corticaux. A contrario l'injection d'une forte concentration de peptide $A\beta_{42-1}$ ou de solvant dans le milieu extracellulaire au cours de l'enregistrement n'a pas d'effet sur la $[Ca^{2+}]_i$ ([Figure 33](#)), montrant une fois de plus que la réponse calcique observée est spécifiquement induite par le peptide $A\beta_{1-42}$.

Nous avons également observé une augmentation significative de la $[Ca^{2+}]_i$ ($29 \pm 3 \%$, $p = 0,001$, [Figure 33 B](#)) suite à l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$ ($1 \mu\text{M}$) dans $33 \pm 16 \%$ ([Figure 33 C](#)) des neurones corticaux préalablement traités avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ (50 nM), néanmoins contrairement à ce qui été attendu l'amplitude de la réponse calcique obtenue est significativement inférieure à celle obtenue en absence de traitement chronique ($p = 0,02$) ([Figure 33 B](#)). Bien que le traitement chronique des cultures primaires avec le peptide $A\beta_{1-42}$ n'ait pas d'effet notable sur la $[Ca^{2+}]_i$ des neurones corticaux lorsqu'il n'est suivi que d'une injection de solvant, il semble toutefois que l'exposition prolongée à une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ provoque ultérieurement une désensibilisation des neurones corticaux à un traitement aigu avec une concentration plus élevée de peptide $A\beta_{1-42}$.

3.3.2. Immunocytochimie

Cette diminution de l'amplitude de la réponse calcique induite par l'application aigue d'oligomères $A\beta_{1-42}$ lorsque les cultures sont pré-exposées à une faible concentration de peptide $A\beta$ pourrait s'expliquer par une réduction de la quantité de peptide $A\beta_{1-42}$ interagissant avec les membranes plasmiques des cellules constituant les cultures primaires. Afin de vérifier si le traitement chronique des cellules affecte la liaison du peptide $A\beta$ sur les membranes plasmiques nous avons, comme précédemment avec les cultures de cellules PC12, opté pour la technique de l'immunocytochimie. Selon les conditions expérimentales les cultures primaires ont été traitées ou non de façon chronique avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ ou de peptide $A\beta_{42-1}$ (50 nM) pendant environ 20 heures puis en aigue avec une concentration plus élevée de peptide $A\beta_{1-42}$ ou de peptide $A\beta_{42-1}$ (1 μ M) pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été fixées et les membranes plasmiques ont été perméabilisées avant d'être successivement incubées en présence d'anticorps primaires et secondaires. Les anticorps primaires dirigés contre les protéines Map2 et GFAP ont été utilisés pour distinguer les neurones et les astrocytes respectivement. Dans cette série d'expériences l'anticorps primaire 6E10 utilisé pour mettre en évidence le peptide $A\beta$ fixé sur les membranes est un anticorps séquentiel qui reconnaît aussi bien les oligomères de faibles poids moléculaires (dimères/trimères) que les oligomères de hauts poids moléculaires (dodécamères). Les images acquises en microscopie confocale ont été subséquemment analysées avec le logiciel ImageJ afin de quantifier l'intensité de la fluorescence émise par les neurones et les astrocytes à une longueur d'onde de 568 nm en cas de liaison de l'anticorps 6E10 sur les membranes plasmiques (Figure 34 J).

Nous avons ainsi observé dans les deux groupes de cellules traitées en aigue avec une forte concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ (« Ag $A\beta_{1-42}$ » et « Ch $A\beta_{42-1}$ + Ag $A\beta_{1-42}$ ») une augmentation significative de l'intensité moyenne de fluorescence émise à 549 nm comparativement aux cellules contrôles (\emptyset $A\beta$) (Figure 34 A, B, E, J). Ceci confirme que les oligomères $A\beta_{1-42}$ sont bel et bien capables de se lier aux membranes plasmiques au cours du traitement aigue. A contrario l'intensité moyenne de fluorescence émise par les cellules traitées uniquement en chronique avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ ou par les cellules traitées de



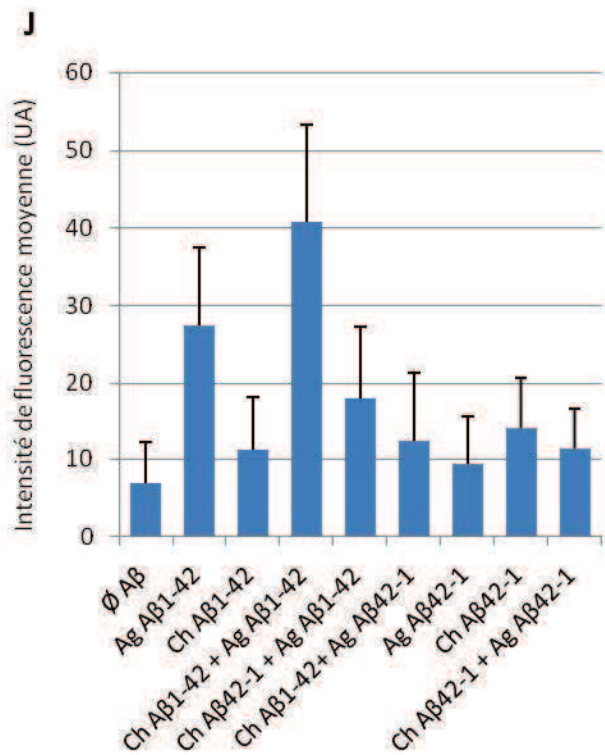
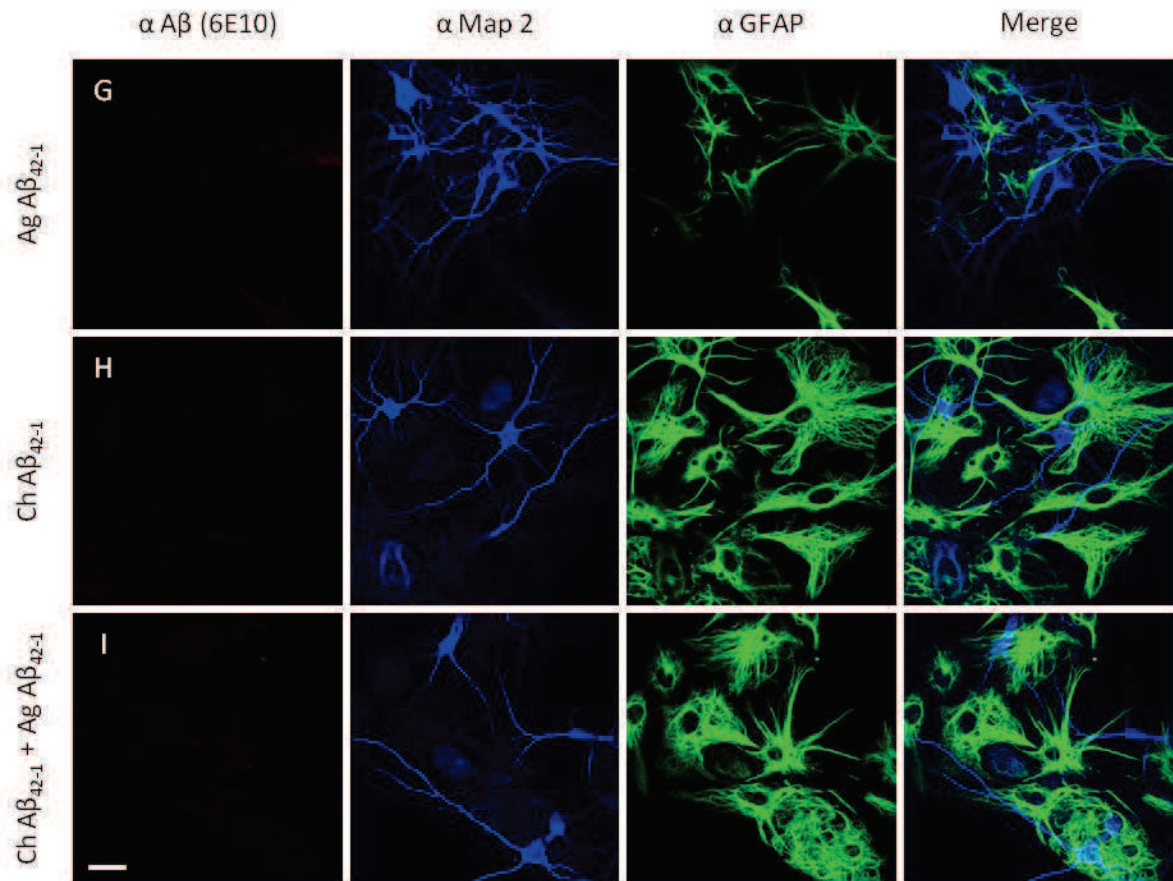


Figure 34 La préincubation des cultures primaires avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ facilite la formation et/ou l'adhésion des oligomères $A\beta_{1-42}$ sur les membranes plasmiques. Les cultures primaires de cortex de souris (12 DIV) ont été préincubées avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (50 nM) (C, D, F), du peptide $A\beta_{42-1}$ (50 nM) (E, H, I) ou du solvant seul (A, B, G) pendant 20 heures à 37°C. Les cellules ont ensuite été traitées en aigu avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, B, D, E), du peptide $A\beta_{42-1}$ (1 μ M, F, G, I) ou du solvant seul (A, C, H) pendant 10 minutes. Microscopie confocale avec l'anticorps 6E10 (anti- $A\beta$), l'anticorps α Map2 (neurones), l'anticorps α GFAP (astrocytes).

façon chronique avec le peptide $A\beta_{1-42}$ et en aigu avec le peptide $A\beta_{42-1}$ est légèrement supérieure mais pas significativement différente de celle émise par les cellules contrôles n'ayant reçu aucun traitement peptidique (Figure 34 A, C, F, J). Ceci implique que la quantité de monomères ou de petits oligomères $A\beta_{1-42}$ fixés sur les membranes plasmiques au cours du traitement chronique est très faible ou que ceux-ci se sont insérés dans les membranes plasmiques ce qui les rendrait moins accessibles pour les anticorps 6E10. Néanmoins l'intensité de fluorescence émise par les cellules traitées successivement en chronique puis en aigu avec le peptide $A\beta_{1-42}$ est nettement supérieure à celle émise par les cellules traitées uniquement en aigu avec l' $A\beta_{1-42}$ et par les cellules traitées en chronique avec l' $A\beta_{42-1}$ puis en aigu avec l' $A\beta_{1-42}$ (Figure 34 B, D, E, J).

En guise de contrôle certains groupes de neurones et d'astrocytes primaires ont été traités en chronique et/ou en aigu uniquement avec le peptide inverse $A\beta_{42-1}$ (Figure 34, G, H, I, J). L'intensité de fluorescence moyenne émise par ces cellules ne diffère pas significativement de celle émise par les cellules non traitées ($\emptyset A\beta$). Ceci nous permet de vérifier que l'anticorps 6E10 ne reconnaît pas le peptide $A\beta_{42-1}$ de façon spécifique et que le signal fluorescent que nous avons observé dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus reflète bien l'adhésion du peptide $A\beta_{1-42}$ exogène sur les membranes plasmiques.

Ces résultats, comparables à ceux que nous avons obtenus avec les cultures de cellules PC12, suggèrent que le prétraitement des neurones et des astrocytes avec une solution contenant une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ sous forme d'oligomères de petite taille favorise l'adhésion d'un plus grand nombre d'oligomères $A\beta_{1-42}$ sur les membranes plasmiques au cours du traitement aigu. En outre cela nous permet d'exclure l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'amplitude de la réponse calcique induite par le peptide $A\beta_{1-42}$ dans les neurones pré-exposés à une faible concentration d' $A\beta_{1-42}$ serait liée à une diminution de la quantité de peptide fixé sur leur membrane plasmique. Nous pouvons à présent supposer que le traitement chronique des cultures primaires avec de faibles concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$ entraîne l'activation de cascades de signalisation et de régulation membranaires et intracellulaires aboutissant à une diminution de l'activité des récepteurs NMDA ou à une réduction de la quantité de calcium libérée à partir des réservoirs de calcium intracellulaires.

3.4. Discussion et perspectives

3.4.1. Le traitement chronique favorise la formation et/ou l'adhésion des oligomères A β sur la membrane plasmique des cellules PC12, des neurones et des astrocytes

Dans cette seconde partie nous avons constaté en utilisant la technique d'immunocytochimie une augmentation significative de l'intensité de la fluorescence liée à la fixation des anticorps 6E10 et A11 dirigés contre le peptide A β sur les membranes plasmiques des cellules PC12, des neurones primaires et des astrocytes primaires traités de façon chronique avec une faible concentration de peptide A β_{1-42} puis en aigu avec une forte concentration d'A β_{1-42} . Ceci est d'autant plus surprenant que nous n'avons pas mesuré de signal significatif dans les cellules ayant exclusivement reçu un traitement chronique avec l'A β_{1-42} . Il est donc peu probable que l'effet obtenu dans les cellules traitées en chronique et en aigu avec l'A β_{1-42} ne s'explique par une simple addition linéaire du signal obtenu à l'issue du traitement chronique et de celui obtenu à l'issue du traitement aigu. Cette absence de signal à la surface des cellules traitées uniquement en chronique avec l'A β_{1-42} pourrait par ailleurs s'expliquer par le fait que la solution appliquée sur les cellules lors du traitement chronique est constituée en grande partie de monomères ou de dimères (Figure 30) qui s'intègrent plus facilement dans la membrane plasmique et qui seraient par conséquent plus difficilement accessibles pour les anticorps primaires. De plus nous ne pouvons pas exclure que l'absence de signal dans cette condition ne soit liée à un défaut de sensibilité de la technique que nous avons employé. En effet la quantité de peptide effectivement lié sur les membranes plasmiques à l'issue du traitement chronique est peut être tout simplement trop faible pour être distinguée du bruit de fond. A ce titre il serait sans doute intéressant de réaliser des expériences complémentaires avec une méthode plus sensible telle que la méthode ELISA associée à une extraction des protéines membranaire par exemple.

En dépit de ces quelques réserves nous avons conclu de ces expériences qu'une pré-exposition des cellules à une faible concentration de peptide A β_{1-42} favorise la fixation d'une quantité accrue d'oligomères A β au cours du traitement aigu subséquent. Ceci suggère que

le traitement chronique favorise l'adhésion ou la formation de nouveaux oligomères au cours du traitement aigu. Nous pouvons envisager deux hypothèses possibles pour expliquer ce phénomène. La première hypothèse serait que les monomères ou oligomères de faible poids moléculaire fixés sur la membrane au cours du traitement chronique agiraient comme des récepteurs permettant aux oligomères préformés ajoutés dans le milieu extracellulaire lors du traitement aigu de reconnaître et d'adhérer plus facilement aux membranes plasmiques. La seconde hypothèse serait que ces monomères ou oligomères de faible poids moléculaires serviraient d'amorces à partir desquelles se formeraient des oligomères de haut poids moléculaires par additions successives de monomères ou de dimères A β . Cette néoformation d'oligomères serait alors accélérée en présence d'une concentration plus élevée de peptide A β . Cette hypothèse est notamment confortée par les travaux de Johnson et al. [663] qui montrent que dans une solution de peptide A β_{1-40} (50 nM) à 37°C des oligomères composés de trois à six monomères se forment très rapidement au détriment des monomères et des dimères initialement présents dans la solution. Ce processus d'agrégation nécessitant la formation d'un noyau à partir duquel se forment des oligomères d'ordre supérieur puis des fibrilles par élongation n'est pas sans rappeler celui de la protéine Prion. Nous avons vu en introduction (cf. § 1.3.5) qu'il existe de nombreuses analogies entre la maladie d'Alzheimer et les maladies à Prion notamment en ce qui concerne les voies d'agrégation des protéines impliquées dans ces différentes maladies. Le peptide A β et la protéine Prion doivent en effet subir des changements de conformation très similaires avant de former des oligomères neurotoxiques puis des fibrilles insolubles [184-187, 664]. Il a en outre été montré que les radeaux lipidiques enrichis en cholestérol favorisent le regroupement des protéines prions cellulaires (PrP^C), leur conversion en protéines prions malformées (PrP^{SC}) et l'agrégation des PrP^{SC} grâce notamment à l'interaction de la protéine prion recombinée avec les gangliosides GM1 [665-668]. De même les membranes plasmiques et plus particulièrement les radeaux lipidiques enrichis en cholestérol et en gangliosides GM1 pourraient catalyser la formation des oligomères en favorisant par exemple le rapprochement des oligomères de faible poids moléculaire. En accord avec cette dernière hypothèse Johnson et al. ont également montré que la taille des oligomères nouvellement formés augmente de trois à six sous unités jusqu'à six à quatorze sous unités à la surface des cellules SH-SY5Y [663]. De plus des expériences préliminaires menées récemment par notre équipe sur des cellules PC12 dans les mêmes conditions

expérimentales que celles décrites ci-dessus nous ont permis de mettre en évidence une co-localisation partielle du peptide $A\beta_{1-42}$ avec la toxine cholérique utilisée pour marquer les gangliosides GM1 à la surface des cellules. (cf. Gilson et al, soumis, en annexe).

3.4.2. Le traitement chronique augmente-t-il l'expression membranaire des récepteurs NMDA-NR2B et/ou la libération de calcium intracellulaire dans les cellules PC12 ?

Dans les cellules PC12 prétraitées avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ l'augmentation de la quantité d'oligomères $A\beta_{1-42}$ liée aux membranes plasmiques se traduit par une augmentation de l'amplitude de la réponse calcique induite par l' $A\beta_{1-42}$. Nous avons montré dans la première partie de cette étude, et ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes [604, 669], que l'injection d'oligomères $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire provoque une augmentation de la concentration calcique intracellulaire liée à l'activation des récepteurs NMDA composés de la sous unité NR2B localisés à la surface des cellules PC12 et des neurones primaires. Nous n'avons de notre côté pas pu déterminer si l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ que nous avons observée était liée exclusivement à un influx d'ions Ca^{2+} via le canal des NMDARs ou si les ions Ca^{2+} stockés dans les réservoirs intracellulaires de calcium jouaient également un rôle dans cette réponse calcique. Toutefois d'autres auteurs ont montré que l'activation de des récepteurs NMDA par des oligomères $A\beta$ entraînerait un stress du réticulum endoplasmique qui se solderait effectivement par une libération des ions Ca^{2+} stockés dans la lumière du réticulum endoplasmique [669]. L'effet du traitement chronique avec le peptide $A\beta_{1-42}$ sur la réponse calcique induite par le traitement aigu avec les oligomères $A\beta_{1-42}$ pourrait donc s'expliquer de deux façons : soit le traitement chronique accroît l'expression et/ou l'adressage à la membrane plasmique de récepteurs NMDA-NR2B dont l'activation et l'ouverture au cours du traitement aigu avec des oligomères $A\beta_{1-42}$ entraînerait un influx plus important d'ions Ca^{2+} dans les cellules, soit il facilite la libération de calcium par les réservoirs intracellulaires de calcium.

En accord avec notre première hypothèse Liu et al. ont récemment montré une augmentation de l'expression des sous unités NR1 et NR2B dans les hippocampes de rats

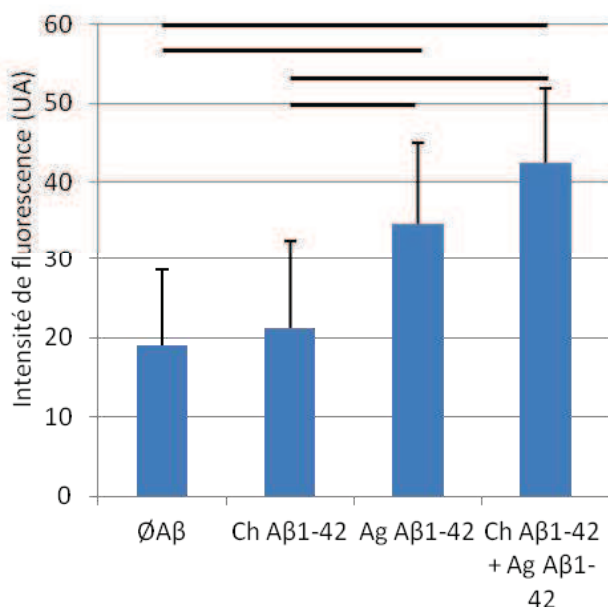
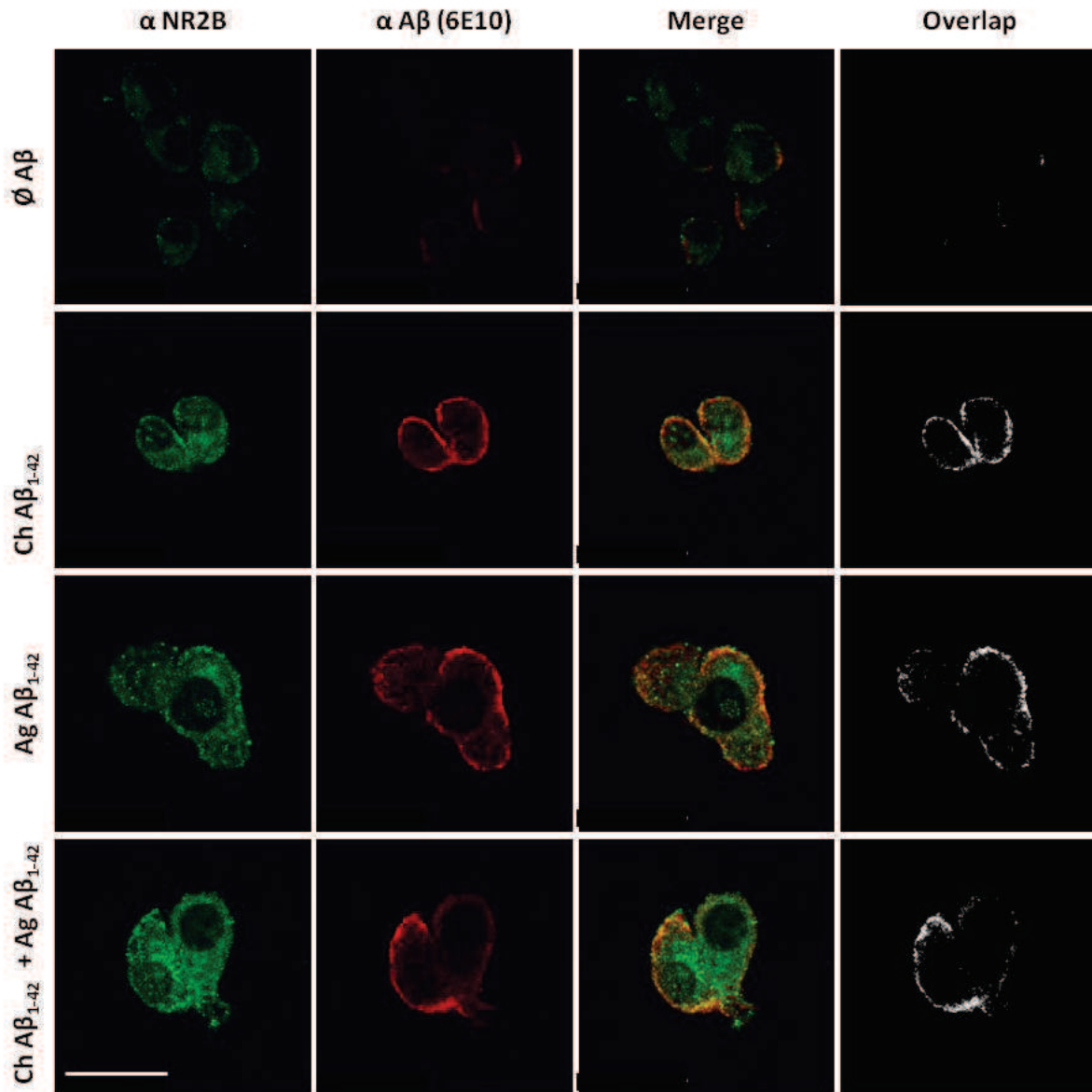


Figure 35. Surexpression membranaire des récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B dans les cellules PC12 traitées avec le peptide $A\beta_{1-42}$. Les cellules PC12 en culture ont été préincubées avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (50nM, B, D) ou du solvant (A, C) pendant 20 heures à 37°C. Les cellules ont ensuite reçu un traitement aigu avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, C, D) ou du solvant seul (A, C) pendant 10 minutes. (A-D) Microscopie confocale avec les anticorps 6E10 et α NR2B. (E) Quantification de l'intensité de fluorescence émise par les cellules

modèles pour la maladie d'Alzheimer [605]. Afin de vérifier si le traitement chronique que nous appliquons sur nos cellules PC12 avec le peptide $A\beta_{1-42}$ a un impact sur l'expression membranaire des récepteurs NMDA nous avons mené des expériences préliminaires d'immunocytochimie sur des cellules PC12 traitées en chronique et/ou en aigu avec le peptide $A\beta_{1-42}$ ($[A\beta_{1-42}]_{Ch} = 50 \text{ nM}$ et $[A\beta_{1-42}]_{Ag} = 1 \mu\text{M}$) en utilisant cette fois un anticorps primaire dirigé contre la sous unité NR2B des NMDARs (Figure 35). Il convient de préciser que ces expériences ont été conduites sur des cellules non perméabilisées et que les anticorps utilisés n'avaient pas conséquent pas accès au milieu intracellulaire. Comparativement aux cellules contrôles non traitées (Figure 35 A et E) nous avons ainsi observé une augmentation significative de l'expression membranaire des récepteurs NMDA-NR2B dans les cellules traitées de façon aiguë (Figure 35 C et E, $p = 0,006$) et dans celles traitées de façon chronique puis aiguë avec le peptide $A\beta_{1-42}$ (Figure 35 D et E, $p < 0,001$) mais pas dans les cellules traitées uniquement en chronique (Figure 35 B et E). De même la densité membranaire des NMDAR-NR2B est significativement supérieure dans les cellules traitées en chronique puis en aiguë avec $A\beta_{1-42}$ que dans celles traitées uniquement en aiguë (Figure 35 C, D et E). Ces résultats doivent encore être confirmés avec un plus grand nombre de cellules, nous remarquons toutefois que cette augmentation de l'expression membranaire de récepteurs NMDA-NR2B dans les cellules traitées en aiguë et plus encore dans celles traitées en chronique puis en aiguë concorde avec l'augmentation de la quantité d'oligomères $A\beta_{1-42}$ liés à la membrane plasmique que nous avons précédemment observée en immunocytochimie (Figure 32) et avec les résultats que nous avons obtenus en imagerie calcique (Figure 31). Ces résultats appuient donc l'hypothèse selon laquelle le traitement chronique des cellules avec une faible concentration d' $A\beta_{1-42}$ facilite l'adhésion sur la membrane plasmique d'un nombre accru d'oligomères qui eux-mêmes favorisent l'expression membranaire et l'activation des récepteurs NMDA-NR2B.

L'activation et l'ouverture du canal des NMDARs-NR2B entraînent vraisemblablement une entrée d'ions Ca^{2+} d'origine extracellulaire dans les cellules. Ces ions calcium ont ensuite la possibilité d'induire la libération des ions Ca^{2+} stockés dans les réservoirs intracellulaires de calcium. Ce phénomène appelé libération de calcium induite par le calcium (CICR) est lié à la présence de récepteurs ryanodine (RyR) dans la membrane endoplasmique. Les RyRs sont des récepteurs ionotropes perméables aux ions Ca^{2+} et activés par la fixation d'ions Ca^{2+} sur

leurs sites de liaisons [617]. Des études récentes ont mis en évidence le rôle majeur des RyRs dans la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer et plus particulièrement dans la cascade amyloïde [527, 623, 670-672]. Il a notamment été suggéré que le traitement de neurones primaires de souris avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (1 μ M) pendant 18 heures entraînerait dans ces neurones une surexpression de RyRs fonctionnels [672]. Notons toutefois que la concentration de peptide utilisée dans cette étude est très élevée (1 μ M) et que les solutions stocks de peptide $A\beta$ ont été préparées dans des conditions propices à l'oligomérisation et la fibrillisation du peptide $A\beta$. Nous avons montré dans notre étude qu'une solution d'oligomères à 1 μ M provoque dans les neurones une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ liée à une activation des NMDARs. Les RyRs sont également impliqués dans l'augmentation de la réponse calcique induite par l'injection extracellulaire de NMDA dans des neurones primaires transgéniques (TAS/TPM et 3xTg-AD) comparativement à celle induite dans des neurones non transgéniques [623]. Par ailleurs en utilisant un paradigme de préférence de place Kurokawa et al. [673] ont montré que l'injection répétée de méthamphétamine dans l'aire tegmentale ventrale (VTA) des souris induit dans les neurones dopaminergiques une surexpression des RyRs bloquée par l'injection concomitante d'ifenprodil. Cette surexpression de RyRs est donc intimement liée à l'activité des NMDARs contenant la sous unité NR2B. Nous avons observé une surexpression membranaire de récepteurs NMDA-NR2b dans la membrane plasmique des cellules PC12 traitées uniquement en aigu et dans celles traitées en chronique puis en aigu avec le peptide $A\beta_{1-42}$. Au vu des données fournies par la littérature nous pouvons émettre l'hypothèse que les traitements chroniques et aigu que nous appliquons sur nos cellules sont également susceptibles d'induire une surexpression de RyRs dans la membrane endoplasmique qui seraient responsables lors du traitement aigu d'une libération excessive de calcium dans le cytosol des cellules traitées notamment en chronique puis en aigu avec l' $A\beta_{1-42}$. Nous pourrions aisément vérifier cette hypothèse en réalisant des expériences d'immunocytochimie sur des cellules PC12 traitées de façon chronique et/ou aigu avec le peptide $A\beta_{1-42}$ en utilisant cette fois un anticorps dirigé contre les récepteurs ryanodine. Il serait également intéressant de vérifier si la potentialisation de la réponse calcique observée lorsque les cellules sont traitées en chronique puis en aigu avec $A\beta_{1-42}$ est inhibée en présence d'antagonistes sélectifs des récepteurs ryanodine.

3.4.3. Le traitement chronique entraînerait-il une désensibilisation des récepteurs NMDA dans les neurones primaires ?

A l'inverse de ce que nous avons observé dans les cellules PC12, le traitement chronique des cultures primaires de cortex de souris avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ ne potentialise pas la réponse calcique induite par l'injection d'oligomères dans le milieu extracellulaire. Au contraire, bien que la quantité d'oligomères fixés sur la membrane plasmiques des cellules soit plus importante dans les cellules traitées de façon chronique puis aigue avec $A\beta_{1-42}$ nous avons observé une diminution significative de l'amplitude de la réponse calcique induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$ dans ces cellules comparativement à celle obtenue dans les cellules traitées uniquement de façon aigue. Ces résultats semblent contradictoires au vu des résultats que nous avons obtenus avec les cellules PC12 différenciées. Néanmoins des résultats comparables ont été obtenus récemment par d'autres équipes. Giuffrida et al. ont notamment évoqué le rôle neuroprotecteur des monomères $A\beta_{1-42}$; injectés à une faible concentration dans le milieu extracellulaire les monomères $A\beta_{1-42}$ réduiraient en effet l'excitotoxicité induite par l'injection de NMDA [674]. De même après avoir pré-incubé pendant 16 heures des cultures primaires de neurones corticaux en présence de monomères ou d'oligomères $A\beta_{1-42}$ de faible poids moléculaire (trimères/tétramères) ($[A\beta_{1-42}] = 1 \mu\text{M}$), He et al. ont observé une diminution significative de la réponse calcique induite par l'injection de NMDA dans le milieu extracellulaire [675]. D'après nos résultats et ces données fournies par la littérature il semble donc que le traitement chronique des cultures primaires avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ ait un effet neuroprotecteur sur la réponse calcique induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$ qui repose vraisemblablement sur une désensibilisation durable des récepteurs NMDA.

3.4.3.1. Inactivation par déphosphorylation des récepteurs NMDA

Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.4.2.1.2 le peptide $A\beta$ peut provoquer une désensibilisation des NMDARs en activant ou en inhibant différentes voies ou cascades métaboliques. Nous avons notamment évoqué que le peptide $A\beta$ avait la capacité

d'accélérer leur déphosphorylation en inhibant l'activité des protéines kinases (PKC, Src, Fyn, ...) et des récepteurs à activité tyrosine-kinase et/ou en stimulant l'activité des phosphatases qui ciblent les récepteurs NMDA telles que la STEP. La déphosphorylation des NMDARs entraîne une désensibilisation rapide des NMDARs, nous ne pouvons toutefois pas déterminer si cela explique la désensibilisation durable que nous avons observée. Pour cela il serait dans un premier temps intéressant de vérifier en immunocytochimie si le traitement chronique des cultures primaires avec l' $A\beta_{1-42}$ réduit le nombre de récepteurs NMDA-NR2B phosphorylés localisés dans la membrane plasmique en utilisant un anticorps qui reconnaît spécifiquement les sous-unités NR2B phosphorylées. Nous pourrions ensuite doser l'activité des kinases et des phosphatases citées ci-dessus dans les cellules primaires traitées en chronique et/ou en aigu avec l' $A\beta_{1-42}$.

3.4.3.2. Internalisation des récepteurs NMDA

A l'instar de Giuffrida, de He et de leurs collaborateurs respectifs, Dewachter et al. ont également observé une diminution de la réponse calcique induite par l'injection de NMDA dans le milieu extracellulaire de neurones primaires d'hippocampe et de cortex pré-incubées avec une faible concentration (100 nM) de monomères ou d'oligomères $A\beta_{1-42}$ de faible poids moléculaire (dimères-tétramères) [676]. Dans cette étude cette diminution de la réponse calcique induite par le NMDA dans les neurones prétraités avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ est associée à une réduction du nombre d'épines dendritiques immunoréactives pour la sous unité NR2B des NMDARs. De même ces auteurs ont observé une diminution significative des concentrations de la sous unité NR2B et de la protéine PSD-95 dans des préparations de densité post synaptiques issues de cerveaux de souris transgéniques APP[V717I]. En revanche les concentrations de la sous unité NR2B et de la protéine PSD-95 obtenues dans des homogénats de cerveaux entiers de souris APP[V717I] ne sont pas significativement inférieures à celles obtenues dans des homogénats de souris non transgéniques. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle une pré-exposition des neurones à une faible concentration de monomères ou d'oligomères de faible poids moléculaires entraînerait l'endocytose clathrine-dépendante des NMDARs-NR2B exprimés à la surface des neurones. Nous avons vu au paragraphe 2.4.2.1.2 que cette endocytose

nécessite l'intervention d'une phosphatase qui cible préférentiellement les NMDARs composés de la sous unité NR2B [573]. Le niveau de la protéine STEP61 est augmenté dans les tissus corticaux issus de souris transgéniques Tg2576 ou de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. De plus il a été montré que le peptide A β provoque dans des neurones corticaux en culture une augmentation significative et dose-dépendante de la production de protéines STEP61 une heure après le début du traitement [580]. Malheureusement cette étude ne précise ni la durée du traitement ni la concentration et les formes de peptide A β appliqués sur les cellules. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que la diminution de l'amplitude de la réponse calcique que nous avons observée dans les neurones corticaux primaires traités de façon chronique avec le peptide A β_{1-42} est la conséquence d'une surexpression de la phosphatase STEP entraînant l'endocytose des NMDARs-NR2B exprimés à la surface de ces neurones. Afin d'étayer cette hypothèse il serait nécessaire de quantifier le niveau de protéines STEP intracellulaires et le nombre de récepteurs NMDA-NR2B exprimés à la surface des neurones après traitement chronique et/ou aigu avec le peptide A β_{1-42} .

3.4.3.3. Altération de l'environnement lipidique des récepteurs NMDA

Enfin, nous avons également vu que l'activité des NMDARs dépend étroitement de leur environnement lipidique et en particulier de leur ancrage dans des radeaux lipidiques enrichis en cholestérol et en sphingolipides. Toute altération de la composition de ces radeaux lipidiques pourrait donc entraîner un dysfonctionnement des récepteurs NMDA et par conséquent une diminution de l'amplitude de la réponse calcique induite par les oligomères A β_{1-42} . Nous avons par exemple observé une diminution significative de la réponse calcique induite par les oligomères A β dans des cellules PC12 différenciées prétraitées avec de la méthyl- β -cyclodextrine, un agent qui réduit la quantité de cholestérol dans les membranes plasmiques. Or selon Grimm et al. le peptide A β pourrait modifier la composition en cholestérol et en sphingomyéline des radeaux lipidiques et éventuellement perturber leur fonctionnement en stimulant l'activité de la sphingomyélinase, l'enzyme chargée de la dégradation de la sphingomyéline, et en inhibant l'activité de la HMG-CoA

réductase, une enzyme impliquée dans la synthèse du cholestérol [585]. Ces observations sont confortées par plusieurs études montrant que le peptide A β sous diverses formes stimule l'activité de la sphingomyélinase et la production de céramide [677-679]. De plus le peptide A β est connu pour induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [92, 453, 482, 680] qui stimulent également l'activité de la sphingomyélinase [588-590] et induisent une peroxydation des lipides membranaires [336, 591, 681]. Nous pouvons donc envisager qu'une exposition prolongée des membranes plasmiques à de faibles concentrations de peptide A β_{1-42} provoque une altération de la composition en cholestérol et en sphingomyéline qui perturberait le fonctionnement des NMDARs lors du traitement aigu d'où cette diminution de l'amplitude de la réponse calcique induite par les oligomères A β_{1-42} dans les neurones traités en chronique avec le peptide A β_{1-42} . Afin de vérifier cela nous proposons de doser le contenu en cholestérol et en sphingomyéline des membranes plasmiques des cellules primaires ou l'activité de la sphingomyélinase et de la HMG-CoA réductase dans nos différentes conditions expérimentales. Il serait également intéressant de vérifier si un prétraitement des neurones avec de la méthyl- β -cyclodextrine modifie de la même façon la réponse calcique induite par l'A β_{1-42} dans les neurones traités en chronique puis en aigu avec l'A β_{1-42} et dans les neurones traités uniquement en aigu avec l'A β_{1-42} .

