



HAL
open science

Implication de la phospholipase A2 cytoplasmique dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer

Cédric Pierre Louis Desbene

► To cite this version:

Cédric Pierre Louis Desbene. Implication de la phospholipase A2 cytoplasmique dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0235 . tel-01749627

HAL Id: tel-01749627

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749627>

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Cédric Pierre Louis DESBENE

**Implication de la phospholipase A₂ cytoplasmique (cPLA₂)
dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer**

Le 12 novembre 2012

Membres du jury :

Président :	M. Sylvain LORIC	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université Paris Est Créteil, Créteil
Rapporteurs :	Mme Joëlle MASLIAH	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université Pierre et Marie Curie, Paris
	Mme Marie–Claude POTIER	Directeur de Recherche CNRS, Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Hôpital de la Pitié – Salpêtrière, Paris
Examineurs :	Mme Frances Yen–POTIN	Directeur de Recherches INSERM, Université de Lorraine, Vandoeuvre lès Nancy
	M. Jean–Luc OLIVIER	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Lorraine, Vandoeuvre lès Nancy, Directeur de Thèse
	Mme Catherine MALAPLATE–ARMAND	Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Lorraine, Vandoeuvre lès Nancy, Co-directeur de Thèse

Laboratoire LIPIDOMIX (EA 4422)

« Métabolisme lipidique et neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer »

ENSAIA - INPL Université de Lorraine

2 avenue de la Forêt de Haye 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy

Implication de la phospholipase A₂ cytoplasmique dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer

RESUME

Les oligomères solubles de peptide Bêta-amyloïde (A β) apparaissent comme les acteurs majeurs de la perte synaptique précoce observée au cours de la maladie d'Alzheimer. Notre équipe a précédemment montré que ces oligomères de peptide A β activent la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂), qui entraîne la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. En utilisant un modèle d'injection intra cérébro ventriculaire unique d'une faible quantité de peptide A β , nous avons pu observer que l'inactivation constitutive du gène de la cPLA₂ protège les souris KO contre les perturbations mnésiques et empêche la réduction de l'expression de protéines synaptiques au sein de l'hippocampe, ces deux effets délétères étant constatés chez les animaux *wild-type*. Par la suite, nous avons montré que l'activation des sphingomyélinases, consécutive à l'exposition aux oligomères A β , est indétectable dans des neurones en culture issus de souris KO. Dans ces mêmes neurones KO, nous avons constaté que la phosphorylation de Akt/PKB n'est pas altérée suite à l'exposition des cellules aux oligomères A β . Enfin, nous avons pu mettre en évidence une diminution de l'expression de la protéine précurseur du peptide A β (protéine APP), tant au niveau d'homogénats hippocampiques que de neurones en cultures, issus de souris KO. Néanmoins, des travaux supplémentaires sont requis pour établir le lien exact entre cette réduction de l'expression d'APP et la résistance aux oligomères A β , tant in vitro qu'in vivo. Toutefois, ces résultats soulignent l'implication de la cPLA₂ dans la neuro dégénérescence entraînée par les oligomères A β , et font apparaître cette enzyme comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

MOTS CLES

Maladie d'Alzheimer

Phospholipase A₂ cytosolique

Oligomères solubles de peptide Bêta-amyloïde

Synaptotoxicité

Protéine précurseur du peptide Bêta-amyloïde

Involvement of cytosolic phospholipase A₂ in Alzheimer's disease pathogenesis

SUMMARY

Soluble beta-amyloid (A β) oligomers putatively play a critical role in the early synapse loss and cognitive impairment observed in Alzheimer's disease. We previously demonstrated that A β oligomers activate cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) which specifically releases arachidonic acid from membrane phospholipids. By using a single A β oligomers intra cerebro ventricular injection, we observed that cPLA₂ gene suppression prevents both the alterations of cognitive abilities and the reduction of hippocampal synaptic markers levels which are observed in wild type mice. We further demonstrated that the A β oligomers-induced sphingomyelinase activation is suppressed and that the phosphorylation of Akt/PKB is preserved in neuronal cells isolated from KO mice. Interestingly, expression of the A β precursor protein (APP) is reduced in hippocampus homogenates and neuronal cells from KO mice, but the relationship with the resistance of these mice to the A β oligomers toxicity requires further investigation. These results therefore show that cPLA₂ plays a key role in the A β oligomers-associated neurodegenerative effects, and as such represents a potential therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease.

KEYWORDS

Alzheimer's disease

Cytosolic phospholipase A₂

Beta-amyloid oligomers

Synaptotoxicity

Amyloid precursor protein

A mes Grands-parents,
et plus spécialement à ma Grand-Mère,
sans qui la famille n'aurait jamais pu
devenir ce qu'elle est aujourd'hui.

A mes Parents,
pour tout l'amour qu'ils ont su me donner
pour leur soutien indéfectible en toutes circonstances
pour l'exemple qu'ils constitueront toujours pour moi
et pour la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée.

A ma Marraine,
qui a toujours su être là pour m'aider
pour tout l'amour qu'elle m'a apporté
pour tous ses conseils judicieux et son soutien permanent.

A toutes les personnes qui ont croisé mon chemin,
Marie, Benjamin, Marie-Alex, Christophe, Pierre, Alice, Ariane...
ainsi qu'à tous ceux et celles dont je ne pourrai mentionner le nom ici,
qui ont su m'apporter ce qu'ils avaient de mieux
et qui m'ont aidé à grandir et à progresser au long de ma vie.

A ma grande famille de Paris, Grenoble, Saint Raphaël et du Luxembourg
ainsi qu'à tous mes amis.

A tous les malades souffrant de cette terrible maladie qu'est l'Alzheimer,
ainsi qu'à leurs familles et leurs proches qui les accompagnent dans cette épreuve,

Aux personnels du monde médical, paramédical et social,
qui les prennent en charge et essaient de rendre leur vie moins dure,

Aux chercheurs qui s'investissent dans l'exploration des mécanismes intimes de cette
pathologie, préalable indispensable à la mise en place d'un diagnostic pertinent...
et surtout, d'un traitement préventif et/ou curatif efficace

J'espère que ce maigre travail pourra, à sa très modeste mesure, contribuer à faire
progresser les connaissances en ce domaine, pour le bénéfice des patients...

... au moins *un tout petit peu*...

Entre le mois d'octobre 2007, date de début de ces travaux de recherche, et aujourd'hui, alors que leur conclusion approche, notre grande famille franco luxembourgeoise a été endeuillée par le décès de plusieurs de ses membres.

Ce travail de Thèse leur est tout spécialement dédié.

Le temps passe mais les souvenirs demeurent.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements ouvrent ce manuscrit de Thèse et achèvent l'écriture de ce travail. Au fil des rencontres, et que leurs noms figurent sur ces pages ou non, je remercie les compagnons de route qui m'ont accompagné pendant ces moments, et qui ont éclairé mon chemin.

Madame le Professeur Joëlle MASLIAH a eu la gentillesse d'accepter de participer à ce Jury. Qu'elle soit remerciée pour sa disponibilité à mon égard et sa bienveillance par rapport à ce travail de Thèse.

Madame le Docteur Marie-Claude POTIER a également répondu sans hésitation à mon invitation. Je la remercie pour la bienveillance qu'elle a su me témoigner et sa contribution à ce travail.

Madame le Docteur Frances YEN-POTIN m'a accueilli au sein du Laboratoire LIPIDOMIX avec chaleur et humanité. Elle a également accepté avec enthousiasme de rejoindre ce jury. Elle me permet de conclure un travail commencé il y a cinq ans. Qu'elle soit remerciée pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Monsieur le Professeur Sylvain LORIC avait déjà rejoint (et même présidé) mon Jury de Thèse d'Exercice, il y a maintenant cinq ans. Je me rappelle non sans émotion mon dernier semestre d'Internat passé dans l'Unité de Biochimie du Laboratoire de Biochimie – Génétique moléculaire de l'Hôpital Henri Mondor. Qu'il soit tout particulièrement remercié pour sa permanente disponibilité et son enthousiasme communicatif. En espérant sincèrement que nous arriverons à poursuivre notre collaboration.

Madame le Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND a accepté de co-encadrer ce travail de Thèse de Sciences. Qu'elle soit ici tout particulièrement remerciée pour sa très haute estime de mes qualités de Médecin Biologiste et pour sa bienveillance indéfectible à mon égard, durant tout mon Assistanat. J'ai énormément appris à son contact et ses enseignements dépassent largement le cadre de la Biologie. Qu'elle soit infiniment remerciée pour ce bagage qui me sera utile toute ma vie.

Monsieur le Professeur Jean-Luc OLIVIER m'a accueilli dans son Laboratoire de Biochimie du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy et m'a proposé ce travail de Thèse. Il a su donner à ma carrière médicale une réelle opportunité de progrès à un moment où la situation devenait inquiétante. Qu'il soit remercié pour ce poste d'Assistant Hospitalo Universitaire et pour cette Thèse, qui ont été de puissants moteurs pour ma vie professionnelle. Qu'il soit également remercié pour son encadrement, sa disponibilité et sa bienveillance durant ce travail de Thèse, ainsi que pour son soutien permanent.

Madame le Docteur Brigitte DOUSSET m'a très gentiment reçu dans l'Unité de Biochimie spécialisée de l'Hôpital Central et m'a formé à cette discipline que je n'avais paradoxalement pas abordée durant mes semestres d'Internat. Qu'elle soit ici remerciée pour tout ce qu'elle m'a appris durant ces trois ans. Son aide et ses conseils ont été déterminants dans la préparation du Concours National de Praticien Hospitalier. Qu'elle soit assurée de ma profonde reconnaissance pour ses conseils avisés et son soutien indéfectible.

Le Laboratoire LIPIDOMIX m'a accueilli pour la réalisation de cette Thèse. Que chacun de ses membres soit ici remercié pour tout ce qu'il a su m'apporter.

Je remercierai en tout premier lieu le Docteur Thierry PILLOT, qui dirigeait cette équipe au moment de mon arrivée et pendant toute la durée de mon séjour nancéen. Ses qualités scientifiques resteront un exemple. Je lui souhaite de tout cœur de poursuivre dans SYNAGING l'entreprise qu'il a initiée à LIPIDOMIX.

Madame Violette KOZIEL a su me former aux différentes techniques *in vitro* avec gentillesse et bienveillance. Qu'elle soit remerciée pour ses conseils avisés et sa disponibilité permanente, quelles que soient les circonstances. Je garderai un très bon souvenir de notre collaboration sur le dossier de l'animalerie.

Monsieur le Docteur Thierry OSTER m'a toujours témoigné sa sympathie et je garde d'excellents souvenirs de nos conversations. Il aura su aiguïser ma réflexion et mon sens critique et je lui en suis très reconnaissant.

Le Docteur Badreddine KRIEM m'a inculqué les bases de l'expérimentation animale et a ainsi complété ma formation de Médecin par une initiation à la Science Vétérinaire.

Nicolas FISCHER aura tout spécialement contribué aux expérimentations qui sont ici présentées. Qu'il soit encore une fois remercié pour sa compétence, son enthousiasme et sa bonne humeur permanente.

Dorine RIMET, Delphine WANIUSIOW et Laurent ROYER ont contribué à instaurer une formidable ambiance dans le bureau des étudiants. Qu'ils soient à leur tour remerciés pour leur compétence et leur dévouement au laboratoire, ainsi que pour tous les formidables moments que nous avons pu vivre *after work*.

Mes collègues étudiants du Laboratoire LIPIDOMIX ont su créer une formidable ambiance de travail, empreinte à la fois de camaraderie, de chaleur humaine, de compétence et d'un humour particulièrement ravageur et communicatif.

Le Docteur Christophe STENGER m'a entouré de ses avis et conseils judicieux et m'a assuré un soutien permanent. Tous mes vœux de réussite et d'épanouissement l'accompagnent pour ses études de Médecine. Qu'il soit assuré, ainsi que Diane et Manon, de ma profonde sympathie et de mon indéfectible amitié.

Le Docteur Pierre GARCIA a été notre référence pour les tests comportementaux et la Neurobiologie. Son aide aura été très précieuse. Qu'il trouve ici toute l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié sans faille.

Le Docteur Ihsen YOUSSEF a également beaucoup contribué à ce travail de Thèse et m'a témoigné sa sympathie et sa confiance en maintes occasions. Qu'il soit également assuré de ma reconnaissance et de mon amitié.

Les Docteurs Sabrina FLORENT-BECHARD, Marine HANSE, Samina AKBAR et Ahmad ALLOUCHE auront partagé mon quotidien de Thésard et ont toujours su faire preuve d'une constante bienveillance à mon égard. Qu'ils soient ici chaleureusement remerciés pour cette ambiance agréable qu'ils ont contribué à créer. Mon amitié et mes meilleurs souvenirs les accompagnent dans leur vie « après la Thèse ».

Tout le personnel du Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire de l'Hôpital Central m'a chaleureusement accueilli lorsque je débarquais de la capitale et a tout de suite su m'intégrer dans cette équipe.

Madame le Docteur Sophie FREMONT-ORLOWSKI et Monsieur le Docteur Michel GOT m'ont réservé le meilleur accueil et m'ont toujours témoigné confiance et sympathie. Qu'ils soient remerciés pour leurs qualités humaines et leur professionnalisme.

Madame Chantal FOIS a toujours su me témoigner une gentillesse et une disponibilité constantes tout au long de mon séjour dans le Laboratoire. Qu'elle soit ici chaleureusement remerciée pour l'aide qu'elle a su m'apporter et la bonne ambiance qu'elle a contribué à instaurer dans le Service.

Madame Marie-Christine ESCANYE m'a fait bénéficier de ses compétences en Biologie, à la fois à LIPIDOMIX et au laboratoire hospitalier. Son aide technique et ses qualités auront été particulièrement appréciées. Qu'elle soit ici remerciée pour sa présence discrète, mais efficace, et sa gentillesse.

Les Techniciens du Laboratoire m'ont immédiatement intégré à leur équipe et m'ont témoigné confiance et sympathie. Qu'ils soient remerciés pour l'excellente ambiance de travail qu'ils ont su créer, ainsi que pour leurs grandes qualités, tant humaines que professionnelles. Une pensée toute particulière va à Arlette et à Mathieu.

Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE et Monsieur le Docteur Jean DEVIGNES, du Laboratoire d'Hématologie, et Monsieur le Docteur Stéphane ALBIZATTI, du Service d'Accueil et d'Urgences Adultes, m'ont fait partager leurs connaissances dans leurs disciplines respectives et ont su mettre en place de passionnantes discussions clinico-biologiques. Qu'ils soient ici chaleureusement remerciés pour la qualité de nos échanges et la cordialité de nos relations.

Monsieur le Professeur Jean-Louis GUEANT et les Enseignants-chercheurs de Biochimie et Biologie moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy m'ont réservé le meilleur accueil lors de mon arrivée comme Assistant Hospitalo Universitaire et m'ont toujours témoigné leur sympathie. Qu'ils soient remerciés pour ces trois années passées à la Faculté de Médecine de Nancy.

Mes collègues du Laboratoire de Biochimie et du Pôle de Biologie Pathologie du Centre Hospitalier du Mans m'ont accueilli dans ma nouvelle affectation et m'ont dès le début intégré à leur sympathique équipe.

Madame le Docteur Fabienne PINEAU-VINCENT, Madame le Docteur Martine LELONG, Madame le Docteur Saga LE BOURDELLES et Monsieur le Docteur Olivier GAILLARD ont su tout mettre en œuvre pour que mon arrivée dans le Pôle se déroule dans les meilleures conditions. Qu'ils soient remerciés pour tous les bons moments partagés, les projets réalisés et ceux que nous conduirons dans l'avenir. Ils ont su mettre en place un climat favorable à la poursuite de ce travail de Thèse et à son accomplissement. Qu'ils en soient remerciés du fond du cœur.

Les Techniciens du Laboratoire de Biochimie m'ont également réservé le meilleur accueil et m'ont accordé leur confiance dès le début. Qu'ils soient tous remerciés pour leur investissement et leurs grandes qualités, tant humaines que professionnelles.

De nombreux Confrères croisés au cours de mes études de Médecine m'ont fait bénéficier de leurs compétences et m'ont énormément apporté : Mesdames les Professeurs Diane DAMOTTE, Martine BELJEAN-LEYMARIE, Monsieur le Professeur Stéphane OUDARD, Mesdames les Docteurs Marie-Alexandra ALYANAKIAN, Catherine SETTEGRANA, Messieurs les Docteurs Olivier ADOTEVI et Eugeniu BANU... Qu'ils soient assurés de mon meilleur souvenir, comme de ma plus sincère reconnaissance.

Madame le Professeur Annie DESBENE (Maman), Monsieur le Professeur Paul-Louis DESBENE (Papa), Madame le Docteur Catherine DESBENE (Marraine), Monsieur le Docteur Olivier GAILLARD, Monsieur le Docteur Christophe STENGER et Monsieur le Docteur Pierre GARCIA ont relu et commenté le présent manuscrit. Qu'ils soient tous remerciés pour leur aide précieuse et leur contribution à ce travail.

PLAN

RESUME	2
SUMMARY	3
REMERCIEMENTS	7
PLAN	12
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX	19
LISTE DES ABREVIATIONS	20
INTRODUCTION	26
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	29
Partie I : Mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer : connaissances et hypothèses	30
I – 1 Présentation clinique de la maladie d'Alzheimer	30
I – 2 Les protéines Tau et APP : des protéines critiques dans la maladie d'Alzheimer....	35
I – 3 Peptide β -amyloïde : l'agent principal de la maladie d'Alzheimer ?.....	66
Partie II : Phospholipase A ₂ cytosolique, implication potentielle dans la maladie d'Alzheimer	84
II – 1 La phospholipase A ₂ cytosolique dans le monde des autres phospholipases A ₂	85
II – 2 La phospholipase A ₂ cytosolique, une structure et une régulation particulières ...	94
II – 3 Fonctions physiologiques et implication potentielle de la cPLA ₂ dans la maladie d'Alzheimer et les pathologies neurodégénératives	106
II – 4. Inhibiteurs thérapeutiques de la cPLA ₂ : état actuel des travaux.....	127
Partie III : Modèles animaux d'études de la maladie d'Alzheimer	136
III – 1 Modèles transgéniques de la maladie d'Alzheimer	137
III – 2 Modèles d'injection intracérébrale de peptide A β	146
III – 3 Intérêts potentiels des modèles d'injection de peptide A β par rapport aux modèles transgéniques	168
III – 4 Autres modèles d'étude de la maladie d'Alzheimer	172
RESULTATS ANTERIEURS DU LABORATOIRE, HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS	173
MATERIEL ET METHODES	176
I – Animaux et manipulations animales	176
I – 1 Origine et hébergement des animaux.....	176
I – 2 Entretien de la lignée transgénique et génotypage	176
I – 3 Techniques d'injection intracérébroventriculaire	180
I – 4 Analyses comportementales	182
I – 5 Préparation des échantillons tissulaires pour analyses biochimiques.....	189
II – Cultures cellulaires et expérimentations <i>in vitro</i> sur neurones corticaux	191
II – 1 Cultures de neurones corticaux et de cellules HEK exprimant la protéine APP humaine.....	191
II – 2 Traitements par le peptide A β et les inhibiteurs.....	194
II – 3 Préparation des échantillons cellulaires.....	196
II – 4 Etude de la viabilité cellulaire	196
III – Techniques d'analyse biochimiques.....	199
III – 1 Préparation des oligomères solubles de peptide A β	199
III – 2 Détermination de la concentration en protéines	199
III – 3 Mesure des activités sphingomyélinases	200
III – 4 Electrophorèse en conditions dénaturantes et immunoblot.....	201

III – 5 Dosage intra-tissulaire d’interleukine 1 β	205
III – 6 Etude de l’expression du gène de l’APP au niveau de structures cérébrales par RT-PCR.....	208
IV – Analyses statistiques et exploitation des données	212
RESULTATS.....	213
I – Neurotoxicité du peptide A β oligomérique et protection conférée par l’inactivation de la cPLA ₂	213
I – 1 Effet des oligomères A β sur la mémoire à court terme, implication de la cPLA ₂ ..	213
I – 2 Effet des oligomères A β sur la mémoire à long terme, implication de la cPLA ₂	214
I – 3 Protection conférée par une délétion partielle de la cPLA ₂ : étude des animaux hétérozygotes.....	219
I – 4 Oligomères A β et perte synaptique, implication de la cPLA ₂	223
I – 5 Résistance des neurones cPLA ₂ ^{-/-} aux oligomères de peptide A β	224
I – 6 Conclusion	227
II – Fonctions physiologiques et voies de transduction impliquées dans la résistance des souris cPLA ₂ ^{-/-} à la neurotoxicité des oligomères A β	229
II – 1 Activation de la cPLA ₂ par les oligomères A β	229
II – 2 Neuro inflammation et effets rapides des oligomères solubles de peptide A β ...	232
II – 3 Peptide A β oligomérique et équilibre survie / apoptose des neurones : implication de la cPLA ₂	239
II – 4 Conclusion	244
III – Recherche d’un mécanisme de résistance aux oligomères solubles de peptide A β induit par l’inactivation de la cPLA ₂	246
III – 1 Effet de l’inhibition de la protéine kinase C ζ sur la sensibilité des neurones aux effets pro apoptotiques des oligomères solubles de peptide A β	246
III – 2 Rôle de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) dans la résistance aux effets délétères des oligomères de peptide A β	250
III – 3 Relations entre expression des protéines cPLA ₂ et APP : Origine de la résistance des souris cPLA ₂ ^{-/-} ?	252
III – 4 Conclusion	260
DISCUSSION	262
I – Intérêts du modèle d’injection intra cérébro ventriculaire des oligomères solubles de peptide A β pour l’étude du rôle de la cPLA ₂ dans les phases précoces de la maladie d’Alzheimer	263
I – 1 Similitudes entre le modèle d’injection de peptide A β soluble et les modèles transgéniques par rapport à l’implication de la cPLA ₂ dans la maladie d’Alzheimer	263
I – 2 Complémentarités entre le modèle d’injection de peptide A β soluble et les modèles transgéniques : des stades différents de la maladie d’Alzheimer	265
II – Implication de la cPLA ₂ dans les voies de transduction aboutissant à l’apoptose neuronale et à la perte des synapses.....	268
II – 1 cPLA ₂ et neurotoxicité des oligomères solubles de peptide A β	268
II – 2 cPLA ₂ et synaptotoxicité des oligomères de peptide A β	270
III – Protection contre la neurotoxicité des oligomères de peptide A β et cPLA ₂ : quel(s) mécanismes(s) ?	274
III – 1 Implication de la PKC ζ dans la genèse de la protection contre les effets délétères du peptide A β soluble	274
III – 2 Implication de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) dans la genèse de la protection contre les effets délétères du peptide A β	276

III – 3 Implication de la protéine APP dans la genèse de la protection contre les effets délétères du peptide A β soluble	279
III – 4 Participation des phénomènes d'excitotoxicité à la protection contre les effets délétères du peptide A β soluble	283
IV – Perspectives	286
IV – 1 La résistance des souris cPLA $_2^{-/-}$ aux oligomères de peptide A β , un effet direct de l'inhibition de la cPLA $_2$ ou un phénomène adaptatif ?	286
IV – 2 La cPLA $_2$ et la voie de l'acide arachidonique comme cibles thérapeutiques pour la prévention et/ou le traitement de la maladie d'Alzheimer	288
CONCLUSION	293
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	296
PUBLICATIONS	340
Article 1	341
Article 2	342
Revue 1	343
Revue 2	344
COMMUNICATIONS	345
Communication orale 1	346
Communication orale 2	347
Communication orale 3	348
Communication orale 4	349

