



HAL
open science

Validation fonctionnelle d'une nouvelle stratégie thérapeutique prévenant la dégénérescence et les troubles cognitifs associés dans des modèles murins de la Maladie d'Alzheimer

Pierre Garcia

► To cite this version:

Pierre Garcia. Validation fonctionnelle d'une nouvelle stratégie thérapeutique prévenant la dégénérescence et les troubles cognitifs associés dans des modèles murins de la Maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL084N . tel-01749495

HAL Id: tel-01749495

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749495>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE NANCY
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

N° attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

Ecole doctorale RP2E

Discipline : Sciences Agronomiques

Présentée et soutenue publiquement par

Mr Pierre GARCIA

Le 14 novembre 2011

**Validation fonctionnelle d'une nouvelle stratégie thérapeutique
prévenant la dégénérescence et les troubles cognitifs associés dans
des modèles murins de la Maladie d'Alzheimer**

Directeur de thèse : Dr. Thierry Pillot

Co-directrice de Thèse : Dr. Simone Niclou

JURY

Pr. F. BOURGAUD, Président

Dr. F. DARCHEN, Rapporteur

Dr. B. ALLINQUANT, Rapporteur

Dr. X. LEROY, Examineur

Dr. T. PILLOT, Directeur de thèse

Dr. S. NICLOU, Co-directrice de Thèse

Ce travail a été réalisé
au sein de l'équipe d'accueil Lipidomix EA 4422 (Directrice : Dr. Frances Yen-Potin),
Institut National de Polytechnique de Lorraine (INPL), Nancy, France
sous la direction du Dr. Thierry Pillot

en collaboration avec

le Laboratoire Norlux de Neuro-Oncologie (Directrice : Dr. Simone Niclou)
Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé), Luxembourg, Luxembourg
sous la codirection du Dr. Simone Niclou

grâce au soutien financier du Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur, de la
Recherche et de l'Innovation (MCESRI) du Luxembourg (AFR n°EXT-BFR07-006).

Résumé

Validation fonctionnelle d'une nouvelle stratégie thérapeutique prévenant la dégénérescence et les troubles cognitifs associés dans des modèles murins de la Maladie d'Alzheimer.

Aucun traitement de la maladie d'Alzheimer (MA) n'existe à ce jour, soulignant le besoin de développer des stratégies thérapeutiques. La toxicité des oligomères solubles du peptide amyloïde β soluble ($A\beta$) est centrale dans les pertes synaptiques et cellulaires précoces dans la maladie. Dans le cadre de cette hypothèse, nous proposons qu'empêcher ces effets puisse prévenir le déclin cognitif dans la MA. Les facteurs neurotrophiques sont de bons candidats pour prévenir la mort cellulaire mais nécessitent une application ciblée et continue. Nous avons utilisé la technologie d'encapsulation cellulaire pour produire des bioréacteurs implantables contenant des cellules C2C12 sécrétant le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF). Notre objectif était d'établir la preuve du concept que la production à long terme de CNTF *in situ* dans le cerveau, par l'implantation des bioréacteurs, puisse prévenir les atteintes neurotoxiques et les déficits cognitifs liés à l' $A\beta$.

Nos études prouvent que le CNTF produit par les bioréacteurs prévient la cytotoxicité et l'apoptose induites par le peptide $A\beta$ *in vitro*. La neuroprotection dépend de l'activation de la PI3-Kinase et du facteur STAT3. *In vivo*, la pré-implantation des bioréacteurs dans le cerveau prévient les troubles cognitifs induits par l'injection intracérébrale d' $A\beta$ ou retarde leur apparition chez la souris Tg2576. Dans nos deux modèles précliniques de la MA, la protection comportementale est associée au maintien des protéines synaptiques dans l'hippocampe.

Aussi, la production *in situ* de CNTF est une approche thérapeutique préventive efficace contre la toxicité et les déficits cognitifs liés à l' $A\beta$. Ces résultats suggèrent également que l'implantation de cellules encapsulées est un bon procédé pour délivrer des molécules thérapeutiques au cerveau.

Mot-clés : Alzheimer, prévention, oligomères solubles d' $A\beta$, encapsulation, neuroprotection, CNTF, Tg2576, STAT3, mémoire.

À la mémoire de ceux qui m'étaient chers,

À toi, Caroline,

À mes filles, Liz et Clémence,

Et aux futurs souvenirs que nous aurons ensemble.

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu les docteurs Bernadette Allinquant et François Darchen pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail ainsi que pour les intéressants débats qui ont pu être développés suite à nos échanges. Je souhaite également remercier le Dr Frédéric Bourgaud pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury. Je remercie aussi le Dr Xavier Leroy pour avoir partagé avec moi sa vision « pratique » quand à la valorisation de ce travail. Un grand merci à ces personnes, pour l'intérêt bienveillant qu'ils ont manifesté à l'égard de ce travail.

Un grand MERCI tout particulier à mes encadrants, les docteurs Simone Niclou et Thierry Pillot. Simone, je te remercie pour tes judicieux conseils, ta gentillesse et ton implication quand à l'élaboration de ce travail. Tu m'as fait découvrir l'aspect transnational de la recherche, ce qui a été furieusement enrichissant pour moi. Tu as toujours répondu à mes appels, et pour cela je te remercie. J'espère que nous aurons encore l'occasion de nous recroiser par la suite. J'en profite pour remercier ton équipe (Jo, Amandine et Vanassa) qui via la production des billes a contribué significativement à ce travail. Thierry, tu es sans conteste la personne à qui je dois le plus. Tu as accepté de m'offrir la chance de réaliser cette Thèse durant laquelle j'ai énormément appris. Cette réussite est aussi la tienne en tant qu'encadrant et coach. Je te remercie pour ton écoute et ton soutien, ta patience et tes conseils, ainsi que les discussions « science » et ta bouteille de pastis artisanal. Reçois dans ces lignes l'expression de mon profond respect et de mon amitié. Je sors de cette aventure avec la fierté d'avoir été formé par un scientifique de ta trempe.

Je remercie mes collègues et amis (dans un désordre non exhaustif qui me caractérise assez bien). Un merci aux thésards qui m'ont accompagné : Ahmad, Samina, Navy et Cédricus (alias Dr Mouse), que je soutien pour la suite de leur travail. Spécial dédicace à Navy, pour ces puissantes blagues involontaires dont toi seule a le secret et Cédric pour l'humour caustique et si fin des carabins qui m'a tellement fait hurler de rire. Merci à Ihsen pour m'avoir expliqué la stéréotaxie. Un merci spécial à Christophe, pour ton amitié, ton franc-parler et ton soutien indéfectible. Merci à Violette, la mémoire du labo : chère Mme Koziel, j'ai été ravi de partager ces années en ta compagnie. Je te remercie tout particulièrement pour ta sympathie, ton écoute et ton soutien aussi bien personnel que professionnel. Un grand merci également à Dodo, Nico, Julie et Pticul. J'ai été très heureux d'avoir pu vous compter dans mon entourage professionnel et personnel, et particulièrement toi, Pticul, pour avoir partagé ma passion dévorante pour le deathmetal.

Un grand merci aussi aux membres de Lipidomix : Francès pour ta gentillesse et ta disponibilité (et certainement pas pour ces délicieux Jelly Beans), Bad pour m'avoir formé aux techniques de comportements, Thierry O pour ton humour si tapageur et ta sympathie (et ce superbe poster qui orne encore les murs du bureau des thésards), Jean-Luc pour tes conseils et le temps que tu as accordé à mes questions, Catherine pour ton franc-parler et ta participation. Afin d'être sur de n'offusquer personne, je remercie ceux que je j'aurais pu oublier.

Je remercie ma famille : c'est grâce à vous que j'ai pu arriver là ou j'en suis aujourd'hui. Voyez, Parents, je n'ai pas fini cuisinier ;) : je vous remercie pour votre soutien au cours des dix dernières années et d'avoir cru en moi. Un grand merci à ma cousine Gwen et mon cousin Stan pour votre soutien. Enfin, le plus important pour moi, merci à toi ma Caro pour ton indéfectible soutien et ton amour sans lesquels je n'aurais pu m'accomplir. Cette thèse, c'est aussi la tienne. Merci à toi Liz,

ma petite princesse, dont le sourire matinal a fait chaque jour de ces 4 dernières années un océan de motivation. Merci à toi Clémence, de nous avoir rejoints : « aaaataa » à toi aussi mon coeur. Voyez mes Amours, papa n'habite plus au labo.

J'ai également une pensée émue pour ma tante Fabienne, et mes grand-mères Germaine et Huguette (cette dernière atteinte de la maladie d'Alzheimer), qui nous ont quittées au cours de ces années de travail avant d'avoir pu en voir la fin. J'achève cette Thèse non sans penser à elles.

Merci à tous, famille, amis, collègues. Grâce à votre soutien, j'ai pu réaliser mon rêve de devenir chercheur pour assouvir mon insatiable curiosité de comprendre le monde qui m'entoure. Merci, merci, merci, merci je ne le dirai jamais assez : ma gratitude me semble sans fin. Il me reste encore beaucoup à apprendre, et je suis sûr que vous tous que j'ai croisé participerez encore à mon « éducation » scientifique. J'ai encore des centaines de personnes à remercier, mais comme diraient certaines personnes (qui se reconnaîtront) : « focus !! », alors je « focus » au travers d'un message inversement proportionnel à la taille du mot « Merci », du fond du coeur.

Sommaire

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	4
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
AVANT-PROPOS.....	10
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	12
Partie A: La maladie d'Alzheimer.....	13
1. La Maladie d'Alzheimer : Généralités	13
1.1 Définition	13
1.2 Historique	13
1.3 Le diagnostic	14
1.3.1 La démarche diagnostique et les outils neuropsychologiques.....	14
1.3.2 La Phase MCI (Mild Cognitive Impairment) et Prodromale	16
1.4 Étiologie	18
1.4.1 Les formes familiales de MA (FAD).....	18
1.4.2 Les formes sporadiques de MA et les facteurs de risques	19
1.4.2.1 Les facteurs de risque non modifiables.	19
1.4.2.2 Les facteurs de risque modifiables	20
2. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	22
2.1 Les lésions « positives »	22
2.1.1 La dégénérescence neurofibrillaire (DNF)	22
2.1.2 Les dépôts amyloïdes	23
2.2 Les lésions négatives.....	24
2.2.1 La perte cellulaire	24
2.2.2 La perte synaptique.....	25
3. Le métabolisme de la protéine APP, le précurseur de l'amyloïde	25
3.1 Le gène de l'APP.....	25
3.2 La protéine APP.....	26
3.3 La protéolyse de l'APP	28
3.3.1 Principe.....	28
3.3.2 Les sécrétases	29
3.3.2.1 L'α sécrétase.....	29
3.3.2.2 La β sécrétase	29
3.3.2.3 La γ-sécrétase	30
3.4 Le peptide Aβ soluble	32
3.4.1 La révision de la cascade amyloïde.....	32
3.4.2 La toxicité du peptide Aβ soluble	32
3.4.2.1 L'apoptose induite par les oligomères solubles et ses mécanismes	32
3.4.2.2 La synaptotoxicité.....	34
4. Les modèles d'étude <i>in vivo</i> de la toxicité du peptide Aβ soluble.	34
Partie B : Le système des neurotrophines et l'encapsulation cellulaire	37
1. Généralités sur la famille des neurotrophines	37
1.1 Définition	37
1.2 L'expression des NTs dans le SNC.....	38
1.3 Le transport des NTs	39
1.4 Les effets et fonctions des NTs	41
1.5 Les récepteurs des NTs : les Trk et p75.....	42
1.5.1 Les Trk.....	42
1.5.2 Le récepteur p75	44
2. Les NTs dans la Maladie d'Alzheimer	46
2.1 L'expression des NTs dans la MA.....	46
2.1.1 Le BDNF	46

2.1.2 Le NGF	47
2.2 Les récepteurs des NTs et la balance p75/Trk	48
2.2.1 Impact sur la mort cellulaire.....	49
2.2.2 Effet sur la survie cellulaire.	49
2.2.3 Effets sur la production d'Aβ.....	50
2.2.4 Effet sur la toxicité de l'Aβ.	50
2.2.5 Effet sur la plasticité synaptique et neuronale.....	51
2.3 NTs et stratégies neuroprotectrices.	51
2.3.1 L'inhibition de la signalisation pro-apoptotique de p75.....	52
2.3.2. L'induction de l'expression des NTs.	52
2.3.3 L'apport de NTs au SNC.	53
2.3.3.1 Les infusions icv.....	53
2.3.3.2 Les infusions intrathécales de NTs.	54
2.3.3.3 La production in situ de NTs.	54
3. L'encapsulation cellulaire.....	56
3.1 Limites et contraintes de la thérapie cellulaire	56
3.2 Production et propriétés des bioréacteurs.....	57
3.2.1 Principe de l'encapsulation cellulaire.....	57
3.2.2 Les différents matériaux d'encapsulation	57
3.2.3 Propriétés immunologiques et mécaniques des polymères d'alginate	58
3.2.4 Les différents types d'encapsulation.....	59
3.3 Les avantages de l'encapsulation	60
3.4 Perspectives de développement	63
Partie C : La biologie du CNTF et son potentiel thérapeutique.....	64
1. Historique de la découverte du CNTF.	64
2. Le CNTF est un membre de la superfamille des cytokines.....	65
2.1 Définition du terme cytokine.....	65
2.2 Nomenclatures et généralités sur les cytokines	66
2.3 Structure de la famille des Hématopoïétines	68
3. Le récepteur du CNTF.....	71
3.1 L'assemblée transductrice	74
3.1.1 La sous-unité gp130.....	74
3.1.2 La sous-unité LIFr.....	78
3.2 La sous-unité CNTFr-α.....	80
3.3 Les autres ligands du complexe récepteur du CNTF	85
3.3.1 La CT1, l'OSM et le LIF	85
3.3.2 La CLC, le CLF, la NPO et l'HN	86
3.4 Fonctionnement du récepteur, signalisation et effets biologiques du CNTF	89
3.4.1 Fonctionnement du récepteur	89
3.4.2 Signalisation positive : JAK/STAT- ERK- PI3K/Akt	92
3.4.2.1 : la voie JAK-STAT.....	93
3.4.2.2 : les voies ERK, PI3K et RAS.....	95
3.4.3 Rétrocontrôle négatif : SHP2; PIAS; SOCS	98
3.4.4 Gènes cibles.....	99
4. Le gène et la protéine CNTF	101
4.1 Le peptide CNTF et son gène sont conservés au cours de l'évolution.....	101
4.2 Le gène du CNTF : structure et conséquences de sa mutation.....	102
4.3. Implications physiopathologiques du CNTF et rôles physiologiques	102
4.3.1 Implications physiopathologiques du CNTF	102
4.3.2 Altérations de l'expression du CNTFrα.....	107
4.3.3 Rôles physiologiques du CNTF	107
4.4 Potentiel neuroprotecteur du CNTF dans la MA	112
II. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS.....	116
III. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES.....	118
1. Animaux	120
1.1 Conditions d'hébergement	120

1.2 Souches murines utilisées.....	120
2. Chirurgie stéréotaxique.....	120
2.1 Anesthésie	120
2.2 Procédure d'implantation des capsules de cellules C2C12 recombinantes	121
2.3 Procédure d'injection intracérébrale unique de peptide A β	123
2.4 Procédure d'injections intracérébrales répétées de peptide A β	123
3. Analyses comportementales.....	126
3.1 Système de capture vidéo	126
3.2 Procédure standard d'évaluation des mémoires à court et long terme.....	127
3.3 Étude de la mémoire spatiale à court terme : le labyrinthe en Y	128
3.4 Étude de la mémoire spatiale à long terme : le labyrinthe aquatique	129
3.5 Planification des expériences	132
3.6 Analyses statistiques.....	134
IV. RÉSULTATS.....	135
1. Introduction	136
2. Publication	137
3. Données additionnelles (publiées).....	149
4. Résultats complémentaires non publiés	152
4.1 Caractérisation des oligomères solubles	152
4.2 Potentiel préventif du CNTF contre les déficits induits par l'A β ¹⁻⁴² soluble.....	153
4.3 Innocuité de la sécrétion à long terme de CNTF.....	154
4.4. Propriétés neuroprotectrices du CNTF produit au niveau du CA1 de l'hippocampe.....	155
4.5 Effet de la sécrétion continue de CNTF icv dans le modèle Tg2576	157
4.6 Caractérisation de la neuroprotection par le CNTF	158
4.7 Potentiel curatif du CNTF.....	160
4.8 Développement d'un modèle d'administration répétée de peptide A β soluble.....	161
4.8.1. Effet de l'administration de doses croissantes d'A β	162
4.8.2. Validation de la procédure chirurgicale d'implantation des canules	163
4.8.3. Effet de l'exposition répétée au peptide A β soluble.....	164
V. DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE ET CONCLUSION.....	166
1. Les mécanismes potentiels de la neuroprotection induite par le CNTF.....	167
2. L'influence de l'A β soluble sur la signalisation induite par le CNTF	170
3. L'influence de l'A β fibrillé sur la signalisation induite par le CNTF	171
4. Conclusion	173
VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	175

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications :

Pierre Garcia, Ihsen Youssef, Jo K. Utvik, Sabrina Florent-Béchar, Vanassa Barthélémy, Catherine Malaplate-Armand, Badreddine Kriem, Christophe Stenger, Violette Koziel, Jean-Luc Olivier, Marie-Christine Escanye, Marine Hanse, Ahmad Allouche, Cédric Desbène, Frances T. Yen, Rolf Bjerkvig, Thierry Oster, Simone P. Niclou and Thierry Pillot. CNTF cell based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. J Neurosci. 2010 Jun 2;30(22):7516-27.

Cédric Desbène, Ihsen Youssef, Pierre Garcia, Christophe Stenger, Mathilde Sauvée, Nicolas Fischer, Violette Koziel, Marie-Christine Escanyé, Thierry Oster, Baddredine Kriem, Francès T. Yen, Thierry Pillot, Jean-Luc Olivier, Catherine Malaplate, Critical role of cPLA2 in A β oligomer-induced neurodegeneration and memory deficit. Neurobiol. Aging, soumis.

Revues:

Sabrina Florent-Béchar, Cédric Desbène, Pierre Garcia, Ahmad Allouche, Ihsen Youssef, Marie-Christine Escanyé, Violette Koziel, Marine Hanse, Catherine Malaplate-Armand, Christophe Stenger, Baddredine Kriem, Frances T.Yen-Potin, Jean-Luc Olivier, Thierry Pillot, Thierry Oster. The essential role of lipids in Alzheimer's disease, (2009) Biochimie. 91(6):804-9.

Participations actives (Posters)

-Séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E, INPL de Nancy, Janvier 2008, "Validation fonctionnelle d'une stratégie thérapeutique prévenant la neurodégénérescence et les déficits cognitifs associés dans des modèles murins de la Maladie d'Alzheimer. " Garcia P., Utvik J., Youssef I., Florent-Béchar S., Kriem B., Koziel V., Oster T., Niclou S., Pillot T.

-International Congress on Alzheimer's Disease (Vienne, Autriche, Juillet 2009), "A cell based ciliary neurotrophic factor therapy against Alzheimer's Disease", Garcia P., Youssef I., Utvik J. K., Florent-Béchar S., Barthélémy V., Armand-Malaplate C., Kriem B., Hanse M., Stenger C., Koziel V. , Olivier JL., Escanye MC. , Allouche A. , Desbène C., Yen F. T., Bjerkvig R., Oster T., Niclou S. P. and Pillot T.

Participations passives

-Workshop " Workshop on Brain Diseases: from bench to bedside" (Organisé par le Dr. Simone Niclou, Centre Hospitalier Luxembourg, Octobre 2008)

-International Congress on Alzheimer's Disease (Vienna, Austria, Juillet 2009).

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Projection du nombre de patients atteints de démence selon l'ADI.....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 2: Le MMSE.....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 3 : Les étapes de détermination du stade MCI.....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 4: Les « dix » stades de la dégénérescence neurofibrillaire.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 5 : Les plaques amyloïdes neuritiques.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 6 : Schéma de l'organisation des domaines de l'APP.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 7 : Principe de la protéolyse séquentielle de l'APP.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 8 : Séquence et sites des différents clivages du fragment C99 par la γ-sécrétase.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 9 : La cascade de signalisation pro-apoptotique induite par les oligomères d'Aβ.....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 10 : Les voies de signalisation induites par la fixation des NTs sur les Trks.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 11: Les partenaires cytosoliques de p75.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 12: Les différents types de capsules.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 13 : Évolution phylogénétique des cytokines de classe 1.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 14 : Structure tridimensionnelle des cytokines à longue chaîne et courte chaîne.....</i>	<i>70</i>
<i>Figure 15: Représentation de la structure d'un dimère de CNTF.....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 16 : combinaisons d'assemblages des sous-unités dans les récepteurs recrutant la gp130.....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 17 : composition modulaire des sous-unités des récepteurs aux hématopoïétines.....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 18 : principe de l'induction de la voie STAT par les cytokines utilisant le dimère gp130-LIFr.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 19 : La structure modulaire de gp130.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 20 : Implication du domaine consensus WSxWS dans la formation d'une structure « Arginine Zipper ».....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 21 : La structure modulaire du LIFr.....</i>	<i>78</i>
<i>Figure 22 : La structure modulaire du CNTFα.....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 23 : Assemblage du complexe récepteur au CNTF.....</i>	<i>90</i>
<i>Figure 24 : Possibilités d'arrangements théoriques du récepteur fonctionnel au CNTF.....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 25 : Structure schématique des JAKs.....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 26 : Structure schématique du facteur STAT3.....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 27: p-STAT3 est préférentiellement induit par le CNTF.....</i>	<i>95</i>
<i>Figure 28 : Principe du couplage des voies RAS-RAF-MEK-ERK et PI3K-Akt à la voie JAK-STAT.....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 29 : Structure schématique de la protéine phosphatase SHP2.....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 30 : Les grandes fonctions d'Akt (PKB) dans la cellule de mammifère.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 31 : La structure des SOCS1/3.....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 32 : mutation ponctuelle du gène du CNTF.....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 33 : Impact de la mutation du gène du CNTF sur la survie des souris mutées pour la SOD-1.....</i>	<i>106</i>
<i>Figure 34 : Le CNTF améliore la survie neuronale en réponse aux agressions du SNC.....</i>	<i>111</i>
<i>Figure 35 : Seringue utilisée pour l'implantation stéréotaxique des capsules.....</i>	<i>121</i>
<i>Figure 36: Repères anatomiques de référence formés par les sutures de croissance.....</i>	<i>121</i>
<i>Figure 37 : Régions d'intérêt ciblées par la chirurgie stéréotaxique.....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 38: Seringue utilisée pour l'injection stéréotaxique de peptide.....</i>	<i>123</i>
<i>Figure 39 : Procédure d'implantation des guide-canules à demeure.....</i>	<i>125</i>
<i>Figure 40: Assemblage du système d'injection.....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 41: capture d'écran du logiciel de capture vidéo.....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 42 : Planification de la procédure comportementale standard.....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 43 : Schéma du labyrinthe en Y.....</i>	<i>129</i>
<i>Figure 44: Schéma du dispositif du labyrinthe aquatique.....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 47 : Conception des expériences in vivo.....</i>	<i>132</i>
<i>Figure 48. Caractérisation des oligomères solubles d'Aβ administrés in vitro et in vivo.....</i>	<i>152</i>

<i>Figure 49 : L'injection icv de CNTF prévient les déficits cognitifs induits par l'Aβ</i>	153
<i>Figure 50 : La production in situ à long terme de CNTF n'est pas délétère sur les performances de mémoire de travail</i>	154
<i>Figure 51 : L'implantation d'une bille sécrétant le CNTF au dessus du CA1 de l'hippocampe prévient efficacement les déficits cognitifs induits par les oligomères solubles d'Aβ</i>	156
<i>Figure 52: La sécrétion continue de CNTF chez des souris contrôle des Tg2576 n'a pas d'effet sur les performances comportementales</i>	157
<i>Figure 53 : La présence du TrkB a été étudiée par immunoblot sur des préparations de synaptosomes d'hippocampe</i>	158
<i>Figure 54 : Le potentiel curatif du CNTF</i>	160
<i>Figure 55 : L'effet de doses croissantes d'Aβ administrées en icv sur les performances comportementales</i>	162
<i>Figure 56 : Validation du système d'injection par les canules</i>	163
<i>Figure 57. L'administration répétée d'oligomères solubles d'Aβ induit des troubles cognitifs</i>	164

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Les principaux outils neuropsychologiques</i>	15
<i>Tableau 2 : La prévalence de la MA et des syndromes apparentés en fonctions de l'âge et du sexe.</i>	20
<i>Tableau 3 : Modèles d'injection de peptide Aβ soluble chez le rat.</i>	35
<i>Tableau 4 : Modèles d'injection de peptide Aβ soluble chez la souris.</i>	35
<i>Tableau 5 : Souris monotransgéniques modèles de la MA</i>	35
<i>Tableau 6 : Tableau récapitulatif des principaux lieux de synthèse des NTs, des modes de transport et des cibles vers lesquelles elles sont acheminées</i>	40
<i>Tableau 7 : Exemples de polymères artificiels ou naturels qui ont été utilisés pour l'encapsulation cellulaire</i>	58
<i>Tableau 8 : L'utilisation des cellules recombinantes encapsulées dans des modèles d'étude de diverses pathologies et chez l'Homme.</i>	62
<i>Tableau 9 : Comparaison entre les cytokines et les hormones</i>	66
<i>Tableau 10 : Classification des cytokines selon leur structure</i>	67
<i>Tableau 11: Les familles de cytokines</i>	68
<i>Tableau 12 : L'expression du CNTFr dans le cerveau.</i>	81
<i>Tableau 13 : Le CNTFra est préférentiellement exprimé dans les lignées cellulaires d'origine neuronale</i>	83
<i>Tableau 14: Résultats des calculs d'identités (i) et de similarités (p) des séquences protéiques du CNTF issues des différentes espèces</i>	101
<i>Tableau 15 : Les variations du taux de CNTF dans le liquide céphalo-rachidien</i>	105
<i>Tableau 16: Liste du matériel nécessaire à la réalisation des injections répétées intracérébrales d'oligomères solubles de peptide amyloïde.</i>	124

LISTE DES ABRÉVIATIONS

18F-DOPA: 18Fluoro-dopamine	GH : growth hormone hormone de croissance
4-HNE : 4-hydroxynonéal	GluR1: AMPA receptor <i>subunit 1</i>
6-OHDA: 6-hydroxydopamine	GluR2: AMPA receptor <i>subunit 2</i>
aa : acide aminé	GMCSF: <i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
ADAM: <i>a Disintegrin And Metalloprotease ; α-sécrétase</i>	gp130 : glycoprotéine 130
ADN: acide désoxyribonucléique	GPI : (ancree) glycosyl phosphatidylinositol
ADNc : acide désoxyribonucléique codant	Grb: Growth factor receptor-bound protein
AGE: <i>Advanced Glycation End Products</i>	GSK3β: glycogène synthase kinase 3
AICD : <i>APP IntraCellular Domain</i>	GTP: Guanosine triphosphate
Akt: protéine kinase B	hAPP: APP humain
AMPA: récepteur à acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque	HN : humanine
APLP : <i>Amyloid Precursor protein Like Protein</i>	HPC : Hippocampe
APOE: apolipoprotéine E	ICE: électrophorèse capillaire immunoaffine
APP: protéine précurseur de l'amyloïde	icv: intracérébroventriculaire
ARNm : Acide Ribonucléique messager	IDE: <i>Insulin Degrading Enzyme-</i>
aSMases: sphingomyélinase acide	IEG: Immediate Early Gene, gene p
ATP: Adénosine Triphosphate	IFN: interféron
Aβ : peptide Aβ	IgD: domaine apparent aux immunoglobulines
BACE : <i>β APP Cleaving Enzyme; β-sécrétase</i>	IL: interleukine
Bad: <i>Bcl2 antagonist causing cell Death</i>	IL1 : Interleukine 1
Bcl2: <i>B-cell lymphoma 2</i>	IL6 : interleukine 6
BDNF: brain derived neurotrophic factor	IP3: inositol 3 phosphate
BMP2: Bone Morphogenic Protein	IRM: Imagerie par résonance magnétique
C83 : voir αCTF	JAK: Janus Kinase
C99: voir β CTF	JNK: <i>Jun amino-terminal kinase</i>
CA1 : Corne d'Amon 1	kDa: kilo dalton
CAA: angiopathie amyloïde cérébrale	Kpb : kilo-paires de base
CDB: <i>Cytokine Binding Domain</i> , domaine de liaison aux cytokines	LCR : liquide céphalo rachidien
CDR: Score de démence clinique	LIF: <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
CG : <i>Cingular Gyrus</i>	LIFr : récepteur au LIF
ChAT: Choline Acetyl Transférase	LOAD: MA familiale tardive
CHR: <i>Cytokine-binding Homology Region</i> , domaine de liaison aux cytokines	LPT: Leptine
CLC : <i>Cardiotrophin T-1 like cytokine</i>	LPT: Leucopoiétine
CLF : Cytokine Like Factor	LTD: dépression à long term
CLN: colivéline	LTP: potentialisation à long terme
CNTF : Facteur neurotrophique ciliaire	MA : maladie d'Alzheimer
CNTF α : sous -unité α du récepteur au CNTF	MAPT : <i>Microtubule associated protein Tau gene</i>
cPLA2: phospholipase A2 cytosolique	MCI : déficit de mémoire modéré
CREB: cAMP response element binding protein	MCSF: <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
CSF: <i>Colony stimulating factor</i>	MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase
CT-1 : cardiotrophine 1	MMP : matrix metalloprotease
DNF: Dégénérescence neurofibrillaire	MMSE : Mini Mental State Examination
EC : <i>Entorhinal Cortex</i>	NF κ B: <i>Nuclear Factor kappa B</i>
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	NFT: Enchevêtrements fibrillaires de protéine Tau
EOFAD: MA familiale précoce	NGF: <i>Nerve Growth Factor</i>
EPO: Erythropoïétine	NMDA: N-méthyl-D-Aspartate
ERK: extracellular signal regulated kinase	NPO : Neuropoïétine
FAD: Familial Alzheimer's Disease; MA familiale	NR1: sous-unité 1 du récepteur NMDA
FDG: FluoroDeoxyGlucose	NR2A: receptor subunit NMDA 2B
FLT3L: <i>Fetal Liver Tyrosine 3 Ligand</i>	NR2B: receptor subunit NMDA 2B
FNIII : domaine apparenté à la fibronectine	NRAGE: neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog
FNIII : Fibronactine III	NRIF: <i>Neurotrophin receptor interacting factor</i>
FPRL1: <i>Formyl Peptide Receptor-Like 1</i>	nSMases: sphingomyélinase neutre
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer	NT(s): neurotrophine (s)
G-CSF : <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>	O2A: progéniteurs gliaux
GD : Gyrus denté	ObR : récepteur à la leptine
GDNF: <i>glial derived neurotrophic factor</i>	OPC: progéniteur d'oligodendrocyte
GDP: Guanosine diphosphate,	OSM: Oncostatine M
gene] homologue	P3 : <i>3 kDa Peptide</i>
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein	p75NTR: p75 neurotrophin receptor
GFAP-IR: GFAP-immunoréactif	PET: tomographie par emission de positons
GFP : green fluorescent protein	PF: plateforme
	PHF : <i>paired hélical fragments</i>
	PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PIAS: *Protein Inhibitor of Activated STAT*
PI-PLC : PhosphoLipase C spécifique du PhosphatidyInositol
PKB: protéine kinase B
PLC: phospholipase C
PLL: poly-L-lysine
PRL : prolactine
pro-NTs : pro-neurotrophines
PS1: préséniline 1
PS2: préséniline 2
PSD95:post-synaptic density protein 95
p-SHP2: phosphoSHP2
p-STAT3 :phospho-STAT3
PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*
PTP: *protein tyrosine phosphatase*
Raf:MAP3K, mitogen activated kinase kinase kinase
RAGE: récepteur aux AGE
Ras: petite GTPase
ROCK: *Rho associated coiled-coil containing Kinase*
ROS: Espèces réactives de l'oxygène
SAL: sclérose amyotrophique latérale
sAPP α : fragment d'APP soluble sécrété par la voie α
SCF: *Stem Cell Factor*
SDS: sodium dodecyl sulfate
SH2: *Src Homology domain 2*
SH2: Src homology domain 2

SHP2: Protéine tyrosine phosphatase
siRNA: petits ARN interférants
sMases: sphingomyélinases
SNC:système nerveux central
SOCS: Suppressor Of Cytokine Signaling
SOD-1: superoxide dismutase
SOS: *Son of Sevenless*
SRE: *serum response element*
STAT: Signal transducer And Activator of Transcription
SUMO: *Small Ubiquitine-related Modifier*
SVF: serum de veau foetal
TH: tyrosine hydroxylase
TM : domaine transmembranaire
TNF: facteur de nécrose tumoral
TNFR: récepteur du TNF
TNFR: TNF receptor
TPO : Thymopoiétine
TRAF: *TNF receptor associated factors*
TrkA : *Tyrosine Receptor KinaseA*,récepteur au NGF
TrkB : *Tyrosine Receptor KinaseB*,récepteur au BDNF
TSLP: *Thymic stromal lymphopietin*
ZVAD: inhibiteur des caspases
 α CTF : *α cleaved-APP C Terminal Fragment*
 β CTF : *β cleaved-APP C Terminal Fragment*

AVANT-PROPOS

Maladie d'Alzheimer et Santé Publique

En 2010, les démences touchent 35,6 millions de personnes dans le monde. La plus fréquente des démences liées au vieillissement est la maladie d'Alzheimer (MA). Les études prospectives dressent des prévisions alarmantes : il est attendu que la proportion de patients double tous les 20 ans. D'après le rapport mondial publié par l'organisation *Alzheimer's Disease International* (ADI) du 21 septembre 2010, le nombre total de patients devrait atteindre 65,7 millions en 2030 et plus de 115 millions en 2050. Bien que les démences soient plus représentées dans les populations des pays les moins riches (58% des cas en 2010) (figure 1), ces pays ne peuvent contribuer qu'à hauteur de 26% des dépenses totales engendrées par cette maladie. A l'heure actuelle, la prise en charge des patients représente 1% du PIB mondial.

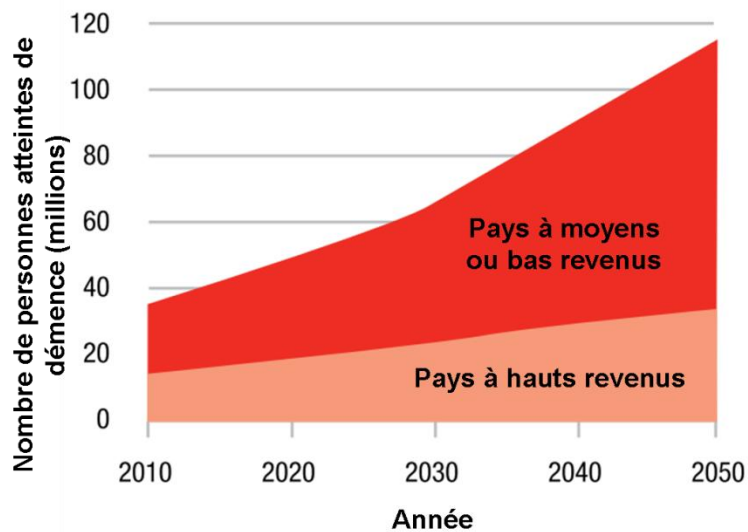


Figure 1 : Projection du nombre de patients atteints de démence selon l'ADI.

En France 7% de la population de plus de 65 ans est touchée par la maladie d'Alzheimer, qui représente concrètement 80% des démences (Helmer *et al.*, 2006). Il a été reconnu en 2002 que *“les démences d'origine neurodégénérative et vasculaire nécessitent une action spécifique du fait de leur fréquence et de leur gravité en termes d'incapacités et de charge de soins”* (Pasnik F., 2002, Consultation sur les priorités de veille sanitaire, INVS). En effet, 860000 patients étaient recensés en 2007 en France au moment de la mise en place du troisième plan Alzheimer. La MA concerne directement 3 millions de personnes si on prend en compte l'entourage des patients (données

AIRMA, *Agence Internationale pour la Recherche sur la Maladie d'Alzheimer*). Cette maladie représente en France la 4^{ème} cause de mortalité après le cancer, les maladies cardiovasculaires et les accidents (données INVS 2007, *Institut National de Veille Sanitaire, Aouba et al., 2007*).

Au niveau scientifique, l'intérêt pour cette affection est plus ancien qu'au niveau politique. Le quasi-doublement du nombre mondial de publications sur ce thème entre 2000 (3300 publications) et 2008 (5644 publications) illustre une réelle motivation de la part de la communauté scientifique à comprendre les facteurs déclenchant la maladie et à élaborer des stratégies thérapeutiques (données ONRA, *Observatoire National de la Recherche sur la maladie d'Alzheimer*).

En 2010, seuls des traitements symptomatiques sont prescrits, faute de stratégies curatives sûres et efficaces. De ce fait, les stratégies privilégiant la prévention de l'apparition des premiers symptômes constituent les alternatives les plus concrètes. Le présent travail de Thèse s'inscrit dans l'optique de l'élaboration d'une stratégie thérapeutique préventive visant à retarder l'apparition des symptômes.

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie A: La maladie d'Alzheimer

Nous verrons dans cette partie ce qu'est la Maladie d'Alzheimer. Celle-ci sera abordée de manière générale à travers sa définition et son étiologie. Nous décrivons ensuite sa physiopathologie. Nous nous focaliserons sur le versant amyloïde de la pathologie pour mettre en relief l'importance de la neurotoxicité du peptide A β soluble.

1. La Maladie d'Alzheimer : Généralités

1.1 Définition

La Maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie « neurodégénérative », c'est-à-dire qu'elle implique une dégénérescence précoce et progressive du système nerveux central. Les premières aires cérébrales atteintes sont celles dédiées à la mémoire épisodique (cortex entorhinal et hippocampe). Sa symptomatologie est souvent résumée par le terme de « démence sénile » bien qu'indépendante de la notion de "folie" au sens commun du terme. Cette affection est définie comme étant « *l'affaiblissement de la mémoire, du jugement, de l'attention, de la capacité à résoudre les problèmes suivi d'une apraxie sévère et d'une perte globale des capacités cognitives* » (définition du VIDAL). Au départ, cette pathologie se manifeste par des problèmes de mémoire mais elle aboutit fatalement à la détérioration de la personnalité et la perte de l'autonomie de l'individu.

1.2 Historique

Cette pathologie a été découverte en 1906 par Alois Alzheimer (1864-1915). Ce médecin psychiatre a identifié lors de l'autopsie du cerveau d'une patiente souffrant de délire, Auguste Deter, des lésions cérébrales diffuses et semblables à celles observées dans les cerveaux de patients déments (*i.e.* les plaques séniles) ainsi que des amas intracellulaires fibrillaires non-identifiés (Alzheimer, 1907, traduit par Stelzmann *et al.*, 1995 ; détail de sa biographie Cipriani *et al.*, 2010). 15 ans plus tard, Paul Divry caractérisera ces lésions diffuses par une coloration au rouge Congo, un colorant des feuillettes amyloïdes, donnant le nom de plaques amyloïdes à ces dépôts extracellulaires. Il faudra attendre l'avènement de la microscopie électronique pour qu'en 1963 la nature des amas intracellulaires formant des enchevêtrements neurofibrillaires puisse être identifiée comme étant des filaments hélicoïdaux (PHF, *paired helical filaments*) de 10nm de diamètre (Kidd, 1963). Pendant longtemps, la communauté scientifique considérera ces deux types de lésions comme étant à la fois les marqueurs et l'origine de la maladie. **La détermination de la nature des lésions histologiques caractéristiques va conduire à l'apparition de deux hypothèses, d'abord en opposition puis en conciliation.** En 1984, le constituant majeur des plaques amyloïdes est identifié comme étant le peptide Amyloïde β (A β) (Glennner *et al.*, 1984). La nature des PHF sera identifiée plus tard en 1985 comme étant la protéine Tau associée aux microtubules (Brion *et al.*, 1985). Deux écoles de pensées vont alors émerger vis-à-vis de l'implication de l'une ou l'autre de ces protéines dans la MA: les

Myéloïstes et les Tauïstes. Les Myéloïstes soutiennent l'hypothèse dite de la « cascade amyloïde », plaçant les plaques amyloïdes à l'origine du processus dégénératif et du déclin cognitif. Les Tauïstes incriminent l'hyperphosphorylation de la protéine Tau à l'origine de la maladie d'Alzheimer mais aussi d'autres pathologies neurodégénératives. **L'établissement d'un diagnostic précoce fiable est complexe et incertain.** A l'époque (et encore actuellement, excepté pour les formes sévères), seul l'examen histologique *post mortem* des cerveaux permet de caractériser un patient MA avec certitude. L'absence d'informations antérieures à l'apparition des symptômes et le délai conséquent séparant l'apparition des premiers symptômes de l'examen histologique ne permettaient pas de déterminer l'implication préférentielle de Tau ou de l'A β dans la pathogénèse. De plus, l'établissement d'un diagnostic neuropsychologique discriminant les patients MA d'autres types de démences est aussi une difficulté. En effet, certaines pathologies neurodégénératives associées à une démence peuvent être confondues avec la MA. Les pathologies les plus couramment confondues avec la MA sont les démences vasculaires, la maladie de Parkinson, la maladie de Pick, la démence à corps de Lewy et la maladie de Creutzfeldt-Jacob (Rogan & Lippa, 2002). Certaines observations des deux dernières décennies ont apporté de profonds changements à l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy & Selkoe, 2002 ; Hardy, 2006) et resituent, par des approches interventionnistes, les interactions entre le peptide amyloïde β et la protéine Tau. Ainsi la toxicité des oligomères solubles d'A β est largement incriminée dans la pathogénèse mais serait aussi en amont des dysfonctions de la protéine Tau.

1.3 Le diagnostic

1.3.1 La démarche diagnostique et les outils neuropsychologiques

L'établissement du diagnostic est au mieux probabilistique car seules les formes sévères ou les biopsie/autopsie permettent d'établir un diagnostic certain. Selon les directives européennes, 6 fonctions se doivent d'être évaluées au cours du diagnostic d'une MA : les fonctions cognitives globales, la mémoire épisodique à long terme, les fonctions exécutives, les troubles neuropsychiatriques, les fonctions instrumentales et les activités fonctionnelles de la vie quotidienne (Waldemar *et al.*, 2007).

Pour détecter ces troubles en consultation, il est donc recommandé d'utiliser les critères du DSM IV (*Diagnostic and Statistical Manual*) et du NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) (Waldemar *et al.*, 2007).

Le DSM a pour objectif de détecter une démence. Il pose comme base pour le diagnostic de la MA la détection d'une altération de la mémoire épisodique (encodage et restitution des informations). Cette altération doit être associée à au moins un des troubles suivants : l'aphasie (problèmes de compréhension des mots), l'apraxie (trouble de l'exécution de tâches motrices complexes malgré des fonctions motrices intactes), l'agnosie (trouble de la reconnaissance d'objets familiers) ou des troubles exécutifs (la planification des actions) (Castellani *et al.*, 2010). Pour la

détection des démences, le score de démence clinique CDR est aussi souvent utilisé dans la littérature (<http://www.alzheimer-adna.com/Ass/DSM.html#CDR>).

Pour déterminer les troubles précités, les neuropsychologues disposent d'une batterie de tests dont les plus utilisés sont listés dans le tableau 1.

Fonctions cognitives	Outils neuropsychologiques	Caractéristiques de l'outil
Fonctions cognitives générales	MMSE	
	Echelle de Mattis	
Mémoire épisodique	Echelle de mémoire de Wechsler	Rappel d'histoires, apprentissage de paires de mots, reproduction de dessins
	Test de Rappel libre-Rappel indicé 16 items	Apprentissage d'une série de 16 mots (procédure de Grober et Buschke)
	Test d'apprentissage de mots du California	Apprentissage d'une série de 16 mots appartenant à 4 catégories
	Figure de Rey	Reproduction de mémoire d'une figure géométrique complexe
	Test des Portes	Reconnaissance de photographies de portes
Mémoire sémantique/langage	Déno 80	Dénomination d'images
	Fluence verbale (critères sémantiques)	Produire oralement le plus grand nombre de mots appartenant à une catégorie sémantique donnée
	Test de connaissances sémantiques	Questionnaire portant sur les connaissances générales et spécifiques de concepts
Mémoire de travail	Empan de chiffres	Répétition de séries croissantes de chiffres
	Paradigme de Brown-Peterson	Restitution de séries de 3 lettres (ou mots) après un délai occupé par une tâche interférente
Fonctions exécutives	<i>Trail-making test</i> (flexibilité mentale)	Relier des chiffres et des lettres dans l'ordre en alternant les 2 séries (1 A 2 B 3 C ...)
	Stroop (inhibition)	Dénommer la couleur de l'encre avec laquelle des mots (noms de couleur) sont écrits, sachant qu'il y a conflit entre les deux (ex : « rouge » est écrit en vert)
	Test de Wisconsin	Classement de cartes selon différents critères
Capacités visuo-constructives	Copie de la figure de Rey	Copie d'une figure géométrique complexe

Tableau 1 : les principaux outils neuropsychologiques (d'après *Maladie d'Alzheimer, Enjeux scientifiques médicaux et sociétaux*, INSERM, 2007, p138)

Le NINCDS-ARDRA vise à déterminer la probabilité échelonnée d'une MA. Dans un premier temps l'utilisation du MMSE (*Mini Mental State Examination*) permet une détection rapide d'une déficience cognitive globale (Derouesné *et al.*, 1999) (figure 2). Cet examen est coordonné à d'autres tests neuropsychologiques et des examens biologiques (EEG, ponction lombaire, sérologie), un diagnostic désigne la suspicion de MA comme étant « improbable, probable incertaine, probable, possible ou certaine » (Mc Khann, 1984).

Encadré 2
Mini-Mental State Examination.
Version GRECO, 1999

NOM :
Date :
SCORE :

Prénom :
Examineur :

Orientation (1 point par réponse juste; maxm A = 5; B = 5)

- A. – « En quelle année sommes nous ? »
– « En quelle saison ? »
– « En quel mois ? »
– « Quel jour du mois ? »
- B. – « Dans quelle ville sommes nous ? »
– « Dans quel département est située cette ville ? »
– « Dans quelle province est situé ce département ? »
– « Quel est le nom de l'hôpital où nous sommes ? »
– « A quel étage sommes-nous ? »

Apprentissage (1 point par mot répété correctement; maxm 3)

- « Je vais vous donner 3 mots, je voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir, je vous les redemanderai tout à l'heure : citron, clé, ballon (cigare, fleur, porte) »
[Nombre d'essais pour une répétition correcte : maxm 6]

Attention et calcul (1 point par soustraction exacte; maxm 5)

- « Voulez-vous compter à partir de 100 en retirant 7 à chaque fois jusqu'à ce que je vous arrête »
[Faire effectuer 5 soustractions]
[« Voulez-vous m'épeller le mot « monde » à l'envers, en commençant par la dernière lettre. »
EDMON:]

Rappel des 3 mots (1 points par mot rappelé, maxm 3)

Langage, praxies

- « Comment s'appelle cet objet ? Crayon, montre (1 point par objet; maxm 2)
– « Répétez ma phrase : Pas de mais, de si, ni de et »
(1 point seulement si la répétition est parfaitement correcte)
– « Prenez mon papier dans la main droite, pliez-le en deux et jetez-le par terre »
(1 point par partie de la consigne exécutée)
– « Faites ce qui est marqué : « FERMEZ LES YEUX »
– « Voulez-vous recopier mon dessin » (1 point si tous les angles sont présents ainsi que l'intersection de deux côtés différents)
– « Écrivez-moi une phrase, ce que vous voulez, mais une phrase entière »
(1 point si au moins un sujet et un verbe)

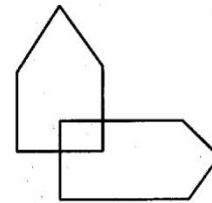


Figure 2: Le MMSE (d'après Derouesné et al., 1999)

1.3.2 La Phase MCI (Mild Cognitive Impairment) et Prodromale

La phase prodromale est par définition la phase précédant l'apparition de troubles cognitifs caractéristiques d'une démence. Elle correspondrait donc à la période entre le stade MCI (« déficit cognitif modéré ») et le diagnostic de démence.

Une définition du stade MCI a été proposée par Petersen (2004). Lors de l'établissement du diagnostic, certains patients se « plaignent » de troubles de mémoire (confirmés par l'entourage) qui

sont « anormaux » pour leur âge sans autres atteintes (démence, d'atteinte cognitive et avec des activités quotidiennes conservées (Petersen, 2004). Ces patients sont alors supposés comme étant « MCI ». D'autres tests sont ensuite réalisés : si des troubles de mémoire sont détectés alors le patient sera considéré comme MCI amnésique (aMCI). Si d'autres troubles cognitifs que les problèmes de mémoire sont trouvés, le patient sera considéré comme MCI non amnésique. Les patients aMCI et naMCI peuvent encore être divisés en 2 sous-groupes selon le nombre d'atteintes (Petersen, 2004). Le stade MCI correspond donc à un déclin cognitif précoce et anormal mais insuffisant pour être qualifié de démence. Il semblerait que les patients MCI soient particulièrement déficitaires dans la tâche de rappel indicé (Petersen, 2004). Le statut MCI est associé à une probabilité accrue de développer une démence et la MA (Amieva *et al.*, 2004 ; Iachini *et al.*, 2009).

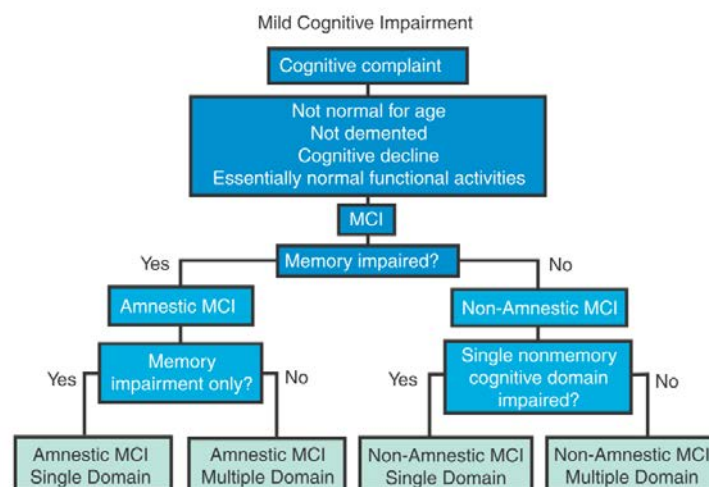


Figure 3 : Les étapes de détermination du stade MCI (d'après Petersen, 2004)

Cependant, une étude longitudinale sur 5 ans mis en évidence que le MMSE ne détecte pas les troubles cognitifs précoces (Tombaugh *et al.*, 2005). Le MMSE est donc depuis peu associé à l'ADAScog (*Alzheimer's disease Assessment Scale of Cognitive score*) ainsi qu'au CDR (Score de démence clinique). Des altérations de la mémoire à court terme (tâche de rappel de mots « ADAS85cog delayed word recall ») et de la vitesse cognitive (AQT : *A Quick Test of cognitive speed*) précèdent les troubles détectables au stade MCI par le MMSE (Stomrud *et al.*, 2010). Le fait qu'il existe des modifications cognitives subtiles non détectables par le MMSE, indique l'existence d'un stade pré-MCI. Or, une atrophie hippocampique a été rapportée chez les sujets sains à risque en milieu de vie et en absence de troubles cognitifs (Honea *et al.*, 2011). L'atrophie hippocampique a été associée avec un risque accru de conversion du patient sain vers le stade MCI et du stade MCI vers la MA (Villemagne *et al.*, 2011). Ces données suggèrent fortement que la dégénérescence commence par une phase silencieuse durant laquelle les altérations sont sans incidence sur la cognition. La phase prodromale débute donc dès l'installation de troubles neurodégénératifs silencieux et comprendrait une phase asymptomatique pure, une phase pré-MCI et le stade MCI.

1.4 Étiologie

L'étiologie de la MA est complexe car son origine est multifactorielle, rendant plus difficile la compréhension des facteurs déclenchant son apparition. La pathogénèse s'appuie sur l'association du déterminisme génétique de l'individu et/ou de combinaisons de facteurs de risque. Différents types de MA sont répertoriées selon leur caractère héréditaire, le déterminisme et l'âge d'apparition de la maladie. On distingue donc dans la MA des formes familiales (25%) et des formes sporadiques (75%) (Castelani *et al.* ; 2010).

1.4.1 Les formes familiales de MA (FAD)

Le caractère « familial » de la MA, les FAD (*Familial Alzheimer's Disease*), est défini par la présence dans la généalogie du patient de plus d'une personne atteinte par génération, et ce sur plusieurs générations. La composante héréditaire de la MA augmente le risque d'émergence des symptômes de la MA, et ce possiblement chez des patients de plus en plus jeunes. Les formes familiales sont classées selon l'âge d'apparition de la maladie en FAD précoces (5%) (*Early Onset FAD* ; EOFAD) ou tardives (*Late Onset AD*, LOAD) (95%).

Les EOFAD sont développées par les patients presque systématiquement entre la 5^{ème} et la 6^{ème} décennie. Les EOFAD ont pour origine principale la transmission de mutations autosomales dominantes directement en lien avec une surproduction d'A β . Elles concernent la préséniline 1 (PS1 ; 66%), la protéine précurseur de l'amyloïde (APP ; 16%), la préséniline 2 (PS2 ; 5%). Chez 13% des patients à histoire familiale, aucune cause génétique n'a pu être identifiée, suggérant des polymorphismes non-identifiés (Renbaum & Levy-Lahad, 1998 ; Raux *et al.*, 2005 ; Jayadaev *et al.*, 2010). Les patients porteurs d'une de ces mutations auraient 80 à 90% de chance de développer la maladie.

Les LOAD apparaissent à partir de 65 ans et sont associées à des mutations et des polymorphismes autres que ceux énoncés pour les EOFAD. La *AlzGene Database* (<http://www.alzgene.org/default.asp>) rassemble les génomes de patients témoins et MA. La méta-analyse de l'association génétique avec l'émergence de la maladie (« GWAS », *Genome-Wide Association Study*) a recensé 695 gènes (pour un total de 3000 polymorphismes) en lien avec l'apparition de la MA (Bertram *et al.*, 2007).

Le polymorphisme de l'Apolipoprotéine E (APOE) est le plus significativement associé à l'émergence de la MA (*AlzGene Database* ; $p=1.10^{-50}$!). L'APOE est impliquée dans le transport cérébral du cholestérol ainsi que la clairance directe du peptide A β (Jones *et al.*, 2011). La présence de l'allèle $\epsilon 4$ est considérée comme un facteur de risque tandis que la présence de l'allèle $\epsilon 2$ est considéré comme un facteur protecteur dans la MA (Conejero-Goldberg *et al.*, 2010). Dans la population générale, les allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ sont présents à des fréquences de 1 à 5%, de 50 à 90% et de 5 à 35% respectivement, tandis qu'au moins 50% des patients LOAD sont porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ (pour revue, Verghese *et al.*, 2011). L'expression de l'APOE est réduite dans la MA, et plus particulièrement chez les patients homozygotes $\epsilon 4$ (Gupta *et al.*, 2011). Parmi les autres protéines codées par les gènes en tête de la *AlzGene Database*, certaines sont impliquées dans le trafic de l'APP et de la β -sécrétase (SORCS1/SORL1 apparentées au LDLR et à la sortiline), le soutien trophique

et la neuroprotection (BDNF ; *Brain Derived Neurotrophic Factor*), le trafic intracellulaire (PICALM - *Phosphatidylinositol-binding Clathrin Assembly protein*- ; CLU -*Clusterin*-), la clairance de l'Aβ (ACE - *Angiotensin Converting Enzyme*-, IDE -*Insulin Degrading Enzyme*-) et l'inflammation (TNF -*Tumoral Necrosis Factor*-) (Laumet *et al.*, 2010). Le polymorphisme du gène MAPT (codant pour la protéine Tau) n'a pas été identifié comme associé à l'apparition des MA familiales (Schjeide *et al.*, 2009).

En parallèle à ces polymorphismes, la composition généalogique de l'histoire familiale des patients atteints est importante en soi. Lors de la recherche de modifications cérébrales précliniques de la MA chez des adultes sains, une atrophie (par IRM, Honea *et al.*, 2011) et un hypométabolisme (par FDG-PET, Mosconi *et al.*, 2010a) du gyrus parahippocampique ont été mises en évidence chez les personnes avec des antécédents maternels (en comparaison de patients avec des antécédents paternels ou sans antécédents). La transmission de certains allèles mitochondriaux serait une base de la contribution maternelle à la MA (Swerdlow *et al.*, 2010 ; Mosconi *et al.*, 2010b). Les troubles du « mitochondriome » et notamment des acteurs de la chaîne respiratoire sont associés au stress oxydant par la formation et l'accumulation des espèces radicalaires ROS (*Reactive Oxygen Species*) (pour revue, Patten *et al.*, 2011). La peroxydation des lipides dans la MA aboutit à la formation des adduits au 4 hydroxynonéal (4HNE), du malondialdéhyde (MDA) et de l'acroléine qui sont hautement réactifs (pour revue Singh *et al.*, 2010).

1.4.2 Les formes sporadiques de MA et les facteurs de risques

La qualification de « sporadique » désigne les patients MA sans antécédents familiaux connus ou recensés et concerne donc 75% des cas (LOAD non comprises). Les facteurs de risques peuvent être modifiables ou non modifiables.

1.4.2.1 Les facteurs de risque non modifiables.

Le genre féminin a été associé à un risque accru de développement de MA (Letenneur *et al.*, 2000). La diminution des œstrogènes suite à la ménopause a été incriminée (Massart *et al.*, 2001). Cette diminution est assimilable à une déprivation de facteurs trophiques (pour revue Sherwin, 2002) et compensable par la prise d'œstrogènes (Zandi *et al.*, 2002 ; pour revue Craig et Murphy, 2010).

Le vieillissement est le principal facteur d'apparition de la maladie. La prévalence (% de la population atteinte) de la maladie augmente considérablement avec l'âge (Helmer *et al.*, 2006). De plus, l'âge exacerbe en soi d'autres facteurs de risques, notamment les risques cardiovasculaires (Launer, 2005).

Âge	Europe Eurodem [3]		France Paquid [4]		Italie [6]		États-Unis CHS [5]	
	H	F	H	F	H	F	H	F
65 - 69	1,6	1,0	-	-	0,76	1,2	13,7	10,4
70 - 74	2,9	3,1	-	-	1,8	3,2		
75 - 79	5,6	6,0	7,7	5,7	5,6	6,0	15,4	20,6
80 - 84	11,0	12,6	12,5	16,6	15,0	13,1	33,3	32,6
> 85	18,0	25,0	23,9	38,4	23,8	34,6	42,9	50,9

Tableau 2 : La prévalence de la MA et des syndromes apparentés en fonctions de l'âge et du sexe. (d'après Helmer *et al.*, 2006)

1.4.2.2 Les facteurs de risque modifiables

Les facteurs vasculaires regroupent l'hypertension artérielle, le diabète et les dyslipidémies, qui sont aussi en soi des troubles métaboliques influençant le développement de la MA indépendamment de leurs complications vasculaires. **L'hypertension** en milieu de vie est presque systématiquement associée à un déclin des fonctions cognitives (7/7 études) ou le développement d'une démence trentaine d'années plus tard (Qiu *et al.*, 2005). En fin de vie, il semble que ce soit l'hypotension qui soit associée avec le risque de démence (Launer, 2005). Le **diabète** a également été associé à un risque accru de MA (8/13 études) et de démence vasculaire (7/8 études) (Biessels *et al.*, 2006a ;2006b). Il a été proposé que l'hyperinsulinémie participe à l'installation d'un stress oxydant dans le cerveau (De la Monte & Wands, 2005 ; Erol, 2008). L'impact sur les pathologies vasculaires du **surpoids et l'obésité** en milieu de vie augmente le risque de développer spécifiquement une MA (x1.8) (Ballard *et al.* 2011) ou une démence (Xu *et al.*, 2011). L'**adiposité** peut être une cause de l'insulinorésistance et de la formation des AGEs (*Advanced Glycation End products*). L'adiposité peut être aussi associée à un statut inflammatoire en lien avec l'apparition de la MA (Luchsinger & Gustafson, 2009). Les combinaisons de facteurs de risques vasculaires, et non pas ces facteurs pris individuellement, sont mieux associées au développement d'une MA (Purnell *et al.*, 2009). **L'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie** sont aussi associées au risque de développement d'une MA dans le cadre de leur complications vasculaires (Altman & Rutledge, 2010). Toutefois cette association n'est pas systématique (Ledesma & Dotti, 2005).

Les facteurs démographiques correspondent aux « habitudes de vie ». Ils regroupent l'éducation, les interactions sociales, l'exercice physique et la consommation de tabac ou d'alcool. Une récente méta-analyse de la littérature les a identifiés comme étant les facteurs de risques les plus modifiables (Ballard *et al.*, 2011). La **consommation de tabac** augmenterait d'un facteur 2 les chances de développement la MA (Ballard *et al.*, 2011). La **consommation d'alcool (faible ou modérée)** réduit le risque d'apparition de démence ou de MA mais pas du déclin cognitif (Anstey *et al.*, 2009). **Les interactions sociales** (Barnes *et al.*, 2004), la taille du réseau social (Bennett *et al.*, 2006) et la **stimulation intellectuelle**, approchée par la durée d'éducation (Verghese *et al.*, 2006; Grünblatt *et al.*, 2009) , sont liées une diminution du déclin cognitif et/ou une meilleure cognition chez les patients MA. Ces paramètres influeraient sur la « réserve cognitive » dont la stimulation diminue

d'un facteur 2 les risques de survenue d'une démence (Ballard *et al.*, 2011). **L'inactivité physique** en milieu de vie prédispose à l'apparition de la MA (Friedland *et al.*, 2001) tandis la pratique d'une activité physique diminue d'un facteur 2 les chances de développer une MA (Ballard *et al.*, 2011). L'analyse de Friedland *et al.* (2001) montre que les effets bénéfiques des activités dans la période adulte sur l'émergence de la MA sont plus liés à la diversité des activités qu'à leur intensité, surtout en ce qui concerne l'exercice physique. **Les antécédents médicaux de l'individu** sont à prendre en compte. Des hauts niveaux d'anxiété et la vulnérabilité au stress ont été liés au risque de développement de MA (Wilson *et al.*, 2011). Les symptômes dépressifs ont aussi été identifiés comme prédisposants à la MA (Grünblatt *et al.*, 2009). Toutefois dans la plupart des cas, les dysfonctions synaptiques constituent des causes communes à ces pathologies (et bien d'autres) (Penzes *et al.*, 2011) suggérant que les facteurs induisant des dysfonctionnements synaptiques participent à l'étiologie de la MA. Cette idée est fortement congruente avec la description de la MA comme pathologie synaptique dans ses premiers stades (pour revues, Selkoe, 2002 ; Mattson, 2004 ; Marcello *et al.*, 2008).

Les facteurs nutritionnels sont d'importants modulateurs de la probabilité d'apparition des démences. Des mauvaises habitudes alimentaires peuvent conduire à l'augmentation de l'IMC et ses complications vasculaires (Xu *et al.*, 2011). Les apports en **acides gras polyinsaturés $\omega 3$ et $\omega 6$** sont importants. Tandis que l'enrichissement des membranes erythrocytaires en $\omega 6$ est associé à un risque plus important de déclin cognitif, l'enrichissement en $\omega 3$ (DHA) est associé à une diminution du déclin cognitif (Heude *et al.*, 2003). Dans la MA, l'oxydation des lipides peut conduire à la déplétion en $\omega 3$ tandis que le statut en $\omega 3$ modulerait/préviendrait la toxicité de l'A β (Oster & Pillot, 2010). La **consommation d'antioxydants**, comme les polyphénols (Panza *et al.*, 2004) ou la caféine (Eskelinen *et al.*, 2009), ont été associés à une diminution du risque de développement d'une MA.

En conclusion, il existe différentes formes de MA. Les formes familiales précoces (EOFAD) impliquent principalement un mismétabolisme de l'APP orientant sa protéolyse vers la formation du peptide A β et ne représentent qu'un pourcent (1%) des MA. D'autre part, les formes sporadiques (LOAD incluses), sont majoritaires et représentent 99% des MA. L'étiologie de la MA condense des origines biologiques vasculaires, inflammatoires, traumatiques, métaboliques, mitochondriales, oxydatives, mais aussi des origines comportementales et sociales, toutes exacerbées par l'âge. L'étiologie complexe de la MA illustre tout autant de facettes de cette pathologie.

2. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

2.1 Les lésions « positives »

2.1.1 La dégénérescence neurofibrillaire (DNF)

Une lésion caractéristique de la MA mise en évidence par la coloration argentique est la **dégénérescence neurofibrillaire (DNF)** (pour revue Brion, 2006). La fibrillation de Tau a lieu suite à son hyperphosphorylation (Alonso *et al.*, 2001). La DNF est la résultante de l'accumulation intracellulaire de protéine Tau pathologique sous forme de PHF (*Paired Helical Fragments*). Les interactions latérales entre les PHF conduisent à la formation des « enchevêtrements neurofibrillaires » ou NFT (*NeuroFibrillary Tangles*) qui sont associés à la dystrophie neuritique (Alonso *et al.*, 2001). D'abord intracellulaires, ces enchevêtrements subsistent dans le milieu extracellulaire après la mort des cellules touchées sous la forme de « ghosts ». Ainsi la fibrillation de Tau a un double impact sur la neurodégénérescence en cumulant la perte de sa fonction physiologique avec le gain d'un potentiel neurotoxique. Les activités de la GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) (Hernández *et al.*, 2010) ainsi que de la kinase Fyn (Roberson *et al.*, 2011) sont fortement incriminées dans l'hyperphosphorylation de Tau suite à leur activation par l'exposition aux oligomères d'A β .

L'étude de cerveaux de patients MA et contrôle a permis de mettre en parallèle l'étendue de la DNF et le déclin cognitif dans la MA évalué avec le MMSE (*Mini-Mental State Examination*) et le score de démence clinique (CDR : *Clinical Dementia Rate*) (Delacourte *et al.*, 1999). Ainsi, 10 stades d'évolution de la DNF ont été décrits en parallèle des altérations cognitives, chaque stade représentant l'atteinte d'une nouvelle zone (figure 3).

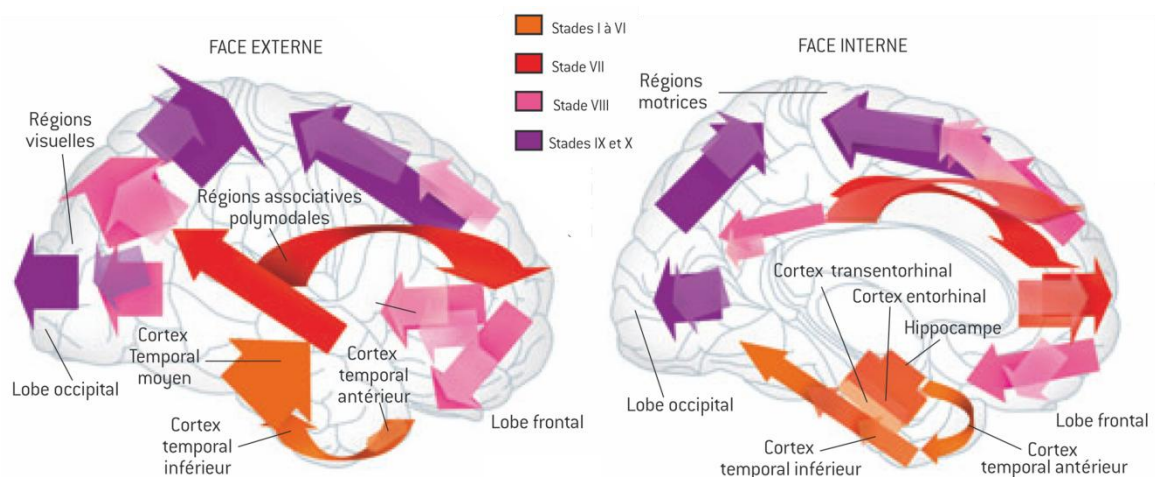


Figure 4: Les « dix » stades de la dégénérescence neurofibrillaire. (d'après Delacourte , 2003, *La Recherche HS n°10*)

La hiérarchisation des atteintes de la pathologie Tau dans la MA suggère que la DNF se propage à travers les connexions anatomiques (Duyckaerts *et al.*, 2009). La chronologie explique la séquence des signes cliniques observés. L'atteinte hippocampique (stade 1 à 3) se caractérise par les troubles de la mémoire épisodiques. L'atteinte du cortex temporal (stades 4 à 6) se traduit par les troubles aphaso-praxo-agnosiques et sa propagation au niveau frontal (stades 4 à 7) par les troubles dysexécutifs. À partir du stade 8, tous les patients présentent une démence (Delacourte *et al.*, 1999).

2.1.2 Les dépôts amyloïdes

Les dépôts amyloïdes peuvent être détectés dans le compartiment vasculaire. Ils sont majoritairement constitués d'A β ¹⁻⁴² et contribuent à l'angiopathie amyloïde cérébrovasculaire (CAA : *Cerebral Amyloid Angiopathy*) ou angiopathie congophile de l'arbre vasculaire (artère, artérioles, capillaires et veines) du parenchyme et des méninges (Roher *et al.*, 1993). Bien que la CAA puisse être une pathologie distincte de la MA (Zhang-Nunes *et al.*, 2006), sa présence est détectée dans 68,7% (CAA totale) à 93,2% (CAA dans la région occipitale) des cas de MA sporadiques, et semble ainsi apporter un fort potentiel de discrimination au diagnostic histologique (Attems *et al.*, 2007).

Les plaques diffuses sont des dépôts amorphes d'amyloïde. Ils constituent la « plaque primitive » (Dickson *et al.*, 1988) de consistance homogène et mal délimitée, avec très peu d'inclusions. L'utilisation d'anticorps dirigés contre l'A β a permis de déterminer que ces dépôts ne sont pas entourés de neurites dystrophiques (Braak & Braak, 1991). Ces dépôts sont trouvés chez les patients MA mais également chez les patients âgés sains sans démence (Braak & Braak, 1992).

Les plaques séniles amyloïdes sont des amas denses organisés autour d'un cœur riche en A β ⁴² (Iwatsubo *et al.*, 1994 ; Gravina *et al.*, 1995). L'analyse des plaques amyloïdes a mis en évidence la présence de métaux sous formes d'ions tels que du fer Fe³⁺, du cuivre Cu²⁺ et du zinc Zn²⁺ au cœur des plaques (Lovell *et al.*, 1998). Ces ions peuvent servir de nucléateur dans l'agrégation du peptide A β (Ha *et al.*, 2007). En périphérie, des neurites dystrophiques contenant des PHF des protéines Tau sont également détectés (Figure 5, A) (Braak & Braak, 1991). L'ensemble plaque amyloïde et sa couronne forme la plaque neuritique. Des astrocytes (Figure 5, B) et des cellules microgliales (Figure 5, C), dont la contribution à l'amyloïdose est duale, sont également présents. Le recrutement de ces cellules participe à la concentration de l'amyloïde et à son expansion : bien qu'elles participent à la clairance du peptide A β (Maat-Schieman *et al.*, 2004), la concentration du peptide dans leur cytoplasme conduit à leur lyse et au relargage de leur contenu (Nagele *et al.*, 2004). De plus, l'activation microgliale induit une libération locale de substances pro-inflammatoires (pour revue Morgan *et al.*, 2004) dont l'IL1 (Interleukine 1) retrouvée dans les plaques qui permettrait le recrutement/activation des astrocytes (expression de S100B) associé à une hausse d'expression de la protéine APP *in vivo* (Sheng *et al.*, 1996). L'ensemble de ces faits suggère que l'accumulation de peptide A β est induit par un submergement de la capacité de clairance de peptide A β , dont l'accumulation aboutit à la formation des plaques dans la MA.

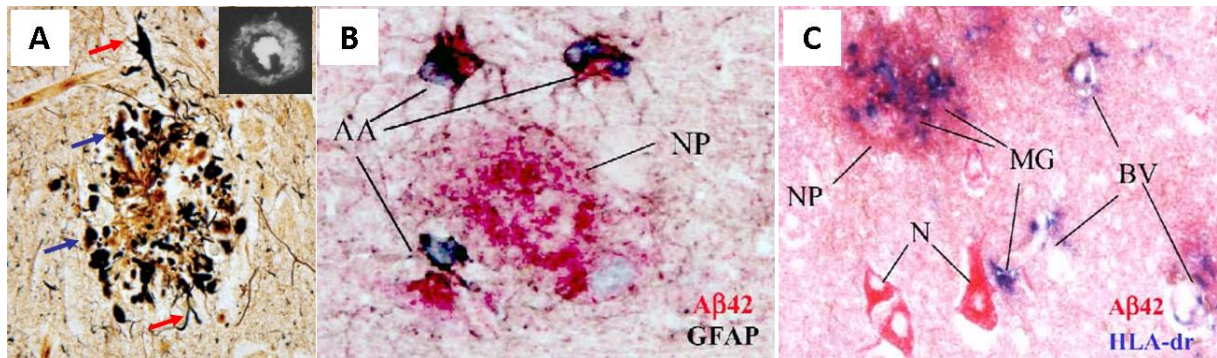


Figure 5 : Les plaques amyloïdes neuritiques. **A** : Coloration de Bielschowski d'une plaque neuritique (x400, d'après Perl, 2010). Flèche rouge : neurites dystrophiques ; flèches bleues : lésions focales amyloïdes ; encart : coloration à la thioflavine d'une plaque à cœur dense (Dickson *et al.*, 1988). **B** : L'astrocytose réactive en périphérie des plaques : double marquage GFAP (Noir)/Aβ42 (Rouge) (AA : Astrocyte activé ; NP : plaque d'origine neuronale). **C** : Invasion microgliale (Bleu) des plaques amyloïdes (Rouge) (MG : microglie ; BV : vaisseau sanguin ; N : neurone) (d'après Nagele *et al.*, 2004).

2.2 Les lésions négatives

2.2.1 La perte cellulaire

La perte neuronale a été déduite de différentes observations. L'atrophie corticale a été la première et plus frappante modification macroscopique. L'examen de cerveaux de patients a révélé une diminution significative du poids des lobes temporal, pariétal et cingulaire (lobe frontal) (Bowen *et al.*, 1989). La présence dans le parenchyme de « fantômes » de DNF est aussi un indice d'une mort neuronale précédente. Normalement intraneuronales, les DNF subsistent après la mort du neurone (Cras *et al.*, 1995).

La mort neuronale semble précoce dans la pathologie. L'IRM permet l'étude morphométrique du cerveau chez des patients sains, à risque ou atteints. Bien qu'une diminution de la taille du cerveau soit aussi un élément du vieillissement normal (0 à 0,5% par an), la neurodégénérescence dans la MA induit une exacerbation de cette diminution dès la phase asymptomatique (1 à 2% par an et plus). Dans ce cas, le cerveau a déjà un volume diminué lors de l'apparition des symptômes cliniques de démence (Fox & Schott, 2004). Avant même l'apparition de troubles cognitifs, certains patients avec une histoire familiale présentent déjà une diminution significative du volume de l'hippocampe du cerveau associée à une augmentation du volume de LCR (Honea *et al.*, 2011). Cette perte est aussi détectée chez les patients au stade pré-MCI (Chételat *et al.*, 2010).

Il a été proposé que cette perte soit le résultat de mécanismes apoptiques. L'activation de la caspase 3, une protéase de la voie intrinsèque de l'apoptose, est significativement augmentée dans les neurones du champ hippocampique CA1, du cortex entorhinal et du cortex frontal chez les patients MA en comparaison des patients contrôle (Su *et al.*, 2001).

2.2.2 La perte synaptique

Une perte de 25 à 35% de la densité synaptique a été observée dans les biopsies corticales frontales et temporales de patients MA (Davies *et al.*, 1987). Cette perte est aussi quantifiable par la diminution des protéines synaptiques. Une diminution de 25% l'immunoréactivité de la synaptophysine (une protéine impliquée dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane) a été rapportée dans le cortex frontal des patients MCI en comparaisons de sujets sains. Une perte de l'expression de la synaptotagmine a également été observée dans cette zone dans les formes plus sévères de MA (Masliah *et al.*, 2001). Les patients MCI, présentent une diminution significative de la protéine PSD95 ainsi que des protéines lui étant associées comme les récepteurs NMDA. Toutefois dans cette étude, la perte synaptique est associée à l'activation des caspases ce qui suggère également l'initiation de l'apoptose (Sultana *et al.*, 2010). Dans la MA, la perte synaptique précoce corrélée aux déficits cognitifs et a conduit à l'hypothèse que la MA pourrait être en premier lieu une pathologie synaptique (DeKosky & Scheff, 1990 ; Selkoe, 2002)

3. Le métabolisme de la protéine APP, le précurseur de l'amyloïde

3.1 Le gène de l'APP

Chez l'Homme, l'unique copie du gène de l'APP est sur le chromosome 21, au locus 21q21, et présente une structure conservée au cours de l'évolution. En effet, l'ADNc de l'APP695 présente 89%, et la protéine 97% d'homologie entre l'Homme et la souris (Yamada *et al.*, 1987). Ce gène s'étend sur 170kpb et comporte 19 exons, notés de 1 à 13, 13a, et de 14 à 18, représentant une séquence codante de 3578 pb (Yoshikai *et al.*, 1990). Sa structure définit une famille de 16 gènes lui étant apparentés (pour revue Coulson *et al.*, 2000), dont les plus courants chez l'humain et la souris codent pour les protéines APLP1 et 2 (*Amyloid Precursor protein Like Protein*) (pour revue Walsh *et al.*, 2007).

Les caractéristiques du promoteur du gène de l'APP sont à l'origine de son expression constitutive et ubiquitaire (Tanzi *et al.*, 1987). Le promoteur du gène de l'APP présente aussi des caractéristiques des promoteurs des gènes domestiques. Son statut de méthylation (un mécanisme répresseur de l'expression) est identique entre des patients MA et des sujets sains (Yoshikai *et al.*, 1990) : la transcription du gène APP n'est pas donc modifiée dans la MA. L'analyse quantitative des quantités totales d'APP (fractions subcellulaires soluble et membranaire cumulées) issues d'extraits de cerveaux ne montre pas de différences significatives entre les patients MA (0,86µg/g) et les patients témoin (1,06µg/g) (Moir *et al.*, 1998).

Son transcrit primaire subit des modifications post-transcriptionnelles. L'épissage alternatif permet ainsi la production de trois ARNm (entre 3,2kb et 3.4kb) dont la traduction aboutit à trois isoformes protéiques majoritaires qui sont l'APP695, l'APP751 et l'APP770 (Tanaka *et al.*, 1988). Ces formes matures diffèrent par la présence d'un domaine inhibiteur de protéase à sérine « Kunitz » (KPI ou serpine) dans l'ectodomaine et codé par l'exon 7 (APP751 et APP770 ; « APP-KPI⁺ ») ou son absence (APP695 ; « APP-PKI⁻ ») (Podlisny *et al.*, 1990). Chez des patients âgés -70 ans- sains, les

ARNm des isoformes APP 770, APP 751 et APP 695 représentent dans le tissu neuronal 1,4%, 20% et 78,6% de l'ARNm total d'APP, indiquant que l'isoforme 695 est celui principalement exprimé dans le cerveau (Tanaka *et al.*, 1993). Si des modifications entre les proportions des différents ARNm ont été rapportées en lien avec la MA (Tanaka *et al.*, 1988, 1993 ; Matsui *et al.*, 2007), la contribution des modifications des protéines correspondantes ne sont pas significatives (Matsui *et al.*, 2007).

3.2 La protéine APP

L'APP mature est une protéine transmembranaire ubiquitaire de type 1. L'APP se compose d'un ectodomaine (aa1-aa624), d'un unique segment transmembranaire (aa625-aa648) et d'un court domaine cytosolique (aa649-aa695) (Kang *et al.*, 1987). Son organisation est assimilable à celle d'un récepteur transmembranaire (pour revue, Zheng et Koo, 2006). Son organisation générale est décrite par la figure 6.

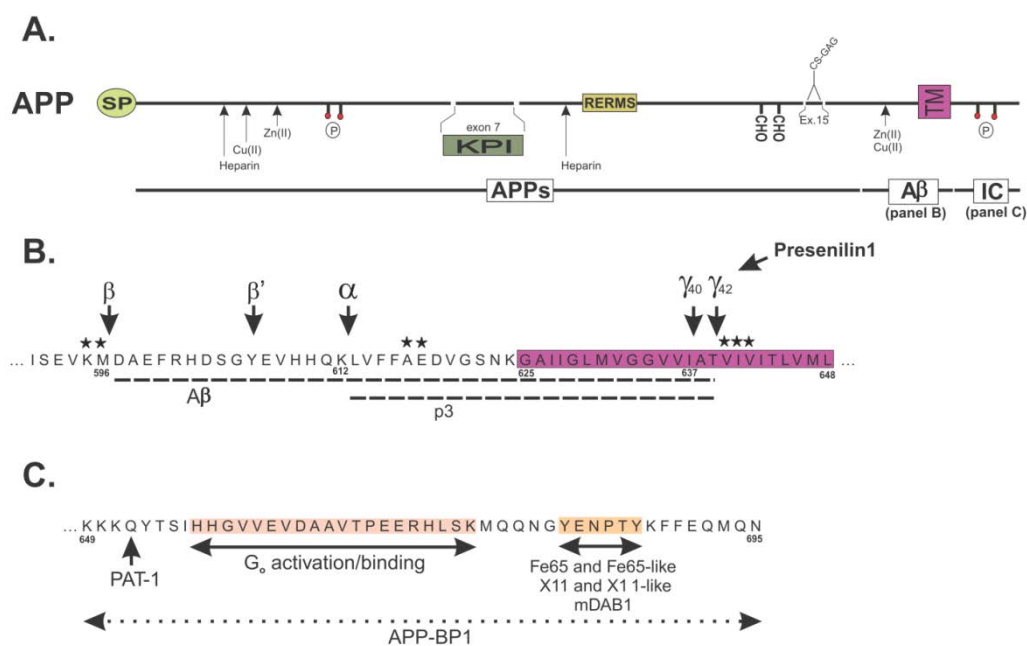


Figure 6 : Schéma de l'organisation des domaines de l'APP (d'après De Strooper et Annaert, 2000). **A** : L'APP dans son ensemble (SP : peptide signal ; Heparin : domaine de liaison à l'héparine ; P : site de phosphorylation ; Cu II / Zn II : sites de fixation du cuivre et du zinc ; KPI : domaine inhibiteur de protéase Kunitz ; RERMS : séquence porteuse des activités trophiques ; CHO : site de glycosylation ; Ex.15 : Exon 15, domaine de liaison avec la chondroïtine sulfate et les glycosaminoglycanes (astrocytes) ; TM : segment transmembranaire). **B** : séquence du peptide Aβ (α, β, γ : sites d'attaques des sécrétases correspondantes ; étoiles : sites de mutations des FAD favorisant la production du peptide Aβ ; en violet : partie intracellulaire). **C** : séquence du domaine intracellulaire (PAT-1 : Protein interacting with APP Tail ; Go : protéine liant le GTP ; Fe65, X11, mDAB : partenaires protéiques de l'APP ; APP-BP1 : APP binding protein)

Son ectodomaine comporte de nombreux modules fonctionnels. Il comporte entre autres des sites de fixation des cations divalents (pour le Zn^{2+} et Cu^{2+}) formés par des poches de résidus basiques fermées par des ponts disulfures. Le domaine Zn^{2+} aurait un rôle structural tandis que le domaine Cu^{2+} pourrait réduire le Cu(II) en Cu(I). La structure de l'ectodomaine de l'APP, permet son oligomérisation au moins jusqu'aux tétramères (Kaden *et al.*, 2008) et permet la formation de dimères parallèles (cis) ou antiparallèles (trans) (Wang *et al.*, 2004 ; Gralle *et al.*, 2006). L'homo- et l'hétérodimérisation en trans ont été impliquées dans l'adhésion cellule-cellule (Soba *et al.*, 2005). Le domaine RERMS serait le domaine supportant l'activité neurotrophique de l'APP (Ninomiya *et al.*, 1993). Le clivage de l'ectodomaine par les α ou β sécrétase aboutit à la libération d'APP soluble (sAPP) dont les propriétés trophiques sont reconnues (Chasseigneaux *et al.*, 2011).

La partie transmembranaire (TM) de l'APP est importante à la maturation protéolytique de l'APP par la γ -sécrétase. Ce domaine renferme un triple motif consensus GxxxG impliqué dans l'homodimérisation l'APP, ce qui limite la progression de la γ -sécrétase et accroît la production de la forme longue $A\beta^{42}$ (Munter *et al.*, 2007).

Le domaine intracellulaire C-terminal renferme 3 motifs fonctionnels consensus et contenant certains résidus susceptibles d'être phosphorylés -Y653, T654, S655, T668, S675, Y682, T686 et Y687 (numérotation sur l'APP 695) (pour revue Buoso *et al.*, 2010). **Le premier motif** est un motif YTSI (aa652-aa656) responsable du transport intracellulaire de l'APP vers la voie de sécrétion constitutive. La fonctionnalité de ce motif dépend de la phosphorylation des résidus Y653 et T654. **Le deuxième motif** fonctionnel est un motif VTPEER (aa667-aa672) enclavant le résidu T668, dont la phosphorylation est spécifique au tissu neuronal et donc supposée comme impliquée dans un métabolisme particulier de l'APP dans le cerveau. La phosphorylation de ce résidu est surreprésentée chez les patients MA, et oriente le métabolisme de l'APP vers le clivage β (Lee *et al.*, 2003). **Le dernier motif** est un motif d'internalisation par puits recouverts de clathrines YENPTY (aa682-aa687, plus particulièrement le motif NPXY). Le retrait de ce motif ou la substitution des résidus tyrosines (ou l'inhibition de la formation du manteau de clathrines) inhibent l'endocytose de l'APP et diminuent la formation de peptide $A\beta^{1-42}$ *in vitro* (Koo & Squazzo, 1994 ; Perez *et al.*, 1999) et *in vivo* (Ring *et al.*, 2007). La substitution de la tyrosine Y687, inhibe l'adressage de l'APP à la membrane plasmique, diminue la sécrétion de sAPP α et conduit à la surproduction d' $A\beta$ (Takahashi *et al.*, 2008).

La structure de l'APP suggère celle d'un récepteur transmembranaire : d'un point de vue structural, des protéines de la matrice extracellulaire interagissent avec son ectodomaine pour homo- ou hétérodimériser la protéine, de manière parallèle en cis (sur la même membrane) ou antiparallèle (en transsynaptique). Du point de vue fonctionnel, la partie intracellulaire de l'APP est critique à son adressage et au support de ses fonctions qui impliquent le segment extracellulaire. Toutefois, la nature des ligands de l'APP n'a pas été déterminée.

3.3 La protéolyse de l'APP

3.3.1 Principe

Le peptide amyloïde β est issu du clivage protéolytique de la protéine APP (*Amyloid Precursor Protein*). L'APP peut subir deux types de clivages, chaque type impliquant une séquence de deux partenaires enzymatiques : les sécrétases. Le principe de ces clivages et la production des différents fragments générés est schématisé dans la figure 7.

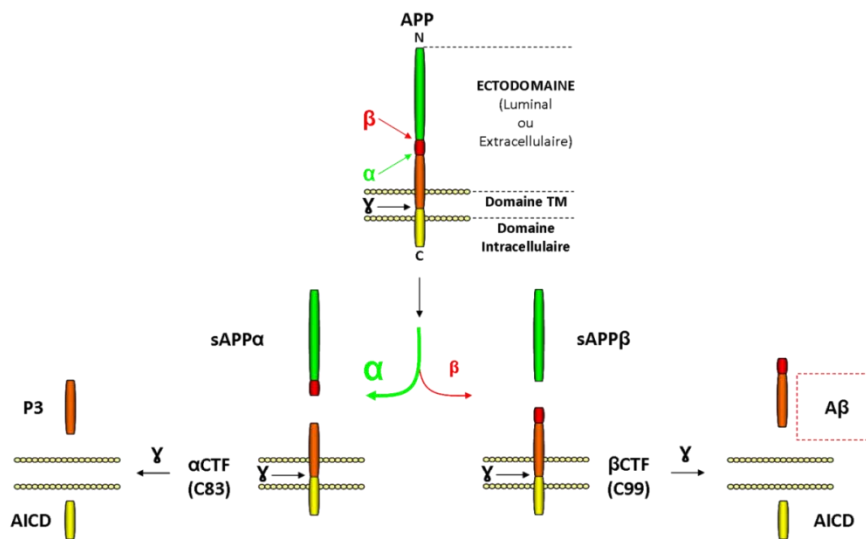


Figure 7 : Principe de la protéolyse séquentielle de l'APP. Partie supérieure : position relative des différents sites de clivage des sécrétases sur la protéine APP (APP : *Amyloid Precursor Protein* ; N : extrémité N-terminale ; α, β, γ : sites d'attaques des sécrétases α, β, γ ; TM : transmembranaire ; C : extrémité C-terminale). Partie inférieure : les clivages séquentiels de l'APP.

Le premier type de clivage est dit β ou amyloïdogénique. Le clivage de l'APP par la β -sécrétase libère dans le milieu extracellulaire le fragment sAPP β (*Secreted APP β*) et laisse un fragment β CTF (*β cleaved-APP C Terminal Fragment*, ou C99) enchâssé dans la membrane. La γ -sécrétase, dont l'activité est intra-membranaire, clive le β CTF et libère le peptide A β au niveau extracellulaire, et le fragment AICD (*APP IntraCellular Domain*), qui est un facteur de transcription, dans le cytosol.

Le second type de clivage est dit α ou non-amyloïdogénique. L' α -sécrétase clive l'APP dans la séquence correspondant au peptide A β , et libère dans le milieu extracellulaire le fragment sAPP α (*Secreted APP α*) et laisse un fragment α CTF (*α cleaved-APP C Terminal Fragment*, ou C83) enchâssé dans la membrane. Le clivage de l' α CTF par la γ -sécrétase libère le peptide P3 (*3 kDa Peptide*) au niveau extracellulaire et le fragment AICD dans le cytosol.

3.3.2 Les sécrétases

3.3.2.1 L' α sécrétase

L' α -sécrétase est une protéase exprimée à la membrane neuronale. Il a été déterminé qu'elle appartient à la famille ADAM (*α Disintegrin And Metalloprotease*). Parmi les 21 ADAM, les ADAM 9, 10 et 17 sont les membres présentant une activité protéase α -sécrétase ayant pour substrat l'APP (Asai *et al.*, 2003). ADAM10 serait la principale protéase à activité α -sécrétase en lien avec la MA. *In vivo*, l'activité d'ADAM 10 module l'apparition des lésions amyloïdes. Sa surexpression prévient la formation des plaques et restaure la LTP (un modèle de mémoire et de plasticité) chez des souris APP_{v17171} modèles de MA, l'expression d'un dominant négatif augmente les lésions (Postina *et al.*, 2004). De plus, l'expression d'ADAM10 est diminuée dans la MA (pour revue, Edwards *et al.*, 2008).