3.4.3.4. Effets sur la libération de calcium intracellulaire?

Enfin nous avons vu dans les paragraphes précédents que les récepteurs ryanodine sont des partenaires privilégiés des récepteurs NMDA et que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ induite par les oligomères A β_{1-42} est vraisemblablement liée en partie à une libération de calcium intracellulaire via ces RyRs. Et nous avons à partir des résultats obtenus dans les cellules PC12 et des données extraites de la littérature émis l'hypothèse que le traitement chronique des cellules avec une faible concentration de peptide A β_{1-42} favoriserait une surexpression membranaire des NMDARs qui entraînerait à son tour une surexpression des RyRs en partie responsable de la potentialisation de la réponse calcique dans les cellules traitées de façon chronique puis de façon aigu avec le peptide A β_{1-42} . Cette hypothèse n'est toutefois pas valable dans le cas des neurones primaires pour lesquels le traitement chronique des cultures primaires jouerait un rôle neuroprotecteur en favorisant la désensibilisation des

NMDARs. Cependant l'ouverture des RyRs est modulée par de nombreux facteurs tels que l'ATP, la calmoduline, les phosphatases PP1 et PP2A, les ROS, ... [616, 617] dont l'expression, la production et/ou l'activité pourrait être modifiée lors du traitement chronique des cultures primaires avec l'A β ₁₋₄₂. A l'heure actuelle nous ne pouvons pas déterminer si l'expression et la fonction des RyRs sont affectées par le traitement chronique des cultures primaires, cela demeure toutefois une piste intéressante.

3.4.4. Hypothèses expliquant la disparités des résultats obtenus dans les cellules PC12 et les neurones.

Pour résumer nous avons vu tout au long de cette partie qu'une pré-exposition des cellules PC12 différenciées, des neurones et des astrocytes primaires à de faibles concentration de peptide A β ₁₋₄₂ sous forme de monomères ou d'oligomères de petite taille (dimères, trimères ou tétramères) a pour effet de faciliter la formation et/ou l'adhésion d'oligomères de plus haut poids moléculaire (dodécamères) sur les membranes plasmiques de ces cellules. Cette augmentation du nombre d'oligomères de haut poids moléculaires fixés sur les membranes plasmiques des cellules préalablement traitées de façon chronique avec le peptide A β ₁₋₄₂ est associée à une augmentation de l'amplitude de la réponse calcique dans les cellules PC12 différenciées et, au contraire, à une diminution de l'amplitude de la réponse calcique dans les neurones primaires. Ces résultats peuvent paraître contradictoires au premier abord cependant nous avons utilisé pour cette étude deux types cellulaire très différents. Les cellules PC12, bien qu'elles expriment un phénotype de type neuronal sous l'effet d'un traitement avec du NGF, sont à l'origine des cellules tumorales prélevées sur une glande surrénale de rat tandis que les cultures primaires sont préparées à partir de tissus nerveux prélevés sur des embryons de souris. Les cellules PC12 sont donc des cellules immortalisées d'origine périphérique qui conservent la capacité de se diviser tandis que les neurones primaires sont des cellules post-mitotiques issues du système nerveux central. De plus, bien que le rat et la souris soit très proches phylogénétiquement, il existe de nombreuses différences entre ces deux espèces. Les métabolomes (ensemble des métabolites et petites molécules présents dans un échantillon biologique à un instant t) des cellules PC12 différenciées et des neurones présentent donc vraisemblablement de nombreuses

différences qui pourraient influencer sur la réponse de ces cellules à l'injection de faibles et/ou de fortes concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire.

Parmi toutes les protéines potentiellement impliquées dans la modulation de la réponse calcique induite par les oligomères $A\beta$ et dont le niveau d'expression peut varier dans ces deux types cellulaires nous soupçonnons que la phosphatase STEP joue un rôle déterminant. Cette phosphatase qui cible préférentiellement les récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B est particulièrement impliquée dans l'endocytose des récepteurs NMDA-NR2B exprimés à la surface des neurones à la suite d'un traitement des cellules avec du peptide $A\beta_{1-42}$. L'expression de la STEP est normalement restreinte au système nerveux central [682-684], l'absence de protéine STEP active dans les cellules PC12 pourrait donc expliquer pourquoi nous avons observé une potentialisation et non une inhibition de la réponse calcique induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$ dans ces cellules. Il serait de plus intéressant de reproduire nos expériences avec des neurones primaires pour lesquels l'expression du gène codant pour la protéine STEP serait invalidée, si notre hypothèse est valide nous observerions alors, comme dans les cellules PC12, une augmentation de l'expression membranaire des récepteurs NMDARs et probablement une augmentation de l'amplitude de la réponse calcique induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$ dans les neurones préalablement traités de façon chronique avec des monomères ou des oligomères $A\beta_{1-42}$ de faible poids moléculaire.

Il existe par ailleurs une autre différence essentielle entre les cultures de cellules PC12 et les cultures primaires : les cultures de cellules PC12 sont homogènes tandis que les cultures primaires sont mixtes et composées principalement de neurones et d'astrocytes. Nous avons vu dans la première partie de cette étude que les astrocytes sont sensibles à la présence de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire. De plus dans cette seconde partie nous avons constaté en immunocytochimie (Figure 21) que le traitement chronique des cultures primaires avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ favorise également la formation et/ou l'adhésion d'une plus grande quantité de peptide $A\beta$ sur les membranes plasmiques astrocytaires mais nous n'avons pas pu déterminer quels effets auraient le traitement chronique et ce surplus d'oligomères adhérent aux membranes plasmiques sur la réponse calcique des astrocytes. De plus les astrocytes sécrètent en réponse à l'addition de peptide

A β dans le milieu extracellulaire de nombreux facteurs (NO, ROS, facteurs pro-inflammatoires, ..., cf. § 1.7.1) qui peuvent avoir un impact sur les neurones avec lesquels ils sont en étroite relation. Nous ne pouvons donc pas exclure que des astrocytes préalablement activés au cours du traitement chronique jouent indirectement un rôle dans l'inhibition de la réponse calcique mesurée dans les neurones.

Pour conclure ces disparités entre les résultats que nous avons obtenus dans les cellules PC12 d'une part et les neurones primaires d'autre part illustre bien l'importance de choisir le modèle expérimental le plus approprié pour répondre à une problématique donnée. Dans le cas présent la physiologie des cellules PC12 est sans doute trop éloignée de la physiologie neuronale pour constituer un modèle fiable pour l'étude des effets chroniques du peptide A β_{1-42} sur les cellules nerveuses. Des données obtenues à partir de tissus cérébraux prélevés sur des souris transgéniques modélisant la maladie d'Alzheimer ou de patients humains atteints de la maladie d'Alzheimer montrent que in vivo le niveau de protéine STEP augmente [573, 580] et que l'expression membranaire des NMDARs contenant la sous unité est réduite dans ces tissus [573, 676]. De plus l'expression de gènes tels que c-Fos contrôlée par l'activation des NMDARs est également perturbée dans le cerveau des souris transgéniques [676] ce qui suggère que l'influx et la libération d'ions Ca²⁺ liés à l'activation des récepteurs NMDA est, contrairement à ce que nous avons observé dans les cellules PC12, également diminué in vivo dans les tissus contaminés par le peptide A β .

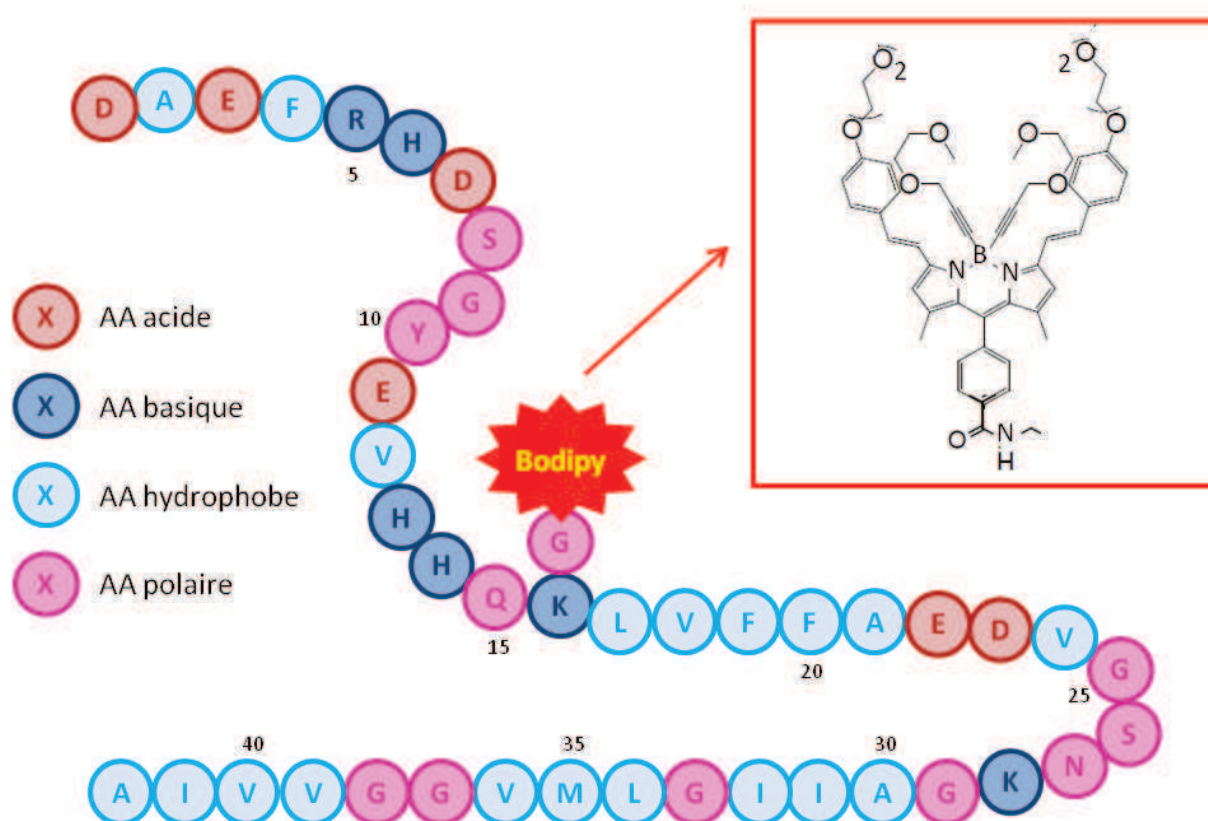


Figure 36 Structure de la sonde peptidique A1. La sonde A1 est composée d'un peptide $A\beta_{1-42}$ sur lequel est greffé une glycine couplée à un fluorophore de type bodipy. La formule chimique du bodipy est représentée dans l'encadré.

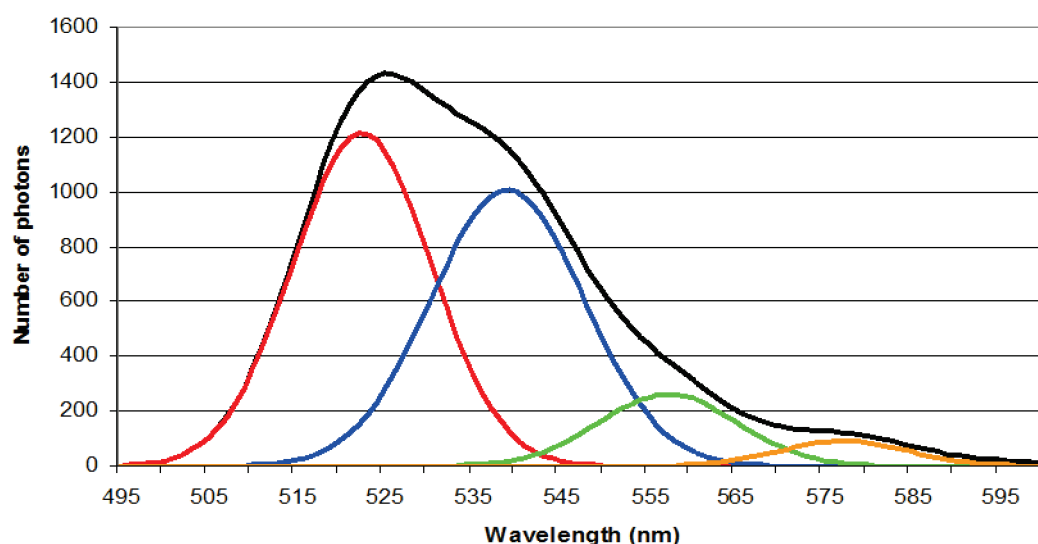


Figure 37. Spectre d'émission de fluorescence de la sonde amyloïde A1. Le spectre de fluorescence (tracé noir) peut être décomposé en courbes gaussiennes élémentaires (tracés en couleur).

4. Partie 3 : Caractérisation d'une sonde peptidique

4.1. Présentation de la sonde amyloïde A1

A l'heure actuelle de gros efforts sont consacrés à la recherche et au développement de biomarqueurs permettant de dépister et de suivre l'évolution de la maladie d'Alzheimer. Dans cette optique la société *Innovative Health Diagnostics* (IHD) développe un test de diagnostic sanguin fondé sur l'utilisation d'une sonde amyloïde fluorescente nommée sonde A1. Cette sonde est constituée d'un peptide amyloïde ayant la même séquence que le peptide $A\beta_{1-42}$ classique sur lequel est greffé un acide aminé (glycine) couplé à fluorophore Bodipy (Figure 36) excité à une longueur d'onde de 488 nm et qui émet à longueur d'onde située entre 505 et 560 nm avec un maximum à 515 nm (Figure 37). Le fluorophore est greffé sur le seizième acide aminé du peptide amyloïde (lysine). Cette position est stratégique car à partir du dix-septième acide aminé la séquence peptidique se replie pour former des feuillets β impliqués dans l'oligomérisation du peptide et éventuellement dans l'insertion des monomères ou des oligomères $A\beta$ dans la membrane plasmique. En cas d'adhésion ou d'insertion de la sonde dans la membrane plasmique le fluorophore se retrouve ainsi juste à la surface de la bicouche lipidique, en contact avec les charges négatives portées par les têtes polaires des phospholipides (Figure 38 A). Ceci n'est pas sans intérêt car l'interaction du fluorophore avec ces charges négatives entraîne un déplacement de son spectre d'émission vers des longueurs d'ondes plus faibles (Figure 38 B) que l'on peut quantifier en calculant un indice spectral. En pratique, le spectre d'émission de la sonde peut être décomposé ou déconvolué en quatre courbes gaussiennes (Figure 37). L'indice spectral (IS) est calculé en divisant la somme des aires sous la courbe des gaussiennes 1 et 2 ($A_1 + A_2$) par l'aire sous la courbe de la gaussienne 3 (A_3) ($IS = (A_1 + A_2)/A_3$). L'indice spectral augmente lorsque la sonde A1 est liée à la membrane plasmique.

Dans le cadre d'une collaboration avec la société IHD, nous avons participé à la caractérisation de la sonde A1. La structure de la sonde A1 étant très proche de celle du peptide $A\beta_{1-42}$ natif que nous utilisons couramment, notre objectif dans cette partie sera de

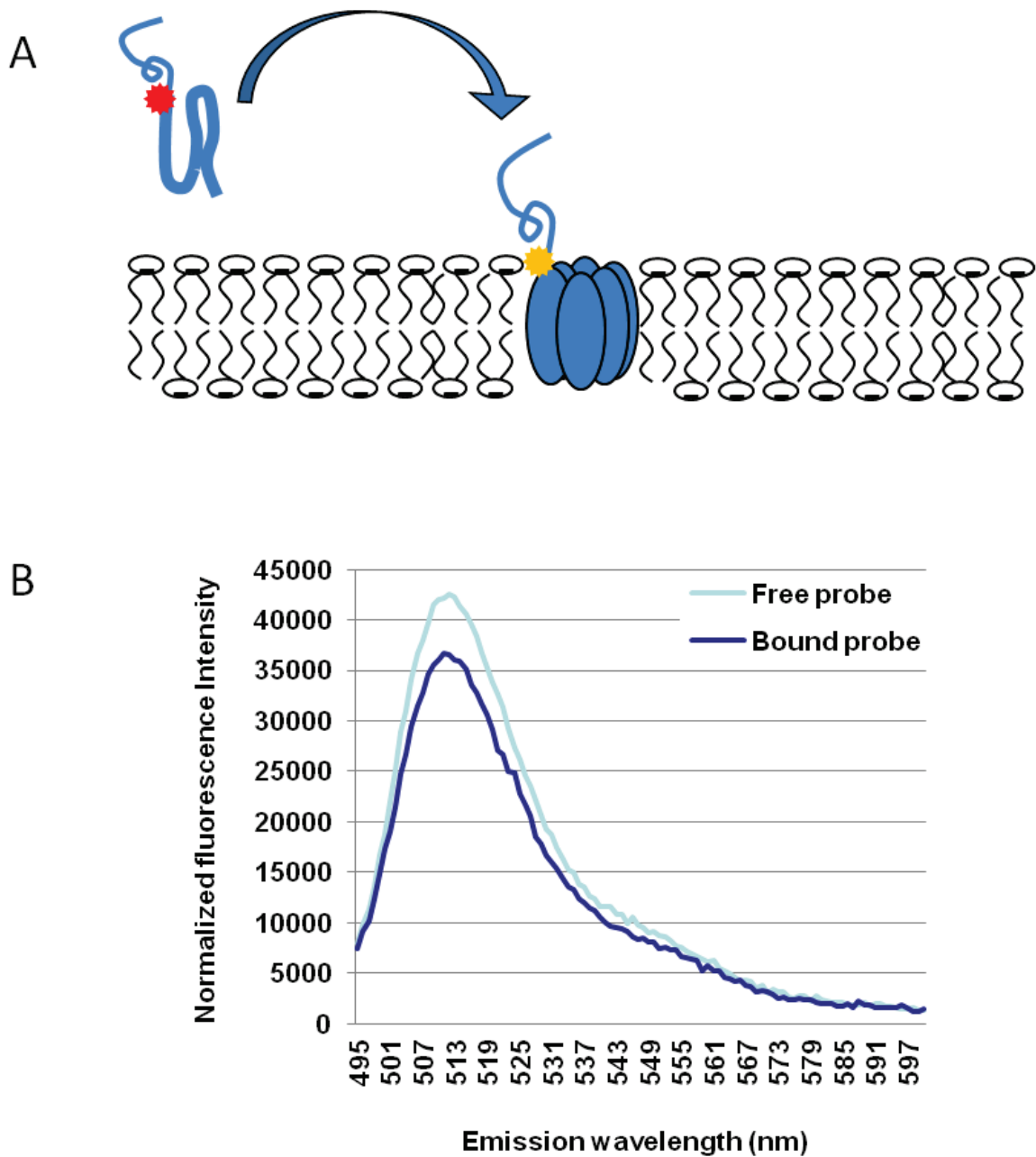


Figure 38. Au contact de la membrane plasmique des cellules PC12 le spectre d'émission de la sonde peptidique A1 se déplace vers des longueurs d'ondes inférieures. (A) Représentation schématique d'un oligomère de sonde A1 s'insérant dans la membrane plasmique. (B) Spectre d'émission de la sonde A1 libre en solution (bleu clair) ou liée aux membranes plasmiques des cellules PC12 (bleu foncé).

montrer que la sonde A1 s'oligomérisé et induit dans les cellules vivantes les mêmes effets biologiques que le peptide $A\beta_{1-42}$ natif.

4.2. Agrégation de la sonde

De nombreuses études ainsi que les résultats que nous avons présentés dans les deux premières parties de cette thèse montrent que les oligomères et en particulier les oligomères de haut poids moléculaire (dodécamères) sont les formes les plus neurotoxiques du peptide $A\beta$. Avant de vérifier si la sonde A1 a effectivement des effets biologiques comparables à ceux du peptide $A\beta_{1-42}$ natif sur les cellules vivantes nous devons par conséquent nous assurer dans un premier temps que le fluorophore greffé sur le seizième acide aminé de la séquence peptidique ne perturbe pas l'oligomérisation de la sonde A1. De plus de nombreux paramètres tels que la concentration en peptide, la température ou le pH de la solution influent sur la cinétique d'agrégation du peptide $A\beta$, la sonde A1 ayant la même séquence peptidique que le peptide $A\beta_{1-42}$ nous nous attendons à ce que ces mêmes paramètres influent également sur la cinétique d'agrégation de la sonde. Comme nous l'avons fait précédemment avec le peptide $A\beta_{1-42}$ nous avons utilisé la technique du Western blot pour mesurer le niveau d'agrégation de la sonde A1 dans différentes conditions expérimentales.

4.2.1. Application de la méthode de Lambert à la sonde A1

La méthode de Lambert et al. [78] couramment utilisée dans la littérature pour préparer des solutions enrichies en oligomères $A\beta$ préconise de laisser incubé une solution très concentrée de peptide $A\beta$ (100 μ M) à 4°C pendant 24 à 48 heures. Nous avons dans un premier temps souhaité vérifier si cette méthode favorise pareillement la formation d'oligomères de sonde A1. Pour cela nous avons préparé deux échantillons de solution de sonde A1. Le premier échantillon que nous nommerons « oligomères A1 » a été préparé suivant la méthode de Lambert. Nous avons dissout la sonde A1 dans de l'hexafluoroisopropanol (HFIP) afin de dissocier les agrégats éventuellement présent dans la préparation synthétique. Le film de sonde A1 ainsi obtenu est ensuite dissout dans du DMSO

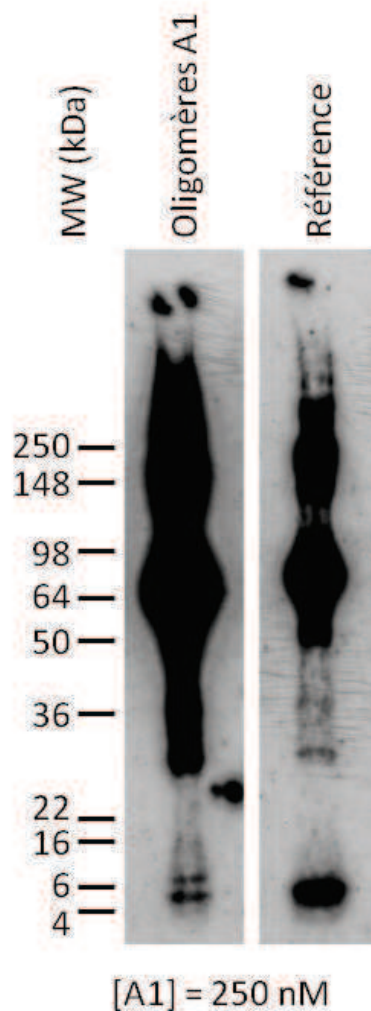


Figure 39. La méthode de Lambert favorise l'oligomérisation de la sonde amyloïde A1. Piste « Oligomères A1 » : solution de sonde A1 préalablement monomérisée diluée dans une solution tampon saline (110 μ M, pH 7,4), conservée à 4°C pendant 20 heures selon la méthode de Lambert puis rediluée (250 μ M) et conservée à température ambiante pendant 30 mn. Piste « Référence » : solution de sonde A1 préalablement monomérisée, diluée dans une solution tampon saline (250nM, pH 7,4) et conservée 30 mn à température ambiante. Quantité de sonde déposée dans chaque puits : 10pg. Western blot révélé avec l'anticorps 6E10.

([A1]_{DMSO} = 1 μM) puis immédiatement dilué dans une solution tampon saline (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, Glucose 1 mM, CaCl₂ 0,5 mM, pH 7,4) à la concentration de 110 μM et conservée toute la nuit à 4°C. Le lendemain le second échantillon, qui nous servira d'échantillon de référence, a été préparé en diluant la sonde A1 préalablement monomérisée dans l'HFIP et dissoute dans du DMSO dans une solution tampon à température ambiante à la concentration de 250 nM. En parallèle le premier échantillon a été dilué jusqu'à atteindre également la concentration de 250 nM puis nous avons laissé les deux échantillons incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Les échantillons ont ensuite été préparés pour la migration électrophorétique et déposés sur des gels d'électrophorèse en polyacrylamide Tris-glycine 4-20%.

Dans la seconde piste correspondant à l'échantillon de référence nous avons détecté grâce à l'anticorps 6E10 une bande migrant à 4-6 kDa, deux bandes de faible intensité migrant à environ 25-30 kDa et 36 kDa, une bande à 50 kDa, une bande très épaisse à 60-70 kDa, une bande à 148 kDa et enfin une bande à environ 250 kDa (Figure 39). Le poids moléculaire d'un monomère de sonde A1 étant d'environ 6 kDa, ces bandes correspondent aux poids moléculaires de monomères, d'oligomères A1 composés respectivement de 4, 6, 9, 12, et 24 sous unités de sonde A1, et de protofibrilles. Ceci confirme que la sonde A1 est bien capable de s'oligomériser comme le ferait le peptide Aβ₁₋₄₂ natif. De plus au vu de l'épaisseur relative des différentes bandes les dodécamères semblent être la forme prédominante dans cette solution. Dans la piste correspondant à l'échantillon « oligomères A1 » nous avons obtenu une bande à 4-6 kDa et une trainée de forte intensité de 25 kDa environ à plus de 250 kDa. L'intensité de la bande migrant à 4-6 kDa dans cette piste est plus faible que celle observée dans la piste correspondant à l'échantillon de référence, ce qui semble indiquer que la quantité de monomères A1 est plus faible dans l'échantillon « oligomères A1 ». En revanche le fait que les bandes correspondant au poids moléculaire des différents oligomères soient plus difficile à différencier au point d'obtenir une trainée très intense indique que la quantité d'oligomères est fortement augmentée dans l'échantillon « oligomères A1 » par rapport à la quantité d'oligomères contenue dans l'échantillon de référence. De plus au sein de cette trainée nous observons un renflement particulièrement important entre 50 et 98 kDa qui indique la présence d'une importante quantité de dodécamères dans cet échantillon. Nous pouvons donc déduire de cette analyse biochimique que la méthode de Lambert favorise la

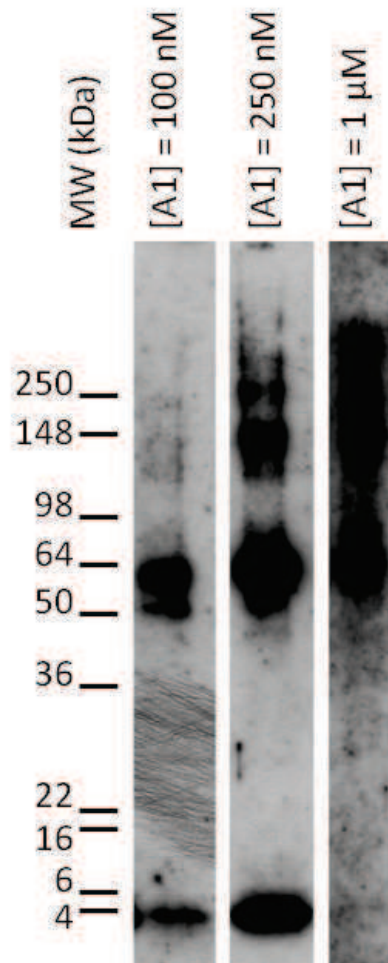


Figure 40. Influence de la concentration sur l'agrégation de la sonde amyloïde A1. Solutions de sonde A1 préalablement monomérisée diluées à 100nM, 250nM ou 1μM dans une solution tampon saline (pH 7,4) et conservée 30 minutes à température ambiante. Quantité de sonde déposée dans chaque puits : 10pg. Western blot révélé avec l'anticorps 6E10.

formation d'oligomères A1 et plus particulièrement de dodécamères au détriment des monomères.

4.2.2. Influence de la concentration de la sonde A1

Pour mesurer l'effet de la concentration de la sonde A1 sur son agrégation nous avons préparé trois solutions tampon contenant chacune 100 nM, 250 nM ou 1 μ M de sonde A1 préalablement monomérisée dans l'HFIP. Nous avons laissé incuber ces solutions à température ambiante pendant 30 minutes avant de les diluer afin d'égaliser les concentrations de sonde A1 et de déposer un échantillon de chaque solution dans les puits d'un gel d'acrylamide Tris-Glycine 4-20%. Les différents agrégats de sonde A1 ont été détectés avec l'anticorps 6E10 (Figure 40). Dans la mesure où la même quantité de sonde A1 (10 pg) a été déposée dans chaque puits nous pouvons comparer les quantités relatives des différents agrégats en fonction de l'épaisseur des bandes obtenues. Dans la piste correspondant à la plus faible concentration 100 nM nous avons obtenu trois bandes migrant approximativement à 4-6 kDa, à 50 kDa et à 60-70 kDa. Ces trois bandes révèlent donc la présence dans la solution de monomères, et d'oligomères composés respectivement de 9 ou de 12 sous-unités. Dans la piste correspondant à la concentration intermédiaire 250 nM nous pouvons visualiser cinq bandes migrant à 4-6 kDa, 50 kDa, 60-70 kDa, 148 kDa et 250 kDa révélant la présence de monomères et d'oligomères composés de 9, 12 et 24 sous-unités et de protofibrilles respectivement. Dans cette piste la bande migrant à 60-70 kDa semble plus épaisse que celle détectée dans la piste précédente ce qui suggère qu'il existe davantage de dodécamères de sonde A1 dans la solution de sonde A1 à 250 nM. De plus l'apparition des bandes à 148 kDa et à 250 kDa montre que des agrégats de poids moléculaires supérieurs se sont formés dans cette solution. Enfin dans la piste correspondant à la concentration la plus élevée, 1 μ M, nous ne détectons plus qu'une bande à 60-70 kDa d'épaisseur moindre que celle détectée dans la piste précédente et une traînée au-delà de 100 kDa. Nous observons donc dans cette solution une disparition des monomères, des oligomères de poids moléculaire intermédiaires et d'une partie des dodécamères au profit d'agrégats de poids moléculaires supérieurs qui suggère un début de

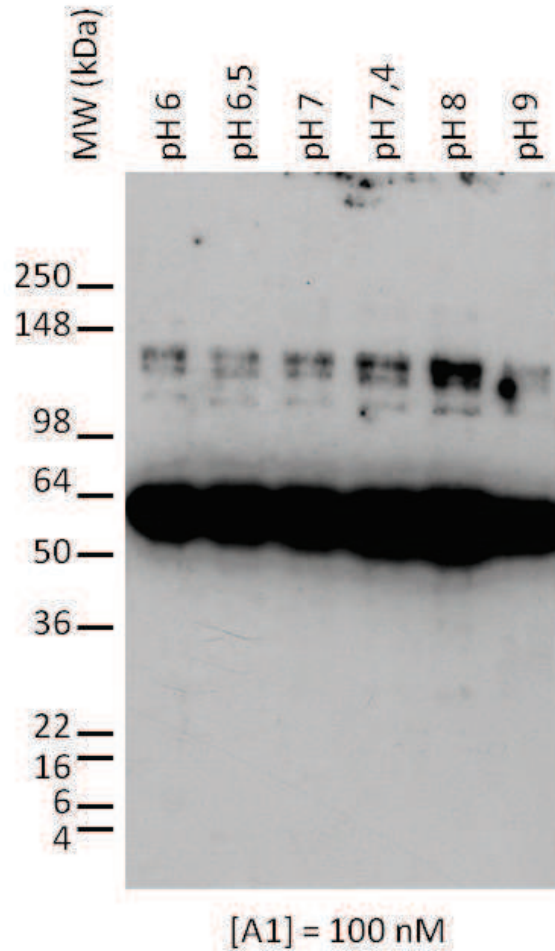


Figure 41. Influence du pH de la solution sur l'agrégation de la sonde amyloïde A1. Solution de sonde A1 préalablement monomérisée diluée dans des solutions tampon salines (100 nM) à pH 6, 6.5, 7, 7.4, 8 ou 9. Les différentes solutions ont été conservées à température ambiante pendant 30 minutes. Quantité de sonde déposée dans chaque puits : 10pg. Western blot révélé avec l'anticorps 6E10.

fibrillation de la sonde A1. En conclusion la [figure 40](#) montre que la cinétique d'oligomérisation et la taille des agrégats qui se forment dans la solution dépend de la concentration de la sonde A1.

4.2.3. Influence du pH

Enfin, afin de vérifier si le pH de la solution a un impact sur l'agrégation de la sonde A1 nous avons préparé six solutions de sonde A1 dont le pH varie de 6 à 9. Ces six solutions contiennent la même concentration de sonde A1 (100 nM) et ont été préparées dans les mêmes conditions expérimentales. Comme précédemment la sonde A1 préalablement monomérisée dans l'HFIP puis dissoute extemporanément dans le DMSO a été diluée dans des solutions tampons à pH 6, 6.5, 7, 7.4, 8 ou 9. A l'issue d'une période d'incubation de 30 minutes à température ambiante, les solutions ont été à nouveau diluées et des échantillons ont été préparés et déposés sur un gel de polyacrylamide Tris-glycine 4-20%. En utilisant l'anticorps 6E10 nous avons détecté dans chaque piste une bande principale à 60-70 kDa et une double bande à environ 145 kDa qui révèlent respectivement la présence d'oligomères A1 composés de 12 et de 24 sous-unités dans les six solutions ([Figure 41](#)). De plus l'épaisseur et l'intensité de ces bandes augmentent progressivement avec le pH de la solution jusqu'à pH 8 puis diminue à pH 9. Ceci implique que la vitesse d'oligomérisation de la sonde A1 varie en fonction du pH de la solution suivant ce qui semble être une courbe en cloche dont le maximum serait à pH 8.

4.3. Adhésion de la sonde A1 sur la membrane plasmique des neurones

Dans l'optique d'évaluer les éventuels effets biologiques de la sonde peptidique A1, nous avons dans un premier temps souhaité vérifier si cette sonde est capable, tout comme le peptide A β ₁₋₄₂ natif, de se lier aux membranes plasmiques des cellules vivantes. Pour cela nous avons traité des cultures primaires de cortex de souris OF1 avec une solution tampon (Hepes) extracellulaire contenant des oligomères de sonde A1 (1 μ M) pendant 30 minutes à

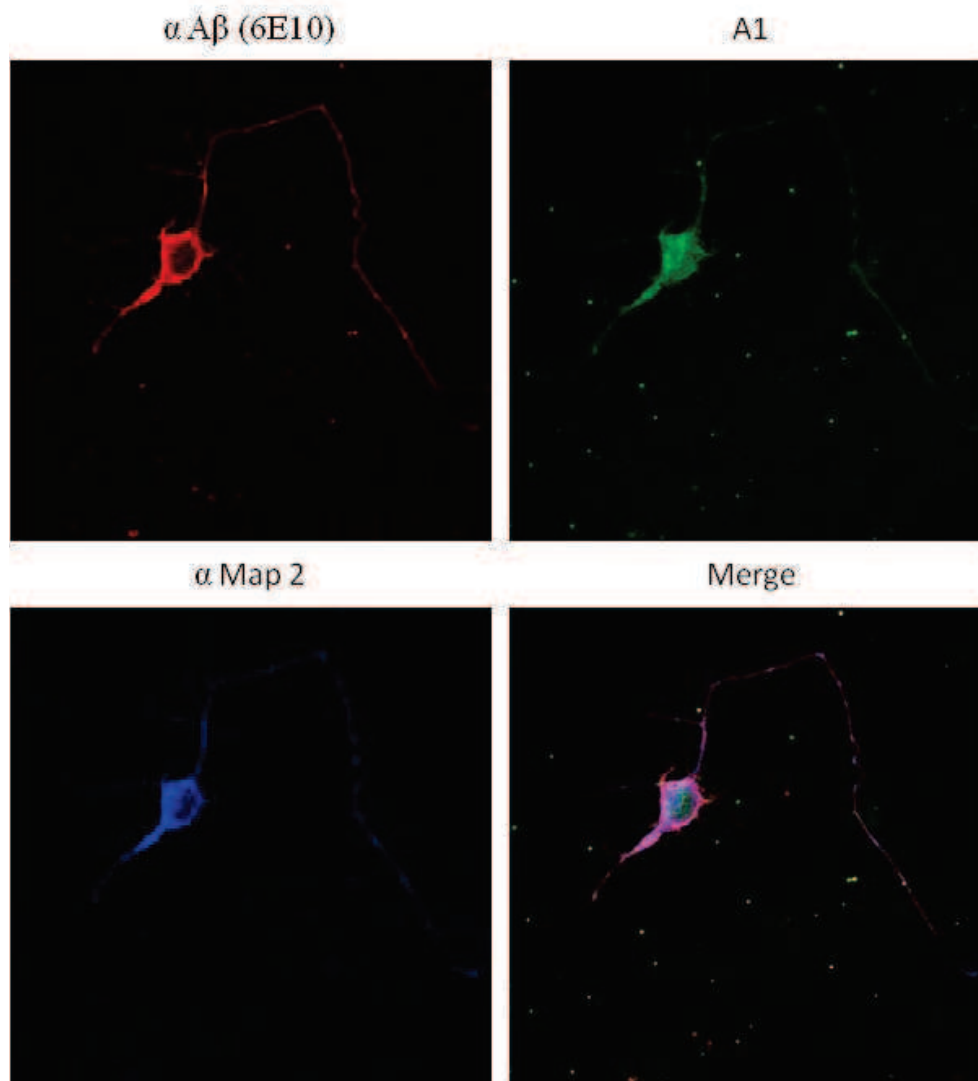


Figure 42. Liaison de la sonde A1 aux membranes plasmiques des neurones corticaux. Les cultures primaires de cortex de souris ont été traitées avec une solution de sonde A1 (1 μ M) pendant 30 minutes. Les molécules de sonde A1 fixées sur la membrane plasmique sont visualisées en excitant la sonde fluorescente A1 à une longueur d'onde de 488 nm (longueur d'onde d'émission = 505-560 nm, vert) et grâce à l'utilisation de l'anticorps anti-A β 6E10 (rouge). Les neurones corticaux ont été marqués avec l'anticorps anti-Map2 (bleu).