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
<u>1</u>	<u>Aspects histologiques des dégénérescences neurofibrillaires</u>	<u>37</u>
<u>2</u>	<u>Stades de Braak – Evolution spatiotemporelle de la localisation des dégénérescences neurofibrillaires en fonction du stade évolutif de la maladie d'Alzheimer</u>	<u>37</u>
<u>3</u>	<u>Etude immuno histochimique d'une plaque amyloïde dans la région du gyrus denté de l'hippocampe d'une souris transgénique PSAPP, modèle murin de la MA, âgée de 19 mois</u>	<u>39</u>
<u>4</u>	<u>Activation astrogliale à proximité des plaques amyloïdes</u>	<u>41</u>
<u>5</u>	<u>Modélisation de l'angiopathie amyloïde dans le cortex d'une souris transgénique PS1/APP, par imagerie multi photons <i>in vivo</i></u>	<u>41</u>
<u>6</u>	<u>Domaines structuraux des différentes isoformes de la protéine Tau exprimées dans le cerveau humain</u>	<u>43</u>
<u>7</u>	<u>Conséquences de l'hyperphosphorylation de Tau dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer et des autres tauopathies</u>	<u>45</u>
<u>8</u>	<u>Hyperphosphorylation de Tau au cours de la maladie d'Alzheimer</u>	<u>47</u>
<u>9</u>	<u>Différentes isoformes de la protéine APP</u>	<u>49</u>
<u>10</u>	<u>Les différents domaines de l'APP</u>	<u>51</u>
<u>11</u>	<u>Trafic intra cellulaire de la protéine APP</u>	<u>55</u>
<u>12</u>	<u>Les deux voies de dégradation de la protéine APP</u>	<u>56</u>
<u>13</u>	<u>Représentation schématique du clivage de l'APP <i>in situ</i></u>	<u>59</u>
<u>14</u>	<u>Structure tridimensionnelle du peptide Aβ</u>	<u>67</u>
<u>15</u>	<u>Modélisation des changements structuraux du peptide Aβ associés à la fibrillogénèse</u>	<u>68</u>
<u>16</u>	<u>Toxicité des oligomères solubles de peptide Aβ : cibles potentielles et toxicité directe</u>	<u>79</u>
<u>17</u>	<u>Composition d'un canal amyloïde</u>	<u>81</u>
<u>18</u>	<u>Action des phospholipases</u>	<u>85</u>
<u>19</u>	<u>Structure tridimensionnelle de la cPLA₂</u>	<u>95</u>
<u>20</u>	<u>Mécanisme d'action possible de la cPLA₂α</u>	<u>95</u>
<u>21</u>	<u>Domaine catalytique de la cPLA₂</u>	<u>96</u>
<u>22</u>	<u>Paralogues de la cPLA₂ : Les membres du groupe IV des PLA₂</u>	<u>98</u>
<u>23</u>	<u>Structure et activation de la cPLA₂</u>	<u>100</u>
<u>24</u>	<u>Représentation schématique du promoteur du gène de la cPLA₂</u>	<u>103</u>
<u>25</u>	<u>Implication de la cPLA₂ dans la prolifération et l'apoptose cellulaires</u>	<u>113</u>
<u>26</u>	<u>Action des acides gras poly insaturés sur la syntaxine 1</u>	<u>115</u>
<u>27</u>	<u>Effet de l'hydrolyse des phospholipides membranaires sur la courbure des membranes cellulaires</u>	<u>117</u>
<u>28</u>	<u>Modèle biochimique intégrant la modulation de la plasticité synaptique par la cPLA₂ et la cascade de l'acide arachidonique</u>	<u>120</u>
<u>29</u>	<u>Implication de la cPLA₂ dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Voies d'activation potentielles et principaux mécanismes effecteurs</u>	<u>126</u>
<u>30</u>	<u>Structure chimique de l'arachidonyl trifluorométhyl ketone</u>	<u>128</u>
<u>31</u>	<u>Structure chimique du méthyl arachidonyl fluorophosphate</u>	<u>128</u>
<u>32</u>	<u>Structure chimique de la bromoenol lactone</u>	<u>129</u>
<u>33</u>	<u>Structures chimiques de la pyrrolidine-1 et de la pyrrophénone</u>	<u>130</u>
<u>34</u>	<u>Structures chimiques du benzènesulfonamide et de la 4-alkoxybenzamidine</u>	<u>131</u>

Numéro	Titre	Page
35	Structure chimique de l'acide 3-(pyrrol)-2-propionique	131
36	Structure chimique d'un dérivé 2-oxoamide	132
37	Structure chimique de la CDP-choline	132
38	Structure chimique de la carbamazépine	133
39	Principales cibles d'action des médicaments thymorégulateurs dans le métabolisme de l'acide arachidonique	134
40	Représentation schématique des mécanismes physiopathologiques de la MA reproduits par ses différents modèles <i>in vivo</i> (transgéniques vs administration exogène)	170
41	Inactivation du gène de la cPLA₂	178
42	Principe et exemple du génotypage des souris cPLA₂^{-/-}	178
43	Coupe horizontale d'un cerveau de souris après coloration à l'hématoxyline éosine	181
44	Radiographie d'un crâne de souris indiquant les différents repères anatomiques utilisés comme référence pour les injections stéréotaxiques de peptide Aβ soluble	181
45	Chronologie des différents tests comportementaux effectués après l'injection intra cérébro ventriculaire de peptide Aβ soluble	183
46	Labyrinthe en Y ou <i>Y-maze test</i>	184
47	Labyrinthe aquatique de Morris ou <i>Morris water maze</i>	186
48	Système de <i>video tracking</i> utilisé pour l'exploitation quantitative des déplacements de la souris dans le labyrinthe aquatique de Morris	186
49	Etapas du labyrinthe aquatique de Morris : chronologie et objectifs	188
50	Structure chimique du méthyl arachidonyl fluorophosphonate	195
51	Séquence peptidique et principe de l'inhibition de la PKCζ par son pseudo substrat	195
52	Contrôle d'une préparation d'oligomères solubles de peptide Aβ par électrophorèse SDS-PAGE	199
53	Schéma explicatif du dosage de l'activité sphingomyélinases acides et neutres sur les neurones corticaux primaires	202
54	Principe du test ELISA utilisé pour la détermination de la concentration en IL-1β dans les échantillons tissulaires de cerveaux de souris	207
55	Exploration des capacités locomotrices des souris : nombres d'entrées totales réalisées dans les bras du labyrinthe en Y	215
56	Exploration de la mémoire de travail : pourcentage d'alternances spontanées des différents groupes expérimentaux dans le labyrinthe en Y	215
57	Evaluation des capacités d'apprentissage des souris grâce au labyrinthe aquatique de Morris	216
58	Exploration de la mémoire à long terme au cours de la dernière phase du labyrinthe aquatique de Morris : délai de premier passage sur l'emplacement initial de la plateforme	217
59	Exploration de la mémoire à long terme au cours de la dernière phase du labyrinthe aquatique de Morris: temps passés par les souris dans les différents quadrants de la piscine	218
60	Etude de la mémoire de travail chez les souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{+/-} injectées avec le peptide Aβ oligomérique	221
61	Exploration des capacités d'apprentissage des souris grâce au labyrinthe aquatique de Morris	221
62	Exploration de la mémoire à long terme au cours de la dernière phase du labyrinthe aquatique de Morris : nombre de passages et délai de premier passage sur le quadrant cible (position initiale de la plateforme)	222

Numéro	Titre	Page
63	Etude des niveaux d'expression de protéines synaptiques : synaptophysine, synaptotagmine et PSD95, dans les fractions membranaires préparées à partir d'hippocampes de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} après injection ICV de peptide Aβ ou de soluté contrôle	224
64	Etude de l'apoptose induite par l'exposition de neurones corticaux en culture primaire aux oligomères solubles de peptide Aβ pendant 24 heures	226
65	Etude des protéines synaptiques dans des neurones en culture primaire exposés aux oligomères solubles de peptide Aβ	226
66	Mesure du niveau de phosphorylation de la cPLA₂ sur la sérine 505 dans des homogénats d'hippocampe, 6 heures après injection ICV d'oligomères solubles de peptide Aβ	231
67	Mesure du niveau de phosphorylation de la cPLA₂ sur la sérine 505 dans des homogénats d'hippocampe, 24 heures après injection ICV d'oligomères solubles de peptide Aβ	231
68	Etude de la phosphorylation de la kinase ERK1/2 dans des homogénats d'hippocampe et de cortex après injection ICV de peptide Aβ soluble chez des souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-}	233
69	Cinétique de l'expression de la <i>glial fibrillary acidic protein</i> (GFAP) après injection ICV de peptide Aβ soluble ou de soluté contrôle chez des souris cPLA₂^{+/+}	235
70	Cinétique de l'expression de la <i>ionized calcium binding adapter molecule 1</i> (Iba1) après injection ICV de peptide Aβ soluble ou de soluté contrôle chez des souris cPLA₂^{+/+}	237
71	Etude de la cinétique de la concentration intra tissulaire en interleukine 1β dans l'hippocampe de souris cPLA₂^{+/+} après administration de peptide Aβ oligomérique	239
72	Etude de la phosphorylation de la kinase Akt dans des homogénats d'hippocampe et de cortex, 7 jours après injection intra cérébro ventriculaire de 500 pmol d'oligomères solubles de peptide Aβ ou de PBS chez des souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-}	241
73	Etude de la phosphorylation de la kinase Akt dans des neurones corticaux en culture primaire exposés aux oligomères solubles de peptide Aβ	242
74	Activation des sphingomyélinases acides et neutres après exposition de neurones corticaux de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} aux oligomères solubles de peptide Aβ 1μM pendant 6 heures	244
75	Toxicité du pseudo substrat de la PKCζ	248
76	Protection conférée aux neurones primaires, par l'inhibition pharmacologique de la PKCζ, contre l'apoptose induite par les oligomères solubles de peptide Aβ	248
77	Homologie de séquence du pseudo substrat de la PKCζ	249
78	Phosphorylation de la glycogène synthase kinase 3β au niveau d'homogénats d'hippocampe de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} après administration d'oligomères solubles de peptide Aβ	251
79	Expression de la protéine APP dans des homogénats d'hippocampe de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+}	254
80	Expression de la protéine APP dans des cultures primaires de neurones corticaux de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+}	254
81	Effet de l'inhibition pharmacologique de la cPLA₂ par le MAFP sur l'expression de la protéine APP dans des cultures primaires de neurones corticaux de rats	255
82	Effet de l'inhibition de l'expression de la cPLA₂ par des oligonucléotides antisens sur l'expression de la protéine APP dans des cultures primaires de neurones corticaux de rats	256

Numéro	Titre	Page
<u>83</u>	<u>Expression du gène de la protéine APP au niveau de l'hippocampe de souris et influence de l'inactivation du gène de la cPLA₂</u>	<u>259</u>
<u>84</u>	<u>Sensibilité à l'apoptose induite par les oligomères solubles de peptide Aβ dans un système de cellules HEK exprimant la protéine APP humaine non mutée</u>	<u>259</u>
<u>85</u>	<u>Implication de la cPLA₂ dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer : intérêt de l'utilisation du modèle murin d'injection intra cérébro ventriculaire</u>	<u>266</u>
<u>86</u>	<u>Implication de la cPLA₂ dans la médiation de la toxicité des oligomères solubles de peptide Aβ</u>	<u>269</u>
<u>87</u>	<u>Implication de la PKCζ dans la médiation de la toxicité des oligomères solubles de peptide Aβ via l'activation de la cPLA₂</u>	<u>275</u>
<u>88</u>	<u>Interactions entre les différentes voies pathogènes au sein de la maladie d'Alzheimer : Lien entre la signalisation Aβ et GSK-3β</u>	<u>278</u>
<u>89</u>	<u>Implication de la protéine APP et de la cPLA₂ dans la médiation des effets délétères des oligomères solubles de peptide Aβ</u>	<u>282</u>
<u>90</u>	<u>Implication de la cPLA₂ dans les phénomènes d'excitotoxicité</u>	<u>284</u>
<u>91</u>	<u>Modulation <i>in vivo</i> de l'expression de la cPLA₂ au niveau de l'hippocampe, par des injections intra cérébro ventriculaires répétées d'oligonucléotides antisens couplés à la pénétratine</u>	<u>289</u>

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page(s)
<u>1</u>	<u>Prévalence de la maladie d'Alzheimer en France en fonction de l'âge et du sexe</u>	<u>33</u>
<u>2</u>	<u>Phospholipases A₂ utilisant une histidine dans leur site catalytique</u>	<u>87</u>
<u>3</u>	<u>Phospholipases A₂ utilisant une sérine dans leur site catalytique</u>	<u>88</u>
<u>4</u>	<u>Caractéristiques des principales catégories de phospholipases A₂</u>	<u>88</u>
<u>5</u>	<u>Souris transgéniques pour la protéine APP</u>	<u>139</u>
<u>6</u>	<u>Souris transgéniques pour les protéines APP/PS</u>	<u>143</u>
<u>7</u>	<u>Souris double-transgéniques APP/BACE1, APP/Tau, APP/ApoE et triple-transgéniques APP/PS/Tau</u>	<u>145</u>
<u>8</u>	<u>Effets comportementaux de l'injection de peptide Aβ chez le rat</u>	<u>147-50</u>
<u>9</u>	<u>Effets cellulaires de l'injection de peptide Aβ chez le rat</u>	<u>151-5</u>
<u>10</u>	<u>Effets comportementaux de l'injection de peptide Aβ chez la souris</u>	<u>156-8</u>
<u>11</u>	<u>Effets cellulaires de l'injection de peptide Aβ chez la souris</u>	<u>159-60</u>
<u>12</u>	<u>Croisement des souris en vue de l'entretien de la lignée cPLA₂^{-/-}</u>	<u>177</u>
<u>13</u>	<u>Croisement des souris en vue de l'obtention des différents génotypes nécessaires aux expérimentations</u>	<u>177</u>
<u>14</u>	<u>Composition des différents milieux utilisés pour la culture primaire de neurones corticaux embryonnaires de souris et de rat</u>	<u>192</u>
<u>15</u>	<u>Récaptulatif des différents traitements utilisés sur les neurones corticaux embryonnaires en culture primaire</u>	<u>195</u>
<u>16</u>	<u>Oligonucléotides antisens utilisés pour l'inhibition de l'expression de la cPLA₂ dans les neurones corticaux en culture primaire</u>	<u>196</u>
<u>17</u>	<u>Anticorps primaires utilisés pour les immunoblots</u>	<u>205</u>
<u>18</u>	<u>Anticorps secondaires utilisés pour les immunoblots</u>	<u>205</u>
<u>19</u>	<u>Amorces utilisées pour la RT-PCR du gène de l'APP et de l'ARNr 18s dans des échantillons d'hippocampe de souris</u>	<u>208</u>

LISTE DES ABREVIATIONS

A	
AA	Acide arachidonique
aa	Acide aminé
AAC	Angiopathie amyloïde congophile
AACOCF3	Arachidonyl trifluoromethyl cétone
Ac	Anticorps
AChR	Récepteur à l'acétylcholine
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADDLs	<i>Aβ-derived diffusible ligands</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AG	Acide gras
Ag	Antigène
AGL	Acide gras libre
AGPI	Acide gras poly insaturé
AICD	<i>Amyloid precursor protein Intracellular Cytoplasmic/C-terminal Domain</i>
AINS	Anti inflammatoires non stéroïdiens
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (analyse de variance)
APH-1	<i>Anterior pharynx defective 1a homologue</i>
APLP	<i>Amyloid precursor like protein</i>
ApoE	Apolipoprotéine E
ApoJ	Clusterine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> (protéine précurseur du peptide β -amyloïde)
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférant
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
A-SMase	Sphingomyélinase acide
ASO	<i>Antisense oligonucleotide</i> (oligonucleotide antisens)
ATP	Adénosine tri phosphate
B	
BACE1	<i>β-site APP cleaving enzyme 1</i>
BACE2	<i>β-site APP cleaving enzyme 2</i>
BCA	Acide bicinchoninique
BEL	Bromoénol lactone
BHE	Barrière hémato encéphalique
C	
CaLB	<i>Ca²⁺ Lipid Binding domain</i>
CAPPD	<i>Central APP domain</i> (domaine central de l'APP)
CBZ	Carbamazépine
CCD	<i>Charge-coupled device</i> (dispositif à transfert de charge)
cdk	<i>Cyclin-dependant kinase</i> (kinase dépendante des cyclines)
CDP-amines	Cytidine-5-diphosphoamines
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> (cellules ovariennes de cochon d'Inde)
CLAC	<i>Collagenous Alzheimer Amyloid Plaque Component</i>
CLU	Clusterine

CoA	Coenzyme A
COX	Cyclooxygénase
cPLA ₂	Phospholipase A ₂ cytosolique
CRE	<i>Corticoid response element</i> (élément de réponse aux corticoïdes)
C-ter	Carboxy terminal
CTF	<i>C-terminal fragment</i> (fragment C-terminal)
CuBD	<i>Copper binding domain</i> (domaine de liaison au cuivre)
D	
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
DAPI	4,6-diamidino-2- phénylindole
DHA	Acide docosahexaénoïque
DIV	<i>Day in vitro</i> (jours de culture <i>in vitro</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Milieu de Eagle modifié par Dulbecco)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNF	Dégénérescence neuro fibrillaire
dNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
E	
EC	Endocannabinoïdes
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (chimiluminescence amplifiée)
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EGF	<i>Epithelial growth factor</i> (Facteur de croissance épithélial)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EntnCx	Cortex enthorhinal
EPA	Acide éicosapentaénoïque
EphB2	Ephrine B2
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases-1/2</i>
F	
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i>
Fz	<i>Frizzled</i>
G	
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
γ-IRE	<i>γ-interferon response element</i>
GAPDH	Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (protéine acide fibrillaire gliale)
GFLD	<i>Growth factor like domain</i>
GlcNAc	β-N-acétylglucosamine
GluR2	Sous unité 2 du récepteur au glutamate de type AMBA
GSAP	<i>γ-secretase activating protein</i> (protéine activatrice de la γ-sécrétase)
GSK3-β	Glycogen synthase kinase 3-β
GTP	Guanosine triphosphate
H	
h	Heure
HEK	<i>Human embryonic kidney</i> (cellules rénales embryonnaires humaines)
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique
HFS	<i>High frequency stimulation</i> (stimulation à haute fréquence)
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA
HMU-P-chol	6-hexadecanoyl amino-4-méthyl umbelliféryl phosphocholine
4-HNE	4-Hydroxynonéal
HPETE	Acide hydroperoxy-eicosatétraénoïque
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxydase du raifort)

HTSMC	<i>Human Tracheal Smooth Muscle Cells</i> (cellules musculaires lisses trachéales humaines)
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (cellules endothéliales de cordon ombilical humain)
I	
Iba1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
IC50	Concentration inhibitrice médiane
ICV	Intra cérébro ventriculaire (injection)
IFN- γ	Interferon γ
Igf-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
Ig	Immunoglobuline
IL-1 β	Interleukine 1 β
Inr	Élément initiateur (site d'initiation de la transcription)
iPLA ₂	Phospholipase A ₂ calcium indépendante
IP3	Inositol tri phosphate
IV	Intra veineux
J	
JE	Jour embryonnaire
JM	Juxta membranaire
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
K	
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Ki	Constante d'inhibition
KPI	<i>Kunitz proteases inhibitor</i> (domaine de liaison aux inhibiteurs de protéases de type Kunitz)
L	
LCR	Liquide céphalorachidien
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (lipoprotéine de basse densité)
LFS	<i>Low frequency stimulation</i> (stimulation à basse fréquence)
LKLF	<i>Lung Krüppel-like factor</i>
LOX	Lipoxygénase
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	<i>Low-density-lipoprotein-receptor-related protein</i>
LT	Leucotriène
LTD	<i>Long term depression</i> (dépression à long terme)
LTP	<i>Long term potentiation</i> (potentialisation à long terme)
LysoPL	Lysophospholipide
M	
M2	Milieu de croissance complet
MA	Maladie d'Alzheimer
MAFP	Méthyl arachidonyl fluorophosphonate
MAGL	Mono acyl glycerol lipase
MAP	<i>Microtubule associated protein</i> (protéine associée aux microtubules)
MAPK	MAP kinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
MCI	<i>Mild cognitive impairment</i> (déclin cognitif léger)
MEK	<i>Mitogen-activated protein / extracellular signal-regulated kinase kinase</i>
MH	Mix hormones
min	Minute
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1.2.3.6-tétrahydropyridine
MT	Microtubule
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

Munc-18	<i>Mammalian uncoordinated-18</i>
N	
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Nct	Nicastrine
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (Facteur de croissance nerveux)
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NOS	NO synthase
NPD1	Neuroprotectine D1
NSE	<i>Neuron specific enolase</i> (énolase spécifique des neurones)
N-SMase	Sphingomyélinase neutre
N-ter	Amino terminal
O	
OV	Ovalbumine
P	
PA	Plaque amyloïde
PAF	<i>Platelet activating factor</i> (Facteur d'activation plaquettaire)
PAF-AH	PAF-acétylhydrolase
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (électrophorèse en gel de poly acrylamide)
pb	Paire de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampon phosphate salin)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDE	Phosphodiesterases
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PEDF	<i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i>
PEN2	<i>Presenilin enhancer 2</i>
Peptide A β	Peptide β -amyloïde
PG	Prostaglandine
PH	<i>Pleckstrin homology (domain)</i>
PHF	<i>Paired helical filaments</i> (filaments hélicoïdaux appariés)
PI3	Inositol trisphosphate
PICALM	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
PICUP	<i>Photo-Induced Cross-linking of Unmodified Proteins</i>
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PKC ζ -PS	Pseudosubstrat de la PKC ζ
PL	Phospholipides
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PLsEtn-PLA ₂	PLA ₂ spécifique des plasmalogènes
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PME	Phosphomonoesters
PP	Protéine phosphatase
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssomes
PrP ^c	Protéine du prion (forme cellulaire)
PSD95	<i>Postsynaptic density protein 95</i>
PS1	Préséniline 1
PS2	Préséniline 2
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> (fluorure de polyvinylidène)

R	
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (formes réactives de l'oxygène)
RT-PCR	<i>Reverse transcription – polymerase chain reaction</i>
S	
s	Seconde
sAPP α	<i>Soluble N-terminal fragment</i>
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> (dodécylsulfate de sodium)
SEC-R	<i>Serpin complex receptor</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> (petit ARN interférent)
SMase	Sphingomyélinase
SNAP25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors</i>
SNC	Système nerveux central
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SorLA	<i>Sortilin related receptor</i> (ou SORL ou LR11)
Souris cPLA ₂ ^{+/+}	Souris de génotype cPLA ₂ sauvage
Souris cPLA ₂ ^{+/-}	Souris de génotype cPLA ₂ hétérozygote
Souris cPLA ₂ ^{-/-}	Souris de génotype cPLA ₂ inactivé (KO)
sPLA ₂	Phospholipase A ₂ sécrétoire
SVF	Sérum de veau fœtal
T	
TACE	<i>Tumor necrosis factor-α converting enzyme</i>
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (tampon)
TBST	<i>Tris-buffered saline – Tween 20</i> (tampon)
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TGN	<i>Trans Golgi network</i> (réseau trans Golgien)
TM	Trans membranaire
TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tub	Tubuline
TX	Thromboxane
U	
UTP	Uridine tri phosphate
V	
VIII	Troisième ventricule
VL	Ventricule latéral
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> (lipoprotéine de très basse densité)
W	
WT	<i>Wild type</i> (génotype sauvage)

Tableau des acides aminés

Nomenclature à 3 lettres

Ala	Alanine	Glu	Glutamate	Leu	Leucine	Ser	Sérine
Arg	Arginine	Gln	Glutamine	Lys	Lysine	Thr	Thréonine
Asn	Asparagine	Gly	Glycine	Met	Méthionine	Trp	Tryptophane
Asp	Aspartate	His	Histidine	Phe	Phénylalanine	Tyr	Tyrosine
Cys	Cystéine	Ile	Isoleucine	Pro	Proline	Val	Valine

Nomenclature à 1 lettre

A	Alanine	E	Glutamate	L	Leucine	S	Sérine
R	Arginine	Q	Glutamine	K	Lysine	T	Thréonine
N	Asparagine	G	Glycine	M	Méthionine	W	Tryptophane
D	Aspartate	H	Histidine	F	Phénylalanine	Y	Tyrosine
C	Cystéine	I	Isoleucine	P	Proline	V	Valine

Tableau des nucléotides

A	Adénosine	C	Cytidine	G	Guanosine	T	Thymidine
---	-----------	---	----------	---	-----------	---	-----------

INTRODUCTION

Actuellement, les maladies neurodégénératives, au premier rang desquelles figure la maladie d'Alzheimer ([MA](#)), constituent un véritable problème de santé publique, dont l'incidence va évoluer de manière croissante dans les décennies à venir, en raison du vieillissement de la population. En effet, ces pathologies sont directement liées à l'âge des patients, hormis quelques formes héréditaires, qui constituent des entités nosologiques particulières.