L'activité α -sécrétase est principalement membranaire. 80% de l' α sécrétase seraient à la membrane sous forme active et 20% dans le cytosol sous forme de proenzyme (Lammich *et al.*, 1999). Son activité protéolytique catalyse le clivage de l'APP à une « distance » fixe (*i.e.* entre le résidu Lys-13 et Leu-12) de l'hélice transmembranaire de l'APP (Sisodia, 1992) dans les RAFTs (Ikezu *et al.*, 1998). Le sAPP α possède des activités neurotrophiques sur les neurones *in vitro* (Chasseigneaux *et al.*, 2010). *In vivo*, son infusion *icv* est procognitive (Bour *et al.*, 2004) et augmente la LTP (Taylor *et al.*, 2008). Le sAPP α est donc fortement impliqué dans la plasticité synaptique. L'activité α -sécrétase et le sAPP α extracellulaire sont diminués chez les patients MA (Colciaghi *et al.*, 2002). Il est donc proposé que son activation puisse être une cible thérapeutique (Endres & Fahrenholz, 2010).

3.3.2.2 La β sécrétase

L'activité β -sécrétase est portée par BACE 1 (**β APP Cleaving Enzyme**) (pour revue, Cole & Vassar, 2008). L'étude de l'expression de BACE par hybridation *in situ* a mis en évidence une forte expression dans le neurone et peu dans la glie dans le cerveau de rat (Vassar *et al.*, 1999). BACE 1 (alias Asp2) clive deux sites, (β) ou (β'), sur l'APP pour former l'extrémité N-terminale du peptide A β (pour revue, De Strooper & Annaert, 2000).

L'activité de BACE 1 est intracellulaire. BACE 1 et son produit direct de clivage, le sAPP β , colocalisent dans des vésicules intracellulaires contenant des marqueurs de l'appareil de Golgi (protéine du Golgi de 58 kDa) et des endosomes (récepteur à la transferrine) (Vassar *et al.*, 1999). Cette localisation concorde avec le fait que l'activité de la β -sécrétase nécessite un pH acide de 5,5 (Sinha *et al.*, 1999). *In vitro*, la β -sécrétase, les β -CTF et l'AICD sont dans des vésicules portant le marqueur LAMP2. Ceci suggère que le compartiment subcellulaire dans lequel la β -sécrétase est active est en relation avec le compartiment lysosomal (Vingtdoux *et al.*, 2007a). Ces vésicules ont par la suite été identifiées comme étant en interaction avec les corps multivésiculaires, à l'origine des exosomes (Vingtdoux *et al.*, 2007b). De manière très intéressante, dans les cellules N2a, une infime fraction du peptide A β (1%) est contenue dans les exosomes et relâchée dans le milieu extracellulaire, tandis que des protéines exosomales ont été identifiées dans les plaques amyloïdes

chez l'Homme (Rajendran *et al.*, 2006). Ce processus, bien que ne concernant que 1% de l'A β produit, pourrait avoir un impact significatif sur l'élévation et l'accumulation du peptide A β extracellulaire.

L'activité de la β -sécrétase est modulée par le cholestérol. *In vivo*, la mise sous régime hypercholestérolémiant des souris PSAPP (un croisement de Tg2576 APP^{swe} avec une souche PS1) augmente les taux centraux de cholestérol (et périphériques) qui sont alors positivement corrélés avec la production totale d'A β (Refolo *et al.*, 2000). A l'inverse, l'inhibition de l'enzyme limitante de la synthèse du cholestérol (HMG-CoA réductase) chez ces souris transgéniques ou les souris sauvages diminue la cholestérolémie et les taux d'A β (Refolo *et al.*, 2001). **Il semble intuitif que l'inhibition de l'activité β -sécrétase constitue une cible thérapeutique dans la MA.** En effet, les animaux issus du croisement BACE1^{-/-} x Tg2576 (diminuant la production d'A β à un niveau normal représentant 5% de la production chez les tg2576) ne présentent ni plaques, ni de déficits comportementaux dans des tâches hippocampo-dépendantes (reconnaissance sociale et alternance dans le labyrinthe en Y). De manière surprenante les animaux BACE1^{-/-} présentent un déficit de mémoire de travail dans le labyrinthe en Y (Ohno *et al.*, 2004). Ce déficit suggère la perte d'une fonction positivement impliquée dans la cognition. Toutefois, il n'a pas été déterminé si cette perte fonctionnelle dépendait d'une diminution de production de β CTF, de sAPP β ou d'A β lui-même. Cette observation, combinée à l'ignorance de la fonction physiologique de l'A β (Puzzo *et al.*, 2008) (ou à un rôle potentiellement trophique), pose une réelle limite quand au bénéfice d'une inhibition totale et/ou chronique de la β -sécrétase sur une longue période.

3.3.2.3 La γ -sécrétase

La γ -sécrétase est un complexe multimérique comprenant la nicastrine, les présénilines (PS1 ou PS2), Aph1 (Anterior Pharynx defective homolog 1) et pen2 (Presenilin Enhancer 2). Le fait que la surexpression de BACE 1 dans les cellules exprimant l'APP^{swe} (*i.e.* la mutation favorisant l'interaction APP/BACE) n'augmente pas la production de peptide A β (Vassar *et al.*, 1999) suggère que l'étape γ -sécrétase est limitante dans la génèse du peptide amyloïde. La nicastrine et Aph1 stabiliseraient le complexe tandis que pen2 serait le catalyseur de l'activité du site actif porté par la préséniline (pour revue, Krishnaswamy *et al.*, 2009). Cette réaction nécessite la création d'un environnement hydrophile au sein même de la membrane selon un mécanisme non-identifié. Ce complexe enzymatique catalyse une série de clivages intramembranaires ϵ , ζ et γ des fragments C-terminaux de l'APP résidant dans la membrane après les clivages par les sécrétases et façonne ainsi l'extrémité C-terminale des peptides A β (Zhao *et al.*, 2007) (figure 8).

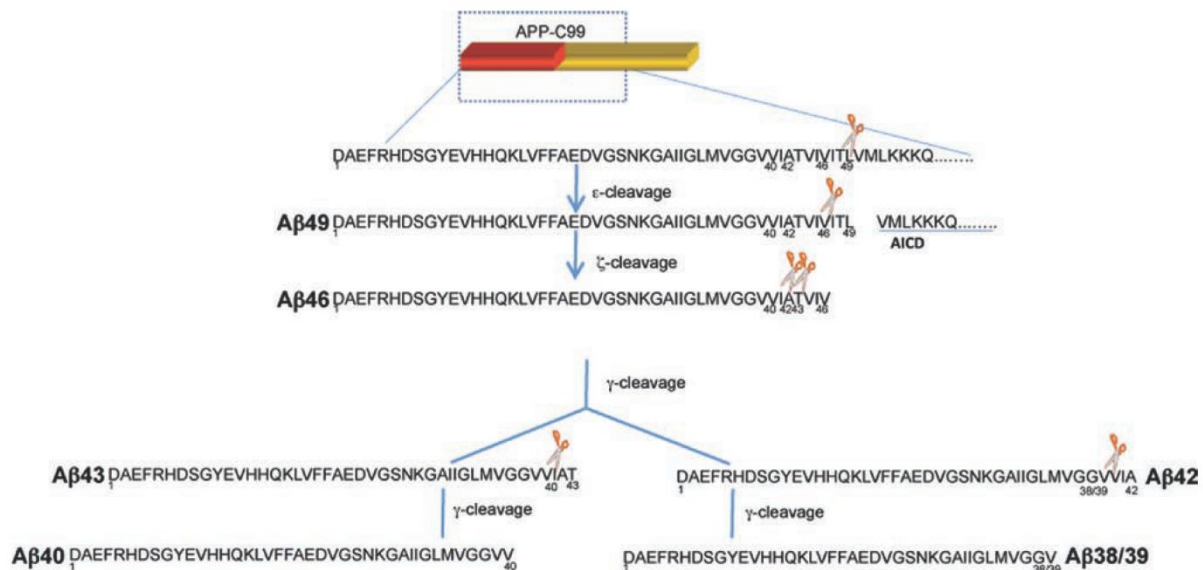


Figure 8 : Séquence et sites des différents clivages du fragment C99 par la γ -sécrétase modelant l'extrémité C terminale du peptide A β (d'après Krishwasnamy *et al.*, 2009).

L'état d'homodimérisation de l'APP pourrait influencer le clivage par la γ -sécrétase : il a été proposé que l'interaction entre les motifs GxxxG des domaines transmembranaires de l'APP puisse prévenir l'avancée des clivages γ pour favoriser la formation d'isoformes C-terminaux longs d'A β (Munter *et al.*, 2007). Cette idée est congruente avec l'hypothèse que les oligomères toxiques d'A β sont d'abord formés au niveau intracellulaire (Takahashi *et al.*, 2002 ; Oddo *et al.*, 2005 ; pour revue Gouras *et al.*, 2005) .

Le fragment AICD, dégagé par le clivage ϵ , est reconnu pour agir comme un facteur de transcription (pour revue Buoso *et al.*, 2010). Les rôles de l'AICD sont encore mal compris. Il a toutefois été rapporté que son activité transcriptionnelle pouvait induire l'expression de la néprilysine (une métalloprotéase capable de dégrader l'A β monomérique) (Belayev *et al.*, 2010). Hormis son statut de facteur de transcription, l'AICD peut être dégradé par le protéasome ou l'IDE (*Insulin Degrading Enzyme*) (pour revue Buoso *et al.*, 2010). L'AICD peut être clivé (à l'aa 664) par les caspases pour former les fragments Jcasp et C31, qui présenteraient une toxicité en présence de la partie C-terminale d'APP (Park *et al.*, 2009). Ainsi, dans un cadre où les caspases sont activées, le fragment AICD pourrait perdre son potentiel bénéfique en faveur d'une activité toxique.

Il a été proposé que l'inhibition de la voie γ sécrétase puisse être une approche thérapeutique. Or la γ -sécrétase a de nombreux autres substrats (pour une liste exhaustive, voir Krishnaswamy *et al.*, 2009) dont la protéine Notch (Woo *et al.*, 2011). Le fait que Notch soit fortement impliquée dans les processus d'hématopoïèse et de maturation du système immunitaire et le manque de spécificité de l'inhibition de la γ -sécrétase pose une limite à cette stratégie thérapeutique (pour revue, Sangram, 2002). Ainsi, les essais cliniques sur le semagacestat ou LY450139 ont été interrompus en phase III (Imbimbo & Giardana, 2011 ; Schor, 2011).

3.4 Le peptide A β soluble

3.4.1 La révision de la cascade amyloïde

Les plaques amyloïdes ont été originellement impliquées dans la pathogénèse dans le cadre de l'hypothèse de la cascade amyloïde. Selon cette hypothèse, un métabolisme altéré de la protéine APP serait à l'origine des troubles observés dans la MA (Hardy et Higgins, 1992). Cependant, elle n'expliquerait pas à elle seule les différentes atteintes cellulaires et tissulaires, observées dans la pathologie. Ainsi, des observations clé ont amené à la révision de cette hypothèse. La présence d'amas amyloïdes a été détectée chez des patients sains (Crystal *et al.*, 1988 ; Katzman *et al.*, 1988) ou, à l'inverse, non détectée chez des patients atteints (Dickson *et al.*, 1992).

Post-mortem, les analyses de cerveaux des patients montrent de meilleures corrélations entre les niveaux cérébraux de peptide A β solubles, la perte synaptique et les déficits cognitifs qu'avec les quantités d'A β fibrillé (Lue *et al.*, 1999 ; McLean *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1999). L'analyse par immunoblot des fractions solubles a révélé la présence non seulement de peptides A β monomériques mais aussi des formes oligomériques solubles dans le SDS (8 et 12 Kd) (McLean *et al.*, 1999). Des oligomères similaires ont été aussi détectés chez les patients dans le CA1 de l'hippocampe et le cortex entorhinal en absence de plaques ou de DNF (Funato *et al.*, 1999). L'émergence de souris transgéniques a permis de confirmer que les déficits cognitifs occuraient en absence de plaques amyloïdes (Mücke *et al.*, 2000).

Ces données suggèrent que les plaques séniles ne jouent pas un rôle prépondérant dans la pathogénèse précoce MA en ce qui concerne l'installation des déficits cognitifs. Les dépôts amyloïdes seraient une conséquence de la neurodégénérescence qui accentueraient la mort cellulaire, les processus oxydatifs et inflammatoires (Selkoe, 2004). Une nouvelle hypothèse, plaçant les oligomères solubles au centre du processus neurodégénératif de la phase préclinique de la MA, a donc été proposée (Drouet *et al.*, 2000).

3.4.2 La toxicité du peptide A β soluble

3.4.2.1 L'apoptose induite par les oligomères solubles et ses mécanismes

Les mécanismes de l'interaction du peptide A β soluble avec la membrane à la base de la toxicité du peptide A β ne sont pas clairs.

Deux hypothèses sont discutées et concernent la formation de pores membranaires ou l'interaction de l'A β avec un récepteur potentiel. L'A β pourrait former des canaux membranaires non sélectifs laissant passer les cations dont le calcium, bloqués par le zinc, et sensibles aux solvants (Hirakura *et al.*, 1999). Cette hypothèse propose un lien direct entre les oligomères solubles et les perturbations du métabolisme calcique (Kagan *et al.*, 2004 ; Glabe, 2006). Différentes entités réceptrices ont été proposées pour l'A β (Verdier & Penke, 2004). Par exemple, l'inactivation du récepteurs p75 (Sotthibundhu *et al.*, 2008) ou la kinase Fyn (Lambert *et al.*, 1998) protège *in vivo*

contre les déficits cognitifs induits par l'Aβ. L'activation du récepteur RAGE par l'Aβ (Chaney *et al.*, 2005) peut induire la formation de ROS par la microglie (Yan *et al.*, 1996).

Quelque soit le mécanisme impliqué, il a été déterminé que la fluidité membranaire était un paramètre déterminant de la modulation de la toxicité de l'Aβ soluble. La déplétion en cholestérol accentuée, et l'enrichissement prévient, la toxicité du peptide Aβ soluble spécifiquement. Cet effet est indépendant de l'interaction des oligomères d'Aβ avec les membranes : la déplétion ou l'enrichissement en cholestérol ne modifie pas l'intégration du peptide Aβ soluble dans les membranes (Sponne *et al.*, 2004). Les rafts, des plateformes lipidiques membranaires de signalisation synaptique, ont été proposées comme particulièrement ciblés par ce phénomène (Florent *et al.*, 2005). Ces observations sont capitales car elles suggèrent que l'interaction membrane/Aβ à la base de la toxicité dépend à la fois du statut membranaire en cholestérol et de la nature des oligomères en présence.

Les propriétés fusogènes du peptide Aβ et son interaction avec les lipides membranaires sont très impliquées dans sa toxicité (Pillot *et al.*, 1999 ; Drouet *et al.*, 2000 ; Drouet *et al.*, 2001). L'interaction des oligomères solubles d'Aβ avec les lipides membranaires induit la mort des neurones corticaux et hippocampiques de manière dépendante des caspases 3 et 9 et de la calpaïne, qui impliquent un stress oxydant et une déstabilisation précoce du cytosquelette neuronal. L'accumulation de calcium intracellulaire est parallèle à ces atteintes (Sponne *et al.*, 2003 ; Fifre *et al.*, 2006). Les signaux pro-apoptotiques induits au niveau intracellulaire nécessitent l'activation précoce de la phospholipase A2 cytosolique, la formation d'acide arachidonique (Kriem *et al.*, 2005) puis l'activation des sphingomyélinases et la libération de céramides (Malaplate-Armand *et al.*, 2006) (figure 9).

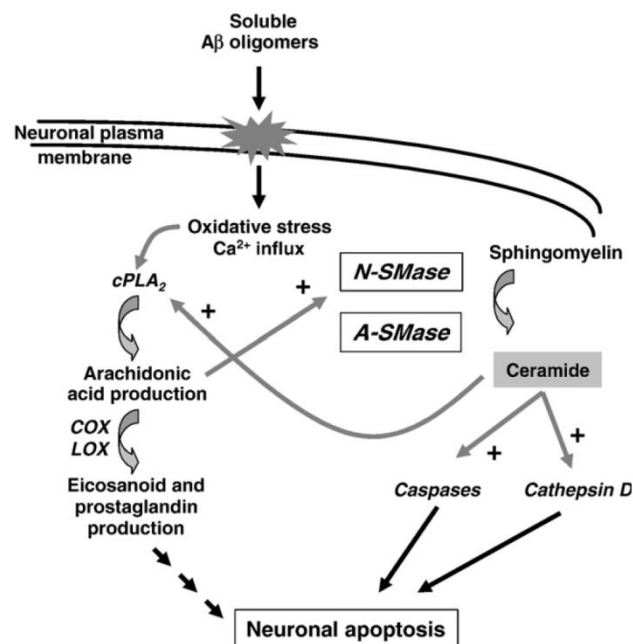


Figure 9 : La cascade de signalisation pro-apoptotique induite par les oligomères d'Aβ (d'après Malaplate-Armand *et al.*, 2006)

3.4.2.2 La synaptotoxicité

Le premier aspect de la toxicité neuronale A β soluble est sa synaptotoxicité. *In vitro*, les oligomères d'A β issus de cerveaux de patients interagissent avec les sites synaptiques riches en PSD95 sur cultures de cellules hippocampiques (Lacor *et al.*, 2004). L'interaction du peptide A β avec la membrane neuronale pourrait être à l'origine de troubles synaptiques à l'origine des troubles de mémoire. Le processus de LTP, un modèle de mémoire et de plasticité synaptique, est inhibé *in vitro* par un traitement du milieu avec les dimères d'A β issus de cerveaux de patients (Shankar *et al.*, 2008). *In vivo*, l'injection intracérébrale de dimères ou de trimères d'A β (300pmol) inhibe l'induction de la LTP dans le CA1, tandis que les monomères sont sans effets (Walsh *et al.*, 2002). Les oligomères solubles d'A β altèreraient donc la neurotransmission et/ou la plasticité synaptique. Le traitement des neurones en cultures altère la composition synaptique en récepteur, modifie l'efficacité synaptique et provoquent des changements morphologiques des épines dendritiques (Calabrese *et al.*, 2007 ; Lacor *et al.*, 2007). L'A β soluble vient d'être impliqué dans le remodelage synaptique et le retrait des récepteurs AMPA GluR1 de la membrane postsynaptiques *in vivo* (D'Amelio *et al.*, 2011). L'application d'A β sur des tranches de cerveaux de souris induit préférentiellement la mort des neurones du CA1 par rapport aux autres sous-régions hippocampiques (Kim *et al.*, 2003). Ainsi la synaptotoxicité du peptide A β semble associée à une régiotoxicité.

Au final, l'impact néfaste des oligomères solubles d'A β sur le cytosquelette, et en particulier sur celui de la synapse, est une cible intéressante pour les stratégies thérapeutiques visant à prévenir la synaptotoxicité du peptide A β (Penzes & VanLeeuwen, 2011).

4. Les modèles d'étude *in vivo* de la toxicité du peptide A β soluble.

Les observations *in vitro* sur la toxicité du peptide A β , suggérant son implication dans les troubles cognitifs précoces dans la MA, sont confortées *in vivo*. De nombreux modèles d'étude ont été créés afin d'étudier l'impact des oligomères solubles sur le cerveau et la cognition. Nous nous focaliserons sur les modèles d'injection intracérébrale (rat et souris) et les souris monotransgéniques (Tableaux 3,4 et 5).

Souche	A β soluble	Site d'injection	Paramètre	Références
Sprague-Dawley	1-40	cortex	Mort neuronale dans le CA1 de l'hippocampe	Kowall <i>et al.</i> , 1991
Sprague-Dawley	1-40	Hippocampe	Déficit de mémoire à court terme	Sweeney <i>et al.</i> , 1997
Sprague-Dawley	1-40 ; répétée	hippocampe	Déficit de mémoire à court terme	Cleary <i>et al.</i> , 1995
Sprague-Dawley	1-40	hippocampe	Déficit de mémoire à long terme	Mc Donald <i>et al.</i> , 1996
Wistar Sprague-Dawley	1-40/43	hippocampe	Neurotoxicité, LTP, mémoire et apprentissage	Stephan <i>et al.</i> , 2001
Sprague-Dawley	Oligomères naturels 1-40/42	icv	LTP	Walsh <i>et al.</i> , 2002

Tableau 3 : Modèles d'injection de peptide A β soluble chez le rat.

Souche	A β soluble	Site d'injection	Paramètre	Références
C57Bl/6J apoE ^{-/-}	1-40	NC	Transport BHE	Shibata <i>et al.</i> , 2001
ICR	1-42 ; 25-35	icv	Inflammation périph. Suite injection icv	Song <i>et al.</i> , 2001
ICR	1-40/42	icv	Clairance A β via BHE	Ji <i>et al.</i> , 2001
SVJ	25-35 (injections répétées)	icv	Mémoire à court terme et perte cholinergique	Yamada <i>et al.</i> , 2005
C57Bl/6J	1-40/42 ;x-42	icv	Mémoire et Stress oxydant	Youssef <i>et al.</i> , 2008

Tableau 4 : Modèles d'injection de peptide A β soluble chez la souris.

Souche	Transgène	Délai d'apparition des dépôts	Déficits cognitifs	Références
PDAPP	APP 751 (V717F)	4 mois	oui	Games <i>et al.</i> , 1995
APPLd	APP 751 (V717I)	12 mois	oui	Moechars <i>et al.</i> , 1999
APP23	hAPP 751 (K670N/M671L)	6 mois	oui	Sturchler-Pierrat <i>et al.</i> , 1997
CRND8	hAPP 751 (K670N/M671L)	3 mois	oui	Chishti <i>et al.</i> , 2001
NSEAPP	APP _{h751}	ND	oui	Quon <i>et al.</i> , 1991
APP _{Swe} (Tg2576)	APP _{h695} (K670N/M671L)	9-10 mois	oui	Hsiao <i>et al.</i> , 1996

Tableau 5 : Souris monogéniques modèles de la MA

Les injections intracérébrales de peptides A β reproduisent certaines caractéristiques de la MA (pour revue Duyckaerts, 2009). Ces caractéristiques comprennent des troubles de mémoire(s), des modifications du statut rédox, des troubles de la plasticité synaptique ainsi que des pertes neuronales. Les modèles d'injections permettent de reproduire les signes et les lésions de la MA (Duyckaerts *et al.*, 2008). Les avantages de l'injection intracérébrale d'A β soluble résident également dans le contrôle de la qualité des oligomères injectés et dans la possibilité d'étudier *in vitro* les

mécanismes induits par la même préparation. L'inconvénient de ce modèle est que pour modéliser l'exposition à long terme aux oligomères, il est nécessaire de recourir soit à l'implantation de canules d'injection (Yamada *et al.*, 2005) pour des injections répétées, soit à l'implantation de pompes.

L'injection *icv* d'oligomères soluble d'A β chez la souris induit des troubles de mémoire spatiale et de travail. Ce déficit s'accompagne de la formation de ROS dans l'hippocampe (Youssef *et al.*, 2008). Les oligomères injectés dans ce modèle ont été précédemment caractérisés *in vitro* (Kriem *et al.*, 2005 ; Fife *et al.*, 2006 ; Malaplate *et al.*, 2006).

De nombreuses souris transgéniques ont été générées afin de modéliser les atteintes, mais aussi la cause de la MA, à savoir la production endogène importante de peptide A β (Duyckaerts *et al.*, 2008).

La souris Tg2576 est particulièrement utilisée. La production d'A β soluble chez la Tg2576 est significativement augmentée dès l'âge de 3 mois (Hsiao *et al.*, 1996). À 6 mois, l'A β formé est oligomérique soluble (Kawarabayashi *et al.*, 2001) et ses quantités sont déjà inversement corrélées aux performances cognitives des animaux (Westermann *et al.*, 2002) avant même l'expression de déficits cognitifs significatifs. Ainsi, les premiers signes d'altérations cognitives chez ces animaux, à partir de 6 mois (Westerman *et al.*, 2002) sont significatifs à partir de 8 mois et antérieurs avant la formation des plaques amyloïdes, vers 9-12 mois (Kawarabayashi *et al.*, 2001). Aussi ce modèle permet de modéliser toute la phase infraclinique de la MA.

En résumé, la MA se caractérise par l'installation progressive de différents troubles caractérisés au niveau biologique par l'émergence de troubles cognitifs difficilement dépistables au début. La maladie comporte une longue phase infraclinique durant laquelle des pertes synaptiques puis cellulaires progressent. Des observations cliniques ont amené à considérer le peptide A β sous forme soluble comme le principal agent neurotoxique à l'origine du déclin cognitif. De nombreux modèles animaux reproduisent assez fidèlement les altérations précoces de la MA. Afin de prévenir l'apparition du déclin cognitif, cibler la neurotoxicité des oligomères solubles d'A β lors des phases précliniques est une approche thérapeutique intéressante.

Partie B : Le système des neurotrophines et l'encapsulation cellulaire

Lors de ce travail, nous avons choisi de faire la preuve du concept que la sécrétion continue *in situ* de facteur neurotrophique pouvait représenter une stratégie thérapeutique pertinente pour la MA. Cette partie sera dédiée à la biologie des facteurs trophiques avec une emphase particulière sur la famille des neurotrophines et leurs altérations dans la MA. Nous verrons par la suite en quelle mesure l'encapsulation cellulaire est une stratégie de délivrance de facteurs trophiques adaptée dans le cadre de la Maladie d'Alzheimer.

1. Généralités sur la famille des neurotrophines

1.1 Définition

Dans le SNC, la survie et la mort neuronale sont régulées par de nombreuses familles de facteurs au cours du développement ainsi que chez l'adulte (pour revue Siegel et Chauhan, 2000). Parmi elles, les neurotrophines (NTs) constituent une famille de médiateurs peptidiques de 118 à 120 aa contrôlant la différenciation (Da Silva & Wang, 2010), la croissance (Markus *et al.*, 2002), la survie (Davies, 2003) et la plasticité neuronale (Poo, 2001).

Les membres de cette famille sont codés par des gènes distincts ayant un même précurseur ancestral. Chez les mammifères, cette famille compte 4 membres : le NGF (*Nerve Growth Factor*), la NT-3 (*Neurotrophin 3*), le BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) et la NT-4/5 (*Neurotrophin 4/5*) (Halbök, 1999). D'autres NTs issues du même gène ancestral, la NT-6 (Götz *et al.*, 1994) et la NT-7 (Laï *et al.*, 1998), ne sont pas exprimées chez les mammifères et ne seront donc pas développées ici. Le NGF est la NT prototypique : historiquement, ce facteur trophique a été le premier mis en évidence sur les ganglions ciliaires de poulet (Cohen *et al.*, 1954 ; Levi-Montalcini *et al.*, 1963). La famille des NT est donc souvent citée comme étant la famille des facteurs apparentés au NGF. Les neurotrophines possèdent, dans leur structure, 3 ponts disulfures formant une « poche neurotrophique » (*neurotrophin knot* ; d'après Roux & Barker, 2002). Le GDNF (*Glial Derived Neurotrophic Factor*) présente aussi cette particularité structurale, mais n'est pas un membre de la famille des NTs (Dawbarn & Allen, 2003). La neuritine, la persépine et l'artémine sont les facteurs apparentés au GDNF. Dans le SNC, les NTs sont potentiellement synthétisées par tous les types cellulaires (microglie, astrocytes et oligodendrocytes), mais principalement par les neurones (Siegel & Chauhan, 2000).

Nous nous focaliserons dans cette partie sur le BDNF et le NGF pour deux raisons. La première est que la NT4 induit sa signalisation *via* le TrkB qui est aussi le récepteur au BDNF. Par conséquent, les signalisations induites par la NT4 et le BDNF sont identiques. Deuxièmement, l'expression de la

NT-3 n'est pas modifiée dans la MA (Hock *et al.*, 2000), et présente donc un intérêt moindre par rapport à la compréhension de l'étiologie de la MA.

1.2 L'expression des NTs dans le SNC

Les NTs sont synthétisées sous forme de propeptides (pro-NTs) dont le clivage libère les formes matures. Ce clivage est réalisé au niveau intracellulaire par la furine ou les convertases (PC1 et PC2 ; « *Pro-protein Convertases* ») et au niveau extracellulaire par la plasmine ou des protéines de la matrice extracellulaire, les MMP 3 et 7 (*Matrix MetalloProteases*) (Lee *et al.*, 2001; pour revue, Chao & Bothwell, 2002). Le pro-NGF (Fahnestock *et al.*, 2001) et le pro-BDNF (Peng *et al.*, 2005) sont les formes prédominantes de NTs (déterminées par immunoblot) présentes dans le cerveau murin et humain.

Durant le développement, la NT-3 et la NT-4 sont les NTs principalement exprimées dans le SNC. L'expression du NGF et du BDNF dans le SNC est principalement post-natale et les expériences d'hybridation *in situ* désignent l'hippocampe comme le site majeur de production des NTs (BDNF, NGF, NT3) chez l'animal adulte (Maisonpierre *et al.*, 1990 ; Hofer *et al.*, 1990). Chez l'Homme, toutes les NTs sont détectables dans les cellules hippocampiques par immunohistochimie depuis le stade embryonnaire jusqu'à un âge avancé (Quartu *et al.*, 1999). Les dosages ELISA des NTs par Hock *et al.* (2000) dans différentes aires cérébrales (hippocampe, cortex frontal et pariétal, cervelet) indiquent que les NTs sont concentrées dans l'hippocampe et sont de l'ordre du pg/g de tissu dans les conditions physiologiques chez le sujet sain âgé (BDNF 70 pg/g ; NGF 5pg/g ; NT3 100pg/g ; NT4 60pg/g).

Dans l'hippocampe, l'expression neuronale du NGF et du BDNF est modulée de manière activité-dépendante. L'inhibition de l'activité neuronale par le GABA la diminue, tandis que l'excitation neuronale par le kainate (Thoenen *et al.*, 1991) ou le NMDA l'augmente (Da Penha Berzagui *et al.*, 1993). Chez l'adulte (et au cours du développement), les afférences cholinergiques en provenance du septum induisent et maintiennent l'expression hippocampique du NGF et du BDNF, mais pas de la NT3 (Da Penha Berzagui *et al.*, 1993). La voie de signalisation ERK et le facteur de transcription CREB régulent l'expression du NGF (Da Penha Berzagui *et al.*, 1993 ; McCauslin *et al.*, 2006) et du BDNF (Conti *et al.*, 2002 ; Barco *et al.*, 2005). En lien avec l'activité neuronale, la signalisation calcique en amont de ces voies est donc un important modulateur de l'expression des NTs (Finkbeiner, 2000) et il est admis que l'activité neuronale spontanée soit suffisante à l'expression basale des NTs *in vivo* (pour revue Leßmann, 1998). L'expression des NTs est naturellement induite en cas d'agression du SNC comme des lésions excitotoxiques (Burke *et al.*, 1994), le stress hypoxique (Sun *et al.*, 2008) ou ischémique (Zhao *et al.*, 2000)

Pour être relâchées dans le milieu extracellulaire, les NTs font l'objet de deux types de trafic intracellulaire : la voie de sécrétion constitutive et la voie de sécrétion régulée. L'étude de la localisation subcellulaire et du trafic des NTs (avec une étiquette GFP) dans des neurones hippocampiques montre que le BDNF et la NT3 sont empaquetés dans des vésicules de la voie de sécrétion contrôlée (98% et 83% des cellules, respectivement). En revanche, le NGF et la NT4 (55% et

75%, respectivement) sont principalement orientés vers la voie de sécrétion constitutive (Brigadski *et al.*, 2005).

1.3 Le transport des NTs

Les expériences d'injection intracérébrale de NTs radiomarquées ont mis en évidence un transport du NGF, du BDNF et de la NT-3 vers des structures particulières éloignées du site d'injection (pour revue, Mufson *et al.*, 1998). Par exemple, le NGF iodé injecté dans le cortex est transporté au noyau basal de Meynert. De même, injecté dans l'hippocampe, il est acheminé dans les structures afférentes de l'hippocampe (septum médian, noyau supra thalamique) pour y réguler la synthèse et l'activité de protéines telles que la ChAT (DiStefano *et al.*, 1992). Les animaux chez qui le NGF est neutralisé (souris AD11) présentent une dégénérescence des structures cholinergiques dans lesquelles le NGF est transporté (Ruberti *et al.*, 2000), ce qui a conduit à l'hypothèse d'un support trophique rétrograde du NGF *in vivo*. Ce mode d'action des NTs a été étudié *in vitro* grâce à l'utilisation des chambres compartimentées. Ce dispositif a permis de montrer i) la formation des endosomes de signalisation suite à l'ajout de ligand et ii) d'étudier l'importance de leur transport de la synapse au soma dans la promotion de la survie cellulaire. Le blocage pharmacologique des récepteurs aux NTs ou leur neutralisation par des anticorps, l'inhibition de l'endocytose dépendante des clathrines (par la monodansylcadaverine ou des dominants négatifs de la dynamine), l'inhibition du transport rétrograde (par l'expression de dominant négatif de la dynéine) inhibent l'effet pro-survie du BDNF ou du NGF appliqués à la terminaison axonale. De plus, la présence dans ces endosomes du récepteur Trk activé est requise: l'immobilisation du ligand (BDNF ou NGF), par sa liaison à des billes trop importantes pour être endocytées, entraîne l'internalisation des récepteurs non activés et ne permet pas de promouvoir la survie (Ye *et al.*, 2003 ; Heerssen *et al.*, 2004). Au niveau des dendrites, la co-localisation du BDNF avec la PSD95 est conforme avec l'idée de son relargage par le neurone post-synaptique (Brigadski *et al.*, 2005). Ainsi, la production hippocampique de BDNF promeut la survie des populations neuronales afférentes de l'hippocampe, dont les neurones sérotoninergiques, noradrénergiques du locus coeruleus, dopaminergiques de la substance noire et cholinergiques du septum médian (pour revue, Von Bohlen und Halbach, 2010).

Les NTs peuvent également faire l'objet d'un transport antérograde. L'expression de protéines de fusion GFP a permis de mieux comprendre ce mode d'action des NTs. Dans les neurones corticaux en culture injectés avec l'ADNc du BDNF-GFP (ou NGF-GFP), la majorité du BDNF synthétisé (71%) -mais pas du NGF (29%)- est contenue dans des vésicules transportées majoritairement (60%) du soma vers les dendrites et l'axone (Adachi *et al.*, 2005). Depuis la terminaison axonale présynaptique, la fluorescence est transférée au neurone postsynaptique puis retrouvée à son soma. Le blocage de l'activité électrique spontanée (par la TTX) prévient ce transfert, tandis que l'inhibition des courants GABA_A par la picrotoxine l'augmente, suggérant un mécanisme de relargage activité-dépendant (Kohara *et al.*, 2001). Tout comme le BDNF, la NT-3 peut également faire l'objet d'un transport antérograde et d'une sécrétion activité-dépendante requérant le métabolisme calcique (mobilisation des stocks intracellulaires de calcium, activation de la CAMK) et la machinerie de fusion membranaire t-SNARES (Wang *et al.*, 2002). *In vivo*, la présence de BDNF a été détectée dans le

striatum alors que l'ARNm du BDNF est absent de cette structure. En revanche, le BDNF est exprimé par les structures afférentes du striatum : l'injection *icv* de colchicine (ou la déafférentation par la lésion du cortex) diminue considérablement l'immunoréactivité du BDNF dans le striatum et l'augmente au niveau cortical. Cet exemple met en évidence le transport antérograde du BDNF du néocortex au striatum, dans lequel il assure le maintien en vie des interneurons GABAergiques par l'expression de la parvalbumine (Altar *et al.*, 1997). De même, le BDNF est transporté de manière antérograde *via* la voie perforante, du cortex entorhinal vers le gyrus denté de l'hippocampe (Yan *et al.*, 1997), dans lequel il va moduler l'excitabilité neuronale dans l'hippocampe (Olofsson *et al.*, 2000). Enfin, les NTs agissent aussi de manière autocrine ou paracrine dans la mesure où certaines structures expriment à la fois les NTs et leurs récepteurs. Ceci est par exemple le cas pour les cellules du gyrus denté exprimant le BDNF et le TrkB, mais aussi le NGF et le TrkA chez le rongeur (Schmidt-Kastner *et al.*, 1996) et le primate (Zhang *et al.*, 2007).

Ainsi, grâce aux différents types de transport, les différentes NTs synthétisées dans une structure donnée participent donc au maintien et à l'activité des structures afférentes ou efférentes (Tableau 6, Schindowski *et al.*, 2008).

Neurotrophin	Site of synthesis	Transported to (neuronal population)	Transport	Function
NGF	Neocortex Hippocampus	ChAT-positive neurons of the nbM ChAT-positive neurons of the MS, VDB, HDB and sum	Retrograde	Survival and maintenance of cholinergic, sensory and sympathetic neurons
BDNF	Frontal cortex	Parietal, cingulate, infralimbic, orbital, perilimbic and occipital cortices, contralateral frontal cortex, nbM, hypothalamus, locus coeruleus, thalamus and HDB	Retrograde	Survival and maintenance (of dopaminergic neurons), synaptic plasticity (long-term potentiation, neuronal firing rate, neurotransmitter release and synaptic transmission) and metabolic effects
	Occipital cortex	Retrosplenial, perirhinal, temporal, entorhinal and frontal cortices, Raphe nucleus, VDB (HDB), thalamus, lateral geniculate nucleus and hypothalamus		
	Hippocampus	Ipsi- and contralateral subfields of hippocampus, MS, sum and VDB (HDB)		
	Entorhinal cortex	Subiculum, CA1 and CA3 hippocampal subfields, amygdala, MS and VDB		
	Amygdala	Temporal, parietal and occipital, entorhinal, cingulate, infralimbic, insular piriform and perirhinal cortices, thalamus, dorsal Raphe, (pre)subiculum and CA1 subfields of hippocampus, medulla, HDB, hypothalamus, nbM and substantia nigra pars compacta		
	Striatum	Frontoparietal cortex, TH-positive neurons of the substantia nigra, Raphe and thalamus		
	Amygdala Neocortex Dentate gyrus	Stria terminalis Striatum CA3 subfield of hippocampus (through mossy fibers)	Anterograde	
NT-3	Pons	Amygdala		
	Hippocampus	MS, VDB, thalamus and sum of hypothalamus	Retrograde	Survival and maintenance

HDB, horizontal limb of diagonal band of Broca; MS, medial septum; sum, supramammillary nucleus; TH, tyrosine hydroxylase; VDB, vertical limb of diagonal band of Broca.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des principaux lieux de synthèse des NTs, des modes de transport et des cibles vers lesquelles elles sont acheminées (d'après Schindowski *et al.*, 2008).

1.4 Les effets et fonctions des NTs

Outre un effet pro-survie sur diverses populations neuronales, les NTs modulent l'activité synaptique. L'application de BDNF sur des neurones en culture embryonnaire potentialise la libération des vésicules de glutamate ou des neurotransmetteurs (Leßmann *et al.*, 1994, Takei *et al.*, 1997). L'application de BDNF ou de NT4 (mais pas de NGF ou de NT3) sur des tranches d'hippocampe induit une dépolarisation des neurones du CA1 et abaisse le seuil d'excitabilité neuronale. Cet effet est rapide (de l'ordre de la milliseconde), porté par des flux sodiques entrants et aboli par l'inhibiteur K252a du TrkB. Ainsi, l'activité kinase du TrkB est nécessaire aux modifications de conductance membranaire (Kafitz *et al.*, 1999). L'incubation de neurones primaires d'hippocampe avec la NT4 et le BDNF, mais pas la NT3 ou le NGF, potentialise l'amplitude des PPSE spontanés, suggérant également un rôle spécifique de TrkB dans ce phénomène (Levine *et al.*, 1996). De même, le BDNF potentialise la composante NMDA (mais pas AMPA) de la réponse au glutamate sur des cultures de cellules hippocampiques (Levine *et al.*, 1998). L'incubation de BDNF (2ng/mL), mais pas de NGF (ou la NT3), avec des densités postsynaptiques issues d'hippocampe ou de cortex induit la phosphorylation des sous-unités NMDA NR1 et NR2B, mais pas NR2A (Lin *et al.*, 1998). La phosphorylation des sous-unités NR2B permet leur interaction avec la PSD95 et leur stabilisation à la synapse (Lavezzari *et al.*, 2003). L'ensemble de ces modulations de l'activité synaptique implique donc le BDNF dans l'induction et le maintien de la LTP : tandis que la phosphorylation de NR2B est associée à l'induction de la LTP hippocampique *in vivo* (Rosenblum *et al.*, 1996), l'inactivation constitutive (Korte *et al.*, 1996) ou conditionnelle du gène du BDNF (Rauskolb *et al.*, 2010) prévient l'induction de la LTP et est réversible par l'ajout exogène de BDNF (Patterson *et al.*, 1996). Les animaux hétérozygotes pour l'inactivation du BDNF présentent une diminution de la LTP en absence de déficits de mémoire spatiale (Montkowski & Holsboer, 1997). En revanche, l'excision du gène du BDNF dans l'hippocampe induit des troubles sélectifs de l'apprentissage des tâches hippocampo-dépendantes (Heldt *et al.*, 2007). *In vivo*, l'expression d'un dominant actif de CREB -induisant une surexpression du BDNF endogène-favorise la LTP, l'apprentissage et la consolidation de la mémoire. Bien que CREB puisse favoriser les processus d'apprentissage, la neutralisation du BDNF ou du TrkB prévient les bénéfices de la sur-activation de CREB (Suzuki *et al.*, 2011). Si la LTP en elle-même favorise la croissance de nouveaux boutons postsynaptiques se branchant sur l'élément présynaptique dans l'hippocampe (Toni *et al.*, 1999), l'activation du TrkB stimule aussi la croissance dendritique dans le CA1 (Tyler & Pozzo-Miller, 2003) et participe au maintien et au contrôle de la forme des épines dendritiques (Von Bohlen und Halbach *et al.*, 2008).

L'exocytose activité-dépendante des NTs et leurs effets sur l'activité synaptique étant (sur le principe) proche de celui des neurotransmetteurs, il a été suggéré que les NTs puissent agir comme telles. Toutefois, la vitesse d'exocytose d'une vésicule de NTs est dix fois inférieure à celle d'une vésicule de neurotransmetteur (Brigadski *et al.*, 2005), ce qui suggère que le mode d'action des NTs sur la plasticité synaptique n'est pas identique à celui d'un neurotransmetteur et qu'il existe d'autres mécanismes de modulation de l'activité synaptique. Par exemple, les effets de l'application de BDNF sur la LTP perdurent après son retrait (Kafitz *et al.*, 1999). De plus, les changements morphologiques des épines dendritiques induits par le BDNF sont bloqués par l'anisomycine, indiquant la nécessité de la synthèse *de novo* de protéines dans les effets du BDNF (Tanaka *et al.*, 2008). La délétion du gène du BDNF induit des déficits du stock de vésicules synaptiques rapidement mobilisables et de leur

accrétion en lien avec une diminution de l'expression des t-SNAREs (synaptobrevine et synaptophysine). Ces déficits sont compensables par l'addition de BDNF (Pozzo-Miller *et al.*, 1999). En effet, le BDNF induit la transcription de gènes directement impliqués dans la fonction synaptique. Le traitement des neurones corticaux par le BDNF augmente l'expression de protéines synaptiques à domaine PDZ (dont PSD95) et des récepteurs AMPA GluR1 et GluR2 (Jourdi *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données implique le BDNF dans la modulation de l'activité synaptique et dans la plasticité neuronale nécessaire aux processus d'apprentissage.

Si l'ajout de NGF ne semble pas induire les mêmes modifications électrophysiologiques que le BDNF *in vitro* (Levine *et al.*, 1996, 1998 ; Kafitz *et al.*, 1999), son importance dans la survie neuronale et les mécanismes liés à la plasticité et à la mémoire a été mise en évidence *in vivo*. La neutralisation du NGF endogène par l'expression postnatale d'anticorps anti-NGF (souris AD11) induit un retard de croissance, une dystrophie musculaire et une dégénérescence de la plupart des neurones cholinergiques du cortex frontal (-55%) et de l'hippocampe chez l'animal âgé de 2 mois (Ruberti *et al.*, 2000). Les souris AD11 présentent également des troubles de mémoire spatiale prévenus par l'administration intranasale de NGF (De Rosa *et al.*, 2005). Chez le rat, l'infusion de NGF dans le septum favorise le phénotype cholinergique des neurones dans cette structure et facilite la LTP hippocampique. Inversement, l'injection d'anticorps anti-NGF dans le septum inhibe la LTP hippocampique et provoque des déficits de mémoire (Conner *et al.*, 2009). Ces données sont en accord avec de plus anciennes observations, impliquant l'acétylcholine d'origine septale dans le maintien de l'expression des NTs hippocampiques chez l'adulte (Da Penha Berzagui *et al.*, 1993). En conséquence, le NGF favorise indirectement la transmission synaptique dans l'hippocampe par le maintien des neurones cholinergiques.

1.5 Les récepteurs des NTs : les Trk et p75

Le transport des NTs et l'accomplissement de leur fonction nécessitent l'expression de récepteurs membranaires. Les NTs agissent sur leur(s) récepteur(s) sous forme d'homodimères non covalents. Deux types de récepteurs sont impliqués : le récepteur p75NTR (*p75 NT Receptor*) et les récepteurs Trk (*Tyrosine Receptor Kinase*, anciennement *Tropomyosin Related Kinase*) qui sont des protéines transmembranaires de type I. Pour être fonctionnels, ces récepteurs doivent se dimériser. Selon l'état de maturation (pro-NT ou forme mature) et les quantités de NTs, les récepteurs sollicités sont différents et les voies de signalisation induites se diversifient en conséquence.

1.5.1 Les Trk

Les différents Trk présentent 87% d'homologie dans leur séquence protéique et les différences concernent principalement leur segment extracellulaire. Chaque Trk lie de manière préférentielle une NT sous forme mature avec une forte affinité ($K_d=10^{-11}$): le TrkA lie le NGF, le TrkC lie la NT-3, le TrkB lie le BDNF et la NT-4/5. Il a été rapporté que des fortes concentrations de NTs peuvent activer de manière non spécifique les Trk : ainsi la NT-4/5 peut activer le TrkA, et la NT-3 peut activer les TrkA et TrkB (Schindowski *et al.*, 2008).

Le TrkA (Ye *et al.*, 2003) et le TrkB (Drake *et al.*, 1999) sont localisés aux synapses mais également au niveau du soma et du segment proximal de l'axone. La localisation membranaire des Trk est stimulée par l'activité cellulaire mais aussi par leur ligand : ainsi le NGF augmente la quantité de TrkA (Ascaño *et al.*, 2009), et le BDNF augmente les quantités de TrkB à la membrane synaptique, en favorisant la fusion des vésicules stockées aux terminaisons (Haapasalo *et al.*, 2002). Les Trk peuvent aussi être exprimés par les oligodendrocytes (pour revue Diarra *et al.*, 2009) et les astrocytes activés (GFAP immunoréactifs), comme c'est le cas dans la MA (pour revue Siegel & Chauhan, 2000; Connor *et al.*, 1996).

La fixation du ligand induit l'homodimérisation du récepteur et la transphosphorylation mutuelle des résidus tyrosine portés par chaque sous-unité pour induire les signalisations (Kaplan *et al.*, 1991). Les motifs phosphorylés des Trk servent de sites de recrutement à des partenaires cytosoliques dont les principaux sont la PLC et la protéine Shc. Les partenaires et les voies de signalisation induites n'ont pas tous la même importance (figure 10).

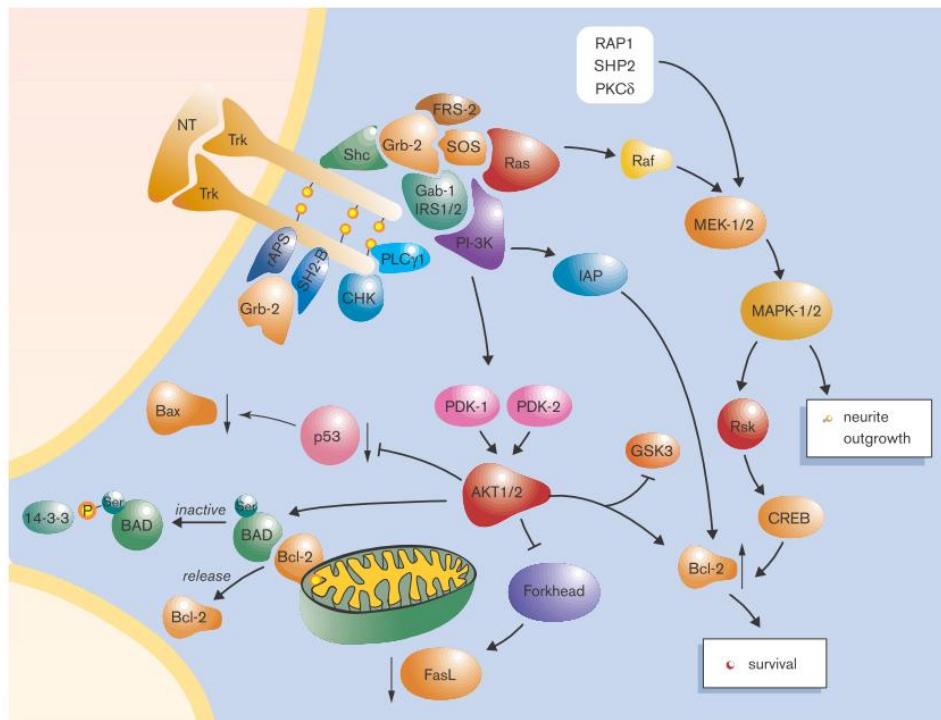


Figure 10 : Les voies de signalisation induites par la fixation des NTs sur les Trks (d'après Kaplan & Miller, 2000).

L'étude par mutagenèse des domaines intracellulaires requis pour les effets des NTs a déterminé que seul le recrutement de Shc (induisant les voies PI3K/Akt et Ras/Raf/Erk1/2) semble

nécessaire aux effets pro-survie des NTs et à la croissance axonale. La PLC ne serait que minoritairement impliquée dans la survie et non-requise à la croissance. L'analyse de la contribution des différentes voies de signalisation des NTs (avec des inhibiteurs de PI3K ou MEK) a déterminé que les activations de PI3K et d'ERK sont nécessaires à la croissance axonale et à la survie neuronale induites par le BDNF et le NGF. Cependant, seule l'activation de la PI3K est indispensable à l'effet pro-survie du NGF *via* le TrkA, tandis que le même effet du BDNF *via* le TrkB requiert la co-activation de PI3K et d'ERK (Atwal *et al.*, 2000). Cette différence peut s'expliquer par le fait que l'activation de la PI3K induite *via* le TrkA soit plus durable que celle induite *via* le TrkB : un motif intracellulaire sur le TrkA favorise son recyclage et diminue sa dégradation par rapport au TrkB (Chen *et al.*, 2005). L'activation d'Akt par les Trk inhibe l'apoptose par la phosphorylation de Bad et en prévenant l'activation de la caspase 9. La stimulation de la PI3K par le BDNF a également été impliquée dans la régulation de l'activité de la GSK3 β (Mai *et al.*, 2002) et la déphosphorylation de Tau (Elliott *et al.*, 2005).

Les voies PI3K/Akt et Ras/RAF/MEK/ERK sont impliquées dans l'activité neuroprotectrice des NTs contre l'excitotoxicité (Burke *et al.*, 1994) et le stress oxydant (Dugan *et al.*, 1997). La formation d'endosomes de signalisation suite à la fixation du ligand permet d'activer localement la voie ERK à la synapse, mais aussi lors du transport rétrograde (pour revue, Zweifel *et al.*, 2005). L'activation de la voie Ras/Raf/ERK favorise la survie cellulaire en activant le facteur de transcription CREB (pour revue, Kaplan & Miller, 2000). Si la PLC ne semble pas indispensable à la survie ou la croissance induite par les NTs (Atwal *et al.*, 2000), son activation préférentielle *via* le TrkB induit la formation d'IP3 (dont le rôle est de mobiliser le relargage de calcium à partir du réticulum) pour contribuer à l'installation de la LTP (pour revue, Rose *et al.*, 2004).

1.5.2 Le récepteur p75

Le récepteur p75 (ou TNFR2) appartient à la superfamille du récepteur au TNF α . Sous forme homodimérique, il lie l'ensemble des pro-NTs sans distinction et avec une forte affinité ($K_d=10^{-11}$). La liaison des pro-NTs sur p75 se fait par leur prodomaine et implique une interaction entre p75 et la sortiline (Feng *et al.*, 2010).

Les effets de l'activation de p75 sont variés et dépendent à la fois de ses partenaires membranaires et des protéines interagissant au niveau intracellulaire. Malgré l'absence d'activité catalytique intrinsèque, p75 peut induire l'apoptose dans de nombreux types cellulaires *in vivo* et *in vitro*, dont les oligodendrocytes et les neurones corticaux, hippocampiques et cholinergiques dans le SNC (pour une revue exhaustive, Roux & Barker, 2002). p75 peut également lier les NTs avec une faible affinité et induire l'apoptose de cellules hippocampiques *in vitro* (Friedman, 2000). Il a également été proposé que p75 constitue un relai en fixant la NT et en la « présentant » au Trk (« *ligand-passing-model* », Chao & Bothwell, 2002). Selon son environnement, p75 peut donc avoir différentes activités conférées par ses partenaires cytosoliques (Figure 11).

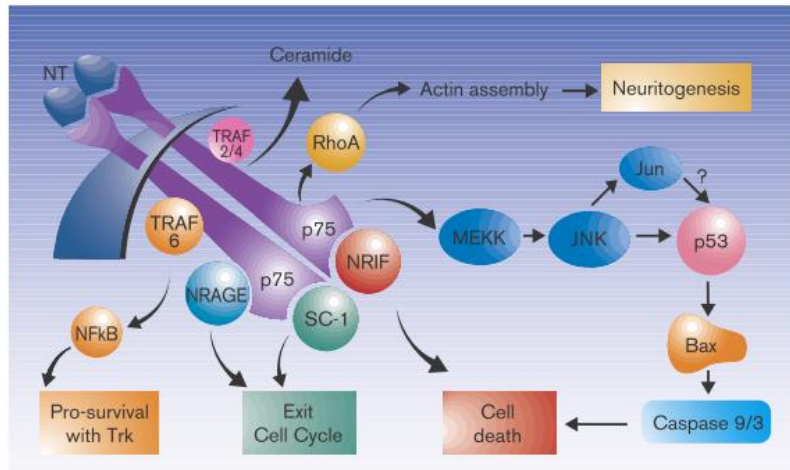


Figure 11: Les partenaires cytosoliques de p75 (d'après Kaplan & Miller, 2000).

Classiquement, l'interaction du domaine intracellulaire « *Death Domain* » de p75 avec ses partenaires cytosoliques aboutit à l'activation de la kinase JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), des caspases (3, 6 et 9) et des sphingomyélinases pour contribuer à la mort cellulaire (pour revues, Costantini *et al.*, 2005a ; Diarra *et al.*, 2009). Nous ne détaillerons pas tous les partenaires moléculaires de p75, mais certains méritent d'être cités (pour revue, Roux & Barker, 2002 ; Costantini *et al.*, 2006). **La GTPase RhoA** est impliquée dans la morphogénèse neuronale, et son activation aboutit à celle de ROCK (*Rho associated coiled-coil containing Kinase*) régulant la dépolymérisation de l'actine. Cette activité influe directement sur la rétraction des dendrites et de l'axone et la guidance axonale par le cône de croissance (pour revue Luo, 2002). À ce titre, p75 vient aussi d'être impliquée dans l'élimination des prolongements les moins actifs pour déterminer l'identité de l'axone principal dans la croissance des neurones de la rétine (Singh *et al.*, 2008). **Les protéines TRAF** sont des molécules adaptatrices qui couplent l'activité de p75 à celle de JNK et de NFkB, induisant ou prévenant respectivement la mort cellulaire. Dans ce cas, l'orientation de l'activité de p75 vers une activité pro-apoptotique est induite par le clivage de p75 par la γ -sécrétase en présence du facteur NRIF (pour revue Blöchl & Blöchl, 2007). **La protéine NRAGE** est un facteur nécessaire à l'apoptose induite *via* p75. NRAGE occupe le site de p75 permettant son interaction avec les Trks (TrkA notamment). Malgré l'apparente compétition entre NRAGE et les Trks, p75 se lie préférentiellement aux Trks lorsqu'ils sont exprimés dans la même cellule (Yoon *et al.*, 1998 ; Friedman, 2000). Ainsi, dans le cas de la coexpression des Trks avec p75, p75 peut interagir avec le TrkA (Esposito *et al.*, 2001) et le TrkB (Bibel *et al.*, 1999). Il en résulte la formation d'un site de meilleure affinité pour le NGF ou le BDNF, une augmentation de l'autophosphorylation et un renforcement de la signalisation des Trks. L'inhibition du TrkB dans un système coexprimant TrkB et p75 n'inhibe pas l'activation de NFkB, ce qui suggère que l'activation de NFkB est portée par p75 dans le cas d'une coexpression Trk-p75 (Burke & Bothwell, 2003).

Dans des conditions non-pathologiques, la signalisation des Trks module l'activité de p75. Avec l'exemple du NGF, il a été proposé que la survie cellulaire dépende d'une compétition entre les signalisations induites par les Trks et p75 : l'activation d'ERK *via* le TrkA inhibe la JNK activée par p75 pour promouvoir la survie cellulaire *in vitro* (Yoon *et al.*, 1998). Une particularité du système des NTs est que les pro-NTs ont une activité biologique et leur interaction avec p75 est pro-apoptotique (Nykjaer *et al.*, 2004 ; Teng *et al.*, 2005). Ces propriétés antagonistes entre les NTs et leurs propeptides impliquent cette famille dans l'architecture des réseaux neuronaux lors du développement et la régulation de la taille des populations neuronales (pour revue Davies, 2003). L'expression neuronale de p75 peut aussi être augmentée suite à des dommages axonaux (Bussmann & Sofroniew, 1999), suggérant son implication dans l'élimination des cellules endommagées.

2. Les NTs dans la Maladie d'Alzheimer

2.1 L'expression des NTs dans la MA.

2.1.1 Le BDNF

Les études post-mortem de cerveaux de patients indiquent que les niveaux de l'ARNm (Phillips *et al.*, 1991 ; Holsinger *et al.*, 2000) et de la protéine BDNF sont réduits dans l'hippocampe et le cortex temporal (Connor *et al.*, 1997), ainsi qu'au niveau pariétal (Peng *et al.*, 2005). Chez les patients, la diminution de l'expression de BDNF dans le cortex temporal est corrélée avec la diminution de l'immunoréactivité de la synaptophysine et l'extension des plaques neuritiques (Lee *et al.*, 2005). De plus, la présence de DNF est inversement corrélée avec la présence de BDNF intraneuronale (Murer *et al.*, 1999). La technique de dosage par ELISA a permis de confirmer cette diminution significative de BDNF dans l'hippocampe (Hock *et al.*, 2000). Le suivi longitudinal des taux de BDNF dans le LCR de patients MA a été réalisé pour étudier l'évolution des taux de BDNF en relation avec le statut cognitif de différentes cohortes. Li *et al.* ont donc confirmé que de faibles taux de BDNF dans le LCR sont associés à la cognition, mais aussi prédictifs d'un déclin cognitif plus important (Li *et al.*, 2009). Cette diminution du BDNF dans la MA semble être tardive car de nombreux travaux suggèrent que l'expression du BDNF n'est pas diminuée (Akatsu *et al.*, 2006 ; O'Bryant *et al.*, 2009) et peut être même augmentée dans les phases précoces de la maladie (Durany *et al.*, 2000). D'autres travaux, réalisés sur des patients en vie, montrent une augmentation transitoire du BDNF plasmatique au début de la maladie pour ensuite chuter dans les stades tardifs (Laske *et al.*, 2006, 2007). Les auteurs de ces travaux suggèrent que l'augmentation transitoire de BDNF est compensatoire dans les premiers stades de la MA. Ces données suggèrent néanmoins que la perte finale de l'expression du BDNF est une conséquence de la MA qui induit une perte des fonctions du BDNF évoquées précédemment, notamment dans la promotion de la survie cellulaire et le support de l'activité synaptique en relation avec les processus d'apprentissage et de mémorisation.

La diminution de BDNF dans la MA peut avoir plusieurs origines. D'une part, la diminution du BDNF dans le tissu cérébral chez l'Homme peut être une conséquence du vieillissement (Ziegenhorn

et al., 2007 ; Von Bohlen und Halbach, 2010), bien qu'elle soit plus diminuée chez les patients MA (Hock *et al.*, 2000). D'autre part, la diminution de la phosphorylation de CREB observée dans l'hippocampe de patients (Yamamoto-Sasaki *et al.*, 1999) pourrait expliquer la perte de l'expression du BDNF. *In vitro*, l'incubation des cellules HEK avec l'A β^{1-42} soluble prévient l'activation de CREB par le NMDA (Tong *et al.*, 2001). Des doses sublétales d'A β^{1-42} diminuent la transcription du gène du BDNF dans des cultures neuronales (Garzon & Fahnstock, 2007). De plus, la plasmine, l'enzyme de maturation des NTs, est diminuée dans le cortex et l'hippocampe des patients MA (Ledesma *et al.*, 2000). Bien qu'il n'ait pas été montré une accumulation du pro-BDNF en association avec la MA, la séquence activation de la plasmine/clivage du pro-BDNF/formation de BDNF est essentielle à l'induction et au maintien de la LTP *in vitro* et *in vivo* (Pang *et al.*, 2004). Il vient d'être montré que de faibles doses -200nM- d'A β^{1-42} soluble prévenaient la conversion du pro-BDNF en BDNF en association avec un déficit de localisation synaptique des sous-unités des récepteurs AMPA GluR1 et GluR4 et l'abolition de l'acquisition d'un conditionnement classique (Zheng *et al.*, 2010). Toutefois, le modèle électrophysiologique ayant servi pour réaliser cette étude étant issue d'un saurien, les extensions aux mammifères restent soumises à réserve. Enfin, il a été montré *in vitro* sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris Tg2576, que l'A β^{1-42} induisait des troubles du transport rétrograde des endosomes de signalisation contenant le TrkB activé par le BDNF et prévenait l'induction de la signalisation en aval (Poon *et al.*, 2009). Or, le facteur CREB est aussi activé par le BDNF, suggérant que le BDNF pourrait induire sa propre expression. Les déficits de transport et de signalisation induits par l'A β contribuent probablement à la diminution d'expression du BDNF dans la MA.

2.1.2 Le NGF

Contrairement au BDNF, les taux de l'ARNm du NGF sont inchangés dans le cortex et l'hippocampe et ceux de la protéine sont même augmentés dans le cortex temporal et dans le cortex frontal des patients MA (Hellweg *et al.*, 1998 ; Hock *et al.*, 2000). Toutefois, chez les sujets sains dont le cortex frontal présente des plaques, les niveaux de NGF sont deux fois moins importants que chez les sujets dont le cortex ne présente pas de plaque. La diminution des niveaux de NGF est corrélée à une diminution de l'activité de la ChAT dans les structures concernées (Hellweg *et al.*, 1998). Cette diminution précoce de NGF a été également rapportée dans le sérum des patients MCI en comparaison à des patients contrôles ou MA, et suggère donc qu'une diminution de l'expression de NGF est un évènement précoce (Schaub *et al.*, 2002). Dans le cortex pariétal des patients, les taux accrus de la protéine NGF ne reflètent pas les taux stables d'ARNm (Fahnstock *et al.*, 1996), ce qui suggère que les variations de protéines observées chez les patients ne reflètent pas nécessairement des modifications d'expression. Toutefois, les tests ELISA utilisés ne permettraient pas la distinction entre les pro-NTs et les NTs. Afin d'éclaircir ce point, Fahnstock *et al.* ont déterminé par immunoblot que le pro-NGF représente la majeure partie du NGF cérébral et ont confirmé que celui-ci est augmenté chez les patients MA, tandis que les NTs matures restent difficiles à détecter (Fahnstock *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2005).

Contrairement au cortex et à l'hippocampe, l'immunoréactivité de la protéine NGF est réduite dans le noyau basal de Meynert (Mufson *et al.*, 1995) suggérant un déficit de transport du cortex vers le noyau basal dans la MA. La similitude des atteintes cholinergiques entre les souris AD11, chez qui le NGF est indisponible, (Ruberti *et al.*, 2000) et les atteintes cholinergiques chez les patients MA (Mufson *et al.*, 2003) présentant de forts taux de pro-NGF, suggère qu'une modification de la biodisponibilité du NGF pourrait participer à cette dégénérescence. Un déficit de maturation du NGF pourrait être à l'origine de cette modification : la plasmine clive le pro-NGF en NGF (Lee *et al.*, 2001) et ses quantités sont diminuées chez les patients MA (Ledesma *et al.*, 2000). Conjointement, la perte sélective de l'expression du TrkA dans les neurones cholinergiques du septum et du noyau basal peut aussi contribuer à l'accumulation de NGF dans les structures dans lesquelles il est produit (cortex et hippocampe principalement), (Mufson *et al.*, 2003). Enfin, les déficits de transport rétrograde dans la MA évoqués dans le cas du BDNF (Peng *et al.*, 2009) ont aussi un impact sur l'accumulation du NGF à ses sites de synthèse. Des approches *in vitro* ont déterminé que le pro-NGF est plus toxique sur des préparations de ganglions cervicaux supérieurs issus d'animaux vieux par rapport aux animaux jeunes (Al Shawi *et al.*, 2008). Bien qu'il soit certain que la perte du rôle de soutien du NGF participe à la perte des neurones cholinergiques dans la MA, les mécanismes à l'origine de la vulnérabilité de ces cellules restent à déterminer.

2.2 Les récepteurs des NTs et la balance p75/Trk

Outre les altérations de l'expression des ligands, l'expression des récepteurs aux NTs est aussi modifiée. D'anciens travaux relatent la localisation du TrkA et du TrkB au niveau des dépôts amyloïdes et dans les cellules gliales de l'hippocampe de patients MA, suggérant que ceux-ci piègent les NTs circulantes et participent à leur déprivation (Connor *et al.*, 1996). En revanche, l'expression des récepteurs aux NTs chute drastiquement dans les neurones. La diminution neuronale des TrkA, B et C dans le noyau basal de Meynert, contenant des noyaux cholinergiques touchés dans la MA, est corrélée avec le degré d'atteinte cognitive (Ginsberg *et al.*, 2006). Le TrkA est également réduit dans le cortex frontal des patients dès le stade MCI (Counts *et al.*, 2004). L'expression du TrkB est réduite dans le cortex frontal et temporal des patients (Allen *et al.*, 1999), ainsi que dans les neurones portant les DNF (Ferrer *et al.*, 1999). Chez les rats âgés, Croll *et al.* ont démontré que la diminution de l'expression de la protéine TrkB dans l'hippocampe était corrélée avec le déclin cognitif (Croll *et al.*, 1998). Par rapport à la perte cholinergique dans la MA, il apparaît cependant que l'évènement le plus précoce soit la perte de l'expression du TrkA (Counts & Mufson, 2005).

Dans toutes les structures, l'expression de p75 est maintenue (Counts *et al.*, 2004 ; Ginsberg *et al.*, 2006). Il apparaît alors une importante modification du ratio Trk/p75 dans la MA qui favoriserait l'activation de p75. Même si l'augmentation de l'expression de p75 sur les neurones hippocampiques des patients est liée à la présence de DNF intraneuronales (Hu *et al.*, 2002), nous avons précédemment évoqué qu'elle puisse aussi découler de l'atteinte de l'intégrité membranaire (Bussmann & Sofroniew, 1999). La dérégulation du système p75/Trk dans la MA a des conséquences sur la mort et la survie cellulaire, l'activité neuronale et les troubles cognitifs, mais également sur la production d'amyloïde et la phosphorylation de Tau.

2.2.1 Impact sur la mort cellulaire.

L'altération de la balance Trk/p75 dans la MA favorise l'apoptose induite par p75. Nous avons précédemment évoqué un déficit de la maturation des NTs dans la MA du fait de la diminution de la plasmine (Ledesma *et al.*, 2000). Or, les pro-NTs sont proapoptotiques *via* p75. La sortiline est un corécepteur de p75 nécessaire à l'apoptose induite par le pro-NGF (Nykjaer *et al.*, 2004) et le pro-BDNF (Teng *et al.*, 2005) *in vitro*. Chez l'Homme, l'expression de la sortiline est maintenue dans la MA, amenant à l'idée que la perte des Trks associée à l'augmentation (ou le maintien) de p75 favorise l'association du pro-NGF avec le dimère p75-sortiline chez les patients MA (Mufson *et al.*, 2010). Les pro-NTs, et notamment le pro-NGF, ont été incriminées comme participant à la perte cholinergique dans la MA par différents mécanismes. *In vitro*, le traitement de cellules en culture (3T3 exprimant p75 en absence des Trk) avec du pro-NGF issu de cerveau de patients MA (mais pas de sujets sains) provoque l'apoptose par l'activation de p75 suite à son clivage par la γ -sécrétase et la translocation au noyau de son fragment intracellulaire (Podlesniy *et al.*, 2006). Volosin *et al.* ont confirmé *in vivo* que l'apoptose induite par la production massive de pro-NGF (par l'induction d'épisodes épileptiques avec du kainate) dans les neurones cholinergiques exprimant p75 impliquait la phosphorylation de JNK et le clivage des caspases 3 et 6 (Volosin *et al.*, 2006). Cette observation suggère que le pro-NGF endogène peut atteindre des quantités significativement apoptogènes, même s'il n'est pas possible d'écarter dans cette étude un effet du traitement pharmacologique pour obtenir un statut épileptique. La toxicité du pro-NGF vient d'être confirmée dans un modèle non-pathologique. L'injection intrahippocampique de pro-NGF chez le rat âgé induit une dégénérescence des noyaux cholinergiques, une augmentation de p75 mais aussi une diminution de l'expression de TrkA (Fortress *et al.*, 2011). Ces travaux sont les premiers à apporter des arguments tendant à montrer que l'augmentation de l'expression de p75 et la perte du TrkA des neurones cholinergiques dans la MA impliqueraient une accumulation de pro-NGF en lien avec un clivage atténué du NGF.

2.2.2 Effet sur la survie cellulaire.

L'altération de la balance Trk/p75 dans le cadre de la MA altère aussi la signalisation pro-survie issue des Trks. **Premièrement**, l'effet pro-apoptotique du pro-NGF *via* p75 requiert l'activation de PTEN qui inhibe alors la voie PI3K/Akt initiée *via* TrkB (Song *et al.*, 2010). *In vivo*, le blocage pharmacologique de PTEN, ou son extinction par des siRNA, prévient l'apoptose induite *via* p75 suite à l'injection de pro-NGF dans l'hippocampe (Song *et al.*, 2010). A l'inverse, l'activation de PTEN prévient la régénération axonale par la PI3K et la formation de synapses fonctionnelles (Liu *et al.*, 2010b). Une telle activation de PTEN dans la MA pourrait prévenir la récupération des neurones endommagés. Chez les patients MCI, PTEN est colocalisée (90%) avec les DNF dans le cortex entorhinal et l'hippocampe (Sonoda *et al.*, 2010). Ainsi, *via* PTEN, l'activité de p75 pourrait aussi participer à la perturbation du cytosquelette neuronal aboutissant aux troubles de transport axonaux dans la MA. Cependant, il reste à déterminer l'importance de l'activation de PTEN dans la MA par

rapport à la phosphorylation de Tau: si PTEN peut indirectement induire la phosphorylation de Tau en activant la GSK3 β , cette phosphatase peut aussi en diminuer la phosphorylation en inhibant Erk.

Deuxièmement, l'activation de p75 supprime l'activation de la voie ERK initiée par le TrkA (Singh *et al.*, 2008). *In vitro* sur des cultures primaires de neurones du septum, l'activation des récepteurs TrkA, TrkB (et TrkC) par la préincubation avec leurs ligands respectifs ne permettent pas de protéger contre l'apoptose induite par le pro-NGF ou le pro-BDNF *in vitro*. Seule la préactivation de la PI3K (par la transfection d'un dominant positif de Ras) semble capable de prévenir partiellement l'activation des caspases 3 et 6, ainsi que la phosphorylation de JNK (Volosin *et al.*, 2006). Il semble donc que dans la MA, l'activité de p75 prime sur celle des Trk bien que la stimulation de la voie PI3K semble avoir des propriétés protectrices préventives.

2.2.3 Effets sur la production d'A β .

La balance p75/Trk est modifiée dans le vieillissement et favorise la production d'A β . Chez l'animal, la diminution de l'expression de TrkA lors du vieillissement favorise l'activité de p75, la production de céramides par l'activation de la sphingomyélinase neutre et la formation d'A β soluble (Costantini *et al.*, 2005b ; 2006). En parallèle, il a été montré *in vitro* (sur des cellules PC12 différenciées), que la déprivation en NGF, ou le blocage du TrkA, favorisait la production d'A β et la mort cellulaire (Matrone *et al.*, 2008). *In vivo*, le cerveau des souris AD11 (chez qui le NGF est neutralisé) présente des enchevêtrements de protéine Tau hyperphosphorylée et des plaques amyloïdes (Capsoni *et al.*, 2000, 2002). La délétion de p75 chez des souris APP23 de 24 mois diminue drastiquement la production d'amyloïde dans l'hippocampe et le cortex entorhinal, ainsi que les troubles cognitifs (He *et al.*, 2007). Toutefois, dans l'apoptose induite par la déprivation en NGF, l'inhibition des caspases par le ZVAD prévient la mort cellulaire mais n'a aucun effet sur la production excessive d'A β , tandis que l'inhibition des caspases 6/8 ou l'extinction de l'expression de l'APP préviennent la mort cellulaire et la production d'A β (Matrone *et al.*, 2008). Au final, les mécanismes moléculaires liant la déprivation en NGF, la production d'A β et l'apoptose APP-dépendante restent à identifier plus précisément dans la MA.

2.2.4 Effet sur la toxicité de l'A β .

p75 peut servir de récepteur à l'A β ¹⁻⁴² pour induire la mort cellulaire *in vivo* et *in vitro*. *In vitro*, le traitement de cellules SHSY5Y avec de l'A β induit l'expression de p75 et diminue celle de TrkA par l'induction d'un stress oxydant (Olivieri *et al.*, 2002). *In vivo*, l'injection intra-hippocampique d'A β ¹⁻⁴² soluble (environ 125 pmol) conduit à une diminution de l'expression de la ChAT détectable pendant au minimum 14 jours dans les projections septo-hippocampiques chez les souris sauvages. En revanche les souris déficientes en p75 sont protégées, suggérant que p75 soit un récepteur de l'A β (Sotthibundhu *et al.*, 2008). Il a été proposé que l'activité pro-apoptotique de p75 s'accompagne de l'induction de l'activité des sphingomyélinases acide et neutre (aSMases et nSMases) (pour revue Costantini *et al.*, 2005a ; Blöchl & Blöchl, 2007). Il est intéressant de constater que p75 peut induire la

mort cellulaire *via* une augmentation de la cPLA₂ (*cytosolic Phospholipase A₂*; McEwan, 1996), tandis que la cPLA₂ est un médiateur de la toxicité de l'Aβ¹⁻⁴² soluble *via* la production d'acide arachidonique et l'activation des SMases *in vitro* et *in vivo* (Kriem *et al.*, 2005; Malaplate-Armand *et al.*, 2006). *In vitro*, il a été suggéré que la production d'acide arachidonique et la mort cellulaire (sur des cellules PC12) interféraient directement avec la signalisation du TrkA en inhibant le facteur NFκB (McDonald *et al.*, 1999). Les animaux issus du croisement de souris exprimant des mutations de l'APP avec des souris p75^{-/-} (Knowles *et al.*, 2009) ou des souris cPLA₂^{-/-} (Sanchez-Mejia *et al.*, 2008) sont résistants aux atteintes cellulaires et cognitives induites par l'Aβ.

2.2.5 Effet sur la plasticité synaptique et neuronale.

Les modifications des ratios p75/Trk et pro-NTs/NTs ont aussi des conséquences sur la régulation de l'activité synaptique. Nous avons évoqué précédemment l'importance du BDNF et du TrkB sur la formation des mémoires et la plasticité synaptique, notamment sur l'induction de la LTP (Korte *et al.*, 1996; Patterson *et al.*, 1996; Montkowski & Holsboer, 1997; Heldt *et al.*, 2007; Rauskold *et al.*, 2010). À l'inverse de l'activation du TrkB par le BDNF, l'activation de p75 par le pro-BDNF augmente la dépression à long terme (LTD) (Woo *et al.*, 2005). En effet, la perte de l'expression de p75 n'abolit que la LTD en laissant intacte la LTP (Rosch *et al.*, 2005). Ainsi, la modification des ratios p75/Trk et pro-NTs/NTs pourrait favoriser la LTD dans la MA.

De plus, il a été rapporté que la LTP induisait la phosphorylation de la sous-unité NMDA NR2B à la synapse (Rosenblum *et al.*, 1996), mais aussi que l'installation de la LTD était dépendante de la présence de NR2B dans des sites extrasynaptiques (Massey *et al.*, 2004). Par conséquent, la localisation synaptique ou extrasynaptique de NR2B l'implique soit dans la LTP, soit dans la LTD. Sur des cultures neuronales, l'Aβ¹⁻⁴² induit i) le retrait du NR2B synaptique par endocytose en association avec sa déphosphorylation et ii) prévient l'activation de CREB par le NMDA (Snyder *et al.*, 2005). Il vient d'être montré que l'Aβ¹⁻⁴² oligomérique altère la LTP par l'activation des récepteurs NR2B extrasynaptiques en association avec une diminution de p-ERK, du facteur CREB et l'activation de p38 et de la calpaïne (Li *et al.*, 2011). Compte tenu de l'implication de p75 dans la LTD et dans l'hypothèse que p75 puisse être un récepteur à l'Aβ, il n'a toutefois pas été déterminé si, dans la LTD, l'inhibition de la phosphorylation de NR2B par l'Aβ était dépendante de p75. En parallèle, l'activité de p75 (précédemment assimilée à la LTD induite par le pro-BDNF ou l'Aβ) diminue le nombre d'épines dendritiques (Zagrebelsky *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données suggère que la modification des ratios p75/Trk et pro-NTs/NTs pourraient intervenir sur la plasticité synaptique par la modulation du nombre de synapses, de leur composition et de leur fonctionnalité (équilibre LTP/LTD).

2.3 NTs et stratégies neuroprotectrices.

Dans la plupart des travaux étudiant le rôle des NTs par des approches de délétion, les déficits synaptiques et comportementaux induits sont réversibles par l'administration de ligands (Patterson *et al.*, 1996; Da Rosa *et al.*, 2005) et suggèrent qu'un apport exogène de NTs puisse être un support

efficace *in vivo*. Nous avons vu précédemment que la diminution des NTs mime certaines altérations caractéristiques de la MA comme la dégénérescence des neurones cholinergiques, la présence de plaques amyloïdes et de DNF, ainsi que les altérations de l'activité synaptique et des performances cognitives (Ruberti *et al.*, 2000 ; Korte *et al.*, 1996 ; Capsoni *et al.*, 2000, 2002 ; Heldt *et al.*, 2007). La restauration de leurs fonctions dans la MA semble donc pertinente. De plus, les NTs ayant un spectre large d'activité, leur potentiel neuroprotecteur a aussi retenu l'attention vis-à-vis de nombreuses autres pathologies comme la dépression, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington ou la sclérose amyotrophique latérale (Tuszynski, 2002). Différentes approches sont envisageables : l'inhibition de l'activité néfaste des pro-NTs, la restauration de l'expression des NTs ou leur apport exogène.

2.3.1 L'inhibition de la signalisation pro-apoptotique de p75

L'apoptose induite par les pro-NTs requiert la sortiline et p75. *In vitro*, l'utilisation de la neurotensine, un antagoniste de la sortiline, prévient l'apoptose induite par le pro-BDNF (Teng *et al.*, 2005 ; Al-Shawi *et al.*, 2008). Cependant, la sortiline vient d'être positivement impliquée dans le transport antérograde des Trk *in vivo* (Vaegter *et al.*, 2011), ce qui suggère qu'il vaut mieux cibler son interaction avec des partenaires comme p75, plutôt que la sortiline elle-même. Selon le même principe, la signalisation de p75 étant double (*i.e.* pro- ou anti-apoptotique), il a été proposé l'établissement de stratégies visant à réduire son interaction avec les pro-NTs ou l'A β (Longo & Massa, 2005). Ainsi, des petites molécules agonistes de la fixation du pro-NGF sur p75 (LM11A) permettent d'inhiber l'activité pro-apoptotique de p75 tout en activant les voies de neuroprotection PI3K et NF κ B (Massa *et al.*, 2006). Ces composés préviennent la dystrophie et la mort cellulaire induite par l'A β *via* p75 *in vitro* sur des tranches d'hippocampe en inhibant l'activation de la GSK3 β et de la calpaïne, mais aussi en levant l'inhibition d'Akt et en activant la PI3K. Ces composés permettent aussi de préserver l'activation de CREB et de la LTP suite à l'exposition d'A β (Yang *et al.*, 2008). Des antagonistes sélectifs de p75 ont été également développés (Yaar *et al.*, 2007).

2.3.2. L'induction de l'expression des NTs.

De nombreuses conditions permettent d'influer sur l'expression des NTs. Les études chez l'animal montrent que l'exercice physique induit l'expression du BDNF et du NGF dans l'hippocampe (Neeper *et al.*, 1996) et améliore les performances et les marqueurs de dégénérescence dans des souris modèles de MA (Nichol *et al.*, 2009). Le traitement avec des antidépresseurs augmente l'immunoréactivité du BDNF dans l'hippocampe (Chen *et al.*, 2001). L'administration de l'antagoniste NMDA mémantine induit également une augmentation de l'expression du BDNF et du TrkB dans le cortex de rat (Maranová *et al.*, 2001).

2.3.3 L'apport de NTs au SNC.

2.3.3.1 Les infusions icv

La perméabilité sélective de la barrière hémato-encéphalique (BHE) limite considérablement la demi-vie et l'apport au SNC des NTs (BDNF, NGF et NT-3) administrées par voie périphérique (Poduslo & Curran, 1996). Des approches visant à améliorer le passage des facteurs trophiques à travers la BHE ont été développées, comme la conjugaison des NTs avec des anticorps anti-transferrine (Kordower *et al.*, 1994a), la synthèse de protéines de fusion (Qu *et al.*, 2008) ou l'utilisation de transporteurs (pour revue Garcia-Garcia *et al.*, 2005). Bien que ces alternatives se soient avérées efficaces en terme de neuroprotection, les doses périphériques requises pour ces effets sont extrêmement importantes ce qui exclue une perspective thérapeutique.

Par conséquent, l'administration des NTs au SNC nécessite une application directe *in cerebro*. De plus, le caractère progressif de la MA nécessite également une application prolongée des facteurs neuroprotecteurs. Les premières approches ont consisté à infuser les NTs dans le ventricule cérébral. Chez le primate, l'infusion *icv* de NGF augmente efficacement les taux de NGF dans le LCR et restaure partiellement la perte cholinergique dans le septum dans un modèle lésionnel de MA par transection de la fimbria (Tuszynski *et al.*, 1990). Malgré l'apparente efficacité chez le primate, d'autres travaux sur l'infusion continue de NGF au SNC ont mis en évidence une amélioration de la perte cholinergique chez le rat âgé, mais surtout un effet délétère sur les performances comportementales des animaux jeunes (Markowska *et al.*, 1994). En accord avec cette observation, il a été montré que les NTs en excès pouvaient induire l'apoptose sur des cellules hippocampiques en culture (Friedman *et al.*, 2000). En revanche, lorsque l'infusion est réalisée directement au niveau du septum chez l'animal jeune, les performances des animaux jeunes sont améliorées (Conner *et al.*, 2009). Ces données indiquent que l'administration des NTs doit être ciblée pour être bénéfique. Chez l'Homme, l'infusion *icv* de NGF (de 16 à 75 µg/24h) chez 3 patients MA n'a pas apporté d'amélioration notable (diminution du MMSE) et a eu des effets secondaires indésirables notamment des douleurs intenses et une importante perte de poids à l'origine de l'arrêt du traitement au bout de trois mois (Eriksdotter Jönhagen *et al.*, 1998). D'autres effets secondaires ont été répertoriés chez l'animal suite à l'infusion continue de NGF. L'infusion de NGF chez le rat et le primate pendant 6 mois provoque un épaississement des méninges causé par des infiltrations de cellules de Schwann et leur hyperplasie (Day-Lollini *et al.*, 1997). De plus, une sur-innervation sympathique de la vascularisation cérébrale a également été rapportée suite à des traitements *icv* courts chez le rat (2 semaines) (Isaacson *et al.*, 1990 ; Isaacson & Crutcher, 1998).

De manière similaire au NGF, la dispersion de BDNF dans le LCR peut aussi avoir des effets délétères. Chez des patients atteints de sclérose amyotrophique latérale, l'infusion *icv* de BDNF induit des paresthésies et des troubles du sommeil (Ochs *et al.*, 2000). La voie *icv* ne semble donc pas appropriée pour l'administration de facteurs trophiques. D'autres conséquences pourraient découler d'une administration non-contrôlée de BDNF. Les animaux surexprimant le BDNF, outre une susceptibilité à l'épilepsie, possèdent des troubles de mémoire et une anxiété accrue (Croll *et al.*, 1999 ; Papaleo *et al.* 2011). L'analyse en microscopie de cultures organotypiques d'hippocampe incubées avec du BDNF montre la formation de nouveaux branchements synaptiques aberrants qui provoquent une hyperexcitabilité et un phénotype épileptique des cellules granulaires (Koyama *et*

al., 2004). Des modifications de la nociception comme l'allodynie, sont parmi les potentielles conséquences d'une trop forte concentration centrale de BDNF : la formation de contacts synaptiques aberrants des fibres C nociceptives (dans la moelle épinière) provoque des épisodes hyperalgésiques dans les périodes de régénération neuronale chez le rat (Endo *et al.*, 2009). Au final, les administrations périphériques ou les infusions *icv* de NTs, ou d'autres composés trophiques comme l'IGFI, sont peu efficaces et présentent souvent des effets secondaires dans les essais cliniques (pour revue, Thoenen & Sendtner, 2002).

En bref, l'administration de NTs doit permettre d'atteindre des concentrations efficaces aux sites précis de dégénérescence neuronale tout en limitant la diffusion à des sites distants à l'origine d'effets secondaires indésirables. De plus, la méthode d'administration doit pouvoir assurer la délivrance continue de faibles concentrations de peptide sur de longues périodes, probablement de manière chronique. Ces concepts posent des limites quant à la possibilité de déterminer le réel potentiel curatif des NTs.

2.3.3.2 Les infusions intrathécales de NTs.

L'administration de NTs dans le parenchyme cérébral *via* des pompes osmotiques pourrait correspondre à ces impératifs. L'implantation de pompes osmotiques délivrant du GDNF *icv* ou dans le parenchyme (striatum) de patients Parkinson n'est pas efficace et induit de nombreux effets secondaires (nausées, hallucinations, fourmillements) (Kordower *et al.*, 1999b ; Nutt *et al.*, 2003). L'implantation bilatérale de canules dans le putamen n'a qu'un effet limité sur la capture du 18F-DOPA et est sans effet sur la récupération fonctionnelle. De plus, les injections mensuelles ont conduit au retrait du dispositif d'infusion ou son repositionnement chirurgical chez une partie des patients (Lang *et al.*, 2006). Les données cliniques suggèrent que l'implantation parenchymale de pompes osmotiques a besoin d'être optimisée. Il convient de remarquer qu'en parallèle des systèmes de pompes implantables, des capsules résorbables enfermant des composés thérapeutiques ont été développées et ont montré leur efficacité à libérer ces composés à un site donné. Toutefois, la limitation -inéluçtable- dans la durée et le manque de contrôle de la libération de l'agent thérapeutique constituent des limites incompatibles avec un traitement de fond et ne seront pas évoquées davantage (pour revue, Shoichet & Winn, 2000). Enfin, il est aussi possible que la séquestration à long terme de composés neuroprotecteurs dans un dispositif d'infusion en altère l'efficacité biologique : par exemple le GDNF contenu dans des pompes osmotiques perd jusqu'à 90% de son activité biologique en 2 semaines (Lu & Hagg, 1997). Ces données suggèrent que pour être efficace, l'apport ,mais aussi la synthèse des composés neuroprotecteurs doivent être continus.

2.3.3.3 La production in situ de NTs.

Parmi les alternatives par rapport à la répétition d'actes chirurgicaux invasifs, l'injection intracérébrale de virus recombinants permet d'assurer l'expression localisée de NTs. Cette méthode possède l'avantage de pouvoir restaurer l'expression de protéines au niveau intracellulaire, mais la

taille de la séquence à introduire dans le génome de l'hôte constitue une limite (pour revue, Björklund *et al.*, 2000). Cette approche consistant à intégrer un gène dans le génome d'un hôte pour y induire son expression est qualifiée d'« *in vivo gene delivery* ». L'infusion d'un lentivirus BDNF-GFP dans le cortex entorhinal de modèles murins de vieillissement, lésionnels et transgéniques de MA et dans leurs équivalents primates, réverse les atteintes cellulaires, les déficits cognitifs et l'expression aberrante de gènes induits par l'A β , la déafférentation de l'hippocampe ou le vieillissement (Nagahara *et al.*, 2009a). Chez le singe âgé, la même approche d'injection bilatérale de lentivirus NGF dans le cerveau antérieur basal permet d'induire localement l'expression de NGF et permet de reverser la perte cholinergique liée à l'âge. L'immunoréactivité du NGF ou l'expression de la GFP (suite à l'infection par un lentivirus GFP) est toujours visible au bout d'un an. L'analyse immunohistochimique a permis de déterminer que l'expression de NGF ainsi induite est limitée dans un rayon de 2 mm autour des sites d'injection, tandis que les niveaux de NGF dans le LCR demeurent indétectables, confirmant le confinement de l'expression de NGF dans la structure ciblée (Nagahara *et al.*, 2009b). Aucun effet secondaire n'a été relaté suggérant l'innocuité de la méthode. Cependant, il n'est pas possible d'éteindre l'expression induite dans l'éventualité de l'apparition d'effets secondaires indésirables, ce qui pose un problème de sécurité et de transposition à l'Homme. En dépit de ce risque, le bénéfice de l'injection du CERE-110 (un adéno-virus modifié pour l'insertion du gène du NGF) dans le noyau basal de Meynert est actuellement testé en phase II chez des patients MA (Mandel, 2010).

Une autre possibilité est d'infecter *in vitro* des cellules pour leur faire exprimer une protéine, puis de les réimplanter dans l'organisme. Cette approche de thérapie cellulaire est qualifiée de « *ex vivo gene delivery* ». Cette approche permet la sécrétion de peptides dans le milieu extracellulaire. La greffe de fibroblastes autologues recombinants pour le NGF chez le singe reverse efficacement la perte cholinergique liée à l'âge et permet une sécrétion de NGF sur un minimum de 8 mois (Smith *et al.*, 1999). Chez les patients MA, la greffe de fibroblastes autologues recombinants pour le NGF dans le noyau basal de Meynert améliore considérablement les scores neuropsychologiques au MMSE et l'ADASCog. De plus, le métabolisme cérébral (FDG-PET) est rétabli et la méthode ne présente aucun effet secondaire au cours des 24 mois de l'expérience (Tuszynski *et al.*, 2005). La greffe de fibroblastes exprimant le BDNF dans la moelle épinière axotomisée stimule le bourgeonnement et la restauration partielle des neurones lésés (Tobias *et al.*, 2003). Ainsi, cette approche semble tout aussi efficace que l'« *in vivo gene delivery* », mais présente deux avantages. Le premier des avantages est le fait même de ne pas utiliser un virus recombinant *in vivo*. Le deuxième avantage est la possibilité d'insérer (en plus du gène d'intérêt) un gène conférant une sensibilité particulière. Par exemple, l'insertion du gène de la thymidine kinase issue du *Herpes Simplex Virus* confère aux cellules recombinantes implantées une sensibilité au ganciclovir en cas d'effets indésirables (Déglon *et al.*, 1996 ; Bachoud-Lévi *et al.*, 2000b). Au final, bien que l'« *in vivo gene delivery* » ne présente pas d'effets secondaires, l'« *ex vivo gene delivery* » semble plus sûr. Afin d'améliorer la survie des implants, les cellules implantées peuvent être encapsulées.