37°C. Après lavages et fixation nous avons incubé les cultures primaires avec l'anticorps primaire anti-Map2 associé à l'anticorps secondaire correspondant couplé à un fluorophore dylight 649 pour distinguer les neurones. La présence de sonde A1 fixée sur les membranes plasmiques est révélée grâce à l'auto-fluorescence de la sonde qui émet à une longueur d'onde située entre 505 et 560 nm lorsqu'elle est excitée à 488 nM. De plus la sonde A1 ayant la même séquence peptidique que le peptide $A\beta_{1-42}$ natif nous avons également utilisé l'anticorps 6E10 associé à l'anticorps secondaire correspondant couplé à un fluorophore dylight 549. Les résultats présentés dans la [figure 42](#) montrent que la sonde A1 adhère à la membrane plasmique des neurones corticaux.

4.4. Réponse calcique induite par la sonde A1

Nous avons ensuite testé en imagerie calcique l'effet d'un traitement aigu avec une forte concentration d'oligomères A1 (1 μM) sur la $[Ca^{2+}]_i$ de neurones corticaux primaires prétraités ou non avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ (50 nM). A titre comparatif un petit groupe de neurones corticaux n'a reçu qu'un traitement aigu avec une forte concentration d'oligomères $A\beta_{1-42}$ natif (1 μM).

Nous avons ainsi observé que l'injection d'une forte concentration d'oligomères A1 dans le milieu extracellulaire des cultures primaires provoque dans les neurones primaires une augmentation rapide de la $[Ca^{2+}]_i$ suivie d'une diminution partielle et enfin d'une phase de plateau au cours de laquelle la $[Ca^{2+}]_i$ est plus élevée d'environ $15 \pm 1\%$ par rapport à la $[Ca^{2+}]_i$ basale ([Figure 43 A et B](#)). Le profil de la réponse calcique induite par les oligomères A1 dans les neurones est donc similaire à celui de la réponse calcique induite par l'injection d'oligomères $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire des cultures primaires ([Figure 33 et 43](#)). Le pourcentage de cellules répondant à l'injection d'oligomères A1 ($39 \pm 24\%$, [Figure 43 C](#)) ne diffère pas significativement de celui obtenu dans les cultures primaires traitées avec des oligomères $A\beta_{1-42}$ ($51 \pm 2\%$, [Figure 43 C](#)). De même l'amplitude moyenne de la réponse calcique (mesurée au cours de la phase de plateau) est comparable dans les neurones traités avec les oligomères A1 ($15 \pm 1\%$ [Figure 43 B](#)) et dans les neurones traités avec les oligomères $A\beta_{1-42}$ ($16 \pm 1\%$ [Figure 43 B](#)).

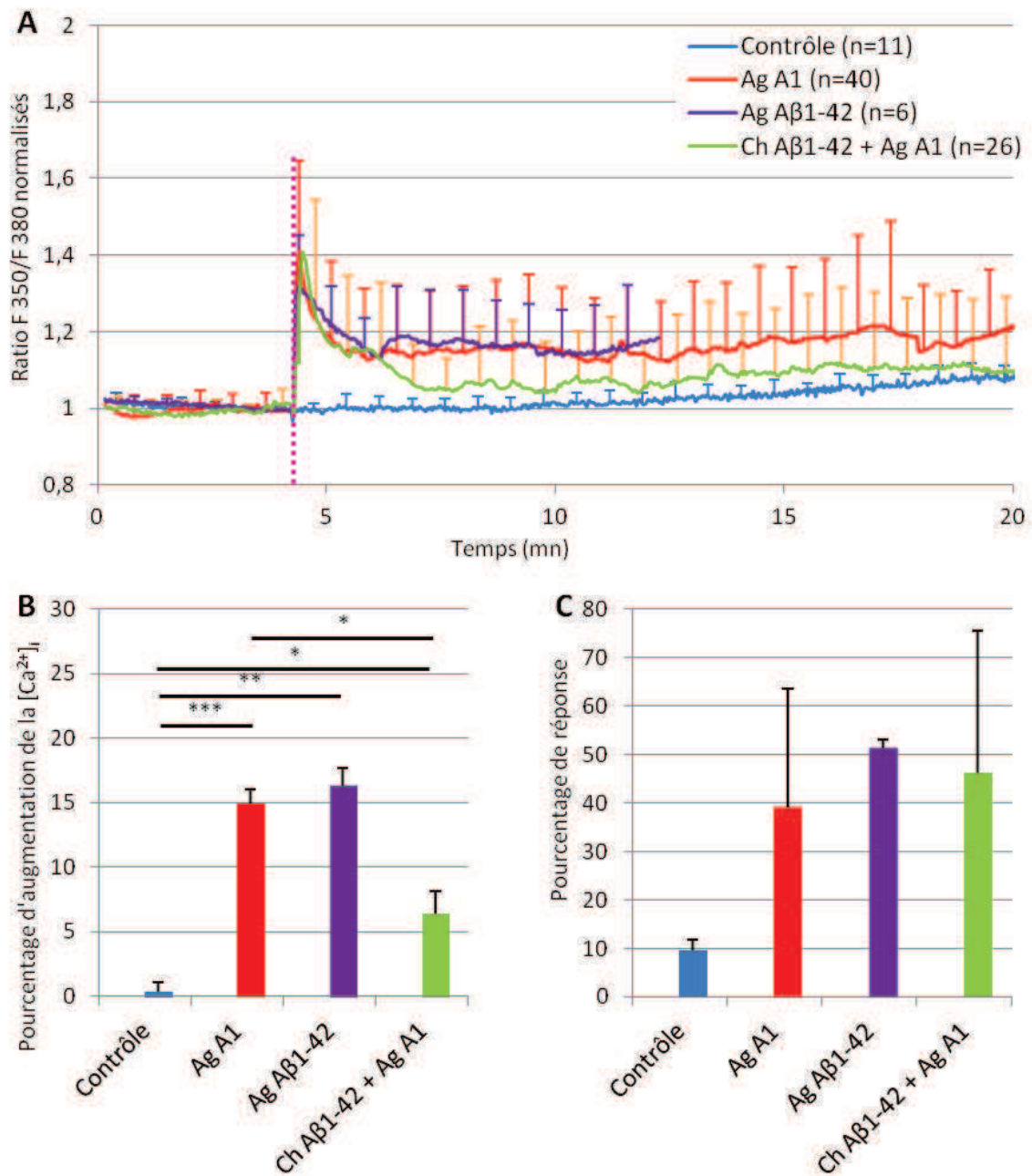


Figure 43. Les oligomères de sonde A1 induisent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ des neurones partiellement inhibée lorsque les cultures primaires de cortex sont préincubées en présence d'une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ natif. Avant le début de l'enregistrement les cultures primaires de cortex d'embryons de souris OF1 (E16) ont incubé à 37 °C pendant 20 h environ dans du milieu de culture contenant du solvant ou une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ (Ch $A\beta_{1-42}$, 50 nM). Les oligomères A1 (1 μ M) sont ajoutés dans le milieu extracellulaire 4 minutes après le début de l'enregistrement (trait pointillé rose, A). (B) Le pourcentage d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est calculé en soustrayant la moyenne des valeurs de la ligne de base à la moyenne des valeurs obtenues entre la 6^{ème} et la 11^{ème} minute d'enregistrement (phase de plateau). (C) Pourcentage de cellules montrant une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ suite à l'injection extracellulaire de peptide $A\beta_{1-42}$, de sonde A1 ou de solvant.

Dans les neurones primaires traités de façon chronique avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$, l'amplitude de la réponse calcique induite par les oligomères A1 dans la phase de plateau est significativement plus faible ($6 \pm 2 \%$ [Figure 43 B](#)) que dans les neurones non prétraités ($15 \pm 1 \%$, $p < 0,05$). Nous n'avons en revanche pas observé d'augmentation significative du pourcentage de réponse ($46 \pm 29 \%$ [Figure 43 C](#)). Cette inhibition partielle de la réponse calcique induite par les oligomères A1 dans les neurones corticaux prétraités avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ est donc comparable à celle que nous avons observée précédemment avec les oligomères $A\beta_{1-42}$.

4.5. Discussion

4.5.1. Comparaison entre le peptide $A\beta$ et la sonde A1

En analysant en Western blot la composition des solutions de peptide $A\beta_{1-42}$ que nous avons appliquées sur nos cultures de cellules PC12 et nos cultures primaires lors des traitements chronique et aigu nous avons essentiellement relevé la présence de monomères ou de dimères et de dodécamères $A\beta_{1-42}$ ([Figure 30](#)). Nous avons également retrouvé des monomères/dimères et des dodécamères en grande quantité en analysant différentes solutions de sonde amyloïde A1 suivant la même méthode ([Figures 39, 40, et 41](#)). De plus nous avons montré que les conditions expérimentales qui favorisent la formation d'oligomères $A\beta_{1-42}$ telles que la diminution de la température de la solution, l'augmentation du temps d'incubation et de la concentration de peptide ainsi que la neutralité du pH de la solution [399] favorisent de façon comparable l'agrégation de la sonde A1. Tout ceci montre que l'ajout du fluorophore bodipy sur la séquence peptidique n'empêche pas la formation d'oligomères de sonde A1 similaires aux oligomères de peptide $A\beta_{1-42}$ natif ([Figures 30, 39, 40, et 41](#)). Néanmoins l'analyse des solutions de sonde A1 a également fait apparaître dans certaines conditions la présence d'oligomères de taille intermédiaires et de protofibrilles que nous avons rarement observés dans les solutions de peptide $A\beta_{1-42}$. L'apparition de ces formes intermédiaires dans les solutions de sonde A1 pourrait éventuellement s'expliquer par un ralentissement de l'agrégation de la sonde A1 probablement lié à la présence du fluorophore.

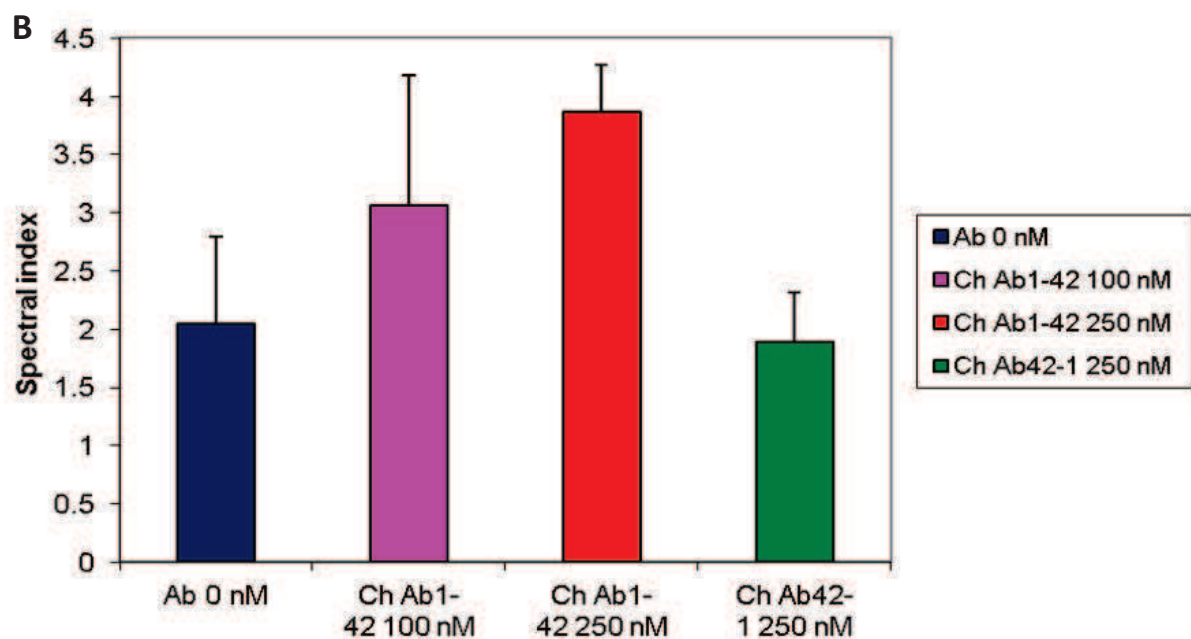
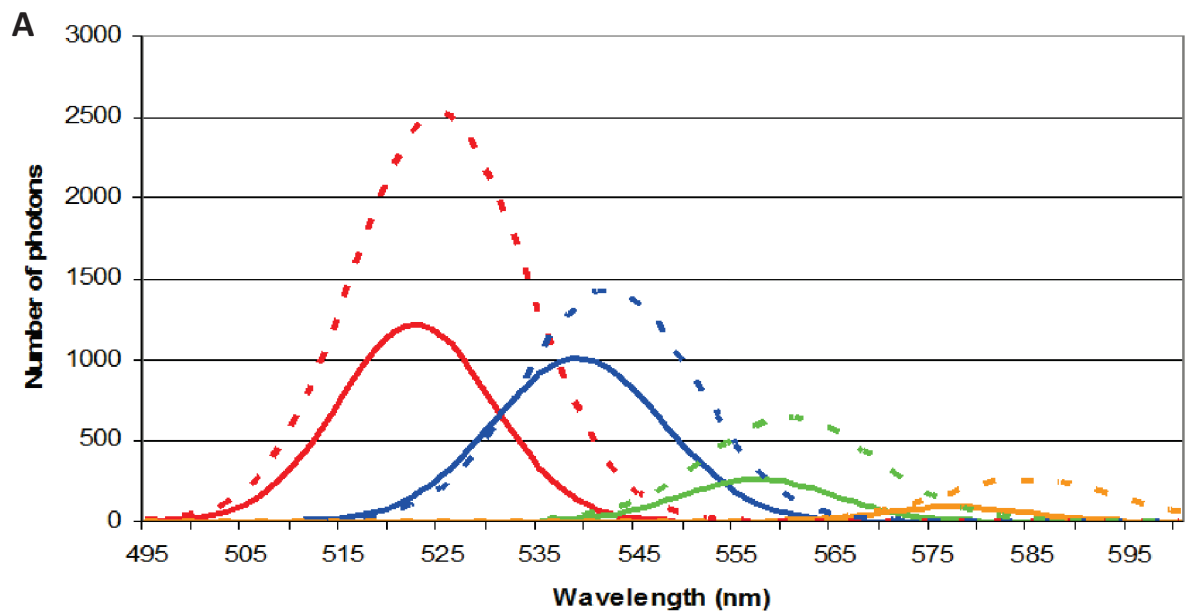


Figure 44. La préincubation des cellules PC12 avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ facilite l'adhésion de la sonde A1 sur les membranes plasmiques. (A) Augmentation importante de l'amplitude de la courbe gaussienne centrée à 525 nm dans les cellules PC12 pré-incubées en présence de peptide $A\beta_{1-42}$ natif pendant 20 heures (tracé en pointillé) puis en présence de sonde A1 (100 nM, 20 minutes). (B) Augmentation de l'indice spectral de la sonde A1 dans les cellules PC12 préincubées en présence de peptide $A\beta_{1-42}$ natif (100 et 250 nM) puis en présence de sonde A1 (100 nM) qui traduit une augmentation de la quantité de sonde A1 liée aux membranes plasmiques. (Mbebi-Liégeois et al, en préparation)

Nous avons en outre observé que la sonde A1 se lie aux membranes plasmiques des neurones et induit une augmentation de leur $[Ca^{2+}]_i$ similaire à celle que nous avons observée dans les neurones traités avec une forte concentration d'oligomères $A\beta_{1-42}$. Le pourcentage de réponse cellulaire que nous avons obtenu en imagerie calcique suite à l'injection extracellulaire d'oligomères A1 est également similaire à celui que d'autres équipes [550] et nous même avons obtenu en injectant des oligomères $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire de cultures primaires d'hippocampes ou de cortex de souris. Enfin nous avons constaté que la réponse calcique induite par les oligomères A1 est, tout comme celle induite par les oligomères $A\beta_{1-42}$, partiellement inhibée dans les neurones primaires préalablement traités de façon chronique avec une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$. Dans la seconde partie de cette thèse nous avons observé que l'inhibition de la réponse calcique dans les cellules prétraitées avec l' $A\beta_{1-42}$ est associée à une augmentation de la quantité de peptide $A\beta_{1-42}$ liée sur les membranes plasmiques à l'issue du traitement aigu des cultures. Nous n'avons malheureusement pas eu la possibilité de vérifier si le traitement chronique augmente de la même façon la quantité de sonde A1 liée aux membranes plasmiques des neurones. Toutefois la société IHD a mis en évidence en utilisant une méthode de spectrofluorimétrie que le prétraitement de cellules PC12 avec différentes concentrations chroniques de peptide $A\beta_{1-42}$ (0-250 nM) suivi d'un traitement aigu avec la sonde A1 (100 nM) entraîne une déformation du spectre d'émission de la sonde A1 (Figure 44 A) et une augmentation dose-dépendante de l'indice spectral (Figure 44 B). Cette augmentation de l'indice spectral reflète une augmentation de la quantité de sonde A1 liée aux membranes plasmiques des cellules prétraitées avec le peptide $A\beta_{1-42}$ natif.

4.5.2. Application clinique : un test sanguin pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer

A partir de ces découvertes la société IHD a entrepris de développer un test sanguin fondé sur l'utilisation de la sonde amyloïde A1 qui permettrait de diagnostiquer et éventuellement de suivre l'évolution de la maladie d'Alzheimer de façon non invasive chez l'Homme.

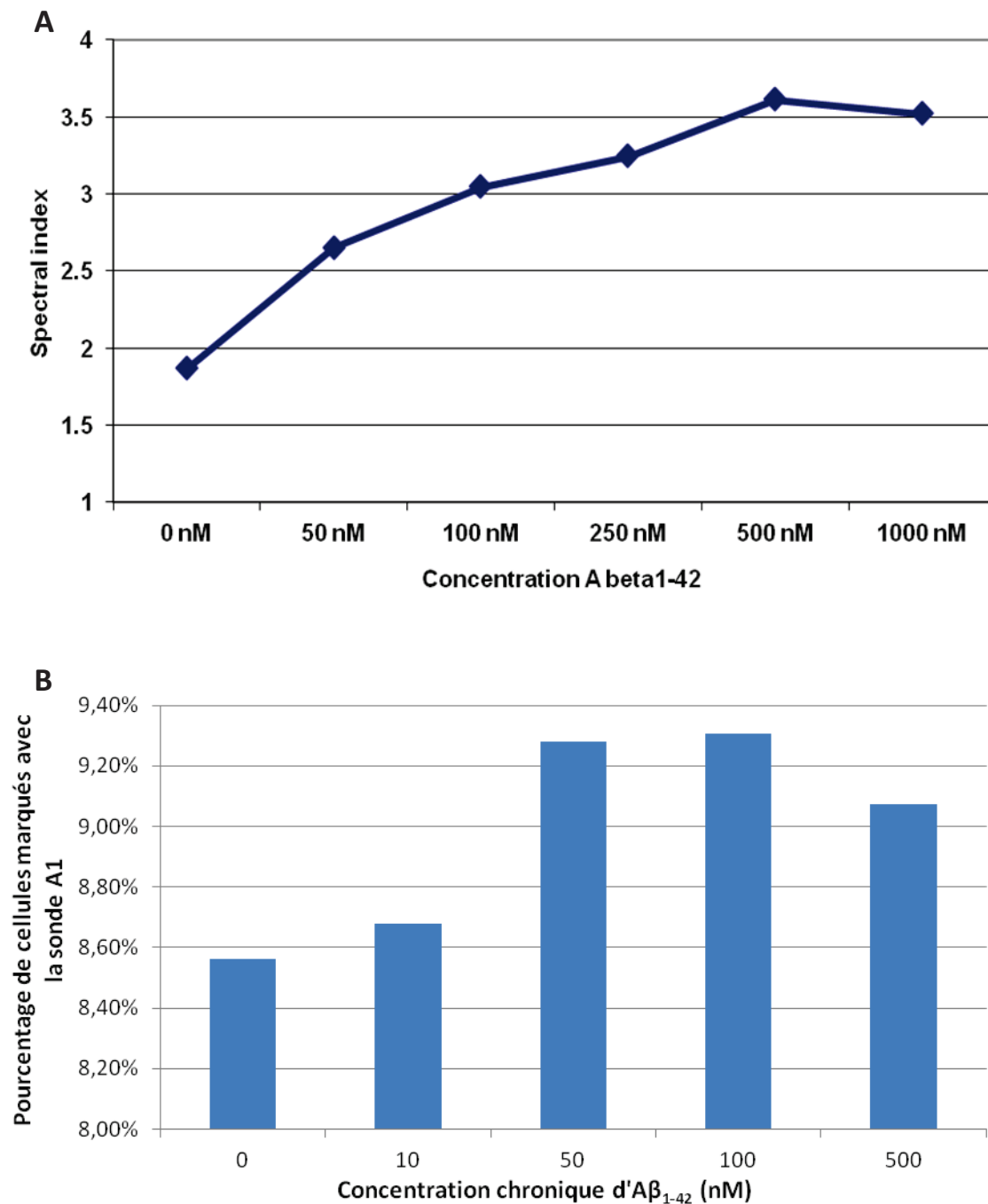


Figure 45. La préincubation des globules rouges humains avec du peptide Aβ₁₋₄₂ facilite l'adhésion de la sonde A1 sur les membranes plasmiques. Les globules rouges prélevés sur des sujets sains ont été préincubés avec différentes concentrations chroniques de peptide Aβ₁₋₄₂ natif (0-1000nM) pendant 20 minutes puis avec la sonde amyloïde A1 (200 nM) pendant 20 minutes et analysés en spectrofluorimétrie (A) ou en cytométrie en flux (B). L'augmentation de l'indice spectral et du pourcentage de cellules marquées avec la sonde A1 avec la concentration de peptide Aβ₁₋₄₂ indique que la pré-exposition des globules rouges au peptide Aβ₁₋₄₂ facilite la liaison de la sonde A1 sur leurs membranes plasmiques. (Mbebi-Liégeois et al, en préparation)

Selon l'hypothèse amyloïde la maladie d'Alzheimer est en effet liée à une augmentation pathologique de la production de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le système nerveux central. Cet excès de peptide $A\beta_{1-42}$ soluble est partiellement éliminé dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) puis dans la circulation sanguine. La concentration plasmatique de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le sang des patients Alzheimer (de l'ordre du nM) reste trop faible pour être quantifiée par les méthodes classiques (kit ELISA), néanmoins les cellules sanguines des patients Alzheimer sont exposées à une concentration plasmatique de peptide $A\beta_{1-42}$ plus importante que les cellules sanguines des sujets sains. En partant de ce postulat et des résultats que nous avons obtenu in vitro l'équipe scientifique de la société IHD a émis l'hypothèse que la sonde A1 se lierait davantage aux membranes plasmiques de globules rouges prélevés sur ces patients Alzheimer qu'aux membranes plasmiques de globules rouges prélevés sur des sujets sains.

Pour valider cette hypothèse la société IHD a dans un premier temps exposé des globules rouges issus de patients sains à différentes concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$ natif synthétique (0-1000 nM) puis à une concentration fixe de sonde A1 (250 nM) et mesuré la déformation du spectre d'émission et l'indice spectral dans ces différentes conditions. Comme précédemment dans les cellules PC12, ils ont ainsi observé une augmentation dose dépendante de l'indice spectral dans les globules rouges pré-incubés avec du peptide $A\beta_{1-42}$ (Figure 45 A). De même cette équipe a montré en cytométrie en flux que le pourcentage de cellules sanguines (hématies) marquées avec la sonde A1 augmente lorsque celles-ci sont pré-incubées en présence de faibles concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$ synthétique (10-100 nM) (Figure 45 B).

Par la suite des essais précliniques ont été menés sur du sang prélevé sur des souris transgéniques TASTPM (hAPP695swe, PS1M146V) ou sauvages (WT) âgées de 4 ou 14 mois. Il est important de noter que les souris transgéniques TASTPM ne présentent des plaques amyloïdes et des déficits cognitifs qu'à partir de l'âge de 4 mois [685, 686]. Les souris transgéniques âgées de 4 mois utilisées dans cette étude préclinique étaient donc asymptomatiques ou au stade précoce de la maladie au moment du test. En pratique le sang prélevé sur ces animaux est d'abord centrifugé pour ne conserver que les globules rouges qui sont ensuite lavés et incubés en présence de sonde A1 (250 nM) pendant 30 minutes avant d'être analysés en

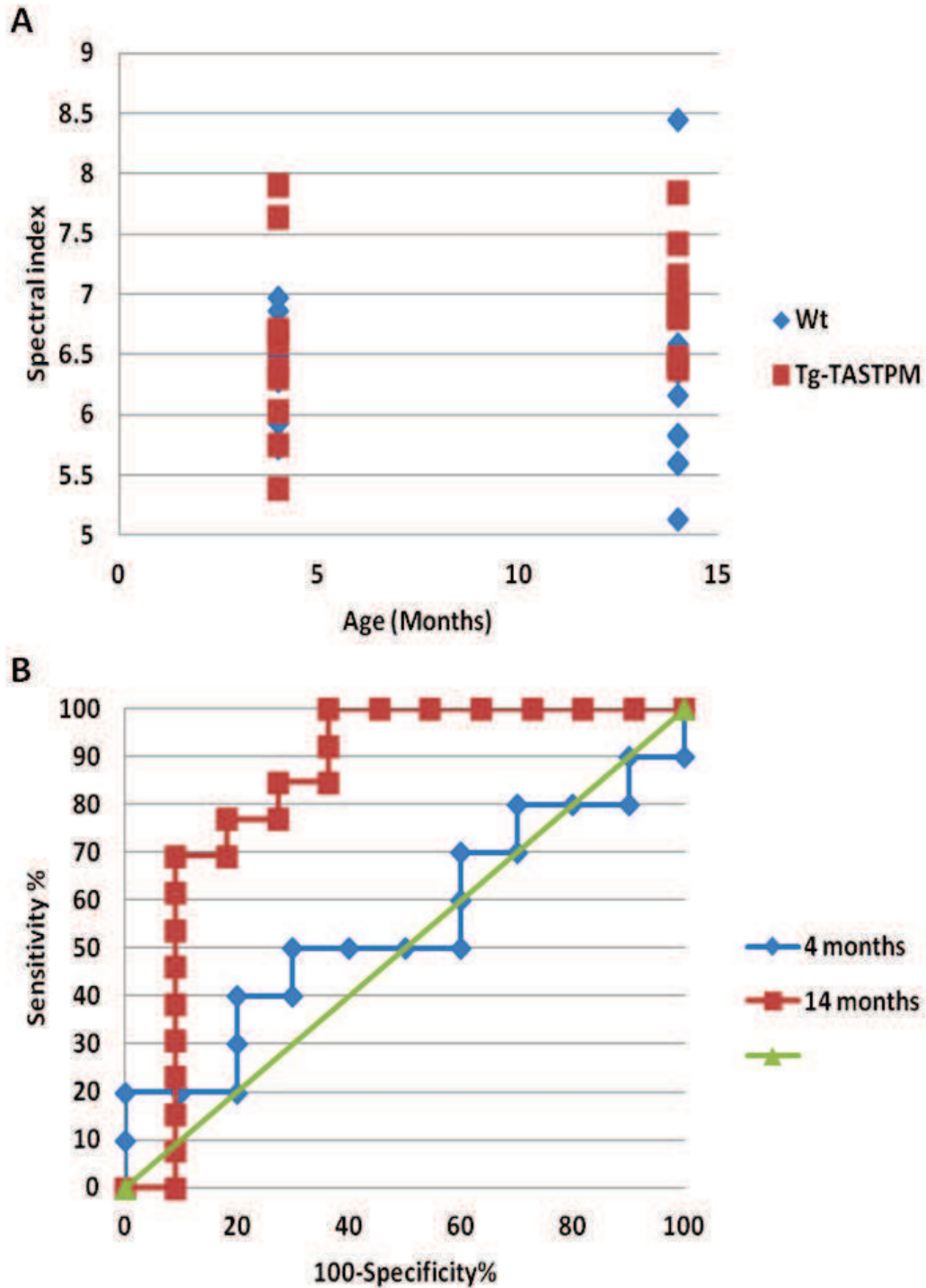


Figure 46. Le test amyloïde permet de discriminer les souris TASTPM malades des souris sauvages saines. Etude préclinique menée sur des globules rouges prélevés sur des souris transgéniques TASTPM ou sauvages âgées de 4 ou de 14 mois. Les globules rouges ont été incubés avec la sonde amyloïde A1 (250 nM) puis analysés en spectrofluorimétrie. (A) Répartition des indices spectraux mesurés à partir des globules rouges analysés en spectrofluorimétrie. (B) Courbe ROC représentant la sensibilité du test amyloïde en fonction de sa spécificité. (Mbebi-Liégeois et al, en préparation)

spectrofluorimétrie. Les résultats de cette étude montrent que pour les souris âgées de 4 mois les indices spectraux mesurés à partir des globules rouges de souris transgéniques ne diffèrent pas significativement de ceux mesurés à partir des globules rouges issus de souris sauvages (Figure 46). En revanche chez les souris âgées de 14 mois il existe une ségrégation plus nette entre les deux groupes ; en effet les indices spectraux mesurés à partir des globules rouges de souris transgéniques sont en moyenne plus élevés que ceux mesurés à partir des globules rouges des souris sauvages. Les courbes ROC qui représentent la sensibilité du test en fonction de sa spécificité confirment que le test sanguin permet une meilleure discrimination entre les groupes de souris transgéniques et sauvages lorsque celles-ci sont âgées de 14 mois. Une étude longitudinale sur des souris TASTPM âgées de 4 à 20 mois a de plus montré que la spécificité et la sensibilité du test amyloïde augmente avec l'âge des souris (Figure 47).

Au cours d'une étude clinique menée récemment, la société IHD a effectué ce test amyloïde sur des hématies provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (n = 58), de patients atteints d'autres maladies neurodégénératives (n = 18), ou de sujets sains (n = 32). Les résultats représentés par une courbe Roc (Figure 48) montrent que le test amyloïde permet de distinguer les patients Alzheimer des autres patients et des sujets sains avec une sensibilité de plus de 83 % et une spécificité de plus de 82 % (aire sous la courbe > 91 %). Ce test amyloïde est donc susceptible de satisfaire les attentes des neurologues en matière de test diagnostique pour la maladie d'Alzheimer. De plus ce test amyloïde est rapide et non invasif car réalisé à partir d'un simple échantillon de sang. Il constituerait par conséquent un bon test de détection pour la maladie d'Alzheimer.

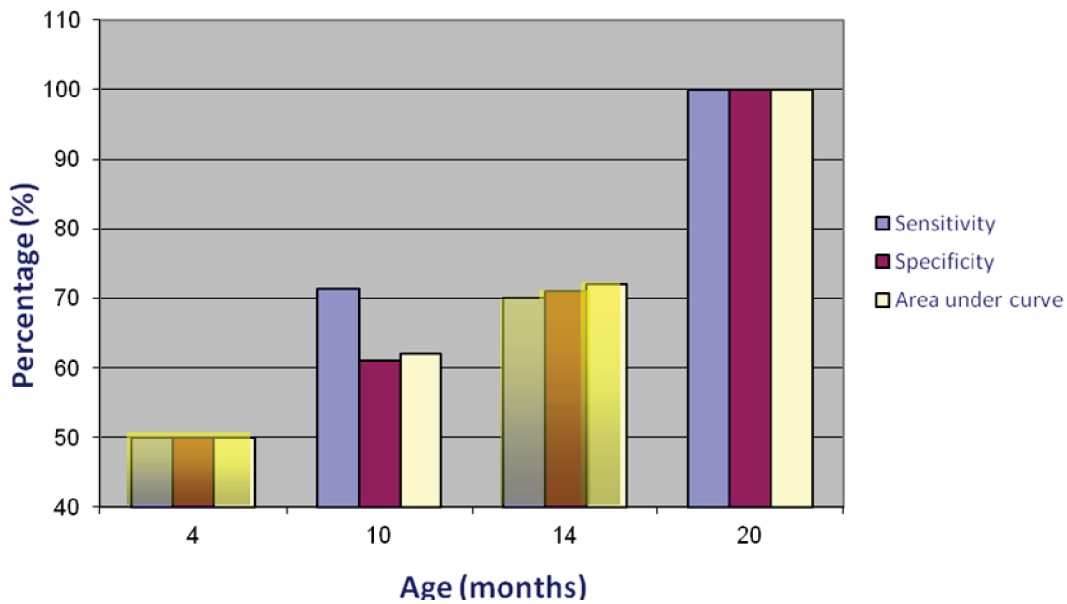


Figure 47. La spécificité et la sensibilité du test amyloïde augmente avec l'âge des souris TASTPM et sauvages. Etude préclinique menée sur des globules rouges prélevés sur des souris transgéniques TASTPM ou sauvages âgées de 4, 10, 14 ou 20 mois. Les globules rouges ont été incubés avec la sonde amyloïde A1 (250nM) puis analysés en spectrofluorimétrie (4 et 14 mois) ou en cytométrie de flux (10 et 20 mois). L'histogramme représente pour chaque groupe de souris la spécificité et la sensibilité du test ainsi que l'aire sur la courbe ROC. (Mbebi-Liégeois et al, en préparation)

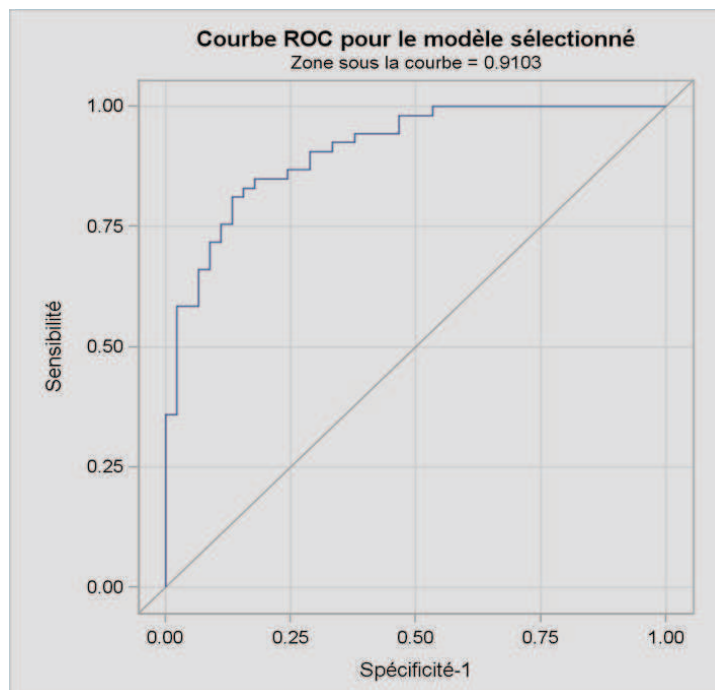


Figure 48. Le test amyloïde permet de détecter la maladie d'Alzheimer avec une sensibilité de plus de 83% et une spécificité de plus de 82%. Courbe ROC représentant les résultats de l'étude clinique du test amyloïde sur des hématies humaines. Les hématies sont issues de prélèvements sanguins effectués sur 58 patients Alzheimer, 18 patients atteints d'une autre maladie neurodégénérative et 32 volontaires sains.