Une prise en charge cohérente de ces maladies implique à la fois le développement de moyens diagnostiques précoces, ainsi que celui de stratégies préventives et, éventuellement, curatives efficaces. La réalisation de ces objectifs se heurte à de multiples écueils : manque de modèles animaux pertinents, incapacité de ces derniers à reproduire fidèlement l'intégralité des aspects de la pathologie humaine, faible puissance des études épidémiologiques portant sur l'influence de l'environnement et de l'hérédité, absence de marqueur biologique précoce, difficulté du suivi de la maladie... Toutefois, le pré requis majeur réside dans la connaissance de la physiopathologie de la MA sur le plan moléculaire et cellulaire, qui demeure pour l'instant partiellement obscure. De nombreuses études, tant sur des modèles animaux que chez l'homme, suggèrent que les altérations cognitives observées au cours de la MA résulteraient d'un dysfonctionnement des synapses, puis de leur disparition ultérieure. Ces altérations seraient induites par les oligomères solubles du peptide bêta amyloïde ([peptide A \$\beta\$](#)).

Les voies de signalisation et les mécanismes, responsables de la toxicité synaptique des oligomères A β , sont très partiellement connus à l'heure actuelle et pourraient constituer autant de cibles thérapeutiques potentielles. Ces voies de toxicité peuvent mettre en jeu divers médiateurs, agissant comme des messagers intracellulaires et / ou synaptiques. Parmi ceux-ci, l'acide arachidonique ([AA](#), C20 :4 ω 6), acide gras polyinsaturé de la famille n-6 à longue chaîne, apparaît comme un candidat de choix. En effet, celui-ci est impliqué dans diverses fonctions neuronales et synaptiques comme la régulation de la transmission synaptique, les phénomènes de mémorisation, la médiation du signal rétrograde généré par l'activation des récepteurs au glutamate de type α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate ([AMPA](#)) et N-méthyl-D-aspartate ([NMDA](#)). Il peut également inhiber divers

canaux pré et post synaptiques, et régule la formation et le recyclage des vésicules synaptiques. Enfin, l'AA peut être transformé par diverses enzymes, en prostaglandines ([PG](#)) et en endocannabinoïdes ([EC](#)). Ces deux catégories de molécules constituent des médiateurs impliqués dans divers processus, notamment la signalisation synaptique et la neuroinflammation.

L'AA peut être libéré de la position sn-2 des phospholipides ([PL](#)) membranaires, sous l'action d'enzymes spécifiques : les phospholipases A₂ ([PLA₂](#)). De nombreuses enzymes appartiennent à cette grande famille des PLA₂. Celles-ci peuvent être classées selon leur localisation membranaire, cytosolique ou sécrétée, ainsi que selon leur dépendance vis-à-vis du calcium (Ca²⁺). Les neurones expriment différents types de PLA₂, notamment une enzyme cytosolique de 85 kDa, dépendant du Ca²⁺, et présentant une forte sélectivité pour les phospholipides contenant de l'AA. L'activation de cette PLA₂ cytosolique ([cPLA₂](#)) répond à deux évènements :

- la translocation de l'enzyme vers les membranes cellulaires, qui assure son accès aux PL qui lui servent de substrat,
- un afflux intracellulaire de Ca²⁺, qui lui confère son activité catalytique.

De plus, l'activité catalytique de la cPLA₂ est augmentée après sa phosphorylation par diverses kinases, en particulier les *mitogen activated protein kinases* ([MAPK](#)). Ces différents évènements sont également nécessaires pour la libération d'AA par la cPLA₂. Or, il a été montré que l'activation des MAPK et la perturbation de l'homéostasie du Ca²⁺ sont des altérations cellulaires observées au cours de la MA, ces dernières participant aux effets délétères des oligomères Aβ.

Le laboratoire Lipidomix avait précédemment montré que l'exposition de neurones aux oligomères Aβ entraîne une libération précoce d'AA, dépendante du Ca²⁺, associée à une translocation de la cPLA₂ au niveau de la membrane plasmique [[Kriem, 2005](#)]. Ces différents éléments suggèrent fortement que l'activation de la cPLA₂ et la libération d'AA, qui en résulte, constituent des éléments importants de la toxicité du peptide Aβ. Les mêmes travaux ont également montré que l'inhibition de la cPLA₂, à l'aide d'ASO ou d'inhibiteurs pharmacologiques, empêche le relargage d'AA en réponse au peptide Aβ et protège les neurones contre l'apoptose. Enfin, notre équipe avait aussi démontré que l'activation de la cPLA₂ par le peptide Aβ précède celle des sphingomyélinases ([SMases](#)) et la production de céramides associées à l'apoptose neuronale [[Malaplate-Armand, 2006](#)]. Ces travaux avaient été réalisés *in vitro* sur des cultures primaires de neurones embryonnaires murins.

Mon premier objectif a été de transposer sur un modèle animal les résultats précédemment rapportés *in vitro*, et ainsi de confirmer l'hypothèse que l'inhibition de la cPLA₂ confère également une résistance au peptide Aβ *in vivo*. Nous avons choisi, pour modèle d'inactivation constitutive de la cPLA₂, la souris cPLA₂^{-/-}, dans laquelle le gène de la cPLA₂α est inactivé par l'insertion d'une cassette *Neo*. Ceci a tout d'abord permis d'établir que la délétion constitutive de cette enzyme protège des neurones en culture contre l'apoptose induite par des oligomères solubles de peptide Aβ. Cette inactivation du gène assure aussi le maintien des voies de survie et de certains marqueurs synaptiques au niveau des neurones en culture. Dans un deuxième temps, nous avons montré que des souris cPLA₂^{-/-} résistent totalement aux altérations comportementales induites par des injections intracérébroventriculaires de peptide Aβ. Cette protection s'exerce à la fois au niveau du comportement des souris et dans le maintien de marqueurs synaptiques au niveau de l'hippocampe. Par ailleurs, nous avons montré que l'injection de peptide Aβ chez des souris sauvages s'accompagne d'une forte majoration de la phosphorylation de la cPLA₂ et témoigne de son activation en réponse au peptide Aβ *in vivo*. Enfin, nous avons cherché l'origine de cette protection chez les animaux cPLA₂^{-/-}, tant au niveau *in vitro* qu'*in vivo*. Nous avons rapidement focalisé nos recherches sur la protéine précurseur du peptide β-amyloïde (*amyloid precursor protein* ou [APP](#)). Celle-ci pourrait jouer un rôle critique dans la médiation de la toxicité des oligomères au niveau cellulaire et synaptique. En effet, les neurones primaires cPLA₂^{-/-} en culture expriment des niveaux moins importants de protéine APP que les neurones cPLA₂^{+/+}. De la même façon, des niveaux réduits de protéine APP ont été retrouvés dans l'hippocampe de souris cPLA₂^{-/-}, cette variation semble spécifique de cette région du cerveau. Ainsi, la protection conférée par l'inactivation de la cPLA₂ résulterait, du moins en partie, de la diminution d'expression de la protéine APP. Les mécanismes à l'origine de cette variation d'expression demeurent encore à préciser. Toutefois, la modulation du niveau d'expression d'APP, *via* le métabolisme des PL, pourrait constituer une approche intéressante pour la mise au point de nouvelles stratégies préventives, voire curatives, de la MA.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Nous allons dans un premier temps présenter la MA, en décrivant ses principales caractéristiques histologiques et ses différents mécanismes moléculaires, à savoir la cascade amyloïde et le rôle joué par la protéine Tau. Nous nous intéresserons ensuite plus particulièrement aux oligomères solubles de peptide A β , qui apparaissent actuellement comme des acteurs majeurs de la physiopathologie de la MA. Après avoir décrit l'hétérogénéité moléculaire de ces oligomères, nous évoquerons leurs divers mécanismes potentiels de toxicité sur les neurones.

Ensuite, nous présenterons la famille des PLA₂, sa diversité et sa classification. Après avoir passé en revue les principales PLA₂ et leur rôle respectif dans le cerveau, nous nous focaliserons sur la cPLA₂. Nous décrirons ainsi sa structure, son activité catalytique et ses différents paralogues. Les régulations de son expression et de son activité seront également abordées. Nous pourrons alors passer en revue les différentes fonctions physiologiques de la cPLA₂, en mettant un accent tout particulier sur la place qu'elle occupe dans le système nerveux central ([SNC](#)). Ceci nous permettra d'aborder dans le même temps son implication dans différents phénomènes pathologiques, en terminant sur sa participation à la pathogenèse de la MA.

Enfin, nous passerons en revue les différents modèles animaux disponibles pour étudier la MA, en abordant successivement les modèles murins transgéniques puis les injections intra-cérébrales de peptide A β .

Partie I : Mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer : connaissances et hypothèses

Une quantité considérable de travaux ont été ou sont actuellement menés sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de la MA. Nous nous concentrerons donc sur les aspects de cette pathologie en rapport avec notre travail.

Dans un premier temps, nous présenterons brièvement les aspects cliniques et épidémiologiques de la MA, qui peuvent apporter un éclairage sur ses aspects moléculaires.

Ensuite, nous aborderons la physiopathologie de cette maladie, en insistant plus particulièrement sur le rôle pathogène majeur des oligomères solubles de peptide A β , ainsi que sur le métabolisme de la protéine APP, dont ils dérivent.

Enfin, nous présenterons les différents modèles *in vivo* de MA, en développant les avantages de celui utilisé par notre équipe.

I – 1 Présentation clinique de la maladie d'Alzheimer

A l'heure actuelle, le diagnostic de certitude de la MA repose encore sur l'examen histopathologique *post mortem* du cerveau des patients. De fait, le diagnostic de la MA demeure essentiellement clinique et repose quasi exclusivement sur des tests neuropsychologiques.

I – 1 a. Symptômes et évolution de la MA

Le début de la MA est très progressif et insidieux, notamment chez les sujets âgés de plus de 65 ans. De ce fait, le diagnostic est très souvent tardif : un délai extrêmement variable sépare l'apparition des premières lésions de la MA et le diagnostic, cette période pouvant même dépasser les 20 ans. Comme les premières lésions atteignent le lobe temporal, et plus particulièrement l'hippocampe, les premiers signes de la MA se traduisent par un syndrome amnésique de type hippocampique. Ce déficit mnésique touche principalement la mémoire à court terme (ou mémoire épisodique). Une anosognosie (inconscience du déficit) empêche le patient de prendre conscience de cette perte mnésique.

Par ailleurs, le patient souffre de désorientation temporo-spatiale, qui l'empêche de s'orienter correctement et entraîne des égarements. A un stade encore peu avancé, qualifié de déclin cognitif léger (ou [MCI](#) pour *Mild cognitive impairment*), le malade présente une

perte de l'initiative, des troubles du langage et devient incapable d'effectuer des tâches de moins en moins complexes. Ultérieurement, les atteintes gagnent les autres lobes cérébraux, ce qui provoque un infléchissement progressif de l'ensemble des fonctions supérieures, comme le langage, la motricité, l'identification visuelle. On note ensuite des troubles du comportement, en particulier une agitation et une perte du rythme circadien. Divers troubles de l'humeur, voire des manifestations psychiatriques (délires, hallucinations) peuvent également être associés. Dans ses phases les plus tardives, la MA devient une véritable démence, se manifestant par un syndrome aphaso apraxo agnosique, composé de :

- une aphasie (trouble du langage), avec un manque du mot,
- une apraxie (troubles d'exécution des gestes et tâches complexes), qui porte sur des actions de plus en plus simples et courantes,
- une agnosie (déficit des capacités d'abstraction et de conceptualisation).

Finalement, les déficits des fonctions supérieures rendent le malade totalement dépendant, et le conduisent à un état grabataire. Le décès résulte des complications du décubitus permanent, telles que des infections urinaires, des accidents thromboemboliques, des escarres,...).

I – 1 b. Formes familiales et sporadiques de la MA

La MA recouvre deux entités très différentes, à la fois en termes d'épidémiologie, d'évolution et, très probablement, de physiopathologie. On distingue, en effet, les formes familiales des formes sporadiques de MA.

Les cas familiaux de MA sont extrêmement minoritaires, puisque leur incidence représente moins de 1 % des cas recensés [[Bekris, 2010](#)]. Leur début apparaît particulièrement précoce par rapport aux formes communes de MA (avant 65 ans) et leur évolution s'avère plus rapide. Dans ces formes familiales, la maladie se transmet entre les générations sur un mode autosomique dominant, comme toute autre maladie monogénique autosomique. Comme nous le verrons plus loin, dans le chapitre consacré à la physiopathologie moléculaire de la MA, les gènes mutés dans ces formes familiales codent pour l'APP et des enzymes assurant son métabolisme (présénilines 1 et 2 ou [PS1](#) et [PS2](#)). Ainsi, une mutation dans l'un de ces gènes entraîne une déviation du métabolisme de l'APP vers la voie amyloïdogène, ce qui s'accompagne d'une production accrue de peptide A β . Un diagnostic génétique de ces mutations est possible pour les familles atteintes. L'étude de ces formes familiales et minoritaires de la MA a permis d'identifier et de caractériser de

nombreux acteurs moléculaires impliqués dans la physiopathologie de cette maladie. Ces derniers interviennent non seulement dans les formes familiales, mais également dans les formes sporadiques. Ces différents acteurs moléculaires seront développés dans un [paragraphe](#) spécifique.

Les formes sporadiques représentent l'écrasante majorité des cas et apparaissent généralement après l'âge de 65 ans. Leur apparition et leur évolution sont plus lentes, plus tardives et plus insidieuses que dans les formes familiales. Le terme anglais *late-onset* oppose ces formes sporadiques d'apparition tardive aux formes familiales dites « précoces ». Leur origine est multifactorielle, résultant de divers facteurs favorisant, de faibles impacts individuels, notamment des facteurs de risque génétiques, alimentaires, liés au mode de vie... L'apparition de ces formes sporadiques de la MA est également modulée par l'influence de l'hérédité, sur un mode polygénique : A côté des mutations responsables des formes familiales, nécessaires et suffisantes pour entraîner la MA, un certain nombre de prédispositions géniques pour la MA ont été rapportées. Ces gènes de susceptibilité entraînent un risque accru de développer la maladie, sans pour autant l'entraîner systématiquement. Le plus ancien gène de susceptibilité mis en évidence est celui de l'apolipoprotéine E ([ApoE](#)). Par la suite, des études génétiques complémentaires ont mis en évidence le rôle de plusieurs autres gènes comme le *SORtilin Related receptor* ([SorL](#)), la clusterine ([CLU](#)) ou le *phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein* ([PICALM](#)) [[Zetzsche, 2010](#)]. On notera notamment l'importance des gènes liés aux lipoprotéines et à leurs récepteurs ([ApoE](#), [SORL](#), [CLU](#)...).

I – 1 c. Facteurs de risque de la MA sporadique

Les études épidémiologiques de la MA sont rendues délicates par l'apparition lente et insidieuse des premiers signes, qui peuvent aboutir à un diagnostic tardif et donc à une sous-estimation de la prévalence de la maladie, au moins dans ses phases précoces. En effet, des séries d'autopsies ou d'imagerie portant sur des sujets d'âges différents montrent que la MA débute plusieurs dizaines d'années avant l'apparition des premiers symptômes [[Braak, 1998](#)]. Le facteur de risque premier et indiscutable de la MA est représenté par l'âge. En effet, comme le montre le [tableau 1](#) ci-dessous, la prévalence de la MA passe de 5,7% entre 75 et 79 ans à 38,4% après 85 ans chez les femmes. Un profil évolutif comparable est également décrit chez les hommes. De plus, la plupart des autres facteurs de risque

identifiés, comme l’hypertension artérielle ou les dyslipidémies voient leur prévalence augmenter avec l’âge [[Launer, 2005](#)].

Il existe de plus une sensibilité différentielle à la MA en fonction du sexe : toutes les études épidémiologiques montrent sa très nette prédominance chez les femmes. En effet, chez les sujets de plus de 85 ans, celle-ci touche 23,9% des hommes contre 38,4% des femmes ([Tableau 1](#)) [[Fratiglioni, 1997](#)]. Cette influence du sexe suggère que les modifications hormonales survenant pendant le vieillissement (diminution des taux d’œstrogènes et d’androgènes au cours de la ménopause et de l’andropause) favoriseraient la survenue de la maladie [[Atwood, 2005](#)]. A l’inverse, le traitement hormonal substitutif de la ménopause diminuerait sa prévalence [[Craig, 2010](#)].

D’autres pathologies favorisent l’apparition de la MA. Parmi ces dernières, on peut notamment citer des pathologies neurologiques comme les antécédents d’accidents vasculaires cérébraux ou de traumatismes crâniens, des facteurs de risque vasculaires tels que l’hypertension artérielle ou des pathologies psychiatriques comme la dépression ou les troubles bipolaires (pour revue, voir [[Helmer, 2006](#)]).

Par ailleurs, le niveau d’instruction, les activités intellectuelles et sportives, ainsi que la vie relationnelle et sociale, peuvent moduler le risque de MA [[Fratiglioni, 2004](#)]. Ainsi, les démences semblent moins fréquentes parmi les classes socio-économiques élevées. La conservation d’une activité sportive et/ou intellectuelle permettrait en particulier de stimuler et de préserver les fonctions cognitives. De plus, ces diverses occupations réduiraient le risque de dépression, état pathologique favorisant le développement ultérieur de la MA [[Arbuckle, 1998](#)]. Le niveau d’éducation et les activités sociales et professionnelles confèreraient aux individus une « réserve cognitive », permettant une meilleure adaptation à la dégénérescence neuronale, ce qui réduirait l’intensité des symptômes [[Sharp, 2011](#)].

	Hommes					Femmes				
Age (ans)	65-69	70-74	75-79	80-84	>85	65-69	70-74	75-79	80-84	>85
Prévalence (%)	-	-	7.7	12.5	23.9	-	-	5.7	16.6	38.4

Tableau 1 : Prévalence de la maladie d’Alzheimer en France en fonction de l’âge et du sexe [[Helmer, 2006](#)]

Enfin, l'épidémiologie insiste sur l'influence de l'alimentation sur le risque de MA, indépendamment du sexe et de l'origine des individus. Les exemples les plus marquants proviennent des populations transplantées : des Afro-américains et des Japonais émigrés aux États-Unis présentent un risque plus élevé de MA que des sujets appariés de leur pays d'origine [[Hendrie, 2006](#)]. La prévalence de la MA au sein d'une population donnée semble donc influencée par les habitudes alimentaires de celle-ci. De même, les personnes soumises à un régime alimentaire riche en acides gras (AG) mono-insaturés (huile d'olive, régime « méditerranéen ») présentent un meilleur vieillissement cérébral [[Panza, 2004](#)]. Cet effet protecteur des AG insaturés a également été retrouvé dans d'autres populations où la consommation de poisson est importante, comme les Japonais ou les Inuits [[Kalmijn, 1997](#)]. A l'inverse, un déficit alimentaire en AG polyinsaturés (AGPI) est fréquemment retrouvé chez les patients atteints de MA [[Soderberg, 1991](#)]. Il semble donc que de trop faibles taux d'acide docosahexaénoïque (DHA) ou d'AG insaturés augmentent le risque de MA. Enfin, une surconsommation d'AG saturés et de cholestérol aurait également un effet délétère [[Luchsinger, 2002](#)]. Le rôle potentiellement protecteur des AG oméga-3, notamment du DHA, est largement documenté quoique les essais cliniques introduisant une supplémentation en DHA associé ou non à d'autres AG aient été décevants. Par contre, le rôle, positif ou négatif, des AG de la série oméga-6 comprenant l'AA, très abondant dans l'alimentation occidentale actuelle, est très peu documenté [[Florent-Bechard, 2009](#)].

D'autres classes d'aliments, comme les fruits et légumes riches en composés antioxydants et/ou anti-inflammatoires (polyphénols, vitamines flavonoïdes) présenteraient des propriétés protectrices contre les pathologies liées au vieillissement, en particulier cérébral [[Joseph, 2005](#)].

I – 2 Les protéines Tau et APP : des protéines critiques dans la maladie d'Alzheimer

Comme nous l'avons vu plus haut, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif et/ou préventif de la MA. Cette lacune résulte d'une caractérisation incomplète des mécanismes moléculaires impliqués dans la neurodégénérescence associée à cette pathologie. Ainsi, en dépit de récents progrès dans l'exploration de la physiopathologie de la MA, les acteurs cellulaires et moléculaires ainsi que les facteurs étiologiques de la MA ne sont toujours pas identifiés avec certitude [[Drouet, 2000](#)].