L'ensemble de ces données indique que les approches alliant la thérapie cellulaire et la thérapie génique seraient les plus efficaces et les plus adaptées à l'administration de facteurs trophiques au SNC. En effet, ces approches permettent de cibler précisément une structure. En comparaison des injections *icv* ou périphériques, le produit est retenu à son lieu de synthèse et sa

production est durable et inoffensive, mais aussi suffisamment importante pour obtenir un effet. La greffe de cellules recombinantes semble la plus sûre méthode et peut être optimisée grâce au procédé d'encapsulation cellulaire.

3. L'encapsulation cellulaire

3.1 Limites et contraintes de la thérapie cellulaire

Les approches de greffes de cellules non-encapsulées (thérapies cellulaires) sont soumises à des limites semblables à celles rencontrées dans les problématiques de greffes chirurgicales. Ces limites découlent majoritairement de la quantité du matériel biologique et de l'origine des transplants, notamment pour ce qui est du tissu nerveux.

Les xénogreffes (le greffon provient d'une espèce différente) constituent un matériel abondant et accessible, mais nécessitent l'administration d'immunosuppresseurs (cyclosporine, prednisolone) sans laquelle les cellules implantées sont détruites (Duan *et al.*, 1996). Des études préliminaires de sûreté menées chez le rat et le mouton ont montré que la greffe de cellules BHK ne survit pas sans encapsulation et provoque des réponses cellulaires et humorales caractéristiques du rejet (pour revue Aebischer *et al.*, 1996a ; Blanchet *et al.*, 2003). De plus, les xénogreffes comportent des risques de transmissions virales de l'animal à l'Homme (pour revue Butler, 1998).

Dans le cas des allogreffes (le tissu provient d'un individu de même espèce que l'hôte), l'immunosuppression est également nécessaire. Dans ce cadre, l'utilisation de cellules fœtales a retenu l'attention pour le traitement de pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington (Freed *et al.*, 1992 ; Bachoud-Lévi *et al.*, 2000a). Cependant, cette ressource est quantitativement limitée et son utilisation est soumise à des restrictions éthiques. La greffe de neurones embryonnaires dans le striatum (caudé-putamen) a amélioré les scores de patients Huntington dans des tests psychomoteurs dans les deux ans suivant l'intervention. Cependant, le suivi de ces patients au-delà de cette période a démontré que ces greffes ne permettent pas de stopper la propagation de la dégénérescence. Chez certains patients, celle-ci se retrouve même accentuée, ne permettant pas au bout de 6 ans de distinguer les patients greffés des patients non-opérés (Bachoud-Lévi *et al.*, 2006). Ces données indiquent de manière générale que les bénéfices de ces greffes sont transitoires, suggérant que l'apport en peptide thérapeutique doit être constant pour conserver ses bénéfices.

Dans le cadre d'autogreffes, l'immunosuppression n'est pas nécessaire (*i.e.* le greffon provient de l'hôte), mais dans ce cas, les ressources sont limitées par les possibilités de prélèvements tissulaires sur le patient. Les biopsies de fibroblastes possèdent l'avantage de proliférer *in vitro* à partir d'un explant (Tuszynski *et al.*, 2005) et permettent de contourner cette difficulté. Toutefois, l'utilisation d'autogreffes à des fins thérapeutiques implique la création d'une banque de tissu par patient, ce qui ne serait pas possible à grande échelle (Thanos & Emerich, 2008). Une autre limite de la greffe de cellules non-encapsulées est la difficulté à retrouver les cellules implantées en cas d'effets secondaires car celles-ci s'intègrent dans les réseaux (Bachoud-Lévi *et al.*, 2009). Enfin, les

cellules implantées peuvent être sensibles à l'environnement pathologique : les cellules greffées chez un patient Parkinson ont présenté des inclusions d' α -synucléine (Kordower *et al.*, 2008)

Idéalement, dans la démarche de pouvoir utiliser l' « *ex vivo gene delivery* » à grande échelle, il est nécessaire d'avoir recours à i) une ressource disponible en quantité suffisante, ii) biocompatible et iii) aisément manipulable expérimentalement et mécaniquement, en accord avec les impératifs d'administration de peptides neurotrophiques au SNC. L'alternative de l'encapsulation cellulaire permet de concilier ces contraintes.

3.2 Production et propriétés des bioréacteurs

3.2.1 Principe de l'encapsulation cellulaire.

Le principe de l'encapsulation consiste à isoler une suspension de cellules recombinantes dans une cage de polymères de façon à former des bioréacteurs (appelés aussi capsules ou billes). Le maillage de la matrice de la capsule se comporte comme une membrane semi-perméable : elle permet le passage des nutriments et des métabolites mais empêche celui de grosses molécules comme les immunoglobulines ainsi que les contacts cellule-cellule entre le greffon et l'hôte (pour revues, Zimmermann *et al.*, 2005 ; Emerich & Thanos, 2006). L'implantation des capsules dans le parenchyme cérébral ou le ventricule se fait par chirurgie stéréotaxique (pour revues Kordower *et al.*, 1999a; Shoichet & Winn, 2000 ; Aebischer & Ridet, 2001 ; Visted *et al.*, 2001 ; Read *et al.*, 2002).

3.2.2 Les différents matériaux d'encapsulation

Le choix du matériau pour réaliser l'encapsulation des cellules est primordial. En effet, le composé choisi doit se conformer à certains critères tels que la neutralité immunologique, la stabilité chimique, la résistance mécanique et la facilité d'utilisation. De nombreux polymères, d'origine artificielle ou naturelle, permettent l'encapsulation. Quelques-uns des composés utilisés à cette fin sont listés dans le Tableau 7.

Polymer	Treatment	Cells	Authors
Synthetic polymer			
Polyvinyl alcohol (PVA)	Diabetes	Langerhans islets	Juang <i>et al.</i> 1995
Acrylonitrile vinyl chloride co-polymer (PAN-PVC)	Parkinson's	PCI2	Tresci <i>et al.</i> 1992
	Alzheimer's	BHK	Emerich <i>et al.</i> 1994
Cellulose sulfate	Diabetes	Langerhans islets	Braun <i>et al.</i> 1985
	Cancer therapy	Hybridomas	Dautzenberg <i>et al.</i> 1999
Polymethacrylate	Diabetes	Insulin secreting cells	Morikawa <i>et al.</i> 1997/
		Mouse L929 Fibroblasts	Lahooti <i>et al.</i> 2000
Polyethylene glycol	Diabetes	Porcine islets	Cruise <i>et al.</i> 1999
Natural Polymers			
Alginate	Parkinson's	Bovine chromaffine cells	Xue <i>et al.</i> 2001
	Lysosomal storage disease	Fibroblasts	Ross <i>et al.</i> 2000
Agarose	Diabetes	Mouse-Ltk Fibroblasts	Taniguchi <i>et al.</i> 1997
		Langerhans islets	Iwata <i>et al.</i> 1994
Chitosan-copolymers	Liver disease	Hepatocytes	Gupta <i>et al.</i> 1993
	Ischemia	rhCSF-1 and ML-10 Fibroblasts	Maysinget <i>et al.</i> 1996

Tableau 7 : Exemples de polymères artificiels ou naturels qui ont été utilisés pour l'encapsulation cellulaire (d'après Read *et al.*, 2002).

Parmi ces composés, l'alginate est fréquemment utilisé pour l'encapsulation cellulaire (Aebischer *et al.*, 1996a; Bloch *et al.*, 2004). La neutralité immunologique de l'alginate en fait un candidat de choix dans le domaine des xénogreffes (Zimmermann *et al.*, 2005). L'absence de toxicité de l'alginate est reconnue et fait qu'il est depuis longtemps utilisé dans les secteurs de l'alimentaire (comme gélifiant sous le nom d'E401) et pharmaceutique (comme pansement gastrique). Son utilisation est donc déjà validée chez l'Homme.

3.2.3 Propriétés immunologiques et mécaniques des polymères d'alginate

L'implantation de capsules d'alginate durant 9 semaines dans le parenchyme cérébral chez le rat ne provoque pas l'activation des cellules immunitaires (lymphocytes B et T), mais principalement de la microglie (Read *et al.*, 1999). Toutefois cette réaction est minime lorsque les capsules implantées sont vides (Kuijlen *et al.*, 2006). Une étude clinique rapporte que la greffe de cellules BHK encapsulées dans de l'alginate s'est avérée immunogène chez ¼ de patients SAL implantés. La présence d'anticorps anti-SVF, utilisé pour la culture de ces cellules, a été détectée dans le LCR de ces patients (Zurn *et al.*, 2000). Ces données montrent la neutralité des implants d'alginate et suggèrent que la diffusion du sérum emprisonné lors de l'encapsulation pourrait significativement être à l'origine des réactions locales vis-à-vis de l'implant. Utilisés dans un contexte hors de l'encapsulation, les hydrogels à base d'alginate sont aussi utilisés comme des composants neutres occupant l'espace créé par des traumatismes spinaux. Ceci favorise la réinnervation du tronçon médullaire lésé en

prévenant la formation de la cicatrice gliale en l'absence de réaction immunitaire (pour revue Novikova *et al.*, 2003).

L'alginate le plus pur est un composé naturel extrait d'algues brunes dans lesquelles il est un composant majeur de la matrice extracellulaire. Les polymères d'alginate sont constitués d'acide guluronique (G) et mannuronique (M). Le mélange de l'alginate avec des cations divalents en solution induit la polymérisation des blocs G qui forment la trame du gel : plus l'affinité de l'alginate est importante pour le cation, plus le polymère formé est solide. Le baryum est le cation pour lequel l'alginate possède la plus grande affinité, mais sa toxicité limite son utilisation (pour revue, Zimmermann *et al.*, 2005). Il est possible de substituer le baryum par le calcium pour éviter cette toxicité (pour revue Visted *et al.*, 2001). Les blocs M ne participent pas à la gélification : il vient d'être montré qu'à 54% d'alginate M, les capsules produites ne résistent pas à un choc hypo-osmotique (Purcell *et al.*, 2009). De plus, l'alginate M présente des propriétés immunogènes *in vivo* comme en témoigne la production d'anticorps anti-alginate M chez la souris (Kulseng *et al.*, 1999). Aussi, des proportions plus importantes d'alginate G ($\geq 60\%$) dans le mélange d'alginate diminuent l'immunogénicité des capsules et renforcent leur stabilité. Une fois polymérisé, l'alginate-calcium présente des pores (de 5 à 200 nm) dont la taille dépend de la concentration en alginate : plus l'alginate est concentré, plus la diffusion hors de la capsules est lente suggérant un resserrement du maillage (Martinsen *et al.*, 1992 ; Read *et al.*, 1999). Le mélange d'alginate doit donc respecter certaines proportions en polymères G et M, et doit être utilisé à certaines concentrations (pour permettre la formation du maillage permettant la diffusion des produits sécrétés hors de l'implant).

Pour augmenter la résistance mécanique de la capsule, il est également possible de la recouvrir de poly-L-Lysine (PLL). Toutefois, l'ajout de PLL diminue le renouvellement des cellules dans la capsule et augmente la réaction de l'hôte vers la capsule (King *et al.*, 2001). Il est possible de diminuer cette immunogénicité en réalisant une étape d'épimérisation de l'alginate (King *et al.*, 2003) ou une étape d'encapsulation supplémentaire de la capsule-PLL, alourdissant le processus de production. Les travaux de Purcell *et al.* (2009) montrent également que la présence de PLL sur la capsule inhibe la sécrétion du NGF (mais pas du BDNF ou du GDNF) dans le milieu de cellules souches neurales encapsulées. Les PLL peuvent interférer avec la diffusion des produits sécrétés. Au final, l'encapsulation en « monocouche » d'alginate sans PLL est la procédure la plus simple, la moins immunogène et qui influe le moins sur la diffusion des composés sécrétés.

3.2.4 Les différents types d'encapsulation

Deux types d'encapsulation sont possibles : la microencapsulation et la macroencapsulation. Ces deux modes d'encapsulation diffèrent par la taille et la forme des bioréacteurs produits. La microencapsulation permet la fabrication de capsules sphériques de petite taille (de l'ordre de la centaine de μm), tandis que la macroencapsulation permet la formation d'implants cylindriques pouvant atteindre plusieurs cm de longueur (figure 12). L'ajustement de la taille des implants rend compatible la technologie d'encapsulation avec des applications chez l'animal (microencapsulation) et chez l'Homme (macroencapsulation) et supporte la portabilité des approches entre différents

modèles d'étude et vers des stratégies thérapeutiques. La taille des implants dépend de la technique utilisée pour leur fabrication.

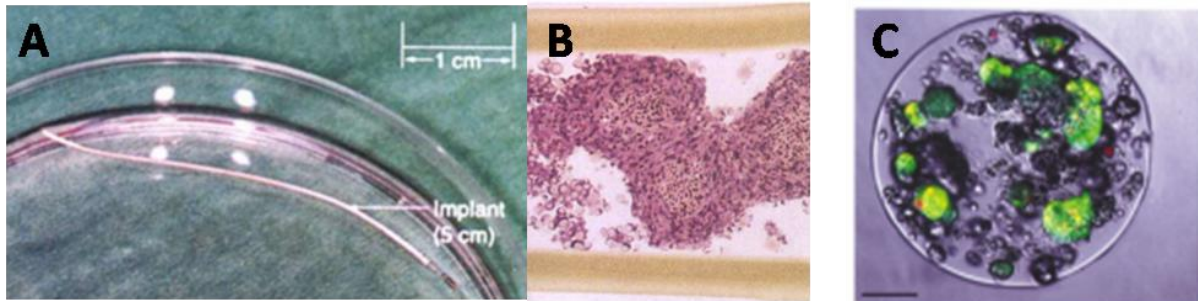


Figure 12: Les différents types de capsules. **A)** Macrocapsule de 6 mois explantée d'un patient. **B)** Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des cellules BHK viables (Aebisher *et al.*, 1996). **C)** Une microcapsule de 4 mois explantée d'un cerveau de rat. Les cellules C2C12 en vie clivent la calcéine et produisent une fluorescence verte (Live/Dead Assay ; Visted *et al.*, 2001).

L'utilisation d'un générateur électrostatique de billes est le dispositif de microencapsulation qui permet d'obtenir les plus petits implants (200 μ M de diamètre) adaptés au petit animal, avec un fort rendement (plusieurs milliers d'implants par heure) et une bonne reproductibilité (Read *et al.*, 2001). Suite au processus d'encapsulation, l'alginate permet la croissance des cellules encapsulées. Il a ainsi été observé trois phases de croissance cellulaire dans les capsules (Read *et al.*, 1999; Visted *et al.*, 2001). Après une première phase d'adaptation à leur microenvironnement au cours des premiers jours suivant leur encapsulation, les cellules entrent dans une phase de croissance durant laquelle elles envahissent la capsule (3 à 5 semaines). La dernière phase est un état d'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire dans l'implant (11 à 18 semaines). Il a été rapporté que la croissance de fibroblastes dans une capsule durant la première semaine pouvait altérer son intégrité et que l'alginate des implants persistants au-delà de cette période n'était pas altéré (Hunt *et al.*, 2010). C'est pourquoi, dans nos approches expérimentales, les capsules sont produites plusieurs semaines avant leur implantation.

3.3 Les avantages de l'encapsulation

La taille des implants rend possible leur implantation de manière ciblée par stéréotaxie. Chez des rats modèles de maladie de Parkinson (infusion de 6-OHDA), la greffe *icv* de capsules contenant des cellules PC12 exprimant la L-DOPA est sans effet. En revanche, l'implantation de capsules dans le striatum diminue significativement la rotation apomorphinique des animaux (Emerich *et al.*, 1996a). Cet exemple montre qu'une implantation ciblée des cellules encapsulées dans le parenchyme est nécessaire et permet d'atteindre des concentrations efficaces. Cependant la miniaturisation limite

également la diffusion des substances dans le tissu. Par exemple, il a été déterminé avec des capsules contenant du NGF seul, que la libération du NGF dans le parenchyme devait se faire à moins de 2 mm de la cible pour pouvoir exercer un effet trophique sur celle-ci. Au-delà de cette distance, le NGF perd toute propriété trophique (Mahoney & Saltzman, 1999). En contrepartie, si la miniaturisation du dispositif permet l'implantation des capsules à des sites précis, la limite de diffusion du produit libéré nécessite souvent l'implantation de plusieurs bioréacteurs chez des animaux de taille importante comme les primates (Emerich *et al.*, 1997; Kishima *et al.*, 2004).

Ainsi, après implantation, les capsules sont récupérables dans la majorité des cas. La récupération de l'implant plusieurs mois après l'intervention permet de vérifier la viabilité cellulaire (Read *et al.*, 2002), de contrôler la sécrétion du peptide d'intérêt (Bloch *et al.*, 2004), son activité biologique, ainsi que l'intégrité de la capsule (Emerich *et al.*, 1996a,b). Cet avantage a permis le renouvellement des macrocapsules tous les 6 mois sur une période de 2 ans chez des patients Huntington (Bloch *et al.*, 2004).

Nous avons précédemment abordé l'isolation immunologique des cellules implantées grâce à l'alginate (Kulseng *et al.*, 1999), évitant ainsi les phénomènes de rejet et rendant inutile la prise d'immunosuppresseurs. La survie à long terme dans l'implant des cellules encapsulées témoigne de l'efficacité de protection vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte: dans le cadre de l'implantation chez le rat, 80 % des cellules encapsulées demeurent en vie 4 mois après implantation dans des tumeurs cérébrales *in vivo* (Read *et al.*, 2001). Zimmermann *et al.* rapportent que la greffe de cellules d'ilots de Langerhans encapsulées dans des souris modèles de diabète normalise la réponse glycémique dans un test de tolérance au glucose, suggérant que les cellules transplantées sont viables au moins un an (Zimmermann *et al.*, 2005). Chez le singe, les cellules PC12 encapsulées survivent au moins 6 mois (Lindner & Emerich, 1998). Ainsi, l'encapsulation permet la survie des cellules recombinantes et est actuellement proposée comme méthode d'administration de peptides thérapeutiques au cerveau (pour revues Shoichet & Winn ; 2000 ; Visted *et al.*, 2001 ; Read *et al.*, 2002 ; Emerich & Thanos, 2006 ; Thanos & Emerich, 2008).

L'isolement immunologique des matériels encapsulés a donc permis l'emploi de nombreuses lignées cellulaires recombinantes. Les lignées cellulaires les plus communément utilisées pour l'encapsulation sont les cellules PC12 (Lindner *et al.*, 1995 ; Emerich *et al.*, 1996a ; Kim *et al.*, 2005), les cellules HEK (Löhr *et al.*, 2001 ; Read *et al.*, 2001), les cellules C2C12 (Déglon *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996 ; Kishima *et al.*, 2004 ; Consiglio *et al.*, 2007), les cellules BHK (Aebischer *et al.*, 1996b; Bachoud-Lévi *et al.*, 2000b ; Bloch *et al.*, 2004). L'encapsulation permet indirectement de pallier aux problèmes de ressources de matériel à implanter par la possibilité d'utiliser ces lignées répandues et caractérisées. Si toutes ces lignées sont capables de proliférer, suggérant un risque de développement de tumeurs, il a été déterminé que la fuite des cellules C2C12 hors de la capsule ralentissait ou stoppait leur prolifération (Déglon *et al.*, 1996) et que les cellules BHK non encapsulées ne provoquaient pas de tumeur (Aebischer *et al.*, 1996a). En outre, la greffe de cellules recombinantes encapsulées s'est avérée efficace dans de nombreux modèles animaux de pathologies du SNC, comme la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la sclérose amyotrophique latérale ou la rétinite pigmentaire, et a été utilisée dans quelques études cliniques (Tableau 8).

Pathologie	Hôte	Type de capsule (longueur x diamètre/ matière)	Type de cellules	Peptide	Nb Caps.	Site d'implantation	Viabilité des implants	Effet	Référence
Alzheimer	Singe (Lésion unilatérale du Fornix)	Macrocapsule (7mm x 0,5 mm / PAN-PVC)	BHK	NGF	5	icv ipsilatéral	4 semaines	oui	Kordower et al., 1994b
Parkinson	Rat (modèle 6OHDA)	Macrocapsule (7mm x 0,5 mm / PAN-PVC)	BHK PC12 PC12A	GDNF DOPA L DOPA	1	striatum	3 mois 3 mois	oui (partiel)	Lindner et al., 1995
SAL	Homme	Macro-capsule hollow fiber membrane (5cm x 0,5mm)	BHK	CNTF	1	Lombaire	17 semaines	trop faible n	Aebischer et al., 1996b
SAL	Rat nouveau-né (Axotomie nerf facial)	macrocapsules (1 cm x 0,5mm/ polyethersulfone)	CZC12	CNTF	2	Sous-cutané, zone stylonastoidé (+ lésion BHE)	1 semaine	oui	Dégion et al., 1996
SAL	Rat adulte	macrocapsules (1 cm x 0,5mm/ polyethersulfone)	CZC12	CNTF	1	Lombaire (espace subarachnoïde)	3mois	oui	
SAL	Rat nouveau-né (Axotomie nerf facial)	macrocapsules (1 cm x 0,5mm/ polypropylène)	BHK	hCNTF	2	Sous-cutané, zone stylonastoidé	1 semaines	oui	Tan et al., 1996
Parkinson	Rat (modèle 6OHDA)	Macrocapsule (7mm x 0,5 mm / PAN-PVC)	PC12 PC12	DOPA DOPA	2 2	icv Striatum	6 semaines 6 semaines	non oui	Emerich et al., 1996a
Huntington	Rat (lésion striatale au quinolate)	Macrocapsule (7mm x 0,5 mm / PAN-PVC)	BHK	CNTF	1	icv	2 mois	oui	Emerich et al., 1996b
Alzheimer	Singe (vieillessement/amyloïdose)	non précisé	BHK	NGF	5	icv	4 semaines	NGF ne modifie pas l'expression d'Abeta	Kordower et al., 1997a
Huntington	Singe (lésion striatale au quinolate)	Macrocapsule (7mm x 0,5 mm / PAN-PVC)	BHK	CNTF	3 + 2	Striatum (putamen + caude)	4 semaines	oui	Emerich et al., 1997
SAL	Homme	nd	BHK	CNTF	1	Lombaire	20 semaines	production anticorps anti-SVF	Zurn et al., 2000
Tumeur du pancréas	Homme	microcapsule (0,8 mm / sulfate de cellulose)	HEK 293	p450 2B1 (CYP2B1)	300	artère duodénale ou pancréatique, puis transport jusqu'à la tumeur	non-déterminé	à 20 semaines, mineur su 1/4 des patients	Löhr et al., 2001
Gliome	Rat (gliome B14C)	microcapsule (0,5mm / alginate calcium)	HumanEK 293	endostatine	10	Cortex	4 mois	oui	Read et al., 2001
Retinite pigmentaire	Chien (rcd1)	Macrocapsule (1cm x 1mm / polyethersulfone)	NTC-201 (rétine humaine)	CNTF	1	Humeur vitrée	9 semaines	oui	Tao et al., 2002
Parkinson	Singe (modèle MPTP)	macrocapsules (1,5 cm x 1mm/ polyethersulfone)	BHK	GDNF	3 + 2	Striatum (putamen + caude)	4mois	non	Blanchet et al., 2003
Huntington	Homme	Macro-capsule (2,5cm x 0,5mm)	BHK	CNTF	1	icv	6 mois x 4	paramètres électrophysiologiques uniquement	Bloch et al., 2004
Parkinson	Babouin (modèle MPTP)	macrocapsule	CZC12	GDNF	1	Ventricule	20 semaines	oui	Kishima et al., 2004
Dégénérescence maculaire	Homme	Macrocapsule (11 ou 6 mm x 1 mm) ancrée "NT501"	NTC-201 (rétine humaine)	CNTF	1	Intraoculaire	6 mois	oui	Sleving et al., 2006
Leucodystrophie métabolique	Souris	macrocapsules (1,2 cm x 0,5mm/ polyethersulfone)	CZC12	ARY/Sulfatase ARSA	1	sous-cutané	4 mois	in vitro, oui; à déterminer in vivo	Consiglio et al., 2007
Alzheimer	Cochon	macrocapsule (8mm) ancrée	NGC-0295	NGF	2	Septum	12 mois	faible (implantation imprécise)	Fjord-Larsen et al., 2010
Retinite pigmentaire	Homme	Macrocapsule (6 mm x 1 mm) ancrée "NT501"	NTC-201 (rétine humaine)	CNTF	1	Intraoculaire	12 mois	oui	Zhang et al., 2011b

Tableau 8 : L'utilisation des cellules recombinantes encapsulées dans des modèles d'étude de diverses pathologies et chez l'Homme.

3.4 Perspectives de développement

Les perspectives de développement concernent non seulement l'évolution de l'utilisation des implants, mais surtout leur production à grande échelle. Les travaux de Bloch *et al.* prennent en compte la nécessité du renouvellement de l'implant. Cette démarche est d'autant plus simplifiée du fait que l'implant se situe au niveau médullaire (Bloch *et al.*, 2004). Toutefois, le renouvellement d'un implant intrathécal nécessiterait à chaque fois une procédure stéréotaxique complète. Pour contourner cette difficulté, un système de canulation à demeure permettant le renouvellement des implants de cellules sans procédure stéréotaxique a été mis au point chez l'animal (Kim *et al.*, 2005).

Les progrès en biologie moléculaire permettent aussi l'évolution des systèmes cellulaires destinés à l'encapsulation. Thanos & Emerich (2008) proposent la fabrication d'implants « intelligents », dont l'activité de synthèse serait préprogrammée ou modulée par les conditions physiopathologiques.

Les capsules d'alginate contenant des cellules HEK résistent à la cryopréservation (Stensvaag *et al.*, 2004) et permettent de maintenir une viabilité élevée des cellules souches embryonnaires lors de leur décongélation après un jour dans l'azote (Serra *et al.*, 2011). Bien que ces résultats soient à confirmer sur des durées de congélation plus importantes, ces observations suggèrent que cette technique serait aussi compatible avec des applications industrielles comme la production en masse de bioréacteurs ou son utilisation pour réaliser des banques de cellules.

En résumé, les analyses de cerveaux de patients MA ont mis en évidence de nombreuses modifications du système des NTs (variations d'expression, modifications post-traductionnelles, transport altéré, dérèglement de la balance entre les différents récepteurs, troubles de leur signalisation). Les études *in vivo* et *in vitro* montrent que ces altérations peuvent être des causes et des conséquences de la MA. Néanmoins, la restauration de l'expression ou le traitement par des NTs prévient la neurodégénérescence dans la plupart des cas. La constance et le ciblage de l'apport en peptides neurotrophiques sont critiques à l'obtention d'effets thérapeutiques et la minimisation des effets secondaires. La technique d'encapsulation cellulaire permet de concilier les différentes contraintes pour rendre efficace et optimale l'administration de peptides trophiques au SNC. L'encapsulation cellulaire permet le maintien en vie des cellules encapsulées pour permettre une synthèse ciblée, constante et efficace de facteurs neuroprotecteurs ou neurotrophiques.

Partie C : La biologie du CNTF et son potentiel thérapeutique

Lors de ce travail, nous avons choisi de faire la preuve du concept que la sécrétion continue *in situ* de facteur neurotrophique pouvait représenter une stratégie thérapeutique préventive (voire curative) pour la maladie d'Alzheimer. Parmi les différents facteurs neurotrophiques connus, nous avons fait le choix du CNTF. Le paragraphe suivant sera donc consacré spécifiquement à ce facteur neurotrophique afin de comprendre plus en détails les fonctions physiologiques, ainsi que les propriétés biologiques de cette protéine.

1. Historique de la découverte du CNTF.

À la fin des années 1970, la compréhension des mécanismes sous-tendant la survie et la croissance neuronale était déjà au centre des préoccupations. À cette date, seul le NGF (*Nerve Growth Factor*; Levi-Montalcini *et al.*, 1963 ; Levi-Montalcini, 1964) avait été identifié comme peptide cumulant à la fois des effets sur la croissance neuritique et sur la survie de neurones cholinergiques issus du ganglion ciliaire embryonnaire de poulet. Cette découverte fera l'objet d'un prix Nobel en 1986. Les propriétés de ce peptide poussent les scientifiques à rechercher d'autres peptides possédant des propriétés similaires sur la survie et la croissance neuronale.

Le CNTF fut pour la première fois évoqué dans la littérature en 1979 (Adler *et al.*, 1979 ; Varon *et al.*, 1979) en tant que « cholinergic neuronotrophic factor ». Dans cet article, les auteurs montrent que l'application de sérum combiné à un extrait d'embryon de poulet permet la survie et la croissance de cellules du ganglion ciliaire de poulet de manière analogue au NGF. Ainsi, les auteurs proposent ce modèle *in vitro* comme outil d'évaluation des propriétés neurotrophiques de peptides candidats.

Quelques mois plus tard, les mêmes auteurs déterminent qu'un broyat de tissus intraoculaires d'embryon de poulet de 15 jours possède une activité neurotrophique (i) nécessaire à la survie des cellules de ganglion ciliaire en culture, et (ii) analogue à celle du NGF (Manthorpe *et al.*, 1980). Cette fraction oculaire contenait un peptide de 35-40 KDa (il s'agissait d'un dimère de CNTF) qui fût (re)baptisé Facteur Neurotrophique Ciliaire, en référence au modèle cellulaire ayant permis de mettre en évidence ses propriétés trophiques. En 1981, la preuve est apportée d'une dissociation entre les effets du CNTF sur la survie des neurones de ganglion ciliaire et le phénomène de croissance neuritique (Manthorpe *et al.*, 1981). Le CNTF sera purifié 3 ans plus tard, ce qui permettra d'établir de nettes différences entre ses caractéristiques physico-chimiques et biologiques par rapport au NGF (Barbin *et al.*, 1984). À ce stade, le CNTF est alors reconnu comme étant le deuxième peptide présentant des propriétés neurotrophiques sur les neurones cholinergiques et peut dorénavant être admis comme un facteur neurotrophique avant même la découverte du *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF).

Les premières analyses *in vivo* ont permis d'établir que les niveaux de CNTF étaient augmentés suite à une lésion dans le cortex de rats jeunes ou adultes, que cette libération était amoindrie chez l'animal vieux et insuffisante pour maintenir en vie les cellules de ganglion ciliaire (Needels *et al.*,

1985). Ce relargage post-lésionnel de neurotrophines a également été mis en évidence suite à des lésions excitotoxiques des neurones hippocampiques et inhibé par l'administration de méthotrexate, un antiproliférateur glial, plaçant ainsi la glie réactive en premier site de production de ce facteur trophique en réponse à des dommages cérébraux (Heacock *et al.*, 1986).

Le rôle du CNTF dans les phénomènes inflammatoires est alors mis en évidence par son effet stimulateur de la différenciation des progéniteurs gliaux O-2A en astrocytes de type II (Hugues *et al.*, 1988). Dans les conditions physiologiques, *i.e* en absence d'inflammation induite, le CNTF serait impliqué dans la croissance du nerf optique et dans la régulation temporelle de la différenciation gliale (Anderson, 1989). Le CNTF favoriserait, dans le système nerveux sympathique, la différenciation des neurones catécholaminergiques (adrénergiques) en neurones cholinergiques en diminuant l'expression de la Tyrosine Hydroxylase et en augmentant l'expression de la Choline Acetyl Transferase (Saadat *et al.*, 1989).

Les propriétés trophiques du CNTF sur les neurones cholinergiques et de différenciation/modification du phénotype de cellules gliales et nerveuses suscitent alors un vif intérêt dans les problématiques de traumatismes médullaires et de régénération axonale. Dans ce cadre, Blottner *et al.* déterminent que l'effet protecteur du CNTF dépend du transport rétrograde dans un modèle lésionnel des colonnes intermédiolatérales de la moëlle épinière par surrénalectomie (Blottner *et al.*, 1989). L'hypothèse de la diminution de CNTF dans les processus neurodégénératifs ciblant les neurones cholinergiques comme la sclérose amyotrophique latérale apparaît mais n'est pas validée (Ebendal *et al.*, 1989). La même année, Lin *et al* (Lin *et al.*, 1989) purifient le CNTF issu du nerf sciatique de lapin et constatent l'absence d'un peptide d'adressage, suggérant ainsi une libération de CNTF suite à des dommages cellulaires. Le clonage de l'ADNc a permis : i) d'établir la structure primaire du CNTF, ii) de vérifier l'absence d'homologie significative avec d'autres neurotrophines et iii) de créer la première lignée de cellules recombinantes exprimant ce facteur. Cette dernière avancée constitue une base pour l'étude au niveau moléculaire des actions et fonctions du CNTF dans le SNC. Bien que principalement exprimé au niveau du SNC, certains organes périphériques, tels que les muscles squelettiques, sont capables de répondre au CNTF.

2. Le CNTF est un membre de la superfamille des cytokines.

2.1 Définition du terme cytokine

Le terme de cytokines désigne un groupe de peptides ou de protéines solubles de faible poids moléculaire qui agissent à faible concentration (nano- ou picomolaire) comme régulateurs de l'activité fonctionnelle de cellules individuelles ou de tissus (Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE). La nuance entre la notion de cytokine et la notion d'hormone est faible. Il est admis que les cytokines sont certes biologiquement proches des hormones en tant que facteurs agissant à faible dose et à distance, mais se distinguent de celles-ci en différents points : les hormones classiques sont chacune synthétisées par des cellules spécifiques, excrétées par des structures glandulaires situées dans un organe spécifique et agissent à distance sur des cellules très spécialisées selon un mode

endocrine. Chaque cytokine peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire par différents types cellulaires et agir sur un large spectre de cellules cibles selon les modes paracrine (la cible est dans le microenvironnement proche), juxtacrine (la cible jouxte la cellule émettrice), autocrine (la cellule émettrice est la cellule cible et les récepteurs sont membranaires), intracrine (la cellule émettrice est la cellule cible et les récepteurs sont cytosoliques) et endocrine (la cellule cible est à distance et la substance est véhiculée par le sang). Ces différences sont résumées dans le Tableau 9.

	Sources	Targets	Activities	Action
Hormones	Secreted by a unique cell lineage	Specificity rather limited to one single type of target cell	Single action	Endocrine
Cytokines	Produced by many cell types	Numerous target cells	Wide spectrum of activities (redundancy)	Paracrine Juxtacrine Autocrine Endocrine

Tableau 9 : Comparaison entre les cytokines et les hormones (Cavaillon JM, 2004)

Enfin, il existe une pléiotropie des effets dans le système des cytokines qui est absente dans le cas du système hormonal. D'une part plusieurs cytokines peuvent avoir un même effet, agir en synergie et avoir des fonctions compensatrices l'une par rapport à l'autre. D'autre part une cytokine peut avoir des effets différents selon le type cellulaire, mais aussi selon les influences auxquelles sont déjà soumises les cibles. Cette redondance confère une certaine souplesse au système des cytokines qui explique les souvent « faibles » répercussions au niveau phénotypique en cas de mutation génétique d'un gène codant pour une cytokine, ce qui dans le cas des hormones aboutit souvent à des pathologies graves.

2.2 Nomenclatures et généralités sur les cytokines

A l'origine, les cellules productrices de cytokines et les cellules cibles étaient des cellules immunitaires. Les premières nomenclatures mises en place portaient donc sur les « immunokines » divisées en deux principaux groupes : les lymphokines sécrétées par les lymphocytes et les monokines sécrétées par les macrophages, auxquelles ont été ajoutées plus tard les interférons, les chemokines, les facteurs stimulant les colonies et d'autres protéines. Les appellations cytokines de « type 1 ou 2 » font respectivement référence aux cytokines synthétisées par les lymphocytes T *helper* de type 1 ou 2. Cependant de nombreux autres types cellulaires comme les cellules endothéliales et épithéliales, les fibroblastes, les synoviocytes et certaines cellules du SNC sont également capables de produire des cytokines et/ou de répondre à celles-ci. En termes fonctionnels,

les cytokines interviennent donc originellement dans la régulation de la réponse immunitaire, des réactions inflammatoires et allergiques, mais aussi d'une pléthore de fonctions comme l'hématopoïèse, la reproduction et l'embryogénèse, le développement et le fonctionnement du SNC, la survie cellulaire ou l'apoptose (pour revue, Ponvert, 1997). Un grand nombre de cytokines a été recensé : le classement des cytokines a donc fait l'objet de vastes et nombreuses nomenclatures (qui ne seront pas passées en revue ici). Proposer une classification des cytokines didactique et représentative des propriétés de ces composés semble quasiment impossible tant il y a de membres, d'activités variées pour un même peptide et de redondance des effets pour différents composés.

Actuellement, deux nomenclatures sont utilisées. **La première nomenclature date des années 1990 et propose de regrouper les cytokines selon leurs structures secondaires et tertiaires** (Bazan *et al.*, 1990 ; Sprang & Bazan, 1993). Elle est simple et est majoritairement utilisée dans la littérature. Cette nomenclature propose de scinder les cytokines en différentes familles structurales (Haddad, 2002) (4 hélices α , feuillets β , trèfle β , feuillets β enroulés, nœud de cystéine, feuillets β en clé grecque) dont les principaux membres sont détaillés dans le tableau 10. Implicitement, cette nomenclature permet également de grouper les cytokines selon leurs récepteurs.

Cytokine family	Members	Receptor type
Haematopoietins (four α -helical bundles)	IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, G-CSF, GM-CSF, CNTF, OSM, LIF, and EPO	Cytokine receptor class I
	IL-10, IFN- α , IFN- β , and IFN- γ M-CSF	Cytokine receptor class II Tyrosine kinase
EGF (β -sheet)	EGF and TGF- α	Tyrosine kinase
β -Trefoil	FGF- α and FGF- β IL-1 α , IL-1 β , and IL-1ra	Split tyrosine kinase IL-1 receptor
TNF (Jelly roll motif)	TNF- α , TNF- β , LT- β	NGF/TNF receptor
Cysteine knot	NGF TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 PDGF and VEGF	NGF/TNF receptor Serine/threonine kinase Tyrosine kinase
Chemokines (triple-stranded, anti-parallel β -sheet in Greek key motif)	IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, PF-4, PBP, I-309/ TCA-3, MCP-1, MCP-2, MCP-3, γ IP-10	Rhodopsin superfamily

Tableau 10 : Classification des cytokines selon leur structure (Haddad, 2002)

Une deuxième nomenclature (exposée par Cavaillon JM, 2004) reprend la précédente nomenclature et tente de condenser i) les activités biologiques similaires (comme l'implication dans la réponse antivirale, l'hématopoïèse, la chimiotaxie), ii) une structure biochimique commune ou iii) le partage d'une sous unité commune dans leur récepteur. Selon cette nomenclature, les cytokines peuvent être scindées en différentes familles : les interleukines (IL), les interférons (IFN), les facteurs hématopoïétiques (composés majoritairement par les facteurs stimulants les colonies : les CSF pour *Colony Stimulating Factors*), les chémokines, la superfamille du Facteur de Nécrose Tumorale (TNF pour *Tumor Necrosis Factor*) et la famille des cytokines signalant par la glycoprotéine gp130. Quelques membres de ces familles sont détaillés dans le tableau 11.

Interferons	IFN α , IFN β , IFN γ , IFN δ , IFN κ , IFN τ , IFN λ
Interleukins ¹	IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-1F5-10 IL-2, IL-15, IL-21 IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-26 IL-12, IL-23, IL-27 IL-17A-E, IL-25 IL-28, IL-29 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 IL-8 (CXCL8), IL-9, IL-11, IL-13, IL-14, IL-16
Hematopoietic factors	M-CSF, G-CSF, GM-CSF, Stem cell factor
Chemokines	CCL1 ... CCL28 ; CXCL1 ... CXCL16 ; XCL1, XCL2 ; CX3CL1
TNF superfamily	TNF, Lt α , Lt β , NGF, CD27L, CD30L, CD40L, CD137L, APRIL, BAFF, FasL, GITRL, LIGHT, OPGL TRAIL, RANKL, TWEAK, VEGI.
Growth factors	TGF β _{1,2,3}
Gp130 cytokine family	IL-6, IL-11, CNTF, LIF, Oncostatin-M, Cardiotrophin-1

¹ Biochemically related interleukins are framed.
APRIL: apoptosis-inducing ligand; BAFF: B cell-activating factor; CCL: chemokine CC ligand; CNTF: ciliary neurotrophic factor; CSF: colony-stimulating factor; CXCL: chemokine CXC ligand; GITRL: glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene ligand; IL-1F: IL-1 family; LIF: leukemia inhibitory factor; LIGHT : lymphotoxins, inducible expression, competes with HSVglycoprotein D for HVEM, a receptor expressed on T-lymphocyte; Lt: lymphotoxin; OPGL: osteoprotegerin ligand; RANKL: receptor activator of NF-kappaB ligand; TGF β : transforming growth factor- β ; TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand; TWEAK: TNF-like weak inducer of apoptosis; VEGI: vascular endothelial cell growth inhibitor.

Tableau 11: Les familles de cytokines (d'après Cavaillon JM, 2004, Molecular Mediators Cytokines, Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine IInd Edition)

Il est important de préciser que cette « méta-nomenclature » bien qu'étant peu utilisée en tant que telle, mérite d'être énoncée car elle propose explicitement dans sa classification la prise en compte de la composition en sous-unités des récepteurs en plus des propriétés biologiques et structurales des ligands. Or, de plus en plus d'auteurs i) se focalisent sur l'impact du partage d'une sous-unité commune, comme la gp130 (glycoprotéine 130) ou le LIFr (*Leukemia Inhibitory Factor Receptor*), sur le fonctionnement de récepteurs multimériques (Boulanger & Garcia, 2004 ; Skiniotis *et al.*, 2008) et ii) définissent de cette façon des ensembles de ligands (Hirano *et al.*, 1997 ; Boulanger *et al.*, 2003a). Certains composés apparaissent donc dans différentes catégories comme l'IL6 qui est positionnée à la fois dans les interleukines et dans la famille utilisant le gp130.

2.3 Structure de la famille des Hématopoïétines

Les membres de la famille des hématopoïétines ne partagent que peu ou pas d'homologie entre eux. En revanche, ces peptides/protéines présentent des structures tridimensionnelles proches. Cette famille regroupe les cytokines riches en hélices α (Bazan *et al.*, 1990). On distingue deux catégories de cytokines selon le nombre d'hélices α que forme la protéine : les cytokines de classe 1 et les cytokines de classe 2.

Les cytokines de classe 1 possèdent 4 hélices α caractéristiques, notées de A à D, arrangées en paires antiparallèles selon une conformation dite « up-up-down-down ». Les membres de cette famille sont très bien conservés au cours de l'évolution et ont leurs orthologues dans les classes animales phylogénétiquement en amont (Huising *et al.*, 2006, figure 13).

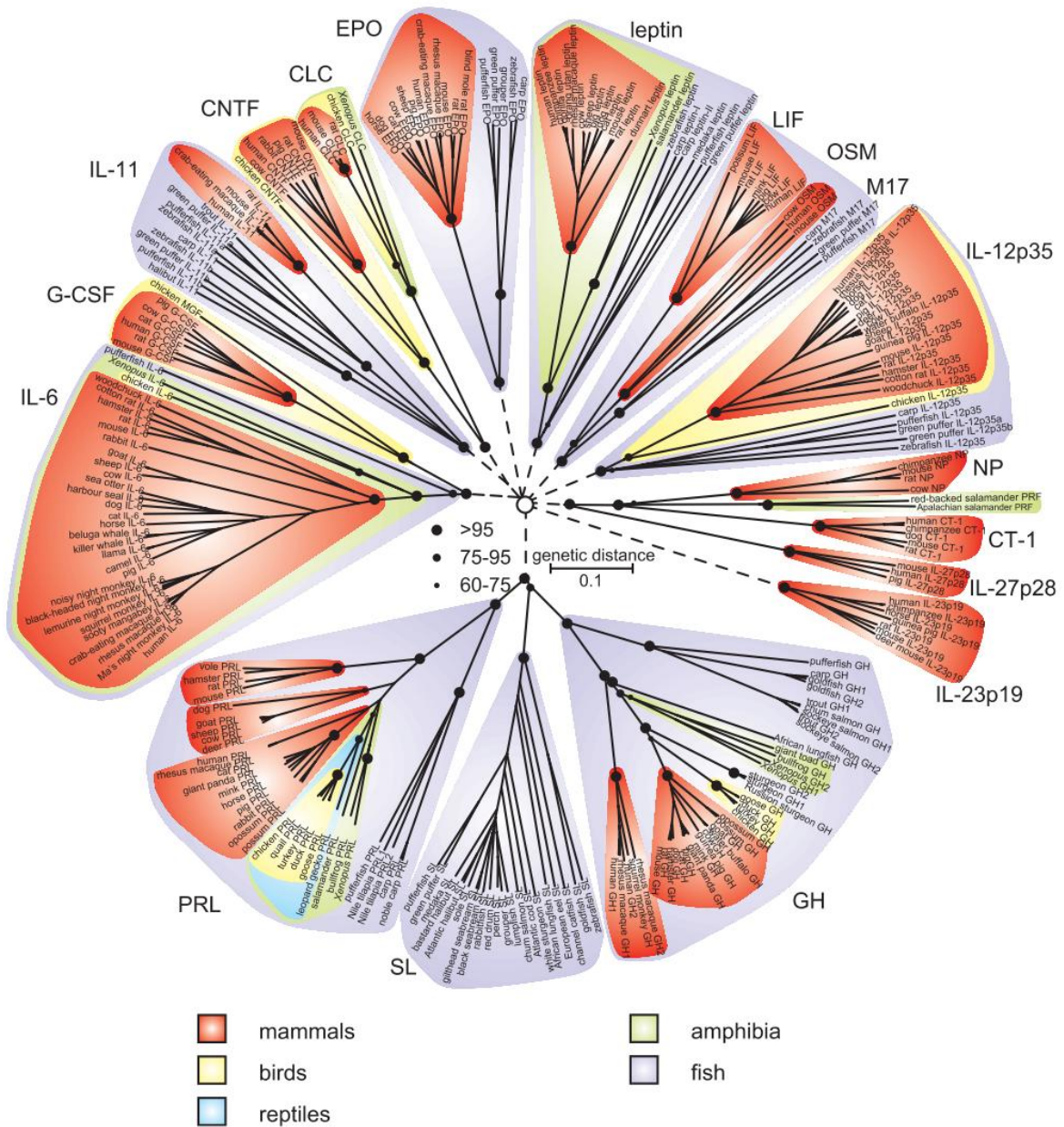


Figure 13 : Évolution phylogénétique des cytokines de classe 1 (d'après Huising *et al.*, 2006)

La classe 1 des cytokines se divise en deux sous-groupes selon le nombre de résidus composant les hélices α : les cytokines hélicales à longue chaîne (de 10 à 20 résidus par hélice) et les cytokines hélicales à courte chaîne (de 8 à 10 résidus par hélice) (Sprang et Bazan, 1993; Davies & Wlodawer, 1995). La plupart du temps, l'arrangement tridimensionnel des hélices est stabilisé grâce à un nombre variable de ponts disulfures (figure 14).

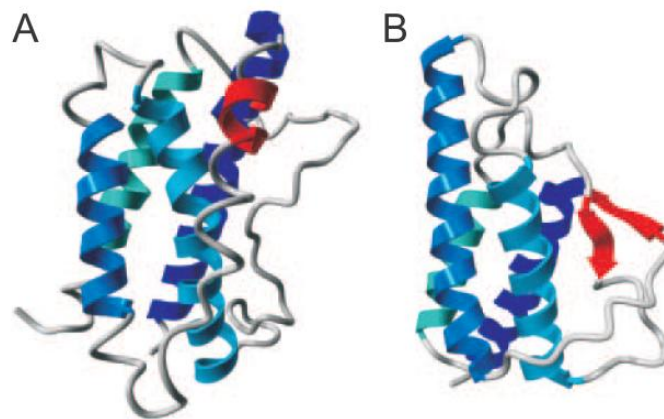


Figure 14 : Structure tridimensionnelle des cytokines à longue chaîne (A) et courte chaîne (B) (d'après Huisling *et al.*, 2006).

Parmi les cytokines de classe 1 à chaîne longue sont comprises TPO, GH, PRL, CLC, **CNTF**, CT-1, G-CSF, LPT, OSM, IL-6, IL-11, IL-12p35, IL-23p19, IL-27p28, IL-31, LIF. Ces peptides peuvent être encore divisés en deux sous-catégorie selon la composition de leur récepteur. Les cytokines à chaîne courtes comprennent : IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-21, GM-CSF, TSLP, FLT3L, M-CSF, SCF, EPO. Les cytokines de classe 2 possèdent plus de 4 hélices α et sont celles apparentées à la famille de l'IL10, de l'IL-20 et des interférons IFN α , β , γ (Krause & Petska, 2005).

Le CNTF est une cytokine hélicale à chaîne longue de classe 1 recrutant la gp130 dans son récepteur. Il a été déterminé par cristallographie à rayon X (MAD : *Multi-wavelength Anomalous Diffraction*) que le monomère CNTF possède 4 hélices α (figure 15, McDonald *et al.*, 1995). Trois sites ont donc été identifiés dans les interactions avec son complexe-récepteur (Skiniotis *et al.*, 2008) : le site I sert à la reconnaissance du CNTF α (Panayotatos *et al.*, 1995), le site II serait engagé dans la reconnaissance du CNTF par la sous-unité gp130 (Panayotatos *et al.*, 1995 ; Inoue *et al.*, 1995), tandis que le site III serait engagé dans la reconnaissance du CNTF par la sous-unité LIFr (Inoue *et al.*, 1996 ; Bitard *et al.*, 2003).

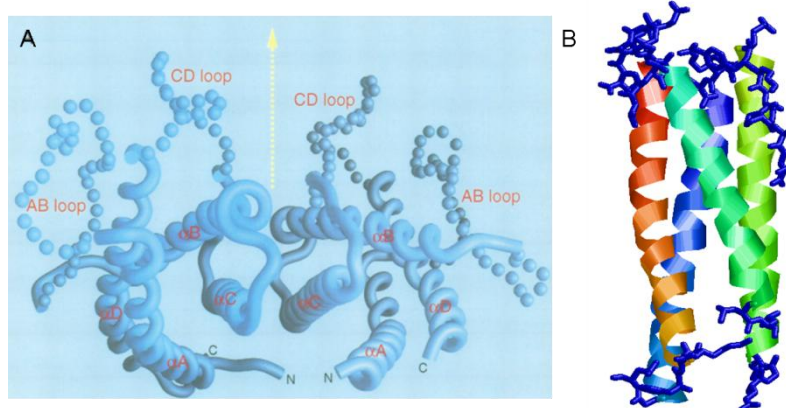


Figure 15: Représentation de la structure d'un dimère de CNTF déterminé par cristallographie (A, d'après McDonald *et al.*, 1995). Chaque monomère est composé de 4 hélices α (B, modélisation RASMOL, PDB ID : 1CNT).

En accord avec la classification résumée par Haddad (Haddad *et al.*, 2002), le CNTF est donc une cytokine dont la structure tertiaire est semblable aux cytokines de classe 1 à longue chaîne de la classe des hématopoïétines. N'étant pas un facteur hématopoïétique en soi, l'appartenance du CNTF à cette classe est justifié (en plus de sa topologie) par la présence dans son complexe récepteur de la sous-unité gp130 commune à un grand nombre de récepteur des cytokines hélicales de classe 1 (pour revue Ernst et Jenkins, 2004). Dans le même sens, le complexe récepteur du CNTF (qui sera détaillé un peu plus loin) partage même deux de ses trois sous unités avec le récepteur basique du LIF : le dimère gp130-LIFr (Davis *et al.*, 1993b).

3. Le récepteur du CNTF

Les récepteurs aux cytokines à longue chaîne se divisent en deux sous-groupes selon leur composition incluant soit un homodimère gp130-gp130 (cas de l'IL-6), soit un hétérodimère gp130-LIFr dans le cas du LIF et du CNTF (Davis *et al.*, 1993b) (figure 16). Le récepteur au CNTF est un complexe hétérotrimérique. Il se compose d'une sous-unité α non transductrice liant le CNTF lui-même (le CNTFr α) et d'une assemblée transductrice formée d'un hétérodimère de glycoprotéine 130 et du récepteur au LIF (LIFr β). Ces trois composantes sont essentielles à l'initiation de la signalisation induite par le CNTF (Davis *et al.*, 1993b).

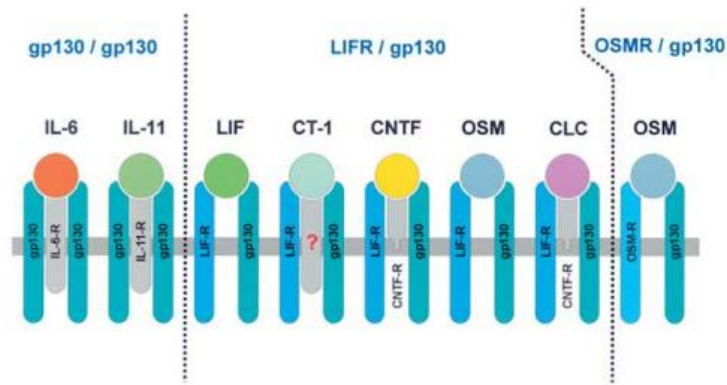


Figure 16 : combinaisons d'assemblages des sous-unités dans les récepteurs recrutant la gp130 (d'après Heinrich *et al.*, 2003)

En préambule à la description de ces sous-unités, il est important de garder à l'esprit que les sous unités des récepteurs aux cytokines ont des structures très proches qui découlent de leur organisation en modules homologues (pour revue Boulanger & Garcia, 2004, figure 17). Ces sous-unités dériveraient d'un « ancêtre » commun qui serait assimilable à un dimère de gp130 (Shields *et al.*, 1995). Ces protéines représentent l'outil de prédilection pour l'étude des interactions entre les domaines des sous-unités, de la signalisation et des fonctions des cytokines.

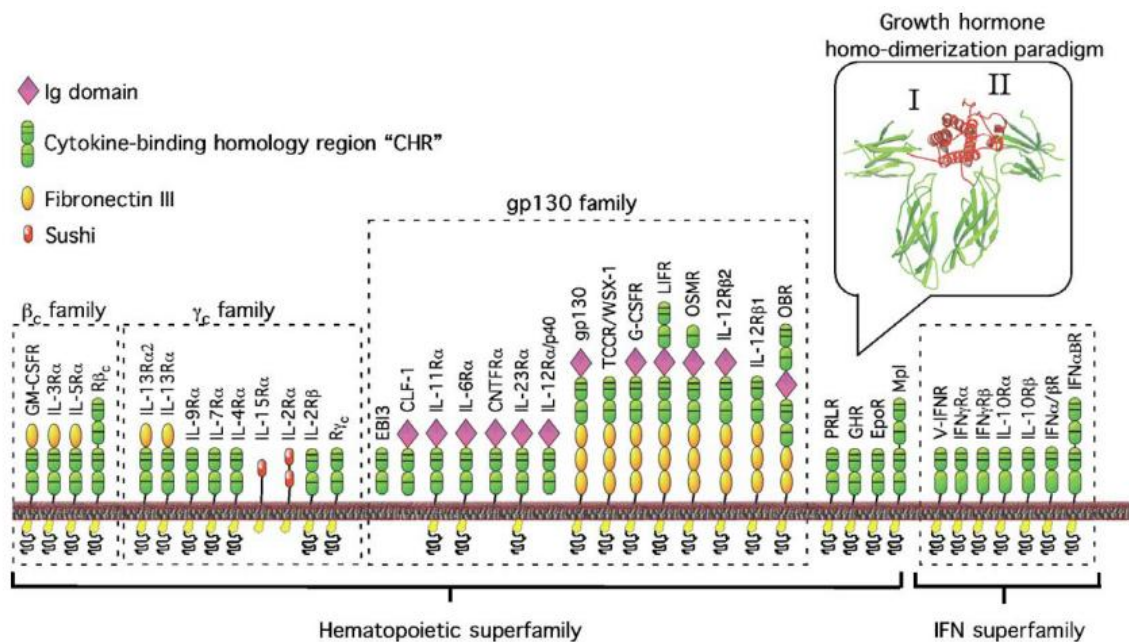


Figure 17 : composition modulaire des sous-unités des récepteurs aux hématopoïétines (d'après Boulanger & Garcia, 2004)

Les régions cytoplasmiques des sous-unités interagissent pour initier la signalisation induite par la fixation du CNTF à son récepteur. Le principe est le suivant (figure 18): le rapprochement des domaines intracellulaires induit l'activation des JAKs (*Janus Kinase*) qui leur sont constitutivement associées. À leur tour, les JAKs activées vont phosphoryler les résidus tyrosine des domaines intracellulaires du récepteur. Ces tyrosines phosphorylées vont permettre le recrutement de protéines cytosoliques latentes par leur domaine SH2 (*Src Homology domain 2*) parmi lesquelles les facteurs de transcription STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), qui seront activés par phosphorylation. Leur activation permet leur dimérisation et leur translocation au noyau pour y induire la transcription de gènes cible, dont certains répresseurs de l'activité kinase des JAKs (les SOCS, *Suppressor Of Cytokine Signaling*). Certaines tyrosines phosphatases munies d'un domaine SH2 sont aussi recrutées par les domaines intracellulaires du LIFr et de gp130. L'activation de la phosphatase SHP2, va permettre indirectement l'activation des voies de signalisation RAS, PI3K et ERK. En parallèle, un rétrocontrôle négatif est induit par les SOCS. D'autres inhibiteurs de STATs, les PIAS, participent au rétrocontrôle négatif.

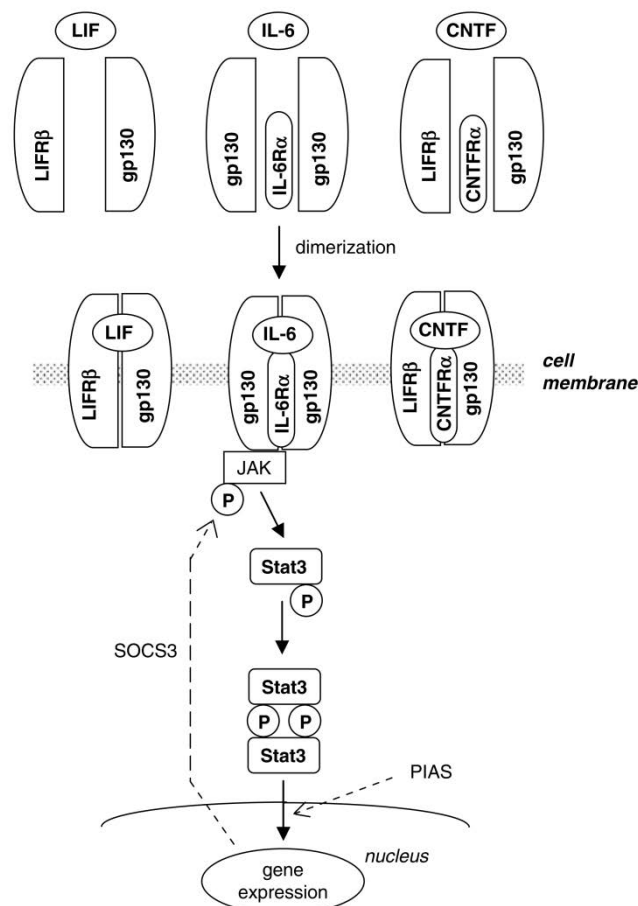


Figure 18 : principe de l'induction de la voie STAT par les cytokines utilisant le dimère gp130-LIFr (d'après Suzuki *et al.*, 2009).

3.1 L'assemblée transductrice

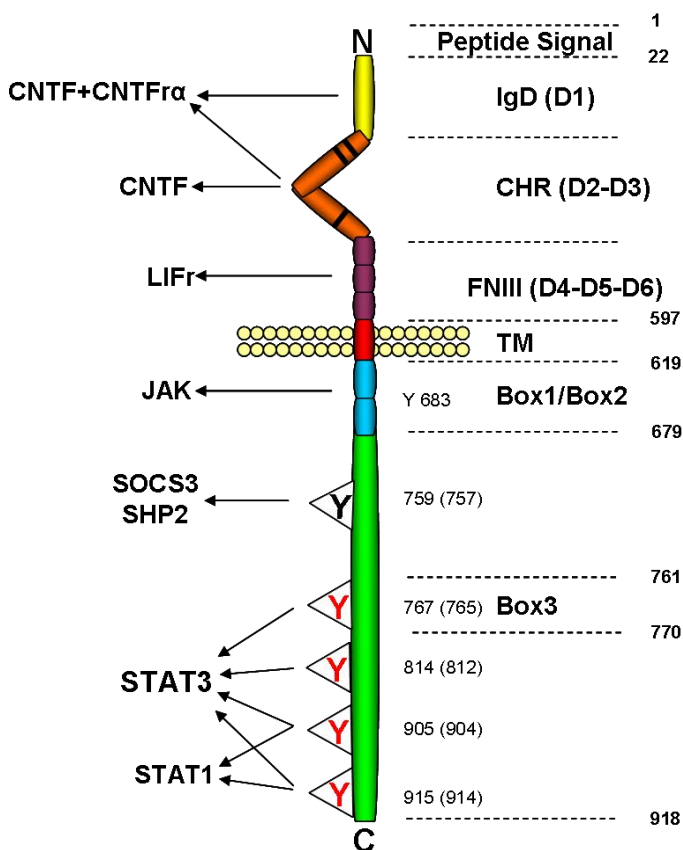
Les méthodes d'études du rôle de chaque sous-unité et de leur implication font l'objet de schémas de démonstration récurrents. La tactique expérimentale d'étude de la dimérisation des sous-unités et/ou de la fixation du ligand consiste à faire exprimer dans un système cellulaire « neutre » (le plus souvent des cellules COS-7) une ou plusieurs des sous unités étudiées dont les domaines intracellulaires ont été mutés ou échangés. Ainsi, l'ajout d'un ligand putatif des domaines extracellulaires étudiés permet d'induire une cascade de signalisation spécifique des tronçons intracellulaires substitués témoignant de la fixation du ligand et de l'interaction entre les sous-unités.

Les approches visant quand à elles à étudier la signalisation propre à chaque sous-unité sont basées sur l'expression de protéines mutantes dont les domaines extracellulaires ont été substitués par l'ectodomaine d'autres récepteurs aux cytokines afin d'homodimériser expérimentalement la sous-unité étudiée et d'induire sa signalisation. Pour déterminer plus finement le rôle des domaines intracellulaires dans la signalisation induite, cette approche est combinée à des délétions/mutations au niveau des domaines intracellulaires.

3.1.1 La sous-unité gp130

La gp130 est une glycoprotéine transmembranaire de 130 kDa. C'est le membre le plus représenté parmi les récepteurs aux cytokines de classe 1 à longue chaîne définissant la famille signalant *via* la gp130 (Hirano *et al.*, 1997). *In vivo*, la délétion du gène de la gp130 chez la souris entraîne une mort *in utero* des embryons entre 12 jours *post-coitum* et le terme. Les embryons présentent une atrophie sévère, des problèmes de développement cardiaques, des anomalies hématopoiétiques et des cellules germinales (Yoshida *et al.*, 1996). Malgré l'absence d'étude sur la surexpression de gp130 *in vivo*, il a été montré que l'activation chronique de gp130 induit une hypertrophie cardiaque (Hirota *et al.*, 1995).

La gp130 est composée de 3 domaines : un ectodomaine extracellulaire (597 aa), un domaine transmembranaire (22 aa) et un domaine cytosolique (277 aa) essentiel à la transduction du signal. Afin d'assurer l'adressage à la membrane de gp 130, l'ADNc code en plus pour un peptide signal N-terminal de 22 aa (Hibi *et al.*, 1990) (Figure 19).



À gauche : les partenaires de gp130 dans la signalisation du CNTF (CNTF : *Ciliary neurotrophic factor* ; CNTF α : récepteur du CNTF ; LIFr : récepteur du LIF ; JAK : Janus Kinase ; SOCS3 : *Suppressor Of Cytokine Signaling* ; SHP2 : protéine tyrosine phosphatase ; STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*).

À droite : les différents modules de la gp130 humaine et leur emplacement (IgD : domaine immunoglobuline ; CHR : domaine de liaison des cytokines *cytokine homology region* ; FNIII : domaines fibronectine ; TM : domaine transmembranaire ; Box : domaines intracellulaires conservés ; Y : tyrosine phosphorylable et leur n°, entre parenthèse leur équivalence chez la souris). Y683 est une tyrosine non requise pour la signalisation.

Figure 19 : La structure modulaire de gp130 .

L'ectodomaine de 597 résidus se décompose en 3 parties scindées en 6 modules, notés D1 à D6 à partir de l'extrémité N-terminale (la plus distale de la membrane). Sa structure est complexe (Xu *et al.*, 2010) et fait l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles (Moritz *et al.*, 2001). **La partie N-terminale est un domaine analogue à une immunoglobuline D (IgD)** constitué d'un unique module (D1). Les mutations de ce domaine empêchent la signalisation (phosphorylation de STAT) et les réponses cellulaires induites par l'IL-6, mais pas celles induites par le LIF. Ceci suggère un rôle du domaine IgD dans l'homodimérisation gp130-gp130, mais pas dans l'hétérodimérisation gp130-LIFr *in vitro* (Hammacher *et al.*, 1998). **La deuxième partie est la partie dite CHR (Cytokine-binding Homology Region) ou CBD (Cytokine Binding Domain).** Elle est composée des domaines D2 et D3. Le domaine D2 renferme 2 ponts disulfures conservés (Cys 112- Cys 122 et Cys 150 - Cys 160) (Bravo *et al.* 1998, Moritz *et al.*, 2001) et le domaine D3 renferme un motif consensus « WSxWS » (Tryptophane 310 - Sérine 311 - acide aminé X 312 - Tryptophane 313 - Sérine 314) (Bazan *et al.*, 1990) (figure 20). Ce domaine CHR est un site de fixation du ligand et les études de délétion ont montré que ce domaine est recruté pour l'interaction avec le ligand dans le cas de l'IL-6 (Horsten *et al.*, 1995). Ce site peut lier le CNTF α seul en absence de CNTF (Man *et al.*, 2003). En absence de CNTF α , seul le site CHR peut lier le CNTF, et en présence de CNTF α , le domaine CHR et le domaine IgD sont recrutés (He *et al.*, 2005). L'ensemble D2-D3 est donc impliqué dans la reconnaissance des différentes cytokines : sa faible flexibilité due à la forme coudée en angle droit de l'interdomaine

(Boulanger *et al.*, 2003a) présente un avantage pour reconnaître différent membre d'une famille structurale. En effet, la structure globale de ce domaine de gp130 est hautement conservée entre les récepteurs aux diverses cytokines de classe 1 (Kernebeck *et al.*, 1999).

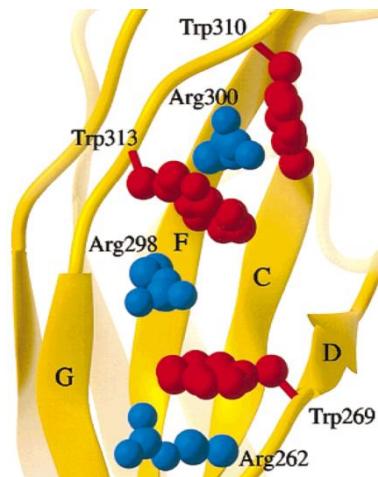


Figure 20 : Implication du domaine consensus WSxWS dans la formation d'une structure « Arginine Zipper » (d'après Kernebeck *et al.*, 1999)

Enfin, **la partie de l'ectodomaine proximale à la membrane** se compose d'une triple répétition d'un même module (composé de 7 feuillets β) semblable à la Fibronectine III (FN III), notés D4 à D6. La délétion d'un de ces 3 domaines, ou la substitution d'un des domaines FNIII par le domaine équivalent issu d'autres récepteurs aux cytokines abolit la signalisation (plus précisément la phosphorylation de STAT) induite par des anticorps, l'IL-6 (Kurth *et al.*, 2000) ou par le LIF (Timmermann *et al.*, 2002). La partie proximale de gp130 influence l'affinité du LIF pour le LIFr (Hammacher *et al.*, 2000). Le module D5 possède un rôle plus important que les modules D4 et D6. La délétion de D4 ou D6 (gp130 Δ 4 ou Δ 6) n'entraîne qu'une perte partielle de la signalisation induite par le ligand. Les gp130 Δ 4 ou Δ 6 présentent une sensibilité, certes amoindrie aux effets agonistes ou antagonistes de certains anticorps, qui est abolie lors de la délétion de D5 (Kurth *et al.*, 2000). Il a également été montré que le D5 module l'hétérodimérisation de gp130 avec le LIFr et en conséquence l'activité du récepteur : la mutation C458A de gp130 induit la dimérisation constitutive avec le LIFr et l'activation chronique du récepteur en absence de ligand (Timmerman *et al.*, 2002). Ces domaines FNIII présentant une certaine flexibilité, il a donc été proposé qu'ils régulent l'activation et la spécificité du signal après fixation du ligand en orientant correctement les domaines intracellulaires (Skiniotis *et al.*, 2005).

La partie transmembranaire (TM) de la gp130 possède bien plus qu'un simple rôle d'ancrage de la protéine à la membrane. Ce domaine forme une hélice transmembranaire (Hibi *et al.*, 1990). *In vitro*, la délétion du domaine transmembranaire de gp130 (BCRgp130 Δ TM) atténue fortement la phosphorylation des résidus tyrosines intracellulaires impliqués dans la signalisation STAT. Bien que

possédant un domaine TM, la protéine de fusion BCRgp130 reste cytoplasmique et peut activer la transcription d'un gène rapporteur contrairement à BCRgp130 Δ TM (Kim & Baumann, 1997). *In vivo*, la perte fonctionnelle liée à la délétion du domaine TM a servi de base pour la création d'animaux knock-out inductibles par le système Cre/LoxP (pour revue, Rajewsky *et al.*, 1996): l'exon 16 du gène de la gp130, codant pour le domaine TM, a été flanqué de séquence Lox-P pour en permettre l'excision et induire l'expression d'une protéine non-fonctionnelle. La délétion constitutive du domaine TM est létale. Elle se manifeste par une atrophie sévère et la mort des embryons 18 jours après fécondation (Betz *et al.*, 1998) de manière similaire aux cas des animaux transgéniques gp130 knock-out (Yoshida *et al.*, 1996). La similitude des atteintes entre ces deux méthodes d'inactivation de gp130 *in vivo* confirme l'importance du domaine TM dans la transduction du signal. Cependant les mécanismes conformationnels impliquant le domaine TM qui rendent possible le couplage entre la fixation du ligand au niveau extracellulaire et l'induction d'une signalisation intracellulaire restent à élucider.

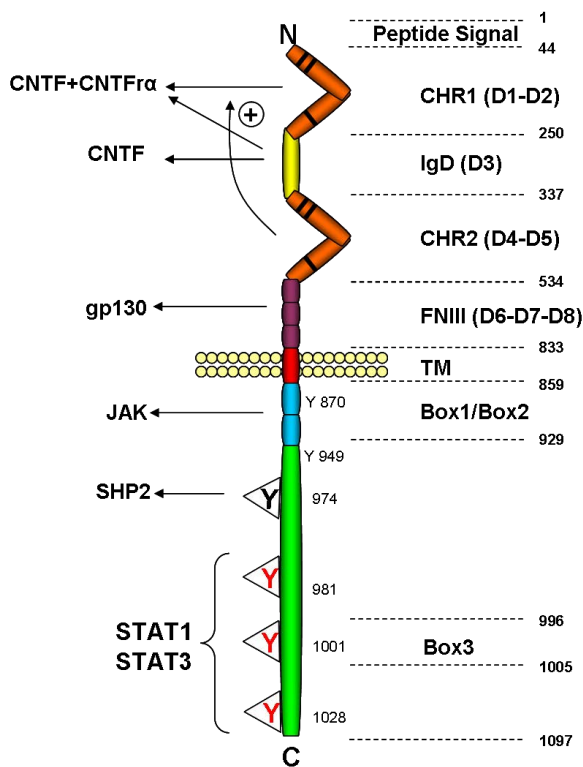
La partie C-terminale cytoplasmique de gp 130 est le site d'initiation de la signalisation intracellulaire. Ce domaine ne possède pas d'activité kinase intrinsèque (d'où la qualification de NTK de gp130, « non-tyrosine-kinase »), mais des expériences de coimmunoprécipitation de gp130 en absence de ligand ont montré que la gp130 est constitutivement liée aux Janus Kinases JAK 1/2 et Tyk2 (Stahl *et al.*, 1994). Le domaine cytoplasmique de gp130 contient des séquences conservées (appelées Box 1 et 2) comprises dans les 61 premiers acides aminés intracellulaires et dont l'intégrité est requise pour la transduction du signal *in vitro* (Murakami *et al.*, 1991). La délétion des acides aminés après le n°61 (gp130 Δ B) n'empêche pas la coimmunoprécipitation gp130 Δ B-JAK mais prévient l'activation de STAT1 induite par un ligand. Les expériences de délétion sélective de Box 1 ou 2 ont démontré la nécessité des Box d'une part pour l'interaction constitutive gp130-JAK1 en absence de ligand et d'autre part pour l'activation de STAT en présence de ligand.

Après la dimérisation gp130-LIFr, les JAKs dimérisées et activées par autophosphorylation mutuelle vont phosphoryler les résidus tyrosines du domaine intracellulaire de gp130 (Y757, Y765, Y812, Y904 et Y914) qui pourront interagir avec le domaine SH2 (Src domain Homology 2) de protéines cytosoliques pour les activer. Ces tyrosines sont incluses dans des motifs peptidiques différents qui après phosphorylation vont servir de site de recrutement à divers ligands intracellulaires (Stahl *et al.*, 1995 ; pour revue Cohen, 2000). Par exemple, le motif Tyrosine-x-x-Valine (YxxV) concernant uniquement la tyrosine 757 (759 chez l'Homme) est un site de recrutement pour la phosphatase SHP2 et le répresseur SOCS3 mais pas SOCS 1 (Schmitz *et al.*, 2000). Les motifs Tyrosine-x-x-Glutamine (YxxQ), concernant les quatre tyrosines C-terminales, permettent de recruter le facteur STAT3. Une séquence conservée Box3 VxxxGYK/RxQ (comprenant Y767 ; YRHQ), comprise dans la portion intracellulaire 761-770, a été reportée comme étant importante dans l'induction de l'activité d'un gène rapporteur (Baumann *et al.*, 1994). Cette portion participe donc en partie au recrutement de STAT. Les deux dernières tyrosines peuvent également participer au recrutement de STAT1 car elles sont enclavées dans un motif YxPQ (Gerhartz *et al.*, 1996). **Il est essentiel à l'induction du signal que les résidus tyrosine soient disponibles à la phosphorylation.** La signalisation induite par le CNTF est transitoire dans les cellules nerveuses (environ 2h) et l'inhibition des tyrosines phosphatases par le PTP (*Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor 2*) ou le PAO (*Phenyl Arsine Oxyde*) prévient l'autophosphorylation des JAK et l'activation de STAT (Jiao *et al.*, 2003).

Cependant, les auteurs de cette observation n'évoquent pas la possible différence d'implication des sous-unités requises pour la signalisation du CNTF (*i.e.* gp130 versus LIFr) dans ce phénomène. La signalisation induite à travers gp130 pourrait donc être doublement paradoxale puisque i) la fixation du ligand va activer une voie et son rétrocontrôle négatif par des régions différentes du même récepteur mais aussi car ii) les mécanismes d'inhibition de la voie induite sont nécessaires pour sa remise à zéro. Les voies de signalisations induites par le CNTF seront développées plus loin.

3.1.2 La sous-unité LIFr

La deuxième sous-unité composant le récepteur au CNTF est le récepteur au LIF (LIFr) (Davis *et al.*, 1993b). Le LIFr est une glycoprotéine transmembranaire de 190 kDa (d'où son autre appellation de gp190) qui possède une organisation modulaire similaire à celle de gp130. L'ADNc du LIFr humain encode un peptide signal N-terminal de 44aa, un ectodomaine de 789aa, une partie TM de 26aa et une queue cytoplasmique de 238aa (Gearing *et al.*, 1991) (figure, 21). *In vivo*, l'inactivation constitutive du gène du LIFr chez la souris induit une mort périnatale due à une combinaison de problèmes hépatiques et neuronaux (perte d'astrocytes dans la moëlle épinière) (Ware *et al.*, 1995) sans présenter les déficits hématopoïétiques ou germinaux observés chez les animaux gp130^{-/-} (Yoshida *et al.*, 1996).



À droite : les différents modules du LIFr humain et leur localisation (IgD : domaine immunoglobuline ; CHR 1 : domaine de liaison des cytokines *cytokine homology region 1* ; FNIII : domaines fibronectine ; TM : domaine transmembranaire ; Box : domaines intracellulaires conservés ; Y : tyrosine phosphorylable et leur n°. Y870 et Y949 sont des tyrosines non requises pour la signalisation.

A gauche : les partenaires de gp130 dans la signalisation du CNTF (CNTF : *Ciliary neurotrophic factor* ; CNTFα : récepteur du CNTF ; LIFr : récepteur du LIF ; JAK : Janus Kinase ; SOCS3 : *Suppressor Of Cytokine Signaling* ; SHP2 : protéine tyrosine phosphatase ; STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription* ; + : effet facilitateur du CHR2 sur le CHR1).

Figure 21 : La structure modulaire du LIFr

L'ectodomaine se décompose en quatre régions, scindées en 8 modules notés D1 à D8 à partir de l'extrémité N-terminale. Globalement, il recèle 19 des 20 sites potentiels de N-glycosylation de la protéine (motif DxS ou DxT), contient le domaine canonique WSxWS de reconnaissance des cytokines de classe 1 et la triple répétition du domaine FNIII proximale à la membrane (Gearing *et al.*, 1991). Le LIFr se démarque des autres récepteurs aux cytokines à longue chaîne par la présence d'un domaine CHR supplémentaire après l'extrémité N-terminale du domaine IgD et cette particularité n'est retrouvée que pour le récepteur à la leptine, ObR.

La région N-terminale est le domaine CHR1 composée des modules D1 et D2 (aa45 - aa250). Cette région, comme le CHR de gp130, est impliquée dans la reconnaissance et la fixation du ligand. Des expériences de délétions combinées des différents modules extracellulaires du LIFr ont identifié le domaine CHR1 comme étant le site de fixation du CNTF α indépendamment de la présence de CNTF (He *et al.*, 2002). En présence des deux parties CNTF/CNTF α , le domaine IgD du LIFr est alors recruté en plus du premier domaine CHR1 (He *et al.*, 2002 ; He *et al.*, 2005). Le CHR1 est également impliqué dans la reconnaissance du LIF et sa fonctionnalité dépend d'une interaction avec le CHR2 (Taupin *et al.*, 1999 ; Voisin *et al.*, 2002).

La deuxième région est un domaine IgD composé d'un unique module D3 et impliqué directement dans la reconnaissance du ligand (aa251 - aa337). Il a été reporté, qu'à forte concentration le CNTF seul était capable d'induire une réponse cellulaire (Saggio *et al.*, 1995). En effet, le CNTF peut interagir directement avec le domaine IgD du LIFr en absence du CNTF α (He *et al.*, 2005). La présence dans l'IgD d'un pont disulfure C194 (D2)- C251 (D3) lui confère une forme coudée, ayant probablement pour rôle de maintenir le CHR1 accessible (Skiniotis *et al.*, 2008). La rigidité découlant de ce pont disulfure permettrait donc le maintien d'un épitope accessible au CNTF, y compris lorsque celui-ci est complexé au CNTF α . Dans le cas du LIF, la double mutation F328T - A329S du LIFr abolit la fixation du ligand (Taupin *et al.*, 1999). La composition du domaine IgD peut moduler l'affinité du LIFr pour son ligand : la substitution par des alanines (Alanine scan) de chacun des acides aminés entourant cette région (aa323-aa330) atténue la fixation du ligand mais ne l'abolit pas, montrant l'influence de la structure de l'environnement créé par ces résidus. Il est suggéré que la Glycine 324 intervient directement dans la liaison avec le site III du CNTF (Bitard *et al.*, 2003).

La région proximale à la membrane de l'ectodomaine est une triple répétition d'un même module FNIII (D6-D7-D8) à fonction structurante (aa535 - aa833). Le domaine FNIII D7 du LIFr est impliqué dans l'hétérodimérisation gp130-LIFr par une interaction avec le domaine FNIII D5 de gp130 (Timmermann *et al.*, 2002). Ce domaine n'a donc pas de rôle direct dans la fixation du ligand mais possède un rôle structurant fort et est nécessaire à l'hétérodimérisation du LIFr.

Le domaine TM (aa834 - aa859) pourrait, en plus de sa fonction d'ancrage, moduler l'affinité du récepteur pour le ligand. Il présente 65% de similarité avec le domaine TM de gp130 (Gearing *et al.*, 1991) dont l'importance pour l'induction des STATs a été démontrée (Kim et Baumann, 1997). Malgré cette similitude, l'influence du segment transmembranaire du LIFr sur la médiation des signaux extracellulaires n'a pas fait l'objet d'études aussi poussées que pour gp130 (Kim et Baumann, 1997).

Le domaine intracellulaire du LIFr est le site initiant une signalisation intracellulaire semblable à celle de gp130 (aa860 - aa1097). Il comporte les 3 domaines Box et contient 6 tyrosines (Y870; Y949; Y974; Y981; Y1001; Y1028) (Gearing *et al.*, 1991 ; Tomida *et al.*, 1999) dont certaines sont susceptibles d'être phosphorylées après fixation d'un ligand (Stahl *et al.*, 1995). Tout comme la gp130, l'intégrité de la queue cytosolique du récepteur est indispensable à sa signalisation : les expériences de délétion sélective et consécutive des domaines C-terminaux ont établi que la délétion complète du domaine intracellulaire du LIFr abolissait l'induction de l'expression du gène rapporteur CAT ou les effets biologiques du LIF. En effet, ce domaine est responsable du recrutement des partenaires intracellulaires du LIFr essentiels à la signalisation (Stahl *et al.*, 1994 ; Hermanns *et al.*, 1999).

3.2 La sous-unité CNTFr- α

La sous-unité CNTFr α du complexe-récepteur au CNTF est une sous unité n'induisant aucune signalisation *per se* mais est un adaptateur nécessaire à la signalisation induite par le CNTF. *In vivo*, l'inactivation constitutive du gène codant pour le CNTFr α chez la souris provoque une mort périnatale des animaux homozygotes dans les premières 24h tandis que les animaux hétérozygotes ont un phénotype normal (DeChiara *et al.*, 1995). Il a précédemment été relaté que l'inactivation du gène du CNTF n'induisait « que » des troubles moteurs chez l'adulte mature, sans mort périnatale (Masu *et al.*, 1993). La différence de phénotype entre les animaux CNTF^{-/-} (viabiles) et CNTFr α ^{-/-} (inactivation létale) suggère l'existence d'autres ligands du complexe récepteur du CNTF (voir partie autres ligands). L'excision conditionnelle du gène du CNTFr α chez la souris dans les motoneurons faciaux induit une dégénérescence rapide de ces cellules (Lee *et al.*, 2008). *In vitro*, la stimulation au LIF, mais pas au CNTF, permet d'induire la phosphorylation des sous-unités transductrices gp130 et LIFr dans les neurones sensoriels des ganglions de la corne dorsale d'embryons d'animaux CNTFr α ^{-/-} indiquant la nécessité du CNTFr α dans la réponse au CNTF (Lee *et al.*, 2008). En parallèle, il a plusieurs fois été montré *in vitro* que le CNTF seul (mais à des doses importantes de l'ordre de la centaine de ng/mL) pouvait induire une signalisation (Davis *et al.*, 1993a ; Saggio *et al.*, 1995 ; Ozog *et al.*, 2008) et qu'en présence de CNTFr α , de bien plus faibles doses étaient requises pour obtenir un effet maximum. L'ensemble CNTF/CNTFr α a donc une affinité accrue pour l'assemblée transductrice gp130-LIFr. Enfin, le CNTFr α potentialise les effets du CNTF contre l'excitotoxicité du glutamate (Ozog *et al.*, 2008). L'ensemble de ces faits met en avant l'importance du CNTFr α dans la réponse au CNTF *in vivo* et *in vitro*.

Les études d'immunolocalisation ont déterminé que le CNTFr α est exprimé dans le SNC et dans le SNP aussi bien pendant l'embryogénèse que l'ontogénèse (MacLennan *et al.*, 1996). L'ARNm du CNTFr α a été principalement détecté dans les tissus nerveux et musculaires chez le rat adulte (Davis *et al.*, 1991). Une étude d'hybridation *in situ* au cours du développement postnatal du rat a montré que l'expression de l'ARNm du CNTFr α est généralisée à l'ensemble du SNC à la naissance et n'est maintenue que dans des régions discrètes au cours du développement post-natal : dans le bulbe olfactif, dans le télencéphale (hippocampe notamment), aux zones du diencéphale affiliées à la fonction visuelle ou en lien avec le télencéphale, dans la medulla du tronc cérébral et dans le cervelet

(Lee *et al.*, 1997a). En parallèle, l'étude de la localisation du CNTFr α chez le primate non-humain adulte (*Cebus Appella*) par immunohistochimie a confirmé les plus intenses immunoréactivités dans le circuit hippocampique (EC, CG, HPC), dans les zones affiliées à la fonction visuelle, dans le cervelet et le tronc cérébral (Tableau 12, Kordower *et al.*, 1997b).

	Neonatal	Adult	Brain region	Relative labelling
Main olfactory bulb			Telencephalon	
Mitral cell layer	+	+	Neocortical layer V pyramidal cells	+++
External plexiform layer	-	+	Neocortex layers I-IV, VI	+
Telencephalon			Paralimbic Cortex	
Olfactory cortex			Entorhinal cortex	+++
Taenia tecta	(+)	+	Cingulate gyrus	+++
Olfactory tubercle	(+)	+	Hippocampus	
Neocortex, layer V	(+)	+	Pyramidal cells	+++
Limbic cortex, layer V	(+)	+	Granule cells	++
Piriform cortex, pyramidal cell layer	(+)	+	Amygdala	-
Hippocampus proper, pyramidal cell layer	+	+	Subiculum	++
Dentate gyrus, granule cell layer	+	+	Striatum	
Dentate gyrus, hilar neurons	(+)	+	Caudate nucleus	+
Subiculum, pyramidal cell layer	+	+	Putamen	+
Entorhinal cortex, pyramidal cell layer	+	+	Globus pallidus	+
Diencephalon			Medial septum	+
Thalamus			Lateral septum	-
Anterodorsal nucleus	+	-	Vertical limb of the diagonal band	+
Laterodorsal nucleus	+	-	Nucleus basalis of Meynert	+
Ventral posterolateral nucleus	+	-	Diencephalon	
Ventral posteromedial nucleus	+	-	Thalamus	
Posterior nucleus	+	-	Anterior nuclear group of thalamus	+
Reticular nucleus	+	-	Ventral lateral nucleus of thalamus	+
Mediodorsal nucleus	+	+	Thalamic reticular nucleus	+
Lateral geniculate body	+	-	Hypothalamus	
Medial habenular nucleus	+	+	Paraventricular nucleus	+
Supraoptic nucleus	+	+	Supraoptic nucleus	-
Paraventricular nucleus	-	+	Periventricular nucleus	-
Tuberomammillary nucleus	-	+	Ventromedial nucleus	-
Subthalamic nucleus	+	(+)	Lateral hypothalamic area	+
Brainstem			Subthalamic nucleus	++
Midbrain			Zona incerta	+
Substantia nigra pars reticulata	+	+	Mesencephalon	
Parabigeminal nucleus	+	+	Substantia nigra	++
Interpeduncular nucleus	+	-	Red nucleus, magnocellular	+++
Microcellular tegmental nucleus	+	-	Red nucleus, parvocellular	-
Medial terminal nucleus accessory optic tract	+	-	Superior colliculus	-
Oculomotor nucleus	+	(+)	Inferior colliculus	-
Trochlear nucleus	+	(+)	Central gray	-
Red nucleus	+	-	Oculomotor nucleus	+++
Pons			Trochlear nucleus	+++
Trigeminal motor nucleus	+	+	Dorsal raphe nucleus	++
Mesencephalic trigeminal nucleus	+	-	Mesencephalic trigeminal nucleus	+++
Locus coeruleus	(+)	-	Interpeduncular nucleus	-
Nucleus trapezoid body	+	-	Ventral tegmental area	-
Ventral nucleus lateral lemniscus	+	-	Brainstem	
Pontine reticular nucleus	+	+	Motor trigeminal nucleus	+++
Reticulotegmental nucleus	+	-	Abducens nucleus	+++
Caudal linear nucleus	(+)	-	Facial nucleus	+++
Median, paramedian raphe nucleus	(+)	-	Ambiguous nucleus	+++
Medulla			Dorsal motor nucleus of vagus	+++
Abducens nucleus	+	+	Hypoglossal nucleus	+++
Facial motor nucleus	+	+	Principal sensory trigeminal nucleus	++
Accessory facial nucleus	-	+	Spinal trigeminal nucleus	-
Hypoglossal nucleus	+	+	Vestibular complex	+
Vagal motor nucleus	(+)	+	Cochlear nucleus	+
Area postrema	?	+	Solitary nucleus	-
Vestibular nucleus	+	+	Pontine nuclei	+
Dorsal cochlear nucleus	?	+	Inferior olivary nucleus	++
External cuneate nucleus	+	+	Gracile nucleus	+
Gigantocellular reticular nucleus	+	+	Cuneate nucleus	+
Lateral reticular nucleus	+	+	Gigantocellular reticular nucleus	++
Inferior olive	+	-	Cerebellum	
Nucleus ambiguus	+	+	Purkinje cells	+++
Spinal trigeminal nucleus	+	-	Deep cerebellar nuclei	
Cerebellum			Fastigial	++
Deep nuclei	+	+	Globose	++
Cortex	+	+	Emboliform	++
			Dentate	++
			Spinal cord	
			Somatic motor neurons	+++
			Intermediolateral nucleus	+++
			Dorsal nucleus of Clarke	++
			Substantia gelatinosa	-
			Dorsal funicular gray	-

The intensity of the hybridization signal is indicated as follows: +, moderate to intense; (+), weak; -, not detectable; ?, not identified.

1- = no CNTFr α -ir; + = light CNTFr α -ir; ++ = moderate CNTFr α -ir; +++ = intense CNTFr α -ir.

Tableau 12 : L'expression du CNTFr dans le cerveau. À gauche, variation d'expression de l'ARNm du CNTFr α dans le SNC au cours du développement post-natal du rat (Lee *et al.*, 1997a). À droite, expression du CNTFr α dans le cerveau de primate non-humain (Kordower *et al.*, 1997b).