5. Conclusion finale

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier l'interaction du peptide $A\beta_{1-42}$ avec les membranes plasmiques des cellules nerveuses et les conséquences de cette interaction sur la physiologie cellulaire et en particulier sur l'homéostasie calcique intracellulaire. Le peptide $A\beta_{1-42}$ peut adopter différentes formes selon son niveau d'agrégation ; il peut en effet être retrouvé sous forme de monomères, d'oligomères de taille variable (2 à 24 sous unités), de protofibrilles ou de fibrilles. Nous avons montré dans cette étude que le peptide interagit avec les membranes plasmiques principalement sous forme de monomères ou d'oligomères de faible ou de haut poids moléculaires. Nous n'avons en revanche pas pu déterminer si ces monomères et ces oligomères adhèrent simplement à la surface des cellules ou s'ils s'insèrent dans les membranes plasmiques formant ainsi des points d'ancrage facilitant l'adhésion ou la formation d'autres oligomères $A\beta$ ou des pores permettant le passage de diverses espèces ioniques à travers ces membranes. Quoiqu'il en soit nous avons observé que l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire provoque une rapide augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules PC12 différenciées, les neurones et les astrocytes. Dans les astrocytes nous avons constaté que l'injection extracellulaire de peptide $A\beta_{1-42}$ induit la formation d'oscillations calciques ou une augmentation de la fréquence et de l'amplitude d'oscillations calciques préexistantes. Cependant les données que nous avons obtenues ne nous permettent ni de déterminer avec certitude sous quelle(s) forme(s) le peptide $A\beta$ interagit avec les membranes plasmiques astrocytaires ni quelles voies de signalisation et/ou métaboliques sont impliquées dans la génération et l'amplification de ces oscillations ni si cette interaction a une incidence sur la survie des astrocytes et des neurones et sur le fonctionnement du réseau neuroglial. Dans les cellules PC12 différenciées et les neurones nous ne pouvons pas tout à fait exclure que les monomères et les oligomères de faibles poids moléculaires interagissent avec les membranes plasmiques et activent, inhibent ou modulent différentes cascades métaboliques intracellulaires. Nous avons cependant observé que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'injection de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire est essentiellement provoquée par l'interaction des oligomères de haut poids moléculaire (dodécamères) avec les membranes plasmiques. Nous avons aussi constaté que la génération de cette réponse calcique nécessite l'activation des

récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B mais nous ignorons encore si les oligomères A β activent ces récepteurs directement, en se fixant sur un site de la sous unité NR2B et en facilitant la libération du blocage Mg²⁺ par exemple, ou indirectement notamment en activant d'autres récepteurs (récepteurs tyrosine-kinase, récepteurs métabotropes, ...) et/ou en stimulant la libération de glutamate par les cellules gliales par exemple. Par ailleurs les NMDARs étant des récepteurs ionotropes perméables notamment au calcium nous sommes partis du principe que l'activation des NMDARs par les oligomères entraîne l'ouverture de leur canal et un influx de calcium dans nos cellules éventuellement secondé par une libération des ions Ca²⁺ stockés dans les réservoirs intracellulaires de calcium, suivant un mécanisme connu sous le nom de libération de calcium induite par le calcium (CICR). Cependant une étude publiée très récemment suggère que les oligomères A β activeraient plutôt la fonction métabotrope des NMDARs contenant la sous unité NR2B en provoquant un changement de conformation de ces récepteurs [687].

Au fur et à mesure de l'évolution de la maladie d'Alzheimer les lésions neuropathologiques caractéristiques de la maladie et en particulier les plaques amyloïdes se multiplient et se propagent dans le système nerveux central suivant une progression analogue à ce qu'on observe notamment dans les maladies à prions : de proche en proche ou vers des régions saines reliées aux régions affectées par des connections axoniques. De plus les fibrilles A β , principal constituant des plaques amyloïdes, pourraient éventuellement constituer des réservoirs à partir desquels les peptides A β sous forme soluble diffuseraient dans le tissu nerveux en formant un gradient de concentration. Dans ces conditions nous pouvons supposer qu'au cours de la maladie les cellules nerveuses localisées dans les régions cérébrales saines sont dans un premier temps exposées à de faibles concentrations de peptide A β provenant des régions affectées puis, à mesure que les lésions s'étendent, à des concentrations plus élevées de peptide A β . Cette pré-exposition des cellules nerveuses à de faibles concentrations de peptide A β pourrait modifier la façon dont le peptide A β interagit ultérieurement avec la membrane plasmique et la réponse des cellules nerveuses à cette interaction. Nous avons souhaité vérifier cela en pré-incubant pendant 20 heures environ des cultures de cellules PC12 différenciées et des cultures primaires d'hippocampes ou de cortex de souris avec de faibles concentrations de peptide A β_{1-42} fraîchement monomérisé avant d'ajouter une concentration plus élevée de peptide A β_{1-42} dans le milieu

extracellulaire. Nous avons ainsi constaté qu'une pré-exposition des cultures de cellules PC12 différenciées et des cultures primaires à de faibles concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$ favorise l'adhésion et/ou la formation d'oligomères $A\beta$ sur les membranes plasmiques au cours du traitement aigu. Il semble donc que l'interaction du peptide $A\beta$ avec la membrane plasmique soit en effet facilitée lorsque les cellules ont été pré-exposées à de faibles concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$. Les concentrations de peptide $A\beta_{1-42}$ que nous avons utilisées pour les traitements chroniques (10-50 nM) sont trop faibles pour induire une réponse calcique dans les cellules, nous avons en effet observé que l'amplitude de la réponse calcique dépend de la concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ appliquée sur les cellules et que la réponse calcique obtenue pour une concentration de peptide de 100 nM est très faible. Le traitement chronique des cellules a cependant un impact significatif sur la réponse calcique induite par les oligomères qui se traduit par une potentialisation de la réponse calcique dans les cellules PC12 différenciées et au contraire par une inhibition partielle de la réponse calcique dans les neurones primaires. En accord avec ce que nous avons observé dans la première partie de ce travail cet effet est probablement lié à une surexpression ou à une désensibilisation et/ou une internalisation des récepteurs NMDA membranaires suivant le type cellulaire. Par ailleurs les résultats que nous avons obtenus avec les neurones primaires suggèrent que le peptide $A\beta_{1-42}$ aurait un effet différent selon la concentration et probablement selon la forme sous laquelle il se trouve lorsqu'il est appliqué sur les cellules. Le traitement aigu des neurones primaires avec une concentration élevée d'oligomères $A\beta$ de haut poids moléculaire induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et, sans doute, l'activation de nombreuses voies métaboliques pro-apoptotiques. A contrario le traitement chronique des cultures primaires avec une solution contenant une faible concentration de peptide $A\beta_{1-42}$ en grande partie sous forme de monomères/dimères ou d'oligomères de faible poids moléculaire réduit la réponse calcique induite par les oligomères et aurait par conséquent un effet neuroprotecteur.

Une meilleure compréhension du mode d'action du peptide $A\beta$ et en particulier de la façon dont il interagit avec les membranes plasmiques des cellules nerveuses peut conduire au développement de nouveaux outils thérapeutiques ou diagnostiques pour la maladie d'Alzheimer. La mise en évidence que les oligomères $A\beta_{1-42}$ interagissent spécifiquement avec les récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B ouvre la voie au développement de

nouveaux agents thérapeutiques dont l'action plus ciblée permettrait de traiter tout aussi efficacement les malades en réduisant le risque d'effets secondaires indésirables. En parallèle le principe du test de diagnostique fondé sur l'utilisation de la sonde A1 repose sur la découverte que les oligomères A β se lient préférentiellement aux membranes plasmiques des cellules pré-exposées à de faibles concentrations de peptide A β ₁₋₄₂.

Enfin, dans cette étude nous nous sommes focalisés sur l'interaction du peptide A β avec la membrane plasmique et les récepteurs membranaires et sur l'effet de cette interaction sur l'homéostasie calcique mais il faut garder à l'esprit que le peptide A β peut aussi être endocyté et interagir avec les membranes des organites intracellulaires et que cela génère également de nombreux dysfonctionnements. L'interaction du peptide A β avec les membranes mitochondriales par exemple entraîne notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La libération de ces ROS dans le cytosol perturbe le fonctionnement de nombreux récepteurs et canaux exprimés notamment au niveau des membranes plasmiques ou endoplasmiques et pourrait par conséquent avoir une influence sur l'influx de calcium extracellulaire et/ou la libération de calcium intracellulaire et donc in fine sur la réponse calcique induite par les oligomères A β .

D'autre part le peptide A β module l'expression génique comme l'atteste notamment les dérégulations des niveaux d'expression des ARNm observées dans le plasma des patients Alzheimer ou dans des cultures primaires de neurones traitées avec du peptide A β ₁₋₄₂ [313-315]. Selon plusieurs études récentes cet effet du peptide A β sur la régulation de l'expression génique est vraisemblablement lié à l'activité des NMDARs-NR2B extrasynaptiques. Le couplage entre l'activité membranaire des NMDARs-NR2B et la régulation de l'expression génique nucléaire de gènes favorisant notamment la mort cellulaire [603, 688] implique la translocation dans le noyau de la protéine Jacob [689]. L'application d'oligomères A β (500 nM) sur des cultures primaires de rat induit la relocalisation et une accumulation nucléaire de Jacob, bloquée en cas de co-incubation avec de l'ifenprodil [606]; ceci montre que la relocalisation nucléaire de Jacob induite par les oligomères A β dépend de l'activation des NMDARs-NR2B. Ces données ouvrent également de nouvelles perspectives tant pour la compréhension de la maladie que pour des applications thérapeutiques.

6. Matériels et Méthodes

6.1. Culture de cellules PC12

La lignée cellulaire PC12 (Pheochromocytoma Cells) a été établie à partir d'une tumeur prélevée sur une glande surrénale de rat. Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture composé de milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 additionné de L-Glutamine, de 5 % de sérum de veau foetal, de 10 % de sérum de cheval et d'une solution d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine) à 100 U/ml. Les flacons de culture contenant les cellules PC12 ont été incubés à 37°C sous une atmosphère humidifiée et enrichie en CO₂ (5 %). Pour maintenir la lignée, les cellules ont été repiquées une fois par semaine ou lorsqu'elles étaient à confluence. Les cellules ont été détachées de leur support grâce à une solution de trypsine 2,5 % et re-suspendues dans du milieu de culture. Après centrifugation à 800 rpm, le surnageant a été éliminé, et le culot contenant les cellules a été re-suspendu dans du milieu de culture. La suspension cellulaire ainsi obtenue a été déposée dans des flacons de culture Falcon de 25 cm² ou de 75 cm² (D. Dutscher, France).

Les cellules utilisées pour les expériences d'immunocytochimie ou d'imagerie calcique ont été cultivées dans des boîtes de pétri pour culture cellulaire en polystyrène de 35 mm de diamètre (Corning, D. Dutscher, France) munies de lamelles couvre-objet en verre couverte de poly-L-ornithine (0,5 mg/ml, Sigma-Aldrich, France) ou dans des boîtes à fond de verre (Iwaki, D. Dutscher, Brumath, France) couverte de collagène de type I extrait de queue de rat (0,1 g/l, Sigma-Aldrich, France) puis de poly-L-ornithine (0,5 mg/ml). La différenciation des cellules a été induite en ajoutant du NGF (Nerve Growth Factor ; 50 µg/l) d'origine murine dans le milieu de culture des cellules PC12 le lendemain du repiquage des cellules. Les cellules utilisées pour l'immunocytochimie et sont restées au contact du NGF pendant 5 jours et celles utilisées en imagerie calcique 7 à 8 jours.

Tous les produits composant le milieu de culture, le NGF et la trypsine 2,5% ont été commandés chez Life technologies, France

6.2. Cultures primaires

Les cultures primaires ont été préparées à partir d'hippocampes et de cortex prélevés sur des embryons de souris OF1 (E18 et E16 respectivement). Les femelles OF1 gestantes, originaires des laboratoires Charles River (France) ont été fournies par l'animalerie de l'institut des neurosciences cellulaires et intégratives (Chronobiotron). Les hippocampes et les cortex ont été dissociés séparément dans une solution enzymatique de trypsine-EDTA à 0,05 % (Life technologies, France) pendant 2 minutes à 37°C. La dissociation enzymatique a été arrêtée en ajoutant un volume équivalent de milieu de culture DMEM complété avec du sérum foetal d'origine bovine (FBS, 20%) puis en éliminant le surnageant. Les hippocampes et les cortex ont ensuite été dissociés mécaniquement avec une pipette de polystyrène dans du milieu de culture Neurobasal complété avec du B27 (2 %), du glutamax (1 %) et des antibiotiques (streptomycine 100 µg/mL, pénicilline 100 unité/mL). La solution de cellules ainsi obtenues a été centrifugée à 700 rpm pendant 5 minutes puis les culots ont été ré-suspendus dans du milieu de culture Neurobasal complété et ensemencés dans des boîtes de cultures à fond de verre (Iwaki, D. Dutscher, Brumath, France) ou dans des boîtes de culture cellulaire en polystyrène de 35 mm de diamètre (Corning, D. Dutscher, Brumath, France) munies de lamelles couvre-objet en verre amovibles préalablement couvertes de collagène de type I extrait de queue de rat (0,1 g/L) et de poly-L-lysine (25 µg/mL). Les cultures ont été conservées à 37°C sous une atmosphère humidifiée et enrichie en CO₂ (5 %) pendant 9 à 14 jours avant traitement avec du peptide Aβ₁₋₄₂ ou Aβ₄₂₋₁ (cf. 6.3). Le milieu de culture a été partiellement renouvelé (50 %) tous les deux jours.

Tous les produits cités ci-dessus ont été commandés chez Gibco (Life technologies, France) excepté le collagène de type et la de poly-L-lysine commandés chez Sigma-Aldrich (France).

6.3. Préparation de solutions enrichies en monomères ou oligomères et traitements peptidiques

Les peptides $A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{42-1}$ (Bachem, Bubendorf, Suisse ou AnaSpec, Fremont, CA, USA) et la sonde amyloïde A1 fournis sous forme de poudre lyophilisée par Bachem sont dans un premier temps dissous dans de l'hexafluoroisopropanol (HFIP, Sigma-Aldrich, France) ($[A\beta]_{HFIP} = 0,1mM$), incubés 15 à 20 minutes à température ambiante dans des microtubes hermétiquement fermés. Après centrifugation à 14 000 g pendant 15 minutes le surnageant est aliquoté et conservé dans des microtubes ouverts jusqu'à complète évaporation du solvant et formation au fond des microtubes de films de peptide $A\beta$ qui peuvent être conservés à $-80^{\circ}C$.

L'HFIP détruit les feuilletts β et déstabilise les liaisons hydrophobes. Il provoque ainsi la dissociation des oligomères, des protofibrilles et des fibrilles. Les peptides $A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{42-1}$ ou la sonde A1 qui composent les films peptiques sont donc sous forme monomérique. Pour préparer une solution enrichie en monomères le film peptidique doit être dissout dans du DMSO (Sigma-Aldrich, France) ($[A\beta/A1]_{DMSO} = 1 \mu M$) puis rapidement dilué à la concentration désirée dans la solution tampon ou le milieu de culture adapté avant l'expérience.

Pour le traitement chronique des cultures primaires et des cultures de cellules PC12 les solutions stocks de peptide $A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{42-1}$ monomérisé et dissout dans le DMSO ont été immédiatement diluées dans le milieu de culture (Neurobasal complétement pour les cultures primaires et RPMI complétement pour les cellules PC12) à 5 nM (Figure 32), 10 nM (Figure 31) ou 50 nM (Figures 33, 34, et 35) puis appliquées sur les cellules et conservées à $37^{\circ}C$ pendant 20 heures environ. Pour vérifier si les monomères $A\beta$ peuvent induire une réponse calcique (Figure 22) la solution de peptide $A\beta$ monomérisé et dissout dans le DMSO a été diluée dans une solution tampon Hepes (D-Glucose 5.5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 2mM, NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, Hepes 10 mM, pH 7.4) et injectée dans le milieu extracellulaire des cultures primaires et des cultures de cellules PC12 au cours de l'enregistrement en imagerie calcique (voir 6.5).

Pour préparer une solution enrichie en oligomères le film de peptide A β ou de sonde A1 est dissout dans du DMSO comme précédemment puis dilué dans une solution tampon saline : D-Glucose 5.5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, Hepes 10 mM, pH 7.4 pour les peptides A β ₁₋₄₂ et A β ₄₂₋₁ ([A β]=100 μ M) ou NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, Glucose 1 mM, CaCl₂ 0,5 mM, pH 7,4 pour la sonde A1 ([A1]=110 μ M). Ces solutions sont conservées à 4°C pendant 24 heures puis centrifugées à 14 000g pendant 10 minutes pour éliminer les protofibrilles et les fibrilles. Le surnageant contenant les oligomères A β ₁₋₄₂, A β ₄₂₋₁ ou A1 est ensuite dilué dans la solution tampon adaptée avant l'expérience.

Pour le traitement aigu des cultures de cellules PC12 ou des cultures primaires les solutions d'oligomères A β ₁₋₄₂, A β ₄₂₋₁ ou A1 sont diluées dans du tampon PBS (Figures 19, 32) ou Hepes (toutes figures sauf figures 19, 32) afin que la concentration finale de peptide ou de sonde A1 soit de 200 nM (Figures 32) ou de 1 μ M (Toutes figures sauf figure 32). Pour les expériences d'immunocytochimie les solutions d'oligomères sont appliquées sur les cellules pendant 10 minutes à température ambiante puis les cellules sont lavées et fixées. Pour les expériences d'imagerie calcique les solutions d'oligomères sont injectées dans le milieu extracellulaire à température ambiante 3 à 5 minutes après le début de l'enregistrement.

6.4. Immunocytochimie

6.4.1. Cellules PC12

Les cellules PC12 ont étéensemencées sur des lamelles couvre-objet en verre recouvertes de poly-L-ornithine (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich) et conservées à 37°C pendant 5 jours dans du milieu de culture complémenté avec du NGF pour induire la différenciation. Selon les conditions expérimentales les cellules ont ensuite reçu un traitement chronique et/ou un traitement aigu avec du peptide A β ₁₋₄₂ ou A β ₄₂₋₁ (cf. 6.3). Les cellules ont ensuite été lavées pour éliminer le peptide A β non lié et fixées avec du para-formaldéhyde 4 % dans du tampon PBS (NaPO₄.2H₂O 14,54 g/L, NaH₂PO₄H₂O 2,52 g/L) pendant 10 minutes. Les cellules PC12 ont été lavées pendant 1 heure avec une solution tampon PBS-Glycine 0,1 M puis incubées dans une solution de saturation (3% d'albumine sérique bovine (BSA, Fischer Scientific,

France) dans du PBS pendant 1 heure. Une solution d'anticorps primaires (voir infra) dilués dans la solution de saturation a été appliquée sur les cellules pendant une nuit complète (≈ 20 heures) à 4°C. Les cellules ont été lavées trois fois pendant 10 minutes avec la solution de saturation et incubées pendant 2 heures dans une solution contenant les anticorps secondaires appropriés dilués dans la solution de saturation à température ambiante puis à nouveau lavées pendant trois fois 10 minutes dans du PBS et montées entre lame et lamelle de verre dans du Mowiol. Les lames ont été observées et les images acquises avec un microscope confocal LSM510 (Carl Zeiss, Munich, Allemagne) et le logiciel d'acquisition associé (Figures 19, 20, 21, 34, 35 et 42) ou un microscope inversé à épifluorescence DIAPHOT-TMD (Nikon), une camera digitale DXM1200 (Nikon) et le logiciel Metamorph software (Molecular Devices) (Figure 32). Les images ont finalement été analysées par le logiciel Image J (NIH) pour la quantification de l'intensité de fluorescence.

6.4.2. Cultures primaires

Les cultures primaires d'hippocampe ou de cortex de souris OF1 ont étéensemencées sur des lamelles couvre-objet en verre recouvertes de collagène de type I extrait de queue de rat (0,1 g/L) et de poly-L-lysine (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et conservées à 37°C pendant 8 ou 9 jours. Selon les conditions expérimentales les cellules ont ensuite reçu un traitement chronique et/ou un traitement aigu avec du peptide $A\beta_{1-42}$ ou $A\beta_{42-1}$ (cf. § 6.3). Les cellules ont ensuite été lavées pour éliminer le peptide $A\beta$ non lié et fixées avec du para-formaldéhyde 4 % dans du tampon PBS ($\text{NaPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14,54 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,52 g/L) pendant 30 minutes. Les cellules ont été lavées pendant 30 minutes avec une solution tampon PBS-Glycine 0,1 M, les membranes plasmiques ont été perméabilisées avec une solution de PBS-0,1 % Triton, puis les cultures primaires ont incubé toute la nuit dans une solution de saturation (1 % de BSA et 10 % de sérum de chèvre dilué dans du PBS). Une solution d'anticorps primaires (voir infra) dilués dans une solution PBS contenant 1% de BSA et 5 % de sérum de chèvre (GtS) a été appliquée sur les cellules pendant une nuit complète à 4°C. Les cellules ont été lavées trois fois pendant 15 minutes avec la solution PBS-1%BSA-5%GtS et incubées pendant 2 heures dans une solution contenant les anticorps secondaires appropriés dilués dans la solution PBS-1%BSA-5%GtS à température ambiante puis à nouveau lavées pendant trois fois 15 minutes

dans du PBS et montées entre lame et lamelle de verre dans du Mowiol. Les lames ont été observées et les images acquises avec un microscope confocal LSM510 (Carl Zeiss, Munich, Allemagne) et le logiciel d'acquisition associé. Enfin Les images ont été analysées par le logiciel Image J (NIH) pour la quantification de l'intensité de fluorescence.

6.4.3. Anticorps primaires et secondaires

Pour visualiser les peptides A β liés aux membranes plasmiques nous avons utilisé l'anticorps primaire conformationnel A11 (1 :1500, anticorps polyclonal de lapin [401], Chemicon, Millipore, France) qui reconnaît spécifiquement les oligomères A β (Figures 19 et 32), l'anticorps primaire séquentiel α A β (1 :1000, anticorps monoclonal de souris, Sigma-Aldrich, France) ou l'anticorps primaire séquentiel 6E10 (1 :1000, anticorps monoclonal de souris, Signet, Covance Inc., Rueil-Malmaison, France) qui reconnaît toutes les formes de peptide A β (Figures 21, 34, 35, et 42).

Nous avons utilisé les anticorps dirigés contre la protéine Map2 (α Map2, 1 :5000, anticorps polyclonal de poulet, Thermo Scientific) (Figures 20, 21, 34 et 42) ou la protéine membranaire Thy-1.2/CD90.2 (α Thy-1.2, 1 :1000, anticorps monoclonal de rat, BD biosciences) (Figures 20) pour distinguer les neurones primaires et l'anticorps dirigé contre la protéine GFAP (α GFAP, anticorps de lapin, Dakopatts, Danemark) pour distinguer les astrocytes (Figures 21 et 34).

L'anticorps α NR2B (1:500, anticorps polyclonal de lapin, abcam, Bristol, UK) a été utilisé pour localiser les récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B dans la membrane plasmique des cellules PC12 (Figure 35).

Enfin nous avons utilisé des anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les immunoglobulines G (IgG) de souris couplé à un Dylight 488 (1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA) (Figure 20) ou à un Dylight 549 (1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA) (Figures 21, 34, 35 et 42), des anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les IgG de lapin couplés à un

Alexa 546 (1:2000, Life technologies, St Aubin, France) (Figures 19 et 32), des anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les IgG de lapin couplés à un Dylight 488 (1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA) (Figures 21, 34, et 35), des anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les IgG de rat couplés à un Dylight 549 (1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA) (Figures 20), et des anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les IgY de poulet couplés à un Dylight 649 (1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA) (Figures 20, 21, 34, et 42).

6.5. Imagerie calcique

Cette technique est fondée sur l'utilisation du Fura 2, une sonde ratiométrique ayant une forte affinité pour les ions calcium, afin de mesurer les variations de la $[Ca^{2+}]_i$. La particularité de cette sonde est que la longueur d'onde permettant d'avoir un pic d'excitation maximal de la fluorescence varie en fonction de la concentration en calcium de la solution dans laquelle se trouve le Fura 2. En effet, lorsque la concentration en ion calcium est élevée, le Fura 2 se lie au calcium, et peut alors être excité à une longueur d'onde de 340 nm. En absence de calcium en revanche le Fura 2 libre est excitable à une longueur d'onde de 380 nm. Dans les deux cas la longueur d'onde d'émission du Fura 2 est de 510 nm. Le calcul du rapport normalisé entre les intensités de fluorescence émises à 510 nm lorsque les cellules sont excitées à 350 nm et lorsqu'elles sont excitées à 380 nm (F_{350}/F_{380}) permet ainsi de mesurer les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ tout en s'affranchissant des variations artefactuelles liées à une fuite de la sonde, à une mauvaise répartition du Fura entre et dans les cellules ou encore à une extinction de la fluorescence (photobleaching). Pour nos expériences, nous utilisons un dérivé acétoxyméthylé du Fura 2 (Fura 2-AM, Life technologies, St Aubin, France). Ce dérivé est hydrophobe et peut donc aisément traverser les membranes plasmiques cellulaires. La diffusion du Fura 2-AM au travers des membranes plasmiques peut encore être améliorée par l'addition d'acide pluronique dans le milieu extracellulaire. Le Fura 2-AM est ultérieurement hydrolysé par des estérases cytosoliques non spécifiques et perd alors la capacité de traverser les membranes plasmiques.

Les cellules PC12 et les cultures primaires ont été cultivées dans des boîtes à fond de verre (Iwaki, D. Dutscher, Brumath, France) préalablement recouvertes de couvertes de collagène de type I extrait de queue de rat (0,1 g/l Sigma-Aldrich, France) puis de poly-L-ornithine (0,5 mg/ml) pour les cellules PC12 ou de poly-L-lysine (25 µg/ml, Sigma-Aldrich, France) pour les cultures primaires.

Pour les expériences présentées sur les (Figures 31, 33 et 43), les cultures primaires ou de cellules PC12 ont reçu un traitement chronique avec du peptide Aβ₁₋₄₂ ou Aβ₄₂₋₁ ou un volume équivalent de solvant (milieu de culture + DMSO) la nuit précédant l'enregistrement.

Les antagonistes des récepteurs NMDA : le D-2-amino-5-phosphonovalérate (D-APV, 10 µM, Tocris Biosciences, United Kingdom), l'acide 5,7-Dichlorokynurenique (5,7-DCK, 10 µM, Tocris Biosciences, United Kingdom), la Mémantine (10 µM, Tocris Biosciences, United Kingdom), le MK-801 (10 µM, Tocris Biosciences, United Kingdom) et l'ifenprodil (5 µM, Tocris Biosciences, United Kingdom) ont été ajoutés dans le milieu extracellulaire avant le début de l'enregistrement. De même la tétródotoxine (TTX, 1.10⁻⁷ M) utilisée uniquement au cours des expériences d'imagerie calcique réalisées sur des cultures primaires est ajoutée dans le milieu extracellulaire avant le début de l'enregistrement.

Les oligomères de peptide Aβ₁₋₄₂ ou Aβ₄₂₋₁ (concentration finale 1 µM sauf pour l'expérience de dose réponse présentée sur la Figure 23) et le NMDA (concentration finale 10 µM, abcambiochemicals, Cambridge, UK) ont été dilués dans du tampon Hepes et injectés dans le milieu extracellulaire 3 à 5 minutes après le début de l'enregistrement. Pour les conditions contrôles un volume équivalent de solvant (tampon Hepes + DMSO) a été injecté dans le milieu extracellulaire.

Les cellules PC12 et les cellules primaires ont été chargées avec du Fura-2 AM (1 µM et 2 µM respectivement, Life technologies, St Aubin, France) et un volume équivalent d'acide pluronique (Life technologies, St Aubin, France) dans une solution tampon Hepes (D-Glucose 5.5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, Hepes 10 mM, pH 7.4) pendant 20 minutes à 37°C. Les cellules ont été rincées trois fois puis à nouveau incubées

pendant 20 minutes dans une solution tampon Hepes à 37°C pour assurer une hydrolyse complète de la sonde avant l'enregistrement. Les cellules PC12 et les cellules primaires sont rincées une dernière fois avec la solution tampon Hepes avant le début de l'enregistrement et maintenues dans cette solution et à température ambiante pour la durée de l'acquisition. Les données ont été enregistrées avec un microscope Axiovert 135 (Carl Zeiss, Munich, Germany), une caméra digitale Am-CDD (Hamamatsu photonics) et le logiciel MetaFluor (Molecular Devices). La fluorescence a été excitée avec une lampe xénon équipée de deux filtres alternant permettant une excitation à 350 nm pour le Fura lié au Ca^{2+} et à 380 nm pour Fura-2 libre. La fluorescence émise a été mesurée à partir de régions d'intérêt centrées sur les cellules. Nous avons capturé une paire d'image toutes les 5 secondes. Les rapports de fluorescence normalisés ont été calculés en divisant les ratios de l'intensité de fluorescence émise par les cellules excitées à 350 nm sur l'intensité de fluorescence émise par les cellules excitées à 380 nm par la moyenne de ces ratio mesurée avant l'injection de peptide A β , de NMDA ou de solvant ($(F_{350}/F_{380})/\text{moyenne}(F_{350_{\text{basal}}}/F_{380_{\text{basal}}})$). Les variations de ces ratios normalisés reflètent les variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

6.6. Western blot

Les solutions de peptide ou de sonde amyloïde A1 préparées comme indiqué dans les paragraphes correspondants (§ 3.1 et 4.2) ont été diluées au 1/10^{ème} dans du tampon d'échantillonnage (Tris HCl 31,5 mM, glycérol 15 %, SDS 1 %, bleu de bromophénol 0,000125 %, DTT 10 %, pH 6,8), chauffées à 80°C pendant 5 minutes puis déposées sur un gel de polyacrylamide tris-glycine 4-20 % (Novex, Life technologies, St Aubin, France) de telle sorte que chaque puits contienne 10 pg de peptide. La séparation électrophorétique a été effectuée dans du tampon de migration tris-glycine SDS Novex (Life Technologies, St Aubin, France) à 125 mV pendant 1h40. Les gels ont ensuite été transférés sur des membranes de nitrocellulose (1h15 à 125 mA, tampon de transfert : Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0.02 %, éthanol 20 %). A l'aide du système SNAP i.d. (Millipore, France) les membranes ont été saturées dans une solution de lait écrémé (Régilait) à 0,5 % et de Tween 20 à 0,1 % dilué dans du PBS, incubées pendant 15 minutes avec l'anticorps primaire 6E10 (1 :1000, Signet Laboratories, Covance Inc., Rueil-Malmaison, France), lavées trois fois, et incubées avec

l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé à la HRP (Horse Raddish Peroxidase) (1 :30 000, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc, West Grove, PA, USA). La détection finale du signal a été réalisée par chimioluminescence (Supersignal west femto sensitivity substrate, Thermo Scientific, Rockford, IL) avec des films photographiques CL-Xposure (Thermo Scientific, Rockford, IL).

6.7. Analyses statistiques

Les valeurs exprimées sont des valeurs moyennes flanquées de l'écart type à la moyenne (moyenne \pm écart type). La significativité des différences entre les groupes expérimentaux a été évaluée par des tests d'analyse de la variance (ANOVA) et des tests t de Student.

7. Bibliographie

1. Maurer, K., S. Volk, and H. Gerbaldo, *Auguste D and Alzheimer's disease*. Lancet, 1997. **349**(9064): p. 1546-9.
2. Hodges, J.R., *Alzheimer's centennial legacy: origins, landmarks and the current status of knowledge concerning cognitive aspects*. Brain, 2006. **129**(Pt 11): p. 2811-22.
3. Cipriani, G., et al., *Alzheimer and his disease: a brief history*. Neurol Sci, 2011. **32**(2): p. 275-9.
4. Hippius, H. and G. Neundorfer, *The discovery of Alzheimer's disease*. Dialogues Clin Neurosci, 2003. **5**(1): p. 101-8.
5. Alzheimer, A., *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*. Allg Zschr Psychiatr Psych gerichtl Med, 1907. **64**: p. 146.
6. Perusini, G., *Über klinisch und histologisch eigenartige psychische Erkrankungen des späteren Lebensalters. Histologische und histopathologische Arbeiten über die Gehirnrinde*. Vol III, 1909.
7. Kraepelin, E., *Psychiatrie*. 8th ed. Vol I: Allgemeine Psychiatrie; Vol II: Klinische Psychiatrie. 1910.
8. Redlich, E., *Über miliare sklerose der Hirnrinde bei seniler Atrophie*. Jahrbucher F Psych u Neurol, 1898. **17**: p. 208-216.
9. Fischer, O., *Miliare Nekrosen mit drusigen Wucherungen der Neurofibrillen, eine regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz*. Monatsschr Psychiat Neurol, 1907. **22**: p. 361-72.
10. Goedert, M., *Oskar Fischer and the study of dementia*. Brain, 2009. **132**(Pt 4): p. 1102-11.
11. Fischer, O., *Die presbyophrene Demenz, deren anatomische Grundlage und klinische Abgrenzung*. . Z ges Neurol Psychiat, 1910. **3**(371-471).
12. Blessed, G., B.E. Tomlinson, and M. Roth, *The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects*. Br J Psychiatry, 1968. **114**(512): p. 797-811.
13. Roth, M., B.E. Tomlinson, and G. Blessed, *Correlation between scores for dementia and counts of 'senile plaques' in cerebral grey matter of elderly subjects*. Nature, 1966. **209**(5018): p. 109-10.
14. Tomlinson, B.E., G. Blessed, and M. Roth, *Observations on the brains of demented old people*. J Neurol Sci, 1970. **11**(3): p. 205-42.
15. Drachman, D.A. and J. Leavitt, *Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging?* Arch Neurol, 1974. **30**(2): p. 113-21.
16. Bartus, R.T., et al., *The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction*. Science, 1982. **217**(4558): p. 408-14.
17. Smith, C.M. and M. Swash, *Possible biochemical basis of memory disorder in Alzheimer disease*. Ann Neurol, 1978. **3**(6): p. 471-3.
18. Davies, P. and A.J. Maloney, *Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease*. Lancet, 1976. **2**(8000): p. 1403.
19. Perry, E.K., et al., *Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue*. J Neurol Sci, 1977. **34**(2): p. 247-65.
20. Bowen, D.M., et al., *Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies*. Brain, 1976. **99**(3): p. 459-96.
21. Perry, E.K., et al., *Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia*. Br Med J, 1978. **2**(6150): p. 1457-9.

22. Dunnett, S.B., B.J. Everitt, and T.W. Robbins, *The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions*. Trends Neurosci, 1991. **14**(11): p. 494-501.
23. Book, A.A., R.G. Wiley, and J.B. Schweitzer, *192 IgG-saporin: I. Specific lethality for cholinergic neurons in the basal forebrain of the rat*. J Neuropathol Exp Neurol, 1994. **53**(1): p. 95-102.
24. Holley, L.A., et al., *Cortical cholinergic deafferentation following the intracortical infusion of 192 IgG-saporin: a quantitative histochemical study*. Brain Res, 1994. **663**(2): p. 277-86.
25. Steckler, T., et al., *Cholinergic lesions by 192 IgG-saporin and short-term recognition memory: role of the septohippocampal projection*. Neuroscience, 1995. **66**(1): p. 101-14.
26. Waite, J.J. and L.J. Thal, *Lesions of the cholinergic nuclei in the rat basal forebrain: excitotoxins vs. an immunotoxin*. Life Sci, 1996. **58**(22): p. 1947-53.
27. Waite, J.J., M.L. Wardlow, and A.E. Power, *Deficit in selective and divided attention associated with cholinergic basal forebrain immunotoxic lesion produced by 192-saporin; motoric/sensory deficit associated with Purkinje cell immunotoxic lesion produced by OX7-saporin*. Neurobiol Learn Mem, 1999. **71**(3): p. 325-52.
28. McGaughy, J., et al., *The role of cortical cholinergic afferent projections in cognition: impact of new selective immunotoxins*. Behav Brain Res, 2000. **115**(2): p. 251-63.
29. Musial, A., M. Bajda, and B. Malawska, *Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment*. Curr Med Chem, 2007. **14**(25): p. 2654-79.
30. Raschetti, R., et al., *Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials*. PLoS Med, 2007. **4**(11): p. e338.
31. Birks, J. and R.J. Harvey, *Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(1): p. CD001190.
32. Birks, J., *Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(1): p. CD005593.
33. Burke, D., *Donepezil or memantine improved cognitive functioning in moderate-to-severe Alzheimer disease*. Ann Intern Med, 2012. **156**(12): p. JC6-10.
34. Terry, R.D., N.K. Gonatas, and M. Weiss, *Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia*. Am J Pathol, 1964. **44**: p. 269-97.
35. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.
36. Masters, C.L., et al., *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4245-9.
37. Kidd, M., *Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease*. Nature, 1963. **197**: p. 192-3.
38. Wisniewski, H.M., H.K. Narang, and R.D. Terry, *Neurofibrillary tangles of paired helical filaments*. J Neurol Sci, 1976. **27**(2): p. 173-81.
39. Weingarten, M.D., et al., *A protein factor essential for microtubule assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(5): p. 1858-62.
40. Wood, J.G., et al., *Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 4040-3.
41. Kosik, K.S., C.L. Joachim, and D.J. Selkoe, *Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 4044-8.
42. Nukina, N. and Y. Ihara, *One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein*. J Biochem, 1986. **99**(5): p. 1541-4.
43. Grundke-Iqbal, I., et al., *Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments*. J Biol Chem, 1986. **261**(13): p. 6084-9.