Nous présenterons brièvement les lésions histologiques cérébrales pathognomoniques de la MA qui ont permis d'obtenir de précieuses informations sur les mécanismes moléculaires et cellulaires participant à sa pathogenèse. Il s'agit des dégénérescences neurofibrillaires ([DNF](#)) et des plaques amyloïdes ([PA](#)). D'autres altérations sont également observées mais ne sont pas pathognomoniques de la maladie. Ces deux lésions ont permis d'identifier le rôle de deux protéines clés : la protéine Tau et la protéine APP. La dégradation de la protéine APP peut générer le peptide A β , ce-dernier étant également impliqué dans la pathogenèse de la MA. Les mutations du gène codant pour la protéine APP, situé sur le chromosome 21, ont été reconnues dans les formes familiales décrites ci-dessus. [[Goate, 1991](#)]. Par la suite, ces études ont identifié deux autres gènes, codant pour les présénilines 1 et 2 ([PS1](#) et [PS2](#)), localisés sur les chromosomes 14 et 1, respectivement [[Bekris, 2010](#)]. Ces diverses mutations entraînent une perturbation du métabolisme de la protéine APP, ce qui conduit à une augmentation de la production du peptide A β . L'agrégation de ce peptide, qui va produire les plaques amyloïdes [[Selkoe, 2002](#)], est à l'origine de la théorie de la **cascade amyloïde**, proposée pendant près de 30 ans comme l'explication des atteintes neurodégénératives observées au cours de la MA [[Hardy, 1992](#)]. Nous allons présenter ci-dessous les structures, fonctions et régulations des protéines Tau et APP, ainsi que leurs implications potentielles dans la MA.

I – 2 a. Anatomopathologie de la maladie d'Alzheimer

a) Les dégénérescences neuro fibrillaires

Les DNF sont constituées par des neurofilaments argentophiles localisés dans le péricaryon de certains neurones corticaux ([Figure 1](#)). Ces lésions sont retrouvées dans le

cerveau de certaines personnes âgées et dans différentes formes de démence, où elles sont particulièrement abondantes.

C'est le cas dans la MA, où la densité de ces DNF au niveau du néocortex est directement corrélée avec la gravité de la maladie [[Delacourte, 1999](#)]. L'apparition progressive des DNF au niveau des neurones permet de caractériser l'évolution de la MA. 11 stades de progression peuvent ainsi être décrits, en fonction des régions du néocortex atteintes [[Serrano-Pozo, 2011](#)]. Les stades de Braak reprennent également cette évolution topographique des DNF au cours de la MA ([Figure 2](#)).

Les DNF apparaissent dans le néocortex des patients atteints de MA et leur abondance est corrélée avec la gravité de la maladie. De plus, leur extension progressive dans les différentes aires cérébrales permet de caractériser l'évolution de la pathologie, selon 11 stades, allant du vieillissement cérébral aux manifestations cliniques de la MA.

Les DNF sont constituées de protéine Tau hyper phosphorylée organisée en filaments hélicoïdaux appariés, ou PHF. Les PHF sont localisés non seulement dans le péricaryon des neurones atteints, mais sont également retrouvés au sein des axones myélinisés, des dendrites et des synapses [[Kosik, 1984](#)]. La présence de PHF dans les neurites entraîne une désorganisation du cytosquelette des neurones, en particulier du réseau de microtubules, ainsi qu'une diminution du nombre de neurofilaments normaux. Les microtubules sont des polymères formés par l'assemblage de dimères de tubuline (α - et β -tubuline). Ils constituent un élément essentiel du cytosquelette du neurone et participent à diverses fonctions, notamment le transport axonal des organites cellulaires, des métabolites et des neurotransmetteurs. La polymérisation, la stabilisation, ainsi que les propriétés dynamiques des microtubules sont modulées par leur interaction avec les protéines spécifiques, les protéines associées aux microtubules ou *Microtubule Associated Proteins* ([MAP](#)). Les protéines Tau appartiennent à cette famille des MAP (sous classe des MAP de faible masse moléculaire) [[Iqbal, 2005](#)]. Ces protéines sont synthétisées à partir d'un gène unique situé sur le chromosome 17. Un épissage alternatif permet la production de six isoformes de masse moléculaire variant de 48 à 67 kDa [[Andreadis, 1992](#)] ([Figure 6](#)). Les protéines Tau constituent d'excellents marqueurs des processus dégénératifs. En effet, si les protéines Tau sont phosphorylées chez le fœtus, elles vont subir un processus de déphosphorylation progressive pendant le vieillissement. *A contrario*, dans le cas des démences, ces protéines vont présenter un état de phosphorylation excessive. Cette hyperphosphorylation provoque

le désassemblage, puis la désorganisation totale des microtubules dans les neurones [[Ihara, 1986](#)]. Caputo et coll. ont envisagé que la formation des DNF soit due à l'altération du métabolisme des protéines Tau et APP [[Caputo, 1992](#)]. Même si les PA et les DNF sont caractéristiques de la MA, on les retrouve également dans d'autres pathologies comme la trisomie 21, la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy, ainsi que chez les personnes âgées non atteintes de pathologie neurodégénérative [[Vermersch, 1995](#)].

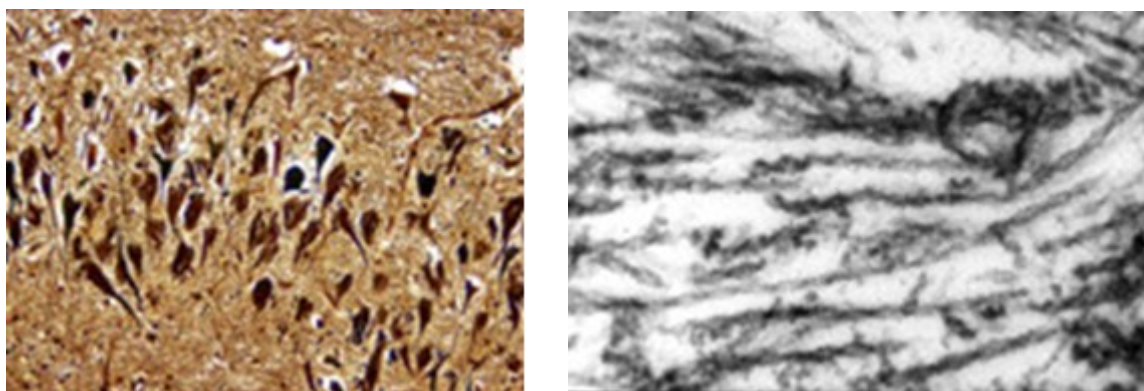


Figure 1 : Aspects histologiques des dégénérescences neuro fibrillaires

Examen microscopique d'une coupe de cerveau de patient atteint de MA, après coloration de Bielschowski, mettant en évidence de nombreuses DNF au sein des neurones (à gauche). Examen en microscopie électronique du péri-caryon d'un neurone présentant une DNF, révélant des *paired helical filaments* (PHF), constitués de protéines Tau anormalement phosphorylées (à droite).

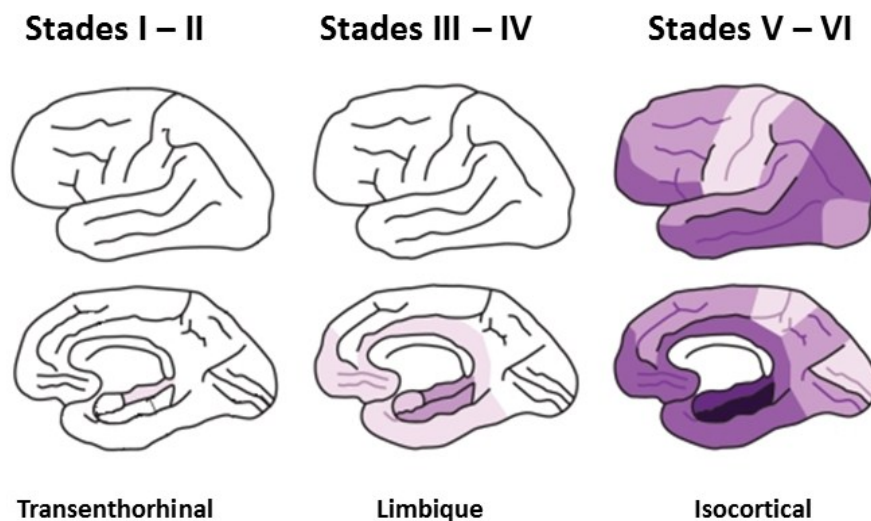


Figure 2 : Stades de Braak – Evolution spatiotemporelle de la localisation des dégénérescences neurofibrillaires en fonction du stade évolutif de la maladie d'Alzheimer [[Serrano-Pozo, 2011](#)]

Ce schéma illustre la corrélation entre la localisation topographique des DNF dans le cerveau des patients atteints de MA et le stade évolutif de la maladie.

b) Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes ([PA](#)) observées dans le cerveau de patients atteints de MA sont constituées de dépôts extracellulaires de peptide A β . Ces plaques sont entourées par des cellules gliales contenant des lysosomes phagocytaires, ainsi que par des neurites amyéliniques. Ces neurites dépourvus de gaine de myéline sont en état de dégénérescence et contiennent les PHF, autres éléments caractéristiques de la MA, que nous venons de décrire au chapitre précédent. Les PA contiennent d'autres composants plus minoritaires, comme l'apolipoprotéine E ([ApoE](#)) et ses récepteurs (le récepteur des VLDL et le "*LDL receptor related protein*" ou [LRP](#)), des protéoglycanes, le *collagenous Alzheimer amyloid plaques component* ([CLAC](#)), le peptide amyloïde P3, l' α 1-antichymotrypsine, des facteurs du complément, ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire [[Morgan, 2004](#)]. Ces PA sont localisées de manière préférentielle dans certaines zones du cerveau, en particulier le cortex, le *striatum* et le cervelet. Elles subissent une maturation au cours de leur évolution et présentent ainsi une morphologie spécifique. Les plaques les moins matures sont qualifiées de plaques diffuses. Elles sont formées d'agrégats amorphes et peu denses de peptides A β . De ce fait, elles ne prennent pas la coloration par le Rouge Congo. De plus, elles ne contiennent pas de neurones dystrophiques, ni de neurites anormaux ([Figure 3](#)) [[Kowa, 2004](#)]. Les plaques matures contiennent des agrégats très denses de peptide A β . Elles sont associées à des phénomènes de neurodégénérescence et de réactivité astrogliale ([Figure 4](#)) [[Nagele, 2004](#)].

Les modèles transgéniques suggèrent que ces PA denses résultent d'une synthèse excessive de peptide A β , qui sature les capacités de clairance du SNC. Divers facteurs vont influencer l'agrégation du peptide A β dans le SNC : sa concentration dans les différentes régions cérébrales ou encore divers cofacteurs comme les ions métalliques (en particulier le zinc) [[Lee, 1999](#)]. Ces derniers agissent comme des chélateurs et favorisent ainsi l'agrégation du peptide A β . Au cours du vieillissement normal, le peptide A β peut se déposer au niveau de la *media* des artérioles du cortex, pour ensuite s'infiltrer au niveau du parenchyme voisin de ces vaisseaux, ces dépôts formant à long terme des PA [[Maat-Schieman, 2004](#)]. Celles-ci peuvent apparaître dès la cinquantaine et leur nombre augmente avec l'âge. Elles sont localisées dans l'hippocampe, le néocortex et certains noyaux sous-corticaux (*striatum*, hypothalamus, substance innominée) [[Hauw, 1986](#)]. Chez les patients atteints de la MA, la

densité des plaques corticales est très importante. Elles sont localisées au niveau des couches II à IV du néocortex, du cortex entorhinal, de l'hippocampe, du *subiculum* ainsi que dans le cortex associatif des lobes temporaux et dans les noyaux amygdaliens. Les couches II et III des lobes fronto-pariétaux-occipitaux sont les plus touchées.

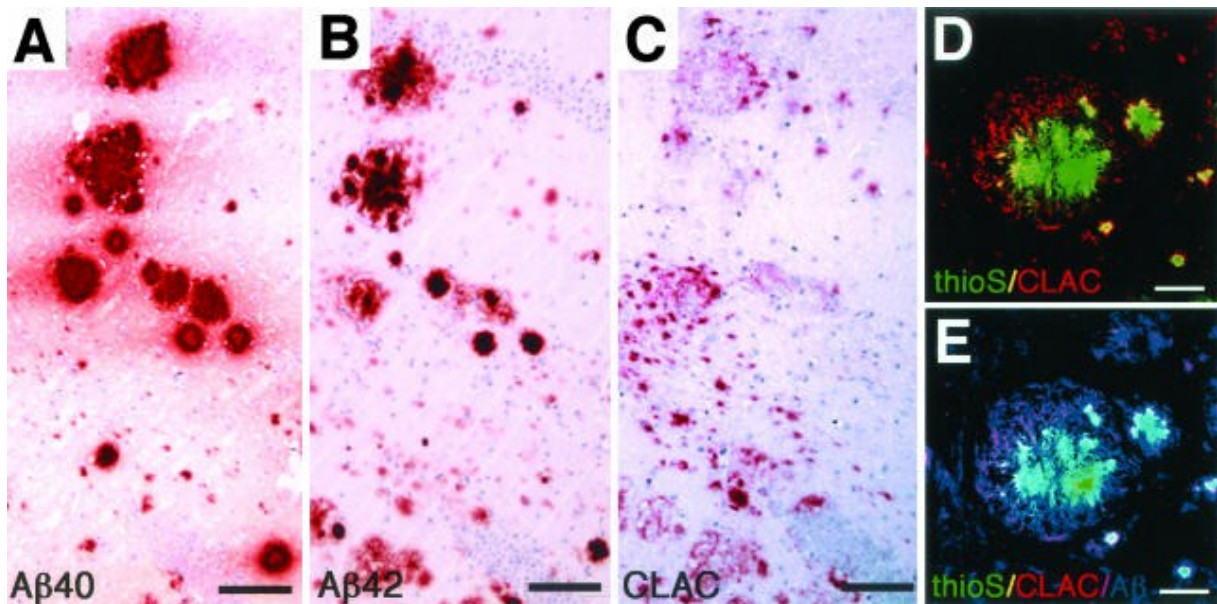


Figure 3 : Etude immuno histochimique d'une plaque amyloïde dans la région du gyrus denté de l'hippocampe d'une souris transgénique PSAPP, modèle murin de la MA, âgée de 19 mois [Kowa, 2004]

Immunomarquage des principaux composants des plaques amyloïdes : le peptide A β 40 (A), le peptide A β 42 (B), le Collagenous Alzheimer Amyloid Plaque Component (ou CLAC) (C). Superposition d'un immuno marquage CLAC et d'une coloration à la thioflavine (D) et d'un immunomarquage du peptide A β (E).

c) Autres lésions histologiques

L'analyse immunohistochimique et biochimique *post-mortem* a permis de mettre en évidence une activation des astrocytes ([Figure 4 gauche](#)) et des cellules microgliales ([Figure 4 droite](#)), à proximité des lésions cérébrales de MA, à savoir les PA, les DNF, et les zones de dégénérescence neuronale.

En effet, les cerveaux des patients atteints de MA présentent des taux élevés de cytokines, en particulier, d'interleukine-1 β (IL-1 β) [Griffin, 1998]. Par ailleurs, l'expression des ARNm de plusieurs cytokines a été mise en évidence dans les cellules microgliales associées aux PA [Walker, 1995]. L'accumulation de peptide A β peut activer localement les astrocytes et les cellules de la microglie, ce qui conduit à la libération de cytokines pro-

inflammatoires et neurotoxiques ainsi que de protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Ces diverses cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires (comme certains facteurs du complément) pourraient participer à la médiation de la neurotoxicité du peptide A β [Craft, 2006]. De plus, ces médiateurs inflammatoires pourraient à leur tour favoriser l'accumulation de peptide A β , créant ainsi un phénomène d'auto-entretien du processus morbide. En effet, il a été décrit que l'IL-1 β active la synthèse de l'APP en saturant l'activité de l' α -secrétase, déviant ainsi le métabolisme de l'APP vers la voie de production de peptide A β [Sheng, 1996]. L'activation des astrocytes et des cellules microgliales entraîne une augmentation de la production locale de radicaux libres, ce qui ajoute un effet de stress oxydant à l'inflammation [Dei, 2002]. Cette description de phénomènes inflammatoires au cours de la MA est confirmée par diverses études épidémiologiques, qui montrent que la prise au long cours d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (notamment dans les rhumatismes inflammatoires chroniques) exerce un effet protecteur contre la survenue de la MA [McGeer, 1996].

Au cours de la MA, les vaisseaux cérébraux présentent une accumulation de dépôts amyloïdes au niveau de leurs parois, lésions qualifiées d'angiopathies amyloïdes (Figure 5) [Vonsattel, 1991]. L'amyloïdose vasculaire atteint les artères corticales de petite taille, d'un diamètre compris entre 50 et 150 μ m. Ces dépôts amyloïdes sont constitués par une infiltration de peptide A β , localisée principalement au niveau de la media artérielle, mais qui peut s'étendre à toute la paroi vasculaire. Suivant le degré d'atteinte de la paroi artérielle deux types d'angiopathie amyloïde cérébrale ont été décrits :

- l'angiopathie congophile : l'infiltration amyloïde reste limitée à la paroi des vaisseaux, sans atteinte du parenchyme,
- l'angiopathie dystrophique : les dépôts amyloïdes atteignent les zones pariétales et périvasculaires, ainsi que le neuropile. On retrouve ce type d'angiopathie à proximité des PA.

Bien que de telles lésions puissent être retrouvées à l'état asymptomatique dans les cerveaux de sujets normaux, les patients atteints de MA présentent souvent une atteinte sévère de la paroi artérielle, pouvant entraîner des complications hémorragiques ou ischémiques [Vonsattel, 1991].

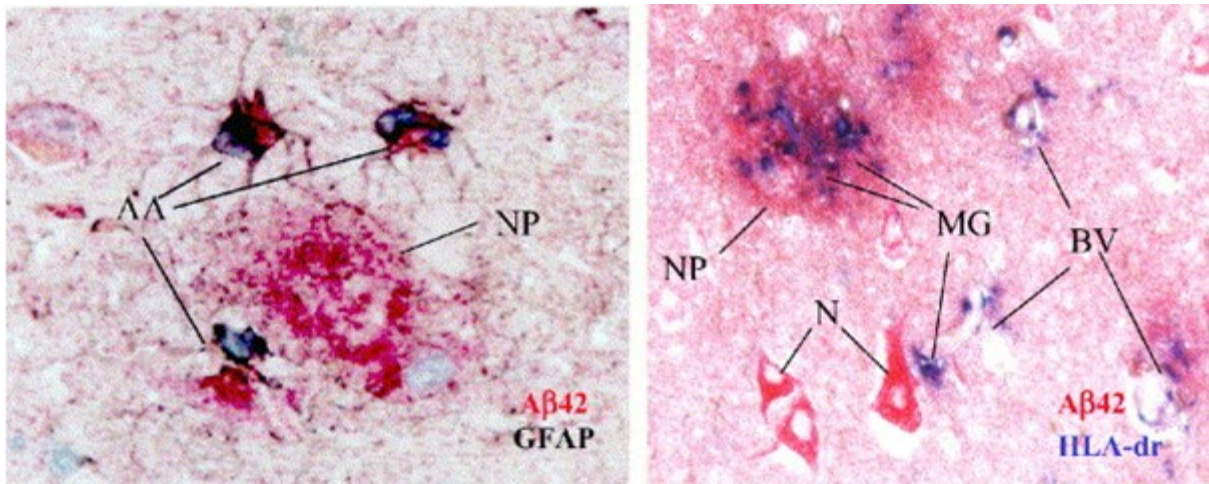


Figure 4 : Activation astrogliale à proximité des plaques amyloïdes [Nagele, 2004]

Etude immuno histologique de cerveaux de patients atteints de MA. Double immunomarquage dirigé contre le peptide A β 42, composant des plaques amyloïdes (**rouge**) et la *glial fibrillary acidic protein*, marqueur d'activation astrocytaire (**noir**) (image de gauche). Double immuno marquage dirigé contre le peptide A β 42 (**rouge**) et la molécule HLA-dr (**bleu**), marqueur d'activation microglial (image de droite). Ces images indiquent la présence d'astrocytes activés (AA) et de microglie (MG) à proximité des plaques amyloïdes (NP).

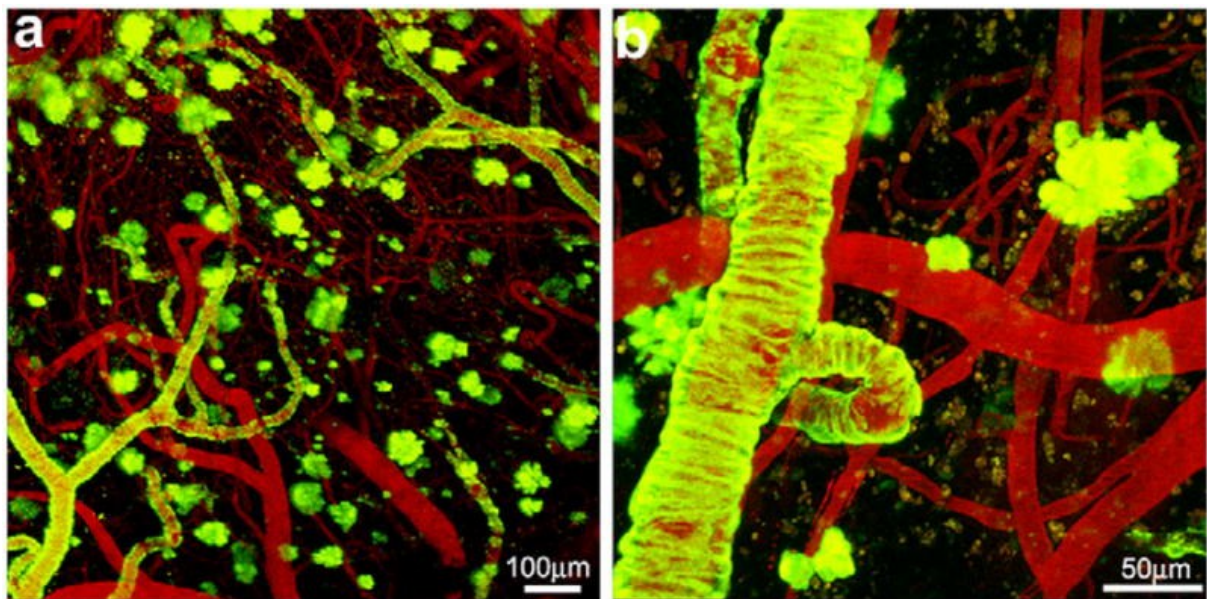


Figure 5 : Modélisation de l'angiopathie amyloïde dans le cortex d'une souris transgénique PS1/APP, par imagerie multi photons *in vivo* [Dong, 2010]

Les vaisseaux sanguins sont opacifiés par la perfusion de dextrans couplés à la rhodamine (**rouge**). Les dépôts amyloïdes sont mis en évidence par le méthoxy-X04 au niveau de la paroi vasculaire (lésions d'angiopathie amyloïde), ainsi que dans les plaques amyloïdes intra parenchymateuses (corps floconneux) (**vert**).