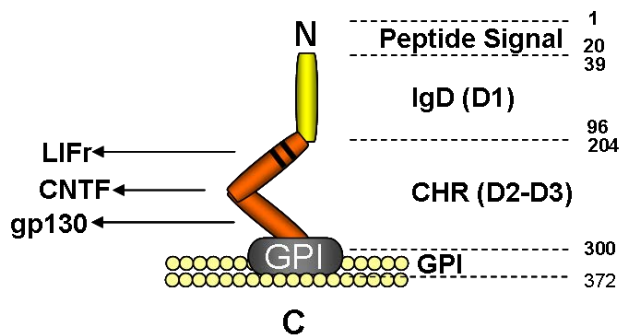
Le CNTFR α a également été mis en évidence dans les foyers de cellules en prolifération dans le SNC. *In vivo* son expression est colocalisée avec l'intégration du marqueur BrdU dans les foyers neurogéniques dans l'hypothalamus caudal près du 3^{ème} ventricule (Kokoeva *et al.*, 2005). Au niveau anatomique, son ARNm est localisé et maintenu postnatalement dans des foyers neurogéniques chez l'adulte. L'expression soutenue du CNTFR α dans le bulbe olfactif (Lee *et al.*, 1997a) peut être associée à l'effet du CNTF sur l'auto renouvellement des cellules souches neurales (Shimazaki *et al.*, 2001). De même, son expression est visible dans les astrocytes de la zone sous-ventriculaire et dans les neurones granulaires du gyrus dentelé qui sont des foyers neurogéniques (Emsley & Hagg, 2003). **Bien qu'étant principalement exprimé dans le tissu neuronal, le CNTFR α peut être exprimé par d'autres types cellulaires** sous certaines conditions : par exemple, *in vitro*, son ARNm a été détecté dans les cellules souches embryonnaires (Conover *et al.*, 1993). Les astrocytes en culture fraîchement ensemencés expriment le CNTFR α , et doivent être maturés pendant 6 semaines pour perdre cette expression (Rudge *et al.*, 1995 ; Ozog *et al.*, 2008). La microglie en culture exprime également le CNTFR α (Kradly *et al.*, 2008). Dans cette étude, les auteurs montrent que les astrocytes GFAP-immunoréactifs -activés- dans la couche moléculaire externe du gyrus dentelé expriment l'ARNm du CNTFR α en réponse à une déafférentation (Lee *et al.*, 1997b). Le CNTFR α est également exprimé par les cellules GFAP-immunoréactives des foyers neurogéniques des zones sous-ventriculaire et sous-granulaire du GD et dans les neurones (Emsley & Hagg, 2003).

Le CNTFR α est une protéine de 372 aa. Son poids moléculaire calculé est d'environ 41 kDa (Davis *et al.*, 1991) mais est de 78-80 kDa lorsqu'il est sécrété (Lee *et al.*, 1997b). Cette protéine, lors de sa sécrétion, subit des modifications post-traductionnelles : elle est glycosylée, puisque sa masse molaire chute de 20 kDa lors d'un traitement à la N-glycanase (Davis *et al.*, 1991). Elle est dépourvue d'un segment intracellulaire et est retrouvée sous deux formes : une forme membranaire, complexée à la membrane plasmique par le biais d'une ancre GPI, et une forme libre et soluble correspondant à l'ectodomaine de la forme membranaire. La forme soluble, qui participe à la signalisation induite par le CNTF résulte du clivage de l'ancre GPI par la PhosphoLipase C spécifique du Phosphatidylinositol (PI-PLC) (Davis *et al.*, 1991 ; Davis *et al.*, 1993a). *In vitro*, le CNTFR α est préférentiellement exprimé dans des systèmes cellulaires d'origine neuronale (Tableau 13). Compte tenu de la localisation de l'ARNm et de la protéine CNTFR α *in vivo*, il a été proposé que la forme membranaire soit plus spécifique des cellules du SNC (Plun-Favreau *et al.*, 2001). Il a donc été proposé que la forme libre du CNTFR α permettrait d'induire une réponse au CNTF par d'autres types cellulaires déjà répondants au LIF, comme, par exemple, la réponse chimiotactique des macrophages (Kobayashi & Mizisin, 2000).

Tissue origin	Cell line	CNTFR expression
Neuroblastoma	SK-N-FL	++
	SK-N-GP	+++
	SK-N-SH	++
	SY5Y	++
	IMR-32	+++
Glioblastoma	T98G	-
	SW1088	-
	GO-G-UVM	-
	GO-G-CCM	-
Ewing sarcoma	EW1	+
Epidermoid carcinoma	KB	-
Hepatoma	HepG2	-
Osteosarcoma	MG63	-

Tableau 13 : Le CNTFR α est préférentiellement exprimé dans les lignées cellulaires d'origine neuronale (d'après Elson *et al.*, 2000)

Le CNTFR α , possède une structure modulaire semblable aux parties N-terminales des ectodomains de gp130 et du LIFr. Il est composé de 3 parties scindables en 4 modules : la partie N-terminale est un domaine IgD (aa39 – aa96), noté D1, surmonté d'un peptide signal de 20aa (aa1 – aa20), la partie proximale à la membrane est un domaine CHR (ou CBD) composé des modules D2 et D3 (aa204- aa300) et la partie C-terminale est membranaire et correspond à l'ancre GPI (Davis *et al.*, 1991) (figure 22). Le CNTFR α est dépourvu de la triple répétition FNIII proximale à la membrane comme observé pour la gp130 (Bazan *et al.*, 1990) ou le LIFr (Timmermann *et al.*, 2002).



À droite : les différents modules du CNTFR (IgD : domaine immunoglobuline ; CHR : domaine de liaison des cytokines *cytokine homology region 1* ; Les lacunes correspondent à des domaine hydrophobes).

À gauche : les partenaires du CNTFR dans la signalisation du CNTF (CNTF : *Ciliary neurotrophic factor* ; LIFr : Leukemia Inhibitory Factor ; gp130 : glycoprotéine 130).

Figure 22 : La structure modulaire du CNTFR α

Le domaine N-terminal est un domaine analogue à une immunoglobuline (aa39 – aa96). Le rôle de ce module dans la reconnaissance ou la fixation du CNTF n'a que peu été étudié. La délétion du domaine IgD ne modifie pas l'affinité du site I du CNTF pour le CNTFR α et n'empêcherait pas la complexation des différentes sous-unités du complexe-récepteur au CNTF (Skiniotis *et al.*, 2008).

Le domaine CHR du CNTF α est porteur de nombreuses propriétés de la protéine. Le domaine CHR du CNTF α est composé des domaines D2 et D3. La partie D2 contient 4 cystéines conservées - impliquées dans la formation de deux ponts disulfures- et D3 contient la séquence consensus spécifique WSxWS des récepteurs aux cytokines à longue chaîne (résidus W290 à S294) (Davis *et al.*, 1991). Au niveau fonctionnel, le CHR du CNTF α est impliqué dans l'interaction avec le ligand et les sous-unités transductrices du complexe récepteur au CNTF. La délétion du domaine IgD ne laisse que les domaines D2 et D3 du CNTF α et laisse intact sa capacité de liaison au CNTF confirmant que le CHR permet de reconnaître et fixer le ligand (Skiniotis *et al.*, 2008). Les résidus T268-N269 du CNTF α forment un site d'interaction avec les domaines CBD1 du LIFr et CBD de gp130 : ces deux domaines sont en compétition pour fixer le CNTF α et la mutation T268A-N269A abolit l'interaction avec les domaines CHR D3 de gp130 et CHR1 du LIFr (Auguste *et al.*, 1996 ; Man *et al.*, 2003). Les résidus F172 et Q286, constituent des « points chauds » du CNTF α directement impliqués dans la reconnaissance du site I du CNTF mais aussi d'autres cytokines (Rousseau *et al.*, 2008).

L'ancre GPI du CNTF α modifie l'activité du complexe récepteur au CNTF. La présence de l'ancre GPI du CNTF α module les effets du CNTF et de variants agonistes ou antagonistes. Les effets de ses agonistes AKDH-CNTF et QAKDH-CNTF sont respectivement 35 et 60 fois plus forts dans un système cellulaire exprimant uniquement la forme membranaire du CNTF α , qu'en présence du CNTF α soluble en excès. Une potentialisation similaire est observable pour le CNTF (DiMarco *et al.*, 1997). En parallèle, lorsque le CNTF α est sous forme soluble, l'utilisation d'un antagoniste (AADH-CNTF) liant le CNTF α avec 50 fois plus d'affinité que le CNTF (DiMarco *et al.*, 1996) sur des cultures neuronales (IMR32) et non-neuronales (HEPG2) a pour effet d'antagoniser la réponse cellulaire au CNTF sans porter atteinte aux réponses induites par le LIF ou l'IL6. En revanche, en présence de la forme membranaire du CNTF α , les réponses induites par les autres cytokines sont fortement altérées par l'ajout de l'AADH-CNTF, indiquant une séquestration probable des éléments du complexe-récepteur (DiMarco *et al.*, 1997). Ainsi la présence de l'ancre GPI du CNTF α module probablement les effets du CNTF en augmentant la stabilité du complexe-récepteur pour permettre une interaction soutenue entre les différentes sous-unités. **Outre un rôle de complexation à la membrane de la sous-unité, l'ancre GPI participe à la localisation du CNTF α .** D'une part, elle peut être clivée, libérant ainsi le CNTF α dans le milieu extracellulaire (Davis *et al.*, 1991). D'autre part, les ancres GPI semblent orienter l'adressage des protéines auxquelles elles sont liées vers les Rafts, des microdomaines membranaires riches en cholestérol, hautement organisés, caractérisés par leur résistance aux détergents et largement impliqués dans la transmission synaptique (pour revue, Sharom & Lehto, 2002). Or le CNTF α est localisé *in vivo* au niveau postsynaptique dans les circuits neuronaux auditifs (Hafidi *et al.*, 2004) et la stimulation *in vitro* au CNTF stabilise rapidement une partie des sous-unités associées au CNTF α dans les Rafts de cellules neuronales IMR32. Ce phénomène de stabilisation est sensible à la déplétion en cholestérol, ce qui altère dans ce cas précis les voies de signalisation ERK1/2 et PI3K/Akt en épargnant la signalisation STAT (Port *et al.*, 2007). Bien que seule une faible proportion (mais significative) des sous-unités LIFr et gp130 soit réquisitionnée dans les Rafts, cette proportion est suffisante pour nuire aux signaux induits par d'autres cytokines *via* ces récepteurs (DiMarco *et al.*, 1997). Il est donc possible que la différence d'activité du complexe-récepteur recrutant soit la forme soluble du CNTF α , soit la forme membranaire, puisse aussi s'expliquer par une localisation dans ou hors des Rafts, ces sites regroupant de nombreuses molécules de signalisations.

3.3 Les autres ligands du complexe récepteur du CNTF

Les grandes différences de phénotype entre animaux CNTF^{-/-} (Masu *et al.*, 1993) et CNTF α ^{-/-} (DeChiara *et al.*, 1995) suggèrent l'existence d'autres ligands pour le complexe-récepteur au CNTF. Les autres ligands du complexe-récepteur au CNTF sont à scinder en deux types : ceux qui ne requièrent pas la sous-unité CNTF α (la CT-1, l'OSM et le LIF) et ceux requérant sa présence (CLC/CLF, NPO et l'HN).

3.3.1 La CT1, l'OSM et le LIF

La CT1 (Cardiotrophin T1) a d'abord été identifiée comme ligand du dimère gp130-LIFr induisant des effets similaires à ceux du LIF et de l'OSM (Pennica *et al.*, 1995a). Comme le CNTF, la CT1 ne possède pas de séquence signal de sécrétion (Pennica *et al.*, 1995b). La CT1 permet la survie PI-PLC dépendante des motoneurones *in vitro* et prévient de la dégénérescence des motoneurones après axotomie *in vivo* de manière analogue au CNTF. Cependant, la CT1 n'interagit avec aucune des formes du CNTF α -soluble ou membranaire- mais avec le LIFr. L'examen histologique par hybridation *in situ* de l'ARNm de CT1 montre une forte expression périphérique (et faible dans le SNC) pendant l'embryogénèse et l'analyse par RT-PCR semiquantitative montre que les niveaux relatifs d'ARNm diminuent dès la naissance chez la souris (Pennica *et al.*, 1996). La CT1 exerce donc ses effets *via* le dimère gp130-LIFr indépendamment du CNTF α , et dans les cellules d'origine neuronale elle requiert un partenaire possédant une ancre GPI qui reste à identifier.

L'OSM (Oncostatin M) a été identifiée comme agissant à travers un hétérodimère gp130-LIFr, tout comme la CT1 (Mosley *et al.*, 1996). L'OSM peut également fixer un dimère gp130-OSMr, l'OSMr possédant une structure proche du LIFr (Lindberg *et al.*, 1998). La fixation de l'OSM sur le complexe gp130-LIFr peut induire efficacement les mêmes cascades de signalisation que celles du LIF et du CNTF (Boulton *et al.*, 1994). Récemment, une approche par mutagénèse dirigée a permis d'identifier les résidus de l'OSM impliqués dans l'induction de la phosphorylation d'ERK et l'activation de STAT1/3 dans des cellules HepG2 (Liu *et al.*, 2009).

Le LIF (Leukemia inhibitory factor) utilise le dimère gp130-LIFr pour sa signalisation et peut être assimilé à un ligand du complexe-récepteur du CNTF ne requérant pas la sous-unité CNTF α . Le LIF et ses propriétés ont été fort bien décrits dans la littérature des 30 dernières années et ne sera donc abordé qu'ici brièvement en relation à la MA ou au CNTF. La création d'une souris triple transgénique CNTF/CT1/LIF a permis d'apporter la preuve que la déplétion en ligand chez les animaux CNTF^{-/-}/CT1^{-/-}/LIF^{-/-} entraîne des pertes neuronales sévères tandis que chez les animaux CNTF^{-/-}/CT1^{-/-}/LIF^{+/+} les pertes neuronales sont modérées, indiquant un rôle trophique important du LIF sur les motoneurones. Le LIF participe au maintien de l'innervation des muscles à l'origine de la conservation de la force musculaire et, de manière indirecte, l'activité locomotrice (Holtmann *et al.*, 2005). Il est également intéressant de signaler que l'analyse récente de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a déterminé une augmentation significative de l'ARNm du LIF dans le lobe temporal -par rapport à des patients contrôle- associée à une augmentation non-significative dans l'hippocampe et le lobe frontal. Bien que la MA altère l'expression du LIF, l'expression du LIFr reste

inchangée au cours de la maladie (Soilu-Hänninen *et al.*, 2010). Ceci suggère que le complexe-récepteur au LIF (*i.e.* l'hétérodimère gp130-LIFr) représente une cible conservée au cours du vieillissement.

3.3.2 La CLC, le CLF, la NPO et l'HN

La CLC (**Cardiotrophin-Like Cytokine ; Neurotrophin 1 ou B-cell stimulating factor 3**) est une cytokine de 22 kDa (225 aa). Elle possède 46% de similarité et 29% d'identité avec la CT1. Son expression chez l'adulte est purement périphérique (rate, ovaires, leucocytes, cœur, rein et pancréas). La CLC entraîne une phosphorylation rapide de gp130 et permet un recrutement de STAT1 mais pas STAT3 *in vitro* (Shi *et al.*, 1999). La CLC est un analogue structural du CNTF : la modélisation de la structure de la CLC montre que les sites I et III sont conservés entre le CNTF et la CLC. Cependant, malgré la présence d'un peptide signal hydrophobe dans la CLC, cette protéine exprimée seule n'est pas sécrétée (Elson *et al.*, 2000). Sa sécrétion doit être « guidée » notamment grâce au CLF ou au CNTF α soluble (Plun-Favreau, 2001). La formation d'une cytokine composite CLC-CNTF α fonctionnelle nécessite des événements intracellulaires non identifiés. En outre, la CLC coexprimée avec le CNTF α soluble peut induire une signalisation cellulaire (Elson *et al.*, 2000). **Il semblerait donc que des phénomènes de co-maturation soient nécessaires à la formation d'un complexe CLC/CNTF α fonctionnel.** Enfin, il a été établi une corrélation positive entre la quantité de CNTF α membranaire et la phosphorylation de STAT3 lors de la stimulation par la CLC (Plun-Favreau *et al.*, 2001). Le CNTF α semble essentiel à la signalisation de la CLC, aussi bien pour sa sécrétion et sa fonctionnalité que pour la modulation des cascades intracellulaires qu'il induit.

En parallèle, il a été identifié le CLF (Cytokine Like Factor, NR6 ou CRLF1), une protéine de 422 aa. Cette protéine est bien conservée chez les vertébrés : la haute conservation entre les séquences nucléotidiques d'ADNc murin et humain (85% d'identité) est extensible au singe, au rat, au lapin, à la vache et au poulet. Cette protéine est proche du récepteur à la prolactine et de gp130 : les prédictions structurales ont déterminé que l'extrémité N-terminale était un domaine IgD suivi de deux domaines de types FNIII contenant la séquence consensus WSxWS, suggérant que ces deux domaines sont des domaines CBD. Il est à noter qu'aucun domaine TM ou une ancre GPI n'ont pu être identifiés sur cette protéine, déterminant qu'il s'agit probablement d'un récepteur soluble aux cytokines à longue chaîne sécrété (Elson *et al.*, 1998). Le CLF serait donc un récepteur soluble analogue aux sous-unités α non-signalisantes utilisées par les complexes-récepteurs des cytokines. *In vivo*, l'inactivation chez la souris de NR6 -correspondant au CLF- induit la mort périnatale dans les 24h post-partum. Tout comme les animaux CNTF α $^{-/-}$ (DeChiara *et al.*, 1995), les animaux NR6 $^{-/-}$ présentent un déficit d'allaitement (Alexander *et al.*, 1999) et une perte significative de motoneurones spinaux et faciaux (Forger *et al.*, 2003). Les animaux hétérozygotes $^{+/-}$ se développent normalement. L'étude de l'ARNm du CLF par hybridation *in situ* pendant l'embryogénèse a mis en évidence son expression transitoire dans le cortex et l'hippocampe entre E17 et le terme. Après la parturition, cette expression n'est plus détectable au niveau cérébral (Alexander *et al.*, 1999).

Bien qu'il semble que le NR6 ne soit important que pour la mise en place du comportement alimentaire chez le nouveau-né, cette ressemblance de phénotype entre les animaux CNTF α ^{-/-} et les animaux NR6^{-/-} a conduit à l'hypothèse que le CLF pourrait être un ligand ou un analogue du CNTF. **Le CLC forme avec la CLF une cytokine composite stable** : le CLF coimmunoprécipite avec la CLC lorsqu'ils sont coexprimés dans des cellules COS, montrant que la CLC et le CLF forment un hétérodimère stable. Le CNTF α soluble est coimmunoprécipité avec le complexe lorsqu'il est ajouté au milieu. L'expression du CLF permet la sécrétion de la CLC : en absence d'expression du CLF, la CLC est séquestrée dans le cytoplasme des cellules transfectées. Au niveau fonctionnel, le dimère CLF/CLC i) induit la prolifération des cellules Ba/F3 (exprimant artificiellement le CNTF α) de manière sensible aux anticorps anti-gp130 ou anti-LIFr. ii) Ce dimère permet l'activation de STAT dans les cellules HepG2 exprimant le CNTF α iii) et la phosphorylation de gp130, LIFr et JAK1 dans des cellules neuronales (IMR32). L'association CLC/CLF permet également le maintien *in vitro* des motoneurones embryonnaires de rat aussi efficacement que le CNTF, démontrant une redondance des effets neuroprotecteurs du CLC/CLF et du CNTF (Elson *et al.*, 2000). **La forme membranaire du CNTF α est nécessaire à la réponse des cellules au dimère CLC/CLF.** Bien que les cellules TF1 ou BA/F3 répondent au LIF ou à la combinaison CNTF α soluble/CNTF, celles-ci ne répondent pas à l'association CNTF α soluble/CLC/CLF. Au contraire, le dimère CLC/CLF n'est pleinement actif que sur les cellules exprimant la forme membranaire du CNTF α . L'activité du dimère CLC/CLF a été étudiée dans des cellules EB (carcinome épithélial) dans lesquelles la stimulation au LIF induit la phosphorylation des MAPK. Cette phosphorylation est inductible par l'ajout de CNTF α soluble et de CNTF, absente lors de la stimulation par la combinaison CNTF α soluble/CLC/CLF et récupérée par l'expression de la forme membranaire du CNTF α (Lelièvre *et al.*, 2001). L'étude *in vivo* de l'expression du CLC, du CLF et du CNTF par double hybridation *in situ* ou par RT-PCR a déterminé que le CLC est coexprimé avec le CLF et le CNTF α dans le muscle en développement et relativement peu exprimé dans le cerveau (De Bovis *et al.*, 2005). Cette coexpression (Elson *et al.*, 2000 ; De Bovis *et al.*, 2005) a lieu au cours de la fenêtre temporelle de l'embryogénèse (à partir de E16) durant laquelle la dégénérescence des motoneurones des animaux CNTF α ^{-/-} est supposée (De Chiara *et al.*, 1995). Associées à la démonstration du maintien en vie des motoneurones embryonnaires par le dimère CLC/CLF *in vitro* (Elson *et al.*, 2000), ces observations suggèrent fortement que le CLC et/ou le CLC/CLF est le ligand embryonnaire du complexe-récepteur hétérotrimérique au CNTF. Bien qu'étant principalement exprimé dans le muscle, les propriétés trophiques protectrices du CLC/CLF sur les motoneurones dépendent d'un transport rétrograde. Les mutations chez l'Homme de la CLC (Rousseau *et al.*, 2006) ou du CLF (Dagoneau *et al.*, 2007) sont rares, peuvent être viables et aboutissent toutes deux au « syndrome des sueurs froides » (*cold sweating syndrome*). Ce syndrome est caractérisé par des difficultés à se nourrir dans la petite enfance, d'anomalies de croissance scoliothoraciques du rachis thoraco-lombaire et des déficits attentionnels. La convergence des mutations CLC/CLF vers un même phénotype souligne la coopération entre ces deux facteurs chez l'Homme. Malgré la relativement faible expression de la CLC, du CLF et du CNTF dans le cerveau embryonnaire en développement, ces protéines montrent de puissantes propriétés neurotrophiques en présence du CNTF α *in vitro* et *in vivo*.

La NPO (Neuropoietin ou CT2) a été identifiée en 2004 dans le cerveau embryonnaire de souris (Derouet *et al.*, 2004). Son ADNc code pour une protéine de 204aa contenant un peptide signal supposé de 24aa, ainsi qu'un seul site de N-glycosylation. Ses orthologues dans les génomes murins,

simiens et humains ont été identifiés : l'analyse de la structure du gène montre 98% d'identité. Chez la souris le gène de la NPO est situé en tandem du gène de la CT1. *In vivo*, son expression dans le cerveau embryonnaire (au niveau du neuro-épithélium et de la zone sous-ventriculaire) montre un pic important à E11, conjointement à l'expression du CNTF α , tandis qu'à ce moment les expressions du CNTF et du CLC/CLF sont faibles. *In vitro*, la NPO est coimmunoprécipitée avec le LIFr, gp130 et le CNTF α , indiquant une interaction directe avec l'ensemble des éléments de son récepteur. La NPO assure le maintien de la prolifération de neurosphères striato-corticales de souris, peut induire la phosphorylation de gp130 et du LIFr et le recrutement de STAT3 dans de nombreuses lignées cellulaires selon une manière dépendante de l'expression membranaire du CNTF α (Derouet *et al.*, 2004). La modélisation structurale du CNTF α a pu déterminer deux résidus (F172 et Q286) impliqués dans l'interaction avec le site 1 de la NPO mais aussi du CLC et du CNTF (Rousseau *et al.*, 2008). En termes fonctionnels, la NPO peut induire la différenciation de cellules neuroépithéliales embryonnaires en astrocytes GFAP-immunoréactifs : cet effet dépend de l'activation de STAT3 qui une fois phosphorylé sur la tyrosine 705, va se dimériser et fixer une séquence promotrice en amont du gène de la GFAP. Cet effet est spécifique de la coadministration du facteur BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) (Ohno *et al.*, 2006).

L'humanine (HN), un peptide endogène récemment identifié, possède des activités protectrices spécifiques contre les atteintes liées à la MA et recrute dans son complexe récepteur les sous-unités gp130 et CNTF α . L'HN est un peptide de 24aa dont l'expression a été identifiée dans les zones épargnées (cortex occipital) de cerveaux de patients atteints par la MA. Une approche par criblage « *death-trap* » a montré que ce peptide possédait des effets neuroprotecteurs spécifiques contre les atteintes cellulaires liées aux MA familiales *in vitro* (exposition au peptide A β , transfection d'APP muté et/ou PS1 et PS2 mutées) (Hashimoto *et al.*, 2001a, b). Malgré sa petite taille, ce peptide adopte une structure hélicale et pourrait s'oligomériser (Benaki *et al.*, 2005). Il a été montré que l'HN induisait un signal *via* le récepteur FPRL1 (*Formyl Peptide Receptor-Like 1*) couplé à une protéine Gi. Un des récepteurs de l'HN est un trimère CNTF α /WSX1/gp130 (WSX1 étant le récepteur à l'IL27) : *in vitro*, la fixation de l'HN sur des cellules F11 est augmentée lors de la surexpression du CNTF α ou de WSX1, potentialisée par la coexpression CNTF α /WSX1 et inhibée par l'extinction de l'expression de ces protéines. Les propriétés neuroprotectrices de l'HN contre la toxicité du peptide A β ¹⁻⁴² sur des cellules SHSY5Y sont neutralisées par le blocage des parties N-terminales du CNTF α ou de WSX1 par des anticorps (Hashimoto *et al.*, 2009). *In vivo*, l'administration de l'HN, ou de son plus puissant mutant l'HNG, par voie ICV permet de prévenir les déficits de mémoire de travail spatiale (*Y-maze*) et d'apprentissage latent (*Water-finding task*) induits par l'administration d'A β 25-35 (Tajima *et al.*, 2005). Les effets de l'administration intranasale de coliveline (CLN), un dérivé de l'HN qui normalise les performances de mémoire et le comportement de souris Tg2576 de 14 mois, sont bloqués par l'administration d'AG490, un inhibiteur de JAK2, indiquant l'importance de cette kinase dans l'activation de STAT par des dérivés de l'HN *in vivo* (Chiba *et al.*, 2009a). Les effets neuroprotecteurs de l'HN dépendent de la phosphorylation de STAT3 : la fixation de l'HN sur son complexe-récepteur va stimuler la phosphorylation de STAT3 sur le résidu Y705 et, à l'inverse, l'utilisation d'un dominant négatif STAT3 prévient la neuroprotection induite par l'HN (Hashimoto *et al.*, 2005). Les effets neuroprotecteurs de l'HN, outre la stimulation de la voie STAT *via* des récepteurs extracellulaires, peuvent aussi s'exercer directement dans le cytoplasme en liant physiquement la protéine

proapoptotique BimEL (*Bim Extra-Long isoform*) et prévenant ainsi le relargage du cytochrome C et l'activation subséquente de la caspase 3 effectrice (Luciano *et al.*, 2005).

Tous les composés utilisant tout ou partie du complexe-récepteur au CNTF ont en commun des effets redondants par rapport au CNTF : bien que leurs profils d'expression soient très variés entre l'embryogénèse et l'adulte et selon les types cellulaires, ces protéines montrent des propriétés trophiques et protectrices indéniables *in vitro* et *in vivo*. La plupart de ces facteurs sont capables, comme le CNTF, de conserver le potentiel prolifératif de cellules précurseurs ou d'induire la différenciation gliale. Enfin, tous requièrent l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT comme support de leur activité dans les neurones.

3.4 Fonctionnement du récepteur, signalisation et effets biologiques du CNTF

3.4.1 Fonctionnement du récepteur

La détermination de la formation du complexe-récepteur a fait l'objet d'une polémique : certains auteurs argumentent en faveur d'un complexe tétramérique (1 CNTF, 1 CNTF α , 1 gp130 et 1 LIFr), d'autres en faveur d'un complexe hexamérique (2 CNTF, 2 CNTF α , 1 gp130 et 1 LIFr). Cet aspect non déterminé du complexe, à l'origine de la signalisation du CNTF, est d'autant plus compliqué que la sous-unité CNTF α peut être trouvée sous forme soluble ou membranaire. Les deux formes ne sont pas équivalentes en termes de ligands préférentiels et de capacité d'induction/maintien de la signalisation intracellulaire. Bien qu'aucune réponse claire n'ait été apportée jusqu'à présent, les études les plus récentes indiquent la formation d'un complexe octamérique composé de deux tétramères. Après la formation du complexe suite à la fixation du ligand, l'ensemble est endocyté pour induire la signalisation.

La dynamique d'assemblage du complexe-récepteur au CNTF est guidée par des modifications d'affinité entre les différents éléments qui le composent. En compilant analyse thermodynamique, microscopie électronique 2D et modélisation moléculaire, une étude récente a déterminé l'ordre des interactions entre les différents constituants du complexe. Ainsi, le site I du CNTF interagit avec le CNTF α avec une faible affinité ($K_d = 95$ nM) et le dimère formé engage alors le recrutement de gp130 ($K_d = 71$ nM) par le site II du CNTF. Le site 3 du CNTF présente à la base une forte affinité pour le LIFr ($K_d = 29$ nM), la complexation CNTF/CNTF α /gp130 ne serait donc pas un prérequis pour l'interaction du CNTF avec le LIFr. La fixation du CNTF α /CNTF sur gp130 va induire l'hétérodimérisation gp130/LIFr. L'ensemble CNTF/CNTF α /gp130/LIFr est considéré comme un complexe quaternaire asymétrique (Skiniotis *et al.*, 2008). L'accolage entre les domaines FNIII proximaux et entre les domaines transmembranaires de gp130 et du LIFr assure la cohésion de l'ensemble et favorise ainsi les interactions entre les domaines intracellulaires (Figure 23). L'unité fonctionnelle à la base de la signalisation du CNTF serait donc tétramérique.

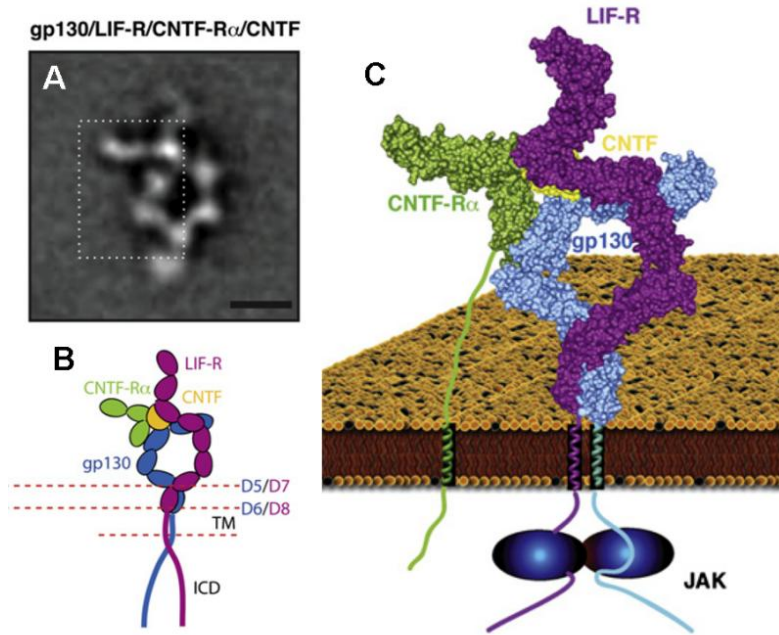


Figure 23 : Assemblage du complexe récepteur au CNTF **A)** Aspect de la conformation du complexe récepteur au CNTF par microscopie électronique 2D. **B)** Représentation schématique de l'arrangement des sous-unités du complexe récepteur au CNTF. **C)** Structure tridimensionnelle du récepteur (d'après Skiniotis *et al.*, 2008)

Le point faible de cette étude, comme toutes les précédentes, est qu'elle est réalisée hors du contexte de la cellule vivante et ne prend pas en compte l'influence que pourrait avoir la membrane plasmique sur la formation d'un tel complexe. Pour prendre en compte cette influence, le transfert de fluorescence (FRET) entre le CNTF et de CNTF α a été étudié sur cellules vivantes. En préambule, les auteurs montrent qu'avant leur liaison, le CNTF et le CNTF α sont sous formes monomériques. La liaison implique la colocalisation à la membrane de CNTF et du CNTF α . Suite à sa fixation, le CNTF adopte alors la vitesse de diffusion membranaire des éléments de son complexe-récepteur ($2.10^{-9} \text{ cm}^2.s^{-1}$). L'effet FRET n'a pu être observé qu'entre des molécules de CNTF marquées et pas entre les molécules de CNTF α . L'effet FRET témoignant de la faible distance (inférieure à 10nm) des substrats, il a donc été déterminé que le complexe-récepteur au CNTF des cellules vivantes recelait 2 molécules de CNTF à 4-7 nm l'une de l'autre et que les CNTF α associés étaient distants de plus de 10nm (Neugart *et al.*, 2009). Cette étude apporte donc la preuve que le complexe récepteur au CNTF des cellules vivantes est au moins un hexamère. Associée à la détermination de la stabilité du complexe CNTF/CNTF α /gp130/LIFr est optimale sous forme tétramérique (Skiniotis *et al.*, 2008), il semble plus probable qu'*in vivo* le complexe récepteur au CNTF soit donc octamérique bien qu'il ne soit pas possible d'exclure la forme hexamérique (figure 24). De plus, la forme octamérique pourrait offrir un arrangement tridimensionnel qui permettrait une amplification du signal bien supérieure à la forme hexamérique.

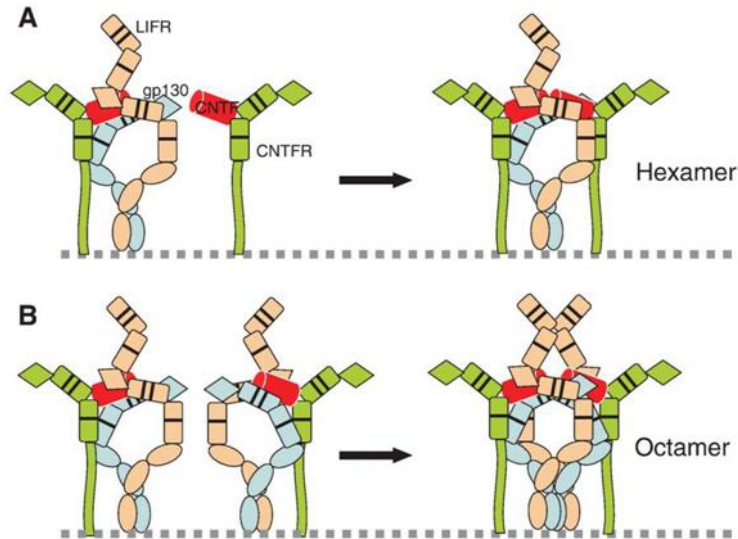


Figure 24 : Possibilités d'arrangements théoriques du récepteur fonctionnel au CNTF qui pourrait être hexamérique (A) ou octamérique (B) (d'après Neugart *et al.*, 2009).

Une association multiple de tétramères pour former un complexe récepteur plus imposant est probable : il a été montré que le récepteur au GMCSF était dodécamérique et que la mutation des résidus (ou leur blocage par des anticorps) à l'interface des deux hexamères qui le composent altérerait gravement sa signalisation, notamment la phosphorylation de JAK2 et STAT5 (Hansen *et al.*, 2008).

Les voies de signalisation induites dépendent de l'endocytose du complexe récepteur (pour revue Neet & Campenot, 2001). Dans les motoneurones et neurones issus de la corne dorsale en culture (*i.e.* les modèles cellulaires d'études les plus courants dans l'étude du CNTF et d'autres neurotrophines), les récepteurs aux neurotrophines font l'objet d'une endocytose par puits recouvert de clathrines à l'origine de la formation des « endosomes de signalisation ». Les endosomes précoces formés par l'endocytose du complexe récepteur au NGF contiennent ERK1/2 et Akt activées (Delcroix *et al.*, 2003 ; Ye *et al.*, 2003), c'est-à-dire des molécules de signalisations aussi activées par le CNTF. Le transport rétrograde de ces endosomes à courte ou longue distance implique les GTPases Rab5 et Rab7, respectivement (Deinhardt *et al.*, 2006). Une étude chez la drosophile a montré que la mutation de Rab5 inhibe la voie JAK-STAT conjointement à des altérations de rétrotransport du complexe-récepteur activé, soulignant l'importance de l'endocytose du récepteur dans l'activation de la signalisation (Devergne *et al.*, 2007). **L'activation de STAT3 par JAK1 lors de la stimulation au CNTF dépendrait de la localisation subcellulaire du complexe-récepteur activé suite à son endocytose.** Dans des neurones issus de ganglions cervicaux en culture, la stimulation au LIF entraîne l'internalisation du complexe-récepteur. L'ajout de l'inhibiteur de JAK1 -P6- sur la partie distale de la dendrite n'a aucune influence sur l'activation de STAT3 par le LIF, tandis que l'ajout de P6 au niveau du corps cellulaire prévient l'activation de STAT3. JAK1 n'activerait donc STAT3 qu'à proximité du corps cellulaire (O'brien & Nathanson, 2007). Bien que l'internalisation du complexe-récepteur au CNTF n'ait été visualisée que par l'internalisation du CNTF lui-même (Blottner, 1989 ; Curtis *et al.*, 1993 ; Kirsch *et al.*, 2003), il est fort probable que l'activation de JAK1 par le CNTF soit

soumise aux mêmes influences que le LIF ou d'autres neurotrophines (NGF et BDNF). Enfin, la déstabilisation des Rafts membranaires n'altère que l'activation d'ERK et de PI3K induite par le CNTF, en laissant intacte la voie STAT (Port *et al.*, 2007). L'inhibition du transport rétrograde par la colchicine prévient la phosphorylation de STAT3 par le CNTF (Kirsch *et al.*, 2003). **Vu ces faits, il est probable que les signalisations induites suite à l'endocytose du complexe-récepteur soient dans un premier temps les voies ERK et Akt au niveau distal de l'axone, et dans un deuxième temps la voie STAT3 au niveau du soma.** Seule l'étude des colocalisations dans le neurone entre les Rab, les éléments du récepteur au CNTF et les substrats activés par celui-ci pourrait apporter une réponse claire.

***In vivo*, le CNTF doit être appliqué sur les terminaisons synaptiques, et non sur le soma, pour être efficace.** La ségrégation anatomique entre les corps cellulaires des motoneurones dans le rachis et leurs axones dans les nerfs moteurs présente un modèle pratique. *In vivo*, l'application de CNTF au niveau des corps cellulaires (*via* une pompe osmotique acheminant le CNTF directement au LCR) des nerfs lésés chez le mouton n'a pas de bénéfice (Kelleher *et al.*, 2006). De même l'expression de CNTF induite par injection d'un adénovirus recombinant pour le CNTF humain dans le cerveau de souris *pnn* (*Progressive Motor Neuropathy*) est inefficace. En revanche son injection dans le muscle (*i.e.* à la partie distale de l'axone) diminue la dégénérescence et augmente la durée de vie de ces animaux (Haase *et al.*, 1999).

3.4.2 Signalisation positive : JAK/STAT- ERK- PI3K/Akt

Les propriétés neuroprotectrices du CNTF impliquent les voies de signalisation JAK1/2-STAT3, PI3K-Akt et ERK. *In vitro*, la stimulation de cellules EW-1 (Sarcome d'Ewing avec des caractéristiques neuroendocrines) par de l'OSM, du LIF ou du CNTF, induit la phosphorylation d'un ensemble commun de protéines dont les sous-unités gp130 et LIFr, la PLC γ , la sous-unité catalytique p110 de la PI3K, ERK1/2 ainsi que l'activation de voies de signalisation utilisant SHC/Grb2 et Raf (Boulton *et al.*, 1994). La stimulation au CNTF des cellules EW-1 induit la phosphorylation de JAK1 et JAK2, mais pas Tyk2 (Stahl *et al.*, 1994). L'utilisation d'inhibiteurs de JAK2 (AG490), de STAT3 (STA-21), de PI3K (LY2940002) et de MEK (PD98059) diminuent de manière dose-dépendante l'effet du CNTF sur la croissance neuritique et sur le maintien en vie des neurones issus de la corne dorsale. L'inhibiteur de la voie MEK n'influe pas sur l'effet pro-survie du CNTF, semblant indiquer un rôle non-prépondérant de MEK sur l'activation de ERK (Sango *et al.*, 2008). De même, les effets du CNTF sur la régénération axonale des cellules ganglionnaires de la rétine sont clairement dépendants des voies JAK-STAT, PI3K-Akt et MAPK-ERK (Müller *et al.*, 2009b). Le facteur STAT3 (pour revue, Stepkowski *et al.*, 2008) et les voies MEK-ERK/PI3K-Akt sont cruciaux à la survie neuronale (pour revue, Frebel & Wiese, 2006). Bien que ces voies soient celles activées en réponse au CNTF, elles aussi sont activées par un très grand nombre de stimuli qui constituent autant de modulateurs conditionnant la réponse cellulaire au CNTF.

3.4.2.1 : la voie JAK-STAT

La famille des JAKs compte 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. Leur poids moléculaire varie entre 120 et 140 kDa et ils sont constitués d'une unique chaîne peptidique de 1100 à 1200 aa. Ces protéines kinases sont constitutivement liées aux domaines intracellulaires des sous-unités du récepteur au CNTF (Stahl *et al.*, 1995). JAK1, JAK2 et Tyk2 sont exprimées dans de nombreux tissus, tandis que JAK3 n'est exprimée que dans les tissus hématopoïétiques. Les JAKs ont une structure modulaire : ces kinases renferment 7 modules homologues, notés JH1 à JH7 (*JAK Homology domain*) (Radtke *et al.*, 2005). Ces modules sont impliqués dans la formation de 4 domaines fonctionnels : un domaine « FERM » (*Band Four-point-one -4.1-, ezrin, radixin, moesin*), un domaine SH2 (*Src Homology domain*), un domaine à activité pseudo-kinase et un domaine à activité kinase. Les domaines FERM et SH2 sont impliqués dans l'interaction avec les domaines BOX1 et BOX2 du récepteur et le module pseudo-kinase régulerait l'activité du module kinase (figure 25) (pour revue Haan *et al.*, 2006).

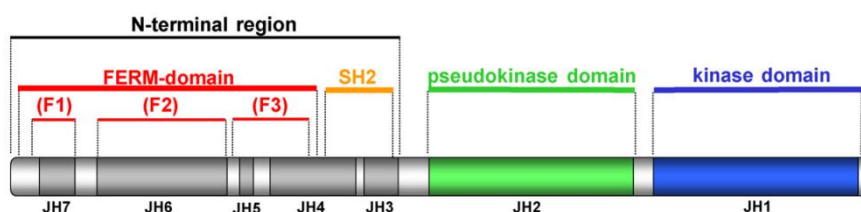


Figure 25 : Structure schématique des JAKs (d'après Haan *et al.*, 2006)

De nombreux résidus tyrosine sur les JAKs sont des sites de phosphorylation potentiels. Parmi eux, 5 des 13 résidus tyrosine conservés dans la séquence entre les différentes JAKs peuvent être transphosphorylés *ex vivo* par JAK2 (*i.e.* une phosphorylation mutuelle entre deux protéines JAK2). 4 de ces 5 sites sont dans le domaine kinase (Matsuda *et al.*, 2004) et 2 d'entre eux sont compris dans la boucle d'activation des JAK, au sein d'un motif consensus KEYY. L'implication respective de deux résidus conservés (Y1033 et Y1034) dans la capacité d'autophosphorylation de JAK1 d'une part, et d'induction de STAT d'autre part, a été étudiée. La double substitution prévient l'autophosphorylation de JAK1 et l'activation de STAT. La mutation Y1033F ne permet ni l'autophosphorylation de JAK1, ni l'activation de STAT tandis que la mutation Y1034F permet l'autophosphorylation et l'activation -réduite- de STAT. Ainsi le résidu Y1033 est le site d'autophosphorylation de JAK1 critique pour l'activation de son activité kinase (Liu *et al.*, 1997).

JAK1 et JAK2 sont les kinases à l'origine de la signalisation du CNTF dans les cellules neuronales. La stimulation au CNTF induit une phosphorylation de JAK1 et JAK2 dans des cellules d'origine neuronale (BE(2)-C, SHSY5Y, motoneurones HMN1, cellules de rétine neurale et de ganglion ciliaire) (Kaur *et al.*, 2005). Au niveau fonctionnel, l'inhibition de JAK2 prévient les effets pro-survie du CNTF sur les motoneurones en culture. Ces effets témoignent donc de l'implication de JAK2 dans

la réponse au CNTF (Sango *et al.*, 2008). **Bien que JAK1 et JAK2 soient phosphorylées et activées en réponse au CNTF, seule l'activation de JAK1 constitue une étape critique.** *In vitro*, l'activation de JAK1 en réponse à l'IL6 est prépondérante, impliquée dans la phosphorylation de gp130 et permet l'activation de STAT1 et STAT3 dans des cellules non-neuronales. La phosphorylation de gp130 et des STATs ainsi que leur activité transcriptionnelle sont fortement diminuées par la délétion de JAK1 et inaltérées par la délétion de JAK2 ou Tyk2 (Guschin *et al.*, 1995 ; pour revue O'Shea *et al.*, 2002). *In vivo*, la délétion du gène de JAK1 chez la souris induit une mort périnatale, et les motoneurones de la corne dorsale issus des animaux JAK1^{-/-} sont totalement insensibles aux effets pro-survie du CNTF et d'autres cytokines signalant par gp130-LIFr comme le LIF, l'OSM et la CT1 (Rodig *et al.*, 1998). En revanche, les cellules issues de fœtus de souris JAK2^{-/-} (animaux non viables faute d'une erythropoïèse efficace) conservent pleinement leur capacité d'induction de p-STAT3 en réponse à l'IL6, démontrant la non-nécessité de JAK2 dans la réponse aux cytokines utilisant gp130 (Parganas *et al.*, 1998).

La famille des STATs compte 7 membres : STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6 (pour revue, Levy & Darnell, 2002). Les STATs possèdent un domaine N-terminal variable, un site de liaison à l'ADN, un domaine SH2 et un domaine transactivateur (figure 26). Deux sites sont critiques pour l'activation des STATs dans le domaine transactivateur: un résidu tyrosine (Y701 sur STAT1 et Y705 sur STAT3) dont la phosphorylation permet la dimérisation du facteur, et un résidu sérine dont la phosphorylation (par ERK notamment) permet d'accroître l'activité transcriptionnelle (Wen *et al.*, 1995) sans en modifier la fixation sur l'ADN (Wen & Darnell, 1997).

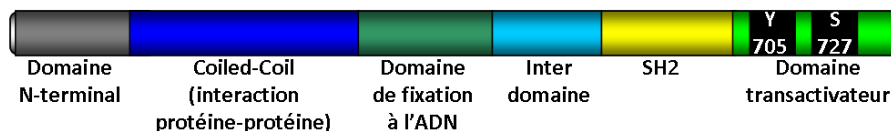


Figure 26 : Structure schématique du facteur STAT3.

Les STATs font partie de complexes massifs appelés statosomes. Le facteur STAT3 cytosolique est inclus dans les statosomes de type I (d'une masse de 200 à 400 kDa) et les statosomes de type II (d'une masse d'1 MDa à 2MDa) (Ndubuisi *et al.*, 1999). Parmi les constituants des statosomes -autres que STAT3- ont été recensées des chaperonnes (HSP90, GRP58), des protéines de trafic membranaire (chaîne lourde de la chlatrine, cavéoline 1) et des protéines d'import nucléaire (importines α 3, α 6 et β 1) (Guo *et al.*, 2002 ; Shah *et al.*, 2002; pour revue, Sehgal, 2008). Une fois associé au récepteur, un résidu tyrosine conservé sur STAT (Y705 pour STAT3) va à son tour être phosphorylé par JAK1 et provoquer le détachement de STAT3 du récepteur. Des « dimères » p-STAT3 vont alors se former par interaction mutuelle entre les phosphotyrosines du domaine SH2 de chaque partenaire. Le facteur STAT3 ainsi « dimérisé » va être transloqué au noyau de la cellule pour y induire la transcription de gènes cibles, qui seront détaillés un peu plus loin.

La voie STAT3 est majoritaire dans la réponse au CNTF. Les effets du CNTF, aussi variés qu'ils soient, sont majoritairement dépendants de l'activation de cette voie : l'inhibition spécifique de STAT3 prévient les effets trophiques du CNTF (Sango *et al.*, 2008). L'ablation conditionnelle du gène de STAT3 n'induit pas en soi de mort cellulaire dans les motoneurones, mais prédispose à une mort cellulaire plus importante, y compris en présence de CNTF (Schweizer *et al.*, 2002). D'autre part, les expériences corrélant la concentration d'exposition au CNTF de cellules SHSY5Y avec la proportion de STATs activées démontrent une activation préférentielle de STAT3 par rapport à STAT1 pour des concentrations de CNTF de l'ordre du picomolaire (figure 27) (Kaur *et al.*, 2002). Cette différence d'activation peut aussi s'expliquer par le fait que le complexe récepteur au CNTF possède au total 7 motifs permettant le recrutement de STAT3 (Gerhartz *et al.*, 1996).

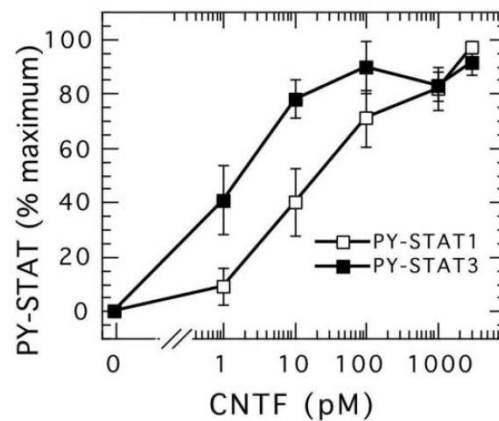


Figure 27: p-STAT3 est préférentiellement induit par le CNTF (d'après Kaur *et al.*, 2002)

3.4.2.2 : les voies ERK, PI3K et RAS

Bien que l'axe JAK-STAT semble prépondérant dans les effets du CNTF, l'activation des JAK permet l'induction des voies de signalisation PI3K et ERK. Le couplage à ces voies est indirect et implique la phosphatase SHP2 (aussi nommée PTP1D, SHPTP2, PTP2C ou Syp) (figure 28). Cette phosphatase possède deux domaines SH2 N-terminaux et un domaine C-terminal à activité PTP (*Protein Tyrosine Phosphatase*) (figure 29). Ce couplage dépend d'une part de la phosphorylation de SHP2 *per se* et d'autre part de son activité phosphatase. Les fonctions de SHP2, en tant que protéine adaptatrice ou phosphatase convergent vers l'activation d'ERK.

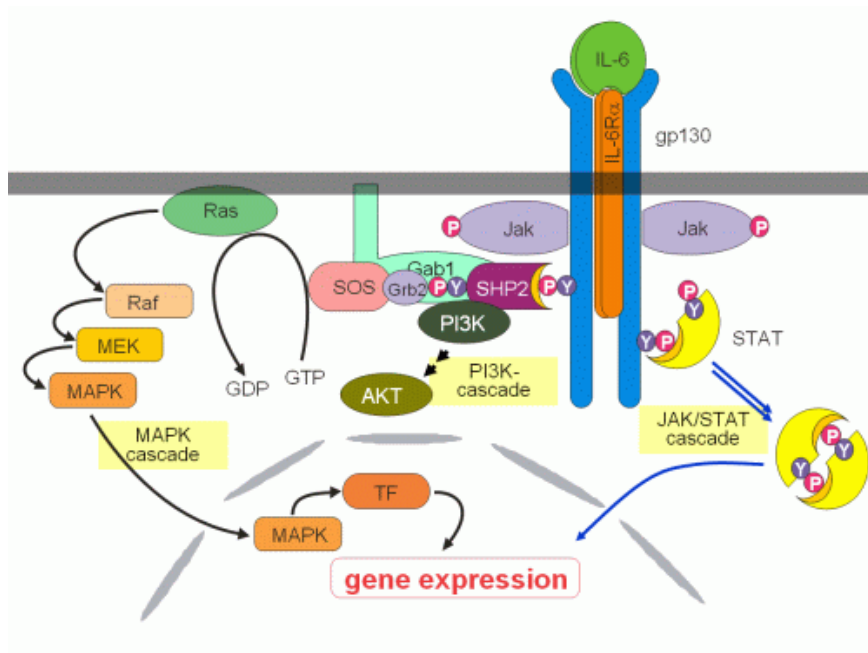


Figure 28 : Principe du couplage des voies RAS-RAF-MEK-ERK et PI3K-Akt à la voie JAK-STAT grâce à SHP2 suite à la stimulation de gp130. Ce principe est transposable au complexe récepteur du CNTF (d'après une mise à jour d'Heinrich *et al.*, 2003).

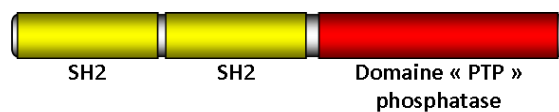


Figure 29 : Structure schématique de la protéine phosphatase SHP2.

SHP2 et PI3K coopèrent via Gab1 pour activer ERK. SHP2 est phosphorylée par JAK1 en réponse au CNTF (Stahl *et al.*, 1995). L'activation (par l'IL6) de JAK1 entraîne le recrutement et la phosphorylation de SHP2 et la phosphorylation directe de Gab1 (*Grb Associated Binder*). La mutation du site de recrutement de SHP2 sur gp130 a permis de mettre en évidence une corrélation entre la diminution de p-SHP2 et la diminution de p-ERK (Takahashi-Tezuka *et al.*, 1998). Indépendamment, l'expression de Gab1 peut moduler l'activation de PI3K par le NGF (Holgado-Madruga *et al.*, 1997). L'analyse du coimmunoprécipitat de p-Gab1 a prouvé l'association -via Gab- de p-SHP2 à p85, la sous-unité régulatrice de la PI3K (Takahashi-Tezuka *et al.*, 1998). Or, la protéine p85 possède 3 domaines SH2 (nSH2, iSH2 et cSH2) et il a été montré que l'interaction d'un phosphopeptide avec le domaine cSH2 provoquait une levée d'inhibition sur l'activité de la sous-unité catalytique p110 de PI3K (Yu *et al.*, 1998). En parallèle, p110 possède également dans sa structure un domaine RBD (*Ras Binding Domain*) et il a été montré que l'interaction PI3K – RAS GTP activait PI3K. Enfin, la PI3K activée par le CNTF possède un rôle majeur dans l'activation d'ERK : l'inhibition de PI3K par la wortmannine prévient totalement l'activation d'ERK (Takahashi-Tezuka *et al.*, 1998).

RAS est également nécessaire à l'induction de p-ERK par le CNTF: d'une part l'utilisation d'un dominant négatif de RAS inhibe totalement l'activation d'ERK induite par la stimulation de gp130 et l'expression de Gab1 (Takahashi-Tezuka *et al.*, 1998). D'autre part, le recrutement de pSHP2 (par Gab1) lui permet d'inactiver RAS-GAP -un inhibiteur de RAS- grâce à son activité phosphatase (Montagner *et al.*, 2005). Enfin, SHP2 après sa phosphorylation, peut servir d'adaptateur à la protéine GRB (*Growth factor Receptor Binding protein 2*) qui est constitutivement associée à SOS, un échangeur GDP-GTP (Li *et al.*, 1994). Ainsi, le facteur RAS-GDP peut être recruté par SOS et activer RAF sous la forme RAS-GTP pour induire la voie MEK/ERK. L'activité phosphatase de SHP2 inhibe d'autres voies régulant négativement ERK, comme la déphosphorylation activatrice de la kinase Shc (pour revue, Dance *et al.*, 2008). Ajoutés à l'observation que l'inhibition de PI3K, mais pas de MEK, prévient l'effet pro-survie du CNTF dans le neurone (Sango *et al.*, 2008), ces faits soulignent l'importance de l'activation d'ERK et l'existence de voies compensatrices qui convergent vers cette cible.

Bien que l'activation d'ERK soit nécessaire, les effets protecteurs du CNTF *in vivo* sont également dépendants de l'activation d'Akt (ou PKB) par la PI3K (Müller *et al.*, 2009b ; Steinberg *et al.*, 2009). Le rôle de la PI3K est de phosphoryler les phosphoinositides membranaires qui vont permettre le recrutement membranaire d'Akt et sa phosphorylation. Akt est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires, dont la survie (figure 30).

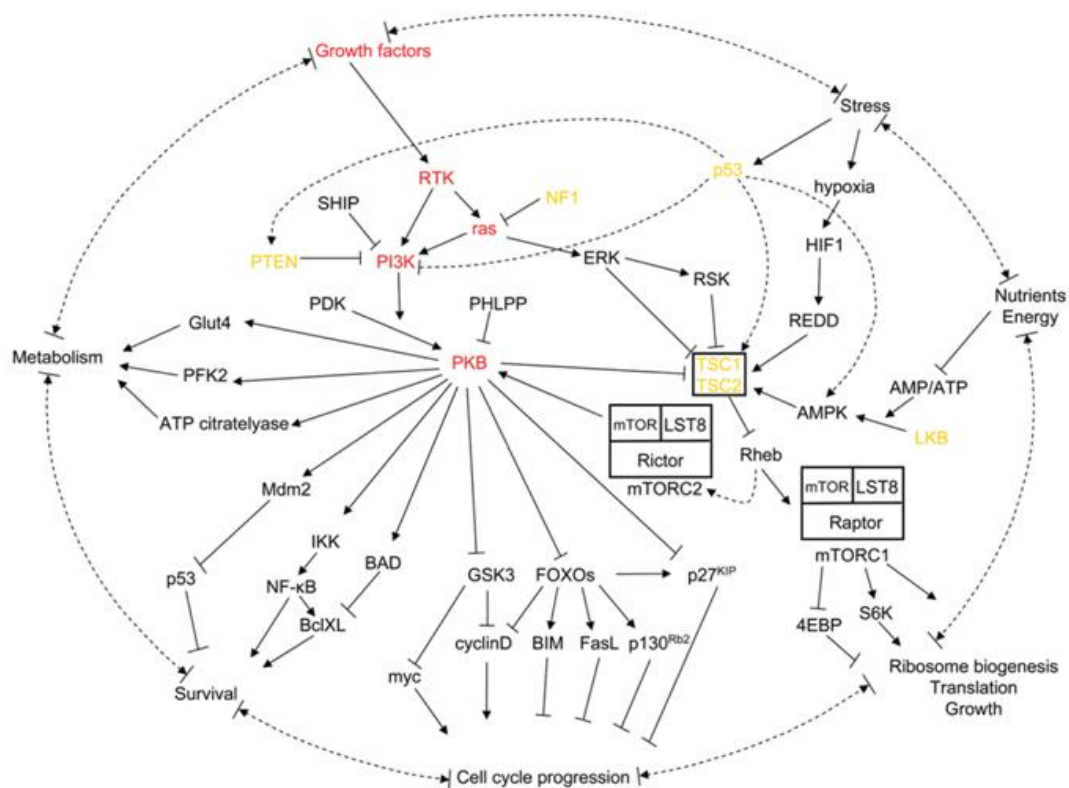


Figure 30 : Les grandes fonctions d'Akt (PKB) dans la cellule de mammifère (d'après Hawkins *et al.*, 2006).

La phosphorylation de Bad (*Bcl2 antagonist causing cell Death*) par Akt provoque sa séparation de Bcl2 et sa séquestration par la protéine 14-3-3. La libération de Bcl2 lui permet alors d'agir comme ligand de Bax pour empêcher l'apoptose induite (voie mitochondriale) par le dimère Bax-Bax (pour revue Hawkins *et al.*, 2006). L'activité de PI3K est essentielle à la survie neuronale, par exemple l'inhibition de PTEN, un répresseur de PI3K, permet la régénération des neurones corticospinaux lésés *in vivo* -chez le rat et la souris- et la formation de nouvelles synapses fonctionnelles (Liu *et al.*, 2010). L'activité de PI3K est donc clairement impliquée dans la réparation/régénération des neurones lésés et leur survie.

3.4.3 Rétrocontrôle négatif : SHP2; PIAS; SOCS

Le rétrocontrôle négatif s'opère de deux manières : une manière directe, grâce à des protéines limitant la cascade de signalisation, et une manière indirecte, faisant intervenir la néo-synthèse de répresseurs terminant la signalisation.

Le rétrocontrôle direct fait intervenir d'une part des tyrosine-phosphatases (pour revue, Xu & Qu, 2008) et d'autre part des inhibiteurs allostériques des STATs. **L'activité phosphatase de SHP2 réprime en temps réel de la signalisation du CNTF.** La phosphatase SHP2 activée participe au rétrocontrôle négatif en déphosphorylant les résidus phosphorylés par JAK. Mécaniquement, SHP2 a la possibilité d'être recrutée de manière indépendante par la gp130 (Y759) ou le LIFr (Y974) après stimulation du récepteur par le CNTF (Clahsen *et al.*, 2005 ; Symes *et al.*, 1997). D'autres phosphatases ont été identifiées comme répresseurs de la signalisation des cytokines, telles que SHP1 (pour revue, Xu & Qu, 2008). Ces phosphatases, bien qu'exprimées dans le SNC, n'ont pour l'instant pas été reliées à l'inhibition ou la modulation de la signalisation du CNTF *in vivo*. Il vient d'être décrit dans l'hippocampe que l'expression de SHP1 était augmentée dans la microglie et les astrocytes suite à une lésion corticale (Horvat *et al.*, 2010). **L'interférence des PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) avec les STATs a été mise en évidence dans différents types cellulaires** et en réponse à différentes cytokines (pour revue, Shuai, 2006). L'activité transcriptionnelle des dimères contenant p-STAT3 est sélectivement inhibée par la liaison avec PIAS3 (Chung *et al.*, 1997). Le rôle de PIAS3 dans le neurone n'a été que peu étudié (Tirard *et al.*, 2004). Il vient d'être montré que les PIAS, par leur activité E3 ligase, peuvent « SUMOyler » (*i.e.* lier un groupe SUMO, *Small Ubiquitine-related Modifier* semblable à l'ubiquitine) les facteurs de transcription pour en moduler l'activité - positivement- et influencer la sélection des gènes cibles, (Onishi *et al.*, 2010). *In vitro*, la diminution de l'expression de PIAS3 dans les cultures primaires de neurones (mais aussi des autres répresseurs de p-STAT3) est associée à une quantité accrue de p-STAT3 (Chiba *et al.*, 2009a). Actuellement, le rôle de PIAS3 dans la signalisation du CNTF ou du LIF dans les cellules nerveuses n'a pas été étudié directement, bien que sa contribution n'ait pas été démentie. L'effet de PIAS3 sur la balance entre l'inhibition de STAT3 et l'effet d'une potentielle SUMOylation sur son activité transcriptionnelle reste à déterminer.

Le rétrocontrôle indirect est basé sur l'activation de la transcription des gènes codant pour les SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) induite par les facteurs STATs et nécessite la néosynthèse de ces protéines. Les SOCS (CISs -*Cytokines Induced SH2 protein*- et SSIs -*STAT Induced STAT Inhibitors*-) (figure 31) sont de puissants terminateurs de la signalisation induite par les cytokines et vont agir à deux niveaux en amont de la cascade de signalisation. Les SOCS vont inactiver les JAKs en les liant et/ou en procédant à leur ubiquitination. SOCS3 peut partiellement prévenir le couplage aux voies PI3K et ERK induites par le CNTF en liant le domaine intracellulaire du gp130 (Schmitz *et al.*, 2000) mais pas du LIFr (Clahsen *et al.*, 2005). Le statut cellulaire de SOCS3 module la sensibilité cellulaire au CNTF : *in vitro*, l'inhibition de SOCS3 restaure l'effet -inhibiteur- du CNTF sur la croissance des neurosphères (Müller *et al.*, 2009b). L'expression de SOCS3 étant également induite par d'autres cytokines (pour revue Baker *et al.*, 2009), il est fort probable que cette expression puisse court-circuiter la signalisation du CNTF.

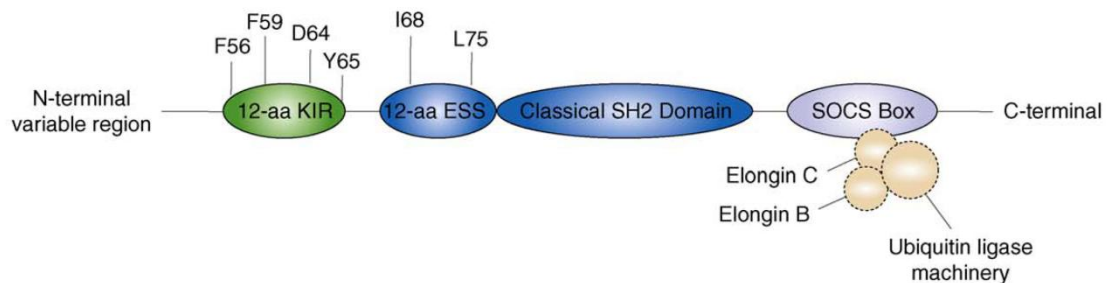


Figure 31 : La structure des SOCS1/3 (d'après Baker *et al.*, 2009). KIR : domaine d'inhibition de l'activité kinase ; SH2 : domaine de liaison à p-JAK1. ; ESS : extension du domaine SH2

3.4.4 Gènes cibles

p-STAT3 est un facteur de transcription : son transport dans le noyau va entraîner l'expression de gènes cibles. L'activation des STATs suite à la fixation d'un ligand va induire l'expression de famille de gènes spécifiques en réponse à des cytokines particulières. Par exemple, les séquences consensus GAS (*Gamma Activated Sequence*) et ISRE (*IFN Stimulated Response Element*) sont fixées spécifiquement par STAT1 et STAT2 en réponse à l'IFN γ ou l'IFN α/β , respectivement. Les cibles transcriptionnelles des STATs ont surtout été étudiées par rapport aux Interférons et peu dans le cadre d'autres cytokines. Parmi les cibles de p-STAT3, des séquences consensus SIE (*c-Sis-Inducible Element*) ont été identifiées en amont de la séquence SRE (*Serum Response Element*) qui permettent l'activation de la transcription de gènes précoces (IEG, *Immediate Early Genes*) tels que c-fos ou CREB (pour revue, Leaman *et al.*, 1996). Cependant, les mécanismes de régulation décrits n'expliquent que très partiellement la grande variété de gènes dont l'expression est modulée en réponse au CNTF.

L'activation de la transcription de certains gènes en réponse au CNTF a pu être étudiée malgré le manque d'éléments de biologie moléculaire détaillant les interactions de p-STAT3 avec des séquences nucléotidiques cibles. L'activation de la cascade CNTF dans des neurones corticaux a pu

être reliée i) à l'augmentation d'expression de protéines impliquées dans la survie cellulaire et/ou la neuroprotection et ii) à la diminution de l'expression d'acteurs pro-apoptotiques. L'analyse quantitative des ARNm et des protéines montre une augmentation du récepteur TrkB au BDNF (mais pas du BDNF lui-même) et du composé anti-apoptotique Bcl2 tandis que pour la molécule pro-apoptotique TIEG (*TGFβ-Inducible Early Growth response*), les quantités sont diminuées (Dutta *et al.*, 2007). L'augmentation d'expression du TrkB a été associée à une augmentation de l'amplitude de la réponse à l'ajout de BDNF *in vitro* (Louhivuori *et al.*, 2011). Le traitement au CNTF par voie sous-cutanée réduit également chez le rat l'expression de Bax (Rezende *et al.*, 2008). L'augmentation d'expression de Bcl2 par le CNTF est associée à une diminution de l'activité de la caspase 3 en périphérie (Rezende *et al.*, 2007) et dans le SNC (Roger *et al.*, 2007). D'autres composés neuroprotecteurs, comme le facteur de croissance fibroblastique FGF2 et l'angiopoiétine 1 (stabilisant les effets du VEGF), ou des récepteurs à des composés neuroprotecteurs, comme les récepteurs à l'activine (ACVR2), et à l'EGF (EGFR), sont synthétisés en réponse au CNTF. Des facteurs de transcription comme c-Fos et CEBPβ/δ (*CAAT Enhancer Binding Protein*) sont également induits. En revanche, ces travaux montrent également que le CNTF n'induit pas d'augmentation de l'expression des neurotrophines BDNF, NGF, NT3 ou GDNF ou de leurs récepteurs (excepté le TrkB) (Dutta *et al.*, 2007). Le CNTF peut également induire l'expression et l'activation de la ChAT supportant un changement phénotypique de certains neurones (Saadat *et al.*, 1989 ; Rudge *et al.*, 1996). Le facteur STAT3, lors de son activation par le CNTF, peut également fixer une séquence en amont du gène de la GFAP pour en induire l'expression (Kahn *et al.*, 1997 ; Bhattacharya *et al.*, 2008).

De manière étonnante, le CNTF pourrait induire sa propre expression mais pas celle de son récepteur. L'administration intravitale de CNTF induit à plus long terme (24h) une hausse significative de son propre ARNm et de la protéine dans les astrocytes exprimant la GFAP (Müller *et al.*, 2009a). Un effet similaire a également été démontré dans les rétines de souris *rd* en utilisant l'association CNTF+BDNF (Azadi *et al.*, 2006). Un tel mécanisme pourrait être à l'origine du maintien de l'expression à long terme de niveaux élevés de CNTF, par exemple 1 mois après une lésion au quinolinate (Haas *et al.*, 2004). En revanche, l'injection intracérébrale de CNTF n'induit pas d'augmentation d'expression de son récepteur (Emsley & Hagg *et al.*, 2003).

Outre un effet modulateur de l'activité transcriptionnelle de p-STAT3, p-ERK est également en amont de l'activation d'autres facteurs de transcriptions (pour revue Seger et Krebs, 1995). La signalisation dépendante d'ERK est impliquée dans de nombreuses fonctions (la survie, la prolifération, la motilité cellulaire, la différenciation et même l'apoptose) selon le site cellulaire de son induction (pour revue, Calvo *et al.*, 2010). Parmi les cibles de p-ERK, l'activation de CREB (*cAMP Response Element Binding protein*) permet l'induction de la transcription de gènes précoces (IEG) tels que fos, jun et zif 268. *In vivo*, les IEG sont essentiels à la plasticité synaptique et à plus grande échelle aux processus de mémoire à long terme (pour revue Bozon *et al.*, 2003).

En conclusion, le CNTF induit majoritairement les voies JAK1/STAT3, RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/Akt. Ces voies sont dépendantes les unes des autres, et sont également stimulées par d'autres facteurs, complexifiant la mécanique d'intégration du signal du CNTF. La stimulation par le CNTF induit des effets à court et à long terme. À court terme, le CNTF induit l'activation des médiateurs pro-survie (ERK et Akt). Les effets à plus long terme reposent sur l'effet

transcriptionnel du CNTF (*via* STAT ou ERK), en augmentant simultanément l'expression d'inhibiteurs des médiateurs pro-apoptotique (Bcl2), mais aussi l'amplitude de la réponse à d'autres facteurs neurotrophiques (augmentation de l'expression de TrkB). Ainsi, la préstimulation de ces voies par le CNTF confère au neurone une résistance aux agents pro-apoptotiques et une sensibilité accrue aux facteurs trophiques. La stimulation de ces voies semble capable i) de prévenir l'apparition de troubles neurodégénératifs associés (ou non) à des déficits cognitifs tels que la MA mais aussi ii) de régénérer les cellules déjà endommagées.

4. Le gène et la protéine CNTF

4.1 Le peptide CNTF et son gène sont conservés au cours de l'évolution

Le CNTF est un peptide de 24kDa et de 200 aa. Le gène du CNTF est bien conservé au cours de l'évolution puisque la protéine encodée partage en moyenne 85% d'identité et 95% de similarité de séquence entre les mammifères (tableau 14).

	Humain	Souris	Rat	Chien	Poule
Humain	i: 100% p: 100%				
Souris	i: 83% p: 89%	i: 100% p: 100%			
Rat	i: 84% p: 91%	i: 95% p: 97%	i: 100% p: 100%		
Chien	i: 84% p: 96%	i: 79% p: 88%	i: 80% p: 91%	i: 100% p: 100%	
Poule	i: 45% p: 64%	i: 48% p: 66%	i: 48% p: 66%	i: 45% p: 66%	i: 100% p: 100%

Tableau 14: Résultats des calculs d'identités (i) et de similarités (p) des séquences protéiques du CNTF issues des différentes espèces (BLASTp)

La structure du gène codant pour le CNTF n'a pour l'instant été décrite avec certitude que chez 5 espèces (hormis le singe): la souris, l'Homme, le rat, la poule et le chien ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/sites/entrez?Db=gene&term=cntf\[gene\]%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]%20&sort=weight](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/sites/entrez?Db=gene&term=cntf[gene]%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]%20&sort=weight)).

4.2 Le gène du CNTF : structure et conséquences de sa mutation

Chez l'Homme, le gène du CNTF est situé sur le chromosome 11 au niveau du locus 11q12.2 (Gene ID : 1270). Ce gène de 3,2 Kpb présente une conservation de sa structure chez le mammifère amniote: il n'a qu'une unique copie avec une organisation génique simple. Il est composé de deux exons flanquant un intron de 1,2 Kpb coupant la séquence codante de 2 Kpb (Lam *et al.*, 1991). Une seule mutation est décrite : il s'agit d'une substitution d'une guanine par une adénine dans l'intron, créant alors un nouveau site de branchement pour le spliceosome dans le transcrit primaire. Ceci conduit à une insertion de 4pb dans la région codante provoquant un décalage du cadre de lecture depuis l'acide aminé 39 et un nouveau codon stop arrêtant la traduction 24 acides aminés en aval (figure 32). L'ARNm muté ne semble pas traduit.

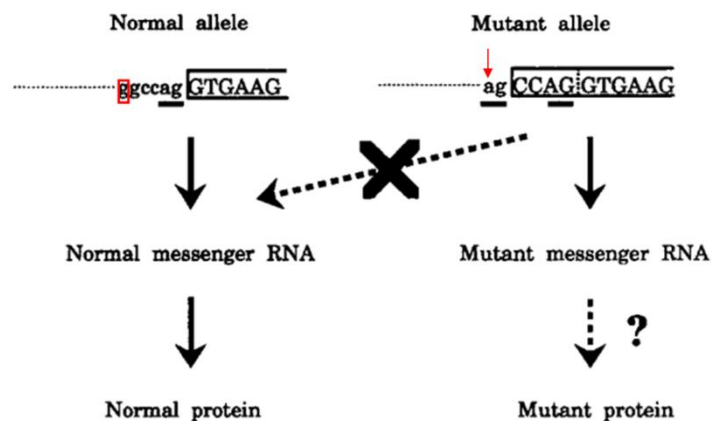


Figure 32 : mutation ponctuelle du gène du CNTF conduisant à la formation d'un nouveau site accepteur et au décalage du cadre de lecture, d'après Degushi *et al.*, 1994. La base mutée est indiquée en rouge et la région codante est encadrée en noir.

4.3. Implications physiopathologiques du CNTF et rôles physiologiques

Pour plus de simplicité, seuls les effets du CNTF au niveau du système nerveux seront développés.

4.3.1 Implications physiopathologiques du CNTF

Compte tenu des propriétés trophiques particulières du CNTF sur les neurones cholinergiques, il a été largement supposé que sa diminution pourrait être à l'origine de la dégénérescence de noyaux centraux cholinergiques et/ou de maladies neuro-musculaires. Afin d'explorer les conséquences du déficit en CNTF, Masu *et al* (1993) ont réalisé l'inactivation du gène du CNTF chez la souris.

Chez la souris adulte, l'inactivation du gène du CNTF entraîne une perte neuronale dans la moëlle épinière et une diminution de la neurogénèse, associées à une perte de tonus musculaire (Masu *et al.*, 1993). Les auteurs rappellent que l'apparition de troubles fonctionnels reflète une perte neuronale massive : dans le cas de la sclérose amyotrophique latérale (SAL) humaine le déficit neuronal s'élèverait à 50% lors de l'émergence des premiers symptômes. Bien que dans cette étude les auteurs n'aient réalisé que le comptage des motoneurons faciaux (perte de 22%) et pas des motoneurons spinaux chez des souris de 28 semaines, la perte fonctionnelle dans la SAL chez l'Homme semble correspondre assez bien à la situation chez la souris CNTF^{-/-}. Cette étude suggère que le CNTF aurait un rôle de maintien de certaines populations neuronales chez l'adulte.

Outre une perte de motoneurons tardive, la souris CNTF^{-/-} présente une diminution de la neurogénèse dans le cerveau adulte. La délétion du gène entraîne une diminution de 50% du nombre de progéniteurs dans la zone sous-granulaire du GD (marqueurs NeuroD, Doublecortine, et PSA-NCAM), une diminution du potentiel prolifératif (diminution du nombre de cellules Ki67-IR), et une diminution de l'intégration du marqueur BrdU administré pendant une semaine (Müller *et al.*, 2009b). Actuellement, le déficit en CNTF chez la souris jeune adulte (3-6 mois) n'a que des conséquences relativement limitées sur les fonctions motrices ou cognitives malgré une atteinte évidente des substrats neuronaux qui les supportent. L'impact de la délétion du gène du CNTF sur le vieillissement reste donc encore à étudier, mais il semble probable que cette délétion puisse favoriser des complications liées au vieillissement.

Le taux de CNTF dans le SNC chez l'Homme est effectivement le reflet du génotype de l'individu, mais n'est pas relié en soi à l'apparition d'un trouble nerveux précis. Dans les études ayant pour but de relier la perte de l'allèle sauvage du CNTF à des troubles dégénératifs chez l'Homme, les proportions d'homozygotes sains (2/3), d'hétérozygotes (1/3) et d'homozygotes mutés (environ 2%) sont conservées entre les populations saines et touchées par des pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la MA (Degushi *et al.*, 1994) ou la sclérose amyotrophique latérale (SAL) (Takahashi, 1995). Dans ce cadre, l'étude de familles de patients atteints de SAL n'a pas établi l'implication d'un déficit de production de CNTF sur l'âge ou la fréquence d'apparition de la maladie (Orell *et al.*, 1995). Enfin, une étude montre même que l'expression du CNTF est conservée dans les motoneurons spinaux de patients atteints de SAL (Schorr *et al.*, 1996). **Cette mutation nulle ne favoriserait donc pas l'apparition de troubles neurologiques ou neurodégénératifs chez l'Homme** (Takahashi *et al.*, 1994a ; Takahashi *et al.*, 1994b). La mutation du gène du CNTF ne favorise pas l'apparition de troubles dépressifs chez les personnes âgées (Grünblatt *et al.*, 2006) et ne constitue pas un facteur de risque d'apparition dans la MA (Gelernter *et al.*, 1997; Grünblatt *et al.*, 2009).

Des variations de l'expression du CNTF dans les tissus et de son activité peuvent être observées en association à des lésions nerveuses variées. L'analyse de biopsies post mortem du nerf sural a mis en évidence des diminutions de l'ARNm du CNTF dans des neuropathies vasculaires (syndrome de Churg-Strauss), ischémique (polyarteritis nodosa) ou des maladies démyélinisantes inflammatoires (Guillain-Barré et polyneuropathie) (Ito *et al.*, 2001) suggérant une diminution de la protéine CNTF synthétisée par les cellules de Schwann. Expérimentalement, les taux d'ARNm et de la protéine sont réduits dans les cellules de Schwann suite à une axotomie puis restaurés lors de la

régénération axonale (Friedman *et al.*, 1992), grâce aux contacts cellules de Schwann-axone (Lee *et al.*, 1995). Il a donc été proposé, que le CNTF puisse être un indicateur de rémission suite à l'observation que la protéine atteint des taux détectables dans les phases de convalescence et non dans les phases aigües de diverses pathologies chez l'humain (Ichiyama *et al.*, 2000).

Toutefois, la pertinence de l'analyse des niveaux circulants de CNTF doit être réévaluée (tableau 15). L'étude chez l'Homme des niveaux de CNTF dans le LCR ou le sérum de patients contrôles indique que les taux de CNTF circulants dans le LCR sont si faibles qu'ils sont parfois indétectables par ELISA (Ichiyama *et al.*, 2000), ou seulement détectable chez une minorité (1/3 ou moins) de sujets sains ou malades (quand la proportion de patients détectée est renseignée). Aebischer *et al.* n'ont pas détecté de CNTF dans le LCR de patients atteints de SAL (Aebischer *et al.*, 1996b). Malgré tout, il semble que les niveaux circulants de CNTF ont tendance à être augmentés dans le cadre de maladies inflammatoires (encéphalite, méningite) ou démyélinisantes (Guillain-Barré, SAL) (Massaro *et al.*, 1997). Le CNTF sérique est peu souvent détectable par ELISA (uniquement dans le cas SAL) (Robak *et al.*, 1998 ; Wierzbowska *et al.*, 1999): l'ELISA semble donc manquer de sensibilité pour ce type d'analyse. Il semble que le WB soit plus indiqué pour détecter les variations sériques de CNTF (Akahori *et al.*, 2010). Une technique plus sensible de dosage, l'électrophorèse capillaire immunoaffine (ICE), a été mise au point pour mesurer les variations sériques de neurotrophines. Ainsi, il a été déterminé que le taux de CNTF circulant dans le sérum de patients normaux était de l'ordre de 0,15 fg/mL (Kalish & Phillips, 2010) c'est-à-dire largement en dessous du seuil de détection de l'ELISA (8pg/mL) classiquement utilisé dans les études antérieures. **L'implication du CNTF dans les processus physiopathologiques est encore mal cernée.** Les précédentes données relatent des augmentations (pas toujours significatives) de CNTF extracellulaire dans le LCR dans le cadre de pathologies chroniques (Ichiyama *et al.*, 2000 ; Albrecht *et al.*, 2006). L'implication directe du CNTF dans l'induction d'un processus physiopathologique reste encore à démontrer.

Echantillon	Pathologie	Taille des cohortes	CNTF vs Contrôles	Méthode de détection	Proportion détectable	Référence
LCR	Sclérose en plaques	26	+ 240 pg/m, s	Double sandwich immunoassay (EIA), limite 100 pg/mL	26/26	Massaro et al, 1997
	Guillain Barré (GBS) et polyneuropathies démyélinisantes inflammatoires chroniques tumeurs du SNC	17	+ 430pg/mL, s		17/17	
	contrôles	22	non détecté		2/14	
		14	non détecté		0/14	
LCR	Encephalomyélite aiguë ADEM	6	+45-425 pg/mL en phase de convalescence, s	ELISA, limite 8pg/mL	6/6	Ichiyama et al, 2000
	Encéphalite	14	non détecté		0/14	
	Méningite bactérienne	17	+11 pg/mL en phase de convalescence, s		2/17	
	Méningite non bactérienne	24	non détecté		0/24	
	contrôles	25	non détecté		0/25	
LCR	Myélopathie associée à HTLV-1/ parapèse spastique tropicale	21	ns	Western Blot (Anticorps primaire 1/100)	NR	Albrecht et al, 2006
	HIV à symptôme moteur et cognitif	19	ns		NR	
	Creutzfeld Jacob	21	ns		NR	
	contrôles	20	NR		NR	
LCR et Sérum	Encephalite	23	+,s lors admission	??	NR	Zdrozowska et al, 2007
	Méningite	16	+,s lors admission		NR	
	contrôles	10	NR		NR	
LCR	Douleur neuropathique	10+20	ns	ELISA, limite 8pg/mL	NR	Capelle et al, 2009
	contrôles	10	NR		NR	
Sérum	Arthrite rhumatoïde	66	0,9 pg/mL, ns	ELISA, limite 8pg/mL	15/66	Robak et al, 1998
	contrôles	24	1,17 pg/mL, ns		8/24	
Sérum	Myélome multiple	67	0 pg/mL, ns	ELISA, limite 8pg/mL	22/67	Wierzbowska et al, 1999
	contrôles	24	0 pg/mL, ns		8/24	
Sérum	SAL	36	+	ELISA, limite 8pg/mL	NR	Iizecka, 2003
	contrôles	43	0		NR	
Sérum	SAL familiale	18	521 pg/mL (+/-178)	ELISA, limite 8pg/mL	9/18	Laaksovirta et al, 2008
	SAL sporadique	78	353 pg/mL (+/- 67)		34/78	
	contrôles inflammatoires (13SEP+14 GBS)	27	18 pg/mL (+/- 3)		NR	
	contrôles	27	9 pg/mL (+/- 2)		NR; < 13/27(médiane=0)	
Sérum	Traumatisme crânien			électrophorèse capillaire immunoafine (ICE), limite détection 0,15 fg/mL dans serum normal		Kalish et Phillips, 2010
	-léger	10	+ 459 pg/mL, s		10/10	
	-modéré	10	+201 pg/mL, s		10/10	
	-sévère	10	+32 pg/mL, s		10/10	
	(sérum normal)	NR	0,15 fg/mL			

Tableau 15 : Les variations du taux de CNTF dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou le sérum sont difficilement détectables. (+ : augmentation ; s / ns : significatif / non significatif ; NR : non renseigné ; ?? : non précisé dans l'abstract).

La perte de l'expression du CNTF serait un facteur aggravant d'autres circonstances pathologiques. L'apparition des formes familiales de la SAL chez l'Homme a été reliée à plus de 60 mutations différentes du gène de la superoxyde dismutase 1 (SOD-1) porté par le chromosome 21q22.1. La plupart du temps, ces mutations sont autosomales dominantes et peuvent diminuer de 80% l'activité de cette enzyme impliquée dans la neutralisation de l'espèce radicalaire anionique superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (De Belleruche *et al.*, 1995). Giess *et al.* (2002) ont étudié le cas d'un patient atteint de SAL familiale porteur d'une mutation de SOD-1 et décédé 11 mois après le diagnostic, à l'âge 25 ans. Ce patient possédait une sœur de 38 ans en bonne santé et sa mère ne fut atteinte qu'à l'âge de 54 ans. Les analyses génétiques ont montré que ce patient était homozygote pour la mutation du gène du CNTF, suggérant un caractère modulateur de la mutation du gène du CNTF aggravant le phénotype de la SAL en terme d'âge d'apparition de la maladie et de sa gravité *per se*. La création d'une lignée de souris double transgénique SOD-1muté/ CNTF^{-/-} a permis aux auteurs de valider leur hypothèse de modulation de la fréquence et d'âge de l'apparition de la SAL par la présence de CNTF (figure 33). Une autre étude a mis en évidence que les animaux CNTF^{-/-}, chez qui est induit une

encéphalite expérimentale auto-immune (EAE) contre une glycoprotéine de la myéline des oligodendrocytes (MOG), présentaient une diminution précoce et accrue (60%) des précurseurs des oligodendrocytes (OPC) spinaux associés à une augmentation d'apoptose des oligodendrocytes (50%). De plus, 100% des animaux $CNTF^{-/-}$ ont présenté des symptômes graves (paraparésie ou tetraparésie) contre seulement 36% des animaux sauvages (Linker *et al.*, 2002).

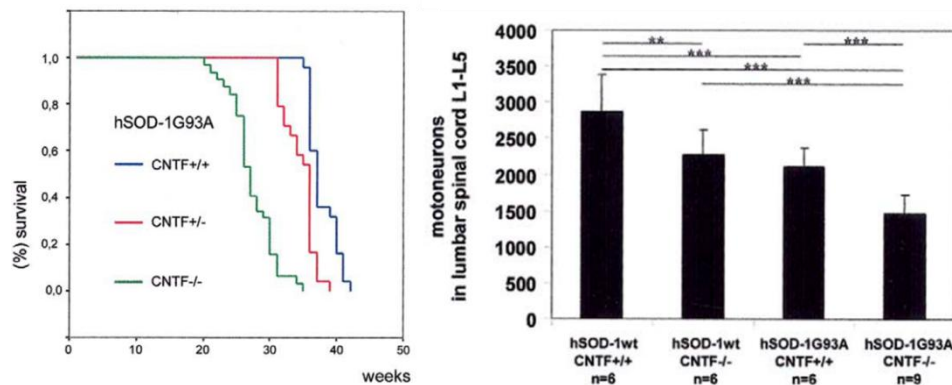


Figure 33 : Impact de la mutation du gène du CNTF sur la survie des souris mutées pour la SOD-1 (à gauche) et sur le nombre de motoneurons spinaux (à droite).

Très peu de données sont disponibles sur l'évolution de l'expression du CNTF lors du vieillissement. Le taux de CNTF diminuerait au cours du vieillissement, tandis que l'expression de son complexe récepteur est maintenue. Needels *et al.* (1985) a démontré que la quantité de CNTF relâchée suite à une lésion corticale est diminuée chez l'animal âgé. Ces travaux ont été corroborés : le CNTF régule la force musculaire au cours du vieillissement chez le rat. Lors de cette étude, une diminution d'un facteur 2 de l'ARNm et de la protéine a été observée entre des extraits de nerf sciatique d'animaux âgés (24 mois) et adultes (6 mois). Ces auteurs ont également étudié l'expression des sous-unités du récepteur : tandis que l'expression de gp130 et du LIFr sont inaltérées, celle du CNTF α est augmentée avec le vieillissement (Guillet *et al.*, 1999). Chez l'Homme, l'expression de gp130 (sous forme soluble) n'est altérée qu'à partir de 80 ans (Giuliani *et al.*, 2000). De plus, l'expression du LIFr reste inchangée chez les patients MA (Soilu-Hanninen *et al.*, 2010). Enfin, l'analyse du transcriptome des lobes temporaux (aire de Brodmann 21) de patients adultes (40 +/- 10 ans en moyenne) a mis en évidence une légère hausse de l'ARNm du CNTF α chez les patients porteur de l'APOE4 mais pas de l'APOE3 (Conejero-Goldberg *et al.*, 2010). La cohésion entre les données issues d'animaux et celles obtenues chez l'Homme suggère que seule l'expression du CNTF est atténuée au cours du vieillissement tandis que celle de son récepteur est conservée (gp130-LIFr) ou spécifiquement augmentée pour le cas du CNTF α , en relation avec un facteur de risque de la MA.

Un lien de causalité entre des altérations de l'expression du CNTF chez l'Homme et l'apparition de troubles neurologiques n'a pas été démontré. Le déficit d'expression en CNTF, d'origine

pathologique ou lié au vieillissement, serait au moins un facteur aggravant dans le cas de pathologies déclarées. Le CNTF serait donc un facteur de réponse latent aux atteintes du SNC.

4.3.2 Altérations de l'expression du CNTF α

La délétion du CNTF α chez la souris est létale (DeChiara *et al.*, 1995) et aucune inactivation n'a été décrite chez l'Homme (seulement un polymorphisme). Chez l'Homme les conséquences du polymorphisme sont peu nombreuses et surtout périphériques : la diminution de l'expression du CNTF α dans le muscle a été associée à la *Myasthenia Gravis* (forme grave de myasthénie d'origine auto-immune) (Poëa *et al.*, 2001). Le polymorphisme du CNTF α semble associé à la force musculaire (De Mars *et al.*, 2007) ou à la masse grasse chez l'adulte (Roth *et al.*, 2003). Au niveau central, l'haplotype pour le CNTF α n'a pour l'instant été relié qu'à une prédisposition à des troubles hyperactifs chez l'enfant et l'adulte (Ribases *et al.*, 2008).