44. Goedert, M., et al., *Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(11): p. 4051-5.
45. Grundke-Iqbal, I., et al., *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(13): p. 4913-7.
46. Hardy, J., *A hundred years of Alzheimer's disease research*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 3-13.
47. Goldgaber, D., et al., *Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease*. Science, 1987. **235**(4791): p. 877-80.
48. St George-Hyslop, P.H., et al., *The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21*. Science, 1987. **235**(4791): p. 885-90.
49. Goate, A., et al., *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease*. Nature, 1991. **349**(6311): p. 704-6.
50. Schellenberg, G.D., et al., *Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease*. Science, 1988. **241**(4872): p. 1507-10.
51. St George-Hyslop, P.H., et al., *Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder*. Nature, 1990. **347**(6289): p. 194-7.
52. Schellenberg, G.D., et al., *Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14*. Science, 1992. **258**(5082): p. 668-71.
53. Sherrington, R., et al., *Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease*. Nature, 1995. **375**(6534): p. 754-60.
54. Levy-Lahad, E., et al., *A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1*. Science, 1995. **269**(5226): p. 970-3.
55. Levy-Lahad, E., et al., *Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus*. Science, 1995. **269**(5226): p. 973-7.
56. Campion, D., et al., *Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(3): p. 664-70.
57. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
58. Hayashi, H., *Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system*. Biol Pharm Bull, 2011. **34**(4): p. 453-61.
59. Fagan, A.M., et al., *Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (-/-), and human apoE transgenic mice*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30001-7.
60. Sanan, D.A., et al., *Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3*. J Clin Invest, 1994. **94**(2): p. 860-9.
61. Wisniewski, T. and B. Frangione, *Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid*. Neurosci Lett, 1992. **135**(2): p. 235-8.
62. Wisniewski, T., et al., *Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro*. Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1030-5.
63. Tiraboschi, P., et al., *Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease*. Neurology, 2004. **62**(11): p. 1977-83.
64. Deane, R., et al., *apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain*. J Clin Invest, 2008. **118**(12): p. 4002-13.
65. Bales, K.R., *Brain lipid metabolism, apolipoprotein E and the pathophysiology of Alzheimer's disease*. Neuropharmacology, 2010. **59**(4-5): p. 295-302.
66. Kim, J., J.M. Basak, and D.M. Holtzman, *The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease*. Neuron, 2009. **63**(3): p. 287-303.
67. Potter, H. and T. Wisniewski, *Apolipoprotein E: Essential Catalyst of the Alzheimer Amyloid Cascade*. Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 489428.
68. Seshadri, S., et al., *Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease*. JAMA, 2010. **303**(18): p. 1832-40.

69. Bertram, L. and R.E. Tanzi, *Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(10): p. 768-78.
70. Bertram, L., C.M. Lill, and R.E. Tanzi, *The genetics of Alzheimer disease: back to the future*. Neuron, 2010. **68**(2): p. 270-81.
71. Borovecki, F., et al., *Unraveling the biological mechanisms in Alzheimer's disease--lessons from genomics*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011. **35**(2): p. 340-7.
72. Lambert, J.C. and P. Amouyel, *Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis?* Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(3): p. 295-301.
73. Harold, D., et al., *Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease*. Nat Genet, 2009. **41**(10): p. 1088-93.
74. Lambert, J.C., et al., *Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease*. Nat Genet, 2009. **41**(10): p. 1094-9.
75. Zhang, Q., et al., *Complement receptor 1 polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer's disease*. Brain Res, 2010. **1348**: p. 216-21.
76. Cirrito, J.R., et al., *Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo*. Neuron, 2008. **58**(1): p. 42-51.
77. Golabek, A., et al., *Amyloid beta binding proteins in vitro and in normal human cerebrospinal fluid*. Neurosci Lett, 1995. **191**(1-2): p. 79-82.
78. Lambert, M.P., et al., *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6448-53.
79. DeMattos, R.B., et al., *Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10843-8.
80. Oda, T., et al., *Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress*. Exp Neurol, 1995. **136**(1): p. 22-31.
81. Rogers, J., et al., *Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes*. Neurobiol Aging, 2006. **27**(12): p. 1733-9.
82. Crehan, H., et al., *Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease*. Immunobiology, 2012. **217**(2): p. 244-50.
83. Alzheimer's disease international, *World Alzheimer Report 2009*. 2009.
84. Kuo, Y.M., et al., *Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains*. J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4077-81.
85. Gong, Y., et al., *Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10417-22.
86. McLean, C.A., et al., *Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1999. **46**(6): p. 860-6.
87. Wang, J., et al., *The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging*. Exp Neurol, 1999. **158**(2): p. 328-37.
88. Deshpande, A., et al., *Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons*. J Neurosci, 2006. **26**(22): p. 6011-8.
89. Lesne, S., et al., *A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 352-7.
90. Kaye, R., et al., *Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46363-6.
91. Demuro, A., et al., *Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17294-300.

92. De Felice, F.G., et al., *Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11590-601.
93. Wang, H.Y., et al., *beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5626-32.
94. Behl, C., et al., *17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(2): p. 473-82.
95. Goodman, Y., et al., *Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons*. J Neurochem, 1996. **66**(5): p. 1836-44.
96. Pike, C.J., *Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease*. J Neurochem, 1999. **72**(4): p. 1552-63.
97. Jaffe, A.B., et al., *Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13065-8.
98. Xu, H., et al., *Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides*. Nat Med, 1998. **4**(4): p. 447-51.
99. Zhang, S., et al., *Estrogen stimulates release of secreted amyloid precursor protein from primary rat cortical neurons via protein kinase C pathway*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(2): p. 171-6.
100. Janicki, S.C. and N. Schupf, *Hormonal influences on cognition and risk for Alzheimer's disease*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2010. **10**(5): p. 359-66.
101. Ryan, J., et al., *Hormonal treatment, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. Int Psychogeriatr, 2008. **20**(1): p. 47-56.
102. Pike, C.J., et al., *Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease*. Front Neuroendocrinol, 2009. **30**(2): p. 239-58.
103. Kennelly, S.P., B.A. Lawlor, and R.A. Kenny, *Blood pressure and dementia - a comprehensive review*. Ther Adv Neurol Disord, 2009. **2**(4): p. 241-60.
104. Nagai, M., S. Hoshida, and K. Kario, *Hypertension and dementia*. Am J Hypertens, 2010. **23**(2): p. 116-24.
105. Biessels, G.J., et al., *Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review*. Lancet Neurol, 2006. **5**(1): p. 64-74.
106. Daviglius, M.L., et al., *Risk factors and preventive interventions for Alzheimer disease: state of the science*. Arch Neurol, 2011. **68**(9): p. 1185-90.
107. Kloppenborg, R.P., et al., *Diabetes and other vascular risk factors for dementia: which factor matters most? A systematic review*. Eur J Pharmacol, 2008. **585**(1): p. 97-108.
108. Shepardson, N.E., G.M. Shankar, and D.J. Selkoe, *Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies*. Arch Neurol, 2011. **68**(10): p. 1239-44.
109. Wagner, G., et al., *Antihypertensive treatment and risk of dementia: a retrospective database study*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2012. **50**(3): p. 195-201.
110. Wolozin, B., et al., *Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors*. Arch Neurol, 2000. **57**(10): p. 1439-43.
111. Jick, H., et al., *Statins and the risk of dementia*. Lancet, 2000. **356**(9242): p. 1627-31.
112. Shepardson, N.E., G.M. Shankar, and D.J. Selkoe, *Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: II. Review of human trials and recommendations*. Arch Neurol, 2011. **68**(11): p. 1385-92.
113. McGuinness, B., et al., *Statins for the prevention of dementia*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(2): p. CD003160.
114. Qiu, C., *Preventing Alzheimer's Disease by Targeting Vascular Risk Factors: Hope and Gap*. J Alzheimers Dis, 2012.

115. Almeida, O.P., et al., *Smoking as a risk factor for Alzheimer's disease: contrasting evidence from a systematic review of case-control and cohort studies*. *Addiction*, 2002. **97**(1): p. 15-28.
116. Anstey, K.J., et al., *Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies*. *Am J Epidemiol*, 2007. **166**(4): p. 367-78.
117. Cataldo, J.K., J.J. Prochaska, and S.A. Glantz, *Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation*. *J Alzheimers Dis*, 2010. **19**(2): p. 465-80.
118. Buchman, A.S., et al., *Total daily physical activity and the risk of AD and cognitive decline in older adults*. *Neurology*, 2012. **78**(17): p. 1323-9.
119. Maci, T., et al., *Physical and cognitive stimulation in Alzheimer Disease. the GAIA Project: a pilot study*. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 2012. **27**(2): p. 107-13.
120. Sattler, C., et al., *Physical fitness as a protective factor for cognitive impairment in a prospective population-based study in Germany*. *J Alzheimers Dis*, 2011. **26**(4): p. 709-18.
121. Christofoletti, G., et al., *Physical activity attenuates neuropsychiatric disturbances and caregiver burden in patients with dementia*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011. **66**(4): p. 613-8.
122. Sattler, C., et al., *Cognitive activity, education and socioeconomic status as preventive factors for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. *Psychiatry Res*, 2012. **196**(1): p. 90-5.
123. Scarmeas, N. and Y. Stern, *Cognitive reserve and lifestyle*. *J Clin Exp Neuropsychol*, 2003. **25**(5): p. 625-33.
124. Alzheimer's disease international, *World Alzheimer Report 2010 - The global economic impact of dementia*. 2010.
125. Jack, C.R., Jr., et al., *Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade*. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(1): p. 119-28.
126. Sperling, R.A., et al., *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*, 2011. **7**(3): p. 280-92.
127. Dubois, B., et al., *Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria*. *Lancet Neurol*, 2007. **6**(8): p. 734-46.
128. Dubois, B., et al., *Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon*. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(11): p. 1118-27.
129. *DSM-IV, Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux*. Elsevier Masson, Paris, 2002.
130. Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh, *"Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. *J Psychiatr Res*, 1975. **12**(3): p. 189-98.
131. Rosen, W.G., R.C. Mohs, and K.L. Davis, *A new rating scale for Alzheimer's disease*. *Am J Psychiatry*, 1984. **141**(11): p. 1356-64.
132. Morris, J.C., *The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules*. *Neurology*, 1993. **43**(11): p. 2412-4.
133. Morris, J.C., et al., *Clinical dementia rating training and reliability in multicenter studies: the Alzheimer's Disease Cooperative Study experience*. *Neurology*, 1997. **48**(6): p. 1508-10.
134. Squire, L.R., *Memory systems of the brain: a brief history and current perspective*. *Neurobiol Learn Mem*, 2004. **82**(3): p. 171-7.
135. Gold, C.A. and A.E. Budson, *Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics*. *Expert Rev Neurother*, 2008. **8**(12): p. 1879-91.
136. Budson, A.E., *Understanding memory dysfunction*. *Neurologist*, 2009. **15**(2): p. 71-9.
137. Hodges, J.R., D.P. Salmon, and N. Butters, *Differential impairment of semantic and episodic memory in Alzheimer's and Huntington's diseases: a controlled prospective study*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1990. **53**(12): p. 1089-95.
138. Locascio, J.J., J.H. Growdon, and S. Corkin, *Cognitive test performance in detecting, staging, and tracking Alzheimer's disease*. *Arch Neurol*, 1995. **52**(11): p. 1087-99.

139. Welsh, K.A., et al., *Detection and staging of dementia in Alzheimer's disease. Use of the neuropsychological measures developed for the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*. Arch Neurol, 1992. **49**(5): p. 448-52.
140. Hodges, J.R., D.P. Salmon, and N. Butters, *Semantic memory impairment in Alzheimer's disease: failure of access or degraded knowledge?* Neuropsychologia, 1992. **30**(4): p. 301-14.
141. Mardh, S., K. Nagga, and S. Samuelsson, *A longitudinal study of semantic memory impairment in patients with Alzheimer's disease*. Cortex, 2012.
142. Huntley, J.D. and R.J. Howard, *Working memory in early Alzheimer's disease: a neuropsychological review*. Int J Geriatr Psychiatry, 2010. **25**(2): p. 121-32.
143. Germano, C. and G.J. Kinsella, *Working memory and learning in early Alzheimer's disease*. Neuropsychol Rev, 2005. **15**(1): p. 1-10.
144. Stopford, C.L., et al., *Working memory, attention, and executive function in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia*. Cortex, 2012. **48**(4): p. 429-46.
145. Woodruff-Pak, D.S., *Eyeblink classical conditioning differentiates normal aging from Alzheimer's disease*. Integr Physiol Behav Sci, 2001. **36**(2): p. 87-108.
146. Hamann, S., E.S. Monarch, and F.C. Goldstein, *Impaired fear conditioning in Alzheimer's disease*. Neuropsychologia, 2002. **40**(8): p. 1187-95.
147. Hernandez, M., et al., *Category-specific semantic deficits in Alzheimer's disease: a semantic priming study*. Neuropsychologia, 2008. **46**(4): p. 935-46.
148. Nakamura, H., et al., *Semantic priming in patients with Alzheimer and semantic dementia*. Cortex, 2000. **36**(2): p. 151-62.
149. Chertkow, H., et al., *Increased semantic priming in patients with dementia of the Alzheimer's type*. J Clin Exp Neuropsychol, 1994. **16**(4): p. 608-22.
150. Knopman, D.S. and M.J. Nissen, *Implicit learning in patients with probable Alzheimer's disease*. Neurology, 1987. **37**(5): p. 784-8.
151. van Halteren-van Tilborg, I.A., E.J. Scherder, and W. Hulstijn, *Motor-skill learning in Alzheimer's disease: a review with an eye to the clinical practice*. Neuropsychol Rev, 2007. **17**(3): p. 203-12.
152. Lyketsos, C.G., et al., *Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2011. **7**(5): p. 532-9.
153. Allegri, R.F., et al., *Neuropsychiatric symptoms as a predictor of caregiver burden in Alzheimer's disease*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2006. **2**(1): p. 105-10.
154. Geda, Y.E., et al., *Prevalence of neuropsychiatric symptoms in mild cognitive impairment and normal cognitive aging: population-based study*. Arch Gen Psychiatry, 2008. **65**(10): p. 1193-8.
155. Hwang, T.J., et al., *Mild cognitive impairment is associated with characteristic neuropsychiatric symptoms*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2004. **18**(1): p. 17-21.
156. Cummings, J.L., *The Neuropsychiatric Inventory: assessing psychopathology in dementia patients*. Neurology, 1997. **48**(5 Suppl 6): p. S10-6.
157. Marshall, G.A., et al., *Positron emission tomography metabolic correlates of apathy in Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2007. **64**(7): p. 1015-20.
158. Hashimoto, H., et al., *Anxiety and regional cortical glucose metabolism in patients with Alzheimer's disease*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2006. **18**(4): p. 521-8.
159. Mega, M.S., et al., *The limbic system: an anatomic, phylogenetic, and clinical perspective*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 1997. **9**(3): p. 315-30.
160. Borson, S. and M.A. Raskind, *Clinical features and pharmacologic treatment of behavioral symptoms of Alzheimer's disease*. Neurology, 1997. **48**(5 Suppl 6): p. S17-24.
161. Wynn, Z.J. and J.L. Cummings, *Cholinesterase inhibitor therapies and neuropsychiatric manifestations of Alzheimer's disease*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2004. **17**(1-2): p. 100-8.
162. Frisoni, G.B., et al., *The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease*. Nat Rev Neurol, 2010. **6**(2): p. 67-77.

163. Thompson, P.M., et al., *Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2003. **23**(3): p. 994-1005.
164. Perl, D.P., *Neuropathology of Alzheimer's disease*. Mt Sinai J Med, 2010. **77**(1): p. 32-42.
165. Perry, G., et al., *Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(9): p. 3033-6.
166. Love, S., et al., *Alz-50, ubiquitin and tau immunoreactivity of neurofibrillary tangles, Pick bodies and Lewy bodies*. J Neuropathol Exp Neurol, 1988. **47**(4): p. 393-405.
167. Mesulam, M.M., C. Geula, and M.A. Moran, *Anatomy of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: effect of physostigmine and tetrahydroaminoacridine on plaques and tangles*. Ann Neurol, 1987. **22**(6): p. 683-91.
168. Hyman, B.T., et al., *A4 amyloid protein immunoreactivity is present in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles*. Neurosci Lett, 1989. **101**(3): p. 352-5.
169. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 741-66.
170. Joachim, C.L., J.H. Morris, and D.J. Selkoe, *Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease*. Am J Pathol, 1989. **135**(2): p. 309-19.
171. Morris, J.C., et al., *Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease*. Neurology, 1996. **46**(3): p. 707-19.
172. Namba, Y., et al., *Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease*. Brain Res, 1991. **541**(1): p. 163-6.
173. Kumar-Singh, S., *Cerebral amyloid angiopathy: pathogenetic mechanisms and link to dense amyloid plaques*. Genes Brain Behav, 2008. **7 Suppl 1**: p. 67-82.
174. Jucker, M. and L.C. Walker, *Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders*. Ann Neurol, 2011. **70**(4): p. 532-40.
175. Pfeifer, L.A., et al., *Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function: the HAAS autopsy study*. Neurology, 2002. **58**(11): p. 1629-34.
176. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathol, 1991. **82**(4): p. 239-59.
177. Josephs, K.A., et al., *Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy*. Ann Neurol, 2008. **63**(2): p. 204-12.
178. Vemuri, P., et al., *Antemortem MRI based STructural Abnormality iNDex (STAND)-scores correlate with postmortem Braak neurofibrillary tangle stage*. Neuroimage, 2008. **42**(2): p. 559-67.
179. Fox, N.C., et al., *Correlation between rates of brain atrophy and cognitive decline in AD*. Neurology, 1999. **52**(8): p. 1687-9.
180. Schott, J.M., et al., *Neuropsychological correlates of whole brain atrophy in Alzheimer's disease*. Neuropsychologia, 2008. **46**(6): p. 1732-7.
181. Cardenas, V.A., et al., *Brain atrophy associated with baseline and longitudinal measures of cognition*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(4): p. 572-80.
182. Giannakopoulos, P., et al., *Pathologic correlates of apraxia in Alzheimer disease*. Arch Neurol, 1998. **55**(5): p. 689-95.
183. Giannakopoulos, P., et al., *Neuroanatomic correlates of visual agnosia in Alzheimer's disease: a clinicopathologic study*. Neurology, 1999. **52**(1): p. 71-7.
184. Brundin, P., R. Melki, and R. Kopito, *Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 301-7.
185. Cerf, E., et al., *Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide*. Biochem J, 2009. **421**(3): p. 415-23.

186. Sarroukh, R., et al., *Transformation of amyloid beta(1-40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(8): p. 1429-38.
187. Xu, Y., et al., *Conformational transition of amyloid beta-peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(15): p. 5403-7.
188. Maeda, S., et al., *Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments*. Biochemistry, 2007. **46**(12): p. 3856-61.
189. Meraz-Rios, M.A., et al., *Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2010. **112**(6): p. 1353-67.
190. von Bergen, M., et al., *Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5129-34.
191. Iqbal, K., et al., *Tau in Alzheimer disease and related tauopathies*. Curr Alzheimer Res, 2010. **7**(8): p. 656-64.
192. Lasagna-Reeves, C.A., et al., *Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease*. FASEB J, 2012. **26**(5): p. 1946-59.
193. Kane, M.D., et al., *Evidence for seeding of beta -amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice*. J Neurosci, 2000. **20**(10): p. 3606-11.
194. Walker, L.C., et al., *Exogenous induction of cerebral beta-amyloidosis in betaAPP-transgenic mice*. Peptides, 2002. **23**(7): p. 1241-7.
195. Meyer-Luehmann, M., et al., *Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host*. Science, 2006. **313**(5794): p. 1781-4.
196. Langer, F., et al., *Soluble Aβ seeds are potent inducers of cerebral beta-amyloid deposition*. J Neurosci, 2011. **31**(41): p. 14488-95.
197. Rosen, R.F., et al., *Exogenous seeding of cerebral beta-amyloid deposition in betaAPP-transgenic rats*. J Neurochem, 2012. **120**(5): p. 660-6.
198. Eisele, Y.S., et al., *Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral versus systemic Aβ inoculation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12926-31.
199. Clavaguera, F., et al., *Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(7): p. 909-13.
200. Frost, B., R.L. Jacks, and M.I. Diamond, *Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell*. J Biol Chem, 2009. **284**(19): p. 12845-52.
201. Nath, S., et al., *Spreading of Neurodegenerative Pathology via Neuron-to-Neuron Transmission of beta-Amyloid*. J Neurosci, 2012. **32**(26): p. 8767-77.
202. Lee, S.J., et al., *Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: problems and perspectives*. Neurosci Res, 2011. **70**(4): p. 339-48.
203. Simons, M. and G. Raposo, *Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(4): p. 575-81.
204. Alvarez-Erviti, L., et al., *Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission*. Neurobiol Dis, 2011. **42**(3): p. 360-7.
205. Fevrier, B., et al., *Cells release prions in association with exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9683-8.
206. Rajendran, L., et al., *Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p. 11172-7.
207. Davis, D.M. and S. Sowinski, *Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(6): p. 431-6.
208. Gousset, K., et al., *Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(3): p. 328-36.
209. Knopman, D.S., et al., *Neuropathology of cognitively normal elderly*. J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(11): p. 1087-95.

210. Price, J.L. and J.C. Morris, *Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease*. *Ann Neurol*, 1999. **45**(3): p. 358-68.
211. Klunk, W.E., et al., *Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B*. *Ann Neurol*, 2004. **55**(3): p. 306-19.
212. Ikonomic, M.D., et al., *Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease*. *Brain*, 2008. **131**(Pt 6): p. 1630-45.
213. Mintun, M.A., et al., *[11C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease*. *Neurology*, 2006. **67**(3): p. 446-52.
214. Aizenstein, H.J., et al., *Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly*. *Arch Neurol*, 2008. **65**(11): p. 1509-17.
215. Villemagne, V.L., et al., *Abeta deposits in older non-demented individuals with cognitive decline are indicative of preclinical Alzheimer's disease*. *Neuropsychologia*, 2008. **46**(6): p. 1688-97.
216. Dickerson, B.C., et al., *The cortical signature of Alzheimer's disease: regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals*. *Cereb Cortex*, 2009. **19**(3): p. 497-510.
217. Chetelat, G., et al., *Accelerated cortical atrophy in cognitively normal elderly with high beta-amyloid deposition*. *Neurology*, 2012. **78**(7): p. 477-84.
218. Wolk, D.A. and W. Klunk, *Update on amyloid imaging: from healthy aging to Alzheimer's disease*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2009. **9**(5): p. 345-52.
219. Wolk, D.A., et al., *Discrimination and reliance on conceptual fluency cues are inversely related in patients with mild Alzheimer's disease*. *Neuropsychologia*, 2009. **47**(8-9): p. 1865-72.
220. Forsberg, A., et al., *PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment*. *Neurobiol Aging*, 2008. **29**(10): p. 1456-65.
221. Maetzler, W., et al., *[11C]PIB binding in Parkinson's disease dementia*. *Neuroimage*, 2008. **39**(3): p. 1027-33.
222. Rabinovici, G.D., et al., *11C-PIB PET imaging in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration*. *Neurology*, 2007. **68**(15): p. 1205-12.
223. Rinne, J.O., et al., *11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study*. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(4): p. 363-72.
224. Fox, N.C. and J. Kennedy, *Structural imaging markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease*. *J Nutr Health Aging*, 2009. **13**(4): p. 350-2.
225. Henneman, W.J., et al., *Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease: added value over whole brain volume measures*. *Neurology*, 2009. **72**(11): p. 999-1007.
226. Chetelat, G., et al., *Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI: a longitudinal MRI study*. *Neuroimage*, 2005. **27**(4): p. 934-46.
227. Barnes, J., et al., *A comparison of methods for the automated calculation of volumes and atrophy rates in the hippocampus*. *Neuroimage*, 2008. **40**(4): p. 1655-71.
228. Bakkour, A., J.C. Morris, and B.C. Dickerson, *The cortical signature of prodromal AD: regional thinning predicts mild AD dementia*. *Neurology*, 2009. **72**(12): p. 1048-55.
229. Hynd, M.R., H.L. Scott, and P.R. Dodd, *Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease*. *Neurochem Int*, 2004. **45**(5): p. 583-95.
230. Fayed, N., et al., *Brain glutamate levels are decreased in Alzheimer's disease: a magnetic resonance spectroscopy study*. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 2011. **26**(6): p. 450-6.
231. Tsai, G. and J.T. Coyle, *N-acetylaspartate in neuropsychiatric disorders*. *Prog Neurobiol*, 1995. **46**(5): p. 531-40.
232. Walecki, J., et al., *N-acetylaspartate, choline, myoinositol, glutamine and glutamate (glx) concentration changes in proton MR spectroscopy (1H MRS) in patients with mild cognitive impairment (MCI)*. *Med Sci Monit*, 2011. **17**(12): p. MT105-11.

233. Herminghaus, S., et al., *Brain metabolism in Alzheimer disease and vascular dementia assessed by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy*. Psychiatry Res, 2003. **123**(3): p. 183-90.
234. Soher, B.J., P.M. Doraiswamy, and H.C. Charles, *A review of 1H MR spectroscopy findings in Alzheimer's disease*. Neuroimaging Clin N Am, 2005. **15**(4): p. 847-52, xi.
235. Modrego, P.J. and N. Fayed, *Longitudinal magnetic resonance spectroscopy as marker of cognitive deterioration in mild cognitive impairment*. Am J Alzheimers Dis Other Dement, 2011. **26**(8): p. 631-6.
236. Jagust, W., *Positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the diagnosis and prediction of dementia*. Alzheimers Dement, 2006. **2**(1): p. 36-42.
237. Silverman, D.H., et al., *Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome*. JAMA, 2001. **286**(17): p. 2120-7.
238. Minoshima, S., et al., *A diagnostic approach in Alzheimer's disease using three-dimensional stereotactic surface projections of fluorine-18-FDG PET*. J Nucl Med, 1995. **36**(7): p. 1238-48.
239. Alexander, G.E., et al., *Longitudinal PET Evaluation of Cerebral Metabolic Decline in Dementia: A Potential Outcome Measure in Alzheimer's Disease Treatment Studies*. Am J Psychiatry, 2002. **159**(5): p. 738-45.
240. Chen, Y., et al., *Voxel-level comparison of arterial spin-labeled perfusion MRI and FDG-PET in Alzheimer disease*. Neurology, 2011. **77**(22): p. 1977-85.
241. de Leon, M.J., et al., *Prediction of cognitive decline in normal elderly subjects with 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose/positron-emission tomography (FDG/PET)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10966-71.
242. Drzezga, A., et al., *Cerebral metabolic changes accompanying conversion of mild cognitive impairment into Alzheimer's disease: a PET follow-up study*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003. **30**(8): p. 1104-13.
243. Hulstaert, F., et al., *Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF*. Neurology, 1999. **52**(8): p. 1555-62.
244. Blennow, K., E. Vanmechelen, and H. Hampel, *CSF total tau, Abeta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease*. Mol Neurobiol, 2001. **24**(1-3): p. 87-97.
245. Fagan, A.M., et al., *Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans*. Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 512-9.
246. Sunderland, T., et al., *Cerebrospinal fluid beta-amyloid1-42 and tau in control subjects at risk for Alzheimer's disease: the effect of APOE epsilon4 allele*. Biol Psychiatry, 2004. **56**(9): p. 670-6.
247. Riemenschneider, M., et al., *Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid 42 proteins identify Alzheimer disease in subjects with mild cognitive impairment*. Arch Neurol, 2002. **59**(11): p. 1729-34.
248. Blennow, K., *CSF biomarkers for mild cognitive impairment*. J Intern Med, 2004. **256**(3): p. 224-34.
249. Blennow, K. and H. Hampel, *CSF markers for incipient Alzheimer's disease*. Lancet Neurol, 2003. **2**(10): p. 605-13.
250. Kapaki, E., et al., *Diagnostic value of CSF biomarker profile in frontotemporal lobar degeneration*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2008. **22**(1): p. 47-53.
251. Mollenhauer, B., et al., *Tau protein, Abeta42 and S-100B protein in cerebrospinal fluid of patients with dementia with Lewy bodies*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2005. **19**(2-3): p. 164-70.
252. Sjogren, M., et al., *Decreased CSF-beta-amyloid 42 in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis may reflect mistreatment of beta-amyloid induced by disparate mechanisms*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2002. **13**(2): p. 112-8.
253. Bateman, R.J., et al., *Fluctuations of CSF amyloid-beta levels: implications for a diagnostic and therapeutic biomarker*. Neurology, 2007. **68**(9): p. 666-9.

254. Arai, H., et al., *Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1995. **38**(4): p. 649-52.
255. Blennow, K., et al., *Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease?* Mol Chem Neuropathol, 1995. **26**(3): p. 231-45.
256. Humpel, C., *Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease*. Trends Biotechnol, 2011. **29**(1): p. 26-32.
257. Otto, M., et al., *Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease*. Neurosci Lett, 1997. **225**(3): p. 210-2.
258. Buerger, K., et al., *Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231*. Arch Neurol, 2002. **59**(8): p. 1267-72.
259. Buerger, K., et al., *Differentiation of geriatric major depression from Alzheimer's disease with CSF tau protein phosphorylated at threonine 231*. Am J Psychiatry, 2003. **160**(2): p. 376-9.
260. Hampel, H., et al., *Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease*. Exp Gerontol, 2010. **45**(1): p. 30-40.
261. Buerger, K., et al., *CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects*. Neurology, 2002. **59**(4): p. 627-9.
262. Buerger, K., et al., *Phosphorylated tau predicts rate of cognitive decline in MCI subjects: a comparative CSF study*. Neurology, 2005. **65**(9): p. 1502-3.
263. Ewers, M., et al., *Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI*. Neurology, 2007. **69**(24): p. 2205-12.
264. Hansson, O., et al., *Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study*. Lancet Neurol, 2006. **5**(3): p. 228-34.
265. Zhong, Z., et al., *Levels of beta-secretase (BACE1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment*. Arch Gen Psychiatry, 2007. **64**(6): p. 718-26.
266. Zetterberg, H., et al., *Elevated cerebrospinal fluid BACE1 activity in incipient Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2008. **65**(8): p. 1102-7.
267. Sihlbom, C., et al., *Structural and quantitative comparison of cerebrospinal fluid glycoproteins in Alzheimer's disease patients and healthy individuals*. Neurochem Res, 2008. **33**(7): p. 1332-40.
268. Hock, C., et al., *Increased CSF levels of nerve growth factor in patients with Alzheimer's disease*. Neurology, 2000. **54**(10): p. 2009-11.
269. Mashayekhi, F. and Z. Salehin, *Cerebrospinal fluid nerve growth factor levels in patients with Alzheimer's disease*. Ann Saudi Med, 2006. **26**(4): p. 278-82.
270. Laske, C., et al., *BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls*. J Psychiatr Res, 2007. **41**(5): p. 387-94.
271. Li, G., et al., *Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects*. PLoS ONE, 2009. **4**(5): p. e5424.
272. Diniz, B.S. and A.L. Teixeira, *Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: physiopathology and beyond*. Neuromolecular Med, 2011. **13**(4): p. 217-22.
273. Tohgi, H., et al., *Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 1999. **269**(1): p. 52-4.
274. Pratico, D., et al., *Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo*. FASEB J, 1998. **12**(15): p. 1777-83.
275. Montine, T.J., et al., *F(2)-isoprostanes as biomarkers of late-onset Alzheimer's disease*. J Mol Neurosci, 2007. **33**(1): p. 114-9.
276. Montine, T.J., et al., *Increased cerebrospinal fluid F2-isoprostanes are associated with aging and latent Alzheimer's disease as identified by biomarkers*. Neuromolecular Med, 2011. **13**(1): p. 37-43.

277. Lovell, M.A., S.P. Gabbita, and W.R. Markesbery, *Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF*. J Neurochem, 1999. **72**(2): p. 771-6.
278. Isobe, C., T. Abe, and Y. Terayama, *Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the CSF of patients with Alzheimer's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process*. J Neurol, 2010. **257**(3): p. 399-404.
279. McGeer, E.G. and P.L. McGeer, *Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy*. J Alzheimers Dis, 2010. **19**(1): p. 355-61.
280. Swardfager, W., et al., *A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease*. Biol Psychiatry, 2010. **68**(10): p. 930-41.
281. Teunissen, C.E., et al., *Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(4): p. 485-508.
282. Galasko, D. and T.J. Montine, *Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease*. Biomark Med, 2010. **4**(1): p. 27-36.
283. Leoni, V., et al., *Are the CSF levels of 24S-hydroxycholesterol a sensitive biomarker for mild cognitive impairment?* Neurosci Lett, 2006. **397**(1-2): p. 83-7.
284. Shafaati, M., et al., *Levels of ApoE in cerebrospinal fluid are correlated with Tau and 24S-hydroxycholesterol in patients with cognitive disorders*. Neurosci Lett, 2007. **425**(2): p. 78-82.
285. Leoni, V., et al., *Diagnostic use of cerebral and extracerebral oxysterols*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(2): p. 186-91.
286. Leoni, V. and C. Caccia, *Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases*. Chem Phys Lipids, 2011. **164**(6): p. 515-24.
287. Mulder, M., et al., *Reduced levels of cholesterol, phospholipids, and fatty acids in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients are not related to apolipoprotein E4*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1998. **12**(3): p. 198-203.
288. Kosicek, M., et al., *Nano-HPLC-MS analysis of phospholipids in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients--a pilot study*. Anal Bioanal Chem, 2010. **398**(7-8): p. 2929-37.
289. Kosicek, M., et al., *Elevated cerebrospinal fluid sphingomyelin levels in prodromal Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 2012. **516**(2): p. 302-5.
290. Haughey, N.J., et al., *Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(8): p. 878-86.
291. Tarawneh, R. and D.M. Holtzman, *Biomarkers in translational research of Alzheimer's disease*. Neuropharmacology, 2010. **59**(4-5): p. 310-22.
292. Chen, M., et al., *Platelets are the primary source of amyloid beta-peptide in human blood*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **213**(1): p. 96-103.
293. Padovani, A., et al., *Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral diagnostic tool and a pharmacological target*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(16): p. 1997-2004.
294. Casoli, T., et al., *Release of beta-amyloid from high-density platelets: implications for Alzheimer's disease pathology*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1096**: p. 170-8.
295. Li, Q.X., et al., *Secretion of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptide by activated human platelets*. Lab Invest, 1998. **78**(4): p. 461-9.
296. Koyama, A., et al., *Plasma Amyloid-beta as a Predictor of Dementia and Cognitive Decline: A Systematic Review and Meta-analysis*. Arch Neurol, 2012.
297. Mayeux, R., et al., *Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk*. Neurology, 2003. **61**(9): p. 1185-90.
298. Pesaresi, M., et al., *Plasma levels of beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. Neurobiol Aging, 2006. **27**(6): p. 904-5.
299. Tamaoka, A., et al., *Amyloid beta protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease*. J Neurol Sci, 1996. **141**(1-2): p. 65-8.

300. Graff-Radford, N.R., et al., *Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2007. **64**(3): p. 354-62.
301. Lambert, J.C., et al., *Association of plasma amyloid beta with risk of dementia: the prospective Three-City Study*. Neurology, 2009. **73**(11): p. 847-53.
302. Seppala, T.T., et al., *Plasma Abeta42 and Abeta40 as markers of cognitive change in follow-up: a prospective, longitudinal, population-based cohort study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010. **81**(10): p. 1123-7.
303. Kuo, Y.M., et al., *Amyloid-beta peptides interact with plasma proteins and erythrocytes: implications for their quantitation in plasma*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **268**(3): p. 750-6.
304. Hye, A., et al., *Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease*. Brain, 2006. **129**(Pt 11): p. 3042-50.
305. Maes, O.C., et al., *Characterization of alpha1-antitrypsin as a heme oxygenase-1 suppressor in Alzheimer plasma*. Neurobiol Dis, 2006. **24**(1): p. 89-100.
306. Matsubara, E., et al., *Alpha 1-antichymotrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia*. Ann Neurol, 1990. **28**(4): p. 561-7.
307. Lieberman, J., et al., *Serum alpha 1-antichymotrypsin level as a marker for Alzheimer-type dementia*. Neurobiol Aging, 1995. **16**(5): p. 747-53.
308. Liu, H.C., et al., *Proteomic identification of lower apolipoprotein A-I in Alzheimer's disease*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2006. **21**(3): p. 155-61.
309. Merched, A., et al., *Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(1): p. 27-30.
310. Aluise, C.D., R.A. Sowell, and D.A. Butterfield, *Peptides and proteins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(10): p. 549-58.
311. Schrijvers, E.M., et al., *Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease*. JAMA, 2011. **305**(13): p. 1322-6.
312. Thambisetty, M., et al., *Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease*. Arch Gen Psychiatry. **67**(7): p. 739-48.
313. Schonrock, N., et al., *Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid-beta*. PLoS ONE, 2010. **5**(6): p. e11070.
314. Delay, C., W. Mandemakers, and S.S. Hebert, *MicroRNAs in Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 2012. **46**(2): p. 285-90.
315. Geekiyanage, H., et al., *Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease*. Exp Neurol, 2012. **235**(2): p. 491-6.
316. Janoshazi, A., et al., *Alteration of protein kinase C conformation in red blood cells: a potential marker for Alzheimer's disease but not for Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2006. **27**(2): p. 245-51.
317. Pratico, D., et al., *Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2002. **59**(6): p. 972-6.
318. Montine, T.J., et al., *No difference in plasma or urinary F2-isoprostanes among patients with Huntington's disease or Alzheimer's disease and controls*. Ann Neurol, 2000. **48**(6): p. 950.
319. Montine, T.J., et al., *Peripheral F2-isoprostanes and F4-neuroprostanes are not increased in Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 2002. **52**(2): p. 175-9.
320. Mufson, E.J. and S. Leurgans, *Inability of plasma and urine F2A-isoprostane levels to differentiate mild cognitive impairment from Alzheimer's disease*. Neurodegener Dis, 2010. **7**(1-3): p. 139-42.
321. Irizarry, M.C., et al., *Plasma F2A isoprostane levels in Alzheimer's and Parkinson's disease*. Neurodegener Dis, 2007. **4**(6): p. 403-5.