I – 2 b. Protéine Tau et dégénérescence neurofibrillaire

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les DNF sont constituées d'amas de protéine Tau hyperphosphorylée, regroupés sous forme de « paired helical filaments » ([PHE](#)) [[Grundke-Iqbal, 1986](#)]. De cette observation, beaucoup d'auteurs ont déduit que cette protéine joue un rôle très important dans la pathogenèse de la MA.

a) Structure et fonction de la protéine Tau

La protéine Tau est une protéine associée aux microtubules ([MAP](#)). Sa fonction principale consiste à stimuler la polymérisation de la tubuline sous forme de microtubules dans le cerveau [[Weingarten, 1975](#)]. Le cytosquelette joue un rôle capital dans l'intégrité et la fonctionnalité des neurones. Ainsi, toute altération dans sa structure et/ou sa fonction peut profondément compromettre la fonctionnalité et la survie de ces cellules. Chez l'Homme, le gène codant Tau est situé sur le bras long du chromosome 17 (en 17q21) et contient 16 exons [[Neve, 1986](#)]. L'épissage alternatif de son ARNm génère 6 isoformes de la protéine dans le cerveau humain adulte [[Goedert, 1989](#)] ([Figure 6](#)). Ces multiples isoformes diffèrent entre elles par la présence ou l'absence d'une ou deux insertions de 29 ou 58 acides aminés ([aa](#)) au niveau de la partie N-ter de la chaîne peptidique, ainsi que par la présence de trois ou quatre répétitions dans la partie C-ter. La portion N-ter de Tau est fortement acide. Les répétitions dans la partie C-ter permettent la liaison de la protéine aux microtubules [[Hirokawa, 1988](#)].

Chaque isoforme de Tau possède des activités biologiques et un rôle physiologique spécifiques. En effet, elles sont différemment exprimées pendant le développement et stimulent la formation des microtubules avec une efficacité variable [[Lee, 1989](#)]. Le cerveau fœtal exprime seulement la forme la plus courte, alors que les six isoformes sont retrouvées chez l'adulte [[Kosik, 1989](#)]. Diverses pathologies neurodégénératives s'accompagnent d'un bouleversement des proportions relatives de ces isoformes [[Brandt, 2005](#)]. L'activité biologique de Tau est marquée par des effets opposés en termes de fonctionnalité du cytosquelette : si Tau stabilise les microtubules, et favorise ainsi la croissance et la stabilisation des neurites, elle peut empêcher la liaison de la kinésine à ces mêmes microtubules, et ainsi diminuer le transport de vésicules de mitochondries et du reticulum endoplasmique ([RE](#)) [[Ebner, 1998](#)].

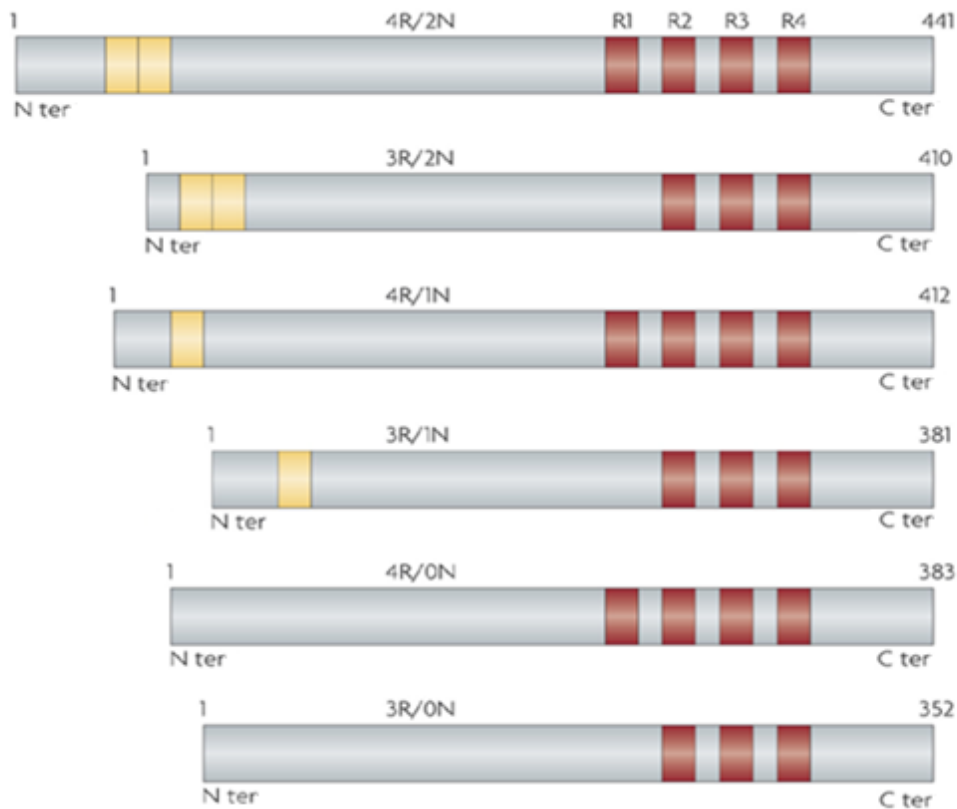


Figure 6 : Domaines structuraux des différentes isoformes de la protéine Tau exprimées dans le cerveau humain [Ballatore, 2007]

La protéine Tau est codée par un gène situé sur le chromosome 17, dont l'épissage alternatif produit 6 isoformes dont la masse moléculaire varie de 48 à 67 kDa. La mention R/N au-dessus de chaque isoforme indique le nombre d'insertions en position C-ter et N-ter, respectivement (ex. 4R/2N : 4 répétitions C-ter et 2 répétitions N-ter).

b) Hyperphosphorylation anormale de Tau au cours de la MA

La protéine Tau subit de nombreuses modifications post traductionnelles, à la fois en situations physiologiques et pathologiques (phosphorylation, glycosylation, ubiquitination, glycation, polyamination, nitration, troncation, agrégation) [Gong, 2005]. Au cours de la MA, la protéine Tau présente un niveau de phosphorylation anormalement élevé. En effet, les DNF sont composées d'amas de Tau hyperphosphorylée. La protéine Tau est phosphorylable et cette phosphorylation régule négativement sa capacité à promouvoir la polymérisation de la tubuline [Lindwall, 1984]. Le niveau de phosphorylation de Tau dans des cerveaux de patients atteints de MA est 3 à 4 fois plus élevé que dans des cerveaux sains [Kopke, 1993]. Plus de 40 sites de phosphorylation ont été identifiés sur Tau au cours de la MA [Gong, 2005]. La phosphorylation anormale de Tau sur différents résidus modifie son activité biologique et lui confère une tendance à l'agrégation. La phosphorylation de Tau sur la Ser²⁶², la Thr²³¹, et la Ser²³⁵ réduit sa liaison aux microtubules de l'ordre de 35%, 25%, et 10%, respectivement [Sengupta, 1998]. Divers sites « critiques » de phosphorylation (Ser¹⁹⁹ /

Ser²⁰² / Thr²⁰⁵, Thr²¹², Thr²³¹ / Ser²³⁵, Ser²⁶² / Ser³⁵⁶ et Ser⁴²²) peuvent convertir Tau en une molécule inhibitrice, pouvant séquestrer hors des microtubules leurs constituants normaux [Alonso Adel, 2004]. De plus, une phosphorylation sur d'autres sites (Thr²³¹, Ser³⁹⁶ et Ser⁴²²) favorise l'auto agrégation de Tau sous forme de filaments [Mawal-Dewan, 1996]. D'autres régions sont également impliquées dans ces phénomènes d'hyper phosphorylation : c'est notamment le cas d'une région riche en proline, située en amont des domaines de liaison aux microtubules, ainsi que de l'extrémité C-ter [Liu, 2007].

Il semble que la perte de fonction physiologique de Tau, l'induction de la formation des microtubules, résultant de son hyperphosphorylation, ne soit pas suffisante pour induire la neurodégénérescence. En effet, les souris Tau^{-/-} présentent des altérations des microtubules sur les axones de petit calibre, mais ne montrent aucune tendance à la neurodégénérescence [Harada, 1994]. D'autres MAP pourraient être à l'origine de la compensation de cette perte de fonction. Cette action toxique résulterait plutôt d'un gain de fonction, puisque la protéine Tau hyperphosphorylée est capable de séquestrer les composants des microtubules, dont la protéine Tau normale, MAP1 et MAP2, et d'induire le désassemblage des microtubules [Alonso, 1997] (Figure 7). La déphosphorylation de Tau la prive de ces propriétés délétères.

Le substratum moléculaire exact de la toxicité de Tau reste encore sujet à de nombreux travaux. Des corrélations fortes entre la densité des DNF dans le cerveau et la sévérité du syndrome démentiel suggère la participation de ces DNF dans la genèse de la MA [Arriagada, 1992]. Toutefois, d'autres études ont montré que la protéine Tau anormale, sous forme monomérique, et les oligomères solubles d'Aβ étaient plus toxiques que les PHF. De même, une analyse d'échantillons autopsiques n'a rapporté aucune corrélation entre la déstabilisation du réseau de microtubules et la formation de DNF [Cash, 2003]. Un modèle murin transgénique conditionnel a également montré que, lorsqu'un transgène mutant de Tau est éteint, la perte neuronale et les déficits comportementaux évoluent favorablement, alors que la pathologie des DNF évolue de manière autonome. Il existe donc une discordance entre l'évolution de ces différents aspects pathologiques au sein de ce modèle [Santacruz, 2005]. *In vitro*, la polymérisation de Tau hyperphosphorylée sous forme de PHF abolit également son activité toxique sur les autres MAP [Alonso Adel, 2006]. Ainsi, les DNF apparaissent plus comme un marqueur des dommages préexistants que comme l'origine même de la neurodégénérescence, à l'image de la conception actuelle des plaques

amyloïdes. En poussant plus loin encore l'homologie, on pourrait même considérer la polymérisation de Tau anormale sous forme de PHF / DNF comme un moyen défensif des neurones destiné à réduire les effets toxiques de Tau sous forme monomérique. Ce phénomène semble d'ailleurs commun à d'autres pathologies caractérisées par l'accumulation de protéines anormales (maladie de Huntington) [Arrasate, 2004].

c) Origines de l'hyperphosphorylation de Tau au cours de la MA

L'hyperphosphorylation de Tau résulte d'un dérèglement dynamique entre les kinases et les phosphatases de Tau, responsables de la régulation de son état de phosphorylation (Figure 8). Les kinases principales incluent la glycogène-synthase kinase-3 β (GSK-3 β), la protéine kinase cycline 5-dépendante (cdk5), la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA), et les protéines kinases activées par le stress [Mazanetz, 2007]. Parmi les phosphatases, la PP2A représente l'enzyme principale, tant sur le plan quantitatif que fonctionnel [Liu, 2005]. Ces différentes enzymes apparaissent naturellement comme autant de pistes thérapeutiques de premier ordre.

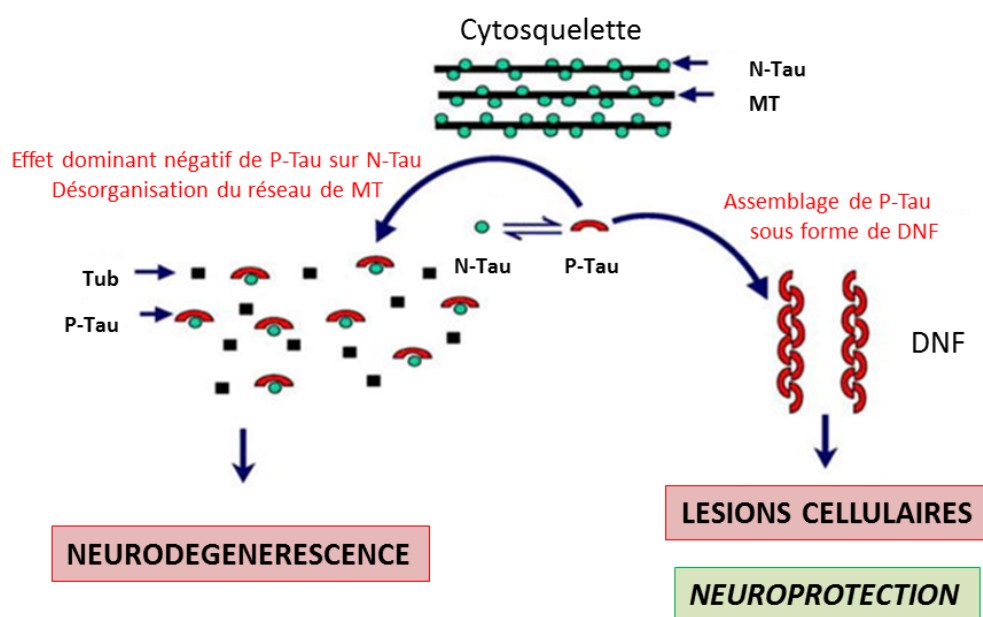


Figure 7 : Conséquences de l'hyperphosphorylation de Tau dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer et des autres tauopathies [Alonso Adel, 2006]

La phosphorylation anormale de Tau empêche cette dernière d'induire et de stabiliser la formation de microtubules (MT) à partir de monomères de tubuline (Tub). Les protéines Tau hyperphosphorylées (P-Tau) ont tendance à s'accumuler dans le neurone sous la forme de DNF (ou PHF). Cette séquestration de P-Tau au sein des DNF pourrait exercer un rôle neuroprotecteur potentiel pour la cellule. Enfin, la protéine Tau hyperphosphorylée se conduit comme un dominant négatif qui empêche la protéine Tau normale (N-Tau) d'accomplir ses fonctions physiologiques. Ces différentes modifications compromettent l'intégrité et la fonctionnalité du neurone et initient les phénomènes de neurodégénérescence.

Les origines de l'hyperphosphorylation de Tau au cours de la MA demeurent mal comprises. Une suractivité de la Cdk5 a été rapportée [Patrick, 1999], mais cette observation n'a pas été confirmée [Tandon, 2003]. Inversement, une diminution de l'expression et de l'activité de PP2A a également été décrite [Sontag, 2004] et pourrait résulter de sa dérégulation par deux inhibiteurs endogènes : I_1^{PP2A} et I_2^{PP2A} [Tsuji, 2005]. D'autres substrats de PP2A sont également hyperphosphorylés au cours de la MA : les neurofilaments [Tsuji, 2005], la MAP1B [Ulloa, 1994], ou encore la β -tubuline [Vijayan, 2001].

A côté de ces diverses kinases et phosphatases, la protéine Tau elle-même pourrait subir différentes modifications pouvant expliquer son hyperphosphorylation et sa tendance à l'agrégation. Les résidus sérine / thréonine de Tau subissent un processus de O – Glc N Acylation, qui consiste en l'adjonction d'un résidu monosaccharide (β -N-acétylglucosamine ou GlcNAc) par une liaison glycosidique [Liu F, 2004]. Cette modification régule inversement la phosphorylation de Tau, à la fois *in vitro* et *in vivo* [Robertson, 2004]. Ce processus de O – Glc N Acylation de Tau est diminué au cours de la MA et cette diminution est corrélée avec l'hyperphosphorylation de Tau [Deng, 2008]. Le métabolisme du glucose, qui régule ce processus de O – Glc N Acylation, et qui est altéré au cours de la MA pourrait, du moins partiellement, expliquer l'hyperphosphorylation de Tau et la DNF [Gong, 2006].

d) Mécanismes de la dégénérescence neurofibrillaire

L'hyperphosphorylation anormale de Tau joue un rôle capital dans la DNF, qui participe à la mort neuronale, dans la MA comme dans les autres tauopathies. Différents facteurs conduisent à l'hyperphosphorylation anormale de Tau, notamment les oligomères solubles de peptide A β , la dérégulation des mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation, et les perturbations du métabolisme cérébral du glucose. L'hyperphosphorylation de Tau abolit non seulement son activité biologique et induit la dissociation des MT, mais favorise également la polymérisation de la protéine. La perturbation du cytosquelette compromet le fonctionnement des neurones, notamment le trafic et l'adressage des protéines. La protéine Tau anormale, sous forme soluble et/ou oligomérique, présente une neurotoxicité qui entraîne la mort neuronale. L'agrégation de Tau anormale sous forme de PHF / DNF permet d'en réduire la toxicité mais pourrait finalement perturber le neurone et causer sa mort. Dans des modèles de souris transgéniques, la réduction / suppression de la forme mutante de Tau permet une amélioration des lésions histologiques et des déficits comportementaux,

que l'intervention porte uniquement sur Tau [Roberson, 2007] ou inclut également le peptide A β [Oddo, 2006b].

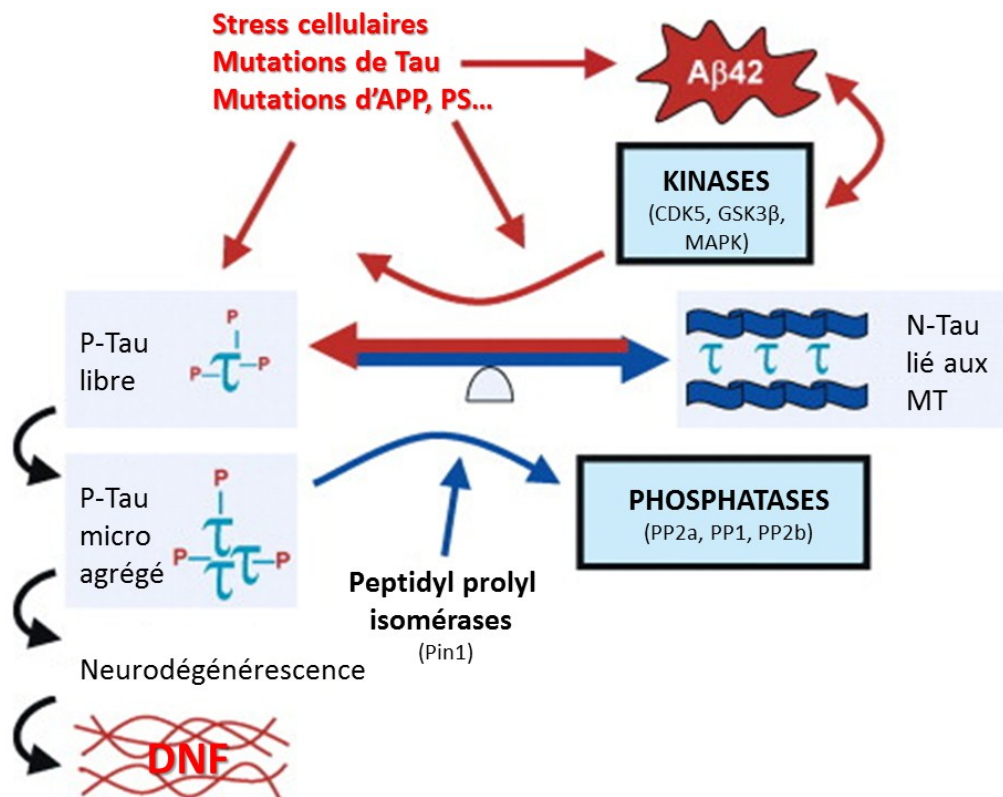


Figure 8 : Hyperphosphorylation de Tau au cours de la maladie d'Alzheimer [Geschwind, 2003]

L'équilibre entre Tau phosphorylée (P-Tau) et Tau déphosphorylée (N-Tau) est conditionné par la résultante entre l'activité de kinases assurant sa phosphorylation (en **rouge** : CDK5, GSK3 β , MAPK), et de phosphatases jouant le rôle inverse (en **bleu** : PP2a, PP1, PP2b). Différents facteurs environnementaux ou constitutifs, ainsi que le peptide A β lui-même, peuvent favoriser la phosphorylation anormale de Tau.

I – 2 c. La protéine précurseur du peptide amyloïde : fonctions, maturation, dégradation

Une étude de la littérature montre que les différentes formes de MA, familiales comme sporadiques, résultent d'une altération du métabolisme de la protéine APP. Ce métabolisme peut être perturbé à différents niveaux qu'il s'agisse du trafic et de la localisation de la protéine APP au sein des cellules, ou encore de sa maturation, liée à divers clivages protéolytiques. Ainsi, la MA pourrait résulter de la conjonction d'une perte des fonctions physiologiques de l'APP et de la production de produits de clivage anormaux ou excessifs, pouvant à leur tour entraîner les altérations fonctionnelles et la perte neuronale.

a) Structure de la protéine APP

Le gène de l'APP est le premier dont une mutation a été associée à une forme familiale de MA [Robakis, 1987]. Ce gène est localisé sur le chromosome 21, au niveau du *locus* 21q21.3-q22.05. Il est composé de 18 exons, répartis sur environ 170 kb. La présence de ce gène sur le chromosome 21 pourrait d'ailleurs expliquer que la trisomie 21 entraîne des manifestations cliniques et histologiques de MA quasi systématiques après 40 ans [Lott, 2005]. L'expression du gène *app* est ubiquitaire. Son transcrit subit un épissage alternatif, lequel va générer, après traduction, trois isoformes majeures de la protéine, caractérisées principalement par leur longueur : APP695, APP750 et APP770, contenant 695, 750 et 770 aa, respectivement, ainsi que par la présence (APP750 et APP770) ou l'absence (APP695) d'un domaine de liaison aux inhibiteurs de protéases Kunitz (KPI), situé à proximité de l'extrémité N-ter de la protéine [de Sauvage, 1989] (Figure 9). L'expression de ces différentes isoformes est variable en fonction du type cellulaire considéré. Si les isoformes APP750 et APP770 sont exprimées de manière ubiquitaire, l'isoforme APP695 est majoritairement exprimée dans les neurones. De la même façon, le *ratio* en ARNm des différentes isoformes varie d'une région du SNC à l'autre : en effet le ratio APP770 – APP750 - APP695 dans le cortex est de 1 – 10 – 20 [Tanaka, 1989], alors que dans les astrocytes en culture, ce même *ratio* est de 2:4:1 [Gray, 1993]. Il a également été montré que les isoformes contenant le domaine KPI (APP750 et APP770) étaient d'avantage exprimées au cours de la MA, et étaient associées à un dépôt accru d'A β [Menendez-Gonzalez, 2005]. De la même manière, une activation prolongée des récepteurs NMDA extra synaptiques entraîne des modifications d'expression similaires et un dépôt accru d'A β [Bordji, 2010]. Une altération anormale de l'ARNm de l'APP pourrait contribuer à la pathogenèse de la MA, par une génération accrue d'A β .