4.3.3 Rôles physiologiques du CNTF

Le CNTF est un facteur de réponse lésionnel qui est relâché dans le milieu extracellulaire suite à des lésions tissulaires et/ou cellulaires. Le CNTF est dépourvu d'un peptide signal de sécrétion (Lin *et al.*, 1989) et est produit intracellulairement (Stöckli *et al.*, 1989). Cette protéine est exprimée au niveau du nerf sciatique principalement par les cellules de Schwann en périphérie et en moindre quantité par les motoneurons (Rende *et al.*, 1992). Dans le SNC, l'expression du CNTF a été détectée *in vitro* dans le cytoplasme d'astrocytes hippocampaux en culture (Rudge *et al.*, 1992) et également *in vivo* en réponse à des atteintes diverses (Yamada *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 1997b). En parallèle, les astrocytes sont aussi le lieu de synthèse d'autres neurotrophines, comme le BDNF (Rudge *et al.*, 1995). **Le CNTF participerait à l'installation d'une réponse pro-survie rapide et précoce.** *In vivo*, l'axotomie des motoneurons faciaux induit une activation rapide de p-STAT3 chez la souris. La délétion du gène du CNTF décale de 12h cette activation qui est restaurée au niveau des contrôles après 24h (Kirsch *et al.*, 2003) potentiellement par le LIF (Haas *et al.*, 1999). En réponse à une lésion nerveuse, la quantité de CNTF acheminée au soma est plus importante en comparaison à des nerfs non lésés, suggérant une augmentation du transport rétrograde du CNTF dans l'axone lésé (Curtis *et al.*, 1993). *In vitro*, Kamiguchi *et al.* (1995) ont déterminé que le prétraitement des astrocytes par d'autres cytokines -inflammatoires comme l'IL1 β , le TNF α , ou trophiques comme l'EGF- stimule le relargage du CNTF dans le milieu. L'augmentation de CNTF dans le milieu extracellulaire nécessite un délai après la lésion et suggère que ce relargage se produit selon un mécanisme contrôlé induit par la lésion et non pas par la lésion elle-même (Herx *et al.*, 2000). Bien que dans cette étude, les auteurs aient utilisé une matrice gélifiée déposée au site de la lésion pour en recueillir le contenu en CNTF, ils n'évoquent pas un biais lié à la diffusion du CNTF dans cette matrice lors de leur étude cinétique. **Les mécanismes de sécrétion du CNTF sont encore soumis à controverse car la sécrétion est inexplicite.** Andrei *et al.* (1999) ont montré dans les cultures de monocytes sanguins un mécanisme d'exocytose pour l'IL1 β qui, comme le CNTF, est également dépourvue de peptide signal de

sécrétion. Ce mécanisme implique l'interaction de l'IL1 β avec un transporteur sur des vésicules endolysosomales exocytées en réponse à l'ajout d'ATP dans le milieu. Un peptide dépourvu de séquence signal peut donc être sécrété. Or la forte augmentation extracellulaire d'ATP est un marqueur de lésion cellulaire et est associable à un phénotype inflammatoire (pour revue, Ferrero, 2009) ou peut être induite par du glutamate et kaïnate (Loiola & Ventura, 2010), suggérant un lien avec le phénomène d'excitotoxicité. Il se pourrait que l'IL1 sécrétée par la microglie soit un médiateur important de la sécrétion du CNTF par les astrocytes (Herx *et al.*, 2000). Certains auteurs ont toutefois avancé que les purines extracellulaires stimulaient directement la synthèse et la sécrétion de facteurs neurotrophiques par les astrocytes, dont le CNTF (pour revue Rathbone *et al.*, 1999). Cependant, aucun mécanisme d'exocytose du CNTF n'a pu être identifié.

L'expression cérébrale du CNTF est augmentée en réponse à des lésions physiques, l'exposition à des agents neurotoxiques ou la déprivation de facteurs trophiques. Les lésions cérébrales, comme celle du cortex entorhinal chez le rat, induit à distance une augmentation de l'immunoréactivité astrocytaire du CNTF dans la couche moléculaire externe du GD. Cette augmentation perdure pendant 10 jours après la lésion et est étonnamment conjointe avec l'augmentation du CNTF α dans les neurones de la structure déafférentée (Lee *et al.*, 1997b). Ainsi, une lésion cérébrale résultant en une déprivation de facteurs trophiques (Nagahara *et al.*, 2009a) pourrait indirectement « conditionner » les neurones à répondre au CNTF. De manière intéressante, l'expression du CNTF dans les tissus cérébraux est progressivement augmentée suite à l'infusion intracérébrale d'A β ¹⁻⁴⁰ chez le rat (Yamada *et al.*, 1995). Suite à une lésion excitotoxique striatale chez le rat, les taux de CNTF sont encore significativement élevés un mois après la lésion (Haas *et al.*, 2004). L'ensemble de ces faits suggère que la quantité de tissus sains ainsi qu'une courte fenêtre temporelle soient nécessaires à l'augmentation de l'expression et des niveaux extracellulaires de CNTF en réponses à des agressions du SNC.

L'installation d'effets pro-survie à long terme du CNTF implique la coopération avec d'autres partenaires neurotrophiques. Ip a avancé cette idée dès 1993, depuis l'observation que les récepteurs aux cytokines présentaient des similarités avec les récepteurs tyrosine kinase des neurotrophines (pour revues originales Ip & Yancopoulos, 1994, 1996; Ip, 1998). En cas de lésion *in vivo*, le LIF participe dans le SNP, en coopération avec le CNTF, au maintien de la survie des motoneurones faciaux axotomisés (Sendtner *et al.*, 1996) et serait le support d'une activation retardée (Haas *et al.*, 1999) de la même signalisation (p-STAT3) que le CNTF (Kirsch *et al.*, 2003). Dans le même esprit, les injections dans le muscle gastrocnémien de CNTF, de NGF et de GDNF (*Glial Derived Neurotrophic Factor*) ont un effet synergique sur le recouvrement des fonctions nerveuses (conductivité) et motrices (locomotion) 12 semaines après transection du nerf sciatique (Chen *et al.*, 2010). La signalisation du CNTF dans les cellules cibles du SNC aboutit à une surexpression du récepteur au BDNF, le TrkB (Dutta *et al.*, 2007). Ogilvie et al (2000) ont démontré un effet synergiques du BDNF et du CNTF sur la survie d'explants rétiniens issus de souris *rd* (modèles de dégénérescence rétinienne). Ces facteurs étant peu efficaces lorsqu'ils sont appliqués seuls et efficaces en combinaison, cette étude suggère que le CNTF agit en coopération avec d'autres partenaires neurotrophiques et que ses effets pourraient être modulés par l'activation de la voie de l'AMPc, donc possiblement d'un couplage avec des récepteurs métabotropiques. Enfin, le fait que le CNTF puisse induire sa propre expression dans le SNC (Azadi *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2009a),

renforce l'idée qu'une boucle d'automodulation positive soit à la base de l'expression post-lésionnelle à long terme du CNTF et puisse limiter les effets d'agressions ultérieures du SNC (Haas *et al.*, 2004).

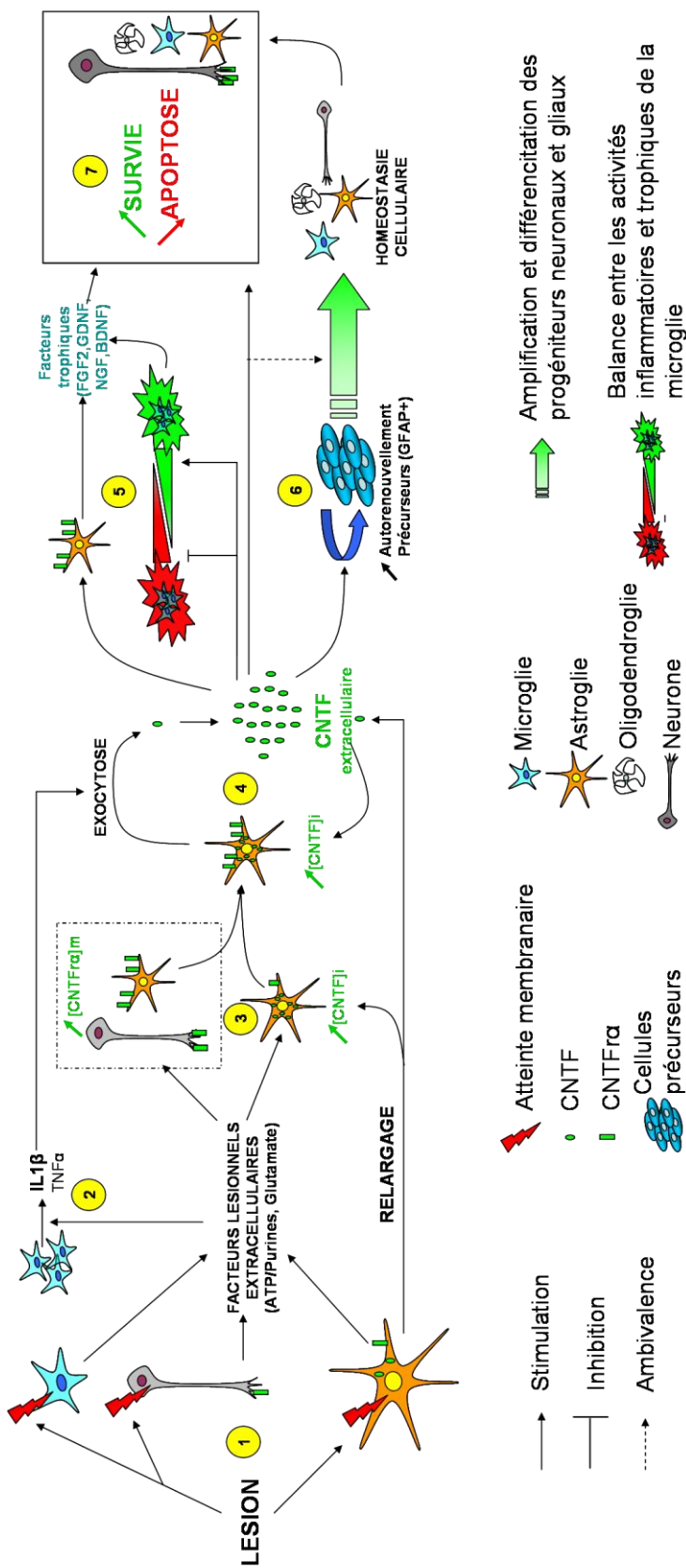
Le CNTF serait également impliqué dans la neurogénèse adulte. Il existe peu de données chez l'Homme sur le lien entre le CNTF et la neurogénèse (pour revue Abrous *et al.*, 2005). L'injection de CNTF (1 μ g) dans le parenchyme cérébral stimule dans les foyers neurogéniques de la zone sous-granulaire (ZSG) la prolifération, la distance de migration et l'engagement vers une différenciation neuronale des cellules ayant incorporé le BrdU dans les 10 jours suivants l'injection de CNTF. Dans la zone sous-ventriculaire (ZSV), cette injection augmente la prolifération et la différenciation astrogliale (qui correspondrait à un renouvellement des précurseurs). Dans la ZSG ou la ZSV, il ne semble pas avoir de stimulation de la prolifération des précurseurs d'oligodendrocytes (CPAse, NG2) ou de la formation d'oligodendrocytes. L'effet inhibiteur d'anticorps anti CNTF est limité par la pénétration dans le parenchyme mais inhibe la prolifération au moins partiellement dans la ZSV (Emsley & Hagg, 2003). Les animaux CNTF^{-/-} présentent une altération d'environ 50% de la prolifération et du renouvellement du stock de précurseurs GFAP-IR ayant pour conséquence une diminution proportionnelle de la quantité de néoneurones (Müller *et al.*, 2009b ; Emsley & Hagg, 2003). *In vitro*, la stimulation par le CNTF des neurosphères primaires en diminue la croissance (par allongement du cycle cellulaire) et donne naissance à beaucoup plus de neurosphères secondaires (Müller *et al.*, 2009b). Toutefois, des fortes doses de CNTF (100ng/mL) atténuent *in vitro* la stimulation de la neurogénèse au profit de la gliogénèse (Bhattacharya *et al.*, 2008), supportant l'idée que le CNTF puisse influencer la destinée des précurseurs des cellules du SNC.

Les cellules gliales sont des cibles et des médiateurs des effets du CNTF. La microglie est à la fois à l'origine de la sécrétion du CNTF et sa réactivité est modulée par le CNTF. La sécrétion d'IL1 β par la microglie est une étape nécessaire à l'augmentation de CNTF post-réssection *in vivo* (Herx *et al.*, 2000). La microglie est également une cible du CNTF : *in vitro*, le CNTF diminue l'expression de la COX2 dans les cultures primaires de microglie, tandis que l'IL6 augmente l'expression des cytokines proinflammatoires TNF α et IL1 β . Le milieu conditionné issu des cultures microgliales préstimulées avec du CNTF augmente significativement la survie de motoneurones en culture, tandis que des effets toxiques ont été obtenus avec du milieu conditionné par la préstimulation à l'IL6 (Kradly *et al.*, 2008). Le CNTF a donc la propriété d'orienter l'activité de la microglie vers un rôle de support trophique au détriment de son implication dans les processus proinflammatoires. Le NGF et le FGF2 sont parmi les molécules neurotrophiques pouvant être sécrétées par la microglie en plus du GDNF. De manière totalement indépendante, le CNTF pourrait stimuler le comportement phagocytaire de la microglie *in vitro* (Lee *et al.*, 2009). **Le rôle des astrocytes dans la réponse au CNTF est double : ces cellules sont certes le lieu de synthèse du CNTF dans le SNC mais sont aussi une cible.** *In vivo*, l'injection de CNTF (0,36 μ g) dans le parenchyme cérébral induit une augmentation de l'immunoréactivité de la GFAP dans l'hémisphère ipsilatéral, témoignant d'une activation des astrocytes. Les animaux surexprimant le CNTF montrent une activation basale des astrocytes marquée dans le bulbe olfactif et dans la moelle épinière (Winter *et al.*, 1995). Dans le bulbe olfactif, mais pas dans la moelle épinière, cette activation s'accompagne d'une activation de la microglie (marqueur CD11b) (Winter *et al.*, 1995). Le CNTF stimule également la production par les astrocytes de facteurs -non identifiés- favorisant la prolifération d'autres types cellulaires: l'utilisation d'un

milieu conditionné issus de culture d'astrocytes de type 1 stimulés au CNTF accroît d'un facteur 2 le nombre de progéniteurs d'oligodendrocytes (OPC, *Oligodendrocyte Progenitor Cell*) en culture (Albrecht *et al.*, 2007). **Le CNTF pourrait indirectement supporter la myélinisation du SNC par les oligodendrocytes dans le cadre d'une réponse lésionnelle.** *In vitro*, le CNTF a été identifié (avec le LIF) comme un facteur supportant la différenciation des progéniteurs O-2A soit en oligodendrocytes, soit en astrocytes de type 2 en présence de protéines de la matrice extracellulaire. Le CNTF supporte également la maturation et la survie de ces cellules (Mayer *et al.*, 1994). Cependant, les effets indirects du CNTF *via* les astrocytes sur la prolifération des OPC (Albrecht *et al.*, 2007) n'ont pas été mis en évidence *in vivo* : les animaux CNTF^{-/-} ne montrent pas de problème de myélinisation du SNC (Masu *et al.*, 1993 ; Müller *et al.*, 2009b). Il n'a pas été montré *in vivo* d'augmentation du nombre d'OPC suite à une injection de CNTF (Emsley & Hagg, 2003). Chez l'animal, l'administration continue de CNTF dans la ME par des nanosphères n'a pas permis de mettre en évidence d'augmentation de prolifération des OPC ou du nombre d'oligodendrocytes matures au voisinage de la lésion (Talbot *et al.*, 2007). La compréhension *in vivo* de l'impact du CNTF sur les propriétés trophiques ou neuroprotectrices de la glie est une problématique qui reste encore à explorer.

Le CNTF est impliqué dans l'homéostasie énergétique par l'arrêt du comportement alimentaire. Le CNTF partage cet aspect avec la leptine (une autre cytokine de type 1 utilisant la signalisation gp130). L'administration périphérique de CNTF provoque une perte de poids chez l'animal associée à une diminution de la prise alimentaire (Gloaguen *et al.*, 1997). L'observation que le CNTF avait un effet amincissant sans induire de cachexie et un rebond de poids dans un modèle de résistance à la leptine (Lambert *et al.*, 2001) a fait du CNTF un candidat de choix dans la lutte contre l'obésité chez l'Homme (pour revue, Mattson, 2001 ; Ettinger *et al.*, 2003). La régulation de la neurogénèse dans l'hypothalamus serait le support des effets anorexigènes du CNTF : l'utilisation d'un antimétabolite (Ara-C) bloque la perte de poids à long terme induite par l'infusion de CNTF (Kokoeva *et al.*, 2005).

En résumé, le CNTF dans le SNC est constitutivement synthétisé par les astrocytes et agit sur de nombreux types cellulaires. Physiologiquement, le CNTF participe au maintien de l'homéostasie cellulaire du SNC par le maintien ou l'orientation des stocks de cellules à potentiel mitogénique vers des lignées -au moins- neuronales et probablement gliales. Bien que ces effets physiologiques soient discrets, les effets bénéfiques du CNTF sont manifestes dans les réponses lésionnelles. Malgré l'absence de peptide signal de sécrétion, la modulation lésionnelle de son expression et de celle de son récepteur, ses propriétés trophiques et rapides en coopération avec de nombreux partenaires, en font un facteur spécifique de l'installation d'une réponse pro-survie en cas d'agressions du SNC (figure 34). Les propriétés du CNTF en font un candidat pertinent dans les approches thérapeutiques mais aussi préventives contre les pathologies du SNC.



Le CNTF est relâché dans le milieu par différents mécanismes. **1** Les atteintes de l'intégrité membranaire entraînent le relâchement dans le milieu extracellulaire de facteurs témoinnant de la lésion (ATP, glutamate) ou du CNTF sécrété par les astrocytes. **2** Les facteurs lésionnels induisent la sécrétion par la microglie de médiateurs proinflammatoires (IL1, TNF). L'IL1 β est un facteur stimulant l'exocytose du CNTF par un mécanisme inconnu. **3** En réponse à la lésion, l'expression du CNTF α à la membrane est augmentée dans les astrocytes et dans les neurones. En parallèle, les facteurs lésionnels ainsi que le CNTF lui-même augmentent l'expression du CNTF intracellulaire dans les astrocytes. **4** L'augmentation de l'expression de l'expression du CNTF α et du CNTF dans les astrocytes constitue une boucle d'amplification augmentant le stock mobilisable de CNTF par la stimulation à l'IL1. **5** Le CNTF conditionne les astrocytes et la microglie à sécréter des facteurs trophiques (BDNF et FGF2 dans les astrocytes). La microglie, sous l'influence du CNTF, bascule d'une réponse inflammatoire proapoptotique vers une réponse trophique (diminution de l'IL1, du TNF, du NO et de COX2 et augmentation de facteurs protecteurs dont le GDNF et le NGF). **6** Le CNTF participe indirectement au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il maintient les stocks des cellules précurseurs du SNC (précurseurs neuronaux et gliaux) en augmentant le potentiel mitogénique des populations cellulaires BrdU/GFAP-IR. Les effets du CNTF sur l'amplification et/ou la différenciation des précurseurs sont doubles: le CNTF a été décrit comme soutenant la neurogenèse et la gliogenèse, tandis que ses effets sur le maintien des précurseurs s'opèrent par l'inhibition de l'évolution des progéniteurs vers les différents types cellulaires. **7** La conservation de l'homéostasie cellulaire dans le SNC assure la formation d'une matrice extracellulaire assumant ses rôles neurotrophiques. Les facteurs trophiques et le CNTF lui-même assurent une signalisation intracellulaire pro-survie (PI3K, pSTAT3) et préventive de l'apoptose (augmentation de Bcl2 et diminution de Bax). Le CNTF sensibilise le neurone aux effets d'autres neurotrophines avec lesquelles il a des effets synergiques, par exemple avec le BDNF via l'augmentation d'expression du TrkB.

Figure 34 : Le CNTF améliore la survie neuronale en réponse aux agressions du SNC.

4.4 Potentiel neuroprotecteur du CNTF dans la MA

Le CNTF, en plus de ses propriétés anti-apoptiques et pro-survie sur les neurones, est à même d'avoir un impact sur différents paramètres dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

L'étude post mortem des niveaux p-STAT3 dans les cerveaux des patients atteints par la MA a donné lieu à des observations contradictoires. La première de ces études (Chiba *et al.*, 2009a) relate une diminution d'un facteur 3 de l'immunoréactivité de p-STAT3 dans le gyrus dentelé, suggérant une altération des voies de survie. Une seconde étude (Wan *et al.*, 2010) rapporte une augmentation importante des niveaux de p-STAT3, sans doute liée à des conditions inflammatoires. L'augmentation de p-STAT3 en réponse à l'A β soluble n'est que transitoire et aboutit *in fine* à une diminution du taux de p-STAT3.

Les travaux suggérant un rôle crucial de STAT3 dans l'apoptose induite par l'A β sont à prendre avec du recul (Wan *et al.*, 2010) car elles ont été réalisées *in vivo* chez la souris avec de l'A β ₁₋₄₂ agrégé ou *in vitro* avec de l'A β ₂₅₋₃₅; ces résultats semblent plus en adéquation avec des altérations locales autour des plaques séniles, qu'avec la neurotoxicité des oligomères solubles de peptide A β . L'analyse *in vivo* des cerveaux de souris modèles de la MA a permis de mettre en évidence que l'injection *icv* de sA β ¹⁻⁴² entraîne une légère augmentation de p-STAT3 dans les premières 24h tandis qu'au bout d'une semaine une diminution de p-STAT3 est constatée et associée dès lors à des déficits comportementaux. Les auteurs de cette observation ont confirmé *in vitro* que l'augmentation transitoire de p-STAT3 induite par l'exposition à court terme d'A β ¹⁻⁴² était liée à une inhibition momentanée de SHP2, SOCS3 et PIAS3, l'exposition prolongée aboutissant à une diminution de p-STAT3 (Chiba *et al.*, 2009a).

La diminution d'immunoréactivité de p-STAT3 chez l'humain serait due au vieillissement et à la MA. Dans le gyrus dentelé de patients, cette diminution est significative chez les patients MA en comparaison à des sujets contrôles. En revanche, la diminution d'immunoréactivité de p-STAT3 dans le CA1 ne semble être qu'une conséquence du vieillissement car elle n'a pas été relié au phénotype MA des patients mais seulement à leur âge (Chiba *et al.*, 2009a). La diminution de p-STAT3 dans le GD est un des aspects de la MA sur lequel le CNTF est à même d'agir directement par sa signalisation. **Le CNTF permet une restauration fonctionnelle des cibles cérébrales sur lesquelles il agit.** *In vivo*, la production striatale de CNTF dans un modèle de Chorée de Huntington prévient de la perte des neurones GABAergiques du striatum et restaure les fonctions de sélection des programmes moteurs (Mittoux *et al.*, 2000). En parallèle, la voie de signalisation STAT3 présente un déficit d'activation dans l'hippocampe chez les patients MA, ainsi que chez les souris Tg2576 modèles de cette pathologie. Ce déficit d'activation a pu être relié à l'installation des troubles cognitifs chez la Tg2576 âgée de 14 mois. La stimulation de la voie STAT3 par la colivéline prévient les déficits de mémoire dans ce modèle de MA (Chiba *et al.*, 2009a,b). Le maintien ou la stimulation de la signalisation STAT3 dans l'hippocampe par le CNTF pourrait prévenir les déficits mnésiques dans la MA.

Le CNTF peut lutter contre le stress oxydant et l'inflammation. Il est communément admis que le stress oxydant est accru dans la MA (production de ROS) et constitue une cible thérapeutique (pour revue Dumont & Beal, 2010). *In vitro*, la délétion de STAT3 augmente la sensibilité cellulaire au

stress oxydant (Barry *et al.*, 2009) et le stress oxydant en lui-même bloque la signalisation JAK/STAT dans des cellules d'origine neuronale (Kaur *et al.*, 2005 ; Monroe & Halvorsen, 2006). Chez l'Homme, le déficit en CNTF est sans effet en soi mais aggrave le phénotype des mutations de la SOD, impliquée dans la protection contre le stress oxydant (Giess *et al.*, 2000). L'activation de STAT3 par le CNTF est donc impliquée, au moins partiellement, dans la réponse au stress oxydant. La stimulation de la voie de signalisation impliquant STAT3 pourrait donc être bénéfique sur cet aspect de la MA.

Au stress oxydant est souvent associé un phénotype inflammatoire qui est chronique dans la MA. L'activité de la glie est fortement impliquée dans l'initiation et le maintien de la neuroinflammation (pour revue Krause & Müller, 2010). La microglie synthétise les médiateurs de l'inflammation dont l'IL1 β (c'est le seul type cellulaire qui contient l'enzyme de clivage de la pro-IL1) et le TNF α . La synthèse de CNTF par les astrocytes est induite en réponse à ces facteurs *in vitro* (Kamiguchi *et al.*, 1995) et *in vivo* (Herx *et al.*, 2000). Le CNTF relâché peut modifier l'activité des astrocytes (Albrecht *et al.*, 2007) et de la microglie (Kradly *et al.*, 2008) en orientant leur activité « inflammatoire » vers une activité trophique, par exemple en diminuant l'expression de la COX2 ou en prévenant celle du TNF α . Cet effet du CNTF pourrait être atténué par l'âge car une diminution du CNTF a été mise en évidence au cours du vieillissement chez l'animal (Guillet *et al.*, 1999). Même si cette diminution de CNTF est hypothétique chez l'Homme, la restauration ou la stimulation de cette réponse par un apport exogène de CNTF participerait à enrayer la neurodégénérescence, ou même à la prévenir.

Le CNTF peut prévenir et réduire la sensibilité à l'excitotoxicité *in vivo*. L'infusion préventive de CNTF ou de son agoniste, l'axokine, mais pas d'autres neurotrophines (BDNF, NGF ou NT-3) prévient la perte neuronale dans un modèle de lésion excitotoxique au quinolate (un agoniste NMDA) chez le rat (Anderson *et al.*, 1996). D'autre part, les lésions excitotoxiques induites par le quinolate induisent une augmentation d'expression du CNTF (Haas *et al.*, 2004). La protection induite par le CNTF contre ces lésions implique aussi une recapture du glutamate extracellulaire par la glie (Beurrier *et al.*, 2010). Enfin, le modèle pharmacologique de Chorée de Huntington de Mittoux *et al.* (2000) est basé sur une sensibilité accrue envers l'excitotoxicité du glutamate et une hausse du calcium intracellulaire. Les auteurs rappellent que parmi les cibles génomiques du CNTF, outre les IEG, figurent des neuropeptides de la classe des opoïdes ayant la propriété de minimiser la sensibilité à l'excitotoxicité du glutamate et de prévenir l'accumulation de calcium intracellulaire (Mittoux *et al.*, 2000).

Le CNTF pourrait agir les altérations des neurotrophines dans la MA. Un déficit en facteurs trophiques peut induire la mort cellulaire ou contribuer en soi à l'apparition de troubles neurodégénératifs comme la MP ou la MA (pour revue, Schindowski *et al.*, 2008). Le TrkB est parmi les cibles génomiques du CNTF (Dutta *et al.*, 2007). Dans la MA, l'expression du BDNF et du TrkB est altérée de façon précoce. Leur déficit est associé au déclin cognitif dans des modèles de neurodégénérescence mimant les stades précoces de la MA et la restauration de l'expression du BDNF permet de réverser ces déficits cognitifs (Nagahara *et al.*, 2009a). Or, les effets pro-survie du BDNF sont potentialisables par le CNTF dans le neurone (Azadi *et al.*, 2006) et d'anciens travaux montrent une potentialisation des propriétés électrophysiologiques synaptiques du BDNF par le CNTF (Stoop & Poo, 1996). Ceci suggère que l'apport exogène de CNTF dans un modèle de

dégénérescence/déclin cognitif, associé à une diminution de BDNF, pourrait rétablir la réponse à cette neurotrophine en maintenant le neurone en vie. Le CNTF peut aussi potentiellement interférer sur les effets proapoptotiques des proneurotrophines. La sortiline interagit avec le récepteur aux proneurotrophines P75NTR en tant que corécepteur et cette interaction est essentielle à la médiation du signal proapoptotique du proNGF (Nykjaer *et al.*, 2004) et du pro-BDNF (Teng *et al.*, 2005) dans les neurones. Plus récemment, il a été proposé que l'interaction pro-NGF/P75NTR/Sortiline puisse être favorisée dans les stades précliniques de la MA par diminution du TrkA (Mufson *et al.*, 2010). De plus, l'utilisation de ligands alternatifs de la sortiline (la neurotensine) prévient *ex vivo* la cytotoxicité induite par le proNGF (Al-Shawi *et al.*, 2008). Des travaux récents montrent de plus que la sortiline potentialise la signalisation induite par le CNTF ou par des cytokines signalisant par gp130/LIFr (Larsen *et al.*, 2010). De manière indépendante, la sortiline vient d'être impliquée positivement dans le trafic subcellulaire et l'activité de la β -sécrétase (Finan *et al.*, 2011), enzyme responsable de la synthèse du peptide β amyloïde. La possibilité de recrutement de la sortiline, via le CNTF, d'une voie pro-apoptotique vers une voie pro-survie est stratégiquement séduisante dans une approche thérapeutique de la MA.

Les propriétés du CNTF en font un candidat de choix dans le traitement d'autres pathologies neurodégénératives, mais la méthode d'administration demeure problématique. Le CNTF est un des premiers peptides neurotrophiques à avoir été utilisé dans des essais cliniques chez l'Homme. Chez la souris, le CNTF administré par voie intraveineuse a une demi-vie courte (environ 3 minutes) due à son accumulation dans le foie (Dittrich *et al.*, 1994), tandis que chez l'Homme la demi-vie est de 120 à 400 minutes après administration par voie sous-cutanée (Emerich & Thanos, 2006). De fortes doses sont requises lors de l'administration périphérique pour atteindre le SNC et augmentent le risque d'effets secondaires indésirables: Aebischer *et al.* relatent une toux sévère, une forte perte de poids et l'induction de fièvre (« Synergen Trial », Aebischer *et al.*, 1996a). L'administration sous cutanée quotidienne chez l'Homme de plus de 5 μ g/kg de CNTF a été associée à des symptômes anorexiques avec perte de poids, toux, réactivation des manifestations herpétiques buccales (Miller *et al.*, 1996). Des doses sous-cutanées allant jusqu'à 30 μ g/kg sont nécessaires pour obtenir une augmentation détectable dans le plasma des patients, mais ont été associées à la production d'anticorps anti-CNTF et n'ont pas permis de ralentir la progression de la SAL (Bongioanni *et al.*, 2004). Pour contourner l'écueil des effets secondaires liés aux fortes doses périphériques requises, deux approches ont été utilisées.

La première a consisté en la synthèse de protéines recombinantes visant à réduire les doses administrées en augmentant la potentialité du CNTF ou en favorisant son ciblage vers le SNC. Parmi ces protéines, l'hyper-CNTF est une protéine résultant de la fusion du CNTF et du CNTF α favorisant des réponses à des faibles concentrations. Le P11-CNTF est le résultat de la fusion du CNTF avec un peptide P11 augmentant son adressage vers le SNC (Qu *et al.*, 2008), mais nécessite de fortes doses (100 μ g/kg/jour) pour obtenir un effet neuroprotecteur chez l'animal. Le TAT-CNTF permettrait de favoriser la signalisation induite par le CNTF en augmentant l'interaction de la protéine avec la membrane cellulaire et induit une phosphorylation de STAT3 moins intense que le CNTF lorsqu'il est administré en *icv* (Vieira *et al.*, 2009). Des peptides clivés ont également fait leur apparition. Actuellement, l'administration par voie sous-cutanée du tetra-peptide 6c semble avoir des effets centraux sur la neurogénèse sans effet secondaire chez l'animal (Blanchard *et al.*, 2010a), ainsi que

sur les déficits cognitifs induits par les oligomères solubles d'A β (Blanchard *et al.*, 2010b). Chez l'Homme, seule l'administration sous-cutanée d'axokine (CNTF tronqué de 15aa c-terminaux) a été testée. Ce peptide permet d'obtenir des réponses similaires au CNTF à des doses plus faibles mais a eu chez la plupart des patients (93%) au moins un effet secondaire indésirable (mal de tête, nausées et vomissements sont les plus reportés), en plus de la fabrication d'anticorps dirigés contre l'axokine (87%) (Ettinger *et al.*, 2003). Les stratégies portant sur des modifications d'activité ou de ciblage du CNTF natif sont pour l'instant incompatibles avec une administration chez l'Homme.

La deuxième approche consiste à produire *in situ* le CNTF, i.e. directement au niveau du SNC. Le caractère lent et progressif de la MA nécessite une application prolongée des agents thérapeutiques. Les approches utilisant des lentivirus CNTF sont pour l'instant limitées au SNP et chez l'animal (Hu *et al.*, 2005). En revanche, plusieurs travaux utilisant des cellules recombinantes encapsulées et implantées dans le cerveau d'animaux modèles de SAL (Déglon *et al.*, 1996), de Maladie de Huntington (Emerich *et al.*, 1997), de Maladie de Parkinson (Emerich *et al.*, 1996a; Lindner & Emerich, 1998) et de rétinite pigmentaire (Tao *et al.*, 2002) ont prouvé l'efficacité de cette approche. La greffe de cellules encapsulées exprimant le CNTF s'est montré sans effets secondaires pendant la durée du traitement chez les patients atteints de SAL (Aebischer *et al.*, 1996a). De plus, des résultats bénéfiques (certes limités à des améliorations électrophysiologiques) ont été obtenus chez les patients Huntington (Bachoud-Lévi *et al.*, 2000b; Bloch *et al.*, 2004). Toutefois, dans les mois suivants l'arrêt des essais les patients ont montré des états dépressifs graves (nécessitant un traitement). La technologie d'encapsulation de cellules exprimant le CNTF est un outil disponible, déjà validé chez l'Homme, et rendant possible l'étude chez l'animal des effets de l'administration de CNTF à long terme sur l'apparition du déclin cognitif dans des modèles de MA, comme il a été fait pour la SAL ou la MH.

En conclusion, le CNTF pourrait potentiellement retarder *in vivo* des atteintes caractéristiques de la MA comme la mort cellulaire, le stress oxydant, l'inflammation, l'excitotoxicité et les conséquences du déficit en neurotrophines. L'administration du CNTF à long terme et *in situ* semble la méthode la plus adaptée compte tenu du caractère progressif et chronique de la maladie et la nécessité de limiter les effets secondaires (et périphériques) du CNTF.

II. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

La MA est une pathologie neurodégénérative complexe. Celle-ci débute par une phase prodromale asymptomatique. Durant cette phase silencieuse, qui s'étend probablement sur plusieurs dizaines d'années, les oligomères solubles d'A β perturbent déjà le fonctionnement neuronal. L'affinité particulière de ces oligomères pour les synapses a mené à l'hypothèse que la synaptotoxicité de l'A β est à l'origine des premiers troubles cognitifs. La toxicité du peptide A β est basée sur son oligomérisation et différentes interactions avec les membranes neuronales. Les altérations synaptiques sont associées à de nombreux mécanismes neurotoxiques comme le stress oxydant, des troubles de l'homéostasie calcique et l'activation de protéases intracellulaires. L'ensemble de ces mécanismes sont intimement liés à la protéolyse de la protéine précurseur de l'amyloïde et à l'induction de la mort cellulaire par apoptose. Il est donc nécessaire d'intervenir le plus tôt possible dans cette cascade événementielle afin de prévenir les pertes cellulaires croissantes au fil de l'évolution de la maladie. **La prévention de la synaptotoxicité et de l'apoptose induites par le peptide A β soluble semble donc une stratégie intéressante pour empêcher la progression de la neurodégénérescence et l'émergence des troubles cognitifs.**

Afin d'identifier les cibles thérapeutiques pertinentes, l'équipe Lipidomix s'est spécialisée sur la compréhension des mécanismes neurotoxiques du peptide A β soluble. En adéquation avec la nature progressive de la MA, l'application de peptide neuroprotecteur se doit d'être continue, sinon chronique. Nous avons choisi parmi les nombreux peptides ayant une activité trophique, le peptide CNTF. Les propriétés pro-survie et anti-apoptotiques de ce peptide ont déjà attiré l'attention des chercheurs qui ont étudié ses propriétés dans divers modèles de pathologies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson, de Huntington ou la sclérose amyotrophique latérale. Le potentiel protecteur de ce peptide n'a toutefois jamais été étudié dans la MA. Afin d'assurer l'apport continu de ce peptide *in vivo*, nous avons choisi d'utiliser la technologie d'encapsulation cellulaire.

Le présent travail vise ainsi à établir la preuve de concept que l'administration continue du peptide CNTF dès la phase prodromale peut prévenir les altérations synaptiques et la mort cellulaire à l'origine des troubles cognitifs dans la MA.

Objectifs spécifiques

Notre premier objectif sera de déterminer si le CNTF produit par les cellules encapsulées exprime des propriétés neuroprotectrices *in vitro*. Cette caractérisation est un préalable à l'établissement de notre preuve de concept.

Notre deuxième objectif sera de déterminer si la sécrétion à long terme de peptide CNTF dans le cerveau prévient les déficits cognitifs induits par les oligomères solubles d'A β *in vivo* dans deux modèles murins de MA.

III. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

Les procédures expérimentales utilisées lors de ce travail sont décrites dans la publication découlant de nos études (Garcia *et al.*, 2010 – *J. Neurosci*). Nous ne détaillerons donc pas dans ce chapitre ces méthodes qui relèvent de techniques classiques de biologie moléculaire et cellulaire, ainsi que de biochimie. Par contre, pour des raisons de clarté, nous avons choisi de décrire en détail les méthodes utilisées lors des expérimentations *in vivo* utilisant différents modèles murins de maladie d'Alzheimer.

Il est également à noter que la procédure de préparation des oligomères de peptides A β est considérée comme confidentielle par la direction du laboratoire Lipidomix. En outre, les méthodologies de préparation font l'objet de deux brevets déposés début 2011 par l'Université de Nancy :

1 - FR 11/50614 [Titre](#) : COMPOSITIONS DE PEPTIDE β -AMYLOIDOGENE, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION POUR LA MISE EN ŒUVRE D'UN PROCEDE DE CRIBLAGE DE MOLECULES ACTIVES DANS LE CADRE DES MALADIES NEUROLOGIQUES (IFB 09 CD NAN OMIX)

2 - FR 11/50608 [Titre](#) : COMPOSITIONS DE PEPTIDE β -AMYLOIDOGENE ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION (IFB 11 AF NAN MIXO)

1. Animaux

1.1 Conditions d'hébergement

Les animaux sont hébergés dans une animalerie de stabulation dans des conditions standardisées de température ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$), d'hygrométrie ($50\% \pm 5$) et d'éclairage selon un cycle jour/nuit de 12h. Les animaux ont accès à l'eau de boisson et la nourriture *ad libitum* et sont acclimatés aux conditions d'hébergement pendant un minimum deux semaines avant le début des expériences.

1.2 Souches murines utilisées

Pour les approches comportementales, des souris mâles de souche C57Bl/6 (Laboratoire Janvier, Le Genest St-Isle, France) de 12 à 14 semaines au moment de la chirurgie stéréotaxique ont été utilisées (Youssef *et al.*, 2008).

Les souris mâles surexprimant l'APP portant la mutation suédoise (APP^{swe}, HuAPP695.K670N-M671L) de la souche Tg2576 (Hsiao *et al.*, 1996) ont été acquises chez Taconic-Europe (Souche 001349-T, Bomholtvej, Danemark) à l'âge de 10 semaines. Des animaux de fond génétique identique n'exprimant pas le transgène (« *Littermates* ») ont été utilisés comme contrôles. Les manipulations sur les animaux sont effectuées selon les recommandations du Comité National de Réflexion d'Éthique sur l'Expérimentation Animale (Autorisations : Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, agrément # 3925 CA-II ; Direction Départementale des Services Vétérinaires de Meurthe-et-Moselle, agrément # DDSV/54/04/ENV/065).

2. Chirurgie stéréotaxique

2.1 Anesthésie

Les animaux sont opérés sous anesthésie générale induite par un mélange de Kétamine (0,8% p/v) et de Xylazine (0,1% p/v) dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%), administré par voie intrapéritonéale à la dose de 1 mg de kétamine / 10 g de souris. Après s'être assuré de la profondeur de l'anesthésie, testée par l'abolition des réflexes de retrait de la patte suite au pincement interdigital et de sursaut suite au pincement de la queue, l'animal est placé dans l'appareil à stéréotaxie.

2.2 Procédure d'implantation des capsules de cellules C2C12 recombinantes

Sous hotte, la capsule est aspirée sous binoculaire dans une microseringue Hamilton de 5 μ L (7000 Series Modified Microliter, Knurled Hub, 24 G, modèle 7105) (Figure 35) dans un volume total de 1 μ L. La seringue est alors placée dans le pousse seringue prévu à cet effet sur l'appareil à stéréotaxie.



Figure 35 : Seringue utilisée pour l'implantation stéréotaxique des capsules.

La tête de l'animal est placée et maintenue dans le cadre stéréotaxique par des barres d'oreilles placées dans les pavillons. Afin de fixer la tête de l'animal dans le plan horizontal, un mord est introduit derrière les incisives de l'animal et le museau bloqué dans cette position. Le crâne de l'animal est rasé et la zone opératoire désinfectée avec de l'éthanol 70% (v/v). Une incision médiale est réalisée depuis l'arrière de la ligne inter-oculaire jusqu'au début de la voûte occipitale. Le crâne est gratté à l'aide du bistouri et nettoyé avec un coton légèrement imbibé d'eau oxygénée (3%) afin de faire apparaître les sutures de croissances formant le repère anatomique du bregma. Ce point de référence constitue une origine pour situer les différentes structures cérébrales dans l'espace selon un trièdre de référence (figure 36).

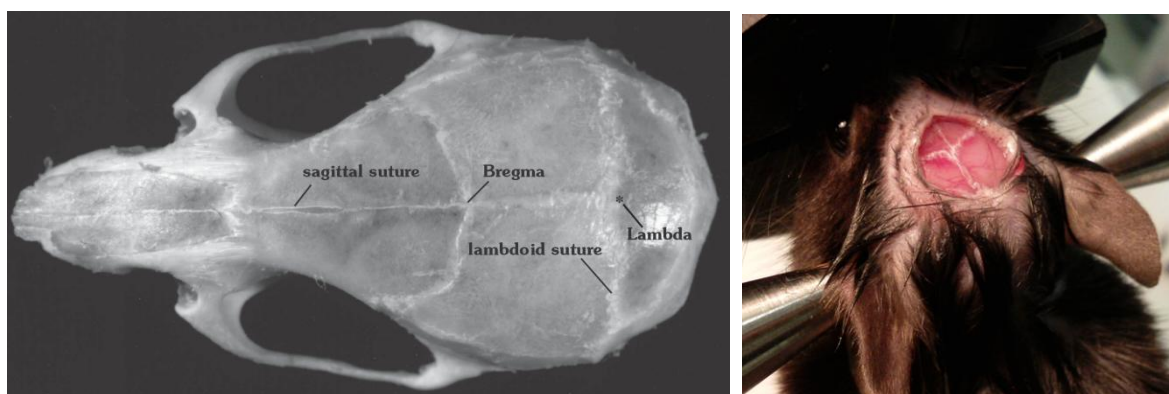


Figure 36: Repères anatomiques de référence formés par les sutures de croissance. À gauche : les repères Bregma et Lambda (d'après Paxinos et Franklin, 2001). À droite : visualisation du Bregma lors de la procédure chirurgicale.

Les coordonnées d'implantation dans le ventricule latéral par rapport au bregma sont : antériorité 0,22 mm, latéralité +/-1 mm et profondeur 2,5 mm. Les coordonnées de la partie dorsale du champ CA1 de l'hippocampe sont : 1,75 mm postérieur, latéralité +/- 1,5 mm, + 1,95 mm de profondeur. La calotte crânienne est percée à l'aide d'une foreuse (\varnothing 0,5mm) au niveau du point d'entrée de l'aiguille. Le crâne est nettoyé avec de la biseptine avant de faire descendre l'aiguille jusqu'à la structure ciblée (Figure 37).

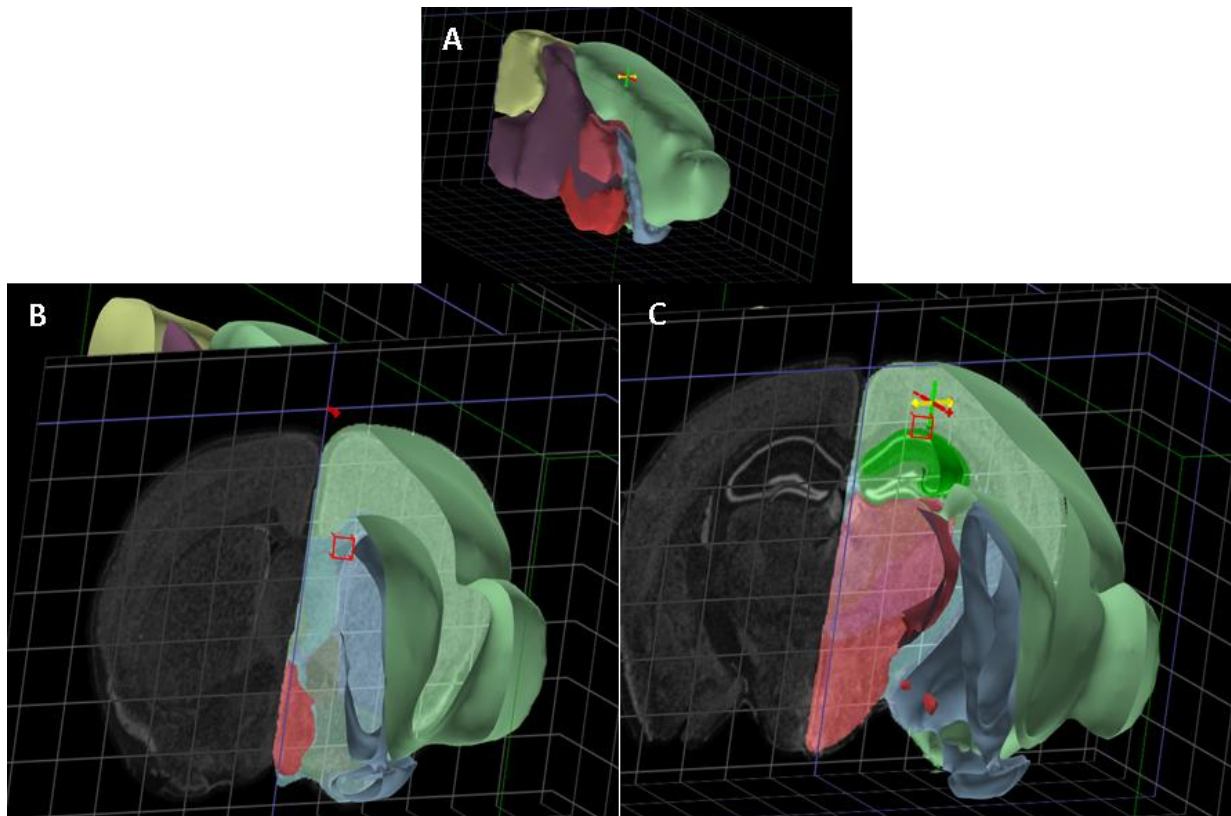


Figure 37 : Régions d'intérêt ciblées par la chirurgie stéréotaxique. **A** : représentation tridimensionnelle d'un hémisphère cérébral de souris C57 âgée de 10 semaines (l'intersection des 3 axes représente la position du bregma dans l'espace ; 1 division=1mm ; l'intersection des lignes bleues représente la projection orthogonale du bregma dans les plans de coupe) ; **B** : plan de coupe au niveau du ventricule latéral ; **C** : plan de coupe au niveau de l'hippocampe (en vert brillant). La zone ciblée est encadrée en rouge.

(Illustration réalisée avec The Allen Atlas Mouse Brain Explorer)

Les souris C57Bl/6 ont été implantées avec une capsule soit dans le ventricule droit, soit au-dessus du champ CA1 de l'hippocampe. Les souris Tg2576 ont été implantées avec deux capsules dans chaque ventricule. L'implantation d'une capsule dans le ventricule se fait à la vitesse de 1 μ L/5min et dans l'hippocampe à la vitesse de 1 μ L/10min.

A la fin de l'injection, l'aiguille est laissée en place pendant 2 minutes avant d'être remontée lentement. Le trou dans le crâne est recouvert d'un film de cire hémostatique (Lukens Bone Wax), le scalp de l'animal recousu et la plaie désinfectée à la biseptine. L'animal est alors replacé dans sa cage, au chaud sur une bouillote pour prévenir l'hypothermie.

2.3 Procédure d'injection intracérébrale unique de peptide A β

Les détails de ce protocole d'injection sont décrits dans une publication du laboratoire Lipidomix (Youssef *et al.*, 2008). Ces injections sont réalisées avec une seringue Hamilton de 5 μ L (Supelco, 800 series, H85RN équipée d'une aiguille G26s, point style 3 blunt, figure 38). Les souris C57Bl/6 ont reçu une injection d'1 μ L d'A β 0,5 mM dans le ventricule gauche (au débit d'1 μ L/min) 3 semaines après l'implantation de la capsule et selon la même méthodologie (4.2.2). De même, certains animaux ont reçu 1 μ g de CNTF humain (hCNTF, Sigma, C3710) en *icv* une semaine, ou 5 minutes, avant de recevoir une injection stéréotaxique d'A β .



Figure 38: Seringue utilisée pour l'injection stéréotaxique de peptide.

2.4 Procédure d'injections intracérébrales répétées de peptide A β

Principe. La mise au point d'un modèle d'exposition multiple au peptide A β_{1-42} soluble permettrait de modéliser l'impact de l'exposition chronique aux oligomères d'A β dans la physiopathologie de la MA lors du passage de la phase prodromale asymptomatique à la phase MCI, puis la phase modérée de MA. Dans un premier temps, la dose d'A β à utilisée a été déterminée. La méthodologie utilisée par Youssef *et al.* (2008) pour mettre en évidence les déficits cognitifs induits par 500 pmol de peptide A β soluble a été une référence afin de déterminer les effets de l'administration d'une dose de 250 pmol (demi-dose) ou d'une dose de 1 nmol (double dose) d'A β . Dans un deuxième temps, une dose similaire (300 pmol) a été administrée *icv* de manière répétée *via* de guide-canules intracérébraux à demeure.

Protocole. Les systèmes d'implantation du guide et le système d'injection sont fabriqués à la main sous binoculaire et nécessitent le matériel référencé dans le tableau 16. Ce matériel nous a été généreusement offert par le Dr Y. Cho (LNC, Bordeaux I).

MATERIEL	CARACTERISTIQUES	RÉFÉRENCE
Guides Souris	Ø extérieur : 0,45 mm Ø intérieur : 0,25 mm Longueur: 8 mm Tube rond, Inox 316 L, Soudé Rectitude la meilleure	CODE :TUC00895 Tubular Components Le Guellec ZI Pouldavid F-29177 DOUARNENEZ CEDEX
Canules Souris	Ø extérieur :0,23 mm Ø intérieur : 0,12 mm Longueur:20 mm Tube rond, Inox 316 L, Soudé Etat physique ecroui	CODE :TUC00886 Tubular Components Le Guellec ZI Pouldavid F-29177 DOUARNENEZ CEDEX
Cathéter	Ø intérieur :0,3 mm Ø extérieur: 0,76 mm Matiere PTFE naturel	Folioplast of 3310 CP folio: 300028
Fil tungstène à mandrins	Ø 0.1 mm	Goodfellow Goodfellow SARL Siège Social: 229, rue Solférino, F-59000 LILLE Ref: 005138 http://www.goodfellow.com/scripts/web.wl?MGWLPN=MNT &PROG=SEARTOW&LAN=F&HEAD=W%2000&SPAGE=W%2000&FORM=50
Tire nerf	Ø 0.2mm	Dentsply Maillefer Ref 9-160 http://gacd.com/product_card.php?id=1124
Colle	Loctite verte	Grande surface
Ciment dentaire	Résine autopolymérisante « PALAVIT G » 100g de poudre	Ref 12-580 « PALAVIT G » Heraeus Kulzer GmbH&Co. KG Grüner Weg 11 D-63450 Hanau www.heraeus-kulzer.com http://gacd.com/product_card.php?id=1713
Solvant pour ciment	Mélange de solvants « PALAVIT G » 80 ml	Ref 12-590 Heraeus Kulzer GmbH&Co. KG Grüner Weg 11 D-63450 Hanau www.heraeus-kulzer.com http://gacd.com/product_card.php?id=1713

Tableau 16: Liste du matériel nécessaire à la réalisation des injections répétées intracérébrales d'oligomères solubles de peptide amyloïde.

La pose des guides-canules est réalisée selon les mêmes modalités que les injections stéréotaxiques à la différence près que l'implantation se fait 1mm au dessus de la cible.(figure 39) Les coordonnées d'injection pour la pose d'un guide-canule destiné à des injections *icv* multiples sont donc (par rapport au bregma) 0,22mm en antérieur, +/- 0,9mm de latéralité et 1,6 mm de profondeur. La méthode d'implantation est détaillée dans la partie droite de la figure 39 (A à F) et

nécessite l'assemblage préalable d'un système d'implantation (figure 39, partie gauche). Brièvement, une fois le repère bregma révélé et les coordonnées du point de référence prises (A et B), le crâne de l'animal est gratté au scalpel et la colle est déposée (C). Après quelques minutes de séchage, la voûte crânienne est percée à l'aide de la fraise \varnothing 0,5mm (D) et le guide est descendu à la profondeur voulue. Le ciment dentaire (Palavit G, Heraeus) est disposé autour de la pièce implantée (E) et sèche pendant 15 minutes. Une fois le ciment sec, la pièce d'implantation est remontée tandis que le guide est maintenu en place par le ciment dentaire (F). Un mandrin conservé dans de la biseptine et de la taille du guide est alors placé dans le guide-canule.

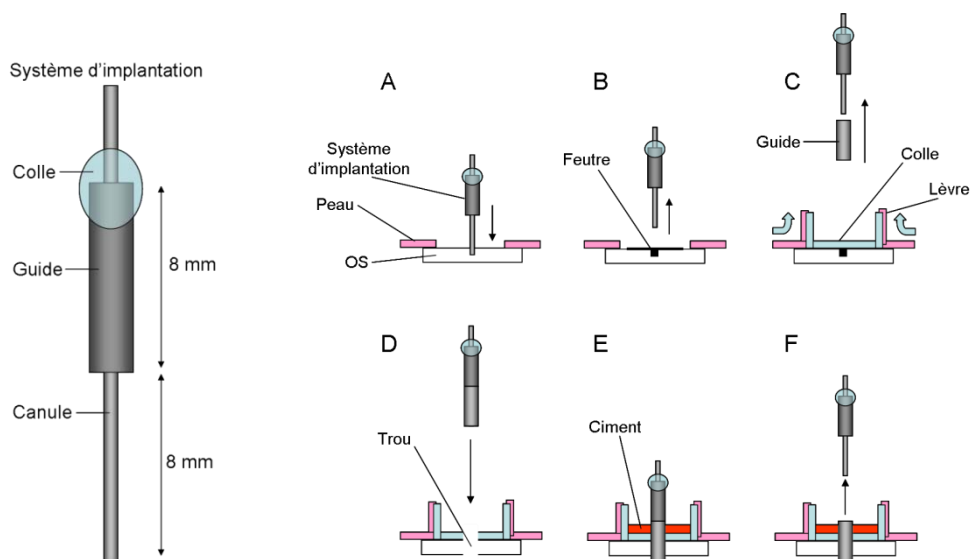


Figure 39 : Procédure d'implantation des guide-canules à demeure. A gauche : système de support des guides-canules permettant leur implantation intracérébrale. A droite : principe et étapes importantes de la pose d'un guide.

À l'issue de la chirurgie, les animaux sont laissés 10 jours en convalescence post-opératoire. Pendant ce délai, l'animal participe à une procédure d'habituation à l'expérimentateur 10 min/ jour x 3 jours. Cette étape est cruciale car les injections répétées sont effectuées sur des animaux vigiles. Les systèmes d'injection sont assemblés de la manière exposée dans la figure 40. La veille de la première injection, le mandrin obturant le guide est retiré et le guide est curé au tire-nerf. Un système d'injection factice est alors placé dans le guide pendant 2 minutes pour écarter les tissus puis le mandrin est remplacé.

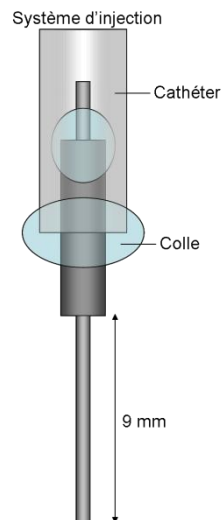


Figure 40: Assemblage du système d'injection.

Les injections se déroulent de la manière suivante : le système d'injection est rempli puis le cathéter est branché sur une seringue hamilton placée dans un pousse-seringue. Sur l'animal vigile en contention, la canule du système d'injection est placée dans le guide pendant deux minutes puis la solution est injectée à un débit de $1\mu\text{L}/\text{min}$. À la fin de l'injection, le système est laissé 2 minutes avant d'être rapidement substitué par le mandrin conservé dans de la biseptine. Dans cette expérience, les animaux ont reçu une dose de 300 pmol d'une solution d'A β 0,5mM (soit un volume d'injection de 0,6 μL) tous les deux jours pendant 3 semaines (pour un total de 10 injections) avant d'être testés selon la méthodologie décrite au 4.3.2.

3. Analyses comportementales

3.1 Système de capture vidéo

Toutes les analyses comportementales sont enregistrées à l'aide d'une caméra couplée à un système de capture vidéo (SMART, Bioseb, Vitrolles, France). Ce système est doté d'un mode « 3 points » qui détecte la morphologie globale de la souris et discrimine la tête, le centre de gravité et la base de la queue. À la fin de l'expérience, un fichier Excel des mesures est généré pour réaliser les analyses. Ce dispositif permet donc l'enregistrement et les quantifications des performances comportementales des animaux de manière semi-automatisée (figure 41).

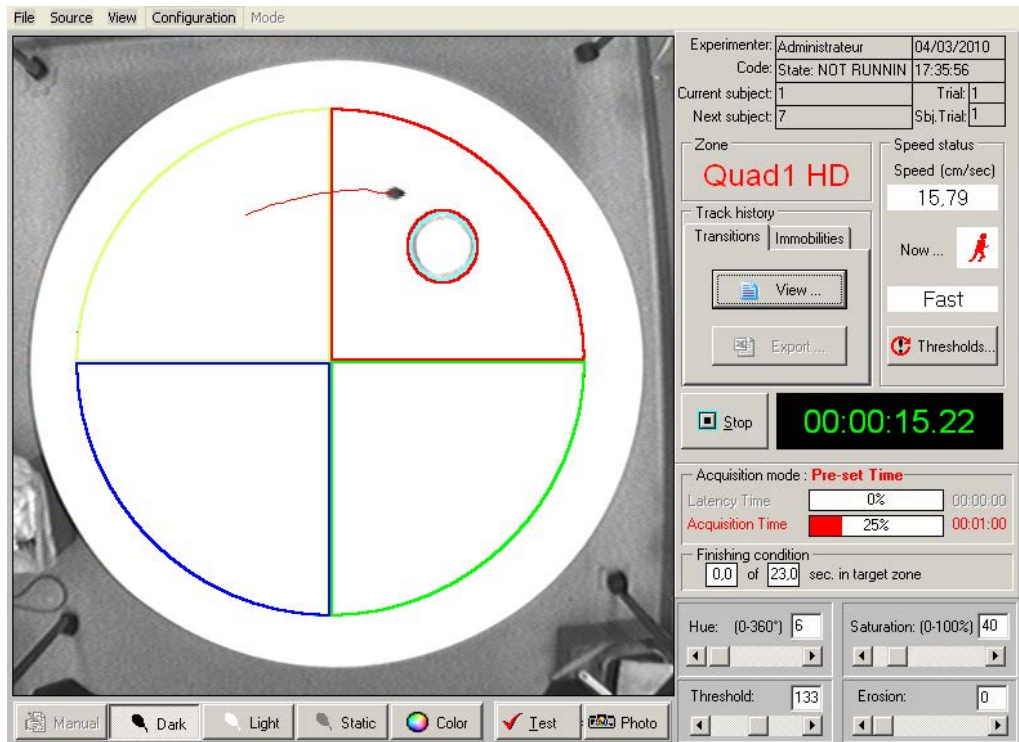


Figure 41: capture d'écran du logiciel de capture vidéo.

3.2 Procédure standard d'évaluation des mémoires à court et long terme

Avant toute mesure comportementale, les animaux sont placés en acclimatation dans la pièce de comportement pendant 20 à 30 minutes. La planification des différentes étapes de la procédure standard d'évaluation des troubles cognitifs induits par l'administration *icv* de peptide A β soluble est décrite dans la figure 42 et les différents tests comportementaux détaillés ci-après.

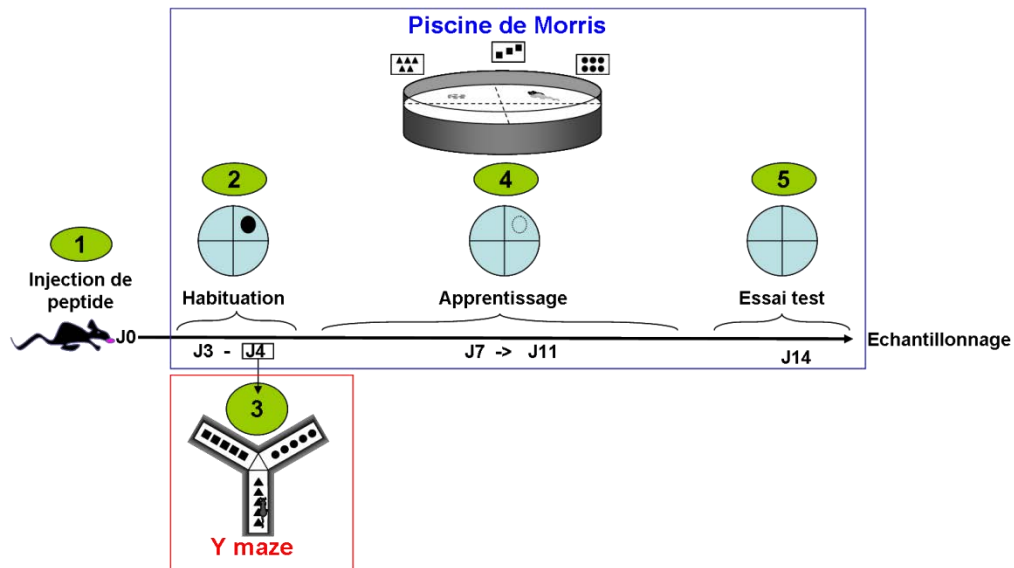


Figure 42 : Planification de la procédure comportementale standard permettant d'évaluer les troubles cognitifs induits par les oligomères soluble de peptide A β (Youssef *et al.*, 2008).

3.3 Étude de la mémoire spatiale à court terme : le labyrinthe en Y

Ce paradigme d'étude de la mémoire spatiale à court terme est composé de 3 bras (notés A, B et C) en plexiglas noir opaque de 40 cm de long, 10 cm de large, 14 cm de hauteur et orientés à 120° les uns par rapport aux autres. Le sol est en plexiglas transparent sous lequel sont glissées des plaques portant des figures géométriques qui vont servir d'indices spatiaux afin de permettre à l'animal de discriminer les différents bras (figure 43). La motivation dans ce test est constituée par l'attrait naturel des souris à explorer des environnements nouveaux. Le test se déroule dans une pièce insonorisée dont les murs sont cachés à l'aide de rideaux noirs afin d'éviter toute interférence avec l'extérieur. Le labyrinthe est éclairé de manière indirecte à faible intensité de manière à obtenir 6 à 10 lux dans les bras. Pendant les 5 minutes de test, l'animal explore librement le dispositif et la séquence des bras visités est enregistrée à l'aide du système d'analyse vidéo. L'animal est considéré comme entré dans le bras lorsque son train arrière passe une ligne fictive située à 5 cm de l'entrée du bras.

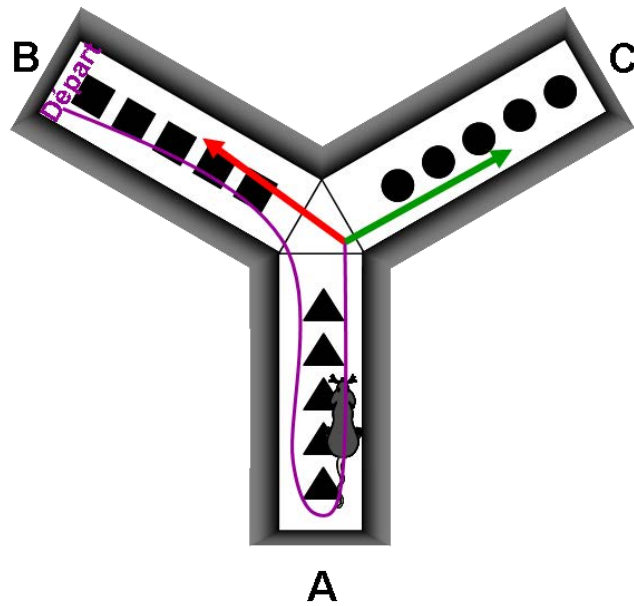


Figure 43 : Schéma du labyrinthe en Y. Dans cet exemple, l'animal est introduit dans le bras B et va dans le bras A. Lorsque l'animal repart vers le centre du dispositif, il a alors le choix entre le bras dont il provient (flèche rouge) et le bras inexploré (flèche verte). Le choix du bras inexploré conduit à une alternance, ici, B-A-C.

Ce test possède un niveau de hasard de 50%. La performance de mémoire à court terme est déterminée par le calcul du pourcentage d'alternance spontanée (Youssef *et al.*, 2008). Une alternance est définie comme la visite successive de trois bras différents constituant un triplet. Les animaux faisant moins de 12 entrées sont éliminés du test. Les triplets pouvant se chevaucher, le pourcentage d'alternance est calculé selon le rapport:

$$\% \text{ d'alternance} = \left(\frac{\text{Nombre d'alternances}}{\text{Nombre d'entrées} - 2} \right) \times 100$$

Ce test possède l'avantage de pouvoir être utilisé plusieurs fois sur un même animal afin de réaliser un suivi longitudinal des performances de mémoire à court terme.

3.4 Étude de la mémoire spatiale à long terme : le labyrinthe aquatique

La piscine de Morris (figure 44) est un test largement utilisé pour étudier la mémoire spatiale de référence et à long terme chez le rongeur. Le paradigme est un réservoir circulaire de 80 cm de diamètre et 60 cm de hauteur rempli au 2/3 d'eau opacifiée avec un colorant blanc. La température est maintenue entre 20 et 21°C. Ce dispositif contient une plateforme (PF) immergée (*i.e.* invisible) de position fixe dans la version mémoire de référence. Le but de cette tâche est de forcer l'animal à créer une carte spatiale (Morris *et al.*, 1984) en utilisant des indices externes à la piscine pour lui

permettre de trianguler sa position dans l'espace, localiser et rejoindre la PF immergée. La motivation dans ce test est basée sur le caractère aversif de la situation aquatique. L'intensité d'éclairage est d'approximativement 100 lux.

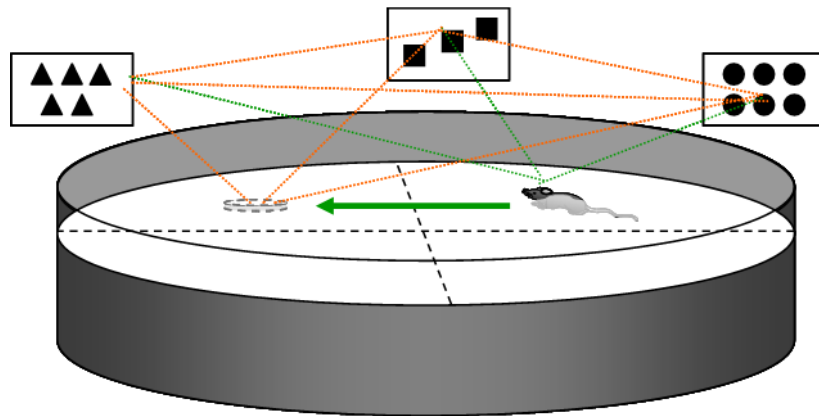


Figure 44: Schéma du dispositif du labyrinthe aquatique. La représentation cognitive des relations spatiales entre les indices à l'extérieur de la piscine et la position de la PF (pointillés orange) constituent la carte spatiale. L'utilisation de cette représentation permet à l'animal de se localiser dans l'espace (pointillés vert) pour inférer la position de la PF (flèche verte).

Le test se déroule en trois étapes : une phase d'habituation, une phase d'apprentissage spatial et un test de restitution (*probe test*).

Phase d'habituation. Le but de cette phase est de familiariser l'animal avec les conditions d'expérimentation et constitue également un test visuo-moteur. L'accomplissement de cette tâche semble peu dépendant de l'intégrité de l'hippocampe car il est basé sur des processus associatifs (Macedo *et al*, 2008). L'accès aux indices extérieurs est empêché par la mise en place d'un rideau noir autour de la piscine. Dans cette phase, l'animal doit rejoindre une PF visible dont la position varie à chaque essai (figure 45). Quatre essais de 60 secondes par jour sont réalisés sur 2 jours, avec un délai inter-essai de 45 minutes. Les paramètres étudiés dans cette phase sont la latence à rejoindre la plateforme, la distance parcourue ainsi que la vitesse de nage.

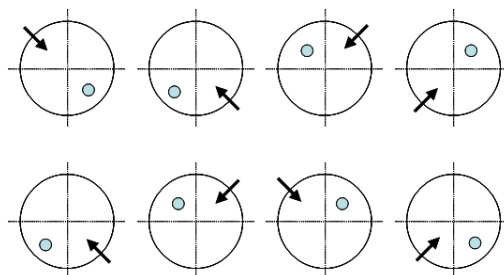


Figure 45 : Schémas des séquences de lâcher et des positions de la plateforme visible lors de la phase d'habituation.

Phase d'apprentissage spatial. Le but de cette phase est de forcer l'animal à élaborer une carte spatiale. De manière générale, la création d'une carte spatiale permettant d'établir des relations entre différents stimuli (les indices) est largement dépendante du circuit hippocampique. Dans cette phase, la PF de position fixe est immergée (invisible) et les indices extérieurs au labyrinthe sont rendus accessibles. Afin d'éviter des biais liés à la préférence spontanée pour un des quadrants de la piscine, l'ensemble des groupes expérimentaux sont subdivisés en sous-groupes et sont chacun entraîné sur différentes positions de PF fixe. La procédure d'apprentissage dure 5 jours au cours desquels 4 essais quotidiens de 60 secondes sont effectués avec un délai inter-essai de 45 minutes. Les positions de lâcher de l'animal sont changées à chaque essai selon une séquence prédéterminée défavorisant l'élaboration de stratégies non-spatiales (figure 46). La latence à rejoindre la PF, la distance parcourue et la vitesse de nage sont les paramètres étudiés.

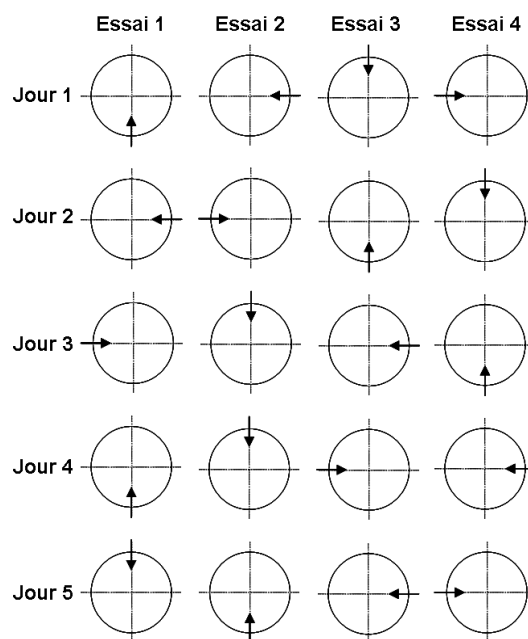


Figure 46 : Schéma des séquences de lâchers des animaux dans la piscine de Morris

Essai test. Le but de l'essai test est d'évaluer la persistance à long terme de la trace mnésique laissée par l'apprentissage. 3 jours après la fin de la phase d'apprentissage, la PF est enlevée de la piscine. La trajectoire de l'animal est analysée au cours d'un unique essai de 60 secondes effectué dans les mêmes conditions que l'apprentissage. La latence de premier passage sur la position de la PF, le

nombre de passages sur cette position, la fréquentation des différents quadrants de la piscine et la vitesse de nage sont les paramètres étudiés.

3.5 Planification des expériences

Pour faciliter la compréhension des procédures expérimentales, la conception de chaque série d'expériences est détaillée dans la figure 47.

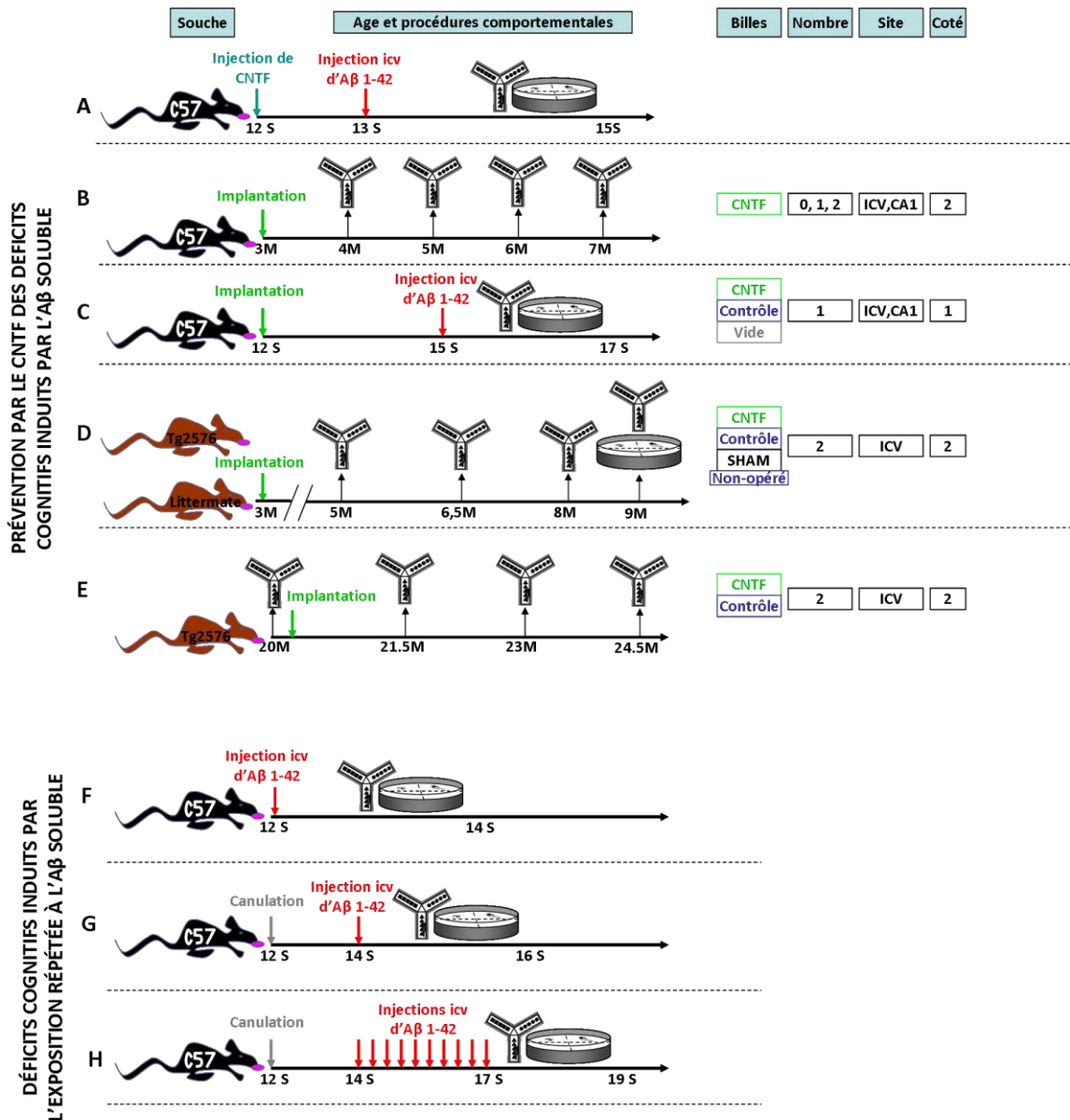


Figure 47 : Conception des expériences *in vivo* (Souches : Tg, Tg2576 ; Litt. Fond génétique ; Billes : peptide exprimé ; Site : ICV intracérébroventriculaire ou CA1 de l'hippocampe ; Coté : 1, unilatéral et 2, bilatéral).

Expérience A. Le potentiel neuroprotecteur du CNTF a été évalué chez des souris C57 (N=24 ; n=12 par groupe) ayant reçu une dose de 1 nmol de CNTF icv, ou une injection contrôle, une semaine avant l'administration de 500 pmol de peptide A β ₁₋₄₂ soluble. Consécutivement à l'injection d'A β , les animaux ont suivi la procédure standard d'évaluation des troubles induits par les oligomères d'A β (Youssef *et al*, 2008).

Expérience B. L'inocuité de l'implantation des billes à long terme a été évaluée sur 24 souris c57 (n=4 par condition) âgées entre 12 et 14 semaines. Les animaux ont été implantés bilatéralement dans le ventricule latéral (icv) ou au dessus du champ CA1 avec 0, 1 ou 2 billes CNTF. Les performances de mémoire de travail des animaux ont été suivies dans le Y maze pendant 4 mois.

Expérience C. Afin de déterminer si le CNTF recombinant sécrété par les capsules CNTF prévenait les déficits cognitifs induits par le peptide A β , 96 souris C57 (n=12 par condition) âgées de 13 semaines ont été implantées avec des billes CNTF ou Contrôle dans le ventricule latéral ou au-dessus du champ CA1 de l'hippocampe. Trois semaines après, le peptide A β ou son véhicule ont été administrés en icv. L'absence de biais de la composition de la capsule sur la toxicité du peptide A β a été vérifiée en implantant 24 souris avec une bille vide en icv avant d'administrer 3 semaines plus tard le peptide A β ₁₋₄₂ ou le véhicule. À l'issue de l'injection de peptide, les troubles cognitifs des animaux ont été évalués selon la procédure standard.

Expérience D. La prévention des déficits cognitifs par l'apport continu de CNTF a été étudiée chez 31 souris Tg2576 (n=15-16 par condition) et 36 littermates (n=18 par condition ; souris de même fond génétique que les Tg2576). Les animaux ont été implantés bilatéralement à l'âge de 3 mois avec 2 billes CNTF ou Contrôle par hémisphère. À partir de 5 mois et tous les 1,5 mois, les performances de mémoire de travail ont été suivies dans le labyrinthe en Y. À l'âge de 9 mois, les animaux ont été testés dans la piscine de Morris, puis à nouveau dans le Y maze avant d'être sacrifiés. La même expérience a été reconduite sur des animaux de même fond génétique « sham » (n=18) ayant subi la procédure chirurgicale seule, ainsi que sur des animaux non opérés (n=16).

Expérience E. Le potentiel curatif du CNTF a été évalué chez des souris Tg2576 âgées. Deux billes CNTF ou contrôle ont été implantées par hémisphère dans le ventricule latéral de souris Tg2576 âgées de 20 mois (n=4 par condition). Les performances de mémoire de travail ont été périodiquement suivies dans le labyrinthe en Y chaque 1.5 mois pendant 4.5 mois.

Expérience F. La détermination d'une dose d'A β subtoxique n'induisant pas de troubles significatifs s'est faite en injectant par voie icv à des souris C57 (n=12 par condition) soit une demi-dose d'A β ₁₋₄₂ (250 pmol), soit une double dose (1nmol). Les performances cognitives des animaux ont ensuite été évaluées selon notre procédure standard (Youssef *et al*, 2008).

Expérience G. La validation du système d'injection par les canules et la faisabilité de la réalisation de mesures comportementales sur des animaux ayant subi cette procédure chirurgicale lourde a été réalisée sur 12 souris C57. Les animaux ont été implantés avec un guide-canule en icv selon la méthodologie précédemment décrite. Après un repos post-opératoire de 10 jours, 500 pmol d'A β ₁₋₄₂ ont été administrées par la canule, avant de tester les animaux selon la procédure standard.

Expérience H. L'effet de l'exposition répétée d'une dose d'A β subtoxique a été mis en évidence en administrant tous les deux jours pendant trois semaines 300 pmol d'A β_{1-42} *via* la guide-canule. Suite à la dernière injection, les animaux ont été testés selon la procédure standard d'évaluation comportementale.

3.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Statview. La normalité des données a été testée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Si les données suivent une loi normale, des statistiques paramétriques ont été utilisées (*t* de Student, ANOVA). Sinon les équivalents non paramétriques ont été utilisés (U de Mann-Whithney, Kruskall-Wallis). Les valeurs de *p* inférieures à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

IV. RÉSULTATS

**Ciliary Neurotrophic Factor Cell-Based Delivery Prevents
Synaptic Impairment and Improves Memory in Mouse
Models of Alzheimer's Disease**

1.Introduction

La maladie d'Alzheimer (MA) est actuellement la démence la plus répandue dans le monde. Malgré les nombreux efforts de recherche entrepris depuis plus d'une vingtaine d'années, aucun traitement efficace n'existe à ce jour. Les causes en sont sans doute multiples, mais il est clair que la complexité des mécanismes moléculaires impliqués dans cette pathologie constitue une des raisons majeures aux échecs successifs de plusieurs essais cliniques chez l'homme.

Afin de comprendre comment lutter contre la neurodégénérescence responsable des pertes cognitives associées à la MA, l'équipe Lipidomix étudie depuis plusieurs années les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la synaptotoxicité et la neurotoxicité des oligomères solubles de peptide amyloïde. Le laboratoire a ainsi développé des modèles cellulaires et animaux dans le but de proposer des validations fonctionnelles de stratégies thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer (Pillot *et al.*, 1999 ; Sponne *et al.*, 2003; Kriem *et al.*, 2004 ; Fifre *et al.*, 2005 ; Malaplate-Armand *et al.*, 2006 ;Florent *et al.*, 2006 ; Youssef *et al.*, 2008).

La chronologie des atteintes histopathologiques (Delacourte *et al.*, 1999) et les troubles fonctionnels de la mémoire épisodique désignent l'hippocampe et les neurones du champ CA1 comme particulièrement vulnérables à la pathologie (Kim *et al.*, 2003 ; Sultana *et al.*, 2010 ; Perez-Cruz *et al.*, 2011). Le peptide A β soluble est précocement impliqué dans les pertes synaptiques et cellulaires *in vitro* (Almeida *et al.*, 2005; Lacor *et al.*, 2004, 2007), *in vivo* (Mucke *et al.*, 2000 ; Westerman *et al.*, 2002 ; Youssef *et al.*, 2008) et chez l'Homme (Delacourte *et al.*, 2002 ; Selkoe, 2002; Sultana *et al.*, 2010). Ainsi, promouvoir la survie neuronale et la transmission synaptique par l'apport de peptides neurotrophiques (Vicario-Abejón *et al.*, 2002) présente donc un intérêt thérapeutique pour la MA. Cependant, la nature progressive de la MA nécessite l'application continue et ciblée de ces facteurs neurotrophiques dans le SNC.

La perméabilité sélective de la BHE limite l'apport de neurotrophines exogènes au cerveau (Poduslo & Curran, 1996). La greffe dans le cerveau de cellules recombinantes sécrétant des peptides thérapeutiques d'intérêt est une alternative efficace à ce problème. Le processus d'encapsulation des cellules recombinantes améliore la biocompatibilité de l'implant en permettant le passage des nutriments tout en limitant la réponse immunitaire de l'hôte (Visted *et al.*, 2001 ;Thanos & Emerich, 2008).

Le peptide CNTF, une cytokine apparentée à l'IL6 et au LIF, possède des propriétés neurotrophiques reconnues. La sécrétion *in situ* de CNTF par des cellules encapsulées implantées dans le SNC s'est avérée efficace chez animaux modèles de différentes pathologies neurodégénératives comme la rétinite pigmentaire ou la maladie de Huntington (Emerich & Thanos, 2006). Le potentiel neuroprotecteur du CNTF dans la MA n'a pas été étudié.

Notre objectif a donc été de réaliser la preuve du concept que la sécrétion continue de CNTF par des cellules C2C12 recombinantes encapsulées pouvait prévenir la toxicité du peptide A β soluble dans différents modèles d'études *in vitro* et *in vivo* de la MA. Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés à caractériser le potentiel neuroprotecteur du CNTF et à décrire les mécanismes moléculaires impliqués. Notre approche a été valorisée par une publication dans un journal à comité de lecture.

2. Publication

7516 • The Journal of Neuroscience, June 2, 2010 • 30(22):7516–7527

Behavioral/Systems/Cognitive

Ciliary Neurotrophic Factor Cell-Based Delivery Prevents Synaptic Impairment and Improves Memory in Mouse Models of Alzheimer's Disease

Pierre Garcia,^{1*} Ihse Youssef,^{1*} Jo K. Utvik,² Sabrina Florent-Bécharde,¹ Vanessa Barthélémy,² Catherine Malaplate-Armand,^{1,4} Badreddine Kriem,¹ Christophe Stenger,¹ Violette Koziel,¹ Jean-Luc Olivier,^{1,4} Marie-Christine Escanye,^{1,4} Marine Hanse,¹ Ahmad Allouche,¹ Cédric Desbène,^{1,4} Frances T. Yen,¹ Rolf Bjerkvig,^{2,3} Thierry Oster,^{1,5} Simone P. Niclou,² and Thierry Pillot¹

¹JE2482 Lipidomix, Nancy Université, 54500 Vandœuvre, France, ²NorLux Neuro-Oncology Laboratory, Centre de Recherche Public-Santé, L-1526 Luxembourg, ³NorLux Neuro-Oncology, Department of Biomedicine University of Bergen, N-5020 Bergen, Norway, ⁴Department of Biochemistry, University Hospital, F-54000 Nancy, France, and ⁵Unité de Formation et de Recherche, Sciences Fondamentales et Appliquées, Université Paul Verlaine, 57000 Metz, France

The development of novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease (AD) represents one of the biggest unmet medical needs today. Application of neurotrophic factors able to modulate neuronal survival and synaptic connectivity is a promising therapeutic approach for AD. We aimed to determine whether the loco-regional delivery of ciliary neurotrophic factor (CNTF) could prevent amyloid- β ($A\beta$) oligomer-induced synaptic damages and associated cognitive impairments that typify AD. To ensure long-term administration of CNTF in the brain, we used recombinant cells secreting CNTF encapsulated in alginate polymers. The implantation of these bioreactors in the brain of $A\beta$ oligomer-infused mice led to a continuous secretion of recombinant CNTF and was associated with the robust improvement of cognitive performances. Most importantly, CNTF led to full recovery of cognitive functions associated with the stabilization of synaptic protein levels in the Tg2576 AD mouse model. *In vitro* as well as *in vivo*, CNTF activated a Janus kinase/signal transducer and activator of transcription-mediated survival pathway that prevented synaptic and neuronal degeneration. These preclinical studies suggest that CNTF and/or CNTF receptor-associated pathways may have AD-modifying activity through protection against progressive $A\beta$ -related memory deficits. Our data also encourage additional exploration of *ex vivo* gene transfer for the prevention and/or treatment of AD.

Introduction

The progressive impairment of short-term memory and emotional disturbances that typify Alzheimer's disease (AD) results from synaptic dysfunction and death of neurons in the hippocampus and associated regions of the cerebral cortex and limbic system (Selkoe, 2002; Scheff et al., 2007). These abnormalities are believed to result from interactions of soluble amyloid- β ($A\beta$) oligomers with synaptic plasma membranes (Walsh et al., 2002; Sponne et al., 2003; Lacor et al., 2004; Kokubo et al., 2005). Consequently, several of the current therapeutic strategies specifically address the amyloid pathology in AD brain (Klafki et al., 2006). These approaches have been designed to decrease the production of $A\beta$ by the use of so-called specific secretase inhibitors,

whereas others attempt to induce $A\beta$ clearance using $A\beta$ immunotherapy (Selkoe, 2004). It is noteworthy that all of these approaches aim primarily toward reducing $A\beta$ peptide levels in the brain. However, although no physiological function has been ascribed to the $A\beta$ monomer itself, marked or complete depletion of monomers could result in side effects (Puzzo et al., 2008). In addition, these strategies do not rescue neurons already compromised by $A\beta$ -induced stress responses. There is therefore an urgent need to develop strategies able to interfere with disease progression to halt ongoing cognitive decline.

The major role of neurotrophic factors (NTFs) in synapse function (Vicario-Abejon et al., 2002) along with evidence that synaptic failure is a critical early event in AD (Selkoe, 2002) has put NTFs at the forefront of neuroprotective strategies for AD (Blesch, 2006). Recent studies suggest that changes in NTF homeostasis may contribute to neuronal degeneration in AD (Twiss et al., 2006). Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor improve memory in AD models (Tuszynski, 2007). However, the application of NTFs as therapeutic agents for AD faces limitations, including limited blood–brain barrier permeability (Allen and Dawbarn, 2006). To overcome these problems, NTFs can be delivered directly to the brain by implantation of cells engineered to produce NTFs (Tuszynski et al., 2002). To prevent

Received Aug. 25, 2009; revised March 29, 2010; accepted April 2, 2010.

This work was supported by the Fonds National de la Recherche of Luxembourg, the Région Lorraine, the Ligue Européenne Contre la Maladie d'Alzheimer (France), the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (France), the Alzheimer Moselle Nord Association (France), the Alzheimer 54 Association (France), and the France Alzheimer Meurthe et Moselle (France). We thank E. Magueur for technical expertise.

*P.G. and I.Y. contributed equally to this work.

The authors have no conflicting financial interests.

Correspondence should be addressed to Dr. Thierry Pillot, EA4422 Lipidomix, Nancy Université, 2 avenue de la Forêt de Haye, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. E-mail: thierry.pillot@ensaia.inpl-nancy.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4182-09.2010

Copyright © 2010 the authors 0270-6474/10/307516-12\$15.00/0

an inflammatory reaction in the brain or the destruction of the transplanted cells by immune cells, the producer cells can be encapsulated in various encapsulation devices. This strategy has been successfully developed in different experimental models of brain diseases, such as Huntington disease (Emerich et al., 1996), Parkinson disease (Frim et al., 1994), AD (Tuszynski et al., 1998), and brain tumors (Read et al., 2001).

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) belongs to the interleukin-6 family of cytokines and is known for its neuroprotective effects, being a survival factor for sympathetic, sensory, and hippocampal neurons. Although CNTF protects neurons from degeneration arising from multiple etiologies (Duff and Baile, 2003; Sieving et al., 2006), it has not been evaluated in preclinical studies in the context of AD pathology (Emerich and Thanos, 2006). Here, we show that CNTF continuously delivered from microcapsule containing engineered CNTF cells implanted in the brain of two AD mouse models prevents A β oligomer-induced neuronal damage and neurobehavioral impairments. We further show that CNTF action requires the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathways.

Materials and Methods

Recombinant cell production and alginate bead encapsulation

The C2C12 myoblast cell line (kindly provided by P. Aebischer, Lausanne, Switzerland) stably expressing human CNTF (hCNTF) was grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin plus 100 U/ml streptomycin (1 \times PS), 2 mM glutamine (Gln), and 1 \times nonessential amino acids (NEAA). To allow direct visualization of the capsules *in vitro* and *in vivo*, both the control and the CNTF-producing cell lines were genetically engineered by lentiviral vector transduction to express the fluorescent marker protein enhanced green fluorescent protein (eGFP). For encapsulation in alginate, the producing cells were harvested, counted, and mixed into a 2% sodium alginate (ultrapure, low viscosity, high guluronic acid content; PRONOVA UP LVG, NovaMatrix; FMC BioPolymer) saline solution [0.9% NaCl and 10 mM 3-(*N*-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS), pH 7.4] at a concentration of 50×10^6 cells/ml alginate solution. Alginate beads were generated with an electrostatic bead generator (Read et al., 2001). To obtain small-sized beads (100–200 μ m), sharpened nozzles with a diameter of 0.17 mm were used (Nisco Engineering). The gelling bath was composed of 0.1 M CaCl₂ in 0.9% NaCl with 10 mM MOPS, pH 7.4. After encapsulation, beads containing 500–1000 C2C12 cells were washed and kept in culture medium (CM) until use. CNTF secretion from the beads was verified by immunoblot analysis and ELISA.