322. Engelhart, M.J., et al., *Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study*. Arch Neurol, 2004. **61**(5): p. 668-72.
323. Ray, S., et al., *Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1359-62.
324. Cutler, P., et al., *Proteomic identification and early validation of complement 1 inhibitor and pigment epithelium-derived factor: Two novel biomarkers of Alzheimer's disease in human plasma*. Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(4): p. 467-77.
325. Thambisetty, M., et al., *Plasma biomarkers of brain atrophy in Alzheimer's disease*. PLoS ONE, 2011. **6**(12): p. e28527.
326. Wang, Y., et al., *Complement 3 and factor h in human cerebrospinal fluid in Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple-system atrophy*. Am J Pathol, 2011. **178**(4): p. 1509-16.
327. Lutjohann, D., et al., *Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9799-804.
328. Papassotiropoulos, A., et al., *Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease*. Neuroreport, 2000. **11**(9): p. 1959-62.
329. Bretillon, L., et al., *Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases*. Neurosci Lett, 2000. **293**(2): p. 87-90.
330. Sato, Y., et al., *Quantitative and wide-ranging profiling of phospholipids in human plasma by two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry*. Anal Chem, 2010. **82**(23): p. 9858-64.
331. Li, N.J., et al., *Plasma metabolic profiling of Alzheimer's disease by liquid chromatography/mass spectrometry*. Clin Biochem, 2010. **43**(12): p. 992-7.
332. Han, X., et al., *Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics*. PLoS ONE, 2011. **6**(7): p. e21643.
333. Mielke, M.M., et al., *Serum ceramides increase the risk of Alzheimer disease: The Women's Health and Aging Study II*. Neurology, 2012.
334. Thongboonkerd, V., *Practical points in urinary proteomics*. J Proteome Res, 2007. **6**(10): p. 3881-90.
335. Pratico, D., et al., *Increased 8,12-iso-iPF2alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity*. Ann Neurol, 2000. **48**(5): p. 809-12.
336. Tuppo, E.E., et al., *Sign of lipid peroxidation as measured in the urine of patients with probable Alzheimer's disease*. Brain Res Bull, 2001. **54**(5): p. 565-8.
337. Bohnstedt, K.C., et al., *Determination of isoprostanes in urine samples from Alzheimer patients using porous graphitic carbon liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **796**(1): p. 11-9.
338. Ghanbari, H., et al., *Biochemical assay for AD7C-NTP in urine as an Alzheimer's disease marker*. J Clin Lab Anal, 1998. **12**(5): p. 285-8.
339. Levy, S., et al., *Competitive ELISA studies of neural thread protein in urine in Alzheimer's disease*. J Clin Lab Anal, 2007. **21**(1): p. 24-33.
340. Youn, Y.C., et al., *Urine neural thread protein measurements in Alzheimer disease*. J Am Med Dir Assoc, 2011. **12**(5): p. 372-6.
341. de la Monte, S.M. and J.R. Wands, *The AD7c-ntp neuronal thread protein biomarker for detecting Alzheimer's disease*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d989-96.
342. Monte, S.M., et al., *Characterization of the AD7C-NTP cDNA expression in Alzheimer's disease and measurement of a 41-kD protein in cerebrospinal fluid*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3093-104.

343. Jackson, C.E. and P.J. Snyder, *Electroencephalography and event-related potentials as biomarkers of mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease*. *Alzheimers Dement*, 2008. **4**(1 Suppl 1): p. S137-43.
344. Gianotti, L.R., et al., *Correlation between disease severity and brain electric LORETA tomography in Alzheimer's disease*. *Clin Neurophysiol*, 2007. **118**(1): p. 186-96.
345. Kwak, Y.T., *Quantitative EEG findings in different stages of Alzheimer's disease*. *J Clin Neurophysiol*, 2006. **23**(5): p. 456-61.
346. Liddell, B.J., et al., *Rates of decline distinguish Alzheimer's disease and mild cognitive impairment relative to normal aging: integrating cognition and brain function*. *J Integr Neurosci*, 2007. **6**(1): p. 141-74.
347. Olichney, J.M., et al., *Abnormal verbal event related potentials in mild cognitive impairment and incipient Alzheimer's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002. **73**(4): p. 377-84.
348. Gironell, A., et al., *Usefulness of p300 in subjective memory complaints: a prospective study*. *J Clin Neurophysiol*, 2005. **22**(4): p. 279-84.
349. Bennys, K., et al., *Can event-related potential predict the progression of mild cognitive impairment?* *J Clin Neurophysiol*, 2011. **28**(6): p. 625-32.
350. Babiloni, C., et al., *Frontal white matter volume and delta EEG sources negatively correlate in awake subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. *Clin Neurophysiol*, 2006. **117**(5): p. 1113-29.
351. Hogan, M.J., et al., *Memory-related EEG power and coherence reductions in mild Alzheimer's disease*. *Int J Psychophysiol*, 2003. **49**(2): p. 147-63.
352. Moretti, D.V., et al., *Individual analysis of EEG frequency and band power in mild Alzheimer's disease*. *Clin Neurophysiol*, 2004. **115**(2): p. 299-308.
353. Olichney, J.M., et al., *Absent event-related potential (ERP) word repetition effects in mild Alzheimer's disease*. *Clin Neurophysiol*, 2006. **117**(6): p. 1319-30.
354. Himmler, A., *Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family*. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(4): p. 1389-96.
355. Goedert, M., et al., *Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease*. *Neuron*, 1989. **3**(4): p. 519-26.
356. Martin, L., X. Latypova, and F. Terro, *Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease*. *Neurochem Int*, 2011. **58**(4): p. 458-71.
357. Mandelkow, E., et al., *Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease*. *Brain Pathol*, 2007. **17**(1): p. 83-90.
358. Buee, L., et al., *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000. **33**(1): p. 95-130.
359. Hanger, D.P., B.H. Anderton, and W. Noble, *Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease*. *Trends Mol Med*, 2009. **15**(3): p. 112-9.
360. Sergeant, N., et al., *Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders*. *Expert Rev Proteomics*, 2008. **5**(2): p. 207-24.
361. Haase, C., et al., *Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation*. *J Neurochem*, 2004. **88**(6): p. 1509-20.
362. Iqbal, K., et al., *Mechanisms of tau-induced neurodegeneration*. *Acta Neuropathol*, 2009. **118**(1): p. 53-69.
363. Liu, F., et al., *Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation*. *Eur J Neurosci*, 2005. **22**(8): p. 1942-50.
364. Liu, F., et al., *Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(3): p. 1790-6.
365. Luna-Munoz, J., et al., *Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2007. **12**(4): p. 365-75.

366. Luna-Munoz, J., et al., *Regional conformational change involving phosphorylation of tau protein at the Thr231, precedes the structural change detected by Alz-50 antibody in Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2005. **8**(1): p. 29-41.
367. Alonso, A.C., et al., *Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(12): p. 5562-6.
368. Li, B., et al., *Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau.* Acta Neuropathol, 2007. **113**(5): p. 501-11.
369. Alonso, A.D., et al., *Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(1): p. 298-303.
370. Patterson, K.R., et al., *Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease.* J Biol Chem, 2011. **286**(26): p. 23063-76.
371. Berger, Z., et al., *Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy.* J Neurosci, 2007. **27**(14): p. 3650-62.
372. Lasagna-Reeves, C.A., et al., *Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice.* Mol Neurodegener. **6**: p. 39.
373. Gomez-Ramos, A., et al., *Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells.* Mol Cell Neurosci, 2008. **37**(4): p. 673-81.
374. Spires-Jones, T.L., et al., *Are tangles as toxic as they look?* J Mol Neurosci, 2011. **45**(3): p. 438-44.
375. Morsch, R., W. Simon, and P.D. Coleman, *Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles.* J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(2): p. 188-97.
376. O'Brien, R.J. and P.C. Wong, *Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease.* Annu Rev Neurosci, 2011. **34**: p. 185-204.
377. Stamer, K., et al., *Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress.* J Cell Biol, 2002. **156**(6): p. 1051-63.
378. Mandelkow, E.M., et al., *Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses.* Neurobiol Aging, 2003. **24**(8): p. 1079-85.
379. Reddy, P.H., *Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease.* Brain Res, 2011. **1415**: p. 136-48.
380. Koo, E.H., et al., *Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1561-5.
381. Lammich, S., et al., *Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3922-7.
382. Buxbaum, J.D., et al., *Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor.* J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 27765-7.
383. Vincent, B. and P. Govitrapong, *Activation of the alpha-secretase processing of AbetaPP as a therapeutic approach in Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2011. **24 Suppl 2**: p. 75-94.
384. Shah, S., et al., *Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor.* Cell, 2005. **122**(3): p. 435-47.
385. Thinakaran, G., et al., *Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo.* Neuron, 1996. **17**(1): p. 181-90.
386. Luo, W.J., et al., *PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1.* J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7850-4.
387. Steiner, H., R. Fluhner, and C. Haass, *Intramembrane proteolysis by gamma-secretase.* J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29627-31.

388. Cole, S.L. and R. Vassar, *The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29621-5.
389. Zhang, H., et al., *Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein*. J Neurochem, 2012. **120 Suppl 1**: p. 9-21.
390. Kinoshita, A., et al., *Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 16): p. 3339-46.
391. Vassar, R., et al., *Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE*. Science, 1999. **286**(5440): p. 735-41.
392. Koo, E.H. and S.L. Squazzo, *Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17386-9.
393. Gouras, G.K., et al., *Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain*. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 15-20.
394. LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo, *Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(7): p. 499-509.
395. Walsh, D.M., et al., *The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain*. Biochemistry, 2000. **39**(35): p. 10831-9.
396. Gellermann, G.P., et al., *Abeta-globulomers are formed independently of the fibril pathway*. Neurobiol Dis, 2008. **30**(2): p. 212-20.
397. Glabe, C.G., *Structural classification of toxic amyloid oligomers*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29639-43.
398. Lin, H., R. Bhatia, and R. Lal, *Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology*. FASEB J, 2001. **15**(13): p. 2433-44.
399. Stine, W.B., Jr., et al., *In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 11612-22.
400. Chromy, B.A., et al., *Self-assembly of Abeta(1-42) into globular neurotoxins*. Biochemistry, 2003. **42**(44): p. 12749-60.
401. Kaye, R., et al., *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis*. Science, 2003. **300**(5618): p. 486-9.
402. Mastrangelo, I.A., et al., *High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers*. J Mol Biol, 2006. **358**(1): p. 106-19.
403. Necula, M., et al., *Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10311-24.
404. Kaye, R., et al., *Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers*. Mol Neurodegener, 2007. **2**: p. 18.
405. Wu, J.W., et al., *Fibrillar oligomers nucleate the oligomerization of monomeric amyloid beta but do not seed fibril formation*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6071-9.
406. Ahmed, M., et al., *Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(5): p. 561-7.
407. Tycko, R., *Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure*. Annu Rev Phys Chem, 2011. **62**: p. 279-99.
408. Kim, S.I., J.S. Yi, and Y.G. Ko, *Amyloid beta oligomerization is induced by brain lipid rafts*. J Cell Biochem, 2006. **99**(3): p. 878-89.
409. Chi, E.Y., et al., *Lipid membrane templates the ordering and induces the fibrillogenesis of Alzheimer's disease amyloid-beta peptide*. Proteins, 2008. **72**(1): p. 1-24.
410. Rushworth, J.V. and N.M. Hooper, *Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid-beta Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes*. Int J Alzheimers Dis, 2010. **2011**: p. 603052.
411. Chi, E.Y., S.L. Frey, and K.Y. Lee, *Ganglioside G(M1)-mediated amyloid-beta fibrillogenesis and membrane disruption*. Biochemistry, 2007. **46**(7): p. 1913-24.

412. Matsuzaki, K., K. Kato, and K. Yanagisawa, *Abeta polymerization through interaction with membrane gangliosides*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1801**(8): p. 868-77.
413. Qiu, L., et al., *Cholesterol modulates the interaction of beta-amyloid peptide with lipid bilayers*. *Biophys J*, 2009. **96**(10): p. 4299-307.
414. Kakio, A., et al., *Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 24985-90.
415. Bales, K.R., et al., *Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition*. *Nat Genet*, 1997. **17**(3): p. 263-4.
416. Bales, K.R., et al., *Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(26): p. 15233-8.
417. Evans, C.G., S. Wisen, and J.E. Gestwicki, *Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(44): p. 33182-91.
418. Rogers, J. and L.F. Lue, *Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease*. *Neurochem Int*, 2001. **39**(5-6): p. 333-40.
419. Preston, S.D., et al., *Capillary and arterial cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: defining the perivascular route for the elimination of amyloid beta from the human brain*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2003. **29**(2): p. 106-17.
420. Weller, R.O., et al., *Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease*. *Brain Pathol*, 2008. **18**(2): p. 253-66.
421. Shibata, M., et al., *Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(12): p. 1489-99.
422. Lam, F.C., et al., *beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein*. *J Neurochem*, 2001. **76**(4): p. 1121-8.
423. Miners, J.S., et al., *Abeta-degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011. **70**(11): p. 944-59.
424. Ittner, L.M. and J. Gotz, *Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2011. **12**(2): p. 65-72.
425. Gotz, J., et al., *Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy*. *Mol Psychiatry*, 2004. **9**(7): p. 664-83.
426. Lewis, J., et al., *Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP*. *Science*, 2001. **293**(5534): p. 1487-91.
427. Gotz, J., et al., *Formation of neurofibrillary tangles in P301 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils*. *Science*, 2001. **293**(5534): p. 1491-5.
428. Selenica, M.L., et al., *Amyloid Oligomers Exacerbate Tau Pathology in a Mouse Model of Tauopathy*. *Neurodegener Dis*, 2012.
429. De Felice, F.G., et al., *Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers*. *Neurobiol Aging*, 2008. **29**(9): p. 1334-47.
430. Hernandez, F., et al., *GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein*. *Exp Neurol*, 2010. **223**(2): p. 322-5.
431. Jin, M., et al., *Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(14): p. 5819-24.
432. Zempel, H., et al., *Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines*. *J Neurosci*, 2010. **30**(36): p. 11938-50.
433. Zhao, Z., et al., *Expression of tau reduces secretion of Abeta without altering the amyloid precursor protein content in CHOsw cells*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(10): p. 2119-24.

434. Shipton, O.A., et al., *Tau protein is required for amyloid {beta}-induced impairment of hippocampal long-term potentiation*. J Neurosci, 2011. **31**(5): p. 1688-92.
435. Vossel, K.A., et al., *Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport*. Science, 2010. **330**(6001): p. 198.
436. Rapoport, M., et al., *Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6364-9.
437. Rhein, V., et al., *Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(47): p. 20057-62.
438. Magistretti, P.J., *Neuron-glia metabolic coupling and plasticity*. J Exp Biol, 2006. **209**(Pt 12): p. 2304-11.
439. Magistretti, P.J., *Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling*. Am J Clin Nutr, 2009. **90**(3): p. 875S-880S.
440. Iadecola, C. and M. Nedergaard, *Glial regulation of the cerebral microvasculature*. Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1369-76.
441. Takano, T., et al., *Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow*. Nat Neurosci, 2006. **9**(2): p. 260-7.
442. Zonta, M., et al., *Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation*. Nat Neurosci, 2003. **6**(1): p. 43-50.
443. Heneka, M.T., J.J. Rodriguez, and A. Verkhratsky, *Neuroglia in neurodegeneration*. Brain Res Rev, 2010. **63**(1-2): p. 189-211.
444. Verkhratsky, A., et al., *Astrocytes in Alzheimer's disease*. Neurotherapeutics, 2010. **7**(4): p. 399-412.
445. Griffin, W.S., et al., *Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7611-5.
446. DeWitt, D.A., et al., *Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease*. Exp Neurol, 1998. **149**(2): p. 329-40.
447. Parpura-Gill, A., D. Beitz, and E. Uemura, *The inhibitory effects of beta-amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes*. Brain Res, 1997. **754**(1-2): p. 65-71.
448. Allaman, I., et al., *Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability*. J Neurosci, 2010. **30**(9): p. 3326-38.
449. Wyss-Coray, T., et al., *Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ*. Nat Med, 2003. **9**(4): p. 453-7.
450. Matos, M., et al., *Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades*. Neuroscience, 2008. **156**(4): p. 898-910.
451. Abramov, A.Y., L. Canevari, and M.R. Duchon, *Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity*. J Neurosci, 2003. **23**(12): p. 5088-95.
452. Abramov, A.Y., L. Canevari, and M.R. Duchon, *Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1742**(1-3): p. 81-7.
453. Abramov, A.Y., L. Canevari, and M.R. Duchon, *Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase*. J Neurosci, 2004. **24**(2): p. 565-75.
454. Murgas, P., B. Godoy, and R. von Bernhardi, *Abeta potentiates inflammatory activation of glial cells induced by scavenger receptor ligands and inflammatory mediators in culture*. Neurotox Res, 2012. **22**(1): p. 69-78.
455. Li, C., et al., *Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res, 2011. **8**(1): p. 67-80.

456. Fetler, L. and S. Amigorena, *Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol*. Science, 2005. **309**(5733): p. 392-3.
457. Xiang, Z., et al., *Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia*. Dis Markers, 2006. **22**(1-2): p. 95-102.
458. Sheng, J.G., R.E. Mrak, and W.S. Griffin, *Glial-neuronal interactions in Alzheimer disease: progressive association of IL-1alpha+ microglia and S100beta+ astrocytes with neurofibrillary tangle stages*. J Neuropathol Exp Neurol, 1997. **56**(3): p. 285-90.
459. Combs, C.K., et al., *beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis*. J Neurosci, 2001. **21**(4): p. 1179-88.
460. Solito, E. and M. Sastre, *Microglia function in Alzheimer's disease*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 14.
461. Carty, M. and A.G. Bowie, *Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system*. Biochem Pharmacol, 2011. **81**(7): p. 825-37.
462. Lehnardt, S., *Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury*. Glia, 2010. **58**(3): p. 253-63.
463. Walter, S., et al., *Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(6): p. 947-56.
464. Yan, S.D., et al., *RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease*. Nature, 1996. **382**(6593): p. 685-91.
465. Lue, L.F., et al., *Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism*. Exp Neurol, 2001. **171**(1): p. 29-45.
466. Arancio, O., et al., *RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4096-105.
467. El Khoury, J., et al., *Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils*. Nature, 1996. **382**(6593): p. 716-9.
468. Paresce, D.M., R.N. Ghosh, and F.R. Maxfield, *Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor*. Neuron, 1996. **17**(3): p. 553-65.
469. Yasojima, K., et al., *Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain*. Am J Pathol, 1999. **154**(3): p. 927-36.
470. Keene, C.D., et al., *Apolipoprotein E isoforms and regulation of the innate immune response in brain of patients with Alzheimer's disease*. Curr Opin Neurobiol, 2011. **21**(6): p. 920-8.
471. Le, Y., et al., *Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1*. J Neurosci, 2001. **21**(2): p. RC123.
472. Iribarren, P., et al., *Role of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1/FPR2) in mononuclear phagocyte responses in Alzheimer disease*. Immunol Res, 2005. **31**(3): p. 165-76.
473. Fillit, H., et al., *Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 1991. **129**(2): p. 318-20.
474. Dheen, S.T., et al., *Retinoic acid inhibits expression of TNF-alpha and iNOS in activated rat microglia*. Glia, 2005. **50**(1): p. 21-31.
475. Colton, C.A. and D.L. Gilbert, *Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia*. FEBS Lett, 1987. **223**(2): p. 284-8.
476. Qin, L., et al., *Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species*. J Neurochem, 2002. **83**(4): p. 973-83.
477. Li, M., et al., *beta-Amyloid protein-dependent nitric oxide production from microglial cells and neurotoxicity*. Brain Res, 1996. **720**(1-2): p. 93-100.

478. Sastre, M., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(2): p. 443-8.
479. Sastre, M., J. Walter, and S.M. Gentleman, *Interactions between APP secretases and inflammatory mediators*. J Neuroinflammation, 2008. **5**: p. 25.
480. Arnaud, L., N.K. Robakis, and M.E. Figueiredo-Pereira, *It may take inflammation, phosphorylation and ubiquitination to 'tangle' in Alzheimer's disease*. Neurodegener Dis, 2006. **3**(6): p. 313-9.
481. Li, Y., et al., *Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway*. J Neurosci, 2003. **23**(5): p. 1605-11.
482. Butterfield, D.A., *Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review*. Free Radic Res, 2002. **36**(12): p. 1307-13.
483. Hansson Petersen, C.A., et al., *The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13145-50.
484. Behl, C., et al., *Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity*. Cell, 1994. **77**(6): p. 817-27.
485. Manczak, M., et al., *Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(9): p. 1437-49.
486. Souza, J.M., et al., *Reactive nitrogen species and proteins: biological significance and clinical relevance*. Adv Exp Med Biol, 2001. **500**: p. 169-74.
487. Gow, A.J., et al., *Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation*. FEBS Lett, 1996. **385**(1-2): p. 63-6.
488. Crawford, D.R., et al., *Analysis of gene expression following oxidative stress*. Methods Mol Biol, 2002. **196**: p. 155-62.
489. Cai, Z., B. Zhao, and A. Ratka, *Oxidative stress and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease*. Neuromolecular Med, 2011. **13**(4): p. 223-50.
490. Snigdha, S., et al., *Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death*. Neurosci Bull, 2012. **28**(1): p. 14-24.
491. Shimohama, S., H. Tanino, and S. Fujimoto, *Changes in caspase expression in Alzheimer's disease: comparison with development and aging*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(2): p. 381-4.
492. Marin, N., et al., *Beta-amyloid-induced activation of caspase-3 in primary cultures of rat neurons*. Mech Ageing Dev, 2000. **119**(1-2): p. 63-7.
493. Harada, J. and M. Sugimoto, *Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons*. Brain Res, 1999. **842**(2): p. 311-23.
494. Uetsuki, T., et al., *Activation of neuronal caspase-3 by intracellular accumulation of wild-type Alzheimer amyloid precursor protein*. J Neurosci, 1999. **19**(16): p. 6955-64.
495. Louneva, N., et al., *Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease*. Am J Pathol, 2008. **173**(5): p. 1488-95.
496. D'Amelio, M., et al., *Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease*. Nat Neurosci, 2011. **14**(1): p. 69-76.
497. Li, Z., et al., *Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization*. Cell, 2010. **141**(5): p. 859-71.
498. Lu, C., et al., *Direct cleavage of AMPA receptor subunit GluR1 and suppression of AMPA currents by caspase-3: implications for synaptic plasticity and excitotoxic neuronal death*. Neuromolecular Med, 2002. **1**(1): p. 69-79.

499. Gervais, F.G., et al., *Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation*. Cell, 1999. **97**(3): p. 395-406.
500. Zhao, M., et al., *Accumulation of caspase cleaved amyloid precursor protein represents an early neurodegenerative event in aging and in Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 2003. **14**(3): p. 391-403.
501. Rohn, T.T., et al., *Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain*. Neurobiol Dis, 2002. **11**(2): p. 341-54.
502. Rohn, T.T., et al., *Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease*. Am J Pathol, 2001. **158**(1): p. 189-98.
503. Gamblin, T.C., et al., *Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 10032-7.
504. Rissman, R.A., et al., *Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology*. J Clin Invest, 2004. **114**(1): p. 121-30.
505. Terry, R.D., et al., *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment*. Ann Neurol, 1991. **30**(4): p. 572-80.
506. Scheff, S.W. and D.A. Price, *Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1993. **33**(2): p. 190-9.
507. Masliah, E., et al., *Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease*. Neurosci Lett, 1989. **103**(2): p. 234-9.
508. Masliah, E. and R. Terry, *The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system*. Brain Pathol, 1993. **3**(1): p. 77-85.
509. Iijima-Ando, K., et al., *Mitochondrial mislocalization underlies Abeta42-induced neuronal dysfunction in a Drosophila model of Alzheimer's disease*. PLoS ONE, 2009. **4**(12): p. e8310.
510. Shankar, G.M., et al., *Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory*. Nat Med, 2008. **14**(8): p. 837-42.
511. Bezprozvanny, I., *Calcium signaling and neurodegenerative diseases*. Trends Mol Med, 2009. **15**(3): p. 89-100.
512. Bezprozvanny, I. and M.P. Mattson, *Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Trends Neurosci, 2008. **31**(9): p. 454-63.
513. Mattson, M.P. and S.L. Chan, *Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease*. Cell Calcium, 2003. **34**(4-5): p. 385-97.
514. Chow, S.K., et al., *Amyloid beta-peptide directly induces spontaneous calcium transients, delayed intercellular calcium waves and gliosis in rat cortical astrocytes*. ASN Neuro, 2010. **2**(1): p. e00026.
515. Demuro, A., I. Parker, and G.E. Stutzmann, *Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease*. J Biol Chem, 2010. **285**(17): p. 12463-8.
516. Arispe, N., J.C. Diaz, and O. Simakova, *Abeta ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with Abeta channel blockers*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(8): p. 1952-65.
517. Lal, R., H. Lin, and A.P. Quist, *Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(8): p. 1966-75.
518. Jang, H., et al., *New structures help the modeling of toxic amyloidbeta ion channels*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(2): p. 91-100.
519. Danysz, W. and C.G. Parsons, *The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence*. Int J Geriatr Psychiatry, 2003. **18**(Suppl 1): p. S23-32.
520. Rovira, C., N. Arbez, and J. Mariani, *Abeta(25-35) and Abeta(1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(5): p. 1317-21.
521. MacManus, A., et al., *Enhancement of (45)Ca(2+) influx and voltage-dependent Ca(2+) channel activity by beta-amyloid-(1-40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical*

- neurons. Modulation by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Biol Chem*, 2000. **275**(7): p. 4713-8.
522. Nimmrich, V., et al., *Amyloid beta oligomers (A beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents*. *J Neurosci*, 2008. **28**(4): p. 788-97.
523. Millar, N.S. and C. Gotti, *Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors*. *Neuropharmacology*, 2009. **56**(1): p. 237-46.
524. Romanelli, M.N., et al., *Central nicotinic receptors: structure, function, ligands, and therapeutic potential*. *ChemMedChem*, 2007. **2**(6): p. 746-67.
525. Lilja, A.M., et al., *Functional interactions of fibrillar and oligomeric amyloid-beta with alpha7 nicotinic receptors in Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2011. **23**(2): p. 335-47.
526. Paoletti, P. and J. Neyton, *NMDA receptor subunits: function and pharmacology*. *Curr Opin Pharmacol*, 2007. **7**(1): p. 39-47.
527. Shtifman, A., et al., *Amyloid-beta protein impairs Ca²⁺ release and contractility in skeletal muscle*. *Neurobiol Aging*, 2010. **31**(12): p. 2080-90.
528. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
529. Biedler, J.L., L. Helson, and B.A. Spengler, *Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture*. *Cancer Res*, 1973. **33**(11): p. 2643-52.
530. Biedler, J.L., et al., *Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones*. *Cancer Res*, 1978. **38**(11 Pt 1): p. 3751-7.
531. Zussy, C., et al., *Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid beta fragment in rats*. *Am J Pathol*, 2011. **179**(1): p. 315-34.
532. Elder, G.A., M.A. Gama Sosa, and R. De Gasperi, *Transgenic mouse models of Alzheimer's disease*. *Mt Sinai J Med*, 2010. **77**(1): p. 69-81.
533. Games, D., et al., *Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein*. *Nature*, 1995. **373**(6514): p. 523-7.
534. Hsiao, K., et al., *Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice*. *Science*, 1996. **274**(5284): p. 99-102.
535. Calhoun, M.E., et al., *Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(24): p. 14088-93.
536. Duff, K., et al., *Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1*. *Nature*, 1996. **383**(6602): p. 710-3.
537. Borchelt, D.R., et al., *Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta₁₋₄₂/1-40 ratio in vitro and in vivo*. *Neuron*, 1996. **17**(5): p. 1005-13.
538. Citron, M., et al., *Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice*. *Nat Med*, 1997. **3**(1): p. 67-72.
539. Holcomb, L., et al., *Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes*. *Nat Med*, 1998. **4**(1): p. 97-100.
540. Allen, B., et al., *Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein*. *J Neurosci*, 2002. **22**(21): p. 9340-51.
541. Lewis, J., et al., *Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein*. *Nat Genet*, 2000. **25**(4): p. 402-5.
542. Oddo, S., et al., *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction*. *Neuron*, 2003. **39**(3): p. 409-21.

543. Boche, D., et al., *Neuropathology after active Abeta42 immunotherapy: implications for Alzheimer's disease pathogenesis*. *Acta Neuropathol*, 2010. **120**(3): p. 369-84.
544. Sokolov, Y., et al., *Soluble amyloid oligomers increase bilayer conductance by altering dielectric structure*. *J Gen Physiol*, 2006. **128**(6): p. 637-47.
545. Scemes, E. and C. Giaume, *Astrocyte calcium waves: what they are and what they do*. *Glia*, 2006. **54**(7): p. 716-25.
546. Neyton, J. and P. Paoletti, *Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach*. *J Neurosci*, 2006. **26**(5): p. 1331-3.
547. Devanathan, S., et al., *Effects of sphingomyelin, cholesterol and zinc ions on the binding, insertion and aggregation of the amyloid Abeta(1-40) peptide in solid-supported lipid bilayers*. *FEBS J*, 2006. **273**(7): p. 1389-402.
548. Wakabayashi, M. and K. Matsuzaki, *Formation of amyloids by Abeta-(1-42) on NGF-differentiated PC12 cells: roles of gangliosides and cholesterol*. *J Mol Biol*, 2007. **371**(4): p. 924-33.
549. Zidovetzki, R. and I. Levitan, *Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(6): p. 1311-24.
550. Lacor, P.N., et al., *Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers*. *J Neurosci*, 2004. **24**(45): p. 10191-200.
551. Lauren, J., et al., *Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers*. *Nature*, 2009. **457**(7233): p. 1128-32.
552. Chen, S., S.P. Yadav, and W.K. Surewicz, *Interaction between human prion protein and amyloid-beta (Abeta) oligomers: role OF N-terminal residues*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(34): p. 26377-83.
553. Cisse, M., et al., *Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model*. *Nature*, 2011. **469**(7328): p. 47-52.
554. Yaar, M., et al., *Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(9): p. 2333-40.
555. Yaar, M., et al., *Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(10): p. 7720-5.
556. Quist, A., et al., *Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(30): p. 10427-32.
557. Jang, H., et al., *beta-Barrel topology of Alzheimer's beta-amyloid ion channels*. *J Mol Biol*, 2010. **404**(5): p. 917-34.
558. Jang, H., J. Zheng, and R. Nussinov, *Models of beta-amyloid ion channels in the membrane suggest that channel formation in the bilayer is a dynamic process*. *Biophys J*, 2007. **93**(6): p. 1938-49.
559. Arispe, N., et al., *Polyhistidine peptide inhibitor of the Abeta calcium channel potently blocks the Abeta-induced calcium response in cells. Theoretical modeling suggests a cooperative binding process*. *Biochemistry*, 2010. **49**(36): p. 7847-53.
560. Diaz, J.C., et al., *Small molecule blockers of the Alzheimer Abeta calcium channel potently protect neurons from Abeta cytotoxicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(9): p. 3348-53.
561. Mattson, M.P., *Calcium and neurodegeneration*. *Aging Cell*, 2007. **6**(3): p. 337-50.
562. Martinez-Coria, H., et al., *Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(2): p. 870-80.
563. Lacor, P.N., et al., *Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease*. *J Neurosci*, 2007. **27**(4): p. 796-807.
564. Shankar, G.M., et al., *Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway*. *J Neurosci*, 2007. **27**(11): p. 2866-75.

565. Legendre, P., C. Rosenmund, and G.L. Westbrook, *Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium*. J Neurosci, 1993. **13**(2): p. 674-84.
566. Wang, Y.T. and M.W. Salter, *Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases*. Nature, 1994. **369**(6477): p. 233-5.
567. Groveman, B.R., et al., *The regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by Src kinase*. FEBS J, 2012. **279**(1): p. 20-8.
568. Trepanier, C.H., M.F. Jackson, and J.F. MacDonald, *Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn*. FEBS J, 2012. **279**(1): p. 12-9.
569. Liao, G.Y., et al., *Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(5): p. 960-4.
570. Omkumar, R.V., et al., *Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31670-8.
571. Wang, L.Y., et al., *Regulation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons by protein phosphatases 1 and 2A*. Nature, 1994. **369**(6477): p. 230-2.
572. Lieberman, D.N. and I. Mody, *Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase*. Nature, 1994. **369**(6477): p. 235-9.
573. Snyder, E.M., et al., *Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta*. Nat Neurosci, 2005. **8**(8): p. 1051-8.
574. Chen, B.S. and K.W. Roche, *Regulation of NMDA receptors by phosphorylation*. Neuropharmacology, 2007. **53**(3): p. 362-8.
575. Henderson, J.T., et al., *The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function*. Neuron, 2001. **32**(6): p. 1041-56.
576. Dalva, M.B., et al., *EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation*. Cell, 2000. **103**(6): p. 945-56.
577. Takasu, M.A., et al., *Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors*. Science, 2002. **295**(5554): p. 491-5.
578. Favit, A., et al., *Alzheimer's-specific effects of soluble beta-amyloid on protein kinase C-alpha and -gamma degradation in human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5562-7.
579. Lee, W., et al., *Amyloid beta peptide directly inhibits PKC activation*. Mol Cell Neurosci, 2004. **26**(2): p. 222-31.
580. Kurup, P., et al., *Abeta-mediated NMDA receptor endocytosis in Alzheimer's disease involves ubiquitination of the tyrosine phosphatase STEP61*. J Neurosci, 2010. **30**(17): p. 5948-57.
581. Besshoh, S., et al., *Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain*. J Neurochem, 2005. **93**(1): p. 186-94.
582. Hering, H., C.C. Lin, and M. Sheng, *Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability*. J Neurosci, 2003. **23**(8): p. 3262-71.
583. Abulrob, A., et al., *Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution*. J Neurochem, 2005. **92**(6): p. 1477-86.
584. Ponce, J., et al., *Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection*. Stroke, 2008. **39**(4): p. 1269-75.
585. Grimm, M.O., et al., *Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(11): p. 1118-23.
586. Grosgen, S., et al., *Role of amyloid beta in lipid homeostasis*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(8): p. 966-74.
587. Hicks, D.A., N.N. Nalivaeva, and A.J. Turner, *Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 189.
588. Ichi, I., et al., *Neutral sphingomyelinase-induced ceramide accumulation by oxidative stress during carbon tetrachloride intoxication*. Toxicology, 2009. **261**(1-2): p. 33-40.

589. Jana, A. and K. Pahan, *Oxidative stress kills human primary oligodendrocytes via neutral sphingomyelinase: implications for multiple sclerosis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2007. **2**(2): p. 184-93.
590. Dumitru, C.A., et al., *Ceramide: a novel player in reactive oxygen species-induced signaling?* Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(9): p. 1535-40.
591. Butterfield, D.A., et al., *Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(5): p. 655-64.
592. Butterfield, D.A. and C.M. Lauderback, *Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(11): p. 1050-60.
593. Cull-Candy, S., S. Brickley, and M. Farrant, *NMDA receptor subunits: diversity, development and disease*. Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(3): p. 327-35.
594. Cull-Candy, S.G. and D.N. Leszkiewicz, *Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses*. Sci STKE, 2004. **2004**(255): p. re16.
595. Hu, N.W., et al., *GluN2B subunit-containing NMDA receptor antagonists prevent Abeta-mediated synaptic plasticity disruption in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20504-9.
596. Rammes, G., et al., *Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of beta-amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices*. Neuropharmacology, 2011. **60**(6): p. 982-90.
597. von Engelhardt, J., et al., *Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks*. Neuron, 2008. **60**(5): p. 846-60.
598. Paoletti, P., *Molecular basis of NMDA receptor functional diversity*. Eur J Neurosci, 2011. **33**(8): p. 1351-65.
599. Barria, A. and R. Malinow, *Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses*. Neuron, 2002. **35**(2): p. 345-53.
600. Scimemi, A., et al., *NR2B-containing receptors mediate cross talk among hippocampal synapses*. J Neurosci, 2004. **24**(20): p. 4767-77.
601. Kohr, G., *NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(2): p. 439-46.
602. Gladding, C.M. and L.A. Raymond, *Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function*. Mol Cell Neurosci, 2011. **48**(4): p. 308-20.
603. Hardingham, G.E. and H. Bading, *Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders*. Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(10): p. 682-96.
604. Ferreira, I.L., et al., *Amyloid beta peptide 1-42 disturbs intracellular calcium homeostasis through activation of GluN2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in cortical cultures*. Cell Calcium, 2012. **51**(2): p. 95-106.
605. Liu, Z., et al., *NR2B-containing NMDA receptors expression and their relationship to apoptosis in hippocampus of Alzheimer's disease-like rats*. Neurochem Res, 2012. **37**(7): p. 1420-7.
606. Ronicke, R., et al., *Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(12): p. 2219-28.
607. Kervern, M., et al., *Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid-beta peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors*. J Alzheimers Dis, 2012. **32**(1): p. 183-96.
608. Tovar, K.R. and G.L. Westbrook, *Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses*. Neuron, 2002. **34**(2): p. 255-64.
609. Groc, L. and D. Choquet, *AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(2): p. 423-38.