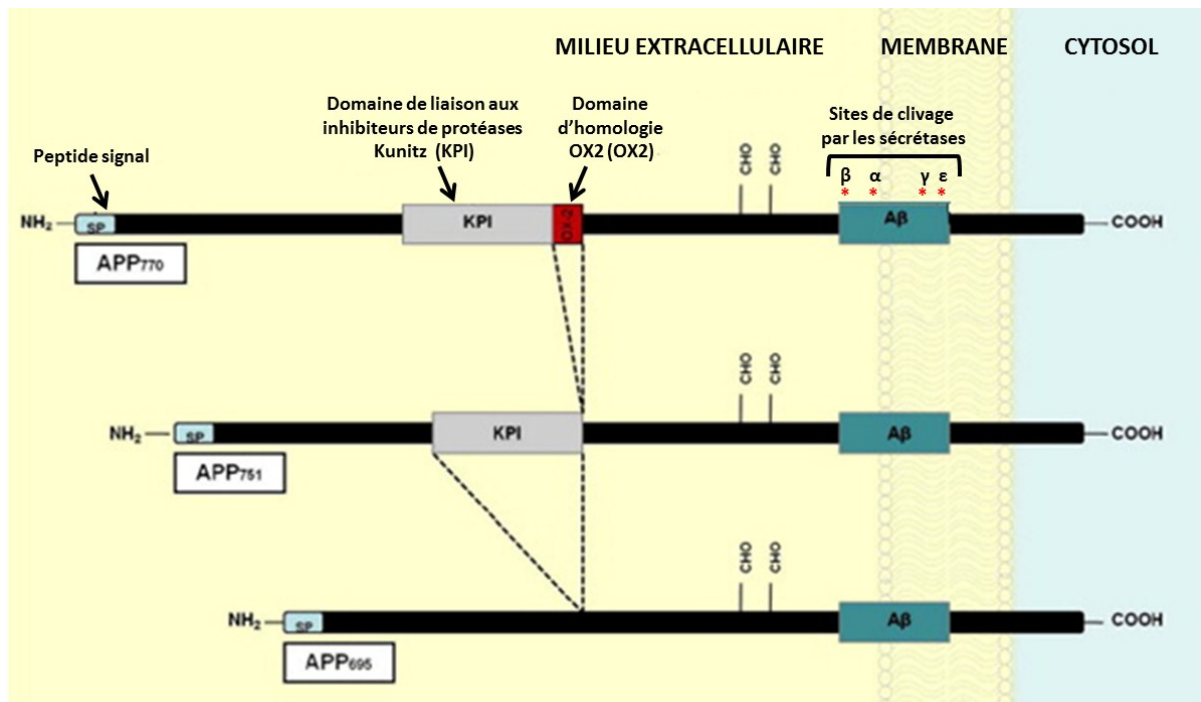


Figure 9 : Différentes isoformes de la protéine APP [Beckett, 2012]

Les isoformes de la protéine APP majoritairement retrouvées dans le SNC sont les formes 770, 751 et 695. Elles sont issues de la traduction d'un transcrit ayant subi un épissage alternatif au niveau des exons 7 et 8. Ces exons codent pour le domaine KPI et le domaine OX2, respectivement. Le domaine OX2 a été ainsi dénommé car il présente une homologie avec le marqueur microglial OX2.

Outre le phénomène d'épissage alternatif du transcrit, les protéines vont subir après traduction diverses modifications, notamment des *O*- et *N*-glycosylations, des sulfatations ou des phosphorylations. L'ensemble de ces modifications produit un ensemble de protéines hétérogènes de masses moléculaires comprises entre 110 et 140 kDa [Hung, 1994]. La zone de la protéine APP, qui génère le peptide Aβ après clivage, correspond à une séquence de 40 à 43 aa, qui sont situés en partie dans le domaine transmembranaire de la protéine. La portion du gène codant pour cette séquence peptidique couvre une partie des exons 16 et 17.

Les protéines APP possèdent des analogues structuraux, représentés par la famille des protéines *amyloid precursor-like protein* (APLP). Cette famille comporte les protéines APLP1 et APLP2 chez les mammifères. Ces dernières possèdent certains domaines de la protéine APP, notamment le domaine KPI (pour APLP1 uniquement, APLP2 en étant dépourvue), les domaines E1 et E2, mais elles sont dépourvues de la séquence peptidique correspondant au peptide Aβ [Slunt, 1994]. Les protéines APP, APLP1 et APLP2 sont toutes des protéines transmembranaires de type I et subissent une maturation similaire au niveau des cellules. Il semble exister un certain degré de redondance fonctionnelle entre ces

différentes protéines homologues à l'APP : les souris transgéniques APP^{-/-} sont viables et fertiles et ne présentent qu'un très léger phénotype déficitaire [Dawson, 1999]. Au contraire, les souris doubles transgéniques APP/APLP2^{-/-} et APLP1/APLP2^{-/-} ou triples transgéniques APP/APLP1/APLP2^{-/-} présentent une mortalité post natale très précoce [Heber, 2000]. Etrangement, les souris APP/APLP1^{-/-} sont viables, ce qui souligne le rôle crucial d'APLP2 lorsque APP et APLP1 sont déficientes [Heber, 2000]. Ainsi, ces deux familles de protéines partageraient des communautés non seulement structurales, mais également fonctionnelles. De ce fait, l'inactivation de l'une de ces deux classes de protéines pourrait être compensée, tout du moins en partie, par la présence de ses homologues [von Koch, 1997].

La protéine APP est une glycoprotéine transmembranaire de type 1. Aucune structure cristalline de cette protéine n'a été établie actuellement [Reinhard, 2005]. La protéine APP est hautement glycosylée, les résidus glucidiques représentent en effet près du tiers de sa masse totale. Un tel degré de glycosylation est en faveur d'un rôle potentiel dans l'adhésion des cellules entre elles et avec la matrice extracellulaire. Elle est composée d'une importante région extracellulaire ou ectodomaine, d'un domaine transmembranaire unique, ainsi que d'un fragment intracellulaire court (Figure 10).

L'ectodomaine est une région de la protéine particulièrement riche en structures secondaires. 70% de sa séquence participe à la formation d'hélices α et de feuillets β [Gralle, 2002]. Les aa qui ne participent pas à la formation de ces structures sont regroupés dans deux régions flexibles, qui conditionnent probablement la structure tertiaire de la protéine. Ce domaine extracellulaire est très vraisemblablement impliqué dans des interactions intercellulaires, ou entre les cellules et la matrice extracellulaire. En effet, il possède des domaines de liaison à l'héparine, au collagène et à la laminine. Plusieurs régions ont été décrites au sein de la séquence peptidique de l'ectodomaine (Figure 10) [Dulubova, 2004] :

- La séquence Asp²³ à Val¹²⁸ correspond à un domaine **GFLD** (*growth factor like domain*)
- Le domaine compris entre les résidus Ser¹²⁴ et Leu¹⁸⁹ est un domaine de liaison au cuivre (Cu Binding Domain ou **CuBD**).

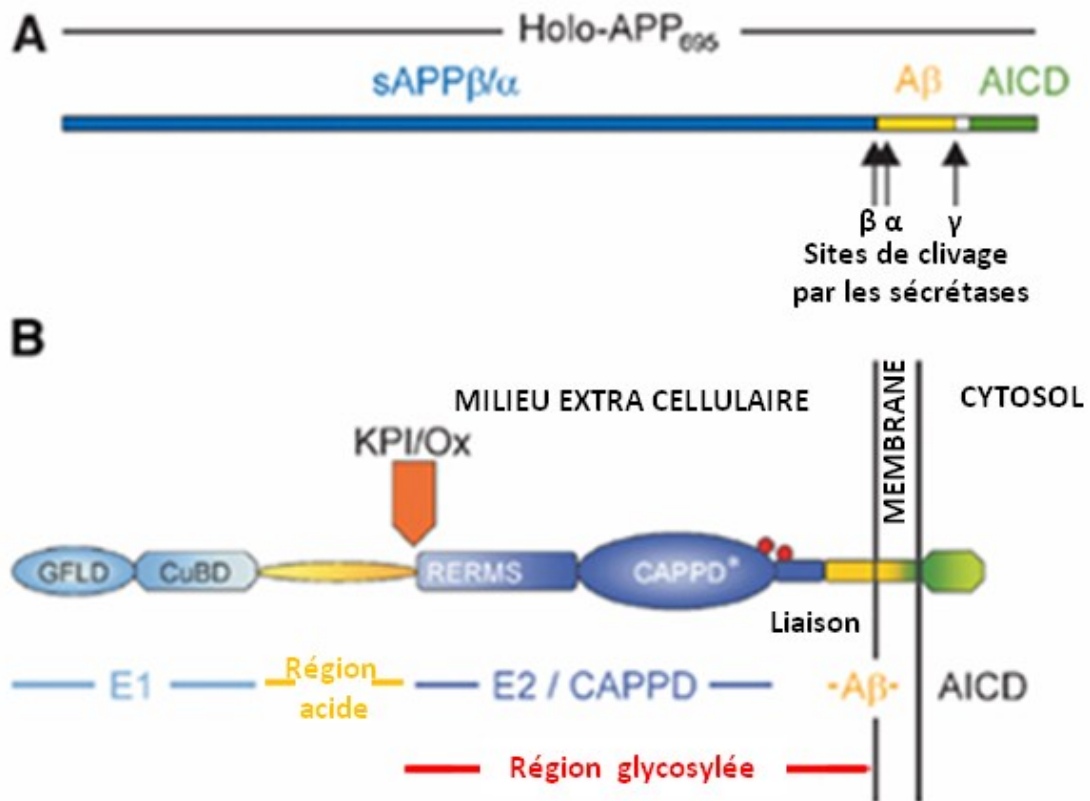


Figure 10 : Les différents domaines de l'APP [Reinhard, 2005]

A : Représentation schématique de l'holoprotéine APP695 humaine, indiquant les différents sites de clivage par les sécrétases (α , β et γ -sécrétases) et leurs produits respectifs (fragment soluble sAPP, peptide A β , domaine intra cellulaire AICD). **B :** Organisation en domaines de la protéine APP : La région E1 correspond à la partie N-ter, elle-même constituée du domaine *growth factor like* (GFLD) et du domaine de liaison au cuivre (CuBD). La région E1 est reliée au domaine carbohydrate par la région acide. Cette région carbohydrate est elle-même subdivisée en un domaine E2 (domaine central de l'APP, ou CAPPD) et une séquence *linker* juxtamembranaire. Cette séquence CAPPD contient les deux sites de N-glycosylation, schématisés par des ronds rouges. La partie C-ter de la protéine APP est formée par la portion transmembranaire et le domaine intracellulaire (AICD). La séquence peptidique correspondant à A β est figurée en jaune. Le domaine de liaison aux inhibiteurs de protéases Kunitz (KPI), qui est présent sur APP751 et APP770, et le domaine d'homologie OX2 (OX), qui est présent sur APP770, sont indiqués par une flèche orange au niveau de leur site d'insertion.

Ces deux premiers domaines constituent le domaine E1 de la protéine APP.

- La séquence Ala¹⁹⁰-Glu²⁶⁴, qui comporte 56% d'aa acides
- La séquence His⁵⁰⁷-Gly⁵⁸⁹, qui correspond à un domaine de liaison entre l'extrémité N-ter de la protéine et la région générant le peptide A β
- La région glycosylée, qui est elle-même divisée en deux sous-régions : la région E2 encore appelée **CAPPD** (*central APP domain*) et le domaine de liaison.

Le domaine intracellulaire de l'APP est également dénommé [AICD](#) (*APP intracellular domain*). Celui-ci n'adopte pas de conformation stable en solution, mais différents états de transition ont pu être observés. Parmi ces derniers ont été décrits un cluster hydrophobe, un coude β et une structure type hélice α [[Ramelot, 2000](#)]. Il est probable que les interactions avec différentes protéines intracellulaires puissent modifier la conformation d'APP et en stabiliser la structure [[Reinhard, 2005](#)]. Ce domaine semble impliqué dans la transduction de différents signaux, puisqu'il interagit avec des protéines adaptatrices [[Hass, 2005](#)]. La région Tyr⁶⁶³-Glu-Asn-Pro-Thr-Tyr⁶⁶⁸ joue un rôle essentiel pour la modulation de diverses voies de transduction. De nombreux facteurs, comme les protéines X11 et Fe65, peuvent interagir avec cette région du domaine AICD [[Sabo, 2001](#)].

b) Fonctions de la protéine APP

Bien que la protéine APP ait fait l'objet de très nombreux travaux depuis son identification, ses fonctions physiologiques demeurent encore largement indéterminées. Comme nous l'avons vu plus haut, l'inactivation constitutive du gène *app* n'est pas létale. Malgré le rôle compensateur des protéines APLP, les souris APP^{-/-} présentent différentes anomalies au niveau du SNC, et notamment une prolifération anormale des cellules gliales, un raccourcissement des dendrites des neurones de l'hippocampe, une diminution du taux de certains marqueurs synaptiques comme la synaptophysine au niveau de l'hippocampe et du néocortex. Sur le plan physiologique, ces animaux montrent des anomalies au niveau de la potentialisation à long terme (*long term potentiation* ou [LTP](#)), qui constitue le substratum neurophysiologique de la mémoire et témoigne de la fonctionnalité synaptique. Enfin, les neurones issus de telles souris présentent une survie diminuée en culture. Ainsi, la protéine APP pourrait jouer de multiples rôles dans la survie, l'intégrité et la fonctionnalité des neurones [[Dawson, 1999](#)]. Cette protéine a été impliquée dans divers processus biologiques essentiels, comme la croissance des neurites et la synaptogenèse, le trafic des protéines au niveau axonal, la transduction transmembranaire du signal, les adhésions cellulaires ou l'homéostasie calcique [[Zheng, 2006](#)]. Comme nous allons le voir prochainement, la protéine APP subit différentes protéolyses au cours de son trafic intra cellulaire ; il est donc difficile de distinguer les propriétés biologiques de l'APP intacte (*full lenght*) de celles de ses produits de clivage, dont l'abondance relative va varier en fonction de son processing.

La protéine APP est impliquée dans des fonctions d'adhésion cellulaire. Ces interactions entre cellules ou avec la matrice extracellulaire pourraient solliciter

l'exodomaine de la protéine APP (cf. [ci-dessus](#)) [[Sabo, 2001](#)]. L'APP peut lier des composants de la matrice extra cellulaire comme le collagène ou l'héparine [[Beher, 1996](#)]. En outre, l'APP est colocalisée avec certaines protéines d'adhésion telles que la β 1-intégrine et la télencéphaline [[Verdier, 2004a](#)]. Une analyse aux rayons X a montré que le domaine E2 de l'APP peut former des dimères anti parallèles [[Wang, 2004](#)]. D'autres études ont ensuite montré que l'APP peut former des homodimères ainsi que des hétérodimères avec d'autres protéines de la famille APP (APLP1, APLP2). Une telle trans dimérisation permet la création d'adhésions inter cellulaires [[Soba, 2005](#)]. Cette propriété de dimérisation et ses conséquences sur le métabolisme et la fonction de l'APP seront abordées dans un [paragraphe](#) spécifique.

La protéine APP présente des similitudes au niveau de sa topologie et de son processing avec le récepteur Notch, ce qui suggère que l'APP puisse jouer un rôle de récepteur membranaire comme celui-ci. Ainsi, plusieurs ligands, capables de lier l'APP, ont été identifiés, notamment le peptide A β [[Lorenzo, 2000](#)], la F-spondine [[Ho, 2004](#)] ou encore la nectrine-1 [[Lourenco, 2009](#)]. La liaison de l'APP à ces ligands pourrait, par elle-même, influencer le processing ultérieur de la protéine. Par contre, les signalisations en aval de l'APP n'ont pas encore été identifiées et, de ce fait, la fonction de récepteur membranaire de l'APP reste encore sujette à débats [[Devys, 2012](#)].

Comme nous l'avons vu plus haut, la région Tyr⁶⁶³-Glu-Asn-Pro-Thr-Tyr⁶⁶⁸ interagit avec de nombreux facteurs, ces interactions pouvant être modulées par l'état de phosphorylation de la séquence [[Tamayev, 2009](#)]. Parmi les protéines adaptatrices impliquées, on peut citer les protéines X11 et Fe65, qui vont moduler la production de peptide A β [[Sabo, 2001](#)]. Ces protéines peuvent interagir avec l'APP, quel que soit l'état de phosphorylation de la séquence Tyr⁶⁶³-Glu-Asn-Pro-Thr-Tyr⁶⁶⁸. Au contraire, des protéines comme Shc et Grb2, protéines impliquées dans les voies de survie cellulaire, interagissent avec l'APP uniquement lorsque la Tyr⁶⁸² est phosphorylée. La phosphorylation du résidu Thr⁶⁸⁸ semble moduler la formation des complexes protéiques, en régulant la stabilité de ces édifices [[Reinhard, 2005](#)]. Le domaine AICD est également associé aux protéines G, lesquelles peuvent moduler, de manière positive ou négative, la signalisation cellulaire médiée par l'adénylate cyclase [[Okamoto, 1995](#)], la phospholipase C ou les canaux calciques voltage dépendants. A l'heure actuelle, aucun ligand physiologique de l'APP, capable d'activer la signalisation en aval, n'a été identifié. Ce domaine AICD peut réguler l'expression

de certains gènes, comme nous le verrons plus loin, soit après son clivage par les sécrétases, *via* un mécanisme de translocation nucléaire, soit par le recrutement et l'activation de protéines régulant l'expression des gènes [[Hass, 2005](#)].

La protéine APP subit un transport antérograde rapide au niveau des neurones. Durant ce transport, elle interagit notamment avec la kinésine-1 et fonctionnerait alors comme un récepteur membranaire pour la kinésine-1 [[Kamal, 2000](#)]. Elle pourrait médier le transport axonal de protéines telles que la β -sécrétase ([BACE1](#)) ou la préséniline-1 ([PS1](#)), protéines impliquées dans le processing de l'APP elle-même [[Kamal, 2001](#)]. Cette interaction n'a cependant pas été vérifiée dans une autre étude [[Lazarov, 2005](#)]. L'APP, ainsi que ses produits de clivage, les CTF (voir plus loin), pourraient réguler le transport vers la membrane de la PS1, mais pas de BACE1 [[Liu, 2009](#)]. L'APP pourrait également influencer le trafic d'autres protéines et particules, notamment le transport rétrograde du *nerve growth factor* ([NGF](#)) [[Salehi, 2006](#)] ou du transporteur de haute affinité de la choline [[Wang B, 2007](#)].

L'APP est impliquée dans de très nombreuses fonctions physiologiques au niveau des neurones : les adhésions et les interactions inter cellulaires, le trafic des protéines... La protéine APP semble également détenir un rôle potentiel de récepteur membranaire. Dans des situations pathologiques telle que la MA, un processing anormal de l'APP peut être à l'origine des troubles observés, soit par un déséquilibre dans les produits de clivage, soit par une perte des fonctions physiologiques de la protéine APP native.

c) Maturation et dégradation de la protéine APP

La protéine APP est une protéine transmembranaire de type I. Elle est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique ([RE](#)) et est alors transportée *via* l'appareil de Golgi vers le réseau trans Golgien (Trans Golgi Network ou [TGN](#)). C'est dans cet organite que sont retrouvés les niveaux les plus importants d'APP dans les neurones au repos [[Xu, 1997](#)]. Le peptide A β est produit au niveau du RE et du Golgi / TGN [[Greenfield, 1999](#)]. A partir du TGN, l'APP peut être transportée *via* des vésicules sécrétoires dérivées du TGN vers la surface cellulaire. A ce niveau, l'APP peut soit être clivée par l' α -sécrétase, et générer un fragment soluble, sAPP α [[Sisodia, 1992](#)], soit être réinternalisée vers le système endosomal / lysosomal [[Caporaso, 1994](#)] ([Figure 11](#)). Le peptide A β pourrait également être généré au niveau de ce système endosomal / lysosomal [[Haass, 1993](#)].

Si le peptide A β est neurotoxique, le sAPP α est au contraire neuroprotecteur. De ce fait, la distribution de l'APP à l'échelon subcellulaire conditionne la production de ses différents

produits de clivage et constitue un élément capital des phénomènes de neurodégénérescence [Mattson, 1997]. La compréhension des mécanismes de trafic de l'APP est donc cruciale pour comprendre la pathogenèse de la MA.

Le métabolisme de la protéine APP suit deux voies différentes, qualifiées de voies non amyloïdogène et amyloïdogène [Thinakaran, 2008]. Ces deux voies sont caractérisées par les enzymes protéolytiques impliquées et les fragments de clivage générés (Figure 12) :

- La voie non amyloïdogène implique deux clivages endoprotéolytiques consécutifs sur la protéine APP, lesquels sont catalysés par l' α -sécrétase puis la γ -sécrétase. Ces clivages produisent trois fragments distincts : la partie APP α soluble (sAPP α), le peptide P83 et le domaine AICD.
- La voie amyloïdogène fait intervenir la β -sécrétase et la γ -sécrétase (cette seconde enzyme étant commune aux deux voies métaboliques). Cette voie de maturation produit la partie APP β soluble (sAPP β), le peptide A β et le domaine AICD.

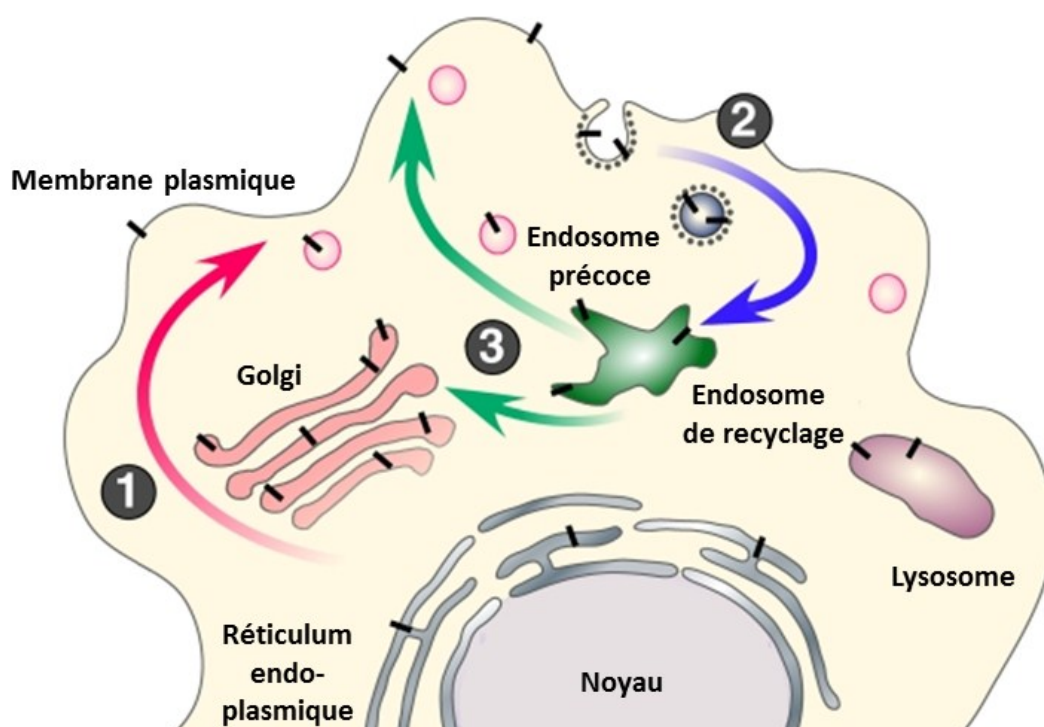


Figure 11 : Trafic intra cellulaire de la protéine APP [Thinakaran, 2008]

Les protéines APP (barres noires) récemment synthétisées subissent un processus de maturation à travers la voie sécrétoire constitutive, vers la membrane plasmique ❶. Lorsqu'APP atteint la surface cellulaire, elle est rapidement internalisée ❷. Cette internalisation lui permet de retourner vers la membrane, *via* les compartiments endocytiques et sécrétoires ❸, ou bien d'être dégradée dans les lysosomes. Le processing non amyloïdogénique d'APP a lieu principalement au niveau de la surface cellulaire, là où se trouvent les α -sécrétases. La voie amyloïdogène implique les compartiments endocytiques, contenant les β - et γ -sécrétases.

Dans les conditions physiologiques et dans la plupart des cellules, 95% du métabolisme de l'APP suit la voie non amyloïdogène et implique le clivage protéolytique sur le site α [Esch, 1990]. Comme on pouvait s'y attendre, la plupart des mutations du gène *app* à l'origine des formes familiales de MA sont localisées au niveau des sites de clivage. De ce fait, en rendant la protéine moins sensible à l'action de l' α -sécrétase, ces mutations détournent le métabolisme de l'APP vers la voie amyloïdogène, assurée par les β et γ -sécrétases. Ceci entraîne ainsi une production accrue de peptide $A\beta$.