Primary cell cultures and treatments

Primary cultures of C57BL/6 mouse neurons were prepared as described previously (Sponne et al., 2003; Fifre et al., 2006). Neurons were treated at 8–10 d *in vitro* (DIV) with increasing concentrations of soluble A β oligomers for the indicated times. Alternatively, cells were preincubated for 2 h under the indicated conditions before addition of A β oligomers. A β _{1–40} and A β _{1–42} were obtained from Bachem, and soluble oligomers of A β were prepared as described previously (Pillot et al., 1999; Fifre et al., 2006; Youssef et al., 2008). Oligomeric preparations of A β resolve to monomers, trimers, and tetramers (15–20 kDa) after SDS-PAGE, as described previously (Dahlgren et al., 2002; Malaplate-Armand et al., 2006; Puzzo et al., 2008; Youssef et al., 2008). Unless otherwise indicated, materials used for cell culture were obtained from Invitrogen.

Neuronal viability and monitoring of apoptosis

Cell viability was assessed using the release of lactate dehydrogenase and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays as described previously (Kriem et al., 2005; Youssef et al., 2008). Alternatively, cell viability was monitored using a LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity kit (Invitrogen) according to the recommendations of the

manufacturer. Cell nuclei were visualized using 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sponne et al., 2003). To evaluate the percentage of apoptotic cells, 14 independent fields from four wells were analyzed (>1000 cells per group). Caspase activities were measured by following the cleavage of the substrates Ac-DEVD-AMC (7-amino-4-methylcoumarin, *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide) and Ac-LEHD-AMC (acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) using previously described procedures (Sponne et al., 2003). Fifty micrograms of cellular proteins were incubated for 2 h with 100 μ M caspase substrates from a stock solution of 10 mM in DMSO. The cleavage of the caspase substrates was monitored by fluorescence emission at 460 nm after excitation at 360 nm, using a Fluostar microplate reader (BMG-Labtechnologies).

Immunoblot analyses

Mouse primary neurons cultured under different conditions were washed with ice-cold PBS. Cells were then solubilized in a 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, lysis buffer containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (w/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.1% (w/v) SDS, and protease inhibitors (Complete; Roche). After homogenization, collected cells were then lysed using three cycles of freezing and thawing and finally centrifuged at 4°C for 10 min at 10,000 \times g. Protein concentration in the supernatant was determined by BCA Protein Assay kit (Interchim). Samples (10 μ g) were mixed with an equal volume of 2 \times Laemli's buffer, denatured by heating the mixture for 5 min at 100°C.

Synaptosomal membrane fractions were prepared as described previously (Keller et al., 1997). Briefly, brain regions were dissected and rapidly homogenized in ice-cold 10 mM Tris buffer, pH 7.4, containing 0.32 M sucrose, 2 mM EDTA, 10 μ g/ml sodium orthovanadate, and protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin, and 5 μ g/ml aprotinin). The homogenate was spun at 1000 \times g for 15 min to remove nuclei and cell debris. The resulting supernatant was centrifuged at 12,000 \times g for 20 min to obtain the synaptosomal preparation.

Samples (conditioned medium from C2C12 cell capsules, cell extracts, or synaptosomes) were then subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. The following antibodies were used: CNTF (1:500 dilution; Sigma); MAP2 (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology); calpain regulatory subunit (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology); caspase-3 (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology); actin (1:1000 dilution, C-11 antibody; Santa Cruz Biotechnology); Akt and phosphorylated (P) Akt-(Ser⁴⁷³) (1:1000 dilution; Cell Signaling Technology); P-cAMP response element-binding protein (CREB)(Ser¹³³) (1:500 dilution; Cell Signaling Technology); GluR1 and GluR2/3 (1:500 dilution; Millipore Bioscience Research Reagents); STAT3 and P-STAT3(Tyr⁷⁰⁵) (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology); JAK-1 and P-JAK-1(Y1022) (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology); PSD95 (1:500 dilution; Cell Signaling Technology); amyloid precursor protein (APP) (1:1000 dilution, 22C11 antibody; Millipore Corporation); β -tubulin (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology); synapsin (1:1000 dilution; Millipore Corporation); SNAP25 (1:2000 dilution; Santa Cruz Biotechnology); synaptotagmin (1:1000 dilution; Calbiochem); stargazin (1:500 dilution; Cell Signaling Technology); and synaptophysin (1:500 dilution; Millipore Bioscience Research Reagents). Immunoblots were probed with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated preadsorbed secondary antibodies (1:2000 dilution; Cell Signaling Technology) and detected using the enhanced chemiluminescence protocol (ECL kit; GE Healthcare). The QUANTITY ONE software, associated with VersaDoc Imaging System (model 1000; Bio-Rad), was used to quantify the protein signals.

Immunocytochemistry

After treatment, neurons were fixed in PBS containing 4% (w/v) paraformaldehyde for 30 min at room temperature. The cells were permeabilized with PBS containing 3% (w/v) BSA and 0.1% (v/v) Triton X-100 for 30 min at room temperature and then incubated successively with an anti-MAP2 antibody (1:500 dilution) and an Alexa Fluor 488 donkey anti-goat antibody (1:1000 dilution). The microtubule network was

visualized using a Nikon microscope using a PlanFluor 60×/1.3 objective, and images were taken using a Nikon DXM1200 digital camera. For semiquantitative analysis of microtubule organization, at least 10 microscope fields per condition were viewed using a Nikon DXM1200 digital camera, and microtubule organization in 50–60 cells per field was classified as normal or disrupted as described previously (Sponne et al., 2003; Fifre et al., 2006).

Mice and surgical procedures

Mice. Male C57BL/6 mice (12 weeks old) were purchased from Janvier Laboratories. Male mice aged 10 weeks and overexpressing the Swedish APP mutant, Tg (HuAPP695.K670N–M671L) 2576, and their wild-type (WT) littermates were purchased from Taconic (001349-T strain on the C57BL/6 × SJL background). Animals were housed five to six per cage with access to food and water *ad libitum* and were kept in a controlled environment (22 ± 1°C, 50 ± 5% humidity) with a 12 h light/dark cycle (lights on 7:30 A.M.) and assessed during the light phase.

Surgery. All surgical procedures were performed on anesthetized mice (ketamine–xylazine mix, 1 mg/10 g body weight, i.p.). The animal facilities and all animal procedures were approved by the Animal Care and Veterinary Committee of Meurthe-et-Moselle (Nancy, France).

Alginate bead implantation. C57BL/6 mice ($n = 12$ per group) were implanted at the age of 3 months with a single alginate bead containing 500–1,000 CNTF–C2C12 or control C2C12 cells using a stereotaxic device. In a control experiment, an empty alginate bead (containing no cells) was implanted using the same experimental procedure. Beads were implanted into the right ventricle [anteroposterior (AP), –0.22 mm; lateral (L), –1 mm; dorsal (D), +2.5 mm] or above the cornu amonis 1 (CA1) subfield of hippocampus (AP, +1.75 mm; L, –1.5 mm; D, +1.95 mm). Five-month-old Tg2576 mice ($n = 8$ per group) received two alginate beads per ventricle. Implantations were performed using a 5 μ l Hamilton syringe (7000 Series Modified Microliter, knurled hub, 24 gauge needle; model 7105). Beads were injected in a total volume of 1 μ l.

Intracerebroventricular injection of soluble A β oligomers. Soluble A β_{1-42} oligomers were prepared as described above as stock solutions at the concentration of 0.5 mM in sterile 0.1 M PBS, pH 7.4, and aliquots were stored at –20°C until use. Three weeks after bead implantation, soluble A β oligomers (50 pmol in 1 μ l) or vehicle (saline) were injected into the left ventricle (from bregma: AP, –0.22 mm; L, +1.0 mm; and D, +2.5 mm). Injections were made using a 10 μ l Hamilton microsyringe fitted with a 26 gauge needle as described previously (Youssef et al., 2008). Alternatively, male C57BL/6 mice ($n = 12$ per group) were injected intracerebroventricularly with hCNTF or vehicle. One week later, mice received an intracerebroventricular injection of 50 pmol A β_{1-42} oligomers, as described previously (Youssef et al., 2008).

Behavioral analysis

Y-maze test. Immediate working memory performance was assessed by recording spontaneous alternation behavior in a Y maze as described previously (Sarter et al., 1988; Youssef et al., 2008). The maze was made of opaque Plexiglas, and each arm was 40 cm long, 16 cm high, and 9 cm wide and positioned at equal angles. Mice were placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during a 5 min session. The series of arm entries were recorded visually, and arm entry was considered to be completed when the hindpaws of the mouse were completely placed in the arm. Alternation was defined as successive entries into the three arms on overlapping triplet sets. The percentage alternation was calculated as the ratio of actual (total alternations) to possible (defined as the number of arm entries minus two) alternations.

Water-maze test. The water maze was performed as described previously by Morris (1984). The experimental apparatus consisted of a circular water tank (diameter, 80 cm; height, 50 cm) containing water at 22°C to a depth of 25 cm and rendered opaque by adding an aqueous acrylic emulsion. A platform (diameter of 10 cm) was submerged 1 cm below the water surface and placed at the midpoint of one quadrant (Youssef et al., 2008). The pool was placed in a test room homogeneously brightened at 100 lux and containing various prominent visual cues on the walls. The swimming paths of the animals were recorded using a video tracking system. On days 3 and 4, navigation to a visible platform

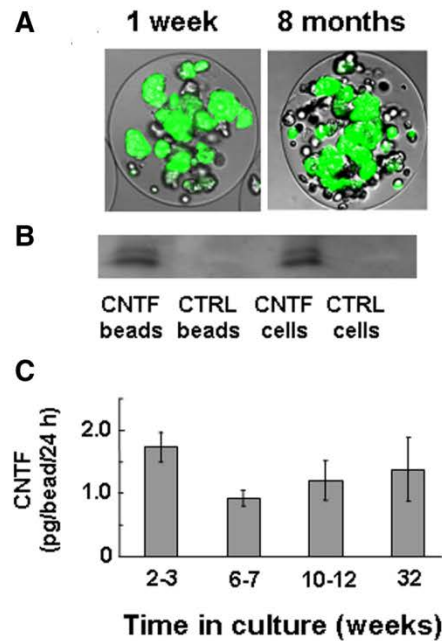


Figure 1. Long-term CNTF secretion from encapsulated C2C12 cells. **A**, Long-term survival of alginate encapsulated CNTF-expressing C2C12 cells as shown by eGFP expression at 1 week and 8 months in culture. **B**, Immunoblot of conditioned medium from CNTF producing C2C12 capsules and from the corresponding cell monolayer. **C**, Mean \pm SEM hCNTF secretion per 24 h from one alginate bead determined by ELISA at different time points in culture ($n = 3–9$ per time point).

was performed before place navigation to evaluate visual and motor abilities of the animals. Mice were submitted to four trials per day with two trials in the morning and two trials in the afternoon and with an intertrial interval of at least 45 min. There was no additional maze cue in the room. The platform position and starting points were randomly distributed over all four quadrants of the pool. Mice that failed to find the platform after 60 s were guided to its location. Next, memory-acquisition trials (training) were performed four times daily during 5 consecutive days to reach a steady state of escape latency. The mice were allowed to swim freely for 60 s, left alone for an additional 30 s on the hidden platform, and then returned to the home cage during the intertrial interval. The intratrial intervals during four trials were 45 min. Start positions (set at each limit between quadrants) were randomly selected for each animal. In each trial, the time required to escape onto the hidden platform was recorded. Mice failing to find the platform within 60 s were placed on the platform for 10 s at the end of the trial. Memory-retention tests (probe trials) were performed 3 d after the last training session. The platform was removed, and each mouse was allowed a free 60 s swim. The number of crossings over the original platform point, the time required for the first crossing over, and the time spent in each of the four quadrants were measured by analyzing the video recordings.

ELISA

For A β measurements, a hemibrain region including cortex and hippocampus from Tg2576 mice were dissected, flash frozen in liquid nitrogen, homogenized, and extracted as described previously (McLaurin et al., 2006). Sandwich ELISAs were performed according to recommendations of the manufacturer to quantify total A β_{1-40} and A β_{1-42} using the human A β_{1-40} and A β_{1-42} kits from Covance and Biosource, respectively. To determine the concentration of hCNTF secreted from beads, triplicates of 10 beads were incubated in 500 μ l of medium (DMEM, 10% FCS, 1 \times PS, 2 mM Gln, and 1 \times NEAA) for 48 h. The medium was harvested, and CNTF was measured using an ELISA kit for human CNTF (Quan-

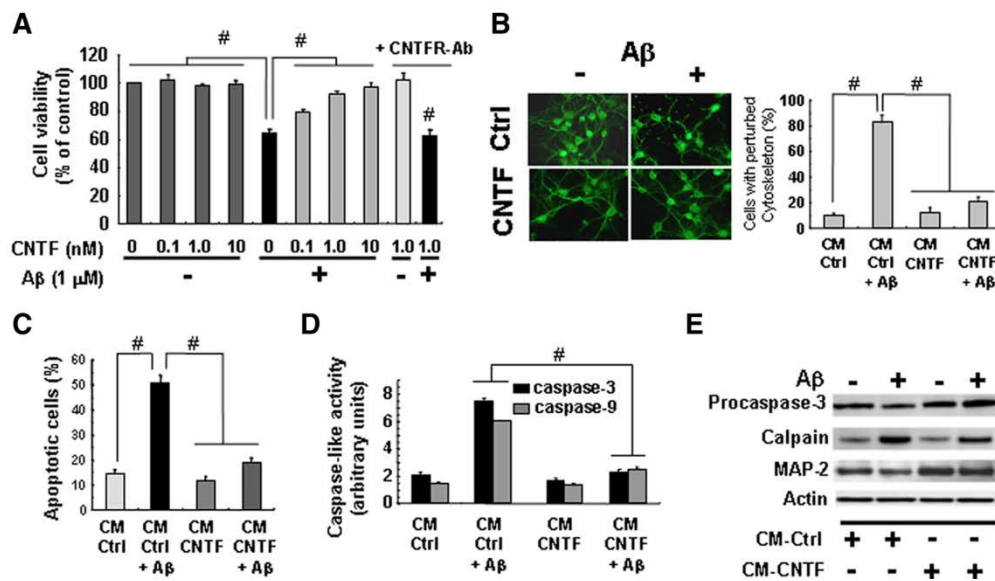


Figure 2. Secreted CNTF prevents A β oligomer-induced neurodegeneration *in vitro*. **A**, Mouse hippocampal and cortical neurons were preincubated for 2 h with CM from encapsulated CNTF cells containing the indicated CNTF concentrations or CM from encapsulated control cells in the absence or presence of anti-CNTF receptor antibodies (CNTFR-Ab). Neurons were then treated for 24 h with vehicle or 1 μ M A β_{1-42} oligomers. Cell viability was monitored using the MTT assay. Data are means \pm SEM of three independent experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle, designated as 100%. No significant differences were found between untreated cells and cells incubated with CM from encapsulated control cells, as well as between cells incubated with A β oligomers in the absence or presence of CM from encapsulated control cells (data not shown). **B**, A β oligomer-induced neurodegeneration is associated with neuronal cytoskeleton disruption (Sponne et al., 2003; Fifre et al., 2006). Seven DIV neurons were exposed for 12 h to 1 μ M A β_{1-42} oligomers in the presence or absence of CM from encapsulated CNTF cells containing 1 nM CNTF. Cultures were fixed and immunostained for MAP2 to visualize dendrites. In the presence of CM alone, dystrophic changes including beading and fragmentation were rare. In contrast, A β oligomers induced a severe disruption of the cytoskeleton network that was markedly reduced in the presence of secreted CNTF. The presence of CM from encapsulated control cells did not prevent A β oligomer-induced cytoskeleton disruption. The A β -induced microtubule perturbations were quantified as indicated in Materials and Methods and also as described previously (Sponne et al., 2003; Fifre et al., 2006). **C**, Apoptotic nuclei were visualized using DAPI staining and quantified as described in Materials and Methods [16 fields from 4 wells (> 1000 cells per group) were examined for quantification]. A β oligomers caused a significant increase in apoptotic nuclei that was almost completely inhibited in the presence of secreted CNTF but not by the CM of encapsulated control cells. **D**, Cells were also exposed for 6 h to 1 μ M A β_{1-42} oligomers, and caspase activation was monitored by measuring the proteolytic cleavage of caspase-related substrates. Data are means \pm SEM of three independent experiments with four determinations each ($p < 0.05$). **E**, Representative immunoblots showing the inhibitory effects of CM from encapsulated CNTF cells containing 1 nM CNTF on A β oligomer-induced caspase and calpain activation as well as decrease in MAP2 levels.

tikine, Human CNTF; R & D Systems Europe). The amount of CNTF (picograms) secreted per bead in 24 h was calculated.

Statistical analysis

STATVIEW computer software was used for the statistical analysis. Data were obtained from three to five separate experiments with six determinations each. Differences between control and treated groups were analyzed using Student's *t* test (** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). Multiple pairwise comparisons among the groups of data were performed using ANOVA, followed by a Scheffé's *post hoc* test ($p < 0.05$ indicates significant differences between groups). For behavioral analysis, statistical comparisons were made by the Student's *t* test, and one-way ANOVA was performed and followed by Fisher's *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ indicate significant differences between experimental groups. All reported values represent the mean \pm SEM.

Results

C2C12 cell encapsulation and CNTF secretion

C2C12 myoblast cells continuously expressing hCNTF with or without a reporter gene (eGFP) were encapsulated in ultrapure alginate beads with high G content. Cell capsules (containing 500–1000 C2C12 cells) were intact and alive for >8 months *in vitro* as identified by fluorescence reporter gene expression (Fig. 1A). CNTF secretion from the capsules was measured at different time points in culture. The concentration achieved was estimated to 1–2 pg per 24 h per alginate bead. After an initial stabilization period (5–10 d), CNTF production from the encapsulated cells

was constant throughout the time period (up to 8 months *in vitro*) (Fig. 1B,C).

CNTF rescues neurons from A β oligomer-induced degeneration *in vitro*

We have demonstrated previously that neuronal cell death induced by soluble A β oligomers proceeds through an apoptotic pathway involving an early cytoskeleton perturbation triggered by calpain and caspase activation (Pillot et al., 1999; Sponne et al., 2003; Fifre et al., 2006). The incubation of primary mouse neurons with 1 μ M A β_{1-42} oligomers for 24 h resulted in a 38.4% ($p < 0.001$ compared with vehicle-treated cells) decrease in cell viability (Fig. 2A). A 2 h preincubation with CNTF dose dependently protected neurons from A β oligomer-induced cell death. Complete protection by CNTF ($98.2 \pm 2.6\%$ cell viability relative to vehicle control cells) was observed with a dose of 10 nM. ANOVA indicated a significant protective effect of CNTF at all concentrations tested (0.1–10 nM) (Fig. 2A). Furthermore, the presence of a CNTF receptor antibody almost completely blocked the CNTF protective effects ($p < 0.05$ compared with cells treated with vehicle in the presence of CNTF receptor antibody) (Fig. 2A). These CNTF-specific neuroprotective effects (Fig. 2B) (see Fig. 4A) were accompanied by the inhibition of apoptotic pathways (Fig. 2C), including caspase and calpain inhibition (Fig. 2D,E).

Stabilization of synaptic protein expression and activation of the PI3K and JAK/STAT signaling pathways by CNTF

Synaptic dysfunction is increasingly considered as an early event in AD pathogenesis (Selkoe, 2002). Indeed, it has been demonstrated recently that A β oligomers impair synaptic function through the alteration of both the level and localization of synapse-associated proteins (Almeida et al., 2005; Kelly et al., 2005). To address the mechanism involved in CNTF-induced neuroprotection against A β , we investigated the expression of synaptic proteins and signaling pathways activated by CNTF. The treatment of mouse neurons with A β_{1-42} oligomers (1 μ M for 3 h) resulted in a dramatic decrease in the levels of the glutamate receptor subunit GluR1 level and of PSD95 in synaptic membranes (Fig. 3A). We show that 1 nM CNTF prevented A β oligomer-induced decrease in synaptic proteins, whereas anti-CNTF receptor antibodies abolished the protective effects of CNTF on synaptic markers (Fig. 3A). CNTF has been demonstrated to activate multiple survival signal transduction pathways that require phosphorylation (Garza et al., 2008) and that are impaired by soluble A β oligomers (Florent et al., 2006). To determine the signaling pathways that can be activated and improved by 1 nM CNTF in mouse neurons exposed to A β oligomers, phosphorylation of Akt (Ser⁴⁷³), CREB (Ser¹³³) and STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) was evaluated by immunoblot. Neurons exposed for 3 h to 1 μ M A β_{1-42} oligomers in the presence of CM from encapsulated control cells exhibited a dramatic decrease in the level of phosphorylated forms of Akt, STAT3, and CREB, strongly suggesting that the corresponding survival pathways are impaired by A β oligomers (Fig. 3A). In contrast, the presence of CM from encapsulated C2C12–CNTF cells markedly inhibited the decrease in phosphorylation of all kinases tested (Fig. 3A) (for immunoblot quantification, see supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Interestingly, CNTF-directed antibodies prevented the protective effects of CNTF on the survival signaling pathways (Fig. 3A) (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). These data demonstrate that the PI3K/Akt and the JAK/STAT3 signaling pathways are recruited by CNTF in mouse neurons. Moreover, it is worth noting that activation of the CREB pathway was also preserved by exogenous CNTF in mouse neurons, strongly suggesting that CNTF maintains an efficient survival signaling, thereby preventing neuronal cell death. To further confirm that the PI3K/Akt signaling pathway mediates the action of CNTF on neuronal survival, cells were exposed to the widely used PI3K-specific inhibitor LY294002 [2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one], followed by A β_{1-42} oligomer treatment. The pretreatment with LY294002 significantly reduced the neuroprotective effects of CNTF (Fig. 3B). Sim-

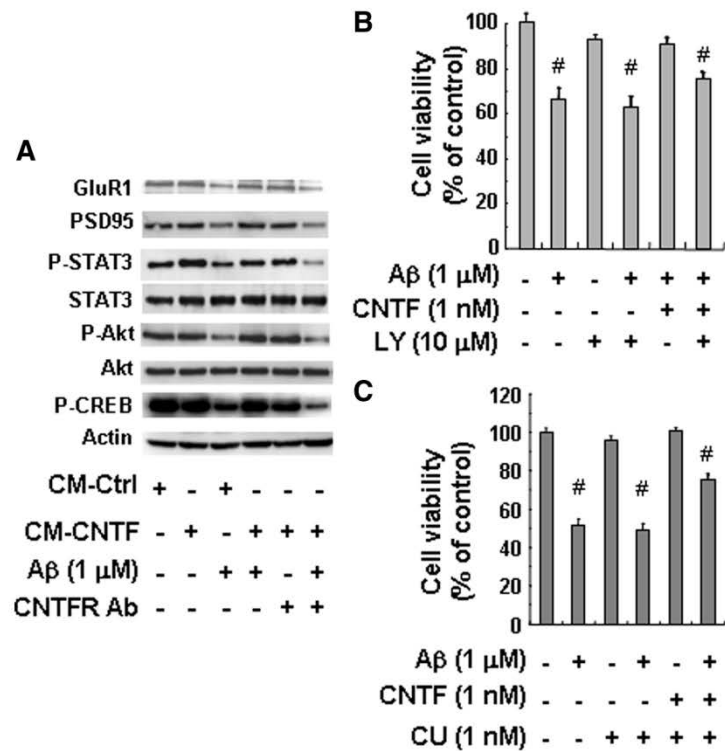


Figure 3. Molecular mechanisms of CNTF-induced neuroprotection. **A**, Representative immunoblot of protein extracts isolated from neurons at 7 DIV exposed for 3 h to 1 μ M A β_{1-42} oligomers in the presence of CNTF CM or control CM. All protein preparations were derived from separate experiments; three independent immunoblot analyses were conducted. Quantification is shown in supplemental Figure 1 (available at www.jneurosci.org as supplemental material). CNTFR Ab, CNTF receptor antibodies. Alternatively, cells were incubated for 24 h in the absence or presence of 10 μ M LY294002 (LY) (**C**) or 1 nM cucurbitacin I (CU) (**B**). Cell viability was determined using the MTT assay. Data are means \pm SEM of three independent experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle, designated as 100%. #Values of $p < 0.05$ indicate significant differences between treatments in the absence or presence of A β oligomers.

ilarly, the presence of the STAT3 inhibitor cucurbitacin I also reduced the CNTF effects (Fig. 3C).

Altogether, our *in vitro* data are consistent with a previously unknown neuroprotective role of CNTF against A β oligomer-induced synaptic and neuronal degeneration, an effect that is mediated at least in part through the PI3K and JAK/STAT signaling pathways.

CNTF specifically prevents neuronal death induced by A β oligomer but not by fibrillar form of A β

We next investigated the effects of CNTF on the neurotoxicity induced by fibrillar A β prepared as described previously (Spohne et al., 2004; Youssef et al., 2008). Under similar experimental conditions, CNTF failed to prevent neuronal death induced by fibrillar A β_{1-42} (Fig. 4B). This corroborates our previous data strongly suggesting that the cellular targets and the molecular mechanisms involved in neuronal death induced by A β strongly depends on peptide conformation (Pillot et al., 1999; Spohne et al., 2003, 2004; Kriem et al., 2005). Although pretreatment or concomitant application of CNTF with A β_{1-42} oligomers results in strong neuroprotection, the addition of CNTF after A β treatment (15 min up to 1 h) elicited no significant effects (Fig. 4C). Thus, CNTF neuroprotective effects most likely require direct CNTF-induced cell signaling and activated pathways.

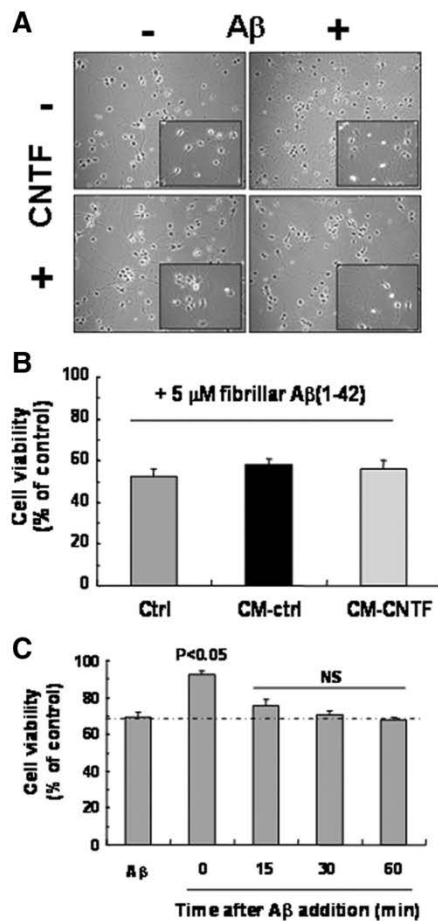


Figure 4. Protective effects of CNTF on A β oligomer (but not A β fibril)-induced neurodegeneration. **A**, Representative micrographs on mouse neurons treated for 12 h with 1 μ M A β_{1-42} oligomers in the absence or presence of conditioned medium from encapsulated C2C12^{CTRL} or C2C12^{CNTF} cells containing 10 nM CNTF. **B**, Mouse neurons were incubated for 24 h with 5 μ M fibrillar A β_{1-42} in the presence or absence of 10 nM CNTF, and cell viability was assessed using the MTT assay. No significant differences were found between the different groups. **C**, Cells were treated for 24 h with 1 μ M A β_{1-42} oligomers in the absence or presence of 1 nM CNTF added at the same time or up to 60 min after the addition of A β oligomers. Cell survival was monitored by the MTT assay. Data are means \pm SEM of three independent experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle, designated as 100%. Values of $p < 0.05$ indicate significant differences.

CNTF rescues mice from A β oligomer-induced cognitive and synaptic impairment

We next investigated whether continuous delivery of CNTF *in vivo* could prevent AD-like symptoms resulting from acute exposure of mouse brain to soluble A β oligomers in a recently developed mouse model for mild cognitive impairment (Youssef et al., 2008).

Male C57BL/6 mice ($n = 12$ per group) were intracerebroventricularly implanted at the age of 3 months with one alginate bead containing 500–1000 C2C12–CNTF or control C2C12 cells, followed 3 weeks later by an intracerebroventricular injection of A β oligomers or vehicle. The cognitive performances of mice were monitored by Y-maze and water-maze behavioral tests as described previously (Youssef et al., 2008). A β_{1-42} oligomer-injected mice implanted with a C2C12–CNTF capsule exhibited significantly better cognitive capacities compared with animals

grafted with a control capsule (Fig. 5). Indeed, CNTF delivery significantly improved spatial working memory (Fig. 5A), learning capability (Fig. 5B, C), and long-term memory (Fig. 5D–F) in A β oligomer-injected mice. Mice implanted with an alginate bead containing C2C12–CNTF cells were indistinguishable from animals engrafted with an alginate bead containing C2C12 control cells and injected with vehicle, indicating that CNTF alone does not interfere with cognitive performances. It is important to note that we were able to monitor in the animal an intact alginate bead containing living CNTF and eGFP-expressing cells 8 weeks after bead implantation (Fig. 5G).

The effects of CNTF delivery on behavioral performances could not be attributed to generalized exploratory, locomotor, or motivational effects (data not shown). Moreover, the water-maze task performed on days 3 and 4 after injection of A β with a visible platform failed to reveal any difference in visual and motor abilities between all groups (data not shown). Similar behavioral improvement was also observed when CNTF-encapsulated cells were implanted above the CA1 subfield of hippocampus (data not shown). Moreover, CNTF-mediated improvement of cognitive functions could not be attributed to nonspecific interactions of A β oligomers with the alginate bead because implantation of empty capsules under similar experimental conditions had no impact on A β oligomer-induced cognitive impairment (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Interestingly, animals implanted with empty capsules or with capsules containing control C2C12 cells exhibited similar behavioral performances after intracerebroventricular injection of vehicle or A β oligomers (Fig. 5) (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Because alginate capsule containing 500–1000 C2C12–CNTF cells secreted low amounts of CNTF (Fig. 1C), we were unable to detect CNTF by ELISA in the CSF or brain tissues of implanted animals (data not shown). To confirm that CNTF is the responsible agent, we directly infused CNTF 1 week before intracerebroventricular injection of A β oligomers. Whereas the intracerebroventricular injection of 10 pmol of CNTF had no effect on A β oligomer-induced cognitive deficits (data not shown), the intracerebroventricular injection of a higher dose of CNTF (1 nmol of CNTF) clearly protected mice from A β -induced impairment of short-term memory [76 ± 3.8 and $58 \pm 4.1\%$ ($p < 0.05$) alternation for mice intracerebroventricularly injected with A β oligomers in the presence and absence of CNTF, respectively] and long-term memory (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Together, our data strongly support the notion that the rescuing activity of implanted alginate beads might be attributed to released CNTF.

In summary, we clearly show that short- and long-term memory deficits induced by a single injection of A β oligomers can be fully reverted during local CNTF delivery.

CNTF prevents changes in hippocampal synaptic protein expression *in vivo*

Synaptic failure resulting from the interaction of A β oligomers with synaptic terminals presumably represents a morphological correlate of the progressive impairment of cognitive function and is considered as an early event in AD pathogenesis (Yankner and Lu, 2009). Here, we show that CNTF-mediated improvement of cognitive functions was accompanied by the preservation of synaptic protein levels in the hippocampus of engrafted animals. After A β oligomer injection, synaptosome-associated protein levels in the hippocampus were significantly decreased. Both presynaptic and postsynaptic proteins were affected, including

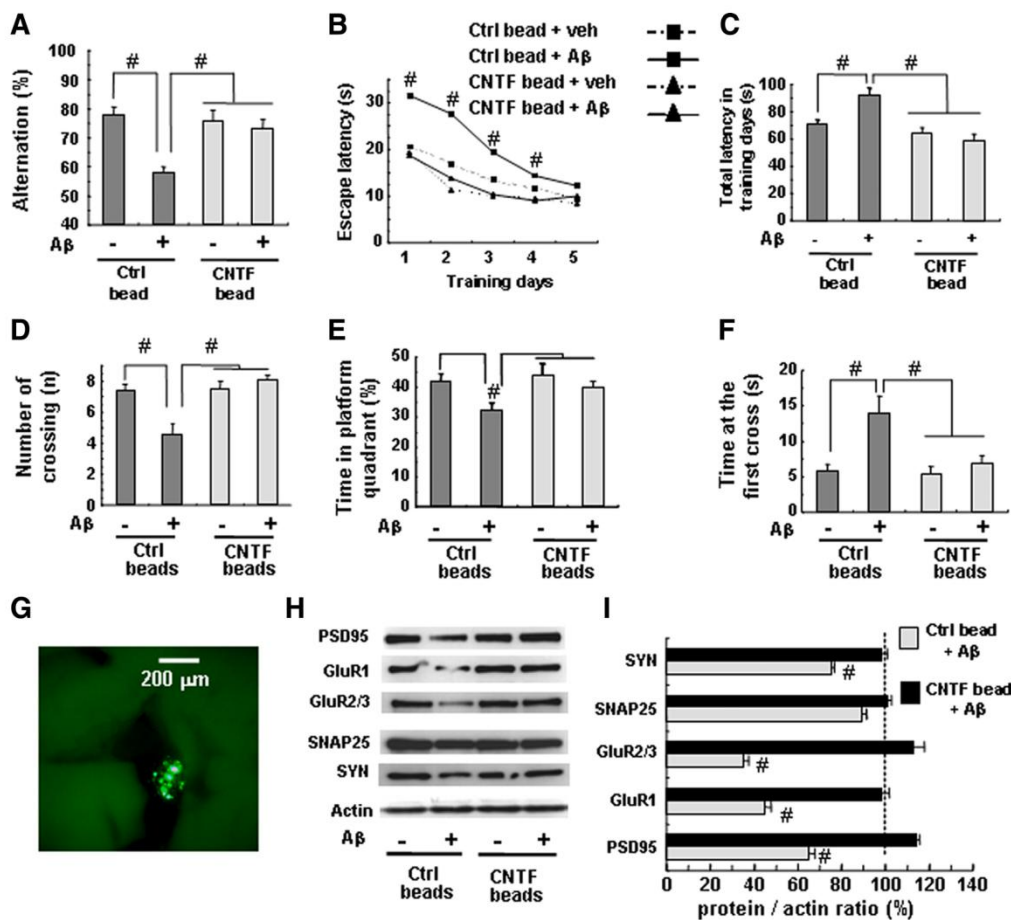


Figure 5. Continuous CNTF secretion prevents cognitive and synaptic impairments in A β oligomer-infused mice. *A*, The Y-maze tests were performed 4 d after A β oligomer or vehicle injection, and spontaneous alternation behavior was measured during a 5 min session as previously described (Youssef et al., 2008). The number of arm entries did not differ among the different groups of mice (data not shown). The water-maze tests were performed as described previously (Youssef et al., 2008). The training trials were performed on days 7–11 after A β or vehicle injection. The latency showed the mean of a block of four trials per day. Escape latency (*B*) and cumulated total latency in training days (*C*) were recorded. The probe trial was performed on day 14 after A β or vehicle injection. The number of crossings over the platform site (*D*), the percentage of time spent in the platform quadrant (*E*), as well as the time required for the first crossing over the platform site (*F*) were recorded. All data are presented as means \pm SEM ($n = 11$). All mice showed normal swimming performance and constant increase in body weight. It is worth noting that similar protective effects of CNTF have been observed when alginate beads were implanted in the subhippocampal region of mouse brain (data not shown). *G*, Survival of encapsulated eGFP–CNTF–C2C12 cells was verified at 8 weeks after implantation. Microscopic observation of freshly dissected brain showed the presence of an intact capsule containing living cells. *H*, After behavioral tests, hippocampal synaptosomes were prepared as described in Materials and Methods and analyzed by immunoblot. Representative immunoblots of synaptic hippocampal proteins of mice implanted with alginate beads containing control or CNTF–C2C12 cells and intracerebroventricularly injected with vehicle or A β oligomers. *I*, Densitometric analysis of immunoblots was performed with normalization to actin. Data are presented as means \pm SEM of three separate immunoblots ($n = 6$ mice per group). # $p < 0.05$ indicate significant differences between animals injected with A β in the presence of control or CNTF beads.

PSD95, GluR1, GluR2/3, SNAP25, and synaptophysin (Fig. 5*H*). In contrast, CNTF delivery completely prevented the A β oligomer-induced decrease in synaptic proteins. This observation was confirmed by immunoblot quantification (Fig. 5*I*). Interestingly, the levels of all synaptic proteins tested were indistinguishable in animals engrafted with C2C12–CNTF cells and injected with vehicle or A β oligomers compared with mice receiving C2C12 control cells, followed by vehicle injection (Fig. 5*H*, *I*). Together, these data clearly demonstrate that continuous delivery of CNTF directly protects hippocampal synapses by maintaining stable protein levels.

Engrafted CNTF-producing cells inhibit cognitive impairment in mutant APP-expressing Tg2576 mice

We next examined whether CNTF delivery influences synaptic and neuronal degeneration in a transgenic mouse model re-

flecting the progressive nature of AD pathology. The Tg2576 transgenic mice express human amyloid precursor transgene (APP695) bearing missense mutations that cause AD in humans (HuAPP695.K670N–M671L). Four alginate capsules containing C2C12–CNTF ($n = 15$, Tg^{CNTF} mice) or C2C12 control cells ($n = 16$, Tg^{CTRL} mice) were bilaterally intracerebroventricularly injected at the age of 5 months. Age-matched wild-type (WT^{CTRL} and WT^{CNTF} mice, $n = 10$ per group) littermates underwent similar surgery. Cognitive performances were monitored as a function of time. Short-term memory was evaluated monthly in the Y maze. As reported previously (Westerman et al., 2002; Young et al., 2009), Tg^{CTRL} mice showed progressive impairment of working memory beginning at 6–8 months (Fig. 6*A*). In this frontal cortex-dependent task, Tg^{CNTF} mice demonstrated significant amelioration of short-term memory deficits compared

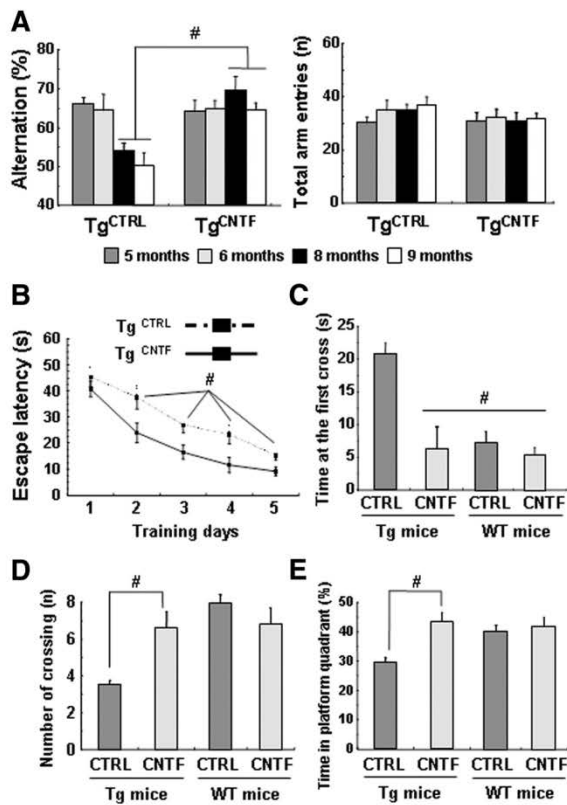


Figure 6. CNTF secretion prevents impairment of cognitive functions in Tg2576 AD mouse model. At 5 months of age, Tg2576 mice (Tg ; $n = 15$ – 16 per group) or age-matched littermate mice (WT; $n = 10$ per group) were intracerebroventricularly implanted with four alginate beads containing 500–1000 control C2C12 (Tg^{CTRL} or WT^{CTRL}) or CNTF–C2C12 (Tg^{CNTF} or WT^{CNTF}) cells as described in Materials and Methods. Short-term memory was monitored monthly using the Y-maze test as indicated (**A**). At 9 months of age, learning capacities and long-term memory were measured using the water-maze test. The training trials were performed, and the mean latency of a block of four trials per day was calculated (**B**). During the probe trials, the time required for the first cross over the platform site (**C**), the number of crossings over platform site (**D**), as well as the percentage of time spent in the platform quadrant (**E**) were recorded. All data are presented as means \pm SEM ($^{\#}p < 0.05$ indicates significant differences between Tg^{CTRL} and Tg^{CNTF} mice). Tg^{CNTF} mice and WT^{CTRL} or WT^{CNTF} were not statistically different. WT^{CTRL} and WT^{CNTF} were not statistically different and exhibited similar cognitive performances compared with untreated wild-type mice (data not shown). All mice showed normal swimming performance and had no difference in body weight gain during the entire experimental period.

with Tg^{CTRL} mice. The performances of WT^{CNTF} mice were not different from that of Tg^{CNTF} mice, nor did the number of arm entries change significantly in the different experimental groups (data not shown). This indicated that preservation of alternation behavior in Tg^{CNTF} mice was not attributable to generalized exploratory, locomotor, or motivational effects (Sarter et al., 1988). Spatial learning and memory were then tested in the water maze on 9-month-old transgenic mice (Fig. 6). Over five successive daily blocks of trials, significant amelioration of spatial memory deficits were observed in Tg^{CNTF} mice compared with Tg^{CTRL} mice (Fig. 6B). Again, the performances of implanted littermates were not different from that of Tg^{CNTF} mice (data not shown). Furthermore, CNTF delivery completely preserved long-term memory on all three measures of water-maze performances. Indeed, latency on test trials (Fig. 6C), platform crossings (Fig. 6D), and time spent in the target quadrant (Fig. 6E) were not significantly different in Tg^{CNTF} and WT^{CNTF} mice.

Finally, Tg^{CNTF} mice showed marked improvement of search strategy, with greater swimming around the platform location (data not shown). Weight loss, a possible side effect of growth factor delivery in the CNS, did not occur (2.3 and 2.1% gain in Tg^{CNTF} and Tg^{CTRL} , respectively). The CNTF-dependent protection of cognitive functions in Tg^{CNTF} mice could not be attributed to nonspecific effects on cognition. Indeed, CNTF delivery in the brain of nontransgenic animals had no effect on the performance of littermate mice at any age (Fig. 6D,E). Thus, CNTF was able to halt cognitive deterioration in an AD mouse model undergoing a progressive deterioration of behavioral performances.

Molecular mechanisms involved in therapeutic effects of CNTF in Tg2576 mice

Synaptic pruning is a feature of both human AD and of AD-like insults in Tg2576 mice. This presumably reflects a chronic exposure of synaptic terminals to soluble A β oligomers representing a morphological alteration that correlates with cognitive impairment in these mice. CNTF-induced functional improvement of cognitive functions in transgenic mice was associated with a significant increase in hippocampal presynaptic and postsynaptic proteins, whereas no change was observed in cortical synaptosomes (Fig. 7A–C). Indeed, CNTF delivery induced a significant recovery of AMPA receptor (i.e., GluR1 and GluR2/3) and their associated proteins PSD95 and stargazin, as well as synaptophysin, a marker of synaptic density (Fig. 7A,B). In addition, the levels of synaptic proteins were positively correlated with the performances of mice in the water-maze probe trials as illustrated in Figure 7D for GluR1, thus allowing discrimination between Tg^{CNTF} and Tg^{CTRL} mice.

To characterize the signaling pathways involved in CNTF-induced neuroprotection in Tg^{CNTF} mice, we analyzed by immunoblot the hippocampal levels of phosphorylated forms of STAT3 and JAK-1 proteins. In Tg^{CNTF} mice, the levels of P-JAK-1 and P-STAT3 were significantly higher, thereby maintaining the cell signaling related to CNTF receptor α /CNTF pathways (Fig. 7E). There were no changes in the total levels of JAK-1 and STAT-3, whereas a significant increase (45 and 52%) in JAK-1 and STAT-3 phosphorylation (respectively) was detected (Fig. 7E) in the hippocampus of Tg^{CNTF} mice compared with Tg^{CTRL} mice ($p < 0.05$; $n = 6$). Notably, the levels of phosphorylated forms of these two proteins were also positively correlated with the performances of mice in the water-maze probe trials (data not shown). CNTF treatment also significantly preserved Akt phosphorylation levels, indicating protection of the cell signaling that controls functional state and survival of neurons in Tg^{CNTF} mice (Fig. 7E). Finally, it is important to note that CNTF delivery affected neither APP levels in hippocampal and cortical synaptosomes (Fig. 7A–C) nor soluble and fibrillar A β peptide levels (Fig. 7F), indicating that a reduction of A β levels is not necessary to induce a functional recovery in this AD mouse model.

In summary, we show that the therapeutic effects of CNTF on cognitive performances in Tg2576 mice involves the preservation of synaptic proteins, activates both JAK/STAT and Akt survival pathways in the hippocampus, and are likely to occur independently of a direct modulation of amyloid production in Tg^{CNTF} mice.

Discussion

Modulation of the amyloid pathology represents a key therapeutic target to delay AD. In addition to strategies designed to decrease A β levels (Klafki et al., 2006), successful AD therapeutics

will likely require the concomitant application of neuroprotective agents to stop ongoing synaptic and cognitive deterioration (Longo and Massa, 2004). It is clear that A β oligomers disrupt synaptic functions, leading to altered cognitive performances (Rowan et al., 2007; Youssef et al., 2008). Therefore, protection from the synaptotoxicity of A β oligomers is necessary to prevent AD-associated neurodegeneration. The broad neuroprotective activity of CNTF toward different cytotoxic insults (Hagg, 2009) prompted us to study the potency of CNTF in preventing synaptic degeneration induced by A β oligomers in AD mouse models.

Here, we provide strong evidence that local and long-term delivery of low-dose CNTF prevents A β oligomer-induced synaptic impairment and subsequent cognitive deficits in AD models submitted to acute or chronic exposure to A β oligomers. This approach was based on the observation that CNTF protects neurons from A β oligomer-induced degeneration *in vitro*. Indeed, CNTF prevents A β oligomer-induced decrease of synaptic proteins, impairment of cell signaling, and cytoskeleton breakdown, as well as the subsequent activation of apoptotic events. Accordingly, CNTF prevents cognitive alterations in mice challenged with a single injection of A β oligomers, a mouse model of early cognitive impairment associated with AD (Youssef et al., 2008). The beneficial effect was observed with continuous low-dose delivery of CNTF, as well as with a high dose (1 nmol) of CNTF injection. We were unable to detect CNTF in the CSF or in brain extracts at neither early nor late time points after capsule implantation. This is most likely explained by the fact that a single capsule was implanted and the concentration of released CNTF (1–2 pg/bead per day) is below the detection limit of the ELISA kit (\sim 20 pg/ml). However, we provide evidence that implanted capsules contain living cells even 8 weeks after implantation (Fig. 5G). Because NTFs exert their effects at low concentrations (picomolar range), the inability to detect CNTF does not mean that it is not released and active in this concentration range. In this respect, it should be noted that the low CNTF concentration achieved may be considered an advantage because it circumvents potential major side effects of increased CNTF levels (Kishima et al., 2004; Yasuhara et al., 2005).

Remarkably, this was associated with stabilization of synaptic-associated proteins in the hippocampus of A β oligomer-injected mice. We further show that CNTF delivery improves AD-like phenotype in an APP transgenic mouse used as a robust and clinically highly relevant model of AD (Mucke et al., 2000). Finally, we provide evidence that *in vitro* and *in vivo* CNTF-induced synaptic stabilization and neuronal survival are mediated through the JAK/STAT and PI3K signaling pathways. We could not detect hCNTF (by ELISA) in both the CSF and brain tissues of implanted mice (data not shown), which most likely reflects its low level of secretion and/or its rapid diffusion into the parenchyma, as described previously for brain glial

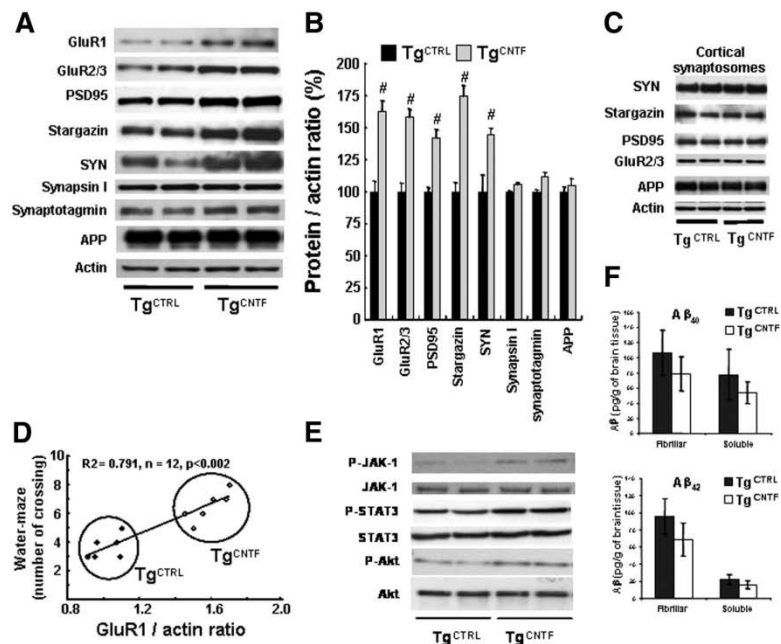


Figure 7. CNTF delivery prevents synaptic impairment and preserves cell signaling independently of amyloid in Tg2576 AD mouse model. After the behavioral analysis was completed, mice were killed, and synaptosomes from different brain regions were prepared as described in Materials and Methods. **A**, Representative immunoblots of proteins from hippocampal synaptosomes of Tg^{CTRL} or Tg^{CNTF} mice (2 synaptosomal preparations per condition are shown). **B**, Densitometric analysis was performed by normalization to actin. Data are presented as means \pm SEM of three separate immunoblots ($n = 6$ mice per group). **C**, Representative immunoblots of proteins from cortical synaptosomes of Tg^{CTRL} or Tg^{CNTF} mice (2 synaptosomal preparations per condition are shown). **D**, Correlation between GluR1 level and long-term memory in Tg^{CTRL} or Tg^{CNTF} mice. **E**, Representative immunoblots of CNTF-related signaling proteins in hippocampal synaptosomes of Tg^{CTRL} or Tg^{CNTF} mice (2 synaptosomal preparations per condition are shown). **F**, Brain levels of A β_{40} and A β_{42} peptides (fibrillar and soluble) were measured by ELISA tests in 9-month-old Tg^{CTRL} or Tg^{CNTF} mice ($n = 6$ mice per group). Data are presented as the mean \pm SEM and were not significantly different between Tg^{CTRL} and Tg^{CNTF} mice. * $p < 0.05$.

cell line-derived neurotrophic factor delivery using encapsulated cells (Kishima et al., 2004). Nevertheless, we could demonstrate the presence of intact capsules containing living eGFP-expressing cells even at 8 months after alginate bead implantation in Tg2576 mice (data not shown). We show here that, despite the low doses of trophic factor delivered, CNTF-producing encapsulated cells implanted in two AD mouse model induced a recovery of cognitive performances. This represents a promising therapeutic approach for AD, providing a major alternative and/or complementary strategy to amyloid-modifying therapeutics.

Tg2576 mice, expressing the Swedish mutation of hAPP, are the most thoroughly characterized AD mouse model and can be considered as “diseased mice” long before amyloid pathology (i.e., appearance of amyloid plaques) occurred (Hsiao et al., 1996; Westerman et al., 2002). Whereas A β plaques appear after 8–9 months (Kawarabayashi et al., 2001), these mice exhibit progressive cognitive decline starting at the age of 4 months, probably reflecting synaptic pruning attributable to chronic synaptotoxic effects of A β oligomers (Kawarabayashi et al., 2004; Young et al., 2009). Accordingly, 5- to 8-month-old Tg2576 mice are often used as a model of mild cognitive impairment. When treatment was initiated at the end of the prodromal phase (i.e., at the age of 5 months), CNTF stabilized molecular, synaptic, and behavioral parameters of Tg2576 mice. Interestingly, CNTF treatment affected neither the quantity of synaptosomal APP nor the amount of A β peptide produced in the brain, indicating that CNTF-

induced protection in this model occurs independently of amyloid pathology.

As reported previously with membrane cholesterol (Sponne et al., 2004) and docosahexaenoic acid status (Florent et al., 2006), CNTF had no protective effects on fibrillar A β -induced neuronal death. These observations strongly suggest that the cellular response depends on A β peptide structure. These data have been corroborated by several studies underlying differential effects of soluble oligomeric and fibrillar A β structures on cell activation and/or degeneration (Dahlgren et al., 2002; Kim et al., 2003; White et al., 2005). Because fibrillar A β also impaired the JAK-1/STAT3 and PI3K signaling pathways (data not shown), it is likely that fibrillar A β induced neuronal degeneration and death through major pathways that are not targeted by CNTF. Indeed, whereas neuronal degeneration induced by A β oligomers involves a caspase 8-independent pathway, cell death triggered by fibrillar A β clearly involves the activation of caspase 8 (Pillot et al., 1999; Sponne et al., 2003; Fifre et al., 2006). Together, these data suggest that the design of AD therapeutics must take into account the structure of the A β peptide that is to be targeted.

Here, we provide evidence that the neuroprotective effects of CNTF *in vitro* and *in vivo* involve the JAK-1/STAT3 and PI3K signaling pathways. In addition, it has been well documented that CNTF could modulate brain plasticity by promoting neurogenesis (Emsley and Haag, 2003; Chen et al., 2007; Yang et al., 2008; Müller et al., 2009). Whether prevention of AD phenotype resulting from continuous CNTF delivery in Tg^{CNTF} mice involves enhanced neurogenesis requires additional investigation. Although it is unlikely that CNTF could “cure” AD at advanced stages of neuronal loss, our data strongly suggest that CNTF delivery can prevent synaptic and neuronal degeneration and halt cognitive decline.

Although potent effects with several NTFs have been reported in animal models, clinical studies did not keep up the promise, most likely because of poor delivery of the therapeutic factor to the site of interest (Thoenen and Sendtner, 2002). NTFs do not pass the blood–brain barrier, have very short half lives, and can induce severe side effects when applied systemically. One way to overcome these hurdles is with cellular implants genetically modified *ex vivo* to produce and deliver NTFs directly into the CNS (Tuszinski, 2007). Cell encapsulation using alginate bead technology eliminates the need for chronic immunosuppression of the host and provides safe and long-term drug release.

Indeed, *ex vivo* gene therapy designed to increase the concentration of neuroprotective factors in the brain resulted in therapeutic improvement in several preclinical models of neurodegenerative diseases (Hemming et al., 2007; Spencer et al., 2008). Such approaches have also been investigated in clinical trials and have demonstrated significant benefits for patients (Tobias et al., 2003; Tuszinski et al., 2005; Sieving et al., 2006). For clinical use, NTF administration must be delivered centrally in appropriate quantities to effectively stimulate neurons over a prolonged time period and to avoid intolerable side effects (Nagahara et al., 2009). A recent study showed that a transducible form of CNTF rescued mice from infused fibrillar A β (Qu et al., 2008). However, the doses of CNTF were high (i.e., 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and only short-term treatment effects were investigated. Currently, no data are available concerning the potential toxic effects of long-term and peripheral administration of high doses of this compound. Peripheral administration of CNTF is likely to induce inadequate stimulation of nontargeted systems (Tuszinski, 2007). Thus, the use of encapsulated cell implants

provides the advantages of *in situ* targeted production of NTFs, therefore reducing the dose requirement.

It has been suggested that intraventricular infusions of NTFs fail to reach most neurons, thereby limiting this strategy of delivery and favoring an intraparenchymal delivery (Kordover et al., 1999). Interestingly, our experiments demonstrated similar efficacy of CNTF through engraftment of CNTF-secreted cells in the lateral ventricle or in the subhippocampal region. Thus, as recently described for BDNF delivery using lentiviral expression (Nagahara et al., 2009), our CNTF delivery approach could be scaled up to the size of human brain, broadly increasing the resistance of neurons throughout hippocampus and associated cortical areas during CNTF diffusion and/or transport.

In summary, our findings clearly demonstrate that continuous *in situ* delivery of CNTF through implantation of alginate microcapsules abolishes synaptic and behavioral impairments in mouse models of AD. The potency of CNTF presented here provides a rational for exploring its clinical efficiency. Finally, long-lasting *in situ* delivery to maintain appropriate levels of neuroprotective factors during and shortly after the prodromal phase in AD patients warrants additional investigations as a potential nonviral therapeutic approach to delay this devastating disease.

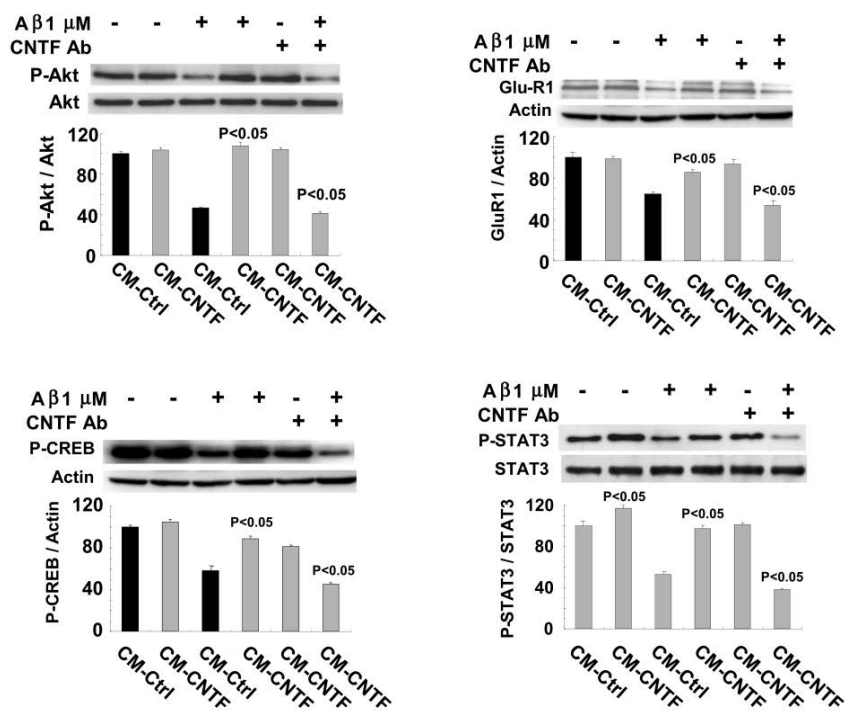
References

- Allen SJ, Dawbarn D (2006) Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci* 110:175–191.
- Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK (2005) Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis* 20:187–198.
- Blesch A (2006) Neurotrophic factors in neurodegeneration. *Brain Pathol* 16:295–303.
- Chen H, Tung YC, Li B, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2007) Trophic factors counteract elevated FGF-2-induced inhibition of adult neurogenesis. *Neurobiol Aging* 28:1148–1162.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB Jr, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ (2002) Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277:32046–32053.
- Duff E, Baile CA (2003) Ciliary neurotrophic factor: a role in obesity? *Nutr Rev* 61:423–426.
- Emerich DF, Thanos CG (2006) Intracompartmental delivery of CNTF as therapy for Huntington's disease and retinitis pigmentosa. *Curr Gene Ther* 6:147–159.
- Emerich DF, Winn SR, Lindner MD (1996) Continued presence of intrastriatal but not intraventricular polymer-encapsulated PC12 cells is required for alleviation of behavioral deficits in Parkinsonian rodents. *Cell Transplant* 5:589–596.
- Emsley JG, Hagg T (2003) Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol* 183:298–310.
- Fifre A, Sponne I, Koziel V, Kriem B, Yen Potin FT, Bihain BE, Olivier JL, Oster T, Pillot T (2006) Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. *J Biol Chem* 281:229–240.
- Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanyé MC, Fifre A, Sponne I, Leininger-Muller B, Olivier JL, Pillot T, Oster T (2006) Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid- β oligomers. *J Neurochem* 96:385–395.
- Frim DM, Uhler TA, Galpern WR, Beal ME, Breakefield XO, Isacson O (1994) Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5104–5108.
- Garza JC, Guo M, Zhang W, Lu XY (2008) Leptin increases adult hippocampal neurogenesis *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* 283:18238–18247.
- Hagg T (2009) From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist* 15:20–27.

- Hemming ML, Patterson M, Reske-Nielsen C, Lin L, Isacson O, Selkoe DJ (2007) Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an Abeta degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease. *PLoS Med* 4:e262.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99–102.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001) Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:372–381.
- Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH, Younkin SG (2004) Dimeric amyloid β protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:3801–3809.
- Keller JN, Mark RJ, Bruce AJ, Blanc E, Rothstein JD, Uchida K, Waeg G, Mattson MP (1997) 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience* 80:685–696.
- Kelly BL, Vassar R, Ferreira A (2005) Beta-amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons. A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:31746–31753.
- Kim HJ, Chae SC, Lee DK, Chromy B, Lee SC, Park YC, Klein WL, Krafft GA, Hong ST (2003) Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta-protein. *FASEB J* 17:118–120.
- Kishima H, Poyot T, Bloch J, Dauguet J, Condé F, Hinnen F, Pralong W, Palfi S, Déglon N, Aebischer P, Hantraye P (2004) Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: a pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons. *Neurobiol Dis* 16:428–439.
- Klafki HW, Staufienbiel M, Kornhuber J, Wiltfang J (2006) Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain* 129:2840–2855.
- Kokubo H, Kaye R, Glabe CG, Yamaguchi H (2005) Soluble Abeta oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 1031:222–228.
- Kordower JH, Isacson O, Emerich DF (1999) Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible? *Exp Neurol* 159:4–20.
- Kriem B, Sponne I, Fife A, Malaplate-Armand C, Lozac'h-Pillot K, Koziel V, Yen-Potin FT, Bihain B, Oster T, Olivier JL, Pillot T (2005) Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide. *FASEB J* 19:85–87.
- 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 β oligomers. *J Neurosci* 24:10191–10200.
- Longo FM, Massa SM (2004) Neuroprotective strategies in Alzheimer's disease. *NeuroRx* 1:117–127.
- Malaplate-Armand C, Florent-Bécharde S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier JL, Oster T, Pillot T (2006) Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol Dis* 23:178–189.
- McLaurin J, Kierstead ME, Brown ME, Hawkes CA, Lambermon MH, Phinney AL, Darabie AA, Cousins JE, French JE, Lan MF, Chen F, Wong SS, Mount HT, Fraser PE, Westaway D, St George-Hyslop P (2006) Cyclohexanehexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat Med* 12:801–808.
- Morris R (1984) Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47–60.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of A β _{1–42} in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050–4058.
- Müller S, Chakrapani BP, Schwegler H, Hofmann HD, Kirsch M (2009) Neurogenesis in the dentate gyrus depends on ciliary neurotrophic factor and signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Stem Cells* 27:431–441.
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH (2009) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 15:331–337.
- Pillot T, Drouet B, Queillé S, Labeur C, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Pinçon-Raymond M, Chambaz J (1999) The non-fibrillar amyloid β -peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J Neurochem* 73:1626–1634.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O (2008) Picomolar amyloid- β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 28:14537–14545.
- Qu HY, Zhang T, Li XL, Zhou JP, Zhao BQ, Li Q, Sun MJ (2008) Transducible P11-CNTF rescues the learning and memory impairments induced by amyloid-beta peptide in mice. *Eur J Pharmacol* 594:93–100.
- Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, Enger PO, Timpl R, Olsen BR, Hjelstuen MH, Haraldseth O, Bjerkvig R (2001) Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol* 19:29–34.
- Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Hu NW, Anwyl R (2007) Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid β -peptide-induced dysfunction. *Biochem Soc Trans* 35:1219–1223.
- Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN (1988) Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and agonist betacarbolines. *Psychopharmacology* 94:491–495.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ (2007) Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68:1501–1508.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–791.
- Selkoe DJ (2004) Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* 140:627–638.
- Sieving PA, Caruso RC, Tao W, Coleman HR, Thompson DJ, Fullmer KR, Bush RA (2006) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intracocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3896–3901.
- Spencer B, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Adame A, Potkar R, Patrick C, Gage FH, Verma IM, Masliah E (2008) Long-term neprilysin gene transfer is associated with reduced levels of intracellular Abeta and behavioral improvement in APP transgenic mice. *BMC Neurosci* 9:109.
- Sponne I, Fife A, Drouet B, Klein C, Koziel V, Pinçon-Raymond M, Olivier JL, Chambaz J, Pillot T (2003) Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid- β peptide proceeds through an early ROS-dependent cytoskeleton perturbation. *J Biol Chem* 278:3437–3445.
- Sponne I, Fife A, Koziel V, Oster T, Olivier JL, Pillot T (2004) Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid- β peptide. *FASEB J* 18:836–838.
- Thoenen H, Sendtner M (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 5:1046–1050.
- Tobias CA, Shumsky JS, Shibata M, Tuszynski MH, Fischer I, Tessler A, Murray M (2003) Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration. *Exp Neurol* 184:97–113.
- Tuszynski MH (2007) Nerve growth factor gene therapy in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 21:179–189.
- Tuszynski MH, Smith DE, Roberts J, McKay H, Mufson E (1998) Targeted intraparenchymal delivery of human NGF by gene transfer to the primate basal forebrain for 3 months does not accelerate beta-amyloid plaque deposition. *Exp Neurol* 154:573–582.
- Tuszynski MH, Thal L, U HS, Pay MM, Blesch A, Conner J, Vahlsing HL (2002) Nerve growth factor gene therapy for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 19:207.
- Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J (2005) A phase I clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 11:551–555.

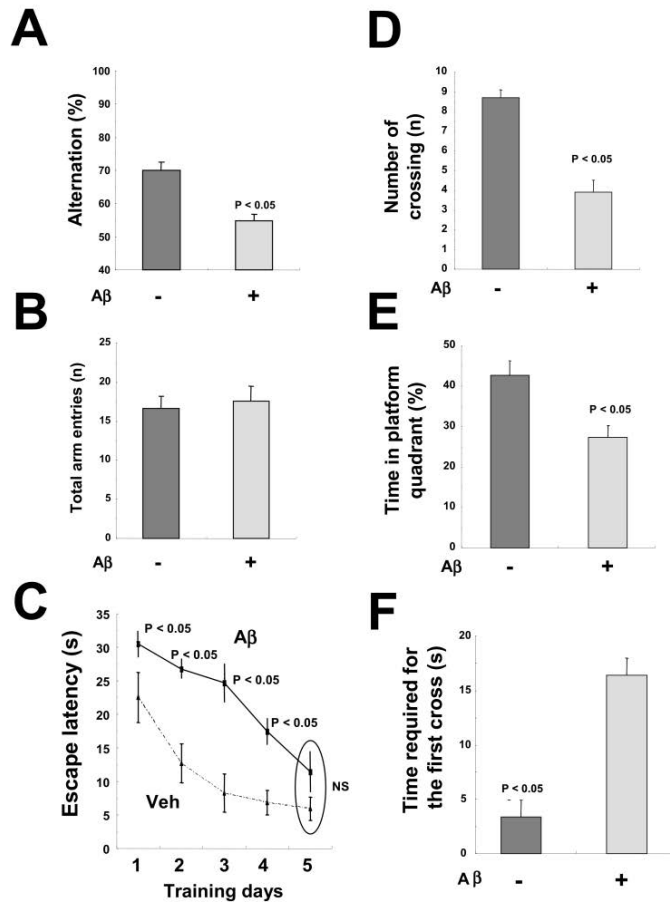
- Twiss JL, Chang JH, Schanen NC (2006) Pathophysiological mechanisms for actions of the neurotrophins. *Brain Pathol* 16:320–332.
- Vicario-Abejón C, Owens D, McKay R, Segal M (2002) Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat Rev Neurosci* 3:965–974.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibited hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 416:535–539.
- Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH (2002) The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22:1858–1867.
- White JA, Manelli AM, Holmberg KH, Van Eldik LJ, Ladu MJ (2005) Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol Dis* 18:459–465.
- Yankner BA, Lu T (2009) Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 284:4755–4759.
- Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kameda M, Agari T, Wen Ji Y, Hayase H, Hamada H, Borlongan CV, Date I (2005) Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1053:10–18.
- Young JW, Sharkey J, Finlayson K (2009) Progressive impairment in olfactory working memory in a mouse model of mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 30:1430–1443.
- Youssef I, Florent-Bécharde S, Malaplate-Armand C, Koziel V, Bihain B, Olivier JL, Leininger-Muller B, Kriem B, Oster T, Pillot T (2008) N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol Aging* 29:1319–1333.

3. Données additionnelles (publiées)



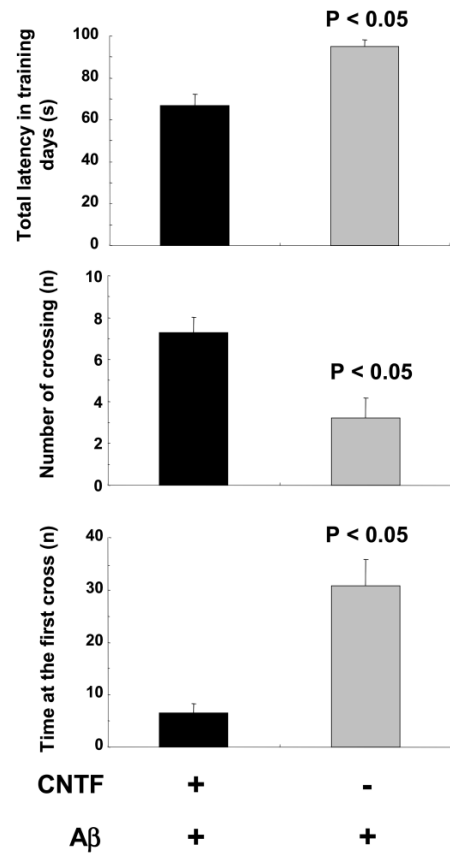
Supplementary data
sFigure 1
Garcia *et al.*

sFigure 1 – CNTF prevents Aβ oligomer-induced impairment of cell signaling. The signals on the immunoblots represented in Fig. 2D were analyzed by densitometry and normalized to actin. Data are presented as mean ± SEM of 3 separate immunoblots from 2 independent experiments. Values of $p < 0.05$ indicate significant differences.



sFigure 2 – Soluble Aβ oligomer-induced behavioral impairments in mice implanted with cell-free capsules – Mice were icv implanted with alginate beads without cells 3 weeks before a single icv injection of 50 pmol Aβ1-42 oligomers or vehicle. Behavioral performances were monitored as described (Youssef *et al.*, 2008). In the Y maze trials, spontaneous alternation (**A**) and the number of arm entries (**B**) were recorded. Water-maze tests were performed as described. The training trials were carried out on days 7-11 after Aβ injection. Escape latency (**C**) were measured and is represented as the mean of a block of 4 trials per day. The probe trial was carried out on day 14 after Aβ oligomer injection. The number of crossings over the platform site (**D**), the percentage of time spent in the platform quadrant (**E**) as well as the time required to cross for the first time the platform site (**F**) were recorded. Data are means ± SEM ($n=6$ mice per group). Values of $p < 0.05$ indicate significant differences with the corresponding vehicle-injected groups. All mice showed normal swimming performance and constant increase body weight. Locomotor activity did not differ among groups.

sFigure 3 – Mice (n = 12 per group) were icv injected with 1 nmol human CNTF (Sigma) or vehicle. One week later, mice received an icv injection of 50 pmol A β 1-42 oligomers. Behavioral performances in the Morris water-maze were monitored as described (Youssef *et al.*, 2008).



Supplementary data
sFigure 3
Garcia *et al.*

4. Résultats complémentaires non publiés

4.1 Caractérisation des oligomères solubles

Lors de ce travail, nous avons réalisé un contrôle de la qualité des oligomères utilisés au cours de nos expériences.

L'analyse par immunoblot en condition non dénaturante de la préparation d'oligomères solubles a révélé la présence de monomères, de trimères et de tétramères mais pas d'assemblés de plus haut poids moléculaires (figure 48, A). La faible turbidité et la faible fluorescence de la thioflavine T de la solution d'oligomères solubles en comparaison d'une solution fibrillaire d'A β indique l'absence de structures feuillées dans la solution d'oligomères solubles (figure 48, B).

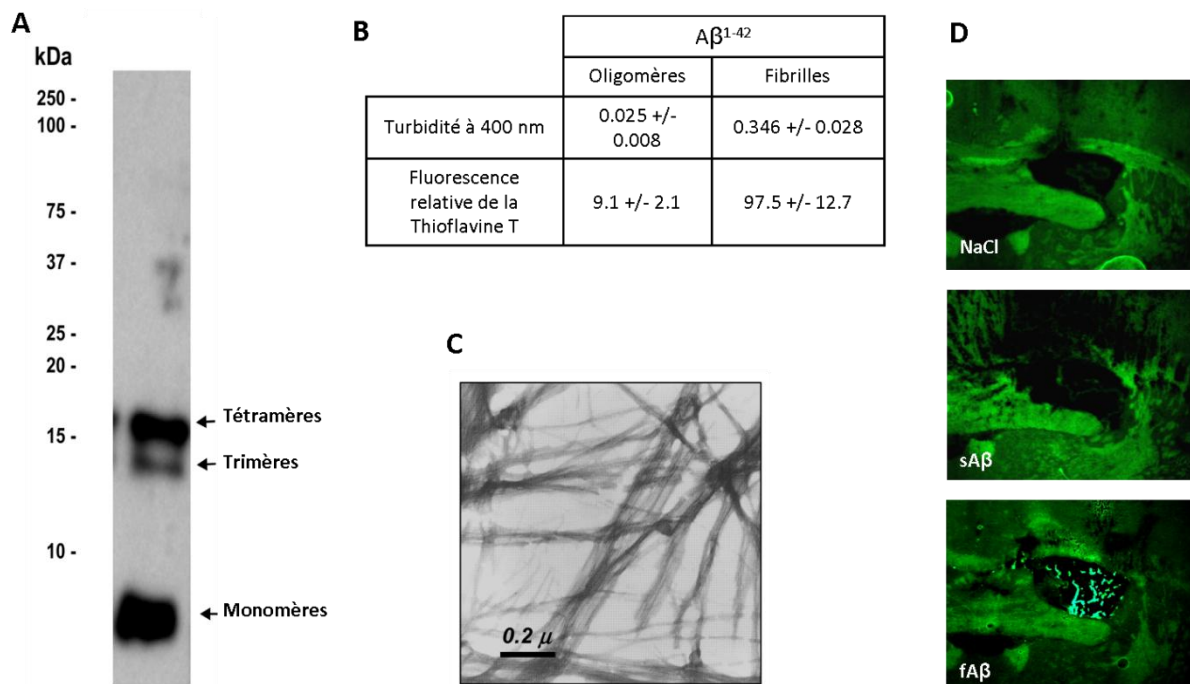


Figure 48. Caractérisation des oligomères solubles d'A β administrés *in vitro* et *in vivo*. **A)** Les oligomères solubles d'A β ¹⁻⁴² ont été visualisés par immunoblot après une électrophorèse sur un gel Tris-Glycine SDS-polyacrylamide. **B)** L'absence d'agrégats dans les préparations d'oligomères solubles a été vérifiée. La formation de fibrilles a été évaluée par mesure de turbidité et mesure de la fluorescence de la thioflavine-T ($\lambda_{\text{abs}}=450\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}}=482\text{nm}$) comme décrit précédemment (Pillot *et al.*, 1999; Sponne *et al.*, 2003). **C)** Observation en microscopie électronique de fibrilles amyloïdes comme décrit précédemment (Pillot *et al.*, 1999). **D)** L'absence de fibrillation *in vivo* des oligomères solubles suite à leur injection a été vérifiée. Des coupes (20 μM) de cerveaux d'animaux ont été colorées à la thioflavine-S 15 jours après l'administration *icv* de différentes préparations de peptide (véhicule, soluble ou fibrillaire).

L'observation en microscopie électronique de la préparation fibrillaire a révélé la présence de fibrilles dans celle-ci (figure 48, C), ce qui confirme les observations précédentes (figure 48, B). La révélation histologique des fibrilles à la thioflavine-S sur des coupes de cerveaux nous a permis de contrôler l'état de fibrillation du peptide A β 15 jours après l'administration *icv* des différentes préparations caractérisées. Aucune fibrille n'a pu être visualisée dans le ventricule des animaux injectés avec le véhicule (Figure 48, D, NaCl) ou les oligomères solubles (Figure 48, D, sA β). En revanche, les fibrilles ont été détectées dans le cas des injections avec l'A β fibrillé (Figure 48, D, fA β). Ceci suggère également que les oligomères solubles ne forment pas de fibrilles suite à leur injection dans le cerveau des souris. L'ensemble de ces données confirme que ce sont bien les formes solubles d'A β qui sont à l'origine des déficits cognitifs observés dans notre modèle *in vivo* (Youssef *et al.*, 2008).

4.2 Potentiel préventif du CNTF contre les déficits induits par l'A β ¹⁻⁴² soluble.

Notre projet visait à réaliser la preuve du concept que le CNTF produit *in situ* par des bioréacteurs implantables pouvait avoir des vertus thérapeutiques contre les déficits cognitifs induits par le peptide A β . Cette expérience a donc eu pour but de déterminer si une administration aigue en *icv* de CNTF avait des propriétés neuroprotectrices contre les déficits induits par l'A β soluble. Ces données complètent la figure S3 de l'article.

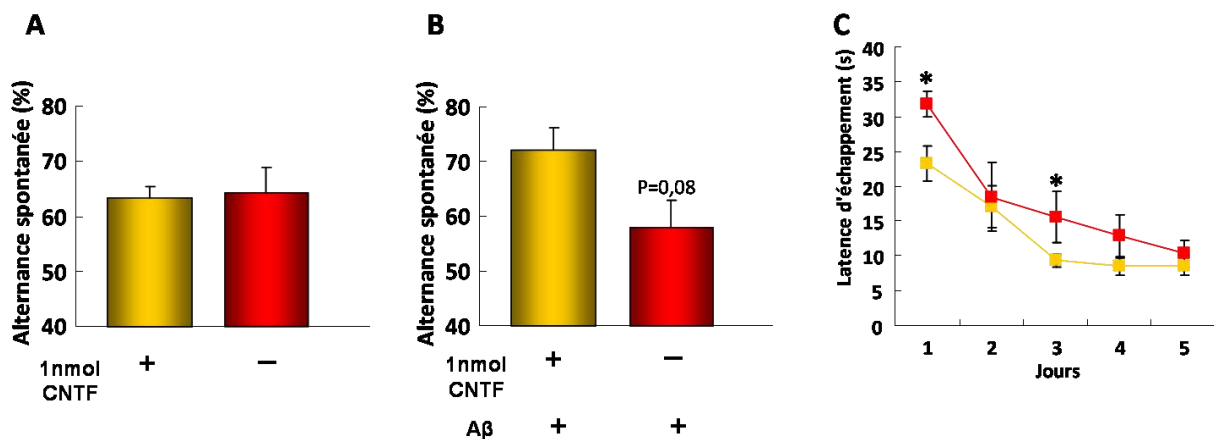


Figure 49 : L'injection *icv* de CNTF prévient les déficits cognitifs induits par l'A β (Schéma de l'expérience A dans la partie Matériels et Méthodes). **A)** 4 jours après l'administration *icv* dans le ventricule droit d'1 nmol de CNTF humain (Sigma, C3710) ou de son véhicule, l'effet du CNTF sur les capacités de mémoire de travail dans le labyrinthe en Y a été évalué. **B et C)** Une semaine plus tard, les animaux ont reçu une dose *icv* de 500 pmol d'A β , avant d'être testés selon la procédure comportementale standard (Youssef *et al.*, 2008). L'effet de l'administration de CNTF sur les déficits induits par l'A β soluble a été étudié dans le labyrinthe en Y 4 jours après l'injection d'A β (**B** ; pourcentage d'alternance spontanée) et dans la piscine de Morris entre 7 et 11 jours après l'injection d'A β (**C** ; latence d'échappement). Le nombre d'entrées dans le labyrinthe n'était pas différent entre

les groupes (non montré).* : $p < 0,05$ avec le test de Mann-Whitney en comparaison du groupe véhicule + A β .

Le pourcentage d'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y n'est pas augmenté de façon significative par l'injection *icv* de CNTF. L'administration aigüe de CNTF n'a donc pas d'impact sur les performances de mémoire de travail (Figure 49, A). L'injection d'oligomères solubles d'A β induit une diminution presque significative du pourcentage d'alternance (Figure 49, B) et une augmentation des latences d'échappement dans la piscine de Morris (Figure 49, C) chez les animaux ayant reçus le véhicule. Chez les animaux ayant reçu le CNTF, ces déficits sont prévenus. Les analyses de la somme des latences et de l'essai test, présentées dans la figure S3, confirment une amélioration significative des performances de mémoire spatiale et à long terme chez les animaux prétraités avec le CNTF. En l'absence d'un groupe contrôle supplémentaire CNTF + Véhicule, l'ensemble de ces données suggèrent *a minima* que le CNTF atténue la gravité des troubles cognitifs induits par le peptide A β soluble *in vivo*. L'hippocampe étant particulièrement sensible au peptide A β , ces données suggèrent également que le CNTF administré sous forme de bolus dans le ventricule peut diffuser jusqu'à l'hippocampe.

4.3 Innocuité de la sécrétion à long terme de CNTF

Bien que le CNTF ait des vertus protectrices contre les déficits induits par le peptide A β soluble, des effets indésirables de l'administration sur de longues périodes ont été rapportés dans la littérature. Nous avons vérifié que l'implantation et la sécrétion de CNTF par les bioréacteurs dans le SNC n'induisait pas de troubles cognitifs ou physiologiques.

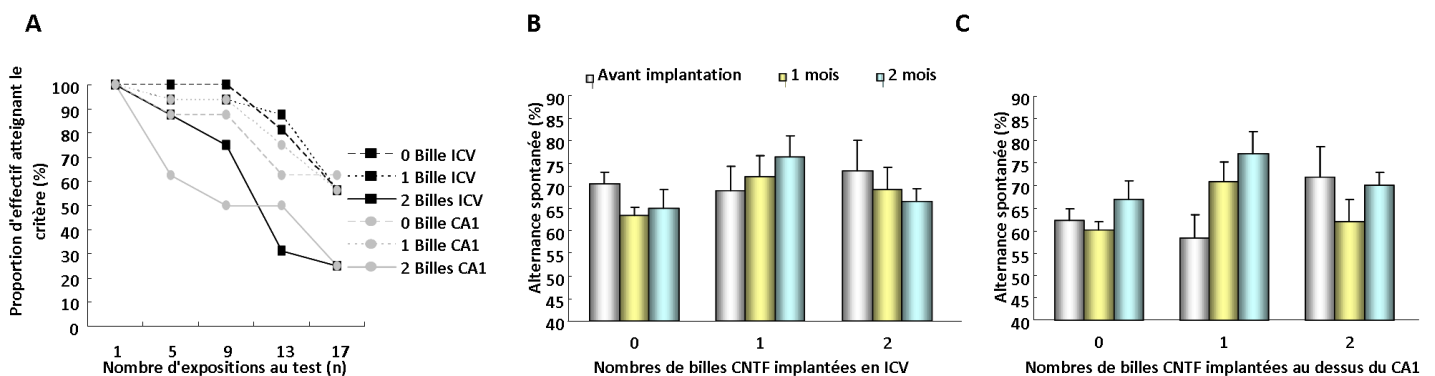


Figure 50 : La production *in situ* à long terme de CNTF n'est pas délétère sur les performances de mémoire de travail (schéma de l'expérience B). Les animaux (n=4 par condition) ont été implantés bilatéralement avec 0, 1 ou 2 billes CNTF en icv ou au dessus du CA1. Les performances de mémoire de travail dans le Y maze ont été suivies hebdomadairement pendant 4 mois. **A)** Proportion des effectifs atteignant le critère de validation dans le Y maze (12 entrées minimum) en fonction du nombre de répétition du test. **B)** Alternance spontanée dans le Y maze des souris ayant été

implantées icv avec 0, 1 ou 2 billes CNTF bilatéralement. **C)** Alternance spontanée dans le Y maze des souris ayant été implantées au dessus du CA1 de l'hippocampe avec 0, 1 ou 2 billes CNTF bilatéralement. Chaque point/histogramme correspond à un bloc de 4 passages au labyrinthe en Y, excepté pour le premier passage avant implantation.

Dans ce test, la motivation repose sur l'attrait spontané des rongeurs pour la nouveauté. Les performances ne dépendent pas d'un apprentissage. Au cours de cette expérience, la proportion d'animaux atteignant le critère de validation a drastiquement chuté dans les groupes implantés avec 4 billes/cerveau à partir du troisième mois (Figure 50, A). Cette diminution reflète une altération de la motivation à explorer le dispositif, probablement due à la fréquence élevée d'exposition au test. J'ai donc choisi de ne représenter que les performances des deux premiers mois. La sécrétion continue de CNTF dans le ventricule (Figure 50, B) ou le CA1 de l'hippocampe (Figure 50, C) n'altère pas significativement les performances de mémoire de travail dans les deux mois suivant l'implantation. Il convient de signaler qu'aucun des animaux n'est décédé ou n'a présenté de signes indicateurs d'un mauvais état général au cours des 4 mois de l'expérience. De plus, la diminution de la fréquentation du labyrinthe aux troisième et quatrième mois n'est pas associée à une diminution du score jusqu'à un niveau proche du hasard (50%). La sécrétion continue de CNTF ne semble pas induire de modification des performances de mémoire de travail, bien que les animaux implantés dans l'hippocampe avec 4 billes/cerveau semblent s'habituer plus vite au test.

4.4. Propriétés neuroprotectrices du CNTF produit au niveau du CA1 de l'hippocampe

L'originalité de notre approche est de pouvoir cibler le site de sécrétion du CNTF. L'hippocampe est une structure particulièrement vulnérable dans la MA. L'administration icv de peptide A β soluble entraîne des troubles de mémoire spatiale associés à des dommages hippocampiques (Youssef *et al.*, 2008). L'objectif de cette expérience a été de déterminer si l'implantation des bioréacteurs au niveau du CA1, assurant une sécrétion continue de CNTF dans l'hippocampe, prévenait les déficits cognitifs induits par l'injection de peptide A β soluble. Ces données sont à mettre en parallèle à la figure 5 de l'article.

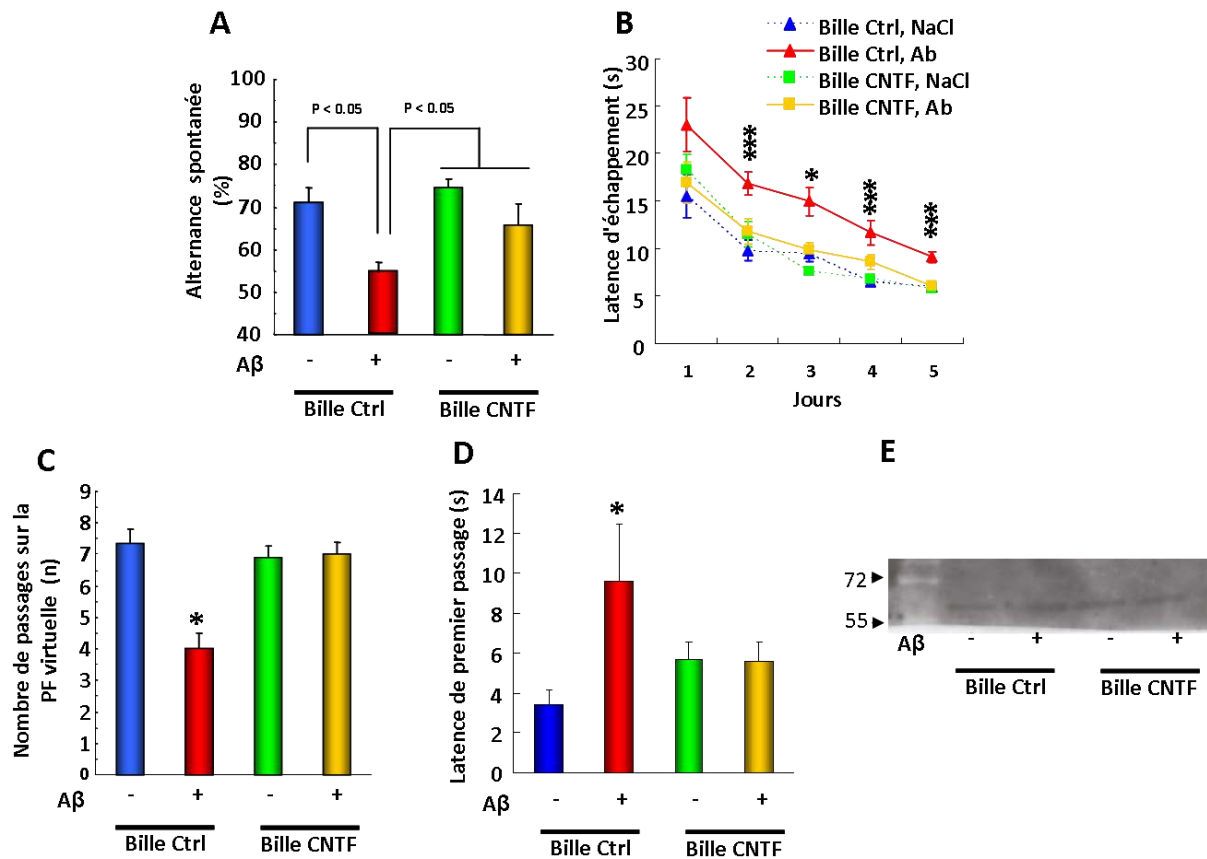


Figure 51 : L'implantation d'une bille sécrétant le CNTF au dessus du CA1 de l'hippocampe prévient efficacement les déficits cognitifs induits par les oligomères solubles d'Aβ (schéma de l'expérience C). Trois semaines après l'implantation d'une bille CNTF ou contrôle au dessus du champ CA1 de l'hippocampe dorsal, les animaux ont reçu une dose icv de 500 pmol d'Aβ et leurs capacités cognitives ont été évaluées. **A)** Le test du labyrinthe en Y a été fait 4 jours après l'injections d'Aβ et le pourcentage d'alternance spontanée a été déterminé. Le nombre d'entrées dans les bras du labyrinthe était invariant entre les groupes (non montré). **B)** L'apprentissage dans la piscine de Morris a été réalisé entre 7 et 11 jours après l'injection d'Aβ. La latence d'échappement a été déterminée. Chaque point correspond au bloc de 4 essais quotidiens. **C)** L'essai test dans la piscine sans PF a été réalisé au 14^{ème} jour après l'injection d'Aβ et le nombre de passages sur la position de la PF a été comptabilisé, ainsi que la latence de premier passage (**D**). **E)** L'expression dans l'hippocampe de la sous-unité CNTFRα du récepteur au CNTF a été vérifiée par immunoblot (1 animal par condition). *, **, *** : p < 0,05 ; 0,01 ; 0,001 respectivement en comparaison du groupe bille contrôle traité avec le véhicule.

La sécrétion continue de CNTF prévient significativement la diminution du pourcentage d'alternance induite par l'injection d'Aβ (observée chez les animaux implantés avec une bille contrôle) (Figure 51, A). De même, cette sécrétion prévient l'augmentation significative de la latence d'échappement lors de la phase d'apprentissage dans la piscine de Morris (Figure 51, B), ainsi que la diminution du nombre de passages sur la PF virtuelle lors de l'essai test (Figure 51, C).

L'augmentation significative de la latence du premier passage induite par l'injection d'A β soluble est observée chez les animaux implantés avec une bille contrôle et prévenue chez les animaux implantés avec une bille CNTF (non montré). L'expression du CNTFR α dans l'hippocampe (Figure 51, D) semble maintenue en présence d'A β . De plus amples investigations sont à réaliser pour quantifier l'impact de l'injection d'A β sur l'expression du CNTFR α . Les performances sont similaires entre les animaux prétraités avec le CNTF et injectés avec l'A β et les animaux bille contrôles injectés avec le véhicule (Figure 51, A, B, C, D). La sécrétion de CNTF par des cellules encapsulées au niveau du CA1 de l'hippocampe prévient donc le déclin de la fonction hippocampique induit par l'A β .