610. Groc, L., et al., *Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors*. Nat Neurosci, 2004. **7**(7): p. 695-6.
611. Fujisawa, S. and C. Aoki, *In vivo blockade of N-methyl-D-aspartate receptors induces rapid trafficking of NR2B subunits away from synapses and out of spines and terminals in adult cortex*. Neuroscience, 2003. **121**(1): p. 51-63.
612. Janssen, W.G., et al., *Cellular and synaptic distribution of NR2A and NR2B in macaque monkey and rat hippocampus as visualized with subunit-specific monoclonal antibodies*. Exp Neurol, 2005. **191** Suppl 1: p. S28-44.
613. Thomas, C.G., A.J. Miller, and G.L. Westbrook, *Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons*. J Neurophysiol, 2006. **95**(3): p. 1727-34.
614. Mony, L., et al., *Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(8): p. 1301-17.
615. Mony, L., et al., *Identification of a novel NR2B-selective NMDA receptor antagonist using a virtual screening approach*. Bioorg Med Chem Lett, 2010. **20**(18): p. 5552-8.
616. Lanner, J.T., et al., *Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(11): p. a003996.
617. Van Petegem, F., *Ryanodine receptors: structure and function*. J Biol Chem, 2012. **287**(38): p. 31624-32.
618. Altschafli, B.A., et al., *The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: a pharmacokinetic profile*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(7): p. 1784-95.
619. Beutner, G., et al., *Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21482-8.
620. Beutner, G., et al., *Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1717**(1): p. 1-10.
621. Gerasimenko, O. and J. Gerasimenko, *New aspects of nuclear calcium signalling*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 15): p. 3087-94.
622. Marius, P., et al., *Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum*. Cell Calcium, 2006. **39**(1): p. 65-73.
623. Goussakov, I., M.B. Miller, and G.E. Stutzmann, *NMDA-mediated Ca²⁺ influx drives aberrant ryanodine receptor activation in dendrites of young Alzheimer's disease mice*. J Neurosci, 2010. **30**(36): p. 12128-37.
624. Anekonda, T.S. and J.F. Quinn, *Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(12): p. 1584-90.
625. Mezler, M., et al., *A beta-amyloid oligomer directly modulates P/Q-type calcium currents in Xenopus oocytes*. Br J Pharmacol, 2011. **165**(5): p. 1572-83.
626. Hermann, D., et al., *Synthetic Abeta oligomers (Abeta(1-42) globulomer) modulate presynaptic calcium currents: Prevention of Abeta-induced synaptic deficits by calcium channel blockers*. Eur J Pharmacol, 2013. **702**(1-3): p. 44-55.
627. Li, H., J.H. Ding, and G. Hu, *Group I mGluR ligands fail to affect 6-hydroxydopamine-induced death and glutamate release of PC12 cells*. Acta Pharmacol Sin, 2003. **24**(7): p. 641-5.
628. Venkitaramani, D.V., et al., *Beta-amyloid modulation of synaptic transmission and plasticity*. J Neurosci, 2007. **27**(44): p. 11832-7.
629. Alberdi, E., et al., *Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors*. Cell Calcium, 2010. **47**(3): p. 264-72.
630. Wang, D., et al., *Binding of amyloid beta peptide to beta2 adrenergic receptor induces PKA-dependent AMPA receptor hyperactivity*. FASEB J, 2010. **24**(9): p. 3511-21.
631. Chen, L. and L.Y. Huang, *Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation*. Nature, 1992. **356**(6369): p. 521-3.

632. Haughey, N.J. and M.P. Mattson, *Alzheimer's amyloid beta-peptide enhances ATP/gap junction-mediated calcium-wave propagation in astrocytes*. *Neuromolecular Med*, 2003. **3**(3): p. 173-80.
633. Kuchibhotla, K.V., et al., *Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice*. *Science*, 2009. **323**(5918): p. 1211-5.
634. De Barry, J., A. Ogura, and Y. Kudo, *Ca²⁺ Mobilization in Cultured Rat Cerebellar Cells: Astrocytes are Activated by t-ACPD*. *Eur J Neurosci*, 1991. **3**(11): p. 1146-1154.
635. Parri, H.R. and V. Crunelli, *The role of Ca²⁺ in the generation of spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations*. *Neuroscience*, 2003. **120**(4): p. 979-92.
636. Yoshida, Y., et al., *Ca²⁺-dependent induction of intracellular Ca²⁺ oscillation in hippocampal astrocytes during metabotropic glutamate receptor activation*. *J Pharmacol Sci*, 2005. **97**(2): p. 212-8.
637. Wang, T.F., et al., *Cellular mechanism for spontaneous calcium oscillations in astrocytes*. *Acta Pharmacol Sin*, 2006. **27**(7): p. 861-8.
638. Boitier, E., R. Rea, and M.R. Duchen, *Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca²⁺ waves in rat cortical astrocytes*. *J Cell Biol*, 1999. **145**(4): p. 795-808.
639. Wang, Z., et al., *Impact of cytoplasmic calcium buffering on the spatial and temporal characteristics of intercellular calcium signals in astrocytes*. *J Neurosci*, 1997. **17**(19): p. 7359-71.
640. Bezprozvanny, I. and B.E. Ehrlich, *The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor*. *J Membr Biol*, 1995. **145**(3): p. 205-16.
641. Yao, Y., J. Choi, and I. Parker, *Quantal puffs of intracellular Ca²⁺ evoked by inositol trisphosphate in Xenopus oocytes*. *J Physiol*, 1995. **482** (Pt 3): p. 533-53.
642. Finch, E.A., T.J. Turner, and S.M. Goldin, *Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release*. *Science*, 1991. **252**(5004): p. 443-6.
643. Berridge, M.J., *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. *Nature*, 1993. **361**(6410): p. 315-25.
644. Venance, L., et al., *Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes*. *J Neurosci*, 1997. **17**(6): p. 1981-92.
645. Finkbeiner, S., *Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps*. *Neuron*, 1992. **8**(6): p. 1101-8.
646. Guan, X., et al., *The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium wave transmission in glial cells*. *J Cell Biol*, 1997. **139**(7): p. 1785-92.
647. Guthrie, P.B., et al., *ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves*. *J Neurosci*, 1999. **19**(2): p. 520-8.
648. Zanotti, S. and A. Charles, *Extracellular calcium sensing by glial cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intercellular signaling*. *J Neurochem*, 1997. **69**(2): p. 594-602.
649. Renner, M., et al., *Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5*. *Neuron*, 2010. **66**(5): p. 739-54.
650. Casley, C.S., et al., *Up-regulation of astrocyte metabotropic glutamate receptor 5 by amyloid-beta peptide*. *Brain Res*, 2009.
651. Brito-Moreira, J., et al., *Abeta oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons*. *Curr Alzheimer Res*, 2011. **8**(5): p. 552-62.
652. Noda, M., H. Nakanishi, and N. Akaike, *Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide*. *Neuroscience*, 1999. **92**(4): p. 1465-74.
653. Kabogo, D., et al., *ss-amyloid-related peptides potentiate K⁺-evoked glutamate release from adult rat hippocampal slices*. *Neurobiol Aging*, 2010. **31**(7): p. 1164-72.
654. Li, S., et al., *Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake*. *Neuron*, 2009. **62**(6): p. 788-801.

655. Pasti, L., et al., *Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ*. J Neurosci, 1997. **17**(20): p. 7817-30.
656. Hirase, H., et al., *Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo*. PLoS Biol, 2004. **2**(4): p. E96.
657. Bal-Price, A., Z. Moneer, and G.C. Brown, *Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes*. Glia, 2002. **40**(3): p. 312-23.
658. Jeremic, A., et al., *ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes*. J Neurochem, 2001. **77**(2): p. 664-75.
659. Montana, V., et al., *Vesicular transmitter release from astrocytes*. Glia, 2006. **54**(7): p. 700-15.
660. Verkhratsky, A. and F. Kirchhoff, *NMDA Receptors in glia*. Neuroscientist, 2007. **13**(1): p. 28-37.
661. D'Ascenzo, M., et al., *Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N- (Cav2.2), and R- (Cav2.3) type Ca²⁺ channels in rat cortical astrocytes*. Glia, 2004. **45**(4): p. 354-63.
662. Fiacco, T.A. and K.D. McCarthy, *Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons*. J Neurosci, 2004. **24**(3): p. 722-32.
663. Johnson, R.D., et al., *Direct observation of single amyloid-beta(1-40) oligomers on live cells: binding and growth at physiological concentrations*. PLoS ONE, 2011. **6**(8): p. e23970.
664. Huang, P., et al., *Prion protein oligomer and its neurotoxicity*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013.
665. Lewis, V. and N.M. Hooper, *The role of lipid rafts in prion protein biology*. Front Biosci, 2006. **16**: p. 151-68.
666. Taylor, D.R. and N.M. Hooper, *The prion protein and lipid rafts*. Mol Membr Biol, 2006. **23**(1): p. 89-99.
667. Sanghera, N., et al., *Deciphering the molecular details for the binding of the prion protein to main ganglioside GM1 of neuronal membranes*. Chem Biol, 2011. **18**(11): p. 1422-31.
668. Pinheiro, T.J., *The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions*. Chem Phys Lipids, 2006. **141**(1-2): p. 66-71.
669. Costa, R.O., et al., *Endoplasmic reticulum stress occurs downstream of GluN2B subunit of N-methyl-d-aspartate receptor in mature hippocampal cultures treated with amyloid-beta oligomers*. Aging Cell, 2012. **11**(5): p. 823-33.
670. Chan, S.L., et al., *Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18195-200.
671. Goussakov, I., S. Chakroborty, and G.E. Stutzmann, *Generation of dendritic Ca²⁺ oscillations as a consequence of altered ryanodine receptor function in AD neurons*. Channels (Austin), 2011. **5**(1): p. 9-13.
672. Supnet, C., et al., *Amyloid-beta-(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function in neurons of TgCRND8 mice*. J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38440-7.
673. Kurokawa, K., et al., *Involvement of NMDA receptors in ryanodine receptor expression in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of mice with intermittent methamphetamine treatment*. Synapse, 2011. **65**(11): p. 1156-65.
674. Giuffrida, M.L., et al., *Beta-amyloid monomers are neuroprotective*. J Neurosci, 2009. **29**(34): p. 10582-7.
675. He, Y., et al., *Prolonged exposure of cortical neurons to oligomeric amyloid-beta impairs NMDA receptor function via NADPH oxidase-mediated ROS production: protective effect of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate*. ASN Neuro, 2011. **3**(1): p. e00050.
676. Dewachter, I., et al., *Deregulation of NMDA-receptor function and down-stream signaling in APP[V717I] transgenic mice*. Neurobiol Aging, 2009. **30**(2): p. 241-56.

677. Jana, A. and K. Pahan, *Fibrillar amyloid-beta peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase. Implications for Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 51451-9.
678. Malaplate-Armand, C., et al., *Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway*. Neurobiol Dis, 2006. **23**(1): p. 178-89.
679. He, X., et al., *Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2010. **31**(3): p. 398-408.
680. Evangelisti, E., et al., *Lipid Rafts Mediate Amyloid-induced Calcium Dyshomeostasis and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease*. Curr Alzheimer Res, 2012.
681. Skoumalova, A., et al., *The lipid peroxidation products as possible markers of Alzheimer's disease in blood*. Exp Gerontol, 2012. **46**(1): p. 38-42.
682. Goebel-Goody, S.M., et al., *Therapeutic implications for striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) in neuropsychiatric disorders*. Pharmacol Rev, 2012. **64**(1): p. 65-87.
683. Boulanger, L.M., et al., *Cellular and molecular characterization of a brain-enriched protein tyrosine phosphatase*. J Neurosci, 1995. **15**(2): p. 1532-44.
684. Bult, A., et al., *STEP61: a member of a family of brain-enriched PTPs is localized to the endoplasmic reticulum*. J Neurosci, 1996. **16**(24): p. 7821-31.
685. Maheswaran, S., et al., *Longitudinal regional brain volume changes quantified in normal aging and Alzheimer's APP x PS1 mice using MRI*. Brain Res, 2009. **1270**: p. 19-32.
686. Howlett, D.R., et al., *Abeta deposition and related pathology in an APP x PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. Histol Histopathol, 2008. **23**(1): p. 67-76.
687. Kessels, H.W., S. Nabavi, and R. Malinow, *Metabotropic NMDA receptor function is required for beta-amyloid-induced synaptic depression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(10): p. 4033-8.
688. Hardingham, G.E., Y. Fukunaga, and H. Bading, *Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways*. Nat Neurosci, 2002. **5**(5): p. 405-14.
689. Dieterich, D.C., et al., *Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus*. PLoS Biol, 2008. **6**(2): p. e34.

8. Annexes

Article :

Priming effect of low concentrations of beta-amyloid peptide 1-42 on differentiated PC12 cells and subsequent membrane expression of NR2b subunit of the NMDA receptor.

**Priming effect of low concentrations of 1-42-beta-amyloid peptide
on differentiated PC12 cells and subsequent membrane expression
of NR2b-NMDA receptor.**

Virginie Gilson^{1,3}, Corinne Mbebi-Liegeois^{1,2}, François Sellal⁴, Jean de Barry^{1,3}

¹Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives-CNRS, Strasbourg, France.

²Innovative Health Diagnostics SAS, Strasbourg, France.

³Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

⁴CMRR Alsace, Centre Hospitalier de Colmar, France

Running Title: Priming effect of amyloid peptide

Corresponding author:

Dr J. de Barry

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives

UPR 3212 CNRS

5 rue B. Pascal

67084 Strasbourg Cedex (FRANCE)

e-mail: barry@inci-cnrs.unistra.fr

Tel.: +33(0) 3 88 45 66 97

Fax: +33(0) 3 88 45 16 64

Abstract

Beta-amyloid peptides ($A\beta$) modulate intracellular metabolic cascade and numerous observations indicate that Alzheimer's Disease (AD) induces alterations in Ca^{2+} homeostasis in nerve cells. However most of these findings have been obtained by using non physiological $A\beta$ concentrations. The present study is aimed at describing the effect of low $A\beta$ concentrations on the cellular homeostasis. An experimental protocol was developed on Nerve growth factor-differentiated PC12 cells with chronic and acute treatment with $A\beta_{42}$. The results show that oligomeric $A\beta_{42}$ application to the cells induces an increase of membrane expression of the extrasynaptic subunit of the NMDA receptor NR2b and an increase in intracellular calcium concentration. We also observed a priming effect of chronic application of low $A\beta$ concentrations on the cellular Ca^{2+} response subsequently induced by an acute application of high $A\beta$ concentrations. This suggests a sequential interaction of $A\beta$ with the cellular plasma membrane involving monomers or small $A\beta$ oligomers which would facilitate the binding of the deleterious high molecular $A\beta$ oligomers. This mechanism would explain the slow progression of the disease in the nervous system and the deep gradient of neuronal death observed around the amyloid plaques in the nervous tissue.

Keywords:

Alzheimer's disease, beta amyloid oligomers, Abeta, intracellular calcium, homeostasis, NMDA receptor, in vitro model, pathogenesis.

Abbreviations:

AD Alzheimer's Disease; NF neurofibrillary; $A\beta$ Beta Amyloid; D-APV D-2-Ami,o-5-Phosphonovalerate; NMDA-R NMDA receptor; NR2b subunit of NMDA receptor; NGF nerve growth factor; DMSO dimethylsulfoxide; HFIP hexafluoropropanol; PBS phosphate buffered saline; $[Ca^{2+}]_i$ intracellular calcium concentration

Introduction

The neuropathological hallmark of Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence of large deposits of extracellular fibrillar amyloid- β ($A\beta$) [1-3] and intraneuronal neurofibrillary (NF) changes [4-6]. However different observations suggest that fibrillar $A\beta$ may not be the primary toxic assembly state responsible for AD pathogenesis. Several groups have reported that individuals with normal cognitive function have amyloid plaque loads that either meet or exceed the criteria for AD diagnosis [7]. Studies have also revealed a positive correlation between soluble $A\beta$ levels and the severity of dementia [8, 9], further suggesting a key role for soluble oligomers species in AD. In vitro studies have reported that soluble oligomers and protofibrils not only are toxic to neuronal cells [10] but also more toxic than fibrils [11, 12].

Considering the progression of AD the mode of exposure of nerve cells to beta amyloid peptides seems to be very important. The question remains whether low soluble $A\beta$ concentrations induce a change in nerve cells. The initial events probably involve the interaction of soluble oligomers with neuronal membranes [13]. But AD evolves over decades in human while most in vitro experiments are performed within minutes or hours. Similarly in most biochemical or electrophysiological experiments designed to decipher the mode of action of $A\beta$ the used concentrations are not physiological.

In an attempt to address this question we used PC12 cells, a cell line which displays a neuronal phenotype when cultivated in the presence of nerve growth factor. We show that these cells have an increased capacity to bind $A\beta$ oligomers after pre-incubation with nanomolar concentrations of soluble $A\beta_{42}$ and that the toxic effect of oligomers occurs at micromolar concentrations. Moreover we also show that cell exposure to high concentrations of $A\beta_{42}$ oligomers rapidly induces membrane expression of the NR2b subunit of the NMDA receptor. These observations may partly explain the slow progression of the disease in the human brain.

Materials and Methods

Cell culture

PC12 cells (rat pheochromocytoma) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated horse serum, 10% foetal bovine serum and antibiotics (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 U/ml) at 37°C in 5% CO₂. PC12 cells were reseeded once a week. Before use, cells were plated in 35mm glass-bottom culture dishes coated with rat tail type I collagen (0.1mg/ml) and Poly-L-ornithine (0.5mg/ml) and NGF (50µg/l) was added in the culture medium to induce their neuronal differentiation. Cells were used after 5 days in vitro. Except for rat tail type I collagen and poly-L-ornithine which were supplied by Sigma-Aldrich (Sigma chem. CO; St Louis, MO) all products used to cultivate PC12 cells were supplied by Life technologies® (St Aubin, France)

Preparation of amyloid peptide monomers, oligomers

A β ₄₂ (Bachem, Bubendorf, Switzerland) was dissolved in hexafluoroisopropanol (HFIP; Sigma-Aldrich), distributed in aliquots, dried (HFIP film) and stored at -80 °C as previously described [14, 15]. The day before the experiment the peptide film was dissolved (1 mM) in sterile Dimethylsulfoxide (DMSO). The solution was then diluted with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) at a final concentration of 100 µM and aged overnight at 4 °C. The preparation was centrifuged for 15 min at 14000 x g to remove insoluble aggregates (Protofibrils and fibrils) and the supernatant containing soluble A β ₄₂ oligomers was transferred to new tubes and maintained on ice during the experimentation. "Monomer" solutions were also prepared; in this case the peptide film was dissolved in DMSO (1 mM) and further diluted in PBS (1 µM) and immediately used after centrifugation without the aging step.

A β peptidic treatment

The A β ₄₂ and the A β ₄₂₋₁ synthetic peptides (Bachem, Bubendorf, Switzerland) were first dissolved in DMSO (Sigma chem. CO; St Louis, MO) and then diluted in the working media. According to experimental conditions, two types of peptidic treatments have been applied on the cells. For “chronic” treatment, cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ and the treatment consisted of an overnight application of peptide A β ₄₂ or A β ₄₂₋₁ (10 nM otherwise specified). For “acute” application, A β ₄₂ or the reverse peptide A β ₄₂₋₁ were diluted in PBS for immunochemistry or HEPES buffer for calcium imaging and then applied to the cells at a final concentration of 1 μ M (otherwise specified).

Immunocytochemistry

PC12 cells were plated on poly-L-ornithine coated coverslips and maintained for 5 days in culture media supplemented with NGF (50 μ g/l) to induce neuronal differentiation at 37°C. According to experimental conditions, PC12 cells have undergone a chronic treatment ([A β ₄₂ or the reverse A β ₄₂₋₁] = 5nM diluted in culture media overnight) and/or an acute treatment ([A β ₄₂ or the reverse A β ₄₂₋₁] = 200nM diluted in PBS, for 10 minutes). Cells were subsequently rinsed to eliminate unbound A β and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes. PC12 cells were then incubated in a blocking solution (3% BSA in PBS) for 1 hour at room temperature. A rabbit polyclonal antibody A11 directed against A β oligomers (Chemicon International, Temecula, CA; diluted 1:1500 in blocking solution) was applied to the cells overnight at 4°C. Cells were washed three times for 10 minutes with the blocking solution and incubated with the appropriate secondary alexa 546-conjugated antibody (1:2000, Life technologies, St Aubin, France) for 2 hours at room temperature, washed 3X10 minutes in PBS and mounted in Mowiol. Glass slides were observed with a Nikon DIAPHOT-TMD inverted fluorescence microscope and images were acquired with a digital camera (DXM1200, Nikon) and the Metamorph software (Molecular Devices). Images were subsequently processed with Image J software (NIH) for quantification.

In double immunolabeling experiments fixed and non permeabilized cells were first incubated with Alexa Fluor 488-conjugated cholera toxin subunit B (1:500, Life technologies, St Aubin,

France) for 30 minutes at room temperature, then washed and incubated overnight with a primary antibody directed against every forms of A β (6E10, mouse monoclonal, 1:1000, Covance Inc., Rueil-Malmaison, France). Cells were washed 3X10 minutes with the blocking solution and incubated with the appropriate secondary Dylight 549-conjugated Goat anti-mouse IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, USA). In another set of experiments cells were incubated with the 6E10 antibody as above and an antibody directed against the NMDAR2b subunits (Rabbit polyclonal, 1:500, Abcam, Bristol, UK). The immunoreactivity was then revealed by incubating the preparation with Dylight 549-conjugated Goat anti-mouse IgG and Dylight 488-conjugated Goat anti-rabbit IgG antibodies (1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, USA) for 2 hours at room temperature, washed 3X10 minutes in PBS and mounted in Mowiol. Glass slides were observed with a Carl Zeiss LSM 510-confocal microscope (Munich, Germany). Images were subsequently processed with Image J software (NIH) for quantification and the Pearson coefficient was calculated to assess for the co-localization of the markers according to the following equation:

$$r_p = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}}$$

Where x_i represents the fluorescence intensity in the green channel for a single pixel and y_i represents the fluorescence intensity in the red channel for the same pixel. This coefficient is equal to 0 when both markers are randomly distributed. It tends to 1 for a complete co-localization and to -1 for a complete segregation of the markers.

Calcium imaging

PC12 cells plated on glass-bottom culture dishes were loaded with Fura-2 AM (1 μ M) and pluronic acid (1v/v) (Life technologies, St Aubin, France) in a HEPES buffer (D-Glucose 5.5

mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2mM, NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, Hepes 10 mM, pH 7.4) for 20 min at 37°C. Cells were washed 3 times and again incubated in Hepes buffer for 20 min at 37°C to ensure complete probe hydrolysis. Cells were maintained in Hepes buffer during image acquisition. Data were acquired with an Axiovert 135 microscope (Carl Zeiss, Munich, Germany), an IMAGE-CDD digital camera (Hamamatsu photonics) and the MetaFluor software (Molecular Devices). Fluorescence was excited by a xenon lamp equipped with two alternating filters allowing a fluorescence excitation at 350 nm for Ca²⁺-bound Fura-2 and at 380 nm for unbound Fura 2. Emitted fluorescence intensities (510 nm) were measured from regions of interest centered on individual cells. A pair of images was captured every five seconds. Normalized ratio were calculated by dividing all ratio between fluorescence intensities emitted when cells were excited at 350 nm and when cells were excited at 380 nm by the mean of this ratio during baseline time (F 350/F 380)/mean (F 350/F 380). Variations of these normalized ratio reflect [Ca²⁺]_i changes.

PC12 cells were eventually pretreated with Aβ₄₂ or reverse Aβ₄₂₋₁ (10 nM) overnight. Aβ₄₂ (1 μM final concentration otherwise specified), reverse Aβ₄₂₋₁ (1 μM) were dissolved in Hepes buffer and added to the extracellular medium about 3 mn after starting the recording. When required the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonists D-APV (D-2-amino-5-phosphonovalerate, 50 μM, Tocris Biosciences, United Kingdom) was added to the extracellular medium just before starting of the acquisition.

Western blots

To characterize the Aβ content of the solutions applied on PC12 cells, chronic and acute solutions were prepared by diluting Aβ₄₂ or reverse Aβ₄₂₋₁ in RPMI medium (50 nM) or in PBS (1 μM). Samples were diluted in a reducing sample buffer (TrisHCl 63 mM, glycerol 30%, SDS 2%, Bromophenol blue 0,00025%, pH 6,8) and electrophoretically separated by SDS-PAGE using 4-20% Tris-Glycine polyacrilamide gels and Novex Tris Glycin running buffer (Life Technologies, St Aubin, France) at 125mV for 1h 40 min. The gels were transferred to nitrocellulose membranes (1h 15 min at 125 mA) in transfer buffer (Tris 25 mM, Glycine 192

mM, SDS 0.02%, ethanol 20%). The membranes were blocked in 0.5% non fat dry milk in PBS-Tween20 0.1% and incubated for 15 min with an monoclonal anti-A β 6E10 primary antibody (Signet Laboratories Dedham, MA) and an HRP-conjugated Goat anti-mouse IgG secondary antibody (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc, West Grove, PA, USA) using the SNAPi.d system (Millipore, France). Final detection was performed with chemiluminescence (Supersignal west femto sensitivity substrate, (Thermo Scientific, Rockford, IL) using CL-Xposure films (Thermo Scientific, Rockford, IL).

Statistical analysis

The values are expressed as mean \pm standard deviation. The statistical significance was assessed by ANOVA and subsequent Student-t test analysis.

Results

Biochemical characterization of A β ₄₂ oligomers

Each peptide preparation applied to the cells was evaluated for the presence of soluble oligomers by SDS-PAGE and immunoblotting. Gels were processed for western blotting using 6E10 monoclonal antibody, which recognizes every form of A β . Western blots showed that preparations at low A β concentrations (nanomolar range) contained a mixture of monomers and higher molecular weight oligomers. In preparations containing high A β concentrations (micromolar range) a weak amount of monomer was detected although the same peptide amount was loaded in each well (Fig 1).

A β triggers intracellular calcium increase

We first examined the concentration dependence of the Ca²⁺ signal after acute application of oligomer solutions prepared as described in the methods section. Calcium imaging experiments showed that an acute application of oligomers induces a rapid rise of intracellular calcium in PC12 cells (Fig 2A). This calcium response was dose-dependent. When a low concentration of A β ₄₂ (0.1 μ M) was applied, the calcium response developed

slowly and the amplitude was reduced but detectable; for $A\beta_{42}$ concentrations greater than or equal to $0.5 \mu\text{M}$, the calcium response was fast and large with a time-to-peak within 2 min. This $A\beta$ -induced calcium response correlates with adhesion of $A\beta_{42}$ oligomers on the membrane surface of PC12 cells as illustrated in Fig 2B. Using an antibody specific for the oligomeric form of $A\beta_{42}$ (A11) immunocytochemical micrographs show $A\beta_{42}$ oligomers detection on the cell surface obtained after $1 \mu\text{M}$ $A\beta_{42}$ application.

To check the presence of the peptide on the cellular membrane we performed a double labelling of the cells using an antibody directed against $A\beta_{42}$ (6E10) and revealed by a secondary Dylight-549-conjugated antibody together with an Alexa Fluor 488-conjugated cholera toxin. This last marker specifically reveals lipid microdomains in the plasma membrane (Fig 3). In control conditions when the reverse peptide $A\beta_{42-1}$ was used the fluorescent signal was very low and the measured Pearson coefficient was 0.034 ± 0.171 ; this very low value indicated a random distribution of labelled pixels in both fluorescent channels without colocalization. We observed a partial colocalization of $A\beta_{42}$ with the cholera toxin (Fig 3) as further assessed by a value of 0.226 ± 0.032 for the Pearson coefficient significantly higher than the value in control conditions with a reversed $A\beta_{42-1}$ peptide ($p < 0.05$).

$A\beta_{42}$ oligomers but not monomers increase intracellular calcium

The effects of homogeneous monomeric and oligomeric preparations of soluble $A\beta_{42}$ were examined in fura 2-AM-loaded PC12 cells. Figure 4 illustrates the increase of intracellular free Ca^{2+} . Application of monomers at a final concentration of $1 \mu\text{M}$ evoked no detectable change in Ca^{2+} concentration whereas subsequent application of the same amount of oligomers evoked a rapid increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Controls in absence of peptide had no effect on Ca^{2+} levels. These results were obtained in at least 35 cells under each experimental condition (three independent experiments were performed with different PC12 cultures).

Chronic incubation with low $A\beta_{42}$ concentration enhances the oligomer-induced intracellular calcium response

To mimic physiopathological conditions we incubated the cells overnight with nanomolar concentrations of A β_{42} or A β_{42-1} . Acute subsequent application of A β_{42} peptide (1 μ M; 10 min) on PC12 cells triggered a rapid rise in intracellular calcium (Fig 5A) and this response was potentiated when the cells were preincubated with the A β_{42} peptide (10 nM) overnight or at least 16 hours (chronic treatment, Fig 5A). The peak amplitude of the [Ca²⁺]_i response was significantly increased (704 \pm 822 nM, n= 51, in preincubated cells versus 295 \pm 129 nM, n=45, in non preincubated cells, p< 0.01) although this value varied from cell to cell. Indeed this [Ca²⁺]_i cellular response was specific for A β_{42} application since neither acute application of the reverse peptide A β_{42-1} at μ molar concentration nor chronic treatment with the reverse peptide A β_{42-1} had an effect on the cells when applied (Fig 5A). Moreover, chronic treatment with A β_{42} peptide followed by acute application of the reverse peptide A β_{42-1} did not induce a significant response as compared to control (Fig 5A). This lack of effect of the reverse peptide A β_{42-1} was also confirmed by the weak percentage of responding cells (Fig 5B). The preincubation alone did not modified the resting [Ca²⁺]_i (53.6 \pm 10.8 nM in control cells versus 53.4 \pm 8.9 nM in preincubated cells)

We performed this experiment with increasing concentrations of acutely applied A β_{42} after a chronic incubation of the cells with A β_{42} . We observed a dose-dependent increase of the calcium signal, which was not significantly different from the dose dependence observed in cells not chronically incubated with A β_{42} (not illustrated).

A β_{42} oligomers detection in PC12 cells

To characterize the tertiary form of the peptide bound to the cells and responsible for the observed priming effect we performed immunocytochemical experiments: PC12 cells were incubated with 200 μ M A β_{42} with or without preincubation with 5 nM A β_{42} , fixed and then revealed with an antibody specifically directed against A β oligomers (A11). No significant fluorescent signal was observed after preincubation with 5 nM A β_{42} (Fig 6c) or even after acute application of 200 μ M A β_{42} (Fig 6b). When chronic preincubation was associated to a subsequent acute A β_{42} application a clear signal was observed (Fig 6d and g) suggesting

that most of bound A β_{42} was under the oligomeric form. The quantitative analysis of fluorescence intensities correlates with the priming effect observed on the A β -induced Ca $^{2+}$ response: the fluorescence intensity in cells chronically incubated with A β_{42} was not significantly different from the fluorescence measured in control cells, while the effect of previous chronic incubation on an acute A β_{42} application was highly significant ($p < 0.001$, Fig 6g).

NMDA-R involvement in A β_{42} oligomer-induced response

NMDA receptors have been reported to be involved in the A β -induced Ca $^{2+}$ response (for a review see [16]). To explore the role of NMDA receptors in the A β -induced Ca $^{2+}$ response in our cellular model, we selected the NMDA-R antagonist D-APV and tested the effects of this antagonist on cytosolic Ca $^{2+}$. Most of the cells were not responding to A β_{42} application in the presence of 50 μ M D-APV (Table 1). In the remaining responding cells (about 5% of the total cell number) the [Ca $^{2+}$] $_i$ increase induced by A β_{42} was almost completely inhibited ($94 \pm 1.5\%$). (Table 1).

Effect of A β_{42} application on NR2b subunit expression.

Previous studies have reported an involvement of the NR2b subunit of NMDA receptor in the cellular response induced by A β_{42} application [17, 18]. Considering that the Ca $^{2+}$ response induced by A β_{42} in PC12 cells was almost completely mediated by NMDA receptors, we checked whether the amyloid peptide was co-localized with NMDA receptors on the cellular membrane. For this purpose we performed double immunolabelling experiments on fixed but non permeabilized PC12 cells with an antibody directed against the NR2b subunit of the NMDA receptor and another antibody (6E10) directed against A β_{42} . As illustrated in Figure 7 we observed a partial co-localization of the membrane-bound A β_{42} with the NR2b subunit. This co-localization occurred in the presence of low concentrations of A β_{42} as well as high concentrations of oligomeric A β_{42} (Fig 7).

We also observed that the fluorescence intensity reflecting NR2b immunoreactivity was triggered by A β treatment of the cells (Fig 7 lower graph). A quantification of the fluorescence intensity revealed no significant increase of NR2b expression after chronic exposure of the cells to low concentrations of monomeric A β_{42} . However NR2b immunoreactivity was significantly increased when the cells were incubated with high concentrations of oligomeric A β_{42} . In this case a trend of priming effect after chronic A β_{42} application was observed although not significant. It should be pointed out that the cells appeared heterogeneous in the label immuno-intensity for NR2B (Fig. 7, arrows). This probably reflects a partial differentiation of some cells and it also explains the lack of significance of priming effect of the cells pretreatment.

To quantify the co-localization of A β_{42} bound to the cellular membrane and membrane-expressed NR2b we also calculated the Pearson coefficient as shown in Table 2. The low value of this coefficient confirmed the partial co-localisation of the two proteins. However while no significant difference in the Pearson coefficient value was observed after preincubation of the cells with low concentrations of monomeric A β_{42} , these values significantly increased after acute application of an oligomeric A β_{42} solution to the cells. This indicated that at least part of the neo-expressed NR2b subunit was co-localized with A β_{42} .

Discussion

Growing evidence points to a disruption of intracellular Ca²⁺ homeostasis in AD and other neurodegenerative diseases (for a review see 17), and elevated intracellular Ca²⁺ levels are known to trigger metabolic cascades that ultimately lead to synaptic dysfunction and cell death [18,19]. It has been established that this deleterious effect is mainly induced by the soluble forms of the amyloid peptides [8,9]. However considering the pathological and physiological concentrations of soluble A β encountered in the nervous tissue raises the question of such low concentrations effects on the cellular homeostasis.

In the present report we show that micromolar concentrations of A β ₄₂ induce an increase of intracellular [Ca²⁺] in PC12 cells expressing a neuronal phenotype. Although the concentration used is high compared to physiological concentrations this is in agreement with numerous previous studies performed either on primary cultures of nerve cells or on cell lines [19-21]).

Additionally the pharmacological characterization of the observed Ca²⁺ cellular response corroborates previous observations: we show that this response is preferentially induced by A β ₄₂ oligomers in agreement with other studies [22-24]. Prefibrillar amyloid aggregates have been shown to elevate cytosolic Ca²⁺ in neurons or neuronal cell lines ([25, 26]) and this phenomenon has been proposed to result from Ca²⁺ influx across the plasma membrane either through cation-selective channels formed by A β ₄₂ itself or through a general disruption of lipid integrity ([12, 26, 27]. Another still controversial hypothesis is based the effect of A β ₄₂ itself on voltage operated calcium channels although the peptide has been described to inhibit L-type channels at micromolar concentrations [28] and P/Q type channels at nanomolar concentrations [29]. We cannot exclude these hypothesis but they appear unlikely since we observed that the A β ₄₂-induced Ca²⁺ response was almost completely inhibited by D-APV, an antagonist of the NMDA receptor. This observation needs some comments: A β ₄₂ has recently been described to directly activate NMDA receptors in transfected cells expressing NR1, NR2a and NR2b subunits [30]. PC12 cells were reported to express NR1 and NR2c [31]. Our present observation is still unexpected since these receptors were reported to be non functional in NGF-treated PC12 cells at least as receptor channels [31]. Overnight exposure of PC12 cells to 10 nM A β ₄₂ did not modified the basal [Ca²⁺]_i in agreement with previously published data [24]. Moreover we did not observe a significant oligomeric A β ₄₂ accumulation on the cellular membranes after chronic exposure of the cells to as revealed by immunocytochemistry. Thus we were not able to show any noticeable change, which would be induced by preincubating the cells with low concentrations of A β ₄₂. There are some clues in the literature indicating that A β ₄₂ is acting differently depending on its cellular location or on its concentration: [32] showed on cultured hippocampal neurons

that pmolar $A\beta_{42}$ application was able to increase long term potentiation while μ molar $A\beta_{42}$ application inhibited it. Acute application of $A\beta_{42}$ was described to increase the K^+ -induced Ca^{2+} response while chronic application would induce apoptosis [24]. Additionally different species of $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$ [33] were described to interact with cellular membranes of living cells. These different species were not exchangeable [34] and their amount binding to the membranes depended on the peptide conformation: according to their size low concentration would favour monomeric or small oligomeric forms while high peptide concentration triggers the binding of large soluble oligomers [31] in agreement with our results. This chronic exposure however induced a significant increase of the Ca^{2+} response induced by a subsequent acute application of 1 μ M $A\beta_{42}$. Such a priming effect of low $A\beta_{42}$ concentrations was also observed in PC12 cells by Innocent et al [24]. In this case the K^+ -induced Ca^{2+} response was increased.