Compartiment extracellulaire

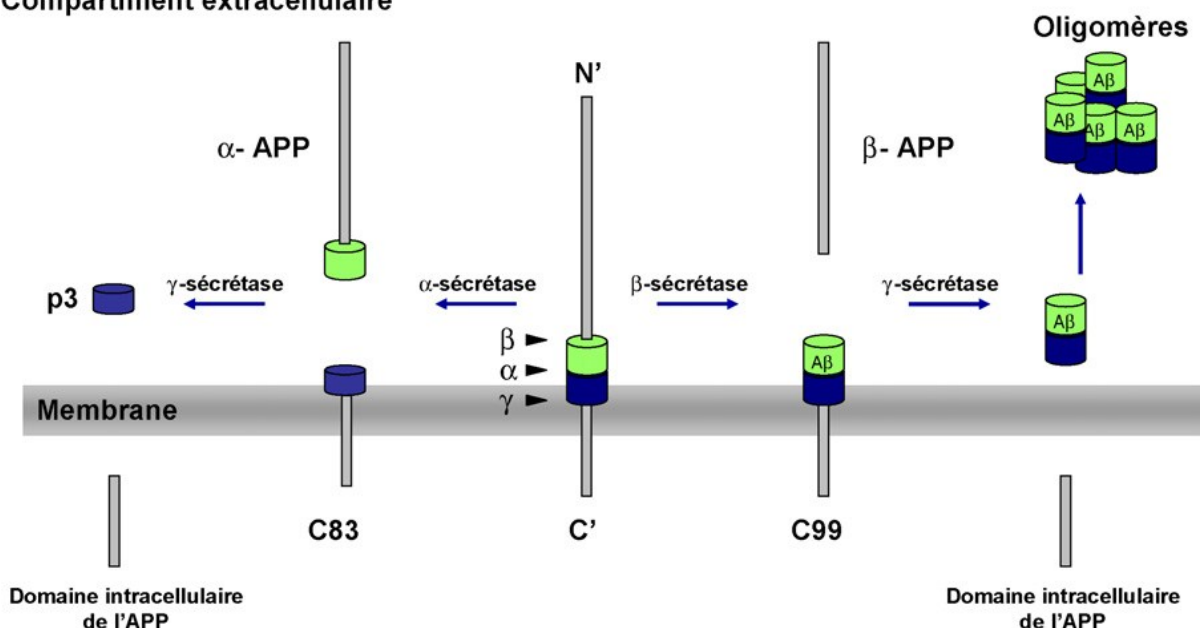


Figure 12 : Les deux voies de dégradation de la protéine APP [Malaplate-Armand, 2009]

Maturation de la protéine précurseur du peptide amyloïde. Physiologiquement, la protéine APP subit deux clivages enzymatiques successifs par une α -sécrétase, puis une γ -sécrétase, conduisant à la libération des fragments sAPP α et p3. Ces derniers sont solubles et ne conduisent pas à la formation de plaques amyloïdes. Cette voie sera donc qualifiée de « voie non-amyloïdogène ». La voie faisant intervenir les β - et γ -sécrétases conduit à la production du peptide $A\beta$. Celui-ci, en raison de sa très forte hydrophobicité, va s'agréger en oligomères, puis en fibrilles. Cette voie est donc dénommée « voie amyloïdogène ».

La voie non amyloïdogène et l' α -sécrétase

L' α -sécrétase clive la protéine APP au niveau de la liaison Lys¹⁶-Leu¹⁷ et libère un ectodomaine appelé sAPP α dans le milieu extra cellulaire (Figure 13) [Esch, 1990]. Comme la liaison peptidique clivée se situe à l'intérieur du fragment pouvant produire le peptide $A\beta$, la voie non amyloïdogène empêche la production de ce peptide $A\beta$. Cette voie métabolique est opérationnelle de manière constitutive, mais peut également être activée par différents stimuli, notamment les hormones sexuelles comme les œstrogènes ou la testostérone, certains neurotransmetteurs, ou des facteurs de croissance [Hooper, 2002]. L'activité α -

sécrétase est une activité endoprotéase localisée au niveau de la membrane plasmique [Sisodia, 1992], de type zinc métallopeptidase [Roberts, 1994], assurée par trois protéines de la famille des protéases **ADAM** (*A Disintegrin And Metalloprotease*), à savoir : les protéines ADAM9, ADAM10 et ADAM17, également dénommée **TACE** (*tumor necrosis factor- α converting enzyme*). Cette dernière dénomination provient du fait que cette enzyme clive le précurseur du *tumor necrosis factor α* (**TNF α**), pour en produire la forme biologiquement active [Allinson, 2003]. Ces 3 protéines partagent certaines caractéristiques structurales ; elles sont notamment toutes des protéines transmembranaires de type I. ADAM9 et ADAM17 seraient responsables de l'activité α -sécrétase inductible, dans de nombreux types cellulaires [Merlos-Suarez, 2001]. L'activité α -sécrétase constitutive serait quant à elle assurée par l'ADAM10 [Kuhn, 2010]. Une réduction très importante de l'activité ADAM10 a été retrouvée dans le cortex cérébral [Tyler, 2002] et les plaquettes sanguines de patients atteints de MA [Colciaghi, 2002], et coïncide avec une diminution du taux de sAPP α , tant au niveau des plaquettes que du LCR [Colciaghi, 2002]. Le fragment sAPP α joue un rôle important dans la plasticité synaptique et la survie neuronale et il possède des propriétés protectrices contre l'excitotoxicité [Furukawa, 1996]. Ces propriétés neuro- et excito-protectrices pourraient résulter de l'absence d'activation de la CDK5 induite par le stress [Han, 2005]. sAPP α régule également la prolifération des cellules souches neurales et contribue au développement précoce du SNC [Caille, 2004]. sAPP α peut remédier aux anomalies présentes chez les souris APP^{-/-}, ce qui suggère que les fonctions physiologiques de l'APP sont majoritairement médiées par sAPP α [Ring, 2007].

La voie amyloïdogène et la β -sécrétase

L'étape initiale et limitante de la génération du peptide A β réside dans le clivage de l'APP par la β -sécrétase. L'activité β -sécrétase est assurée par au moins deux protéases à acide aspartique, **BACE 1** et **2** (pour *β -site APP cleaving enzyme*) [Dingwall, 2001]. Au niveau du cerveau, la majorité de l'activité β -sécrétase proviendrait de l'enzyme BACE1 (également appelée Asp2 ou memapsine 2). BACE1 est une aspartyl protéase liée à la membrane, possédant un domaine transmembranaire de type I près de son extrémité C-ter [Sinha, 1999]. Deux sites de clivages par BACE1 existent au niveau de l'APP, à savoir Asp¹ et Glu¹¹ [Sinha, 1999] (Figure 13). BACE1 provient de la maturation d'un précurseur de grande taille : Pro-BACE1 [Creemers, 2001]. BACE1 requiert un environnement acide pour une activité catalytique optimale. Ainsi, l'activité de BACE1 est située au niveau du RE, du Golgi précoce,

du Golgi tardif / endosomes précoces et des endosomes [Greenfield, 1999]. BACE1 pourrait également être active à l'intérieur des lysosomes, puisqu'elle est active à pH acide [Vetrivel, 2006a]. BACE1 a également été décrite au niveau de la surface cellulaire [Vassar, 1999]. Le trafic intracellulaire de BACE1 est encore mal compris, mais sa localisation intra cellulaire pourrait influencer de manière critique la production de peptide A β . Le blocage de BACE1 au niveau du RE, dont l'environnement est à pH neutre, réduit considérablement son activité catalytique et diminue la production de peptide A β [Shi, 2009]. A l'inverse, l'accumulation de BACE1 dans les endosomes précoces, caractérisés par un pH acide, augmente la stabilité de BACE1, ce qui accroît le clivage de l'APP [Tesco, 2007]. BACE1 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante pour la MA. En effet, des niveaux accrus de BACE1 ont été rapportés dans les régions du cerveau touchées par la MA [Yang, 2003]. De même, des souris transgéniques exprimant la protéine BACE1 humaine présentent un taux élevé de peptide A β [Bodendorf, 2002], alors que des souris BACE1^{-/-} ne génèrent pas de peptide A β [Cai, 2001]. Cette délétion du gène BACE1 confère une protection certaine dans un modèle murin transgénique de MA [Ohno, 2004]. Néanmoins, l'inactivation de BACE1 est soumise à certaines limites : les souris BACE1^{-/-} présentent une surmortalité à la naissance, une taille réduite, ainsi que certains troubles neurologiques (électrophysiologiques, hypomyélinisation) et comportementaux (hyperactivité, hypersensibilité à la douleur) [Dominguez, 2005]. Ceci pourrait être lié à l'absence de production de peptide A β , ou à l'absence de processing d'autres substrats de BACE1 comme la neureguline 1, entre autres [Hu, 2006].

BACE2 est une homologue de BACE1, avec laquelle elle partage des spécificités de substrat similaires [Farzan, 2000]. De plus, le gène de BACE2 est localisé en 21q22.3, locus critique pour le développement de la trisomie 21 [Solans, 2000]. Il pourrait ainsi contribuer à la production accrue de peptide A β au cours de cette maladie. BACE2 clive *in vitro* des substrats de β -sécrétase comme l'APP *wild type* ou son mutant *Swedish* [Hussain, 2000]. Toutefois, BACE2 est faiblement exprimée dans le cerveau [Bennett, 2000]. De plus, elle clive plus activement l'APP au niveau du site α -sécrétase qu'au niveau du site β -sécrétase, *in vivo* [Yan R, 2001]. L'inactivation génique de BACE2 n'entraîne aucun phénotype lorsqu'elle est isolée. Par contre, elle aggrave les troubles observés en cas de *KO* pré-existant de BACE1, ce qui suggère un certain niveau de redondance entre ces enzymes [Dominguez, 2005].

De ce fait, on peut considérer BACE1 comme l'enzyme principalement responsable de l'activité β -sécrétase, mais ceci n'exclut cependant pas une contribution de BACE2 dans le développement de la MA.

En plus de BACE1 et BACE2, la cathepsine B pourrait représenter une autre activité β -sécrétase, puisque son inhibition diminue la production de peptide A β tant *in vitro* qu'*in vivo* [Hook, 2009]. Cependant, il n'existe actuellement aucune preuve de son implication physiologique dans le processing de l'APP.

Par la voie de la β -sécrétase, la majorité de l'APP ayant atteint la membrane plasmique (70%) est rapidement internalisée (en moins d'une minute) vers les compartiments intracellulaires précédemment évoqués, dont les endosomes, où elle subit le clivage sur le site β -sécrétase. Ce clivage libère un fragment soluble appelé sAPP β . Ce dernier ne diffère de sAPP α que par l'absence de la région A β (1-16) au niveau de son extrémité C-ter. Cette différence structurale entraîne des propriétés différentes, puisque sAPP β fonctionne comme un ligand de récepteur de mort et est impliqué dans la dégénérescence axonale et la mort neuronale [Nikolaev, 2009].

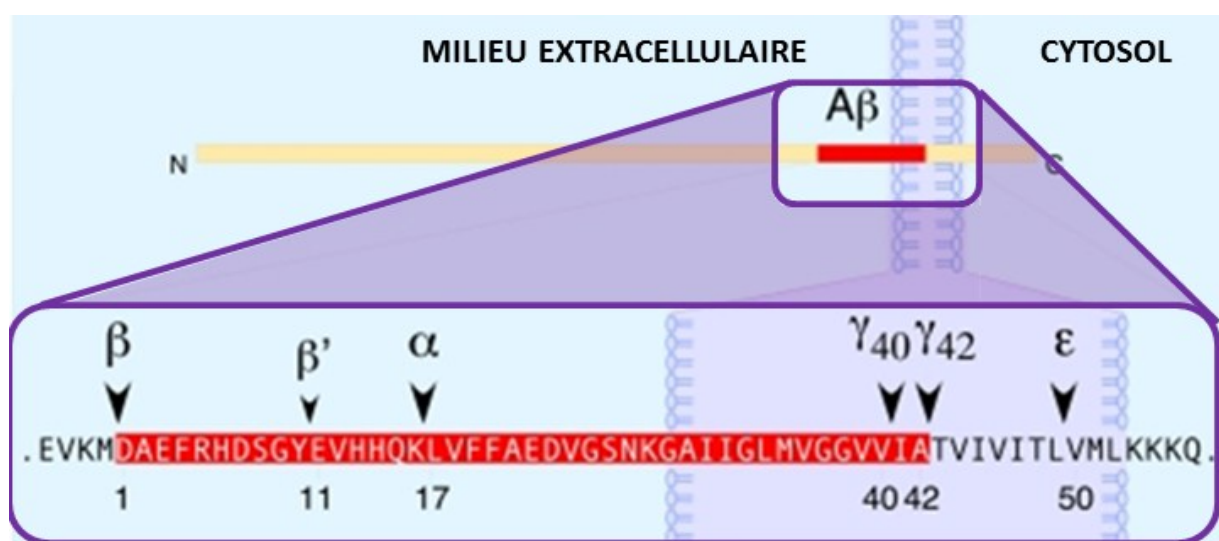


Figure 13 : Représentation schématique du clivage de l'APP *in situ* [Thinakaran, 2008]

Une structure schématique de l'APP, insérée dans la membrane plasmique, est représentée sur le haut de la figure, avec le domaine correspondant au peptide A β indiqué en rouge. La séquence peptidique correspondant à ce dernier est précisée au bas de la figure, avec les aa adjacents. Les principaux sites de clivage par les différentes sécrétases sont indiqués sous la forme d'une flèche \blacktriangledown , avec le nom de l'enzyme et l'aa correspondant au site de clivage (le numéro de l'aa étant donné en prenant comme référence l'aa en position N-ter du peptide A β : Asp¹).

Le clivage de la protéine APP par les α - et β -sécrétases génère les fragments α -CTF et β -CTF, respectivement [[Thinakaran, 2008](#)]. Ces derniers correspondent à la partie C-ter de l'APP et sont toujours liés à la membrane. Ils subiront un processing ultérieur par les γ -sécrétases. Comme il s'agit de produits intermédiaires dans le processing d'APP, leurs fonctions sont très peu connues. Toutefois, la surexpression du β -CTF est cytotoxique et provoque la dégénérescence de neurones. Ces propriétés neurotoxiques peuvent résulter d'une perturbation des fonctions physiologiques de l'APP, notamment dans la transduction du signal [[Yankner, 1989](#)]. Les effets du β -CTF pourraient aussi être médiés par les produits de clivage de la γ -sécrétase et des caspases, notamment l'AICD, C31 et Jcasp. Enfin, le β -CTF peut réguler la distribution de la γ -sécrétase à la membrane cellulaire et ainsi, influencer le processing de l'APP [[Liu, 2009](#)].

Le processing des fragments CTF et la γ -sécrétase

Les fragments α -CTF et β -CTF, produits par les voies non amyloïdogène et amyloïdogène, respectivement, vont subir un clivage par une autre protéase, commune à ces deux voies métaboliques : la γ -sécrétase. Ce clivage de l' α -CTF et du β -CTF va produire les peptides P83 et A β , respectivement. Le fragment P83, produit de la voie non amyloïdogène, est rapidement dégradé et ne possède aucune activité biologique connue. Le clivage du β -CTF par la γ -sécrétase a toujours lieu dans la portion transmembranaire du β -CTF. Toutefois, le site exact de coupure peut varier. Ce clivage peut donc produire des peptides A β de tailles différentes, notamment : le peptide A β (1-40), la forme majoritairement produite, ainsi que le peptide A β (1-42), espèce plus rare mais beaucoup plus amyloïdogène. Des études récentes ont montré que la γ -sécrétase possède également d'autres sites de coupures sur le β -CTF, notamment un site de clivage ζ , qui libère un fragment A β (1-46) [[Zhao, 2004](#)], et un site ϵ , dont le clivage produit un peptide A β (1-49) [[Weidemann, 2002](#)]. Ceci suggère un système de clivage séquentiel, où le clivage sur le site ϵ est suivi par un clivage sur le site ζ , puis sur le site γ . Ce clivage libère également le fragment intracellulaire de l'APP, appelé [AICD](#) (APP Intra Cellular Domain). Le fragment AICD résulte du clivage de l'APP par la γ -sécrétase en position ϵ (qui correspond au site de clivage par la γ -sécrétase sur la protéine Notch) [[Weidemann, 2002](#)]. Cette activité γ -sécrétase est assurée par un complexe de haute masse moléculaire, composé de différentes protéines : la nicastrine ([Nct](#)), les présénilines 1 et 2 ([PS1](#) et [PS2](#)) et les protéines [APH-1](#) (*anterior pharynx defective 1a homologue*) et [PEN2](#) (*presenilin enhancer 2*) [[Kimberly, 2003](#)].

a) Les présénilines sont exprimées de façon ubiquitaire dans tous les types cellulaires. Les mammifères possèdent deux protéines homologues : la PS1 et la PS2, qui contiennent 463 et 448 aa, respectivement [[Sherrington, 1995](#)]. Leurs gènes, *psen1* et *psen2*, sont localisés au niveau des *locus* 14q24.3 et 1q31-q42 [[Nishimura, 1999](#)]. Des mutations sur ces gènes sont responsables de formes familiales de MA, associées à une augmentation du *ratio* A β (1-42)/A β (1-40) [[Tomita, 1997](#)]. Ces protéines, contenant un nombre indéfini de passages transmembranaires [[Kim J, 2004](#)], sont principalement localisées dans le RE et le Golgi, et d'une façon très accessoire, au niveau des membranes plasmique et nucléaire [[Dominguez, 2001](#)]. Ces protéines participent à diverses fonctions cellulaires, comme l'apoptose, la signalisation intracellulaire, l'interaction avec la β -caténine et la maturation de protéines membranaires comme l'APP ou Notch [[Czech, 2000](#)]. Dans le cerveau, les PS subissent une maturation au niveau du RE, par clivage entre les domaines transmembranaires 6 et 7 [[Thinakaran, 1996](#)]. Les fragments N-ter et C-ter issus de ce clivage s'associent au niveau des membranes du Golgi pour former un hétérodimère fonctionnel [[Borchelt, 1996](#)]. L'activité protéolytique des PS est portée par deux résidus aspartyls au niveau des domaines transmembranaires 6 et 7 [[Wolfe, 1999](#)]. Les protéines PS interagissent probablement avec l'APP au niveau de leurs domaines transmembranaires respectifs [[Xia, 1997](#)]. Il semble que l'activité catalytique du complexe γ -sécrétase soit portée par les PS [[Ahn, 2010](#)].

b) La nicastrine (Nct) : Encore appelée Aph-2, la nicastrine est une glycoprotéine transmembranaire de type 1, de 709 aa [[Goutte, 2002](#)]. Elle est localisée au niveau du RE et du Golgi [[Leem, 2002](#)]. Au niveau du RE, la Nct s'associe aux PS et poursuit sa maturation dans l'appareil de Golgi [[Edbauer, 2002](#)]. La Nct est nécessaire à la stabilité et à la maturation du complexe γ -sécrétase, et serait impliquée dans la reconnaissance du substrat et sa présentation au site catalytique [[Shah, 2005](#)].

c) APH-1 et PEN-2 : Ces deux composants du complexe γ -sécrétase ont été mis en évidence par des techniques de *screening* génétique chez *C. elegans* [[Francis, 2002](#)]. APH-1 interagit avec la Nct au niveau du RE [[Fortna, 2004](#)]. Ce sous-complexe s'associera ensuite aux autres protéines pour constituer le complexe γ -sécrétase définitif [[LaVoie, 2003](#)]. La protéine APH-1 est nécessaire à l'activité protéolytique du complexe γ -sécrétase, bien que son rôle exact reste à préciser. PEN-2 est une protéine de 101 aa, comprenant 2 domaines transmembranaires et localisée principalement au niveau du RE. Elle assure la régulation de l'endoprotéolyse des PS [[Ahn, 2010](#)].

Ces quatre protéines sont nécessaires et suffisantes pour la fonctionnalité du complexe γ -sécrétase [Edbauer, 2003]. La déficience d'une seule de ces protéines est suffisante pour réduire fortement son activité catalytique.

Ce complexe protéique est actif au niveau de la membrane plasmique, du RE, du Golgi et du réseau trans Golgi (*trans Golgi network* ou **TGN**), ainsi que dans les compartiments endocytaires et intermédiaires. Il semblerait que la majorité de l'activité γ -sécrétase soit localisée au niveau des vésicules intra cytoplasmiques, l'activité au niveau de la membrane restant très minoritaire (6%) [Chyung, 2005]. Or, ces différents compartiments subcellulaires ne sont pas, à l'exception du TGN, des localisations majoritaires de l'APP [Cupers, 2001].

A côté des quatre composants « indispensables » du complexe γ -sécrétase, d'autres éléments accessoires ont été rapportés, ceux-ci jouant plutôt un rôle régulateur. C'est notamment le cas de la protéine transmembranaire CD147, de TMP21/p23 ou de la *γ -secretase activating protein* (**GSAP**) [Zhang, 2011]. Le niveau d'expression de ces protéines peut en effet moduler la production de peptide A β .

En plus de l'APP, la γ -sécrétase clive différentes protéines transmembranaires importantes, dont Notch, la cadhérine, l'ErbB4, le CD44 ou la tyrosinase [Vetrivel, 2006b]. Fait intéressant, le clivage de ces différents substrats semble dépendre du compartiment cellulaire considéré : le clivage de l'APP a lieu majoritairement dans le TGN et les endosomes précoces, alors que celui de Notch se déroule au niveau de la membrane plasmique [Tarassishin, 2004]. Ainsi, toute modification dans la distribution cellulaire de la γ -sécrétase pourra impacter le processing correct de l'APP et participer à la pathogenèse de la MA.

Le clivage par la γ -sécrétase entraîne le relargage du domaine intracellulaire (Intra Cellular Domain ou **ICD**) de la protéine substrat. Ce domaine ICD peut ensuite être transloqué vers le noyau, où il module l'expression de gènes cibles. Cette propriété est déjà bien établie pour certains substrats de la γ -sécrétase, comme Notch [Schroeter, 1998] ou ErbB4 [Sardi, 2006]. Le domaine AICD, ainsi libéré de la protéine APP, pourrait également transactiver l'expression de nombreux gènes, notamment ceux codant l'APP, la néprilysine, BACE1, GSK-3 β , p53, EGFR ou LRP1 [Kimberly, 2001]. De plus, AICD peut induire l'apoptose des neurones et les sensibiliser aux stimuli toxiques [Giliberto, 2008].