Un profil similaire de neuroprotection a été obtenu avec l'implantation des billes CNTF dans le ventricule latéral (figure 5 de l'article). À bénéfice équivalent, nous avons donc choisi pour des raisons techniques le ventricule comme site d'implantation des cellules C2C12 encapsulées dans la suite de nos expériences.

4.5 Effet de la sécrétion continue de CNTF icv dans le modèle Tg2576

Nous avons étudié le potentiel neuroprotecteur de la sécrétion continue de CNTF dans un autre modèle murin de MA, la souris Tg2576. Le fond génétique de cette souris est mixte (C57/SJL, Hsiao *et al.*, 1996) rendant difficile la transposition des observations réalisées sur les souris C57. Pour valider les résultats comportementaux des expériences menées sur les souris Tg2576 modèles de MA, nous avons choisi comme contrôles les souris sauvages de même fond génétique (Hsiao *et al.*, 1996). Ces données complètent les figures 6A et 6B de l'article.

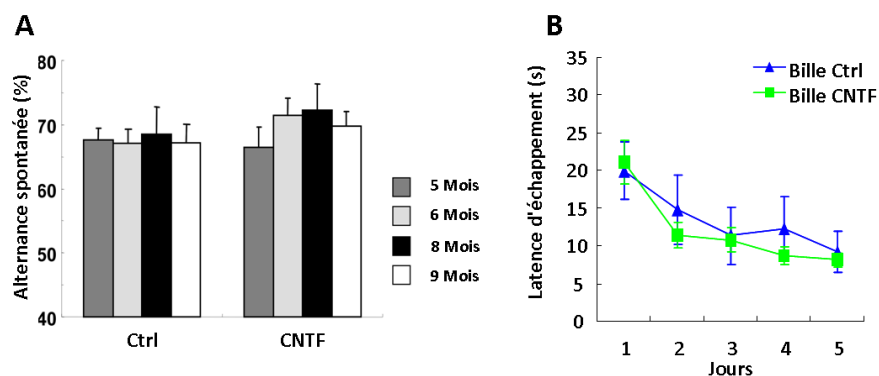


Figure 52: La sécrétion continue de CNTF chez des souris contrôle des Tg2576 n'a pas d'effet sur les performances comportementales (schéma expérimental D). Des expériences similaires à celles conduites dans la figure 6 ont été menées sur des souris « littermate » de même fond génétique que les Tg2576 ne portant pas le gène de l'APP humain muté. **A**) Les performances de mémoire de travail ont été suivies régulièrement tous les 1,5 mois par la mesure du pourcentage d'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y. L'âge des animaux est indiqué dans la légende. **B**) À l'âge de 8 mois, la latence d'échappement au cours de l'apprentissage spatial dans la piscine de Morris a été mesurée.

Le pourcentage d'alternance dans le labyrinthe en Y ne varie pas au cours de l'expérience suite à l'implantation *icv* bilatérale de 2 billes contrôles ou CNTF chez des souris sauvages (figure 52, A). L'analyse des latences d'échappement ne montre aucun effet de la sécrétion continue à long terme de CNTF (figure 52, B). En complément des analyses exposées à la figure 6 de l'article, ces données indiquent l'absence d'interaction entre le fond génétique et la sécrétion continue de CNTF sur les performances comportementales. Les différences observées entre les Tg2576 implantées avec les billes contrôles et CNTF ne sont pas biaisées par le fond génétique de ces animaux. La sécrétion continue de CNTF n'améliore pas en soi les performances (figure 52, A, B ; figure 6 C, D, E), mais prévient l'apparition des troubles cognitifs (Figure 6 de l'article).

4.6 Caractérisation de la neuroprotection par le CNTF

Les mécanismes moléculaires associés aux effets protecteurs du CNTF ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*. Il a été proposé que le CNTF pouvait induire l'expression du récepteur au BDNF, TrkB, (Dutta *et al.*, 2007), tandis que son transport et sa signalisation sont altérés dans la MA (Poon *et al.*, 2009). Le but de ces analyses a donc été de déterminer si la neuroprotection par la sécrétion continue de CNTF impliquait une augmentation de TrkB.

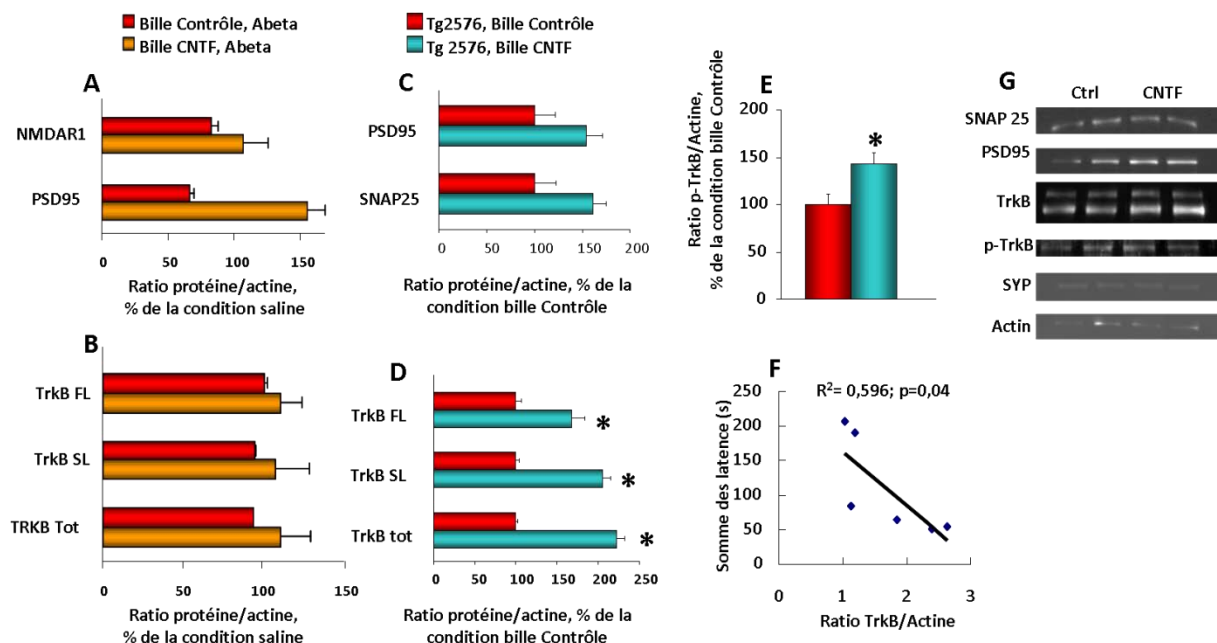


Figure 53 : La présence du TrkB a été étudiée par immunoblot sur des préparations de synaptosomes d'hippocampe. Les protéines synaptiques (A) et le TrkB (B) ont été quantifiés dans des synaptosomes préparés à partir des souris C57 dont le comportement a précédemment été caractérisé (figure 5 de l'article, schéma expérimental C, n=2 par condition). Des analyses similaires ont été réalisées chez les Tg2576 implantées avec des billes contrôles ou CNTF dont le comportement a été caractérisé dans la figure 6 de l'article (schéma expérimental D). C) Les protéines synaptiques ont été quantifiées pour établir un profil de neuroprotection. D) L'impact de la sécrétion continue de CNTF sur la proportion

de TrkB ainsi que sa phosphorylation (**E**) a été quantifié (n=3 par condition). **F**) Corrélation entre les quantités relatives de TrkB et la somme des latences d'échappement lors de l'apprentissage dans la piscine de Morris. **G**) Profil protéique des synaptosomes des Tg2576 (dépôts de 10µg par puits). * : p<0,05 avec le test de Mann-Whitney ; TrkB FL : forme longue du TrkB ; TrkB SL : forme tronquée ; TrkB Tot : TrkB Total ; la corrélation de la figure F a été analysée avec le test de Spearman.

L'implantation des billes CNTF prévient la chute des marqueurs synaptiques, NMDAR1 (-23%) et PSD95 (-31%), induite par l'injection d'Aβ soluble (Figure 53, A). Ces différences ne sont pas significatives, probablement dû au faible nombre d'échantillons utilisés (n=2 par condition), mais sont toutefois comparables à celles observées à la figure 5, I de l'article. La quantification du TrkB chez les souris C57 ne met pas en évidence d'effet des traitements sur la quantité de TrkB présente à la synapse (figure 53, B). Il est à noter que l'injection d'Aβ chez les animaux implantés avec une bille contrôle en *icv* ne tend pas à diminuer la quantité de TrkB à la synapse (figure 53, B).

Chez les Tg2576, le profil de neuroprotection est similaire à celui observé à la figure 7, A de l'article : l'implantation des billes CNTF prévient la diminution des marqueurs pré- et postsynaptiques SNAP25 et PSD95, respectivement (Figure 53, C) et significativement celle du TrkB à la synapse (Figure 53, D). La quantité de TrkB phosphorylée (Figure 53, E) est aussi significativement augmentée en présence de CNTF. Il existe une corrélation positive significative entre les quantités de TrkB à la synapse et sa phosphorylation (p=0,03 ; non montré). Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence le BDNF libre dans les surnageants ou lié à son récepteur dans les synaptosomes. Seul le pro-BDNF a pu être visualisé dans les surnageants (non-montré) et tend à être diminué chez les animaux traités avec le CNTF. L'analyse des quantités et de l'activité de l'enzyme de clivage du pro-BDNF en BDNF, la plasmine et du plasminogène (son précurseur) pourrait déterminer une potentielle augmentation de son clivage vers les formes matures.

Les quantités de TrkB sont significativement et inversement corrélées à la somme des latences mesurée lors de l'apprentissage dans la piscine de Morris (Figure 53, F). Une corrélation significative entre l'expression du TrkB dans les synapses hippocampiques et les performances de mémoire spatiale a déjà été établie dans notre équipe (observation du Dr. Florent-Bécharde ; donnée non publiée). La corrélation entre la quantité de TrkB et le marqueur synaptique PSD95 tend à être significative (non montré ; p=0,06). Il reste à déterminer si l'augmentation du TrkB à la synapse dépend du rétablissement du transport antérograde du récepteur et/ou d'un effet transcriptionnel. L'implication de l'expression du TrkB dans la neuroprotection induite par le CNTF *in vivo* est à déterminer. L'analyse de l'expression du TrkB dans des préparations de synaptosomes issus des animaux sauvages (utilisés comme contrôles de même fond génétique que les Tg2576 ; voir figure 52 ci avant et Figure 6C,D,E de l'article) implantés avec des billes CNTF ou Contrôle et ne présentant pas de déficits cognitifs, identifierait si la sécrétion continue à long terme de CNTF induit une hausse de l'expression de TrkB.

4.7 Potentiel curatif du CNTF

Nous avons apporté la preuve du concept que la sécrétion intracérébrale de CNTF par des bioréacteurs implantés prévenait efficacement les altérations biochimiques et comportementales induites par le peptide A β soluble. Le potentiel curatif du CNTF n'a pas été étudié. L'objectif de cette étude a été de déterminer si le CNTF pouvait améliorer les déficits cognitifs dans un modèle de MA après l'installation des déficits cognitifs.

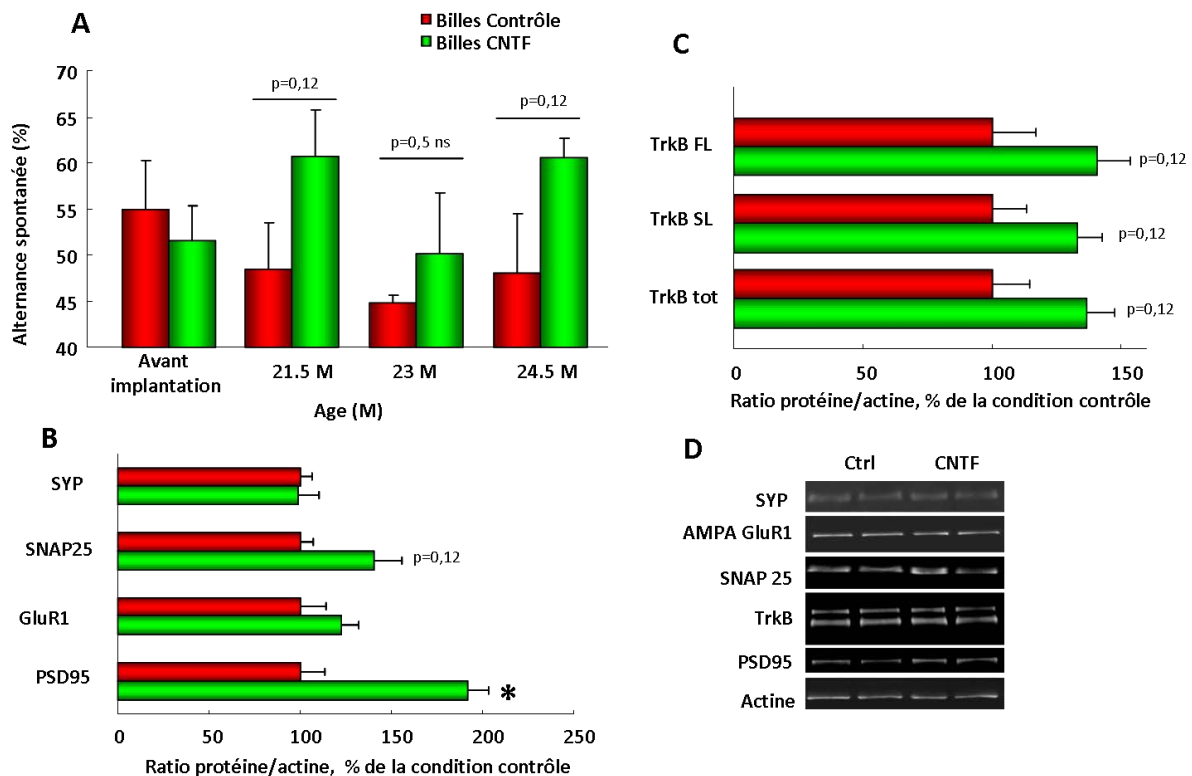


Figure 54 : Le potentiel curatif du CNTF. Des souris Tg2576 âgées de 20 mois ont été implantées bilatéralement avec 2 billes contrôles ou CNTF (n=4 animaux par condition ; schéma expérimental E). **A**) Les performances de mémoire à court terme ont été suivies tous les 1,5 mois dans le labyrinthe en Y. À 24 mois les animaux ont été sacrifiés et des synaptosomes d'hippocampe ont été préparés (n=3 par condition). **B**) Le profil d'expression de quelques protéines synaptiques a été déterminé par immunoblot, ainsi que l'expression du récepteur au TrkB **(C)**. **D**) Exemple de profil d'analyse du contenu synaptique (2 animaux par conditions, 10 μ g de protéines par puits). * : p<0,05 avec le test de Mann-Whitney.

Avant l'implantation des capsules, l'analyse des pourcentages d'alternance dans le labyrinthe en Y montre des performances de mémoire de travail proches du niveau de hasard du test (50%) (figure 54, A). Les animaux implantés avec les capsules CNTF tendent à avoir, de manière non significative,

de meilleures performances que les animaux implantés avec les capsules Contrôle (figure 54, A). Au cours de l'expérience, un animal de chaque groupe est décédé limitant ainsi les effectifs à 3 animaux par groupe pour l'analyse biochimique des synaptosomes.

La quantification des protéines synaptiques par immunoblot des synaptosomes d'hippocampe a permis de révéler une augmentation significative du marqueur postsynaptique PSD95 mais pas du récepteur AMPA GluR1 chez les animaux implantés avec les billes CNTF (figure 54, B). Le marqueur présynaptique SNAP25 tend à être augmenté de manière non significative (Figure 54, B). En revanche, le marqueur de neurodégénérescence SYP (Synaptophysine) n'est pas augmenté par la sécrétion à long terme au CNTF (figure 54, B). Cette absence de différence pourrait provenir d'un problème de localisation : la synaptophysine étant principalement axonale, l'analyse de sa présence dans les synaptosomes n'est pas la plus représentative.

La sécrétion à long terme du CNTF tend à augmenter l'expression du TrkB à la synapse (figure 54, C). Nous n'avons toutefois pas réussi à mettre en évidence la forme phosphorylée du récepteur. Compte tenu du faible nombre d'animaux disponibles pour cette étude, les résultats obtenus sont très encourageants. En effet, le CNTF semble pouvoir améliorer les déficits cognitifs chez des souris âgées, modèle de MA, alors que la pathologie est fortement installée. Ces améliorations cognitives semblent être associées à une stabilisation des fonctions synaptiques, même si des études ultérieures sont nécessaires afin de le confirmer.

4.8 Développement d'un modèle d'administration répétée de peptide A β soluble.

Au cours de mon travail de Thèse, j'ai tenté de développer un autre modèle d'exposition aux oligomères solubles d'A β . Le modèle précédemment développé (Youssef *et al.*, 2008) est basé sur l'effet toxique de l'administration d'un bolus d'A β . Or, l'apparition des troubles cognitifs dans la MA est le résultat d'une exposition prolongée et chronique au peptide A β soluble. Nous avons donc souhaité reproduire cet aspect chez la souris.

Dans un premier temps, l'effet de l'administration *icv* de différentes doses d'A β a été étudié. Cette étude, bien que ne visant à l'origine qu'une meilleure caractérisation du modèle d'injection unique, m'a influencé sur le choix de la dose à administrer de façon répétée. La deuxième étape a consisté à valider la procédure d'injection par les canules en étudiant l'effet comportemental d'une injection unique d'A β de 500 pmol. À la dernière étape, les effets comportementaux induits par l'administration répétée d'une dose de 300 pmol d'A β ont été étudiés.

4.8.1. Effet de l'administration de doses croissantes d'A β

Notre modèle d'altération cognitive par l'exposition aux oligomères d'A β consiste en l'administration d'une dose unique *icv* de 500 pmol. Nous avons étudié les effets de l'administration, soit de la moitié (250 pmol), soit du double (1 nmol) de la dose habituellement administrée.

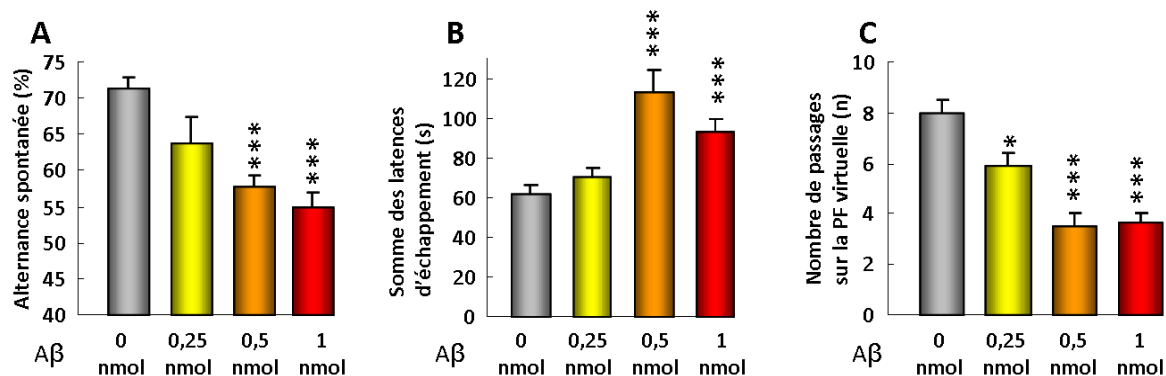


Figure 55 : L'effet de doses croissantes d'A β administrées en *icv* sur les performances comportementales a été étudié selon la procédure d'évaluation comportementale standard (N=48, n=12 par condition) (schéma de l'expérience F). A) 4 jours après l'administration de peptide A β , le pourcentage d'alternance spontanée a été évalué dans le labyrinthe en Y. B) Entre 7 et 11 jours post-injection, les animaux ont participé à la procédure d'apprentissage dans la piscine de Morris et les latences d'échappement ont été mesurées. Pour plus de clarté, seules les sommes des latences sont illustrées. C) La mémoire à long terme a été testée 14 jours après l'injection d'A β lors d'un essai test sans la PF. Le nombre de passages sur la position de la PF a été mesuré. *, **, *** : $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ respectivement avec le test de Mann Whitney en comparaison du groupe 0nmol injecté avec le véhicule.

L'administration *icv* d'1 nmol d'A β diminue significativement l'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y (figure 55, A), augmente la somme des latences (figure 55, B) et diminue le nombre de passages sur la position de la PF lors de l'essai-test (figure 55, C). Cette dose provoque les mêmes déficits comportementaux que la dose de 500 pmol pour tous les indices comportementaux évalués.

L'administration d'une dose de 250 pmol tend à diminuer le comportement d'alternance spontanée dans le Y de manière non significative ($p=0,06$) (Figure 55, A). En revanche, la somme des latences dans la piscine de Morris du groupe traité avec 250 pmol n'est pas différente de celles du groupe témoin (Figure 55, B) et est significativement plus basse que celle des animaux injectés avec 500 pmol ou 1 nmol ($p < 0,01$). Enfin, l'analyse du nombre de passages sur la position de la PF de l'essai met en évidence une diminution faible mais significative des performances de mémoire à long terme en comparaison du groupe témoin (figure 55, C). Ces performances sont toutefois significativement meilleures que celles des animaux traités avec 500 pmol ou 1 nmol ($p < 0,01$). La dose de 250 pmol induit donc des déficits légers de mémoire à court et long terme, mais pas de l'apprentissage spatial.

4.8.2. Validation de la procédure chirurgicale d'implantation des canules

L'implantation d'un guide-canule à demeure est une procédure chirurgicale lourde : elle peut s'avérer douloureuse et comporter des risques infectieux. Ces paramètres peuvent influencer sur le comportement des animaux ou interférer avec le traitement. Nous avons donc souhaité valider la procédure chirurgicale et sa compatibilité avec nos approches comportementales en administrant par les canules une dose unique de 500 pmol d'A β ou de son véhicule.

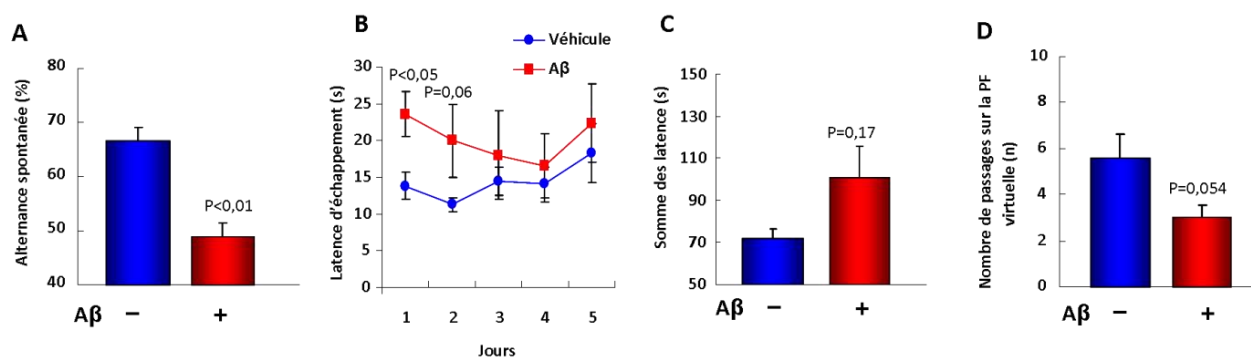


Figure 56 : Validation du système d'injection par les canules. L'administration par un système de canule d'une dose de 500 pmol d'A β reproduit la plupart des altérations comportementales induites par l'injection directe de peptide A β (Expérience G). Des souris (N=12) C57 de 13 semaines ont été implantées au dessus du ventricule latéral droit avec un guide canule. Après 10 jours de repos post opératoire, les animaux ont reçu une dose de 500 pmol d'A β (n=6) ou de son véhicule (n=6) par les canules avant d'être testés selon la procédure comportementale standard. **A)** 4 jours après l'administration d'A β , le pourcentage d'alternance spontanée a été mesuré dans le labyrinthe en Y. **B)** Entre 7 et 11 jours post-injection, les latences d'échappement au cours de la phase d'apprentissage spatial dans la piscine de Morris ont été mesurées. **C)** La somme des latences a été déterminée pour mettre en relief les différences observées lors de l'apprentissage. **D)** 14 jours après l'injection d'A β , le nombre de passages sur la PF virtuelle a été comptabilisé lors de l'essai test. Les données ont été analysées avec le test de Mann-Whitney.

L'administration par le guide canule de 500 pmol d'A β induit une diminution du pourcentage d'alternance, ce qui n'est pas le cas du véhicule (figure 56, A). L'apprentissage dans la piscine est altéré (Figure 56, B et C) mais de manière non significative : le groupe témoin a montré des difficultés d'apprentissage comme en témoigne l'absence d'évolution des latences pour ce groupe (figure 56, B). La somme des latences est tout de même inférieure chez les animaux témoins en comparaison des animaux traités. Bien que cette différence n'apparaisse pas significative, les valeurs obtenues sont similaires à celles obtenues classiquement (voir par exemple la figure précédente, B). Le nombre de passages sur la PF virtuelle est presque significativement diminué dans le groupe traité avec l'A β (figure 56, D). Le petit nombre d'animaux utilisés dans cette étude et la variabilité interindividuelle sont certainement à l'origine de la faiblesse de l'analyse statistique. Si l'on prend en compte cet aspect, l'ensemble des mesures est congruent avec les caractéristiques du modèle d'injection déjà

établi. La procédure chirurgicale semble donc compatible avec la procédure d'évaluation comportementale que nous utilisons dans nos travaux. Pour des raisons éthiques et techniques, nous n'avons pas estimé nécessaire de reproduire cette expérience.

4.8.3. Effet de l'exposition répétée au peptide A β soluble.

Nous avons souhaité reproduire l'effet d'une exposition à long terme au peptide A β induisant une mort cellulaire modérée et des troubles cognitifs.

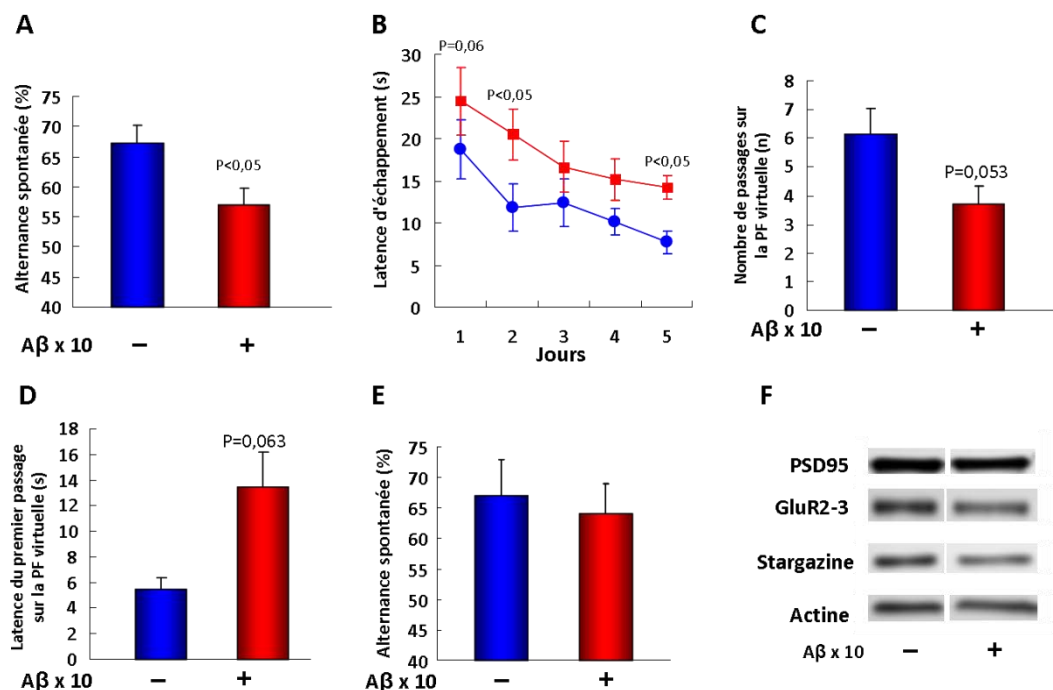


Figure 57. L'administration répétée d'oligomères solubles d'A β induit des troubles cognitifs. Des souris C57 (N=17) ont été équipées d'un guide canule au dessus du ventricule latéral selon la procédure décrite au chapitre matériels et méthodes. Après 10 jours de repos postopératoire, les souris ont reçu 1 injection icv de 300 pmol d'A β (n=9) ou de véhicule (n=8) tous les deux jours pendant 3 semaines avant d'être testées dans notre procédure standard. **A**) 4 jours après la dernière injection, le pourcentage d'alternance a été mesuré dans le labyrinthe en Y. **B**) Entre 7 et 11 jours après la dernière injection, les latences d'échappement dans la piscine de Morris ont été mesurées. **C** et **D**) Au 14^{ème} jour lors de l'essai test, le nombre de passages sur la position de la PF (**C**) et la latence de premier passage ont été mesurés (**D**). **E**) 18 jours après la dernière injection, le pourcentage d'alternance dans le labyrinthe en Y a été mesuré. **F**) A l'issue de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés et les cerveaux disséqués pour réaliser des synaptosomes. Le profil protéique de synaptosomes d'hippocampe a été visualisé par immunoblot.

L'injection répétée de 300 pmol icv diminue le pourcentage d'alternance dans le labyrinthe en Y (Figure 57, A), augmente significativement la latence d'échappement lors de l'apprentissage dans la piscine (figure 57, B). La mémoire de travail et de la mémoire spatiale sont altérées par le traitement. Lors de l'essai test, la diminution du nombre de passages sur la PF virtuelle (figure 57, C) et l'augmentation de la latence du premier passage (figure 57, D) sont presque significatives. Afin de déterminer si les déficits perdurent dans le temps, 4 jours après l'essai test les animaux ont été testés à nouveau dans le labyrinthe en Y (figure 57, E). Aucun déficit lié au traitement n'a pu être mis en évidence. L'analyse par immunoblot des synaptosomes d'hippocampes suggère cependant une faible diminution des marqueurs post synaptiques.

Ce modèle d'injections répétées reproduit les altérations de la mémoire à court terme, spatiale et à long terme du modèle d'injection unique. Toutefois des observations non publiées de notre équipe suggèrent que les altérations dans le labyrinthe en Y perdurent jusqu'à deux mois après l'injection unique de 500 pmol d'A β . Or dans cette expérience, aucun déficit n'est encore détectable dans ce test 18 jours après la dernière injection. L'aspect transitoire des effets de l'administration répétée d'oligomères solubles a déjà été rapporté dans la littérature (Cleary *et al.*, 2005). Le paramètre de la mort cellulaire dans ce type d'approche est à évaluer. Les travaux de Yamada *et al.* (2005) ont montré que l'administration de 10x300 pmol d'A β 25-35 induisait une mort des neurones cholinergiques du septum. Il est également possible que le peptide injecté finisse par s'agréger. À la suite d'injection intrahippocampales répétées, Cleary *et al.* ont pu visualiser la formation de dépôts amyloïdes en procédant à une coloration à la thioflavine S.

La procédure chirurgicale et la méthode d'entretien des guides implantés sont à améliorer. Des animaux ont été écartés pour des raisons techniques : une canule s'est bouchée, un animal a perdu l'implant à la 7^{ème} injection, et deux animaux témoins ont présenté des comportements atypiques réduisant l'effectif de l'étude à 13 animaux. À la dissection, certains cerveaux présentaient un aspect (œdémateux) suggérant un état inflammatoire.

Des travaux complémentaires sont donc à conduire pour achever ce modèle, mais ces premières données suggèrent un potentiel intéressant.

**V. DISCUSSION
COMPLÉMENTAIRE
ET
CONCLUSION**

Les objectifs définis à la base de ce travail ont été atteints. Nos résultats font la preuve du concept que la production continue de peptide neuroprotecteur représente une stratégie thérapeutique efficace contre le développement de la maladie d'Alzheimer, en particulier lors des phases précoces de la maladie. Nous avons ainsi caractérisé les effets neuroprotecteurs du CNTF, choisi comme peptide modèle, dans différents modèles précliniques de MA, *in vitro* mais aussi et de façon importante *in vivo* dans deux modèles murins de MA.

En plus de l'étude des effets symptomatiques du CNTF sur le maintien des capacités cognitives des animaux implantés, nous avons abordé les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les effets neuroprotecteurs du CNTF *in vitro* et *in vivo*. Nos résultats suggèrent fortement que le CNTF (mais surtout ses voies de signalisation) pourraient être utilisées afin d'établir des stratégies thérapeutiques visant à modifier les processus pathologiques de la MA. Ces études, qui restent bien évidemment à compléter, ouvrent des perspectives intéressantes. Afin de compléter la discussion de l'article publié et regroupant nos principaux résultats, il paraît essentiel d'aborder des points complémentaires de discussion.

1. Les mécanismes potentiels de la neuroprotection induite par le CNTF

Nous avons observé *in vitro* que le prétraitement avec le CNTF prévient la mort neuronale et les altérations du cytosquelette induites par l'A β (*fig 2*). Le mécanisme de neuroprotection du CNTF implique une augmentation de MAP2 (*fig 2.E*) probablement à l'origine du maintien du cytosquelette (*fig 2.B*). Blanchard *et al.* (2010a) ont montré que l'administration d'un peptide dérivé du CNTF augmente l'immunoréactivité de MAP2 dans le gyrus denté de souris C57 âgées de 10 mois (Blanchard *et al.*, 2010). *In vitro*, les oligomères solubles d'A β provoquent un stress oxydant à l'origine de la protéolyse des MAP par la caspase 3 et la calpaïne précédant la mort cellulaire (Sponne *et al.*, 2003; Fifre *et al.*, 2006). Or le traitement au CNTF prévient l'activation de ces protéases (*fig 2.D&E*). Nous avons précédemment évoqué que le CNTF puisse être impliqué dans la réponse au stress oxydant (partie C, 4.3.3). L'expression de la forme mutée (Giess *et al.*, 2000) ou la délétion de STAT3 (Barry *et al.*, 2009) confère une sensibilité particulière au stress oxydant *in vivo* et *in vitro*. Nous n'avons pas déterminé si la quantité de ROS était diminuée par le CNTF dans notre étude. Toutefois, le maintien de l'expression de MAP2 par le CNTF en dépit de la présence d'A β suggère que le CNTF contrecarre le stress oxydatif induit par les oligomères solubles d'A β *in vitro*. Étant donné que l'injection *icv* d'A β induit la production de ROS (Youssef *et al.*, 2008), il serait donc intéressant d'étudier le statut redox dans le cadre de la neuroprotection par le CNTF *in vivo*.

Le déficit d'assemblage des microtubules peut être antérieur à la présence de PHF de protéine Tau et est donc une atteinte précoce chez les patients MA (Cash *et al.*, 2003). En parallèle, les patients MCI présentent un déficit hippocampique de PSD95 qui est une protéine postsynaptique clé de la régulation des récepteurs au glutamate à la synapse (Sultana *et al.*, 2010). *In vitro*, la surproduction d'A β ¹⁻⁴² par les neurones primaires de souris Tg2576 a été associée à des altérations du cytosquelette qui modifient le trafic intracellulaire (Poon *et al.*, 2009), mais aussi à un déficit des protéines synaptiques PSD95 et du récepteur AMPA GluR1 (Almeida *et al.*, 2005). Le maintien du

cytosquelette par le CNTF dans notre étude *in vitro* s'accompagne de la préservation des protéines synaptiques AMPA GluR1 et PSD95, tandis que ces protéines sont diminuées par le traitement à l'A β (fig 3.A). *In vivo*, le maintien par le CNTF des protéines pré- et post-synaptiques dans les synaptosomes d'hippocampe (fig 5.H&I ; fig 7.A&B) est associé à la préservation des capacités cognitives (fig 5 A-F ; fig 6). Ainsi, *via* le maintien du cytosquelette, le CNTF permettrait de prévenir les déficits de plasticité synaptique induits par le peptide A β .

Si l'effet du CNTF sur l'activation de la calpaïne reste limité (fig 2.E), l'effet inhibiteur du CNTF sur l'activation des caspases 9 et 3 est total (fig 2.D). L'activation par le CNTF d'Akt *in vitro* (fig S1) et *in vivo* (fig 7.E) *via* la PI3K constitue un premier relai prévenant l'activation des caspases. Cette activation participe à la phosphorylation de Bad et provoque sa séquestration dans le cytosol, empêchant ainsi la perte du potentiel mitochondrial et le relargage du cytochrome C en amont de l'activation de la caspase 9 puis 3 (Polster & Fiskum, 2004). L'activation de la PI3K *in vivo* et *in vitro* témoigne de l'activité anti apoptotique du CNTF. De plus, le CNTF peut moduler l'expression de certaines protéines de la voie mitochondriale intrinsèque : la diminution de l'expression de Bax ou l'augmentation de Bcl2, (Roger *et al.*, 2007 ; Rezende *et al.*, 2007, 2008) convergent également vers l'inhibition des caspases 9 et 3 et de la mort cellulaire. L'activation de la signalisation du CNTF module l'expression d'autres protéines ciblées dans la MA, comme le récepteur TrkB dans les neurones (Dutta *et al.*, 2007). La restauration de l'expression ligand du TrkB, le BDNF, dans différents modèles de MA reverse les troubles cognitifs et la dégénérescence (Nagahara *et al.*, 2009a). Dans nos expériences, le TrkB fait partie des protéines synaptiques maintenues par le CNTF dans l'hippocampe des souris Tg2576 et son expression est corrélée avec les performances de mémoire spatiale (résultats complémentaires 4.6, figure 53). Enfin, Müller *et al.* (2009a) ont montré que l'apport de CNTF exogène pouvait induire sa propre expression endogène pour régénérer les axones. Les effets sur la transcription de gènes cibles par le CNTF ouvrent donc des perspectives intéressantes en terme de prévention de la mort cellulaire et de la promotion de la survie cellulaire dans la MA.

L'activité de p75 pourrait aussi être une cible potentielle de la neuroprotection induite par le CNTF. Tandis que le CNTF prévient l'activation des caspases 9 et 3 (fig 2), celles-ci sont activées par p75 pour induire l'apoptose dans les cellules hippocampiques en culture (Troy *et al.*, 2002). L'activité de p75 est une cible thérapeutique dans la MA (Longo & Massa, 2005) de part son rôle possible de récepteur à l'A β (Sotthibundhu *et al.*, 2008) et de médiateur de l'apoptose induite par les pro-NTs chez l'Homme et l'animal (Fortress *et al.*, 2011). La sortiline est nécessaire à l'apoptose induite par p75 (Nykjaer *et al.*, 2004 ; Teng *et al.*, 2005). Elle peut aussi interagir avec le CNTF et la signalisation de son complexe récepteur (Larsen *et al.*, 2010). Tandis que la fixation de ligand alternatif comme la neurotensine sur la sortiline peut prévenir l'apoptose induite par p75 (Al-Shawi *et al.*, 2008), l'effet du CNTF sur l'apoptose induite par p75 est encore indéterminé. L'activité de p75 participe aussi à la formation du peptide A β lors du vieillissement (Constantini *et al.*, 2005a, 2005b ; 2006).

Les précédentes données *in vitro* montrent que l'activation des caspases et l'apoptose induites par le peptide A β soluble sont dépendantes d'une modification de la perméabilité membranaire au calcium (Sponne *et al.*, 2003 ; Fifre *et al.*, 2006). Chez des jeunes souris Tg2576 âgées de 3 mois, l'activation de la caspase 3 par la calcineurine dans les épines dendritiques induit le retrait de GluR1 de la synapse. Cette activation s'accompagne d'une diminution de la transmission synaptique basale,

d'une augmentation de la dépression à long terme dans l'hippocampe et de déficits cognitifs dans la version contextuelle (dépendante de l'hippocampe) du conditionnement de peur (D'Amelio *et al.*, 2011). L'inhibition de la caspase 3 dans ce paradigme restaure les performances, suggérant un rôle précoce de cette caspase dans la pathogénèse. Nous avons précédemment montré que le CNTF prévenait l'activation des caspases 9 et 3. Il semble donc pertinent de déterminer si cette altération du métabolisme calcique à l'origine de l'activation des caspases est modifiée dans le cadre de la neuroprotection par le CNTF.

Si l'ajout *in vitro* de CNTF après l'A β ne permet pas d'atténuer la mort cellulaire, l'implantation des cellules C2C12-CNTF encapsulées dès l'âge de 3 mois chez les Tg2576 permet d'obtenir une neuroprotection à des âges plus avancés. Or à cet âge, ces animaux ont déjà des taux cérébraux importants d'A β soluble (Hsiao *et al.*, 1996). Les travaux de D'Amelio *et al.* (2011) indiquent que cette production massive d'A β soluble est à l'origine de déficits comportementaux précoces, les dépôts amyloïdes n'apparaissant pas avant une dizaine de mois (Kawarabayashi *et al.*, 2001). Contrairement à nos observations *in vitro*, ceci suggère qu'*in vivo* le CNTF pourrait agir en synergie avec différents partenaires pour restaurer les fonctions cognitives dans un contexte physiopathologique dans lequel les taux d'A β soluble sont déjà augmentés. Le BDNF pourrait être un de ces partenaires : il a été montré sur les neurones *rd* (modèle de dégénérescence rétinienne) que seul un traitement CNTF + BDNF protège totalement ces cellules contre la dégénérescence, tandis qu'individuellement ces composés ne permettent pas le maintien en vie des cellules (Ogilvie *et al.*, 2000 ; Azadi *et al.*, 2006). De plus, les voies activées par le CNTF sont aussi celles activées par les NTs (Kaplan & Miller, 2000). Cette observation suggère que des associations de peptides neuroprotecteurs pourraient aussi être une stratégie thérapeutique efficace, à condition que les effets secondaires ne soient pas eux aussi amplifiés.

L'administration de CNTF *in vivo* n'est pas procognitive. Dans nos expériences, l'implantation de billes CNTF ou l'injection de CNTF n'améliore pas les performances comportementales ou l'expression des protéines synaptiques (résultats complémentaires figures 50 et 52; *fig 5 A-E* ; *fig 6*; *fig S3*). Dans le cadre de la neuroprotection, les performances cognitives et les marqueurs synaptiques sont maintenus au niveau des contrôles. Prises ensemble, ces considérations suggèrent que la neuroprotection induite par le CNTF *in vivo* est orientée spécifiquement contre les troubles induits par le peptide A β soluble et non pas basée sur l'activation de mécanismes accessoires stimulant l'apprentissage.

L'administration aigüe de CNTF permet l'induction de phénomènes neuroprotecteurs à long terme (*fig S3* ; résultats complémentaires, figure 49 B-C). Nous avons précédemment évoqué un possible effet du CNTF sur la transcription de protéines antiapoptotiques (Roger *et al.*, 2007 ; Rezende *et al.*, 2007, 2008), mais aussi du CNTF lui-même (Müller *et al.*, 2009a). Nous n'avons pas identifié les mécanismes impliqués dans ce cas précis, mais cette propriété du CNTF est fortement intéressante en terme thérapeutique. Nos données illustrent un fort potentiel préventif du CNTF dans nos modèles de MA.

2. L'influence de l'A β soluble sur la signalisation induite par le CNTF

In vitro, aucun effet neuroprotecteur n'est observé lorsque l'apport de CNTF est postérieur au traitement par l'A β (fig 4.C). Ces données suggèrent donc que l'A β soluble peut prévenir l'activation de la signalisation du CNTF et/ou que le CNTF ne peut réprimer les voies pro-apoptotiques pré-activées par l'A β .

L'analyse des voies de signalisation activées montre qu'en présence de milieu contrôle, le traitement avec les oligomères solubles d'A β diminue la phosphorylation de STAT3, d'Akt, et de CREB (fig 3.A), parallèlement à l'activation de la calpaïne (fig 2.E). Or, l'ensemble de ces atteintes sont à même de prévenir les effets neuroprotecteurs du CNTF. Sango *et al.* (2008) ont déterminé que l'inhibition d'une de ces voies, par l'utilisation d'inhibiteurs de l'activation de STAT3 (STA21), de PI3K (LY294002) et de ERK (PD98059), prévenait toute activité trophique du CNTF sur la croissance neuritique et la viabilité des neurones sensitifs issus de la corne dorsale (Sango *et al.*, 2008). Si nous n'avons pas montré la diminution de la phosphorylation d'ERK (qui est en amont de l'activation de CREB) en parallèle à l'activation de la caspase 3 suite au traitement par 1 μ M d'A β ¹⁻⁴² soluble, celles-ci ont déjà été renseignées par les précédents travaux de notre équipe (Florent *et al.*, 2006). Toutefois, il convient de remarquer que dans nos expériences, l'inhibition de la PI3K (fig 3.B) ou de la phosphorylation de STAT3 (fig 3.C) ne provoque que la perte partielle de la neuroprotection induite par le CNTF en présence d'A β . Seule la neutralisation du ligand prévient totalement la signalisation et les effets du CNTF (fig 3.A, S1). L'étude de l'effet de l'inhibition simultanée des deux voies de signalisation permettrait de confirmer leur complémentarité.

L'inhibiteur de la phosphorylation de STAT3 choisi (la cucurbitacine 1) n'a pas d'effet sur l'activité kinase des JAK et possède l'avantage de ne pas interférer sur les voies PI3K et ERK (Blaskovich *et al.*, 2003). Son utilisation ne permet donc pas d'identifier quels isoformes de JAK sont importants dans la neuroprotection induite par le CNTF. L'activité du complexe récepteur au CNTF est majoritairement dépendante de JAK1 (Parganas *et al.*, 1998 ; Rodig *et al.*, 1998). Il convient de déterminer si des modifications de l'activité de JAK1 expliquent l'absence d'effet du CNTF ajouté après les oligomères d'A β *in vitro*. De plus, nous n'avons pas déterminé si l'activité de JAK1 est nécessaire ou suffisante à la neuroprotection induite par le CNTF *in vivo*. L'identification de la kinase en amont de l'activation de STAT3 dans notre étude est d'autant plus justifiée par le fait que l'activation de STAT3 par Tyk2 ou JAK2 ait été respectivement impliquée dans l'apoptose (Wan *et al.*, 2010) ou dans la neuroprotection (Yamada *et al.*, 2008 ; Chiba *et al.*, 2009b). Nous avons néanmoins déterminé que l'activation de JAK1 dans les synaptosomes d'hippocampe de souris transgéniques était associée à l'induction de la neuroprotection *in vivo* (fig 7.E), ce qui suggère que l'axe JAK1/STAT3 est neuroprotecteur dans la MA.

De plus, l'activité de la calpaïne est induite par les oligomères d'A β (Fifre *et al.*, 2006) et a été incriminée dans un processus de clivage de STAT3 dans des cellules non neuronales (Oda *et al.*, 2002). Il a été proposé que des formes de STAT tronquées par protéolyse (dont STAT3 γ) puissent agir comme des dominants négatifs et prévenir l'activation de la voie STAT3 dans les cellules souches hématopoïétiques *in vitro* et *in vivo* (pour revue Hendry & John, 2004). Or, l'expression de dominants négatifs de STAT3 peut prévenir les effets neuroprotecteurs induite contre l'apoptose induite par

l'A β ¹⁻⁴² par d'autres composés utilisant la voie STAT3, comme l'humanine (Hashimoto *et al.*, 2001b ; 2005). La formation de STAT3 γ suite à l'activation de la calpaïne par l'A β reste à démontrer dans les neurones mais pourrait être impliquée dans la prévention des effets protecteurs du CNTF.

Ces observations sont en accord avec la diminution de la phosphorylation de STAT3 observée *in vitro* suite à un traitement par l'A β ¹⁻⁴², *in vivo* chez des animaux modèles de la MA (transgéniques ou injectés avec de l'A β ¹⁻⁴²) et chez les patients (Chiba *et al.*, 2009a). Les auteurs de cette observation suggèrent donc que l'A β est à l'origine de la diminution de l'immunoréactivité de p-STAT3 et que la stimulation de cette voie puisse présenter un intérêt thérapeutique (Chiba *et al.*, 2009b). De manière moins directe, l'implication des répresseurs SHP2, PIAS et SOCS dans la diminution de p-STAT3 dans la MA reste également à déterminer. L'inhibition par l'A β des voies de signalisations induites par le CNTF expliquerait en partie l'incapacité du CNTF à protéger les neurones exposés à l'A β soluble *in vitro*.

3. L'influence de l'A β fibrillé sur la signalisation induite par le CNTF

Le CNTF ne présente pas d'activité neuroprotectrice contre l'A β fibrillaire (*fig 4.B*).

Ceci suggère que la signalisation induite par le CNTF ne peut agir sur la signalisation induite par l'A β fibrillé. En effet, les perturbations précoces du cytosquelette par l'A β soluble impliquent l'activation des caspases 9 et 3, mais pas de la caspase 8 (Sponne *et al.*, 2003). Inversement, cette caspase est nécessaire à l'apoptose des neurones hippocampiques en culture induite par l'A β fibrillaire et est activée par une signalisation similaire à celle induite *via* FAS (Ivins *et al.*, 1999). Or, *in vitro* le prétraitement pendant 2 jours avec des NTs ou du CNTF ne prévient pas l'apoptose induite par l'activation de FAS (Raoul *et al.*, 1999). Chez l'Homme, l'immunoréactivité de la caspase 8 est accrue dans les neurites dystrophiques bordant les plaques et colocalisée avec le ligand de Fas dont l'expression est prépondérante dans le cortex entorhinal et l'hippocampe des patients MA (Su *et al.*, 2003). De manière intéressante, la caspase 8 est également impliquée dans l'apoptose induite par la déprivation en BDNF (-sur des motoneurones- Raoul *et al.*, 1999) ou en NGF (-sur des cellules PC12- Matrone *et al.*, 2008) alors que l'immunoréactivité de ces NTs est inversement corrélée à la présence des dépôts amyloïdes chez les patients (Hellweg *et al.*, 1998 ; Murer *et al.*, 1999). Ces données suggèrent que le CNTF ne pourrait pas être protecteur dans l'apoptose induite par l'A β agrégé. De plus, seule l'inhibition des caspases 6/8 mais pas de la caspase 3 permet de réduire la production d'A β *in vitro* (Matrone *et al.*, 2008). Dans nos expériences, nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet du CNTF sur la formation et l'accumulation du peptide A β chez les souris Tg2576 (*fig 7.F*). Aussi, ces données supportent également l'idée que la caspase 8 ne serait pas une cible de la neuroprotection par le CNTF.

L'absence d'effet neuroprotecteur du CNTF contre la cytotoxicité du peptide A β ¹⁻⁴² agrégé peut aussi supposer que la signalisation induite par l'A β fibrillé peut altérer celle du CNTF. Les niveaux de p-STAT3 sont réduits dans les neurones hippocampiques des patients et des souris Tg2576 âgées de 14 mois (donc présentant des plaques). L'immunisation passive de ces animaux par l'infusion

d'anticorps anti-A β 6E10 augmente l'immunoréactivité de p-STAT3 associée à une réduction des plaques amyloïdes (Chiba *et al.*, 2009a). Plus récemment, Wan *et al.* (2010) ont montré que l'injection intrahippocampale d'A β ¹⁻⁴² chez la souris induit la phosphorylation de STAT3 associée à des dépôts amyloïdes dans l'hippocampe. L'immunoréactivité de p-STAT3 est accrue dans l'hippocampe des patients MA et augmente avec l'âge dans le cerveau de souris APP/PS1 (Wan *et al.*, 2010). Les auteurs ont identifié l'axe Tyk2/STAT3 comme étant impliqué dans l'activation de la caspase 3 et l'apoptose induite par l'A β ²⁵⁻³⁵. Si ces deux études ne vont pas dans le même sens, elles suggèrent néanmoins que l'A β agrégé peut interférer avec l'activation de STAT3 *in vitro* et *in vivo*, au moins de manière locale autour des plaques amyloïdes. Il est nécessaire de comprendre les mécanismes des dérèglements de l'activité de STAT3 chez les patients. Nos analyses biochimiques menées sur les synaptosomes des souris Tg2576 âgées de 9 mois indiquent néanmoins que l'activation de STAT3 *via* JAK1 est neuroprotectrice (*fig 7.E*) et que cette activation ne participerait pas à la dégénérescence dans la MA, comme lors de son activation par Tyk2.

En dépit des considérations précédentes sur l'absence d'effet du CNTF sur la dégénérescence induite par l'A β agrégé, nous avons quand même étudié le potentiel curatif du CNTF. Nous avons montré que l'administration continue de CNTF augmente l'expression et l'activation du TrkB à la synapse hippocampique des souris Tg2576 âgées de 9 mois (résultats complémentaires 4.6 figure 53). Nous n'avons pas déterminé si cette augmentation est le résultat du rétablissement du trafic axonal ou bien d'un effet transcriptionnel de la voie STAT3. Toutefois, l'activation du TrkB chez ces souris à un âge avancé permet d'inverser les déficits cognitifs (Nagahara *et al.*, 2009a) malgré les troubles de la signalisation et du transport de ce récepteur dans les neurones primaires de Tg2576 (Poon *et al.*, 2009). Nous avons donc implanté 4 billes CNTF ou contrôle dans le ventricule de souris Tg2576 âgées de 20 mois (résultats complémentaires 4.7 figure 54). Dans ce cadre, la sécrétion à long terme de CNTF ne permet pas de restaurer significativement les fonctions cognitives dans le labyrinthe en Y. De même, les marqueurs synaptiques (synaptophysine, SNAP 25 et GluR1), témoignant de la neurodégénérescence, et le TrkB ne sont pas significativement augmentés. Dans l'ensemble, l'apport de CNTF n'apporte pas d'amélioration significative après l'émergence des troubles cognitifs et de la pathologie amyloïde chez ces souris. En revanche, l'expression de PSD95 est accrue par le CNTF et suggère une restauration synaptique partielle. Ces données, à confirmer, chez l'animal âgé sont conformes avec l'idée que le CNTF ne puisse pas intervenir sur les troubles tardifs dans la MA : de nombreuses études montrent que les sites synaptiques contenant PSD95 sont ciblés par les oligomères solubles d'A β *in vitro* (Lacor *et al.*, 2004), *in vivo* chez les Tg2576 (Mucke *et al.*, 2000 ; Almeida *et al.*, 2005) et chez les patients MCI (Sultana *et al.*, 2010). Aussi, l'effet positif du traitement au CNTF sur la PSD95 peut s'expliquer par une sélectivité du CNTF contre les troubles synaptiques induits par les oligomères solubles d'A β comme nous l'avons observé chez les animaux jeunes. Ces données suggèrent que le CNTF ne présente que peu d'intérêt en terme curatif dans la MA une fois la déposition d'amyloïde engagée.

4. Conclusion

En résumé, la toxicité des oligomères solubles d'A β est fortement impliquée dans les pertes synaptiques et cellulaires dans la MA (Yankner & Lu, 2009). En parallèle, les systèmes de soutien trophique, comme les neurotrophines, sont gravement dérégulés (Schindowski *et al.*, 2008). Ainsi, les composés à même de contrer les différents aspects de la toxicité du peptide A β , de promouvoir la survie cellulaire et de moduler l'activité synaptique apparaissent comme de bons candidats préventifs et/ou curatifs de la MA. Cependant, les nombreux travaux étudiant l'apport de NTs au SNC ont mis en évidence la nécessité de l'administration ciblée de ces composés, afin d'éviter les effets secondaires indésirables et d'atteindre des concentrations thérapeutiques (Emerich & Thanos, 2006). L'utilisation de la technologie d'encapsulation cellulaire permet de concilier les différentes contraintes de l'administration de NTs au SNC (Visted *et al.* 2001 ; Read *et al.*, 2002 ; Thanos & Emerich, 2008). Parmi les nombreux peptides à activité neurotrophique, le CNTF semble pouvoir intervenir sur différents paramètres de la toxicité du peptide A β tout en promouvant la survie neuronale. Nous avons apporté la preuve du concept, grâce à l'utilisation des cellules encapsulées recombinantes, que le CNTF pouvait prévenir les atteintes liées au peptide A β soluble *in vitro* et notamment les troubles cognitifs *in vivo*. Notre étude supporte l'idée novatrice que la voie JAK1/STAT3 puisse être une cible thérapeutique dans la MA.

Nous n'avons détecté aucun effet secondaire (perte de poids notamment) ou d'altérations cognitives liés à l'administration continue de CNTF (jusqu'à 4 mois). La production continue de CNTF jusqu'à des concentrations thérapeutiques ciblées dans le parenchyme (par l'implantation des bioréacteurs dans le parenchyme) ou généralisées au SNC *via* sa diffusion dans le LCR (par l'implantation des bioréacteurs *icv*) semble non-toxique. La garantie de la sécrétion du peptide par les implants *in vivo* a été apportée par l'observation de l'intégrité de la capsule et de la viabilité des cellules jusqu'à 8 mois après leur implantation. Nos données confirment que la technologie d'encapsulation est donc un moyen efficace d'apporter des peptides thérapeutiques au SNC, mais constitue également un outil de choix dans la démarche de validation de peptides candidats à visée thérapeutique.

L'absence d'effet du CNTF sur la production d'A β et son inefficacité à prévenir la toxicité des formes fibrillaires d'A β , suggère que ce peptide complèterait d'autres traitements ciblant spécifiquement la protéolyse de l'APP. De plus, le CNTF possède des effets à long terme et d'une grande spécificité envers les pertes synaptiques et cellulaires induites par les formes solubles d'A β . Cette observation en fait un peptide candidat de choix dans les approches préventives visant à traiter les troubles synaptiques et la neurodégénérescence à l'origine des troubles cognitifs précoces dans la MA. Toutefois nos données suggèrent qu'au mieux le CNTF retarde les déficits cognitifs précoces, puisqu'il n'a pas d'impact sur la production ou l'agrégation de l'A β . La détermination de la limite jusqu'à laquelle la production continue de CNTF peut retarder les troubles cognitifs est une étape de validation importante. Il est fort probable que cette étape nécessite le remplacement régulier des implants. Les procédures chirurgicales répétées chez l'Homme visant à renouveler les capsules sécrétant le CNTF s'avèrent contraignantes pour le patient (Aebischer *et al.*, 1996b ; Bloch *et al.*, 2004). Il semble donc nécessaire de définir dès à présent des moyens d'assurer ce renouvellement

tout en minimisant les approches chirurgicales pour permettre l'apport continu de peptide thérapeutique.

Une première alternative est la méthode de canulation proposée par Kim *et al.* (2005), permettant le renouvellement de l'implant sans procédure stéréotaxique répétée. Celle-ci serait tout à fait adaptée à cette étude. Ce dispositif permettrait également de procéder facilement à des prélèvements de LCR réguliers pour vérifier l'absence de production d'anticorps dirigés contre le peptide délivré.

La chirurgie à titre préventif chez l'Homme n'étant pas déontologiquement possible, il est donc également envisageable de modifier la voie d'administration du CNTF. Chez la souris, le CNTF administré par voie intranasale passe la BHE et est transporté jusqu'à l'hippocampe (Alcala-Barraza *et al.*, 2010). Le fait que l'administration intranasale ne permette pas de cibler une structure en particulier pourrait être un inconvénient. Cependant, nos résultats montrent aussi que la production continue de CNTF dans l'ensemble du SNC, par l'implantation *icv* de cellules recombinantes encapsulées, est aussi efficace que sa production localisée au niveau de l'hippocampe pour prévenir les troubles induits par l'injection d'A β (résultats complémentaires 4.4 figure 51). L'administration intranasale pourrait donc être une autre méthode d'apport de CNTF au SNC dans nos modèles d'altérations cognitives induites par l'A β . L'efficacité de l'administration intranasale d'autres facteurs neuroprotecteurs, comme le NGF ou la colivéline, a déjà été montrée *in vivo* (De Rosa *et al.*, 2005 ; Yamada *et al.*, 2008). Récemment, l'administration intranasale d'insuline a permis l'amélioration des scores cognitifs chez des patients MCI ou MA modérée (Craft *et al.*, 2011). L'utilisation de cette voie d'administration possède l'avantage de pouvoir contrôler et d'ajuster directement la dose à administrer, ou d'interrompre le traitement si besoin.

Dans nos modèles, de nombreux paramètres de neuroprotection par le CNTF restent à étudier. Parmi ceux-ci, le stress oxydant, l'activité de p75 et la perte de la signalisation des neurotrophines sont aussi des cibles potentielles dans la MA. Ces mécanismes sont tous impliqués dans la toxicité et/ou la production d'A β dans la MA et peuvent tous influencer sur la phosphorylation de Tau, qui est aussi une cible dans la MA (pour revue, Ballatore *et al.*, 2007). Il est nécessaire de déterminer quelques-unes des cibles génomiques de STAT3 lors de la neuroprotection par le CNTF, pour déterminer précisément quels aspects de la MA sont ciblés par cette voie. Il paraît difficilement concevable qu'un seul peptide puisse concentrer toutes les activités neuroprotectrices requises pour lutter efficacement contre une pathologie aussi complexe que la MA. Aussi, la détermination expérimentale des activations liées à la neuroprotection par le CNTF, mais aussi de ses partenaires *in vivo*, est déterminante dans le choix des associations thérapeutiques.

VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev.* 2005; 85(2):523-69.
- Adachi N, Kohara K, Tsumoto T. Difference in trafficking of brain-derived neurotrophic factor between axons and dendrites of cortical neurons, revealed by live-cell imaging. *BMC Neurosci.* 2005; 6:42.
- Adler R, Landa KB, Manthorpe M, Varon S. Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science.* 1979; 204(4400):1434-6.
- Aebischer P, Pochon NA, Heyd B, Deglon N, Joseph JM, Zurn AD, Baetge EE, Hammang JP, Goddard M, Lysaght M, Kaplan F, Kato AC, Schlupe M, Hirt L, Regli F, Porchet F, De Tribolet N. Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using a polymer encapsulated xenogenic cell line engineered to secrete hCNTF. *Hum Gene Ther.* 1996a; 7(7):851-60.
- Aebischer P, Ridet J. Recombinant proteins for neurodegenerative diseases: the delivery issue. *Trends Neurosci.* 2001; 24(9):533-40.
- Aebischer P, Schlupe M, Déglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med.* 1996b; 2(6):696-9.
- Akahori Y, Takamoto N, Masumoto A, Inoue S, Nakatsukasa H, Masuyama H, Hiramatsu Y. Circulating levels of ciliary neurotrophic factor in normal pregnancy and preeclampsia. *Acta Med Okayama.* 2010; 64(2):129-36.
- Akatsu H, Yamagata HD, Kawamata J, Kamino K, Takeda M, Yamamoto T, Miki T, Tooyama I, Shimohama S, Kosaka K. Variations in the BDNF gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies in Japan. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2006; 22(3):216-22
- Albrecht D, García L, Cartier L, Kettlun AM, Vergara C, Collados L, Valenzuela MA. Trophic factors in cerebrospinal fluid and spinal cord of patients with tropical spastic paraparesis, HIV, and Creutzfeldt-Jakob disease. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006; 22(3):248-54.
- Albrecht PJ, Dahl JP, Stoltzfus OK, Levenson R, Levison SW. Ciliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival. *Exp Neurol.* 2002; 173(1):46-62.
- Albrecht PJ, Enterline JC, Cromer J, Levison SW. CNTF-activated astrocytes release a soluble trophic activity for oligodendrocyte progenitors. *Neurochem Res.* 2007; 32(2):263-71.
- Alcalá-Barraza SR, Lee MS, Hanson LR, McDonald AA, Frey WH 2nd, McLoon LK. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. *J Drug Target.* 2010; 18(3):179-90.

- Alexander WS, Rakar S, Robb L, Farley A, Willson TA, Zhang JG, Hartley L, Kikuchi Y, Kojima T, Nomura H, Hasegawa M, Maeda M, Fabri L, Jachno K, Nash A, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol*. 1999; 9(11):605-8.
- Allen SJ, Wilcock GK, Dawbarn D. Profound and selective loss of catalytic TrkB immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 264(3):648-51.
- Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK. Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses *Neurobiol Dis*. 2005; 20(2):187-98.
- Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(12):6923-8.
- Al-Shawi R, Hafner A, Olsen J, Chun S, Raza S, Thrasivoulou C, Lovestone S, Killick R, Simons P, Cowen T. Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system. *Eur J Neurosci*. 2008; 27(8):2103-14.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*. 1997; 389(6653):856-60.
- Altman R, Rutledge JC. The vascular contribution to Alzheimer's disease. *Clin Sci (Lond)*. 2010; 119(10):407-21.
- Amieva H, Letenneur L, Dartigues JF, Rouch-Leroyer I, Sourgen C, D'Alché-Birée F, Dib M, Barberger-Gateau P, Orgogozo JM, Fabrigoule C. Annual rate and predictors of conversion to dementia in subjects presenting mild cognitive impairment criteria defined according to a population-based study. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004; 18(1):87-93
- Anderson DJ. New roles for PDGF and CNTF in controlling the timing of glial cell differentiation in the optic nerve. *Trends Neurosci*. 1989; 12(3):83-5.
- Anderson KD, Panayotatos N, Corcoran TL, Lindsay RM, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(14):7346-51.
- Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell*. 1999; 10(5):1463-75
- Anstey KJ, Mack HA, Cherbuin N. Alcohol consumption as a risk factor for dementia and cognitive decline: meta-analysis of prospective studies. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2009; 17(7):542-55.
- Aouba A, Pequignot F, Le Toullec A, Jouglu E. Les causes médicales de décès en France et leur évolution 1980-2004 Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire INVS 18 septembre 2007, n°35-36, p 308-314 http://www.invs.sante.fr/beh/2007/35_36/beh_35_36_2007.pdf**

- Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 301(1):231-5.
- Ascaño M, Richmond A, Borden P, Kuruvilla R. Axonal targeting of Trk receptors via transcytosis regulates sensitivity to neurotrophin responses. *J Neurosci.* 2009; 29(37):11674-85.
- Attems J, Quass M, Jellinger KA, Lintner F. Topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy and its effect on cognitive decline are influenced by Alzheimer disease pathology. *J Neurol Sci.* 2007; 257(1-2):49-55
- Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR. The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron.* 2000; 27(2):265-77.
- Auguste P, Robledo O, Olivier C, Froger J, Praloran V, Pouplard-Barthelaix A, Gascan H. Alanine substitution for Thr268 and Asp269 of soluble ciliary neurotrophic factor (CNTF) receptor alpha component defines a specific antagonist for the CNTF response. *J Biol Chem.* 1996; 271(42):26049-56.
- Azadi S, Johnson LE, Paquet-Durand F, Perez MT, Zhang Y, Ekström PA, van Veen T. CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina. *Brain Res.* 2007; 1129(1):116-29.

B

- Bachoud-Lévi AC, Déglon N, Nguyen JP, Bloch J, Bourdet C, Winkel L, Rémy P, Goddard M, Lefaucheur JP, Brugières P, Baudic S, Cesaro P, Peschanski M, Aebischer P. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther.* 2000b; 11(12):1723-9.
- Bachoud-Lévi AC, Gaura V, Brugières P, Lefaucheur JP, Boissé MF, Maison P, Baudic S, Ribeiro MJ, Bourdet C, Remy P, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol.* 2006; 5(4):303-9.
- Bachoud-Lévi AC, Rémy P, Nguyen JP, Brugières P, Lefaucheur JP, Bourdet C, Baudic S, Gaura V, Maison P, Haddad B, Boissé MF, Grandmougin T, Jény R, Bartolomeo P, Dalla Barba G, Degos JD, Lisovoski F, Ergis AM, Pailhous E, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet.* 2000a; 356(9246):1975-9.
- Bachoud-Lévi AC. Neural grafts in Huntington's disease: viability after 10 years. *Lancet Neurol.* 2009; 8(11):979-81.
- Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN. SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol.* 2009; 30(8):392-400.

- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011; 377(9770):1019-31.
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(9):663-72.
- Barbin G, Manthorpe M, Varon S. Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem*. 1984; 43(5):1468-78.
- Barco A, Patterson SL, Alarcon JM, Gromova P, Mata-Roig M, Morozov A, Kandel ER. Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron*. 2005; 48(1):123-37.
- Barnes LL, Mendes de Leon CF, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA. Social resources and cognitive decline in a population of older African Americans and whites. *Neurology*. 2004; 63(12):2322-6.
- Barry SP, Townsend PA, McCormick J, Knight RA, Scarabelli TM, Latchman DS, Stephanou A. STAT3 deletion sensitizes cells to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 385(3):324-9.
- Baumann H, Symes AJ, Comeau MR, Morella KK, Wang Y, Friend D, Ziegler SF, Fink JS, Gearing DP. Multiple regions within the cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor and gp130 cooperate in signal transduction in hepatic and neuronal cells. *Mol Cell Biol*. 1994; 14(1):138-46.
- Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(18):6934-8.
- Benaki D, Zikos C, Evangelou A, Livaniou E, Vlasi M, Mikros E, Pelecanou M. Solution structure of humanin, a peptide against Alzheimer's disease-related neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 329(1):152-60.
- Bennett DA, Schneider JA, Tang Y, Arnold SE, Wilson RS. The effect of social networks on the relation between Alzheimer's disease pathology and level of cognitive function in old people: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*. 2006; 5(5):406-12.
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet*. 2007; 39(1):17-23.
- Betz UA, Bloch W, van den Broek M, Yoshida K, Taga T, Kishimoto T, Addicks K, Rajewsky K, Müller W. Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J Exp Med*. 1998; 188(10):1955-65.
- Beurrier C, Faideau M, Bennouar KE, Escartin C, Kerkerian-Le Goff L, Bonvento G, Gubellini P. Ciliary neurotrophic factor protects striatal neurons against excitotoxicity by enhancing glial glutamate uptake. *PLoS One*. 2010; 5(1):e8550.
- Bhattacharya S, Das AV, Mallya KB, Ahmad I. Ciliary neurotrophic factor-mediated signaling regulates neuronal versus glial differentiation of retinal stem cells/progenitors by concentration-

- dependent recruitment of mitogen-activated protein kinase and Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathways in conjunction with Notch signaling. *Stem Cells*. 2008; 26(10):2611-24.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J*. 1999; 18(3):616-22.
- Biessels GJ, De Leeuw FE, Lindeboom J, Barkhof F, Scheltens P. Increased cortical atrophy in patients with Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006b; 77(3):304-7.
- Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol*. 2006a; 5(1):64-74.
- Bitard J, Daburon S, Duplomb L, Blanchard F, Vuisio P, Jacques Y, Godard A, Heath JK, Moreau JF, Taupin JL. Mutations in the immunoglobulin-like domain of gp190, the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor, increase or decrease its affinity for LIF. *J Biol Chem*. 2003; 278(18):16253-61.
- Björklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ. Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res*. 2000; 886(1-2):82-98.
- Blanchard J, Chohan MO, Li B, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Beneficial Effect of a CNTF Tetrapeptide on Adult Hippocampal Neurogenesis, Neuronal Plasticity, and Spatial Memory in Mice. *J Alzheimers Dis*. 2010a; 21(4):1185-95.
- Blanchard J, Wanka L, Tung YC, Cárdenas-Aguayo Mdel C, LaFerla FM, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Pharmacologic reversal of neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting A β and tau pathologies in 3xTg-AD mice. *Acta Neuropathol*. 2010b; 120(5):605-21.
- Blanchet PJ, Konitsiotis S, Mochizuki H, Pluta R, Emerich DF, Chase TN, Mouradian MM. Complications of a trophic xenotransplant approach in parkinsonian monkeys. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27(4):607-12.
- Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebti SM. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res*. 2003; 63(6):1270-9.
- Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugières P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski M. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther*. 2004; 15(10):968-75.

- Blöchl A, Blöchl R. A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem.* 2007; 102(2):289-305.
- Blottner D, Brüggemann W, Unsicker K. Ciliary neurotrophic factor supports target-deprived preganglionic sympathetic spinal cord neurons. *Neurosci Lett.* 1989; 105(3):316-20.
- Bongioanni P, Reali C, Sogos V. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004; (3):CD004302.
- Boulanger MJ, Bankovich AJ, Kortemme T, Baker D, Garcia KC. Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Mol Cell.* 2003a; 12(3):577-89.
- Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science.* 2003b; 300(5628):2101-4.
- Boulanger MJ, Garcia KC. Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system. *Adv Protein Chem.* 2004; 68:107-46.
- Boulton TG, Stahl N, Yancopoulos GD. Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem.* 1994; 269(15):11648-55.
- Bour A, Little S, Dodart JC, Kelche C, Mathis C. A secreted form of the beta-amyloid precursor protein (sAPP695) improves spatial recognition memory in OF1 mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2004; 81(1):27-38.
- Bowen DM, Najlerahim A, Procter AW, Francis PT, Murphy E. Circumscribed changes of the cerebral cortex in neuropsychiatric disorders of later life. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(23):9504-8.
- Bozon B, Kelly A, Josselyn SA, Silva AJ, Davis S, Laroche S. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003; 358(1432):805-14.
- Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991; 82(4):239-59.
- Braak H, Braak E. The human entorhinal cortex: normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases. *Neurosci Res.* 1992; 15(1-2):6-31.
- Bravo J, Staunton D, Heath JK, Jones EY. Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *EMBO J.* 1998; 17(6):1665-74.
- Brigadski T, Hartmann M, Lessmann V. Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *J Neurosci.* 2005; 25(33):7601-14.
- Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol.* 1985; 17(1):89-96.

- Brion JP. Immunological demonstration of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2006; 9(3 Suppl):177-85.
- Buoso E, Lanni C, Schettini G, Govoni S, Racchi M. beta-Amyloid precursor protein metabolism: focus on the functions and degradation of its intracellular domain. *Pharmacol Res.* 2010; 62(4):308-17.
- Burke MA, Bothwell M. p75 neurotrophin receptor mediates neurotrophin activation of NF-kappa B and induction of iNOS expression in P19 neurons. *J Neurobiol.* 2003; 55(2):191-203.
- Burke MA, Mobley WC, Cho J, Wiegand SJ, Lindsay RM, Mufson EJ, Kordower JH. Loss of developing cholinergic basal forebrain neurons following excitotoxic lesions of the hippocampus: rescue by neurotrophins. *Exp Neurol.* 1994; 130(2):178-95.
- Bussmann KA, Sofroniew MV. Re-expression of p75NTR by adult motor neurons after axotomy is triggered by retrograde transport of a positive signal from axons regrowing through damaged or denervated peripheral nerve tissue. *Neuroscience.* 1999; 91(1):273-81.
- Butler D. Last chance to stop and think on risks of xenotransplants. *Nature.* 1998; 391(6665):320-4.

C

- Calabrese B, Shaked GM, Tabarean IV, Braga J, Koo EH, Halpain S. Rapid, concurrent alterations in pre- and postsynaptic structure induced by naturally-secreted amyloid-beta protein. *Mol Cell Neurosci.* 2007; 35(2):183-93.
- Calvo F, Agudo-Ibáñez L, Crespo P. The Ras-ERK pathway: understanding site-specific signaling provides hope of new anti-tumor therapies. *Bioessays.* 2010; 32(5):412-21.
- Capelle HH, Weigel R, Schmelz M, Krauss JK. Neurotrophins in the cerebrospinal fluid of patient cohorts with neuropathic pain, nociceptive pain, or normal pressure hydrocephalus. *Clin J Pain.* 2009; 25(8):729-33.
- Capsoni S, Giannotta S, Cattaneo A. Beta-amyloid plaques in a model for sporadic Alzheimer's disease based on transgenic anti-nerve growth factor antibodies. *Mol Cell Neurosci.* 2002; 21(1):15-28.
- Capsoni S, Ugolini G, Comparini A, Ruberti F, Berardi N, Cattaneo A. Alzheimer-like neurodegeneration in aged antineurotrophin growth factor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(12):6826-31
- Cash AD, Aliev G, Siedlak SL, Nunomura A, Fujioka H, Zhu X, Raina AK, Vinters HV, Tabaton M, Johnson AB, Paula-Barbosa M, Avila J, Jones PK, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol.* 2003; 162(5):1623-7.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. *Dis Mon.* 2010; 56(9):484-546.

- Cavaillon JM. Molecular mediators : Cytokines. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine 2nd Edition. 2004 Edité par Robert A. Meyers chez Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim , p431-460
- Chaney MO, Stine WB, Kokjohn TA, Kuo YM, Esh C, Rahman A, Luehrs DC, Schmidt AM, Stern D, Yan SD, Roher AE. RAGE and amyloid beta interactions: atomic force microscopy and molecular modeling. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1741(1-2):199-205
- Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron*. 2002; 33(1):9-12
- Chasseigneaux S, Dinc L, Rose C, Chabret C, Couplier F, Topilko P, Mauger G, Allinquant B. Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. *PLoS One*. 2011; 6(1):e16301.
- Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*. 2001; 50(4):260-5.
- Chen J, Chu YF, Chen JM, Li BC. Synergistic effects of NGF, CNTF and GDNF on functional recovery following sciatic nerve injury in rats. *Adv Med Sci*. 2010; 55(1):32-42.
- Chen YL, Law PY, Loh HH. Sustained activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor kappaB signaling mediates G protein-coupled delta-opioid receptor gene expression. *J Biol Chem*. 2006; 281(6):3067-74.
- Chételat G, Villemagne VL, Bourgeat P, Pike KE, Jones G, Ames D, Ellis KA, Szoëke C, Martins RN, O'Keefe GJ, Salvado O, Masters CL, Rowe CC; Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle Research Group. Relationship between atrophy and beta-amyloid deposition in Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2010; 67(3):317-24.
- Chiba T, Yamada M, Aiso S. Targeting the JAK2/STAT3 axis in Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2009b; 13(10):1155-67.
- Chiba T, Yamada M, Sasabe J, Terashita K, Shimoda M, Matsuoka M, Aiso S. Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Mol Psychiatry*. 2009a; 14(2):206-22.
- Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, George-Hyslop PS, Westaway D. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem*. 2001; 276(24):21562-70.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*. 1997; 278(5344):1803-5.

- Clahsen T, Lehmann U, Stross C, Hermanns HM, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J, Heinrich PC, Schaper F. The tyrosine 974 within the LIF-R-chain of the gp130/LIF-R heteromeric receptor complex mediates negative regulation of LIF signalling. *Cell Signal*. 2005; 17(5):559-69.
- Cleary J, Hittner JM, Semotuk M, Mantyh P, O'Hare E. Beta-amyloid(1-40) effects on behavior and memory. *Brain Res*. 1995; 682(1-2):69-74.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci*. 2005; 8(1):79-84. Epub 2004 Dec 19.
- Cohen P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25(12):596-601.
- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A nerve growth factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1954; 40(10):1014-8.
- Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L, Marcello E, Zimmermann M, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M. α -Secretase ADAM10 as well as α APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med*. 2002; 8(2):67-74.
- Cole SL, Vassar R. The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *J Biol Chem*. 2008; 283(44):29621-5.
- Conejero-Goldberg C, Hyde TM, Chen S, Dreses-Werringloer U, Herman MM, Kleinman JE, Davies P, Goldberg TE. Molecular signatures in post-mortem brain tissue of younger individuals at high risk for Alzheimer's disease as based on APOE genotype. *Mol Psychiatry*. 2011; 16(8):836-47. doi: 10.1038/mp.2010.57
- Conner JM, Franks KM, Titterness AK, Russell K, Merrill DA, Christie BR, Sejnowski TJ, Tuszynski MH. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J Neurosci*. 2009; 29(35):10883-9.
- Connor B, Young D, Lawlor P, Gai W, Waldvogel H, Faull RL, Dragunow M. Trk receptor alterations in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996; 42(1):1-17.
- Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997; 49(1-2):71-81.
- Conover JC, Ip NY, Poueymirou WT, Bates B, Goldfarb MP, DeChiara TM, Yancopoulos GD. Ciliary neurotrophic factor maintains the pluripotentiality of embryonic stem cells. *Development*. 1993; 119(3):559-65
- Consiglio A, Martino S, Dolcetta D, Cusella G, Conese M, Marchesini S, Benaglia G, Wrabetz L, Orlicchio A, Déglon N, Aebischer P, Severini GM, Bordignon C. Metabolic correction in oligodendrocytes derived from metachromatic leukodystrophy mouse model by using encapsulated recombinant myoblasts. *J Neurol Sci*. 2007; 255(1-2):7-16.

- Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci*. 2002; 22(8):3262-8.
- Costantini C, Kolasani RM, Puglielli L. Ceramide and cholesterol: possible connections between normal aging of the brain and Alzheimer's disease. Just hypotheses or molecular pathways to be identified? *Alzheimers Dement*. 2005a; 1(1):43-50.
- Costantini C, Scrabble H, Puglielli L. An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid beta-peptide generation. *EMBO J*. 2006; 25(9):1997-2006.
- Costantini C, Weindruch R, Della Valle G, Puglielli L. A TrkA-to-p75NTR molecular switch activates amyloid beta-peptide generation during aging. *Biochem J*. 2005b; 391(Pt 1):59-67.
- Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int*. 2000; 36(3):175-84.
- Counts SE, Mufson EJ. The role of nerve growth factor receptors in cholinergic basal forebrain degeneration in prodromal Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005; 64(4):263-72.
- Counts SE, Nadeem M, Wu J, Ginsberg SD, Saragovi HU, Mufson EJ. Reduction of cortical TrkA but not p75(NTR) protein in early-stage Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2004; 56(4):520-31.
- Craft S, Baker LD, Montine TJ, Minoshima S, Watson GS, Claxton A, Arbuckle M, Callaghan M, Tsai E, Plymate SR, Green PS, Leverenz J, Cross D, Gerton B. Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment: A Pilot Clinical Trial. *Arch Neurol*. 2011 Sep 12
- Craig MC, Murphy DG. Estrogen therapy and Alzheimer's dementia. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1205:245-53.
- Cras P, Smith MA, Richey PL, Siedlak SL, Mulvihill P, Perry G. Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. 1995; 89(4):291-5.
- Croll SD, Ip NY, Lindsay RM, Wiegand SJ. Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res*. 1998; 812(1-2):200-8.
- Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience*. 1999; 93(4):1491-506.
- Crystal H, Dickson D, Fuld P, Masur D, Scott R, Mehler M, Masdeu J, Kawas C, Aronson M, Wolfson L. Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology*. 1988; 38(11):1682-7.

Curtis R, Adryan KM, Zhu Y, Harkness PJ, Lindsay RM, DiStefano PS. Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature*. 1993; 365(6443):253-5.

D

da Penha Berzaghi M, Cooper J, Castrén E, Zafra F, Sofroniew M, Thoenen H, Lindholm D. Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. *J Neurosci*. 1993; 13(9):3818-26.

da Silva S, Wang F. Retrograde neural circuit specification by target-derived neurotrophins and growth factors *Curr Opin Neurobiol*. 2011; 21(1):61-7

Dagoneau N, Bellais S, Blanchet P, Sarda P, Al-Gazali LI, Di Rocco M, Huber C, Djouadi F, Le Goff C, Munnich A, Cormier-Daire V. Mutations in cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1) account for both Crisponi and cold-induced sweating syndromes. *Am J Hum Genet*. 2007; 80(5):966-70.

D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, Diamantini A, De Zio D, Carrara P, Battistini L, Moreno S, Bacci A, Ammassari-Teule M, Marie H, Cecconi F. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2011; 14(1):69-76.

Dance M, Montagner A, Salles JP, Yart A, Raynal P. The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell Signal*. 2008; 20(3):453-9.

Davies AM. Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *EMBO J*. 2003; 22(11):2537-45.

Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 1987; 78(2):151-64.

Davies DR, Wlodawer A. Cytokines and their receptor complexes. *FASEB J*. 1995; 9(1):50-6.

Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, DiStefano PS, Curtis R, Panayotatos N, Gascan H, et al. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science*. 1993a; 259(5102):1736-9.

Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, Yancopoulos GD. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science*. 1993b; 260(5115):1805-8.

Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science*. 1991; 253(5015):59-63.

- Dawbarn D, Allen SJ. Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003; 29(3):211-30.
- Day-Lollini PA, Stewart GR, Taylor MJ, Johnson RM, Chellman GJ. Hyperplastic changes within the leptomeninges of the rat and monkey in response to chronic intracerebroventricular infusion of nerve growth factor. *Exp Neurol.* 1997; 145(1):24-37.
- De Belleruche J, Orell R, King A. Familial amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease (FALS): a review of current developments. *J Med Genet* 1995; 32:841-847
- De Bovis B, Derouet D, Gauchat JF, Elson G, Gascan H, Delapeyrière O. *clc* is co-expressed with *clf* or *cntfr* in developing mouse muscles. *Cell Commun Signal.* 2005; 3(1):1.
- de la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005; 7(1):45-61.
- De Mars G, Windelinckx A, Beunen G, Delecluse C, Lefevre J, Thomis MA. Polymorphisms in the CNTF and CNTF receptor genes are associated with muscle strength in men and women. *J Appl Physiol.* 2007; 102(5):1824-31.
- De Rosa R, Garcia AA, Braschi C, Capsoni S, Maffei L, Berardi N, Cattaneo A. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(10):3811-6.
- De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 11):1857-70.
- DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, Friedman B, McClain J, Pan L, Stahl N, Ip NY, Yancopoulos GD. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell.* 1995; 83(2):313-22.
- Déglon N, Heyd B, Tan SA, Joseph JM, Zurn AD, Aebischer P. Central nervous system delivery of recombinant ciliary neurotrophic factor by polymer encapsulated differentiated C2C12 myoblasts. *Hum Gene Ther.* 1996; 7(17):2135-46.
- Deguchi T, Misawa H, Takahashi R. Differentiation of cholinergic neurons and physiological role of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *J Physiol Paris.* 1994; 88(4):229-33.
- Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, Watson R, Worth D, Hanrahan S, Bucci C, Schiavo G. Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron.* 2006; 52(2):293-305.
- DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol.* 1990; 27(5):457-64.
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Watez A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology.* 1999; 52(6):1158-65.

- Delcroix JD, Valletta JS, Wu C, Hunt SJ, Kowal AS, Mobley WC. NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron*. 2003; 39(1):69-84.
- Derouesne C, Poitreneau J, Hugonot L, Kalafat M, Dubois B, Laurent B. Mini-Mental State Examination: a useful method for the evaluation of the cognitive status of patients by the clinician. Consensual French version. *Presse Med*. 1999; 28(21):1141-8.
- Derouet D, Rousseau F, Alfonsi F, Froger J, Hermann J, Barbier F, Perret D, Diveu C, Guillet C, Preisser L, Dumont A, Barbado M, Morel A, deLapeyrière O, Gascan H, Chevalier S. Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(14):4827-32.
- Devergne O, Ghiglione C, Noselli S. The endocytic control of JAK/STAT signalling in *Drosophila*. *J Cell Sci*. 2007; 120(Pt 19):3457-64.
- Di Marco A, Gloaguen I, Demartis A, Saggio I, Graziani R, Paonessa G, Laufer R. Agonistic and antagonistic variants of ciliary neurotrophic factor (CNTF) reveal functional differences between membrane-bound and soluble CNTF alpha-receptor. *J Biol Chem*. 1997; 272(37):23069-75.
- Di Marco A, Gloaguen I, Graziani R, Paonessa G, Saggio I, Hudson KR, Laufer R. Identification of ciliary neurotrophic factor (CNTF) residues essential for leukemia inhibitory factor receptor binding and generation of CNTF receptor antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(17):9247-52.
- Diarra A, Geetha T, Potter P, Babu JR. Signaling of the neurotrophin receptor p75 in relation to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 390(3):352-6.
- Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging*. 1992; 13(1):179-89.
- Dickson DW, Farlo J, Davies P, Crystal H, Fuld P, Yen SH. Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am J Pathol*. 1988; 132(1):86-101.
- DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, Alexander C, Boland P, Schick CM, Lindsay RM, Wiegand SJ. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron*. 1992; 8(5):983-93.
- Dittrich F, Thoenen H, Sendtner M. Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. *Ann Neurol*. 1994; 35(2):151-63.
- Drake CT, Milner TA, Patterson SL. Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci*. 1999; 19(18):8009-26.
- Drouet B, Fife A, Pinçon-Raymond M, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Guéant JL, Chambaz J, Pillot T. ApoE protects cortical neurones against neurotoxicity induced by the non-fibrillar C-terminal domain of the amyloid-beta peptide. *J Neurochem*. 2001; 76(1):117-27.

- Drouet B, Pinçon-Raymond M, Chambaz J, Pillot T. Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57(5):705-15.
- Duan WM, Brundin P, Grasbon-Frodl EM, Widner H. Methylprednisolone prevents rejection of intrastriatal grafts of xenogeneic embryonic neural tissue in adult rats. *Brain Res.* 1996; 712(2):199-212.
- Dugan LL, Creedon DJ, Johnson EM Jr, Holtzman DM. Rapid suppression of free radical formation by nerve growth factor involves the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(8):4086-91.
- Dumont M, Beal MF. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(5):1014-26.
- Dutta R, McDonough J, Chang A, Swamy L, Siu A, Kidd GJ, Rudick R, Mirnics K, Trapp BD. Activation of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) signalling pathway in cortical neurons of multiple sclerosis patients. *Brain.* 2007; 130(Pt 10):2566-76.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 2009; 118(1):5-36.
- Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 2008; 115(1):5-38.

E

- Ebendal T, Askmark H, Aquilonius SM. Screening for neurotrophic disturbances in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1989; 79(3):188-93.
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 2008; 29(5):258-89
- Elliott E, Atlas R, Lange A, Ginzburg I. Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3 Kinase signalling mechanism. *Eur J Neurosci.* 2005; 22(5):1081-9.
- Elson GC, Graber P, Losberger C, Herren S, Gretener D, Menoud LN, Wells TN, Kosco-Vilbois MH, Gauchat JF. Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J Immunol.* 1998; 161(3):1371-9.
- Elson GC, Lelièvre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, Suard I, de Coignac AB, Delneste Y, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Gascan H. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci.* 2000; 3(9):867-72.
- Emerich DF, Lindner MD, Winn SR, Chen EY, Frydel BR, Kordower JH. Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci.* 1996b; 16(16):5168-81.

- Emerich DF, Thanos CG. Intracompartmental delivery of CNTF as therapy for Huntington's disease and retinitis pigmentosa. *Curr Gene Ther.* 2006; 6(1):147-59.
- Emerich DF, Winn SR, Lindner MD. Continued presence of intrastriatal but not intraventricular polymer-encapsulated PC12 cells is required for alleviation of behavioral deficits in Parkinsonian rodents. *Cell Transplant.* 1996a; 5(5):589-96
- Emsley JG, Hagg T. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol.* 2003; 183(2):298-310.
- Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, Nakama S, Hoshino Y, Murakami T, Kobayashi E. Early exercise in spinal cord injured rats induces allodynia through TrkB signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 381(3):339-44.
- Endres K, Fahrenholz F. Upregulation of the alpha-secretase ADAM10--risk or reason for hope? *FEBS J.* 2010; 277(7):1585-96.
- Eriksdotter Jönhagen M, Nordberg A, Amberla K, Bäckman L, Ebendal T, Meyerson B, Olson L, Seiger, Shigeta M, Theodorsson E, Viitanen M, Winblad B, Wahlund LO. Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 1998; 9(5):246-57.
- Ernst M, Jenkins BJ. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet.* 2004; 20(1):23-32.
- Erol A. An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2008; 13(3):241-53.
- Eskelinen MH, Kivipelto M. Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dis.* 2010; 20 Suppl 1:S167-74.
- Espósito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem.* 2001; 276(35):32687-95
- Ettinger MP, Littlejohn TW, Schwartz SL, Weiss SR, McIlwain HH, Heymsfield SB, Bray GA, Roberts WG, Heyman ER, Stambler N, Heshka S, Vicary C, Guler HP. Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA.* 2003; 289(14):1826-32.

F

- Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci.* 2001; 18(2):210-20.