The trigger of membrane expression of NR2b by $A\beta_{42}$ oligomers was also unexpected. This effect was observed after acute treatment of the cells with oligomers at high concentration but not after chronic treatment. Indeed the amyloid peptide has been suggested to interact with extra synaptic NMDA receptors involving NR2b subunits [30]. More recently Liu et al [35] also reported that $A\beta_{42}$ induced an increase of NR1 and NR2b subunits in rat hippocampal neurons in culture. Given the rapid effect observed (within 5 min) and the fact that it was revealed in non permeabilized cells this phenomenon should not be assigned to protein synthesis but rather to a translocation of NR2b from the cytoplasm or from endogenous vesicles toward the plasma membrane. It remains that the intracellular signal for this translocation is unknown. Besides an hypothetic and weak $[Ca^{2+}]_i$ increase induced per se by $A\beta_{42}$ (see above) an alternative hypothesis may be a metabotropic effect of $A\beta_{42}$ as described recently [36].

Hence the present study describes a functional link between two forms of $A\beta_{42}$ interacting on the plasma membrane of PC12 cells. Considering these observations we would suggest that a low physiologic $A\beta_{42}$ concentration induces monomers (or small oligomers) binding, which in turn favours large oligomers to bind when the peptide concentration increases. Coming

back to the physiopathology of the disease this could explain the deep gradient of degenerated neurons around amyloid plaques in the brain tissue and the slow progression of the disease. A continuous secretion of amyloid peptides does not notably hinder neuronal function but prepare the bad end of the neurons. Degeneration maximally occurs in close vicinity to senile plaques. These plaques can be considered as $A\beta_{42}$ reservoirs generating high concentration of soluble amyloid peptide oligomers. Due to the size of the oligomers the diffusion of the peptide through the brain tissue is limited and the concentration gradient is high.

This hypothesis does not explain the spreading of the disease throughout the brain during the course of the pathology. It has been suggested similarities between prion diseases and AD involving intracellular transport of misfolded particles [37, 38]. According to this hypothesis monomers or small oligomers of misfolded proteins could serve as seeds for larger pathogenic particles. Our present observation corroborates and completes this suggestion: soluble misfolded $A\beta_{42}$ could be not only seeds for larger oligomers but also anchors on cellular membranes. An important and recurrent question still remains related to the specific susceptibility of neuronal types to the disease: is this effect of low $A\beta_{42}$ concentrations dependent on the presence of specific receptors?

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, by a special grant for Alzheimer's disease research from the Fondation pour la Recherche Médicale and received a financial support from the SATT Conectus. We are grateful to Odile Proschksh for her technical support.

References

- [1] Castano EM, Frangione B (1988) Human amyloidosis, Alzheimer disease and related disorders. *Lab Invest* **58**, 122-132.
- [2] Ogomori K, Kitamoto T, Tateishi J, Sato Y, Suetsugu M, Abe M (1989) Beta-protein amyloid is widely distributed in the central nervous system of patients with Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **134**, 243-251.
- [3] Braak H, Braak E, Ohm T, Bohl J (1989) Alzheimer's disease: mismatch between amyloid plaques and neuritic plaques. *Neurosci Lett* **103**, 24-28.
- [4] Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197**, 192-193.
- [5] Braak H, Braak E, Ohm T, Bohl J (1988) Silver impregnation of Alzheimer's neurofibrillary changes counterstained for basophilic material and lipofuscin pigment. *Stain Technol* **63**, 197-200.
- [6] Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259.
- [7] Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK (1992) Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* **13**, 179-189.
- [8] McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **46**, 860-866.
- [9] Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM (1999) The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* **158**, 328-337.
- [10] Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* **19**, 8876-8884.
- [11] Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486-489.
- [12] Kaye R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG (2004) Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem* **279**, 46363-46366.
- [13] Evangelisti E, Wright D, Zampagni M, Cascella R, Bagnoli S, Relini A, Nichino D, Scartabelli T, Nacmias B, Sorbi S, Cecchi C (2012) Lipid Rafts Mediate Amyloid-induced Calcium Dyshomeostasis and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*.
- [14] Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6448-6453.
- [15] Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* **24**, 10191-10200.

- [16] Malinow R (2012) New developments on the role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* **22**, 559-563.
- [17] Hu NW, Klyubin I, Anwyl R, Rowan MJ (2009) GluN2B subunit-containing NMDA receptor antagonists prevent Aβ-mediated synaptic plasticity disruption in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20504-20509.
- [18] Rammes G, Hasenjager A, Sroka-Saidi K, Deussing JM, Parsons CG (2011) Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of beta-amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Neuropharmacology* **60**, 982-990.
- [19] Huang TH, Yang DS, Fraser PE, Chakrabartty A (2000) Alternate aggregation pathways of the Alzheimer beta-amyloid peptide. An in vitro model of preamyloid. *J Biol Chem* **275**, 36436-36440.
- [20] Arispe N, Diaz J, Durell SR, Shafir Y, Guy HR (2010) Polyhistidine peptide inhibitor of the Aβ calcium channel potently blocks the Aβ-induced calcium response in cells. Theoretical modeling suggests a cooperative binding process. *Biochemistry* **49**, 7847-7853.
- [21] Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH (2000) Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J* **14**, 1508-1517.
- [22] Ono K, Condrón MM, Teplow DB (2009) Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14745-14750.
- [23] Fradinger EA, Monien BH, Urbanc B, Lomakin A, Tan M, Li H, Spring SM, Condrón MM, Cruz L, Xie CW, Benedek GB, Bitan G (2008) C-terminal peptides coassemble into Aβ₄₂ oligomers and protect neurons against Aβ₄₂-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14175-14180.
- [24] Innocent N, Evans N, Hille C, Wonnacott S (2010) Oligomerisation differentially affects the acute and chronic actions of amyloid-beta in vitro. *Neuropharmacology* **59**, 343-352.
- [25] Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* **280**, 17294-17300.
- [26] Kawahara M, Kuroda Y, Arispe N, Rojas E (2000) Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J Biol Chem* **275**, 14077-14083.
- [27] Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin MC (2002) The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides* **23**, 1311-1315.
- [28] Ueda K, Shinohara S, Yagami T, Asakura K, Kawasaki K (1997) Amyloid beta protein potentiates Ca²⁺ influx through L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels: a possible involvement of free radicals. *J Neurochem* **68**, 265-271.
- [29] Nimmrich V, Grimm C, Draguhn A, Barghorn S, Lehmann A, Schoemaker H, Hillen H, Gross G, Ebert U, Bruehl C (2008) Amyloid beta oligomers (Aβ₁₋₄₂ globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *J Neurosci* **28**, 788-797.
- [30] Texido L, Martín-Satue M, Alberdi E, Solsona C, Matute C Amyloid beta peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium* **49**, 184-190.
- [31] Edwards MA, Loxley RA, Williams AJ, Connor M, Phillips JK (2007) Lack of functional expression of NMDA receptors in PC12 cells. *Neurotoxicology* **28**, 876-885.

- [32] 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**, 14537-14545.
- [33] Nag S, Chen J, Irudayaraj J, Maiti S (2010) Measurement of the attachment and assembly of small amyloid-beta oligomers on live cell membranes at physiological concentrations using single-molecule tools. *Biophys J* **99**, 1969-1975.
- [34] Bateman DA, Chakrabartty A (2009) Two distinct conformations of Abeta aggregates on the surface of living PC12 cells. *Biophys J* **96**, 4260-4267.
- [35] Liu Z, Lv C, Zhao W, Song Y, Pei D, Xu T (2012) NR2B-containing NMDA receptors expression and their relationship to apoptosis in hippocampus of Alzheimer's disease-like rats. *Neurochem Res* **37**, 1420-1427.
- [36] Kessels HW, Nabavi S, Malinow R (2013) Metabotropic NMDA receptor function is required for beta-amyloid-induced synaptic depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4033-4038.
- [37] Brundin P, Melki R, Kopito R (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 301-307.
- [38] Jucker M, Walker LC (2011) Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* **70**, 532-540.

Table 1.

Effect of NMDA receptor antagonist D-APV on the intracellular calcium response induced by $A\beta_{42}$ application to PC12 cells.

	Ct	$A\beta_{42}$	DAPV	DAPV + $A\beta_{42}$
Normalized ratio F350/F380	0.98 ± 0.02	5.18 ± 0.40	1.02 ± 0.04	0.99 ± 0.03
% of responsive cells	7 ± 1.0	73.3 ± 7.6	0	9 ± 16
% of inhibition	–	–	–	94 ± 1.5

Table 2

Pearson coefficient values quantifying the co-localisation of A β_{42} and NR2b subunit on PC12 cell membranes

	Control	Acute A β_{42}	Chronic A β_{42}	Chronic + Acute A β_{42}
Pearson coefficient Mean \pm SD	0.17 \pm 0.05	0.22 \pm 0.03	0.20 \pm 0.04	0.21 \pm 0.03
Student t-test vs control	-	P < 0.01	ns	P < 0.05
Number of measured ROIs	16	12	12	16

Legends to figures

Figure 1

Biochemical characterization of A β_{42} applied solutions: SDS-PAGE separation followed by western blot revealed with 6E10 antibody shows that the RPMI solution of A β_{42} at low concentration contains a mixture of monomers and higher molecular weight oligomers, while at high concentration the A β_{42} preparation mostly contains oligomers.

Figure 2.

Panel A: **A β_{42} -induced Ca $^{2+}$ increase in PC12 cells.** The effect induced by acute application of A β_{42} is dose dependent. However this Ca $^{2+}$ response is observed with concentrations of applied A β which are much higher than the physiological concentrations of

soluble A β observed in brain tissue. (curves are representative of the average of 50 recorded cells).

Panel B: **Immunocytochemical detection of A β_{42} -oligomers in PC12 cells** after acute application of 1 μ M soluble A β_{42} (right) or vehicle (left) and revealed by an antibody specific for oligomers (A11, 1:1500). No staining was observed in control cells incubated with the buffer solution (left).

Figure 3

A β_{42} partially colocalizes with cholera toxin on the surface of PC12 cells. Cells were incubated with either 1 μ M A β_{42-1} (the reverse peptide) as a control condition or with 1 μ M A β_{42} prior to fixation and immunolabeling for A β_{42} (red) and cholera toxin (green). A β_{42} as revealed by the antibody 6E10 (directed against every form of the peptide) is partially colocalized with membrane microdomains revealed by cholera toxin as quantified by a Pearson coefficient of 0.23 ± 0.03 . Calibration bar 20 μ m

Figure 4.

Comparison of the Ca $^{2+}$ response induced in PC12 cells after acute application of an A β_{42} monomer solution (1 μ M) and of an A β_{42} oligomer solution (1 μ M). The monomer solution induces a weak Ca $^{2+}$ response as compared to the oligomer-induced response.

Figure 5

Panel A: **Chronic incubation of PC12 cells with nanomolar A β_{42} concentrations enhances the Ca $^{2+}$ response induced by subsequent micromolar A β_{42} application.** The inactive reverse peptide A β_{42-1} neither induces a Ca $^{2+}$ response nor modifies the A β_{42} -induced response.

Panel B: This last observation also correlates with the proportion of observed responding cells. (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$)

Figure 6

Immunocytochemistry of PC12 cells revealed by the A11 antibody (oligomers

specific). The cells were treated with the following conditions: control (panel A); acute application of 200 nM A β_{42} (panel B); chronic incubation of 5 nM A β_{42} (panel C); chronic with 5 nM A β_{42} incubation followed by acute application of 200 nM A β_{42} (panel D); Chronic application of the reverse peptide A β_{42-1} (5 nM) (panel E); chronic incubation with 5 nM A β_{42-1} followed by acute application of 200 nM A β_{42} (panel F).

Panel G represents the quantification of the labeling of PC12 cells under various conditions mentioned above. The potentiation of the calcium response is correlated with an increase in A β_{42} oligomers binding on the cells (* = p < 0.05). (Calibration bar 20 μ m)

Figure 7

A β_{42} binding to PC12 cells is correlated with the membrane expression of NR2b. Fixed PC12 cells were incubated with primary antibodies directed against NR2b subunit (green) and A β_{42} (red). The chronic treatment with low A β_{42} did not produce a significant increase of NR2b immunoreactivity. The fluorescence intensity related to NR2b increased when the cells were incubated with oligomeric A β_{42} as illustrated by the lower panel. Note that the two antigens are partially colocalized. However in some cells this colocalization appears weak suggesting a heterogeneity among PC12 cells (white arrows). Calibration bar 20 μ m

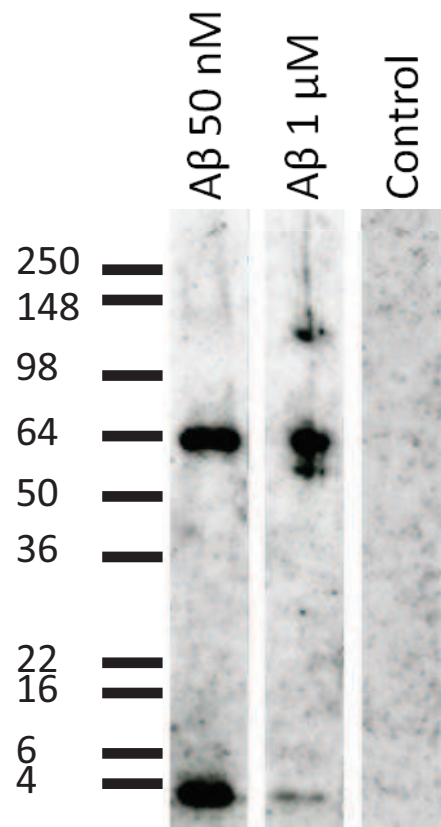


Figure 1.

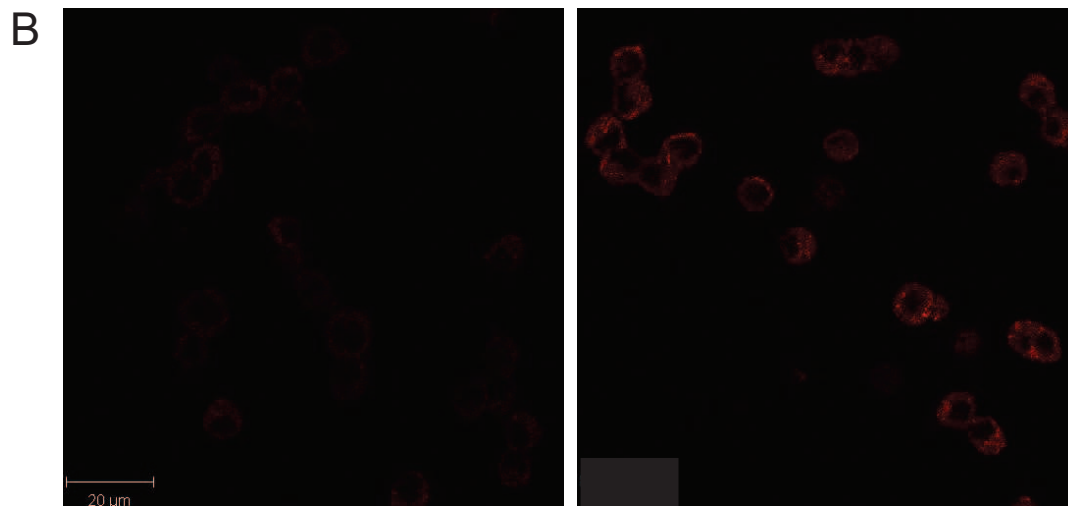
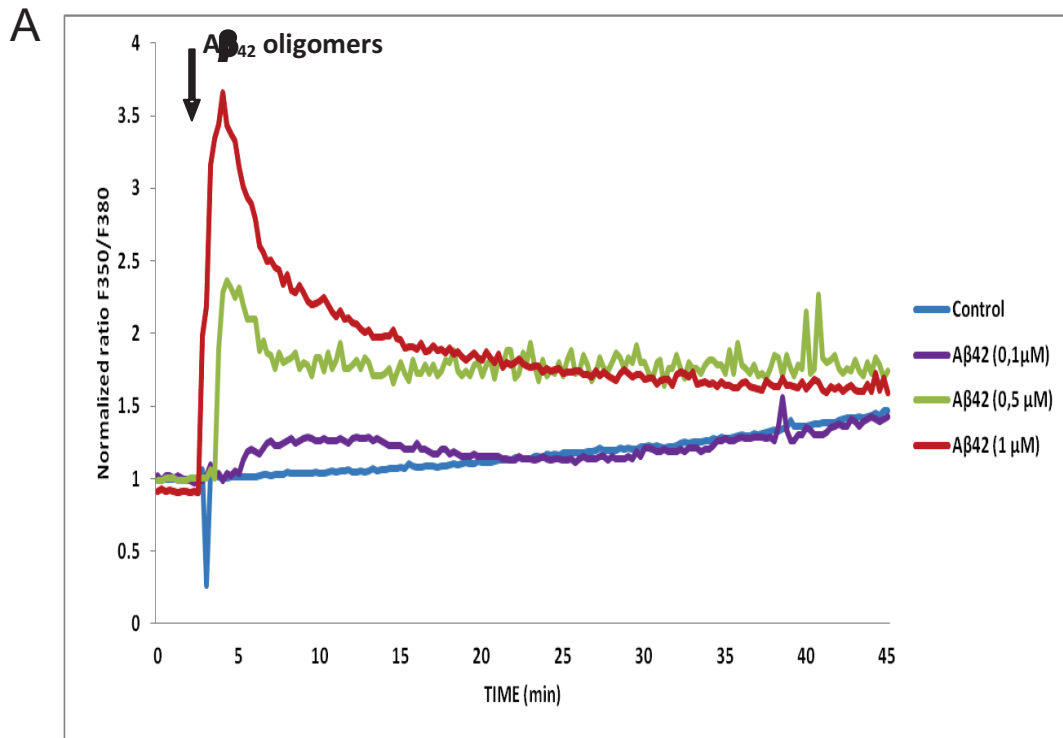


Figure 2.

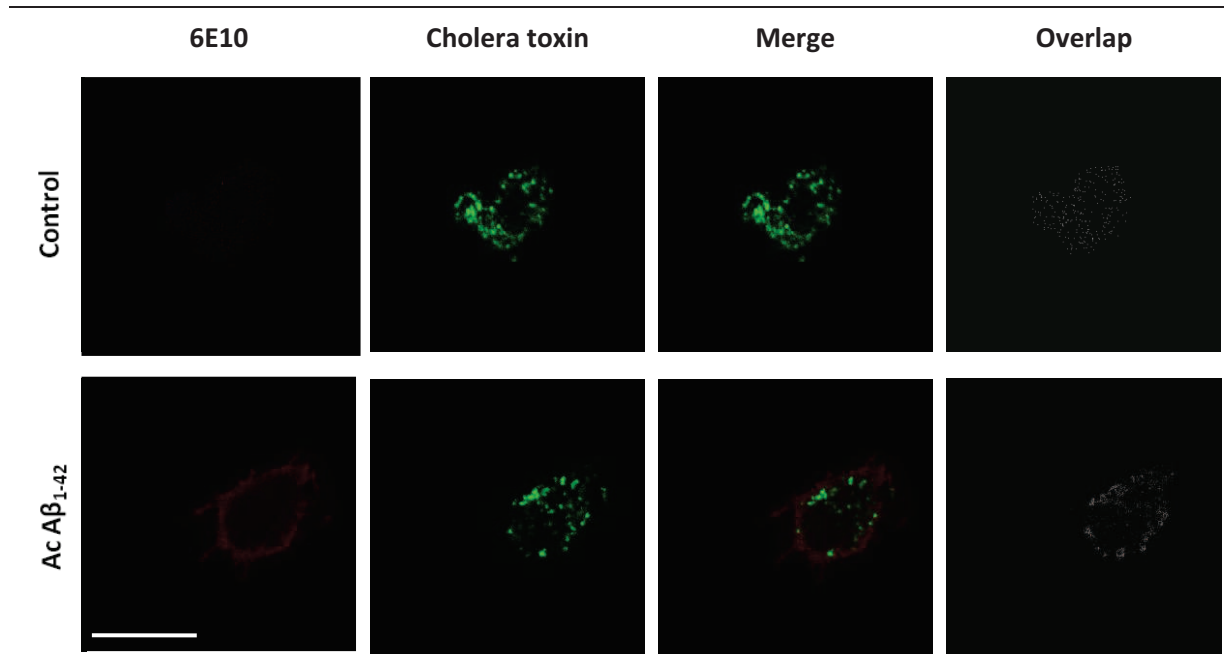


Figure 3.

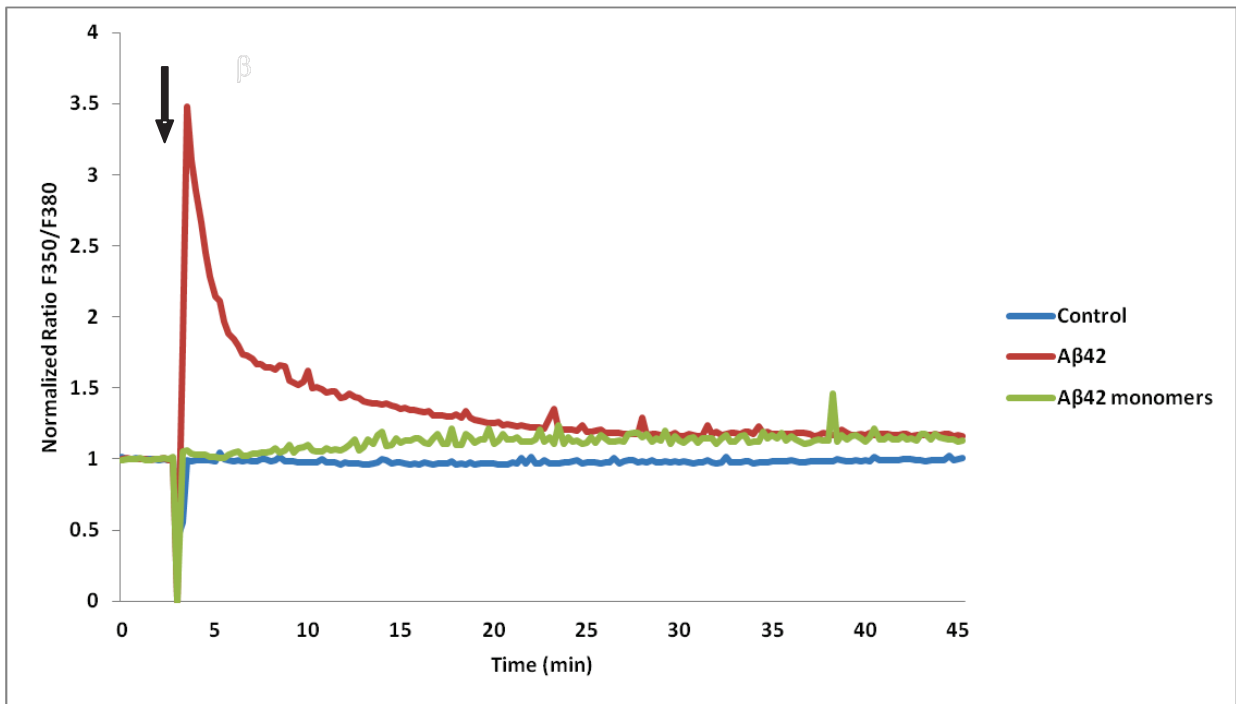


Figure 4.

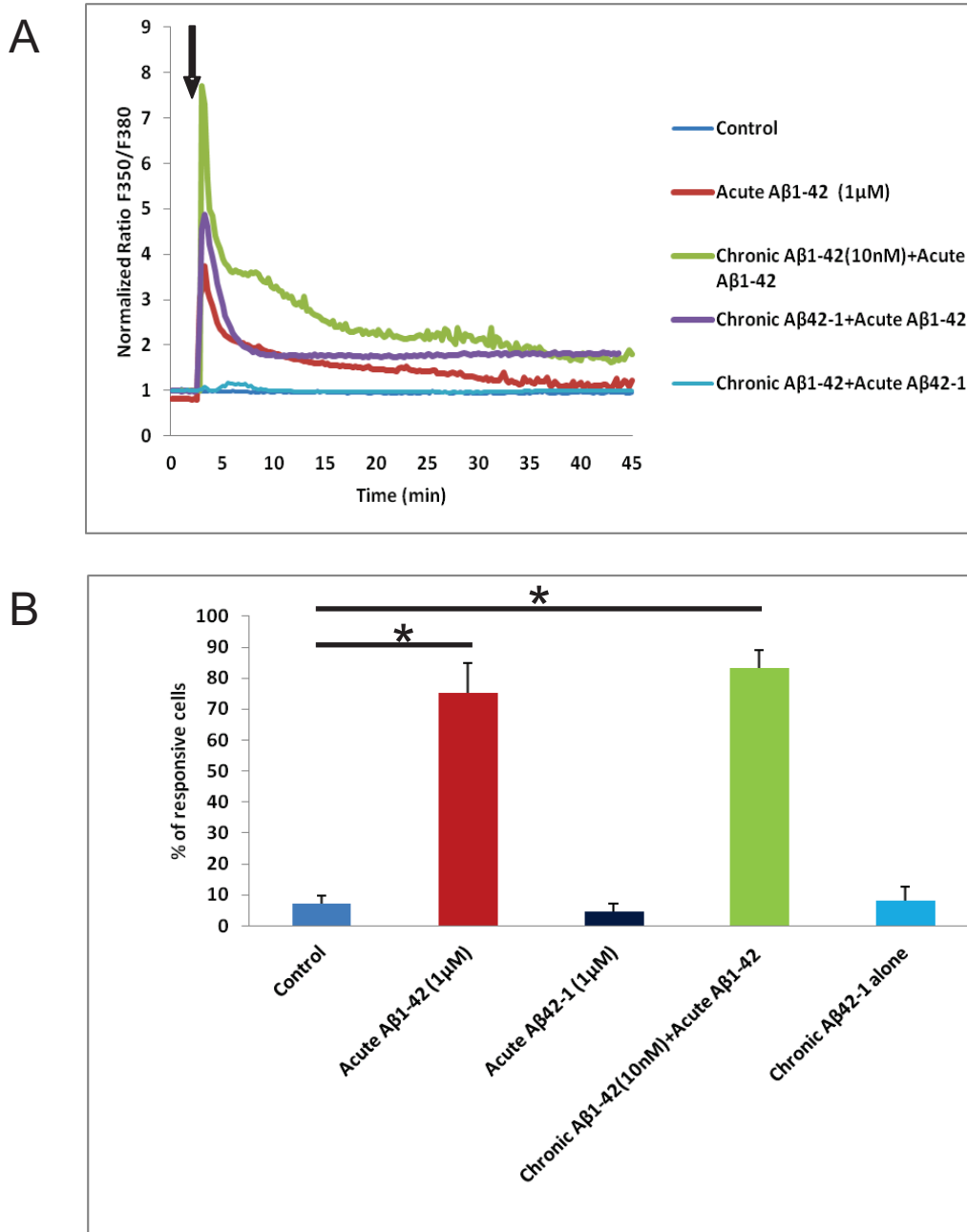


Figure 5.

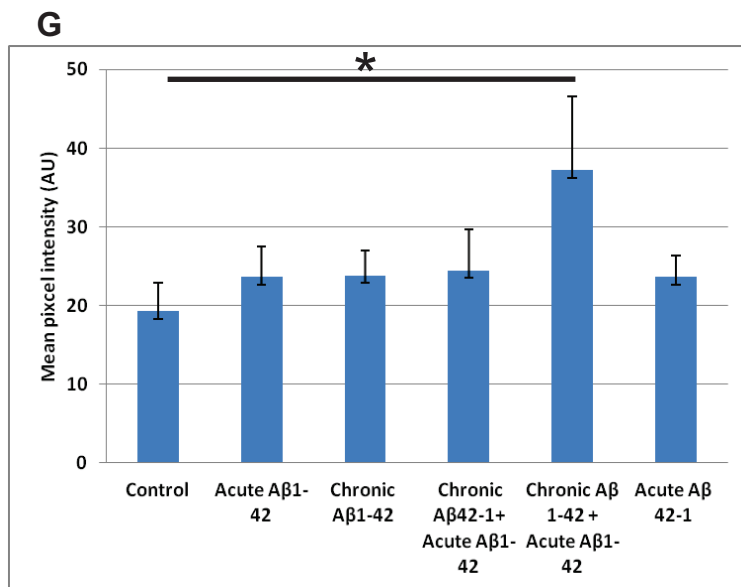
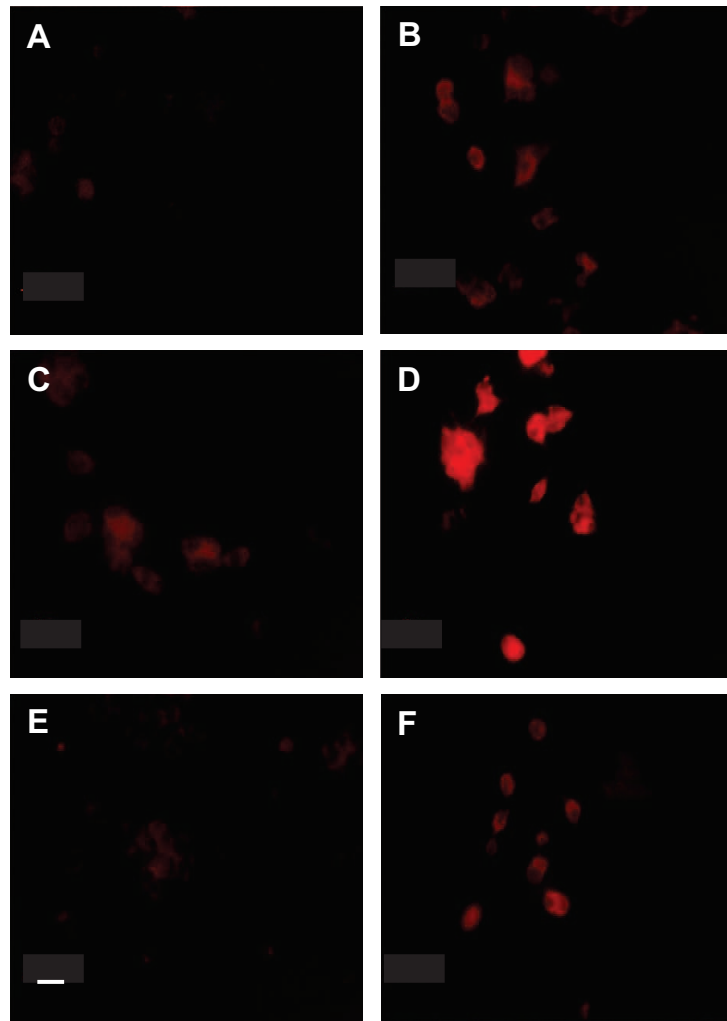


Figure 6.

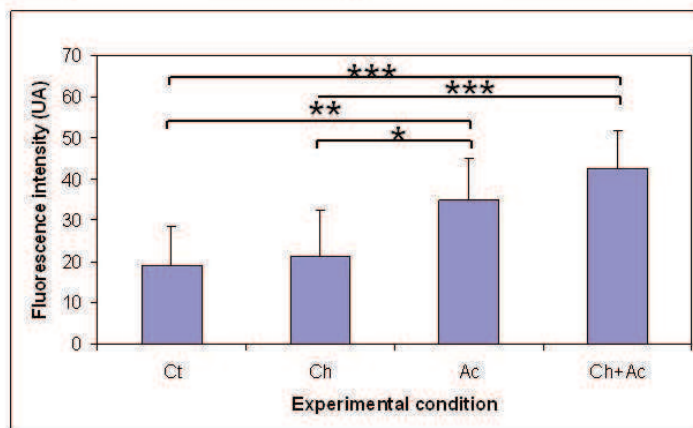
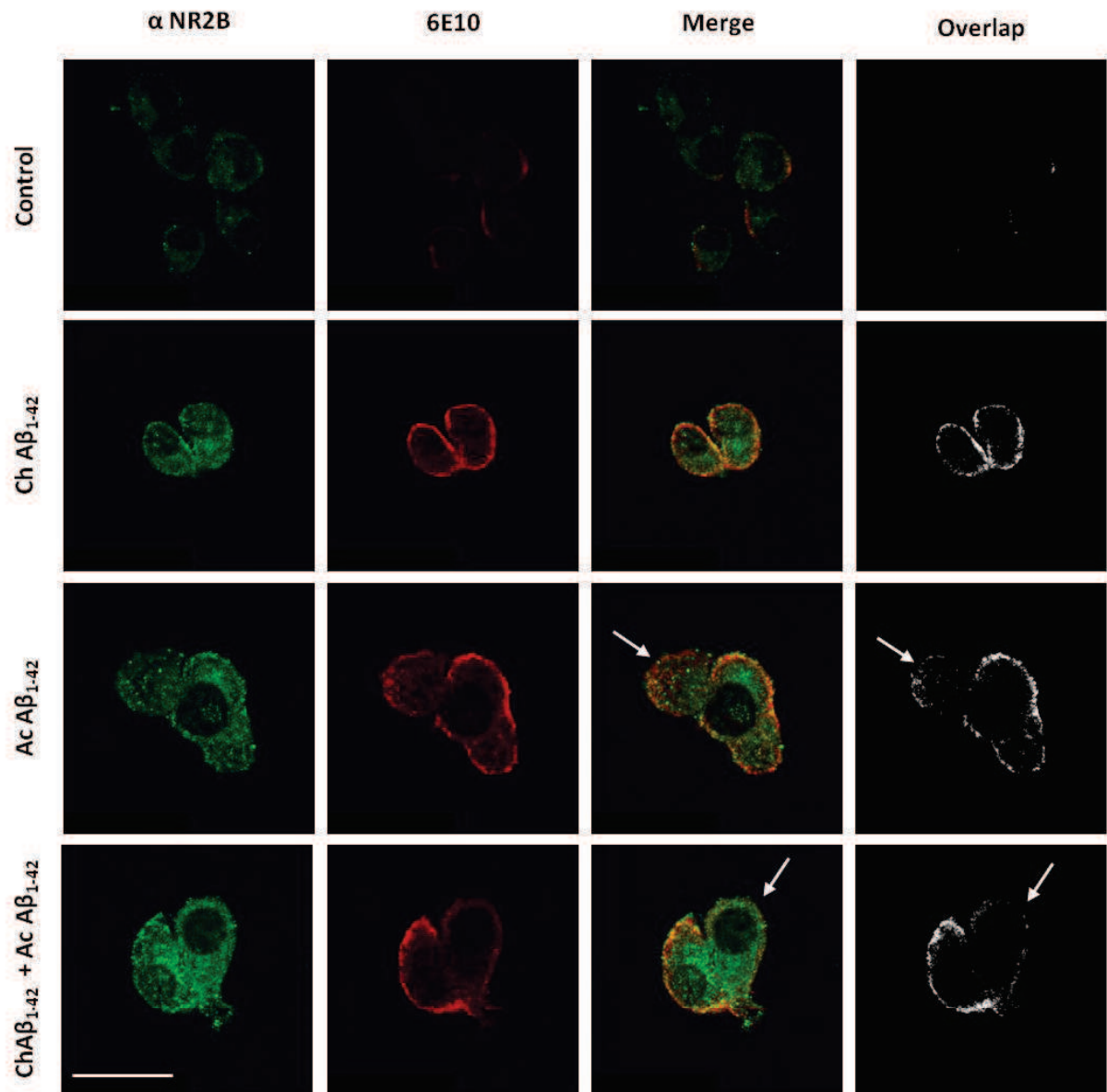


Figure 7.

Interaction du peptide beta amyloïde avec les membranes plasmiques cellulaires

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative du système nerveux central qui se caractérise notamment par l'accumulation de peptide beta-amyloïde ($A\beta$) dans le tissu nerveux. Dans la première partie de cette thèse nous avons montré que l'interaction des oligomères $A\beta_{1-42}$ de haut poids moléculaire avec la membrane plasmique des cellules PC12 différenciées ou des cellules nerveuses (neurones et astrocytes primaires) provoque des variations de la $[Ca^{2+}]_i$ dépendant de l'activation des récepteurs NMDA. Dans la seconde partie nous avons montré qu'une pré-exposition des cellules PC12 et des cellules nerveuses à de faibles concentrations de peptide $A\beta$ module l'interaction ultérieure des oligomères avec la membrane plasmique. Enfin dans le cadre d'une collaboration avec l'entreprise Innovative Health Diagnostics (IHD) nous avons participé à la caractérisation d'une sonde amyloïde fluorescente développée pour réaliser des tests de détection de la MA à partir d'échantillons sanguins.

Résumé en anglais

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease of the central nervous system which is characterized in particular by the accumulation of beta amyloïde peptide ($A\beta$) in nerve tissues. In the first part of this thesis we showed that the interaction of high molecular weight $A\beta_{1-42}$ oligomers with the plasma membrane of differentiated PC12 or nerve cells (neurons and astrocytes) triggers variations of their depending on the activation of the NMDA receptors. In the second part we showed that a pre-exposure of PC12 and nerve cells with low concentrations $A\beta_{1-42}$ of modulates the later interaction of oligomers with the plasma membrane. Finally in collaboration with the company Innovative Health Diagnostics (IHD) we participated in the characterization of a fluorescent amyloid probe developed to realize detection test of AD from blood samples.

Alzheimer's disease
Beta-amyloid oligomers
NMDA receptors
Intracellular calcium responses
Primary culture
PC12 cells