- Fahnestock M, Scott SA, Jetté N, Weingartner JA, Crutcher KA. Nerve growth factor mRNA and protein levels measured in the same tissue from normal and Alzheimer's disease parietal cortex. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996; 42(1):175-8.
- Feng D, Kim T, Ozkan E, Light M, Torkin R, Teng KK, Hempstead BL, Garcia KC. Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75NTR and sortilin. *J Mol Biol*. 2010; 396(4):967-84.
- Ferrer I, Marín C, Rey MJ, Ribalta T, Goutan E, Blanco R, Tolosa E, Martí E. BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999; 58(7):729-39.
- Ferrero ME. A new approach to the inflammatory/autoimmune diseases. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2009; 4(2):108-13.
- Fifre A, Sponne I, Koziel V, Kriem B, Yen Potin FT, Bihain BE, Olivier JL, Oster T, Pillot T. Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. *J Biol Chem*. 2006; 281(1):229-40.
- Finan GM, Okada H, Kim TW. BACE1 retrograde trafficking is uniquely regulated by the cytoplasmic domain of sortilin. *J Biol Chem*. 2011; 286(14):12602-16.
- Finkbeiner S. Calcium regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57(3):394-401
- Fjord-Larsen L, Kusk P, Tornøe J, Juliusson B, Torp M, Bjarkam CR, Nielsen MS, Handberg A, Sørensen JC, Wahlberg LU. Long-term delivery of nerve growth factor by encapsulated cell biodelivery in the Göttingen minipig basal forebrain. *Mol Ther*. 2010; 18(12):2164-72.
- Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanyé MC, Fifre A, Sponne I, Leininger-Muller B, Olivier JL, Pillot T, Oster T. Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. *J Neurochem*. 2006; 96(2):385-95
- Forger NG, Prevet D, deLapeyrière O, de Bovis B, Wang S, Bartlett P, Oppenheim RW. Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci*. 2003; 23(26):8854-8.
- Fortress AM, Buhusi M, Helke KL, Granholm AC. Cholinergic Degeneration and Alterations in the TrkA and p75NTR Balance as a Result of Pro-NGF Injection into Aged Rats. *J Aging Res*. 2011; 2011:460543.
- Fox NC, Schott JM. Imaging cerebral atrophy: normal ageing to Alzheimer's disease. *Lancet*. 2004; 363(9406):392-4.
- Frebel K, Wiese S. Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem Soc Trans*. 2006; 34(Pt 6):1287-90.

Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Kriek E, Qi JX, Lone T, Zhang YB, Snyder JA, Wells TH, et al. Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 1992; 327(22):1549-55.

Friedland RP, Fritsch T, Smyth KA, Koss E, Lerner AJ, Chen CH, Petot GJ, Debanne SM. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(6):3440-5.

Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrisey D, McClain J, Wang DY, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, et al. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron.* 1992; 9(2):295-305.

Friedman WJ. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci.* 2000; 20(17):6340-6.

Funato H, Enya M, Yoshimura M, Morishima-Kawashima M, Ihara Y. Presence of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid beta-protein dimers in the hippocampus CA1 not exhibiting neurofibrillary tangle formation *Am J Pathol.* 1999; 155(1):23-8.

G

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature.* 1995; 373(6514):523-7.

Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? *Int J Pharm.* 2005; 298(2):274-92.

Garzon DJ, Fahnstock M. Oligomeric amyloid decreases basal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA via specific downregulation of BDNF transcripts IV and V in differentiated human neuroblastoma cells. *J Neurosci.* 2007; 27(10):2628-35.

Gearing DP, Thut CJ, VandeBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, Price V, Cosman D, Beckmann MP. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J.* 1991; 10(10):2839-48.

Gelernter J, Van Dyck C, van Kammen DP, Malison R, Price LH, Cubells JF, Berman R, Charney DS, Heninger G. Ciliary neurotrophic factor null allele frequencies in schizophrenia, affective disorders, and Alzheimer's disease. *Am J Med Genet.* 1997; 74(5):497-500.

Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn F, Heinrich PC, Graeve L. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem.* 1996; 271(22):12991-8.

- Giess R, Holtmann B, Braga M, Grimm T, Müller-Myhsok B, Toyka KV, Sendtner M. Early onset of severe familial amyotrophic lateral sclerosis with a SOD-1 mutation: potential impact of CNTF as a candidate modifier gene. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(5):1277-86.
- Ginsberg SD, Che S, Wu J, Counts SE, Mufson EJ. Down regulation of trk but not p75NTR gene expression in single cholinergic basal forebrain neurons mark the progression of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2006; 97(2):475-87.
- Giuliani N, Sansoni P, Girasole G, Vescovini R, Passeri G, Passeri M, Pedrazzoni M. Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130 exhibit different patterns of age- and menopause-related changes. *Exp Gerontol.* 2001; 36(3):547-57.
- Glabe CG. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol Aging.* 2006; 27(4):570-5.
- Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 1984; 2(6):357-69.
- Gloaguen I, Costa P, Demartis A, Lazzaro D, Di Marco A, Graziani R, Paonessa G, Chen F, Rosenblum CI, Van der Ploeg LH, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(12):6456-61.
- Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharf M, Thoenen H. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature.* 1994; 372(6503):266-9.
- Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH. Intraneuronal Aβ accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2005; 26(9):1235-44.
- Gralle M, Oliveira CL, Guerreiro LH, McKinstry WJ, Galatis D, Masters CL, Cappai R, Parker MW, Ramos CH, Torriani I, Ferreira ST. Solution conformation and heparin-induced dimerization of the full-length extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *J Mol Biol.* 2006; 357(2):493-508.
- Gravina SA, Ho L, Eckman CB, Long KE, Otvos L Jr, Younkin LH, Suzuki N, Younkin SG. Amyloid beta protein (Aβ) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at Aβ 40 or Aβ 42(43). *J Biol Chem.* 1995; 270(13):7013-6.
- Grünblatt E, Hupp E, Bambula M, Zehetmayer S, Jungwirth S, Tragl KH, Fischer P, Riederer P. Association study of BDNF and CNTF polymorphism to depression in non-demented subjects of the "VITA" study. *J Affect Disord.* 2006; 96(1-2):111-6.
- Grünblatt E, Zehetmayer S, Bartl J, Löffler C, Wichart I, Rainer MK, Jungwirth S, Bauer P, Danielczyk W, Tragl KH, Riederer P, Fischer P. Genetic risk factors and markers for Alzheimer's disease and/or depression in the VITA study. *J Psychiatr Res.* 2009; 43(3):298-308.

Guillet C, Auguste P, Mayo W, Kreher P, Gascan H. Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *J Neurosci.* 1999; 19(4):1257-62.

Guo GG, Patel K, Kumar V, Shah M, Fried VA, Etlinger JD, Sehgal PB. Association of the chaperone glucose-regulated protein 58 (GRP58/ER-60/ERp57) with Stat3 in cytosol and plasma membrane complexes. *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22(5):555-63.

Gupta VB, Laws SM, Villemagne VL, Ames D, Bush AI, Ellis KA, Lui JK, Masters C, Rowe CC, Szeoke C, Taddei K, Martins RN; AIBL Research Group. Plasma apolipoprotein E and Alzheimer disease risk: the AIBL study of aging. *Neurology.* 2011; 76(12):1091-8.

Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR, Ihle JN, Kerr IM. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J.* 1995; 14(7):1421-9.

H

Haan C, Heinrich PC, Behrmann I. Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation. *Biochem J.* 2002; 361(Pt 1):105-11.

Haan C, Hermanns HM, Heinrich PC, Behrmann I. A single amino acid substitution (Trp(666)-->Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction. *Biochem J.* 2000; 349(Pt 1):261-6.

Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72(11):1538-46.

Haapasalo A, Sipola I, Larsson K, Akerman KE, Stoilov P, Stamm S, Wong G, Castren E. Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *J Biol Chem.* 2002; 277(45):43160-7.

Haas CA, Hofmann HD, Kirsch M. Expression of CNTF/LIF-receptor components and activation of STAT3 signaling in axotomized facial motoneurons: evidence for a sequential postlesional function of the cytokines. *J Neurobiol.* 1999; 41(4):559-71.

Haas SJ, Ahrens A, Petrov S, Schmitt O, Wree A. Quinolinic acid lesions of the caudate putamen in the rat lead to a local increase of ciliary neurotrophic factor. *J Anat.* 2004; 204(4):271-81.

Haase G, Pettmann B, Bordet T, Villa P, Vigne E, Schmalbruch H, Kahn A. Therapeutic benefit of ciliary neurotrophic factor in progressive motor neuronopathy depends on the route of delivery. *Ann Neurol.* 1999; 45(3):296-304.

Haddad JJ. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 297(4):700-13.

- Hafidi A, Decourt B, MacLennan AJ. CNTFRalpha and CNTF expressions in the auditory brainstem: light and electron microscopy study. *Hear Res.* 2004; 194(1-2):14-24.
- Hallböök F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol.* 1999; 9(5):616-21.
- Hammacher A, Richardson RT, Layton JE, Smith DK, Angus LJ, Hilton DJ, Nicola NA, Wijdenes J, Simpson RJ. The immunoglobulin-like module of gp130 is required for signaling by interleukin-6, but not by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem.* 1998; 273(35):22701-7.
- Hammacher A, Wijdenes J, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Layton JE. Ligand-specific utilization of the extracellular membrane-proximal region of the gp130-related signalling receptors. *Biochem J.* 2000; 345 Pt 1:25-32.
- Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, Stomski FC, Dottore M, Powell J, Ramshaw H, Woodcock JM, Xu Y, Guthridge M, McKinstry WJ, Lopez AF, Parker MW. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell.* 2008; 134(3):496-507.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002; 297(5580):353-6.
- Hardy J. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. *J Alzheimers Dis.* 2006; 9(3 Suppl):151-3.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992; 256(5054):184-5.
- Hashimoto Y, Kurita M, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130. *Mol Biol Cell.* 2009; 20(12):2864-73.
- Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Sudo H, Hata M, Arakawa E, Abe Y, Kita Y, Nishimoto I. Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J Neurosci.* 2001b; 21(23):9235-45.
- Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Doyu M, Sobue G, Koide T, Tsuji S, Lang J, Kurokawa K, Nishimoto I. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001a; 98(11):6336-41.
- Hashimoto Y, Suzuki H, Aiso S, Niikura T, Nishimoto I, Matsuoka M. Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in Humanin-mediated neuroprotection. *Life Sci.* 2005; 77(24):3092-104.
- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34(Pt 5):647-62.
- He P, Zhong Z, Lindholm K, Berning L, Lee W, Lemere C, Staufenbiel M, Li R, Shen Y. Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J Cell Biol.* 2007; 178(5):829-41.

- He W, Gong K, Smith DK, Ip NY. The N-terminal cytokine binding domain of LIFR is required for CNTF binding and signaling. *FEBS Lett.* 2005; 579(20):4317-23.
- He W, Gong K, Zhu G, Smith DK, Ip NY. Membrane distal cytokine binding domain of LIFR interacts with soluble CNTFR in vitro. *FEBS Lett.* 2002; 514(2-3):214-8.
- Heacock AM, Schonfeld AR, Katzman R. Hippocampal neurotrophic factor: characterization and response to denervation. *Brain Res.* 1986; 363(2):299-306.
- Heerssen HM, Pazyra MF, Segal RA. Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nat Neurosci.* 2004; 7(6):596-604
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003; 374(Pt 1):1-20.
- Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry.* 2007; 12(7):656-70.
- Hellweg R, Gericke CA, Jendroska K, Hartung HD, Cervós-Navarro J. NGF content in the cerebral cortex of non-demented patients with amyloid-plaques and in symptomatic Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci.* 1998; 16(7-8):787-94.
- Helmer C, Pérès K, Letenneur L, Guttiérrez-Robledo LM, Ramarosan H, Barberger-Gateau P, Fabrigoule C, Orgogozo JM, Dartigues JF. Dementia in subjects aged 75 years or over within the PAQUID cohort: prevalence and burden by severity. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2006; 22(1):87-94.
- Hendry L, John S. Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *Eur J Biochem.* 2004; 271(23-24):4613-20.
- Hermanns HM, Radtke S, Haan C, Schmitz-Van de Leur H, Tavernier J, Heinrich PC, Behrmann I. Contributions of leukemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with glycoprotein 130. *J Immunol.* 1999; 163(12):6651-8.
- Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J. GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol.* 2010; 223(2):322-5.
- Herx LM, Rivest S, Yong VW. Central nervous system-initiated inflammation and neurotrophism in trauma: IL-1 beta is required for the production of ciliary neurotrophic factor. *J Immunol.* 2000; 165(4):2232-9.
- Heude B, Ducimetière P, Berr C; EVA Study. Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes--The EVA Study. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77(4):803-8.
- Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell.* 1990; 63(6):1149-57.**

- Hirakura Y, Lin MC, Kagan BL. Alzheimer amyloid abeta1-42 channels: effects of solvent, pH, and Congo Red. *J Neurosci Res.* 1999; 57(4):458-66.
- Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997; 8(4):241-52.
- Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(11):4862-6.
- Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol.* 2000; 57(6):846-51.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 1990; 9(8):2459-64.
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emlet DR, Dieterich R, Wong AJ. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(23):12419-24.
- Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnstock M. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000; 76(2):347-54.
- Holtmann B, Wiese S, Samsam M, Grohmann K, Pennica D, Martini R, Sendtner M. Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function. *J Neurosci.* 2005; 25(7):1778-87.
- Honea RA, Swerdlow RH, Vidoni ED, Burns JM. Progressive regional atrophy in normal adults with a maternal history of Alzheimer disease. *Neurology.* 2011; 76(9):822-9.
- Honea RA, Swerdlow RH, Vidoni ED, Goodwin J, Burns JM. Reduced gray matter volume in normal adults with a maternal family history of Alzheimer disease. *Neurology.* 2010; 74(2):113-20.
- Horsten U, Schmitz-Van de Leur H, Müllberg J, Heinrich PC, Rose-John S. The membrane distal half of gp130 is responsible for the formation of a ternary complex with IL-6 and the IL-6 receptor. *FEBS Lett.* 1995; 360(1):43-6.
- Horvat A, Schwaiger F, Hager G, Brocker F, Streif R, Knyazev P, Ullrich A, Kreutzberg GW. A novel role for protein tyrosine phosphatase shp1 in controlling glial activation in the normal and injured nervous system. *J Neurosci.* 2001; 21(3):865-74.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996; 274(5284):99-102.

Hu XY, Zhang HY, Qin S, Xu H, Swaab DF, Zhou JN. Increased p75(NTR) expression in hippocampal neurons containing hyperphosphorylated tau in Alzheimer patients. *Exp Neurol.* 2002; 178(1):104-11.

Hu Y, Leaver SG, Plant GW, Hendriks WT, Niclou SP, Verhaagen J, Harvey AR, Cui Q. Lentiviral-mediated transfer of CNTF to schwann cells within reconstructed peripheral nerve grafts enhances adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Mol Ther.* 2005; 11(6):906-15

Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M. Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature.* 1988; 335(6185):70-3.

Huising MO, Kruiswijk CP, Flik G. Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. *J Endocrinol.* 2006; 189(1):1-25.

Hunt NC, Smith AM, Gbureck U, Shelton RM, Grover LM. Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. *Acta Biomater.* 2010; 6(9):3649-56.

I

Iachini I, Iavarone A, Senese VP, Ruotolo F, Ruggiero G. Visuospatial memory in healthy elderly, AD and MCI: a review. *Curr Aging Sci.* 2009; 2(1):43-59.

Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Elevated cerebrospinal fluid level of ciliary neurotrophic factor in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neurol Sci.* 2000; 177(2):146-9.

Ikezu T, Trapp BD, Song KS, Schlegel A, Lisanti MP, Okamoto T. Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 1998; 273(17):10485-95.

Iłzecka J. Increased serum CNTF level in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Cytokine Netw.* 2003; 14(3):192-4.

Imbimbo BP, Giardina GA. γ -secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Curr Top Med Chem.* 2011; 11(12):1555-70.

Inoue M, Nakayama C, Kikuchi K, Kimura T, Ishige Y, Ito A, Kanaoka M, Noguchi H. D1 cap region involved in the receptor recognition and neural cell survival activity of human ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(19):8579-83.

Inoue M, Nakayama C, Noguchi H. Activating mechanism of CNTF and related cytokines. *Mol Neurobiol.* 1996; 12(3):195-209.

Ip NY, Yancopoulos GD. Neurotrophic factors and their receptors. *Ann Neurol.* 1994; 35 Suppl:S13-6.

- Ip NY, Yancopoulos GD. The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 1996; 19:491-515.
- Ip NY. The neurotrophins and neurotrophic cytokines: two families of growth factors acting on neural and hematopoietic cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 840:97-106.
- Isaacson LG, Crutcher KA. Uninjured aged sympathetic neurons sprout in response to exogenous NGF in vivo. *Neurobiol Aging.* 1998; 19(4):333-9.
- Isaacson LG, Saffran BN, Crutcher KA. Intracerebral NGF infusion induces hyperinnervation of cerebral blood vessels *Neurobiol Aging.* 1990; 11(1):51-5.
- Ito Y, Yamamoto M, Mitsuma N, Li M, Hattori N, Sobue G. Expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha, and gp130) in human peripheral neuropathies. *Neurochem Res.* 2001; 26(1):51-8.
- Ivins KJ, Thornton PL, Rohn TT, Cotman CW. Neuronal apoptosis induced by beta-amyloid is mediated by caspase-8. *Neurobiol Dis.* 1999; 6(5):440-9.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron.* 1994; 13(1):45-53.

J

- Jayadev S, Leverenz JB, Steinbart E, Stahl J, Klunk W, Yu CE, Bird TD. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain.* 2010; 133(Pt 4):1143-54.
- Ji Y, Permanne B, Sigurdsson EM, Holtzman DM, Wisniewski T. Amyloid beta40/42 clearance across the blood-brain barrier following intra-ventricular injections in wild-type, apoE knock-out and human apoE3 or E4 expressing transgenic mice. *J Alzheimers Dis.* 2001; 3(1):23-30.
- Jiao J, Kaur N, Lu B, Reeves SA, Halvorsen SW. Initiation and maintenance of CNTF-Jak/STAT signaling in neurons is blocked by protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003; 116(1-2):135-46.
- Jones PB, Adams KW, Rozkalne A, Spires-Jones TL, Hshieh TT, Hashimoto T, von Armin CA, Mielke M, Bacskai BJ, Hyman BT. Apolipoprotein E: isoform specific differences in tertiary structure and interaction with amyloid- β in human Alzheimer brain. *PLoS One.* 2011; 6(1):e14586.
- Jourdi H, Iwakura Y, Narisawa-Saito M, Ibaraki K, Xiong H, Watanabe M, Hayashi Y, Takei N, Nawa H. Brain-derived neurotrophic factor signal enhances and maintains the expression of AMPA receptor-associated PDZ proteins in developing cortical neurons. *Dev Biol.* 2003; 263(2):216-30.

K

- Kaden D, Munter LM, Joshi M, Treiber C, Weise C, Bethge T, Voigt P, Schaefer M, Beyermann M, Reif B, Multhaup G. Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP. *J Biol Chem.* 2008; 283(11):7271-9
- Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature.* 1999; 401(6756):918-21.
- Kagan BL, Azimov R, Azimova R. Amyloid peptide channels. *J Membr Biol.* 2004; 202(1):1-10.
- Kahn MA, Huang CJ, Caruso A, Barresi V, Nazarian R, Condorelli DF, de Vellis J. Ciliary neurotrophic factor activates JAK/Stat signal transduction cascade and induces transcriptional expression of glial fibrillary acidic protein in glial cells. *J Neurochem.* 1997; 68(4):1413-23.
- Kalish H, Phillips TM. Analysis of neurotrophins in human serum by immunoaffinity capillary electrophoresis (ICE) following traumatic head injury. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878(2):194-200.
- Kamiguchi H, Yoshida K, Sagoh M, Sasaki H, Inaba M, Wakamoto H, Otani M, Toya S. Release of ciliary neurotrophic factor from cultured astrocytes and its modulation by cytokines. *Neurochem Res.* 1995; 20(10):1187-93.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 1987; 325(6106):733-6.
- Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature.* 1991; 350(6314):158-60.
- Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2000; 10(3):381-91.
- Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol.* 1988; 23(2):138-44.
- Kaur N, Lu B, Monroe RK, Ward SM, Halvorsen SW. Inducers of oxidative stress block ciliary neurotrophic factor activation of Jak/STAT signaling in neurons. *J Neurochem.* 2005; 92(6):1521-30.
- Kaur N, Wohlhueter AL, Halvorsen SW. Activation and inactivation of signal transducers and activators of transcription by ciliary neurotrophic factor in neuroblastoma cells. *Cell Signal.* 2002; 14(5):419-29.

- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001; 21(2):372-81.
- Kelleher MO, Myles LM, Al-Abri RK, Glasby MA. The use of ciliary neurotrophic factor to promote recovery after peripheral nerve injury by delivering it at the site of the cell body. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006; 148(1):55-60; discussion 60-1.
- Kernebeck T, Pflanz S, Müller-Newen G, Kurapkat G, Scheek RM, Dijkstra K, Heinrich PC, Wollmer A, Grzesiek S, Grötzinger J. The signal transducer gp130: solution structure of the carboxy-terminal domain of the cytokine receptor homology region. *Protein Sci*. 1999; 8(1):5-12.
- Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*. 1963; 197:192-3.
- Kim H, Baumann H. Transmembrane domain of gp130 contributes to intracellular signal transduction in hepatic cells. *J Biol Chem*. 1997; 272(49):30741-7.
- Kim HJ, Chae SC, Lee DK, Chromy B, Lee SC, Park YC, Klein WL, Krafft GA, Hong ST. Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein. *FASEB J*. 2003; 17(1):118-20.
- Kim YT, Hitchcock R, Broadhead KW, Messina DJ, Tresco PA. A cell encapsulation device for studying soluble factor release from cells transplanted in the rat brain. *J Control Release*. 2005; 102(1):101-11.
- King A, Sandler S, Andersson A. The effect of host factors and capsule composition on the cellular overgrowth on implanted alginate capsules. *J Biomed Mater Res*. 2001; 57(3):374-83.
- King A, Strand B, Rokstad AM, Kulseng B, Andersson A, Skjåk-Braek G, Sandler S. Improvement of the biocompatibility of alginate/poly-L-lysine/alginate microcapsules by the use of epimerized alginate as a coating. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 64(3):533-9.
- Kirsch M, Terheggen U, Hofmann HD. Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons. *Mol Cell Neurosci*. 2003; 24(1):130-8.
- Kishima H, Poyot T, Bloch J, Dagueet J, Condé F, Dollé F, Hinnen F, Pralong W, Palfi S, Déglon N, Aebischer P, Hantraye P. Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: a pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons. *Neurobiol Dis*. 2004; 16(2):428-39.
- Knowles JK, Rajadas J, Nguyen TV, Yang T, LeMieux MC, Vander Griend L, Ishikawa C, Massa SM, Wyss-Coray T, Longo FM. The p75 neurotrophin receptor promotes amyloid-beta(1-42)-induced neuritic dystrophy in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2009; 29(34):10627-37.
- Kobayashi H, Mizisin AP. CNTFR alpha alone or in combination with CNTF promotes macrophage chemotaxis in vitro. *Neuropeptides*. 2000; 34(6):338-47.**
- Kohara K, Kitamura A, Morishima M, Tsumoto T. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science*. 2001; 291(5512):2419-23.

- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science*. 2005; 310(5748):679-83.
- Koo EH, Squazzo SL. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*. 1994; 269(26):17386-9.
- Kordower JH, Charles V, Bayer R, Bartus RT, Putney S, Walus LR, Friden PM. Intravenous administration of a transferrin receptor antibody-nerve growth factor conjugate prevents the degeneration of cholinergic striatal neurons in a model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994a; 91(19):9077-80.
- Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Olanow CW, Freeman TB. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Mov Disord*. 2008; 23(16):2303-6.
- Kordower JH, Isacson O, Emerich DF. Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible? *Exp Neurol*. 1999a; 159(1):4-20.
- Kordower JH, Mufson EJ, Fox N, Martel L, Emerich DF. Cellular delivery of NGF does not alter the expression of beta-amyloid immunoreactivity in young or aged nonhuman primates. *Exp Neurol*. 1997a; 145(2 Pt 1):586-91.
- Kordower JH, Palfi S, Chen EY, Ma SY, Sendera T, Cochran EJ, Cochran EJ, Mufson EJ, Penn R, Goetz CG, Comella CD. Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1999b; 46(3):419-24.
- Kordower JH, Winn SR, Liu YT, Mufson EJ, Sladek JR Jr, Hammang JP, Baetge EE, Emerich DF. The aged monkey basal forebrain: rescue and sprouting of axotomized basal forebrain neurons after grafts of encapsulated cells secreting human nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994b; 91(23):10898-902.
- Kordower JH, Yaping-Chu, Maclennan AJ. Ciliary neurotrophic factor receptor alpha-immunoreactivity in the monkey central nervous system. *J Comp Neurol*. 1997b; 377(3):365-80.
- Korte M, Staiger V, Griesbeck O, Thoenen H, Bonhoeffer T. The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments. *J Physiol Paris*. 1996; 90(3-4):157-64.
- Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(16):7247-51.
- Koyama R, Yamada MK, Fujisawa S, Katoh-Semba R, Matsuki N, Ikegaya Y. Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *J Neurosci*. 2004; 24(33):7215-24.

Krady JK, Lin HW, Liberto CM, Basu A, Kremlev SG, Levison SW. Ciliary neurotrophic factor and interleukin-6 differentially activate microglia. *J Neurosci Res.* 2008; 86(7):1538-47.

Krause CD, Pestka S. Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. *Pharmacol Ther.* 2005; 106(3):299-346.

Krause DL, Müller N. Neuroinflammation, microglia and implications for anti-inflammatory treatment in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2010; 2010. pii: 732806.

Kriem B, Spone I, Fifre A, Malaplate-Armand C, Lozac'h-Pillot K, Koziel V, Yen-Potin FT, Bihain B, Oster T, Olivier JL, Pillot T. Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide. *FASEB J.* 2005; 19(1):85-7.

Krishnaswamy S, Verdile G, Groth D, Kanyenda L, Martins RN. The structure and function of Alzheimer's gamma secretase enzyme complex. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009; 46(5-6):282-301

Kuijlen JM, de Haan BJ, Helfrich W, de Boer JF, Samplonius D, Mooij JJ, de Vos P. The efficacy of alginate encapsulated CHO-K1 single chain-TRAIL producer cells in the treatment of brain tumors. *J Neurooncol.* 2006; 78(1):31-9.

Kulseng B, Skjåk-Braek G, Ryan L, Andersson A, King A, Faxvaag A, Espevik T. Transplantation of alginate microcapsules: generation of antibodies against alginates and encapsulated porcine islet-like cell clusters. *Transplantation.* 1999; 67(7):978-84.

Kurth I, Horsten U, Pflanz S, Timmermann A, Küster A, Dahmen H, Tacke I, Heinrich PC, Müller-Newen G. Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. *J Immunol.* 2000; 164(1):273-82.

L

Laaksovirta H, Soynila S, Hukkanen V, Røyttä M, Soilu-Hänninen M. Serum level of CNTF is elevated in patients with amyotrophic lateral sclerosis and correlates with site of disease onset. *Eur J Neurol.* 2008; 15(4):355-9.

Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci.* 2004; 24(45):10191-200.

Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL. 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):796-807.

Lai KO, Fu WY, Ip FC, Ip NY. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci.* 1998; 11(1-2):64-76.

- Lam A, Fuller F, Miller J, Kloss J, Manthorpe M, Varon S, Cordell B. Sequence and structural organization of the human gene encoding ciliary neurotrophic factor. *Gene*. 1991; 102(2):271-6.
- 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. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(11):6448-53.
- Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hijarunguru A, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(8):4652-7.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(7):3922-7.
- Larsen JV, Hansen M, Møller B, Madsen P, Scheller J, Nielsen M, Petersen CM. Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Mol Cell Biol*. 2010; 30(17):4175-87.
- Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Maetzler W, Wittorf A, Soekadar S, Richartz E, Koehler N, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *J Psychiatr Res*. 2007; 41(5):387-94.
- Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Wittorf A, Richartz E, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2006; 113(9):1217-24.
- Laumet G, Chouraki V, Grenier-Boley B, Legry V, Heath S, Zelenika D, Fievet N, Hannequin D, Delepine M, Pasquier F, Hanon O, Brice A, Epelbaum J, Berr C, Dartigues JF, Tzourio C, Campion D, Lathrop M, Bertram L, Amouyel P, Lambert JC. Systematic analysis of candidate genes for Alzheimer's disease in a French, genome-wide association study. *J Alzheimers Dis*. 2010; 20(4):1181-8.
- Launer LJ. The epidemiologic study of dementia: a life-long quest? *Neurobiol Aging*. 2005; 26(3):335-40.
- Lavezzari G, McCallum J, Lee R, Roche KW. Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology*. 2003; 45(6):729-37.
- Leaman DW, Leung S, Li X, Stark GR. Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *FASEB J*. 1996; 10(14):1578-88.

- Ledesma MD, Da Silva JS, Crassaerts K, Delacourte A, De Strooper B, Dotti CG. Brain plasmin enhances APP alpha-cleavage and Abeta degradation and is reduced in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep.* 2000; 1(6):530-5.
- Ledesma MD, Dotti CG. The conflicting role of brain cholesterol in Alzheimer's disease: lessons from the brain plasminogen system. *Biochem Soc Symp.* 2005; (72):129-38.
- Lee DA, Zurawel RH, Windebank AJ. Ciliary neurotrophic factor expression in Schwann cells is induced by axonal contact. *J Neurochem.* 1995; 65(2):564-8.
- Lee J, Fukumoto H, Orne J, Klucken J, Raju S, Vanderburg CR, Irizarry MC, Hyman BT, Ingelsson M. Decreased levels of BDNF protein in Alzheimer temporal cortex are independent of BDNF polymorphisms. *Exp Neurol.* 2005; 194(1):91-6.
- Lee MS, Kao SC, Lemere CA, Xia W, Tseng HC, Zhou Y, Neve R, Ahlijanian MK, Tsai LH. APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J Cell Biol.* 2003; 163(1):83-95.
- Lee MY, Deller T, Kirsch M, Frotscher M, Hofmann HD. Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion. *J Neurosci.* 1997b; 17(3):1137-46.
- Lee MY, Hofmann HD, Kirsch M. Expression of ciliary neurotrophic factor receptor-alpha messenger RNA in neonatal and adult rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience.* 1997a; 77(1):233-46.
- Lee N, Robitz R, Zurbrugg RJ, Karpman AM, Mahler AM, Cronier SA, Vesey R, Spearry RP, Zolotukhin S, MacLennan AJ. Conditional, genetic disruption of ciliary neurotrophic factor receptors reveals a role in adult motor neuron survival. *Eur J Neurosci.* 2008; 27(11):2830-7. Erratum in: *Eur J Neurosci.* 2008; 28(1):238.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001; 294(5548):1945-8.
- Lee TI, Yang CS, Fang KM, Tzeng SF. Role of ciliary neurotrophic factor in microglial phagocytosis. *Neurochem Res.* 2009; 34(1):109-17.
- Lelièvre E, Plun-Favreau H, Chevalier S, Froger J, Guillet C, Elson GC, Gauchat JF, Gascan H. Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem.* 2001; 276(25):22476-84.
- Letenneur L, Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. Education and the risk for Alzheimer's disease: sex makes a difference. EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group. *Am J Epidemiol.* 2000; 151(11):1064-71

- Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Essential role of the nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells in vitro. *Dev Biol.* 1963; 7:653-9.
- Levi-Montalcini R. Growth control of nerve cells by a protein factor and its antiserum: discovery of this factor may provide new leads to understanding of some neurogenetic processes. *Science.* 1964; 143:105-10.
- Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(17):10235-9.
- Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR. Selective role for trkB neurotrophin receptors in rapid modulation of hippocampal synaptic transmission. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996; 38(2):300-3.
- Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(9):651-62.
- Leßmann V, Gottmann K, Heumann R. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport.* 1994; 6(1):21-5.
- Leßmann V. Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen Pharmacol.* 1998; 31(5):667-74.
- Li G, Peskind ER, Millard SP, Chi P, Sokal I, Yu CE, Bekris LM, Raskind MA, Galasko DR, Montine TJ. Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. *PLoS One.* 2009; 4(5):e5424.
- Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci.* 2011; 31(18):6627-38.
- Li W, Nishimura R, Kashishian A, Batzer AG, Kim WJ, Cooper JA, Schlessinger J. A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 1994; 14(1):509-17.
- Lin LF, Mismar D, Lile JD, Armes LG, Butler ET 3rd, Vannice JL, Collins F. Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science.* 1989; 246(4933):1023-5.
- Lin SY, Wu K, Levine ES, Mount HT, Suen PC, Black IB. BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998; 55(1):20-7.
- Lindberg RA, Juan TS, Welcher AA, Sun Y, Cupples R, Guthrie B, Fletcher FA. Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(6):3357-67.

- Lindner MD, Emerich DF. Therapeutic potential of a polymer-encapsulated L-DOPA and dopamine-producing cell line in rodent and primate models of Parkinson's disease. *Cell Transplant.* 1998; 7(2):165-74
- Lindner MD, Winn SR, Baetge EE, Hammang JP, Gentile FT, Doherty E, McDermott PE, Frydel B, Ullman MD, Schallert T, et al. Implantation of encapsulated catecholamine and GDNF-producing cells in rats with unilateral dopamine depletions and parkinsonian symptoms. *Exp Neurol.* 1995; 132(1):62-76.
- Linker RA, Mäurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med.* 2002; 8(6):620-4.
- Liu H, Fenollar-Ferrer C, Cao A, Anselmi C, Carloni P, Liu J. Molecular dissection of human oncostatin M-mediated signal transductions through site-directed mutagenesis. *Int J Mol Med.* 2009; 23(2):161-72.
- Liu K, Lu Y, Lee JK, Samara R, Willenberg R, Sears-Kraxberger I, Tedeschi A, Park KK, Jin D, Cai B, Xu B, Connolly L, Steward O, Zheng B, He Z. PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. *Nat Neurosci.* 2010; 13(9):1075-81.
- Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA, Greene WC. Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differentially regulated by tyrosine phosphorylation. *Curr Biol.* 1997; 7(11):817-26.
- Löhr M, Hoffmeyer A, Kröger J, Freund M, Hain J, Holle A, Karle P, Knöfel WT, Liebe S, Müller P, Nizze H, Renner M, Saller RM, Wagner T, Hauenstein K, Günzburg WH, Salmons B. Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma. *Lancet.* 2001; 357(9268):1591-2.
- Loiola EC, Ventura AL. Release of ATP from avian Müller glia cells in culture. *Neurochem Int.* 2011; 58(3):414-22.
- Longo FM, Massa SM. Neurotrophin receptor-based strategies for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2005; 2(2):167-9.
- Louhivuori V, Vicario A, Uutela M, Rantamäki T, Louhivuori LM, Castrén E, Tongiorgi E, Akerman KE, Castrén ML. BDNF and TrkB in neuronal differentiation of Fmr1-knockout mouse. *Neurobiol Dis.* 2011; 41(2):469-80.
- Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 1998; ; 158(1):47-52.
- Lu X, Hagg T. Glial cell line-derived neurotrophic factor prevents death, but not reductions in tyrosine hydroxylase, of injured nigrostriatal neurons in adult rats. *J Comp Neurol.* 1997; 388(3):484-94.
- Luchsinger JA, Gustafson DR. Adiposity, type 2 diabetes, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009; 16(4):693-704.

Luciano F, Zhai D, Zhu X, Bailly-Maitre B, Ricci JE, Satterthwait AC, Reed JC. Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL. *J Biol Chem.* 2005; 280(16):15825-35.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1999; 155(3):853-62.

Luo L. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002; 18:601-35.

M

Maat-Schieman ML, Yamaguchi H, Hegeman-Kleinn IM, Welling-Graafland C, Natté R, Roos RA, van Duinen SG. Glial reactions and the clearance of amyloid beta protein in the brains of patients with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. *Acta Neuropathol.* 2004; 107(5):389-98.

Macdonald NJ, Perez-Polo JR, Bennett AD, Tagliatela G. NGF-resistant PC12 cell death induced by arachidonic acid is accompanied by a decrease of active PKC zeta and nuclear factor kappa B. *J Neurosci Res.* 1999; 57(2):219-26

MacEwan DJ. Elevated cPLA2 levels as a mechanism by which the p70 TNF and p75 NGF receptors enhance apoptosis. *FEBS Lett.* 1996; 379(1):77-81.

MacLennan AJ, Vinson EN, Marks L, McLaurin DL, Pfeifer M, Lee N. Immunohistochemical localization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha expression in the rat nervous system. *J Neurosci.* 1996; 16(2):621-30.

Mahoney MJ, Saltzman WM. Millimeter-scale positioning of a nerve-growth-factor source and biological activity in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(8):4536-9.

Mai L, Jope RS, Li X. BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents. *J Neurochem.* 2002; 82(1):75-83.

Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron.* 1990; 5(4):501-9.

Malaplate-Armand C, Florent-Bécharde S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier JL, Oster T, Pillot T. Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol Dis.* 2006; 23(1):178-89.

Man D, He W, Sze KH, Gong K, Smith DK, Zhu G, Ip NY. Solution structure of the C-terminal domain of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) receptor and ligand free associations among components of the CNTF receptor complex. *J Biol Chem.* 2003; 278(26):23285-94.

- Mandel RJ. CERE-110, an adeno-associated virus-based gene delivery vector expressing human nerve growth factor for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Opin Mol Ther.* 2010; 12(2):240-7.
- Manthorpe M, Adler R, Varon S. Cholinergic neuronotrophic factors. VI. Age-dependent requirements by chick embryo ciliary ganglionic neurons *Dev Biol.* 1981; 85(1):156-63.
- Manthorpe M, Skaper S, Adler R, Landa K, Varon S. Cholinergic neuronotrophic factors: fractionation properties of an extract from selected chick embryonic eye tissues. *J Neurochem.* 1980; 34(1):69-75.
- Marcello E, Epis R, Di Luca M. Amyloid flirting with synaptic failure: towards a comprehensive view of Alzheimer's disease pathogenesis. *Eur J Pharmacol.* 2008; 585(1):109-18.
- Markowska AL, Koliatsos VE, Breckler SJ, Price DL, Olton DS. Human nerve growth factor improves spatial memory in aged but not in young rats. *J Neurosci.* 1994; 14(8):4815-24.
- Markus A, Patel TD, Snider WD. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol.* 2002; 12(5):523-31.
- Martinsen A, Storrø I, Skjærk-Braek G. Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. *Biotechnol Bioeng.* 1992; 39(2):186-94.
- Marvanová M, Lakso M, Pirhonen J, Nawa H, Wong G, Castrén E. The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Mol Cell Neurosci.* 2001; 18(3):247-58.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW Jr, Morris JC. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology.* 2001; 56(1):127-9.
- Massa SM, Xie Y, Yang T, Harrington AW, Kim ML, Yoon SO, Kraemer R, Moore LA, Hempstead BL, Longo FM. Small, nonpeptide p75NTR ligands induce survival signaling and inhibit proNGF-induced death. *J Neurosci.* 2006; 26(20):5288-300.
- Massaro AR, Soranzo C, Carnevale A. Cerebrospinal-fluid ciliary neurotrophic factor in neurological patients. *Eur Neurol.* 1997; 37(4):243-6.
- Massart F, Reginster JY, Brandi ML. Genetics of menopause-associated diseases. *Maturitas.* 2001; 40(2):103-16.
- Massey PV, Johnson BE, Moulton PR, Auberson YP, Brown MW, Molnar E, Collingridge GL, Bashir ZI. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci.* 2004; 24(36):7821-8.
- Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature.* 1993; 365(6441):27-32.

- Matrone C, Di Luzio A, Meli G, D'Aguanno S, Severini C, Ciotti MT, Cattaneo A, Calissano P. Activation of the amyloidogenic route by NGF deprivation induces apoptotic death in PC12 cells. *J Alzheimers Dis.* 2008; 13(1):81-96.
- Matsuda T, Feng J, Witthuhn BA, Sekine Y, Ihle JN. Determination of the transphosphorylation sites of Jak2 kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 325(2):586-94.
- Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, Ramasamy K, Kowa H, Frosch MP, Irizarry MC, Hyman BT. Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2007; 1161:116-23
- Mattson MP. Lose weight STAT: CNTF tops leptin. *Trends Neurosci.* 2001; 24(6):313-4.
- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004; 430(7000):631-9
- Mayer M, Bhakoo K, Noble M. Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro. *Development.* 1994; 120(1):143-53.
- McCauslin CS, Heath V, Colangelo AM, Malik R, Lee S, Mallei A, Mocchetti I, Johnson PF. CAAT/enhancer-binding protein delta and cAMP-response element-binding protein mediate inducible expression of the nerve growth factor gene in the central nervous system. *J Biol Chem.* 2006; 281(26):17681-8.
- McDonald MP, Overmier JB, Bandyopadhyay S, Babcock D, Cleary J. Reversal of beta-amyloid-induced retention deficit after exposure to training and state cues. *Neurobiol Learn Mem.* 1996; 65(1):35-47.
- McDonald NQ, Panayotatos N, Hendrickson WA. Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing. *EMBO J.* 1995; 14(12):2689-99.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1999; 46(6):860-6.
- Miller RG, Bryan WW, Dietz MA, Munsat TL, Petajan JH, Smith SA, Goodpasture JC. Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 1996; 47(5):1329-31.
- Mittoux V, Joseph JM, Conde F, Palfi S, Dautry C, Poyot T, Bloch J, Deglon N, Ouary S, Nimchinsky EA, Brouillet E, Hof PR, Peschanski M, Aebischer P, Hantraye P. Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther.* 2000; 11(8):1177-87.
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reversé D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem.* 1999; 274(10):6483-92.

- Moir RD, Lynch T, Bush AI, Whyte S, Henry A, Portbury S, Multhaup G, Small DH, Tanzi RE, Beyreuther K, Masters CL. Relative increase in Alzheimer's disease of soluble forms of cerebral Abeta amyloid protein precursor containing the Kunitz protease inhibitory domain. *J Biol Chem*. 1998; 273(9):5013-9.
- Monroe RK, Halvorsen SW. Cadmium blocks receptor-mediated Jak/STAT signaling in neurons by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2006; 41(3):493-502.
- Montagner A, Yart A, Dance M, Perret B, Salles JP, Raynal P. A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. *J Biol Chem*. 2005; 280(7):5350-60.
- Montkowski A, Holsboer F. Intact spatial learning and memory in transgenic mice with reduced BDNF. *Neuroreport*. 1997; 8(3):779-82.
- Morgan C, Colombres M, Nuñez MT, Inestrosa NC. Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2004; 74(6):323-49.
- Moritz RL, Hall NE, Connolly LM, Simpson RJ. Determination of the disulfide structure and N-glycosylation sites of the extracellular domain of the human signal transducer gp130. *J Biol Chem*. 2001; 276(11):8244-53.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984; 11(1):47-60.
- Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De Santi S, de Leon MJ. Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging. *J Alzheimers Dis*. 2010b; 20(3):843-54.
- Mosconi L, Berti V, Swerdlow RH, Pupi A, Duara R, de Leon M. Maternal transmission of Alzheimer's disease: prodromal metabolic phenotype and the search for genes. *Hum Genomics*. 2010a; 4(3):170-93
- Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS, Cosman D. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem*. 1996; 271(51):32635-43.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci*. 2000; 20(11):4050-8.
- Mufson EJ, Conner JM, Kordower JH. Nerve growth factor in Alzheimer's disease: defective retrograde transport to nucleus basalis. *Neuroreport*. 1995; 6(7):1063-6.
- Mufson EJ, Ginsberg SD, Ikonovic MD, DeKosky ST. Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *J Chem Neuroanat*. 2003; 26(4):233-42

Mufson EJ, Kroin JS, Sendera TJ, Sobreviela T. Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.* 1999; 57(4):451-84.

Mufson EJ, Wu J, Counts SE, Nykjaer A. Preservation of cortical sortilin protein levels in MCI and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2010; 471(3):129-33.

Mufson EJ, Wu J, Counts SE, Nykjaer A. Preservation of cortical sortilin protein levels in MCI and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2010; 471(3):129-33

Müller A, Hauk TG, Leibinger M, Marienfeld R, Fischer D. Exogenous CNTF stimulates axon regeneration of retinal ganglion cells partially via endogenous CNTF. *Mol Cell Neurosci.* 2009a; 41(2):233-46.

Müller S, Chakrapani BP, Schwegler H, Hofmann HD, Kirsch M. Neurogenesis in the dentate gyrus depends on ciliary neurotrophic factor and signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Stem Cells.* 2009b; 27(2):431-41.

Munter LM, Voigt P, Harmeier A, Kaden D, Gottschalk KE, Weise C, Pipkorn R, Schaefer M, Langosch D, Multhaup G. GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J.* 2007; 26(6):1702-12.

Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T, Kishimoto T. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(24):11349-53

Murer MG, Boissiere F, Yan Q, Hunot S, Villares J, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R. An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 1999; 88(4):1015-32.

N

Nagahara AH, Bernot T, Moseanko R, Brignolo L, Blesch A, Conner JM, Ramirez A, Gasmi M, Tuszynski MH. Long-term reversal of cholinergic neuronal decline in aged non-human primates by lentiviral NGF gene delivery. *Exp Neurol.* 2009b; 215(1):153-9.

Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2009; 15(3):331-7

Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2009a; 15(3):331-7

- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2004; 25(5):663-74.
- Ndubuisi MI, Guo GG, Fried VA, Etlinger JD, Sehgal PB. Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer? *J Biol Chem*. 1999; 274(36):25499-509.
- Needels DL, Nieto-Sampedro M, Whittmore SR, Cotman CW. Neuronotrophic activity for ciliary ganglion neurons. Induction following injury to the brain of neonatal, adult, and aged rats. *Brain Res*. 1985; 350(1-2):275-84.
- Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res*. 1996; 726(1-2):49-56.
- Neet KE, Campenot RB. Receptor binding, internalization, and retrograde transport of neurotrophic factors. *Cell Mol Life Sci*. 2001; 58(8):1021-35.
- Neugart F, Zappe A, Buk DM, Ziegler I, Steinert S, Schumacher M, Schopf E, Bessey R, Wurster K, Tietz C, Börsch M, Wrachtrup J, Graeve L. Detection of ligand-induced CNTF receptor dimers in living cells by fluorescence cross correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1788(9):1890-900.
- Nichol K, Deeny SP, Seif J, Camaclang K, Cotman CW. Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice. *Alzheimers Dement*. 2009; 5(4):287-94.
- Ninomiya H, Roch JM, Sundsmo MP, Otero DA, Saitoh T. Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *J Cell Biol*. 1993; 121(4):879-86.
- Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury. *Curr Opin Neurol*. 2003; 16(6):711-5.
- Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER Jr, Lozano AM, Penn RD, Simpson RK Jr, Stacy M, Wooten GF; ICV GDNF Study Group. Implanted intracerebroventricular. Glial cell line-derived neurotrophic factor. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology*. 2003; 60(1):69-73.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004; 427(6977):843-8.

O

- O'Brien JJ, Nathanson NM. Retrograde activation of STAT3 by leukemia inhibitory factor in sympathetic neurons. *J Neurochem*. 2007; 103(1):288-302.

- O'Bryant SE, Hobson V, Hall JR, Waring SC, Chan W, Massman P, Lacritz L, Cullum CM, Diaz-Arrastia R; Texas Alzheimer's Research Consortium. Brain-derived neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dis*. 2009; 17(2):337-41.
- Ochs G, Penn RD, York M, Giess R, Beck M, Tonn J, Haigh J, Malta E, Traub M, Sendtner M, Toyka KV. A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000; 1(3):201-6.
- Oddo S, Caccamo A, Tran L, Lambert MP, Glabe CG, Klein WL, LaFerla FM. Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. *J Biol Chem*. 2006; 281(3):1599-604.
- Ogilvie JM, Speck JD, Lett JM. Growth factors in combination, but not individually, rescue rd mouse photoreceptors in organ culture. *Exp Neurol*. 2000; 161(2):676-85.
- Ohno M, Kohyama J, Namihira M, Sanosaka T, Takahashi JA, Hashimoto N, Nakashima K. Neuropeptin induces neuroepithelial cells to differentiate into astrocytes via activation of STAT3. *Cytokine*. 2006; 36(1-2):17-22.
- Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2004; 41(1):27-33.
- Olivieri G, Otten U, Meier F, Baysang G, Dimitriadis-Schmutz B, Müller-Spahn F, Savaskan E. Oxidative stress modulates tyrosine kinase receptor A and p75 receptor (low-affinity nerve growth factor receptor) expression in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Neurol Clin Neurophysiol*. 2002; 2002(2):2-10.
- Olofsson K, Lindvall O, Asztély F. Increased synaptic inhibition in dentate gyrus of mice with reduced levels of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*. 2000; 101(3):531-9.
- Onishi A, Peng GH, Chen S, Blackshaw S. Pias3-dependent SUMOylation controls mammalian cone photoreceptor differentiation. *Nat Neurosci*. 2010; 13(9):1059-65.
- Ono S, Imai T, Igarashi A, Shimizu N, Nakagawa H, Hu J. Decrease in the ciliary neurotrophic factor of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Neurol*. 1999; 42(3):163-8.
- Orrell RW, King AW, Lane RJ, de Belleruche JS. Investigation of a null mutation of the CNTF gene in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1995; 132(2):126-8.
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*. 2002; 109 Suppl:S121-31.
- Oster T, Pillot T. Docosahexaenoic acid and synaptic protection in Alzheimer's disease mice. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1801(8):791-8

Ozog MA, Modha G, Church J, Reilly R, Naus CC. Co-administration of ciliary neurotrophic factor with its soluble receptor protects against neuronal death and enhances neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 2008; 283(10):6546-60.

P

Pan W, Kastin AJ, Maness LM, Brennan JM. Saturable entry of ciliary neurotrophic factor into brain. *Neurosci Lett.* 1999; 263(1):69-71.

Panayotatos N, Radziejewska E, Acheson A, Somogyi R, Thadani A, Hendrickson WA, McDonald NQ. Localization of functional receptor epitopes on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved, function-related epitope topography among helical cytokines. *J Biol Chem.* 1995; 270(23):14007-14

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science.* 2004; 306(5695):487-91.

Panza F, Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Torres F, Del Parigi A, Capurso S, Capurso A. Mediterranean diet and cognitive decline. *Public Health Nutr.* 2004; 7(7):959-63.

Papaleo F, Silverman JL, Aney J, Tian Q, Barkan CL, Chadman KK, Crawley JN. Working memory deficits, increased anxiety-like traits, and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. *Learn Mem.* 2011; 18(8):534-44.

Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell.* 1998; 93(3):385-95.

Park SA, Shaked GM, Bredesen DE, Koo EH. Mechanism of cytotoxicity mediated by the C31 fragment of the amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 388(2):450-5.

Pasnick F, Isnard H, Lang T, Chérié-Challine L, Lecomte P. Consultation sur les priorités de veille sanitaire dans le domaine des maladies chroniques et traumatismes. INVS 2002

Patten DA, Germain M, Kelly MA, Slack RS. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20 Suppl 2:S357-67.

Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron.* 1996; 16(6):1137-45.

Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2005; 93(6):1412-21.

- Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2005; 93(6):1412-21.
- Pennica D, Arce V, Swanson TA, Vejsada R, Pollock RA, Armanini M, Dudley K, Phillips HS, Rosenthal A, Kato AC, Henderson CE. Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron*. 1996; 17(1):63-74.
- Pennica D, King KL, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh SM, Darbonne WC, Knutzon DS, Yen R, Chien KR, Baker JB, Wood WI. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995b; 92(4):1142-6.
- Pennica D, Shaw KJ, Swanson TA, Moore MW, Shelton DL, Zioncheck KA, Rosenthal A, Taga T, Paoni NF, Wood WI. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem*. 1995a; 270(18):10915-22.
- Penzen P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2011a; 14(3):285-93..
- Penzen P, Vanleeuwen JE. Impaired regulation of synaptic actin cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*. 2011b ; 67(1-2):184-92.
- Penzen P, Vanleeuwen JE. Impaired regulation of synaptic actin cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*. 2011; 67(1-2):184-92
- Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB, Koo EH. Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem*. 1999; 274(27):18851-6.
- Perez-Cruz C, Nolte MW, van Gaalen MM, Rustay NR, Termont A, Tanghe A, Kirchhoff F, Ebert U. Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011; 31(10):3926-34.
- Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010; 77(1):32-42.
- Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med*. 2004; 256(3):183-94.
- Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*. 1991; 7(5):695-702.
- Pillot T, Drouet B, Queillé S, Labeur C, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Pinçon-Raymond M, Chambaz J. The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J Neurochem*. 1999; 73(4):1626-34.
- Plun-Favreau H, Elson G, Chabbert M, Froger J, deLapeyrière O, Lelièvre E, Guillet C, Hermann J, Gauchat JF, Gascan H, Chevalier S. The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *EMBO J*. 2001; 20(7):1692-703.

- Podlesniy P, Kichev A, Pedraza C, Saurat J, Encinas M, Perez B, Ferrer I, Espinet C. Pro-NGF from Alzheimer's disease and normal human brain displays distinctive abilities to induce processing and nuclear translocation of intracellular domain of p75NTR and apoptosis. *Am J Pathol.* 2006; 169(1):119-31.
- Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996; 36(2):280-6.
- Poëa S, Guyon T, Levasseur P, Berrih-Aknin S. Expression of ciliary neurotrophic factor receptor in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2001; 120(1-2):180-9.
- Polster BM, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem.* 2004; 90(6):1281-9.
- Ponvert CI. Les cytokines. *Rev. fr. Allergol.* 1997; 37(1) :36-55
- Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(1):24-32.
- Poon WW, Blurton-Jones M, Tu CH, Feinberg LM, Chabrier MA, Harris JW, Jeon NL, Cotman CW. β -Amyloid impairs axonal BDNF retrograde trafficking. *Neurobiol Aging.* 2011; 32(5):821-33.
- Port MD, Gibson RM, Nathanson NM. Differential stimulation-induced receptor localization in lipid rafts for interleukin-6 family cytokines signaling through the gp130/leukemia inhibitory factor receptor complex. *J Neurochem.* 2007; 101(3):782-93.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 2004; 113(10):1456-64.
- Pozzo-Miller LD, Gottschalk W, Zhang L, McDermott K, Du J, Gopalakrishnan R, Oho C, Sheng ZH, Lu B. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci.* 1999; 19(12):4972-83.
- Purcell EK, Singh A, Kipke DR. Alginate composition effects on a neural stem cell-seeded scaffold. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009; 15(4):541-50.
- Purnell C, Gao S, Callahan CM, Hendrie HC. Cardiovascular risk factors and incident Alzheimer disease: a systematic review of the literature. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2009; 23(1):1-10.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.* 2008; 28(53):14537-45.

Q

- Qiu C, Winblad B, Fratiglioni L. The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia. *Lancet Neurol.* 2005; 4(8):487-99.
- Qu HY, Zhang T, Li XL, Zhou JP, Zhao BQ, Li Q, Sun MJ. Transducible P11-CNTF rescues the learning and memory impairments induced by amyloid-beta peptide in mice. *Eur J Pharmacol.* 2008; 594(1-3):93-100.
- Quartu M, Lai ML, Del Fiacco M. Neurotrophin-like immunoreactivity in the human hippocampal formation. *Brain Res Bull.* 1999; 48(4):375-82.
- Quon D, Wang Y, Catalano R, Scardina JM, Murakami K, Cordell B. Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature.* 1991; 352(6332):239-41.

R

- Radtke S, Haan S, Jörissen A, Hermanns HM, Diefenbach S, Smyczek T, Schmitz-Vandeleur H, Heinrich PC, Behrmann I, Haan C. The Jak1 SH2 domain does not fulfill a classical SH2 function in Jak/STAT signaling but plays a structural role for receptor interaction and up-regulation of receptor surface expression. *J Biol Chem.* 2005; 280(27):25760-8.
- Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(30):11172-7.
- Rajewsky K, Gu H, Kühn R, Betz UA, Müller W, Roes J, Schwenk F. Conditional gene targeting. *J Clin Invest.* 1996; 98(3):600-3.
- Raoul C, Henderson CE, Pettmann B. Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J Cell Biol.* 1999; 147(5):1049-62.
- Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol.* 1999; 59(6):663-90.
- Rauskolb S, Zagrebelsky M, Dreznjak A, Deogracias R, Matsumoto T, Wiese S, Erne B, Sendtner M, Schaeren-Wiemers N, Korte M, Barde YA. Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. *J Neurosci.* 2010; 30(5):1739-49.
- Raux G, Guyant-Maréchal L, Martin C, Bou J, Penet C, Brice A, Hannequin D, Frebourg T, Campion D. Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. *J Med Genet.* 2005; 42(10):793-5
- Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, Enger PO, Timpl R, Olsen BR, Hjelstuen MH, Haraldseth O, Bjerkvig R. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol.* 2001; 19(1):29-34.

- Read TA, Stensvaag V, Vindenes H, Ulvestad E, Bjerkvig R, Thorsen F. Cells encapsulated in alginate: a potential system for delivery of recombinant proteins to malignant brain tumours. *Int J Dev Neurosci.* 1999; 17(5-6):653-63.
- Read TA, Thorsen F, Bjerkvig R. Localised delivery of therapeutic agents to CNS malignancies: old and new approaches. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002; 3(3):257-73.
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* 2000; 7(4):321-31.
- Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2001; 8(5):890-9.
- Renbaum P, Levy-Lahad E. Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: presenilin-2 mutations. *Cell Mol Life Sci.* 1998; 54(9):910-9.
- Rende M, Muir D, Ruoslahti E, Hagg T, Varon S, Manthorpe M. Immunolocalization of ciliary neuronotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia.* 1992; 5(1):25-32.
- Rezende AC, Vieira AS, Rogério F, Rezende LF, Boschero AC, Negro A, Langone F. Effects of systemic administration of ciliary neurotrophic factor on Bax and Bcl-2 proteins in the lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41(11):1024-8.
- Rezende LF, Stoppiglia LF, Souza KL, Negro A, Langone F, Boschero AC. Ciliary neurotrophic factor promotes survival of neonatal rat islets via the BCL-2 anti-apoptotic pathway. *J Endocrinol.* 2007; 195(1):157-65.
- Ribasés M, Hervás A, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X, Fernández-Anguiano M, Nogueira M, Gómez-Barros N, Valero S, Gratacòs M, Estivill X, Casas M, Cormand B, Bayés M. Association study of 10 genes encoding neurotrophic factors and their receptors in adult and child attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 2008; 63(10):935-45.
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfer DP, Müller UC. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci.* 2007; 27(29):7817-26.
- Robak T, Gladalska A, Stepień H, Robak E. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 1998; 7(5):347-53.
- Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, Wu T, Hamto P, Devidze N, Yu GQ, Palop JJ, Noebels JL, Mucke L. Amyloid- β /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011; 31(2):700-11.

- Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KC, Yin L, Pennica D, Johnson EM Jr, Schreiber RD. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*. 1998; 93(3):373-83.
- Rogan S, Lippa CF. Alzheimer's disease and other dementias: a review. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2002; 17(1):11-7.
- Roger J, Goureau O, Sahel JA, Guillonnet X. Use of suppression subtractive hybridization to identify genes regulated by ciliary neurotrophic factor in postnatal retinal explants. *Mol Vis*. 2007; 13:206-19.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(22):10836-40.
- Rösch H, Schweigreiter R, Bonhoeffer T, Barde YA, Korte M. The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(20):7362-7.
- Rose CR, Blum R, Kafitz KW, Kovalchuk Y, Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels *Bioessays*. 2004; 26(11):1185-94.
- Rosenblum K, Dudai Y, Richter-Levin G. Long-term potentiation increases tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in rat dentate gyrus in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(19):10457-60.
- Roth SM, Metter EJ, Lee MR, Hurley BF, Ferrell RE. C174T polymorphism in the CNTF receptor gene is associated with fat-free mass in men and women. *J Appl Physiol*. 2003; 95(4):1425-30.
- Rousseau F, Chevalier S, Guillet C, Ravon E, Diveu C, Froger J, Barbier F, Grimaud L, Gascan H. Ciliary neurotrophic factor, cardiotrophin-like cytokine, and neuropoietin share a conserved binding site on the ciliary neurotrophic factor receptor alpha chain. *J Biol Chem*. 2008; 283(44):30341-50.
- Rousseau F, Gauchat JF, McLeod JG, Chevalier S, Guillet C, Guilhot F, Cognet I, Froger J, Hahn AF, Knappskog PM, Gascan H, Boman H. Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(26):10068-73.
- Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol*. 2002; 67(3):203-33.
- Ruberti F, Capsoni S, Comparini A, Di Daniel E, Franzot J, Gonfloni S, Rossi G, Berardi N, Cattaneo A. Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J Neurosci*. 2000; 20(7):2589-601.

- Rudge JS, Alderson RF, Pasnikowski E, McClain J, Ip NY, Lindsay RM. Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *Eur J Neurosci.* 1992; 4(6):459-471.
- Rudge JS, Eaton MJ, Mather P, Lindsay RM, Whitemore SR. CNTF induces raphe neuronal precursors to switch from a serotonergic to a cholinergic phenotype in vitro. *Mol Cell Neurosci.* 1996; 7(3):204-21.
- Rudge JS, Pasnikowski EM, Holst P, Lindsay RM. Changes in neurotrophic factor expression and receptor activation following exposure of hippocampal neuron/astrocyte cocultures to kainic acid. *J Neurosci.* 1995; 15(10):6856-67.

S

- Saadat S, Sendtner M, Rohrer H. Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol.* 1989; 108(5):1807-16.
- Saggio I, Gloaguen I, Poiana G, Laufer R. CNTF variants with increased biological potency and receptor selectivity define a functional site of receptor interaction. *EMBO J.* 1995; 14(13):3045-54.
- Sanchez-Mejia RO, Newman JW, Toh S, Yu GQ, Zhou Y, Halabisky B, Cissé M, Scearce-Levie K, Cheng IH, Gan L, Palop JJ, Bonventre JV, Mucke L. Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2008; 11(11):1311-8.
- Sango K, Yanagisawa H, Komuta Y, Si Y, Kawano H. Neuroprotective properties of ciliary neurotrophic factor for cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130(4):669-79.
- Schaub RT, Anders D, Golz G, Göhringer K, Hellweg R. Serum nerve growth factor concentration and its role in the preclinical stage of dementia. *Am J Psychiatry.* 2002; 159(7):1227-9.
- Schindowski K, Belarbi K, Buée L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav.* 2008; 7 Suppl 1:43-56.
- Schindowski K, Belarbi K, Buée L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav.* 2008; 7 Suppl 1:43-56.
- Schjeide BM, McQueen MB, Mullin K, DiVito J, Hogan MF, Parkinson M, Hooli B, Lange C, Blacker D, Tanzi RE, Bertram L. Assessment of Alzheimer's disease case-control associations using family-based methods. *Neurogenetics.* 2009; 10(1):19-25.
- Schmidt-Kastner R, Humpel C, Wetmore C, Olson L. Cellular hybridization for BDNF, trkB, and NGF mRNAs and BDNF-immunoreactivity in rat forebrain after pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Brain Res.* 1996; 107(3):331-47.

- Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem.* 2000; 275(17):12848-56.
- Schor NF. What the halted phase III γ -secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us. *Ann Neurol.* 2011; 69(2):237-9. doi: 10.1002/ana.22365.
- Schorr M, Zhou L, Schwechheimer K. Expression of ciliary neurotrophic factor is maintained in spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1996; 140(1-2):117-22.
- Schweizer U, Gunnarsen J, Karch C, Wiese S, Holtmann B, Takeda K, Akira S, Sendtner M. Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *J Cell Biol.* 2002; 156(2):287-97.
- Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995; 9(9):726-35.
- Sehgal PB. Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19(4):329-40.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 2002; 298(5594):789-91.
- Selkoe DJ; Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med.* 2004; 140(8):627-38.
- Sendtner M, Götz R, Holtmann B, Escary JL, Masu Y, Carroll P, Wolf E, Brem G, Brület P, Thoenen H. Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF. *Curr Biol.* 1996; 6(6):686-94.
- Serra M, Correia C, Malpique R, Brito C, Jensen J, Bjorquist P, Carrondo Microencapsulation technology: a powerful tool for integrating expansion and cryopreservation of human embryonic stem cells. *MJ, Alves PM. PLoS One.* 2011; 6(8):e23212.
- Shah M, Patel K, Fried VA, Sehgal PB. Interactions of STAT3 with caveolin-1 and heat shock protein 90 in plasma membrane raft and cytosolic complexes. Preservation of cytokine signaling during fever. *J Biol Chem.* 2002; 277(47):45662-9.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008; 14(8):837-42.
- Sharom FJ, Lehto MT. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Cell Biol.* 2002; 80(5):535-49.
- Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, Griffin WS. In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging.* 1996; 17(5):761-6.

- Sherwin BB. Estrogen and cognitive aging in women. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23(11):527-34.
- Shi Y, Wang W, Yourey PA, Gohari S, Zukauskas D, Zhang J, Ruben S, Alderson RF. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 262(1):132-8.
- Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV 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):1489-99.
- Shields DC, Harmon DL, Nunez F, Whitehead AS. The evolution of haematopoietic cytokine/receptor complexes. *Cytokine.* 1995; 7(7):679-88.
- Shimazaki T, Shingo T, Weiss S. The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 2001; 21(19):7642-53.
- Shoichet MS, Winn SR Cell delivery to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000; 42(1-2):81-102.
- Shuai K. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res.* 2006; 16(2):196-202.
- Siegel GJ, Chauhan NB. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 33(2-3):199-227.
- Sieving PA, Caruso RC, Tao W, Coleman HR, Thompson DJ, Fullmer KR, Bush RA. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(10):3896-901
- Singh KK, Park KJ, Hong EJ, Kramer BM, Greenberg ME, Kaplan DR, Miller FD. Developmental axon pruning mediated by BDNF-p75NTR-dependent axon degeneration. *Nat Neurosci.* 2008; 11(6):649-58.
- Singh M, Nam DT, Arseneault M, Ramassamy C. Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *J Alzheimers Dis.* 2010; 21(3):741-56.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature.* 1999; 402(6761):537-40.
- Skiniotis G, Boulanger MJ, Garcia KC, Walz T. Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *Nat Struct Mol Biol.* 2005; 12(6):545-51.
- Skiniotis G, Lupardus PJ, Martick M, Walz T, Garcia KC. Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex. *Mol Cell.* 2008; 31(5):737-48.

- Smith DE, Roberts J, Gage FH, Tuszynski MH. Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(19):10893-8.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*. 2005; 8(8):1051-8.
- Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Löwer A, Langer A, Merdes G, Paro R, Masters CL, Müller U, Kins S, Beyreuther K. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J*. 2005; 24(20):3624-34.
- Soilu-Hänninen M, Broberg E, Røyttä M, Mattila P, Rinne J, Hukkanen V. Expression of LIF and LIF receptor beta in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Acta Neurol Scand*. 2010; 121(1):44-50.
- Song DK, Im YB, Jung JS, Cho J, Suh HW, Kim YH. Central beta-amyloid peptide-induced peripheral interleukin-6 responses in mice. *J Neurochem*. 2001; 76(5):1326-35.
- Song W, Volosin M, Cragolini AB, Hempstead BL, Friedman WJ. ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J Neurosci*. 2010; 30(46):15608-15.
- Sonoda Y, Mukai H, Matsuo K, Takahashi M, Ono Y, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T. Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett*. 2010; 471(1):20-4.
- Sotthibundhu A, Sykes AM, Fox B, Underwood CK, Thangnipon W, Coulson EJ. Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci*. 2008; 28(15):3941-6.
- Sponne I, Fifre A, Drouet B, Klein C, Koziel V, Pinçon-Raymond M, Olivier JL, Chambaz J, Pillot T. Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation. *J Biol Chem*. 2003; 278(5):3437-45.
- Sponne I, Fifre A, Koziel V, Oster T, Olivier JL, Pillot T. Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide. *FASEB J*. 2004; 18(7):836-8.
- Sprang SR, Bazan JF. Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement: Curr. Opin. Struct. Biol. 1993, 3:815–827**
- Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*. 1994; 263(5143):92-5.
- Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*. 1995; 267(5202):1349-53.

- Steinberg GR, Watt MJ, Ernst M, Birnbaum MJ, Kemp BE, Jørgensen SB. Ciliary neurotrophic factor stimulates muscle glucose uptake by a PI3-kinase-dependent pathway that is impaired with obesity. *Diabetes*. 2009; 58(4):829-39.
- Stelzmann RA, Schitzlein HN, Murtagh R. An English translation of Alzheimer's 1907 paper "Über eine eigenartige Erkrankung der Jindrinde". *Clinical Anatomy*. 1995 8:429-431
- Stensvaag V, Furmanek T, Lønning K, Terzis AJ, Bjerkvig R, Visted T. Cryopreservation of alginate-encapsulated recombinant cells for antiangiogenic therapy. *Cell Transplant*. 2004; 13(1):35-44.
- Stéphan A, Laroche S, Davis S. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci*. 2001; 21(15):5703-14.
- Stepkowski SM, Chen W, Ross JA, Nagy ZS, Kirken RA. STAT3: an important regulator of multiple cytokine functions. *Transplantation*. 2008; 85(10):1372-7.
- Stöckli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Götz R, Lindholm D, Thoenen H. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature*. 1989 Dec 21-28; 342(6252):920-3.
- Stomrud E, Hansson O, Zetterberg H, Blennow K, Minthon L, Londos E. Correlation of longitudinal cerebrospinal fluid biomarkers with cognitive decline in healthy older adults. *Arch Neurol*. 2010; 67(2):217-23.
- Stoop R, Poo MM. Potentiation of transmitter release by ciliary neurotrophic factor requires somatic signaling. *Science*. 1995; 267(5198):695-9.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(24):13287-92.
- Su JH, Zhao M, Anderson AJ, Srinivasan A, Cotman CW. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. *Brain Res*. 2001; 898(2):350-7.
- Sultana R, Banks WA, Butterfield DA. Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of BCL2 and caspase 3 in hippocampus from subjects with amnesic mild cognitive impairment: Insights into their potential roles for loss of synapses and memory, accumulation of Abeta, and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2010; 88(3):469-77.
- Sun X, Zhou H, Luo X, Li S, Yu D, Hua J, Mu D, Mao M. Neuroprotection of brain-derived neurotrophic factor against hypoxic injury in vitro requires activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Int J Dev Neurosci*. 2008; 26(3-4):363-70.
- Suzuki A, Fukushima H, Mukawa T, Toyoda H, Wu LJ, Zhao MG, Xu H, Shang Y, Endoh K, Iwamoto T, Mamiya N, Okano E, Hasegawa S, Mercaldo V, Zhang Y, Maeda R, Ohta M, Josselyn SA, Zhuo

M, Kida Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *J Neurosci.* 2011; 31(24):8786-802.

Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009; 29(3):464-79

Sweeney WA, Luedtke J, McDonald MP, Overmier JB. Intrahippocampal injections of exogenous beta-amyloid induce postdelay errors in an eight-arm radial maze. *Neurobiol Learn Mem.* 1997; 68(1):97-101.

Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20 Suppl 2:S265-79.

Symes A, Stahl N, Reeves SA, Farruggella T, Servidei T, Gearan T, Yancopoulos G, Fink JS. The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression. *Curr Biol.* 1997; 7(9):697-700.

T

Tajima H, Kawasumi M, Chiba T, Yamada M, Yamashita K, Nawa M, Kita Y, Kouyama K, Aiso S, Matsuoka M, Niikura T, Nishimoto I. A humanin derivative, S14G-HN, prevents amyloid-beta-induced memory impairment in mice. *J Neurosci Res.* 2005; 79(5):714-23.

Takahashi K, Niidome T, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. Phosphorylation of amyloid precursor protein (APP) at Tyr687 regulates APP processing by alpha- and gamma-secretase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 377(2):544-9.

Takahashi R, Yokoji H, Misawa H, Hayashi M, Hu J, Deguchi T. A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet.* 1994a; 7(1):79-84.

Takahashi R, Yokoji H, Misawa H, Hayashi M, Hu J, Deguchi T. A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases (Erratum). *Nat Genet.* 1994b; 7(2):215.

Takahashi R. Deficiency of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) is not causally related to amyotrophic lateral sclerosis (ALS) *Rinsho Shinkeigaku.* 1995; 35(12):1543-5.

Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, Beal MF, Xu H, Greengard P, Gouras GK. Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol.* 2002; 161(5):1869-79.

Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K, Nakajima K, Hibi M, Hirano T. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(7):4109-17.

- Takei N, Sasaoka K, Inoue K, Takahashi M, Endo Y, Hatanaka H. Brain-derived neurotrophic factor increases the stimulation-evoked release of glutamate and the levels of exocytosis-associated proteins in cultured cortical neurons from embryonic rats. *J Neurochem.* 1997; 68(1):370-5.
- Talbott JF, Cao Q, Bertram J, Nkansah M, Benton RL, Lavik E, Whittemore SR. CNTF promotes the survival and differentiation of adult spinal cord-derived oligodendrocyte precursor cells in vitro but fails to promote remyelination in vivo. *Exp Neurol.* 2007; 204(1):485-9.
- Tan SA, Déglon N, Zurn AD, Baetge EE, Bamber B, Kato AC, Aebischer P. Rescue of motoneurons from axotomy-induced cell death by polymer encapsulated cells genetically engineered to release CNTF. *Cell Transplant.* 1996; 5(5):577-87.
- Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, Kasai H. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science.* 2008; 319(5870):1683-7.
- Tanaka S, Nakamura S, Kimura J, Ueda K. Age-related change in the proportion of amyloid precursor protein mRNAs in the gray matter of cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 1993; 163(1):19-21.
- Tanaka S, Nakamura S, Ueda K, Kameyama M, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H. Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 157(2):472-9.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science.* 1987; 235(4791):880-4.
- Tao W, Wen R, Goddard MB, Sherman SD, O'Rourke PJ, Stabila PF, Bell WJ, Dean BJ, Kauper KA, Budz VA, Tsiaras WG, Acland GM, Pearce-Kelling S, Laties AM, Aguirre GD. Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43(10):3292-8.
- Taupin JL, Miossec V, Pitard V, Blanchard F, Daburon S, Raher S, Jacques Y, Godard A, Moreau JF. Binding of leukemia inhibitory factor (LIF) to mutants of its low affinity receptor, gp190, reveals a LIF binding site outside and interactions between the two cytokine binding domains. *J Biol Chem.* 1999; 274(20):14482-9.
- Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I, Bourne K, Marechal NM, Turner PR, Bilkey DK, Tate WP, Abraham WC. Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis.* 2008; 31(2):250-60.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.* 2005; 25(22):5455-63.
- Thanos CG, Emerich DF. On the use of hydrogels in cell encapsulation and tissue engineering system. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2008; 2(1):19-24

- Thoenen H, Sendtner M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci.* 2002; 5 Suppl:1046-50
- Thoenen H, Zafra F, Hengerer B, Lindholm D. The synthesis of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal and cortical neurons is regulated by specific transmitter systems. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 640:86-90.
- Timmermann A, Küster A, Kurth I, Heinrich PC, Müller-Newen G. A functional role of the membrane-proximal extracellular domains of the signal transducer gp130 in heterodimerization with the leukemia inhibitory factor receptor. *Eur J Biochem.* 2002; 269(11):2716-26.
- Tirard M, Jasbinsek J, Almeida OF, Michaelidis TM. The manifold actions of the protein inhibitor of activated STAT proteins on the transcriptional activity of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in neural cells. *J Mol Endocrinol.* 2004; 32(3):825-41.
- Tobias CA, Shumsky JS, Shibata M, Tuszynski MH, Fischer I, Tessler A, Murray M. Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration. *Exp Neurol.* 2003; 184(1):97-113.
- Tombaugh TN. Test-retest reliable coefficients and 5-year change scores for the MMSE and 3MS. *Arch Clin Neuropsychol.* 2005; 20(4):485-503.
- Tomida M, Heike T, Yokota T. Cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor required for STAT3 activation, differentiation, and growth arrest of myeloid leukemic cells. *Blood.* 1999; 93(6):1934-41.
- Tong L, Thornton PL, Balazs R, Cotman CW. Beta -amyloid-(1-42) impairs activity-dependent cAMP-response element-binding protein signaling in neurons at concentrations in which cell survival is not compromised. *J Biol Chem.* 2001; 276(20):17301-6.
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature.* 1999; 402(6760):421-5.
- Troy CM, Friedman JE, Friedman WJ. Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *J Biol Chem.* 2002; 277(37):34295-302. Epub 2002 Jul 3.
- Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med.* 2005; 11(5):551-5.
- Tuszynski MH, U HS, Amaral DG, Gage FH. Nerve growth factor infusion in the primate brain reduces lesion-induced cholinergic neuronal degeneration. *J Neurosci.* 1990; 10(11):3604-14.
- Tuszynski MH. Growth-factor gene therapy for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2002; 1(1):51-7.
- Tyler WJ, Pozzo-Miller L. Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J Physiol.* 2003; 553(Pt 2):497-509.

U

V

- Vacher CM, Crépin D, Aubourg A, Couvreur O, Bailleux V, Nicolas V, Férézou J, Gripois D, Gertler A, Taouis M. A putative physiological role of hypothalamic CNTF in the control of energy homeostasis. *FEBS Lett.* 2008; 582(27):3832-8.
- Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, Glerup S, Skeldal S, Kjolby M, Richner M, Erdmann B, Nyengaard JR, Tessarollo L, Lewin GR, Willnow TE, Chao MV, Nykjaer A. Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci.* 2011; 14(1):54-61.
- Varon S, Manthorpe M, Adler R. Cholinergic neuronotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. *Brain Res.* 1979; 173(1):29-45.**
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 1999; 286(5440):735-41.
- Verdier Y, Penke B. Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease. *Curr Protein Pept Sci.* 2004; 5(1):19-31.
- Verghese J, LeValley A, Derby C, Kuslansky G, Katz M, Hall C, Buschke H, Lipton RB. Leisure activities and the risk of amnesic mild cognitive impairment in the elderly. *Neurology.* 2006; 66(6):821-7.
- Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2011; 10(3):241-52.
- Vicario-Abejón C, Owens D, McKay R, Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3(12):965-74.
- Vieira AS, Rezende AC, Grigoletto J, Rogério F, Velloso LA, Skaper SD, Negro A, Langone F. Ciliary neurotrophic factor infused intracerebroventricularly shows reduced catabolic effects when linked to the TAT protein transduction domain. *J Neurochem.* 2009; 110(5):1557-66.
- Villemagne VL, Pike KE, Chételat G, Ellis KA, Mulligan RS, Bourgeat P, Ackermann U, Jones G, Szoek C, Salvado O, Martins R, O'Keefe G, Mathis CA, Klunk WE, Ames D, Masters CL, Rowe CC.

- Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2011; 69(1):181-92. doi: 10.1002/ana.22248.
- Vingtdeux V, Hamdane M, Bégard S, Loyens A, Delacourte A, Beauvillain JC, Buée L, Marambaud P, Sergeant N. Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiol Dis*. 2007a; 25(3):686-96.
- Vingtdeux V, Hamdane M, Loyens A, Gelé P, Drobeck H, Bégard S, Galas MC, Delacourte A, Beauvillain JC, Buée L, Sergeant N. Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J Biol Chem*. 2007b; 282(25):18197-205
- Visted T, Bjerkvig R, Enger PO. Cell encapsulation technology as a therapeutic strategy for CNS malignancies. *Neuro Oncol*. 2001; 3(3):201-10.
- Voisin MB, Bitard J, Daburon S, Moreau JF, Taupin JL. Separate functions for the two modules of the membrane-proximal cytokine binding domain of glycoprotein 190, the leukemia inhibitory factor low affinity receptor, in ligand binding and receptor activation. *J Biol Chem*. 2002; 277(16):13682-92.
- Volosin M, Song W, Almeida RD, Kaplan DR, Hempstead BL, Friedman WJ. Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci*. 2006; 26(29):7756-66.
- Von Bohlen und Halbach O, Minichiello L, Unsicker K. TrkB but not trkC receptors are necessary for postnatal maintenance of hippocampal spines. *Neurobiol Aging*. 2008; 29(8):1247-55.
- Von Bohlen und Halbach O. Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus. *Front Aging Neurosci*. 2010; 2. pii: 36.
- Waldemar G, Dubois B, Emre M, Georges J, McKeith IG, Rossor M, Scheltens P, Tariska P, Winblad B; EFNS. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur J Neurol*. 2007; 14(1):e1-26.

W

- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002; 416(6880):535-9.
- Walsh DM, Minogue AM, Sala Frigerio C, Fadeeva JV, Wasco W, Selkoe DJ. The APP family of proteins: similarities and differences. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35(Pt 2):416-20.
- Wan J, Fu AK, Ip FC, Ng HK, Hugon J, Page G, Wang JH, Lai KO, Wu Z, Ip NY. Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2010; 30(20):6873-81.

- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol*. 1999; 158(2):328-37.
- Wang X, Butowt R, Vasko MR, von Bartheld CS. Mechanisms of the release of anterogradely transported neurotrophin-3 from axon terminals *J Neurosci*. 2002; 22(3):931-45.
- Wang Y, Ha Y. The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol Cell*. 2004; 15(3):343-53.
- Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, Gliniak BC, McKenna HJ, Papayannopoulou T, Thoma B, et al. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development*. 1995; 121(5):1283-99.
- Wen Z, Darnell JE Jr. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25(11):2062-7.
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*. 1995; 82(2):241-50.
- Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002; 22(5):1858-67.
- Wierzbowska A, Urbańska-Ryś H, Robak T. Circulating IL-6-type cytokines and sIL-6R in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1999; 105(2):412-9.
- Wilson RS, Begeny CT, Boyle PA, Schneider JA, Bennett DA. Vulnerability to stress, anxiety, and development of dementia in old age. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2011; 19(4):327-34.
- Winter CG, Saotome Y, Levison SW, Hirsh D. A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(13):5865-9.
- Woo HN, Baik SH, Park JS, Gwon AR, Yang S, Yun YK, Jo DG. Secretases as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 404(1):10-5.
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B. Activation of p75^{NTR} by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*. 2005; 8(8):1069-77.

X

- Xu D, Qu CK. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci*. 2008; 13:4925-32.

Xu WL, Atti AR, Gatz M, Pedersen NL, Johansson B, Fratiglioni L. Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: a population-based twin study. *Neurology*. 2011; 76(18):1568-74.

Xu Y, Kershaw NJ, Luo CS, Soo P, Pocock MJ, Czabotar PE, Hilton DJ, Nicola NA, Garrett TP, Zhang JG. Crystal structure of the entire ectodomain of gp130: insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes. *J Biol Chem*. 2010; 285(28):21214-8

Y

Yaar M, Zhai S, Panova I, Fine RE, Eisenhauer PB, Blusztajn JK, Lopez-Coviella I, Gilchrest BA. A cyclic peptide that binds p75(NTR) protects neurones from beta amyloid (1-40)-induced cell death. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007; 33(5):533-43.

Yamada K, Nitta A, Saito T, Hu J, Nabeshima T. Changes in ciliary neurotrophic factor content in the rat brain after continuous intracerebroventricular infusion of beta-amyloid(1-40) protein. *Neurosci Lett*. 1995; 201(2):155-8.

Yamada M, Chiba T, Sasabe J, Nawa M, Tajima H, Niikura T, Terashita K, Aiso S, Kita Y, Matsuoka M, Nishimoto I. Implanted cannula-mediated repetitive administration of Abeta25-35 into the mouse cerebral ventricle effectively impairs spatial working memory. *Behav Brain Res*. 2005; 164(2):139-46.

Yamada T, Sasaki H, Furuya H, Miyata T, Goto I, Sakaki Y. Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 149(2):665-71.

Yamamoto-Sasaki M, Ozawa H, Saito T, Rösler M, Riederer P. Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Res*. 1999; 824(2):300-3.

Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol*. 1997; 378(1):135-57. Erratum in: *J Comp Neurol* 1997; 382(4):546-7.

Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1996; 382(6593):685-91.

Yang T, Knowles JK, Lu Q, Zhang H, Arancio O, Moore LA, Chang T, Wang Q, Andreasson K, Rajadas J, Fuller GG, Xie Y, Massa SM, Longo FM. Small molecule, non-peptide p75 ligands inhibit Abeta-induced neurodegeneration and synaptic impairment. *PLoS One*. 2008; 3(11):e3604.

Yankner BA, Lu T. Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2009; 284(8):4755-9.

- Ye H, Kuruvilla R, Zweifel LS, Ginty DD. Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron*. 2003; 39(1):57-68.
- Ye H, Kuruvilla R, Zweifel LS, Ginty DD. Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron*. 2003; 39(1):57-68.
- Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao MV. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci*. 1998; 18(9):3273-81.
- Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota K, Yoshida N, Kishimoto T. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(1):407-11.
- Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene*. 1990; 87(2):257-63.
- Youssef I, Florent-Bécharde S, Malaplate-Armand C, Koziel V, Bihain B, Olivier JL, Leininger-Muller B, Kriem B, Oster T, Pillot T. N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol Aging*. 2008; 29(9):1319-33
- Yu J, Wjasow C, Backer JM. Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem*. 1998; 273(46):30199-203.

Z

- Zagrebelsky M, Holz A, Dechant G, Barde YA, Bonhoeffer T, Korte M. The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2005; 25(43):9989-99.
- Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Mayer LS, Steffens DC, Breitner JC; Cache County Memory Study Investigators. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA*. 2002; 288(17):2123-9.
- Zdrodowska A, Swierzbńska R, Kondrusik M, Pancewicz SA, Zajkowska JM, Grygorczuk S, Hermanowska-Szapakowicz T. [Ciliary neurotrophic factor in tick-borne encephalitis]. *Pol Merkuriusz Lekarski*. 2007; 23(134):100-2.
- Zhang HT, Li LY, Zou XL, Song XB, Hu YL, Feng ZT, Wang TT. Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. *J Histochem Cytochem*. 2007; 55(1):1-19.
- Zhang K, Hopkins JJ, Heier JS, Birch DG, Halperin LS, Albini TA, Brown DM, Jaffe GJ, Tao W, Williams GA. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011b; 108(15):6241-5

- Zhang-Nunes SX, Maat-Schieman ML, van Duinen SG, Roos RA, Frosch MP, Greenberg SM. The cerebral beta-amyloid angiopathies: hereditary and sporadic. *Brain Pathol.* 2006; 16(1):30-9.
- Zhao G, Tan J, Mao G, Cui MZ, Xu X. The same gamma-secretase accounts for the multiple intramembrane cleavages of APP. *J Neurochem.* 2007; 100(5):1234-46.
- Zhao LR, Mattsson B, Johansson BB. Environmental influence on brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience.* 2000; 97(1):177-84.
- Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener.* 2006; 1:5.
- Zheng Z, Sabirzhanov B, Keifer J. Oligomeric amyloid- β inhibits the proteolytic conversion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA receptor trafficking, and classical conditioning. *J Biol Chem.* 2010; 285(45):34708-17.
- Ziegenhorn AA, Schulte-Herbrüggen O, Danker-Hopfe H, Malbranc M, Hartung HD, Anders D, Lang UE, Steinhagen-Thiessen E, Schaub RT, Hellweg R. Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging.* 2007; 28(9):1436-45.
- Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, Feilen PJ, Manz B, Katsen A, Weber M, Ihmig FR, Ehrhart F, Gessner P, Behringer M, Steinbach A, Wegner LH, Sukhorukov VL, Vásquez JA, Schneider S, Weber MM, Volke F, Wolf R, Zimmermann U. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16(6):491-501
- Zurn AD, Henry H, Schlupe M, Aubert V, Winkel L, Eilers B, Bachmann C, Aebischer P. Evaluation of an intrathecal immune response in amyotrophic lateral sclerosis patients implanted with encapsulated genetically engineered xenogeneic cells. *Cell Transplant.* 2000; 9(4):471-84.
- Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(8):615-25.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur François DARCHEN, Directeur, L.M.D.N.D, Université Paris Descartes

Madame Bernadette ALLINQUANT, Directeur de Recherche, INSERM, Paris

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur GARCIA Pierre

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Validation fonctionnelle d'une nouvelle stratégie thérapeutique prévenant la
dégénérescence et les troubles cognitifs associés dans des modèles murins de la Maladie
d'Alzheimer. "**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : « **Sciences Agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 03 novembre 2011

Le Président de l'I.N.P.L.

F. LAURENT
Pour le Président par délégation
Le Directeur Général des Services
de l'INPL,

J.Y. RIVIERE



Résumé

Validation fonctionnelle d'une nouvelle stratégie thérapeutique prévenant la dégénérescence et les troubles cognitifs associés dans des modèles murins de la Maladie d'Alzheimer.

Aucun traitement de la maladie d'Alzheimer (MA) n'existe, justifiant le développement de stratégies thérapeutiques. La toxicité des oligomères solubles du peptide amyloïde β ($A\beta$) est centrale dans les pertes synaptiques et cellulaires précoces dans la maladie. Dans le cadre de cette hypothèse, nous proposons qu'empêcher ces effets puisse prévenir le déclin cognitif dans la MA. Les facteurs neurotrophiques sont de bons candidats pour prévenir la mort cellulaire mais nécessitent une application ciblée et continue. Nous avons utilisé la technologie d'encapsulation cellulaire pour produire des bioréacteurs implantables contenant des cellules C2C12 sécrétant le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF). Notre objectif était d'établir la preuve du concept que la production à long terme de CNTF *in situ* dans le cerveau puisse prévenir les déficits cognitifs liés à l' $A\beta$.

Nos études prouvent que le CNTF produit par les bioréacteurs prévient la cytotoxicité et l'apoptose induites par le peptide $A\beta$ *in vitro*. La neuroprotection dépend de l'activation de la PI3-Kinase et du facteur STAT3. *In vivo*, l'implantation des bioréacteurs dans le cerveau prévient les troubles cognitifs induits par l'injection *icv* d' $A\beta$ ou retarde leur apparition chez la souris Tg2576. Dans nos deux modèles précliniques de la MA, la protection comportementale est associée au maintien des protéines synaptiques dans l'hippocampe.

Aussi, la production *in situ* de CNTF est une approche thérapeutique préventive efficace contre la toxicité et les déficits cognitifs liés à l' $A\beta$. Ces résultats suggèrent également que l'implantation de cellules encapsulées est un bon procédé pour délivrer des molécules thérapeutiques au cerveau.

Mot-clés : Alzheimer, prévention, oligomères solubles d' $A\beta$, encapsulation, neuroprotection, CNTF, Tg2576, STAT3, mémoire.

Summary

Functional validation of a new therapeutic strategy preventing degeneration and associated cognitive impairments in murine models of Alzheimer's Disease.

No cure against Alzheimer's Disease (AD) exists yet, justifying the development of therapeutic strategies. Toxicity of soluble amyloid β peptide is a key-player in early synaptic and cellular loss in AD. According to this hypothesis, we propose that preventing $A\beta$ peptide effects could prevent cognitive decline in AD. Neurotrophic factors are good candidates to prevent cell death but require a targeted and continuous delivery. We used the cell encapsulation technology to produce graftable bioreactors that contain C2C12 cells secreting the Ciliary Neurotrophic factor (CNTF). Our goal was to realize the proof-of-concept that CNTF long term *in situ* delivery could prevent $A\beta$ -induced cognitive decline.

Our studies prove that bioreactor-produced CNTF prevents $A\beta$ -induced cytotoxicity and apoptosis *in vitro*. Neuroprotection relies on PI3K and STAT3 activation. *In vivo*, bioreactor implantation in brain prevents cognitive impairment induced by $A\beta$ *icv* injection or delays their appearance in Tg2576 mice. In both of our preclinical model of AD, behavioral protection was associated with synapse maintenance in hippocampus.

Therefore, *in situ* long term CNTF delivery is an efficient preventive therapeutic strategy against toxicity and $A\beta$ -linked cognitive disturbances. These results also suggest that encapsulated cells graft is a good way to deliver therapeutic molecules to the brain.

Keywords: Alzheimer, prevention, soluble $A\beta$ oligomers, encapsulation, neuroprotection, CNTF, Tg2576, STAT3, memory.