Le clivage de la protéine APP par les caspases

A côté des présénilines, les caspases (principalement la caspase 3) peuvent cliver l'APP au niveau de l'Asp⁶⁶⁴ (selon la séquence de l'APP695), au niveau de la portion intra

cytoplasmique de la protéine, au cours de l'apoptose. Ce clivage libère un fragment appelé C31, qui contient les 31 derniers aa de l'APP. Un clivage supplémentaire par les γ -sécrétases produit un fragment, comportant les aa situés entre le site de clivage γ et celui des caspases (fragment Jcasp) [Bredesen, 2009]. Ces fragments C31 et Jcasp possèdent des propriétés neurotoxiques. De plus, le clivage de l'APP par les caspases pourrait modifier son propre métabolisme [Gervais, 1999], bien que ces résultats soient encore débattus [Soriano, 2001]. Cependant, au cours de l'excitotoxicité induite par $A\beta$, le clivage d'APP par les caspases, entraîne la formation de C31 et de Jcasp et initierait une cascade de mort neuronale [Lu, 2003].

d) Régulation du processing de la protéine APP

Toute modification dans le trafic et la localisation intra cellulaire de la protéine APP va fortement impacter la production de peptide $A\beta$, puisque ce dernier est produit par deux voies mutuellement exclusives. Le processing de l'APP est étroitement régulé par différents mécanismes, dont la perturbation pourrait participer à la pathogenèse de la MA.

La dimérisation de la protéine APP

Comme d'autres récepteurs à domaine transmembranaire, en particulier le récepteur à l'*epithelial growth factor* (EGF) [Schlessinger, 2002], l'APP pourrait former des homodimères : Dans le cas de l'APP *full length*, cette homodimérisation fait intervenir son domaine E1 [Soba, 2005]. Les segments juxtamembranaires (JM) et transmembranaires (TM) sont également impliqués dans la formation d'homodimères. En effet, ce domaine TM/JM renferme 3 motifs GXXXG. Ces motifs jouent un rôle capital dans la dimérisation d'autres protéines, notamment la glycophorine A [Bormann, 1989]. Des motifs AXXXA, localisés dans le segment TM, pourraient également participer, de manière moins importante, à ce processus [Russ, 2000]. De plus, la région où sont localisés ces motifs est également le lieu des clivages d'APP par les différentes sécrétases. La dimérisation de l'APP représente une étape importante de son processing et pourrait aussi réguler sa fonction. Le segment E2 de l'ectodomaine peut se dimériser selon une orientation anti parallèle, et ce de manière réversible [Wang, 2004]. La formation de dimères trans cellulaires participerait à l'adhésion et aux interactions inter cellulaires. Cette transdimérisation peut faire également participer d'autres protéines que l'APP, en particulier les APLP [Soba, 2005]. Ces phénomènes seraient à la base de certaines fonctions de l'APP, en particulier pendant la migration neuronale et l'embryogenèse [Young-Pearse, 2007]. La dimérisation d'APP au niveau des domaines

JM/TM favorise la production de peptide A β et les sécrétases impliquées semblent capables d'effectuer leur clivage d'APP sous forme dimérique [[Scheuermann, 2001](#)]. Les interactions entre les motifs GXXXG favorisent le clivage par la γ -sécrétase, en modifiant l'accessibilité de l'enzyme au site de clivage [[Kienlen-Campard, 2008](#)]. Cependant, l'accessibilité des différents sites de clivage ne serait pas impactée de la même manière. Ainsi, la perte de la dimérisation *via* ces motifs GXXXG inhibe la production du peptide A β (1-42) [[Kienlen-Campard, 2002](#)]. Ces processus de dimérisation pourraient également intéresser les produits de dégradation de l'APP, notamment le β -CTF. Ainsi, le clivage par la γ -sécrétase est influencé par l'orientation des hélices transmembranaires composant le dimère. Cette orientation relative pourrait influencer la production de peptide A β [[Kienlen-Campard, 2008](#)]. La dimérisation pourrait également moduler la libération du fragment AICD. Toutefois, la suppression des motifs GXXXG semble sans effet sur les concentrations en fragment AICD [[Kienlen-Campard, 2008](#)]. Enfin, la formation d'hétérotrimères est également possible, et peut influencer le processing de l'APP. Des motifs GXXXG et AXXXA sont également présents sur des enzymes telles que BACE1 ou APH-1 (ce motifs GXXXG est d'ailleurs essentiel pour la formation d'un complexe γ -sécrétase actif) [[Lee, 2004](#)]. Ainsi, les interactions déterminées par ces motifs peuvent moduler la liaison d'APP à des enzymes ou d'autres complexes protéiques impliqués dans son trafic et son métabolisme.

Les facteurs modulant le trafic intracellulaire de la protéine APP

Le trafic des protéines à l'intérieur de la cellule est étroitement régulé par divers facteurs cytosoliques. De nombreuses protéines pouvant interagir avec l'APP et modifier sa distribution subcellulaire ainsi que la production de peptide A β ont été identifiées. Parmi ces dernières, on peut citer :

- Trois facteurs de la famille mint (mint1, mint2 et mint3), qui peuvent altérer la stabilité de la protéine APP dans la cellule et modifier à la fois la production et la sécrétion de sAPP α et du peptide A β [[Borg, 1998](#)]
- Rab6, une protéine liant le GTP, impliquée dans la régulation du trafic membranaire, et qui peut moduler le processing de l'APP [[McConlogue, 1996](#)]
- La clathrine, qui participe à l'internalisation de l'APP membranaire pour la diriger vers la voie des endosomes / lysosomes. L'endocytose médiée par la clathrine est elle-même régulée par de nombreux facteurs, dont AP-2 ou la dynamine I [[Maldonado-Baez, 2006](#)].

D'autres protéines peuvent moduler le processing de l'APP en se liant directement à cette protéine. Ainsi, la PS1, composant du complexe γ -sécrétase, peut également réguler le trafic de nombreuses protéines membranaires, dont d'autres composants de ce complexe (NCT, APH-1, PEN2) et l'APP [Vetrivel, 2006b]. La PS1 pourrait également moduler le trafic intracellulaire de l'APP : l'inactivation (ou l'expression d'un variant inactif) de PS1 majore la génération de vésicules au niveau du RE et du TGN et accroît la localisation membranaire de l'APP. A l'inverse, l'expression d'une forme mutante de PS1, associée aux formes familiales de MA, entraîne des effets opposés. Ceci pourrait expliquer pourquoi ces mutations de PS1 augmentent la production d'A β en diminuant le transport intra cellulaire de l'APP, en augmentant ainsi la disponibilité de l'APP pour le clivage par les β - et γ -sécrétases, localisées au niveau du TGN. La PS1 pourrait aussi moduler le trafic de l'APP en interagissant avec des facteurs cytosoliques comme Rab6, Rab11 et Rab GD1 [Scheper, 2004]. PS1 interagit aussi avec la phospholipase D1 (PLD1), une enzyme impliquée dans la régulation des trafics cellulaires par la modification de la composition lipidique des membranes [Cai, 2006]. L'interaction PS1 / PLD1 entraîne le recrutement de la PLD1 au niveau du Golgi / TGN, ce qui accroît l'export de l'APP vers la membrane plasmique [Cai, 2006].

La protéine SorLA agit comme un régulateur des trafics vésiculaires entre la membrane, les endosomes et le Golgi [Yamazaki, 1996]. SorLA est une protéine membranaire de type I, appartenant à la famille des récepteurs aux lipoprotéines, exprimée dans les neurones. Son expression est réduite dans les cerveaux de patients atteints de la MA [Scherzer, 2004] et certains variants de son gène ont été associés à un risque accru de MA sporadique [Rogaeva, 2007]. La surexpression de SorLA entraîne la redistribution d'APP au Golgi et diminue la production d'A β . A l'inverse, son inactivation entraîne une surproduction d'A β [Andersen, 2005].

L'APP peut se lier à différents partenaires, dont le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LRP). LRP est une protéine homologue à SorLA, qui se lie à l'APP, *via* la protéine adaptatrice Fe65 [Trommsdorff, 1998]. LRP peut également se lier, directement ou non, à A β afin d'assurer son élimination [Deane, 2004]. La dissociation entre LRP et APP entraîne une augmentation de la localisation de l'APP à la membrane, et une diminution de la production de peptide A β . A l'inverse, l'expression du minirécepteur LRP dans un modèle murin de MA aggrave les troubles mnésiques et accroît la production de peptide A β [Zerbinatti, 2004].

I – 3 Peptide β -amyloïde : l'agent principal de la maladie d'Alzheimer ?

Le peptide A β constitue un produit du métabolisme de la protéine APP, y compris dans les conditions physiologiques. Il n'est donc pas étonnant que l'on retrouve ce dernier dans le plasma et le liquide céphalorachidien (LCR) de sujets indemnes de toute pathologie [Ida, 1996]. Il semble donc que ce peptide ne possède pas de propriétés neurotoxiques intrinsèques. Les perturbations synaptiques et la mort neuronale résulteraient alors d'un phénomène pathologique d'auto agrégation du peptide [Pike, 1991]. En effet, le peptide A β synthétique est capable de s'agréger *in vitro* sous forme de fibrilles matures semblables à celles présentes à l'intérieur des plaques amyloïdes des patients atteints de MA [Castano, 1986]. C'est de cette observation qu'est né le modèle physiopathologique de la **cascade amyloïde** proposé par Hardy et Higgins en 1992 [Hardy, 1992]. Les insuffisances de ce modèle ont attiré l'attention sur le rôle propre des oligomères de peptide A β , dont nous présenterons la complexité et les questions actuellement posées sur leurs mécanismes toxiques.

I – 3 a. La cascade amyloïde et ses insuffisances

Le modèle de la cascade amyloïde postule qu'un métabolisme anormal de la protéine APP serait à l'origine des altérations observées au cours de la MA. Ce métabolisme altéré aboutirait à une accumulation de peptides A β sous forme de fibrilles, constituant les dépôts amyloïdes retrouvés au niveau du cerveau de patients et de souris transgéniques (Figures 1 et 3). Cette hypothèse est corroborée par les formes familiales de la MA ou encore la trisomie 21. En effet, les mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme de la protéine APP, ou la présence d'un gène *App* supplémentaire, entraînent une production accrue de peptide A β et l'apparition précoce de PA [Hardy, 1992]. De même, des mutations au sein de la protéine APP, qui favorisent son agrégation sous forme fibrillaire, constituent d'autres étiologies de formes familiales de MA. Ces différents mécanismes physiopathologiques confortent l'hypothèse de la cascade amyloïde [Hardy, 1992].

L'accumulation de peptide A β sous forme de fibrilles a été étudiée en analysant le comportement de peptides synthétiques en suspension dans divers tampons. De nombreuses approches ont été utilisées (dichroïsme circulaire, IRFT, microscope de force

atomique, RMN, diffraction aux rayons X) et ont été par la suite complétées par des modélisations *in silico*. Différentes représentations modélisent la structure tridimensionnelle du peptide A β (1-40) au niveau de la [figure 14](#). Un modèle concordant de fibrillogénèse a ainsi pu être dégagé de ces différentes études ([Figure 15](#)). Celui-ci stipule que l'adoption d'une structure en feuillet β constitue un préalable indispensable à la formation de fibrilles de peptide A β [[Serpell, 2000](#)]. Les fibrilles de peptide A β (1-40) contiennent en effet de nombreux feuillets β intermoléculaires [[Serpell, 2000](#)]. L'apparition d'un coude entre les aa 26 et 29 du peptide A β est également nécessaire à son accumulation sous forme de fibrilles [[Irie, 2005](#)]. Par contre, on relève peu d'études sur la fibrillogénèse du peptide A β (1-42), rendues difficiles par l'hydrophobie importante de ses résidus C-ter. Cependant, il a également été montré que le peptide A β (1-42) adoptait lui aussi une conformation riche en feuillets β antiparallèles, ainsi qu'un coude, avec un cluster hydrophobe des résidus 35 à 42.

Les protofibrilles, sous forme stable, sont composées de 15 à 40 monomères. Cet assemblage est lui-même stabilisé par des cations, associés aux fibrilles. Ces protofibrilles sont neurotoxiques à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les mécanismes à l'origine de cette toxicité neuronale ne sont pas encore totalement élucidés [[Caughey, 2003](#)]. Toutefois, différentes hypothèses ont été proposées pour relier la structure des fibrilles à leurs propriétés neurotoxiques [[Lorenzo, 1994](#)]. Ainsi, l'exposition de la Met³⁵ lors du repliement en feuillet β pourrait générer un stress oxydant. Celui-ci provoquerait des dommages à la membrane et perturberait les nombreuses fonctions cellulaires qu'elle abrite [[Irie, 2005](#)].

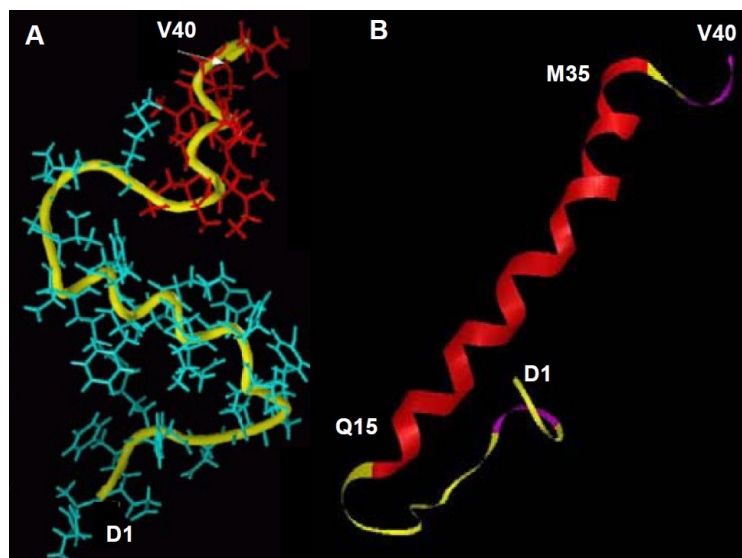


Figure 14 : Structure tridimensionnelle du peptide A β (1-40)

A : Sticht et coll. (1995) [[Sticht, 1995](#)] ; **B** : Coles et coll. (1998) [[Coles, 1998](#)].

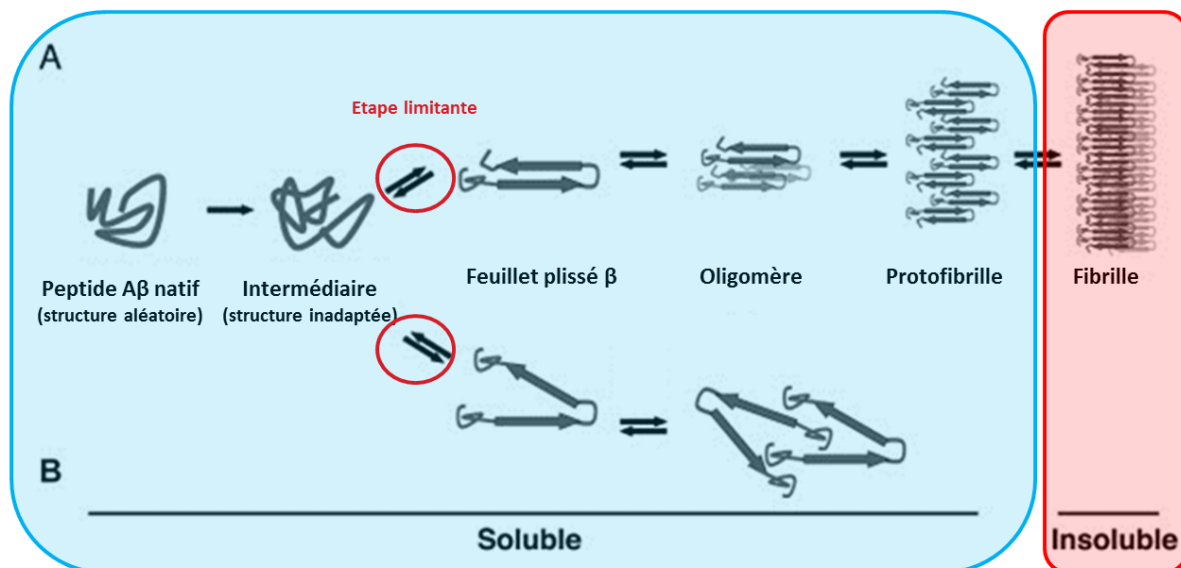


Figure 15 : Modélisation des changements structuraux du peptide Aβ associés à la fibrillogenèse [Dasilva, 2010]

Le peptide Aβ natif adopte une structure aléatoire en bobine. La fibrillogenèse débute lorsque le peptide Aβ subit un changement conformationnel qui aboutit à une structure intermédiaire inadaptée. Cet intermédiaire peut subir un nouveau changement de conformation, lequel produit une structure en feuillet β. A : Cet intermédiaire est instable et s'agrège en oligomères d'ordre plus élevé, composés de multiples sous unités. Le recrutement de monomères supplémentaires conduit à la formation de protofibrilles, qui produisent des fibrilles insolubles. B : Une voie alternative d'agrégation conduirait à la production d'oligomères adoptant une conformation particulière, qui les empêche de former des fibrilles.

L'accumulation des fibrilles de peptides Aβ est observée à la fois dans le milieu extracellulaire et à l'intérieur des neurones. A l'extérieur des cellules, elle prend son origine au niveau d'un noyau de nucléation. Ce noyau serait composé de gangliosides, métaux, protéines. Toutefois, sa composition précise reste encore un sujet de discussion. Ces agglomérats de peptides Aβ dans l'espace extracellulaire entraîneraient l'apoptose des neurones avoisinants [Hayashi, 2004]. Après une phase de croissance, les plaques vont se densifier. La (Les) cause(s) de ce changement de comportement des plaques n'est (ne sont) pas connue(s) à l'heure actuelle. La présence de peptide Aβ au sein des neurones a conduit à une hypothèse alternative [Gouras, 2005]. Selon celle-ci, les plaques se formeraient à l'intérieur des neurones, où elles exerceraient leurs effets toxiques. Après la mort de la cellule, elles seraient libérées dans l'espace extracellulaire, où elles poursuivraient leur croissance. Elles entraîneraient alors l'apoptose des neurones environnants.

Toutefois, cette hypothèse ne permet pas de répondre à toutes les questions soulevées par la physiopathologie de la MA, en particulier dans ses phases précoces. De plus,

la toxicité du peptide A β sous forme agrégée ne permet pas d'expliquer certaines spécificités des atteintes cellulaires et tissulaires, qui sont caractéristiques de la MA, en particulier leur caractère régiospécifique et leur cinétique d'apparition [Marchesi, 2005]. De la même façon, d'un point de vue clinique, diverses observations vont à l'encontre de la toxicité exclusive du peptide A β sous forme agrégée. En effet, des sujets âgés indemnes de toute démence peuvent présenter des dépôts amyloïdes au niveau du cortex et de l'hippocampe, de manière totalement asymptomatique [Delaere, 1993]. De plus, aucune étude n'a pu mettre en évidence de corrélation entre l'abondance des plaques amyloïdes et le niveau de détérioration des fonctions cognitives au cours de la MA [Terry, 1991]. A l'inverse, des phénomènes neurodégénératifs peuvent apparaître en l'absence de plaques amyloïdes [Cochran, 1991]. Des plaques amyloïdes ont pu être retrouvées dans des zones cérébrales indemnes de tout signe histologique de neurodégénérescence [Joachim, 1989]. La concentration en peptide A β soluble semble mieux corrélée à l'intensité de la perte synaptique et à l'atteinte démentielle que le nombre de plaques amyloïdes [McLean, 1999]. Diverses études sur des animaux transgéniques modèles de MA ont prouvé que les altérations morphologiques et fonctionnelles des neurones précédaient l'apparition des dépôts amyloïdes [Mucke, 2000]. Ainsi, des souris exprimant une forme mutante de l'APP humaine (V717F) présentent une diminution de la densité en neurones et en terminaisons pré-synaptiques, avant que les premières plaques amyloïdes ne soient détectables [Hsia, 1999]. Sur le plan fonctionnel, ces mêmes souris présentent des déficits de la transmission synaptique au niveau de l'hippocampe, qui précèdent de plusieurs mois l'apparition des plaques [Hsia, 1999]. De discrètes altérations morphologiques sont détectables au niveau des dendrites d'une sous population de neurones granulaires du gyrus denté, chez des souris transgéniques exprimant l'APP mutante V717F. Là encore, ces altérations structurales précèdent largement l'apparition de la pathologie amyloïde [Wu, 2004]. Ces différentes observations suggèrent que des formes plus précoces d'agrégats d'A β sont responsables des altérations cognitives présentes chez ces souris.

Ainsi, de nombreux auteurs sont désormais convaincus que le peptide A β fibrillaire accumulé dans les plaques séniles n'occupe pas une place essentielle dans la genèse des troubles cognitifs observés pendant les phases précoces de la MA. Au contraire, ces plaques ne seraient que le résultat tardif du processus dégénératif lui-même. Elles pourraient même constituer une forme d'exclusion du peptide A β au sein du SNC, de manière à en réduire la toxicité [Selkoe, 2004]. Plusieurs équipes ont donc proposé une alternative à la cascade

amyloïde traditionnelle, où les oligomères solubles de peptide A β seraient responsables des phénomènes de dégénérescence neuronale associés aux phases précliniques de la MA [[Drouet, 2000](#)].

I – 3 b. Diversité des oligomères solubles de peptide β -amyloïde

Les oligomères solubles de peptide A β regroupent un ensemble très hétérogène de complexes moléculaires formés par des monomères de ce peptide. Cette hétérogénéité concerne non seulement le nombre de monomères présents dans l'édifice, mais également la conformation de ceux-ci. La diversité structurale de ces oligomères conditionne leur activité biologique, et par voie de conséquence, leur toxicité sur les neurones et les synapses.

Des structures globulaires formées de peptide A β , d'un diamètre de l'ordre de 5 nm, d'une taille de 53 kDa ont pu être générées dans du milieu Hams-F12 et ont été qualifiées de *A β -derived diffusible ligands (ADDLs)* [[Lambert, 1998](#)]. Ces ADDLs possèdent la capacité de se lier aux épines dendritiques de neurones en culture, d'induire la mort neuronale et d'inhiber la LTP. Ces agrégats de peptide A β induisent une perturbation des fonctions mitochondriales sur des cellules PC12 [[Oda, 1995](#)]. La toxicité de ces oligomères sur des cultures mixtes de cellules cérébrales est dépendante à la fois du temps d'incubation et de la dose de peptide A β présente dans le milieu [[Hartley, 1999](#)]. Plus récemment, d'autres travaux ont montré que la neurotoxicité de ces ADDLs était supérieure à celle des fibrilles matures [[Dahlgren, 2002](#)]. Enfin, ces mêmes ADDLs ont pu être mis en évidence dans des cerveaux de patients atteints de MA [[Lambert, 2001](#)].

La formation d'oligomères annulaires de peptide A β , de taille plus importante que les structures décrites ci-dessus, a été également rapportée. Ainsi, l'incubation de peptide A β avec de la clusterine ([ApoJ](#)) entraîne l'apparition d'agrégats de peptide A β , d'une taille supérieure à 200 kDa, qui sédimentent lentement et résistent à la dissociation induite par de faibles concentrations de sodium dodécylsulfate ([SDS](#)) [[Oda, 1995](#)]. Ces formes annulaires présentent un diamètre externe de 8 à 12 nm et un diamètre interne de 2 à 2,5 nm, leur masse moléculaire est comprise entre 150 et 250 kDa [[Lashuel, 2006](#)]. Ces assemblages annulaires, dont la forme rappelle celle d'un *doughnut*, présentent une certaine homologie avec plusieurs toxines bactériennes, formant des pores cellulaires. Cette dernière propriété pourrait expliquer une partie des effets toxiques du peptide A β sur les cellules [[Lashuel, 2006](#)].

Des structures globulaires de taille encore supérieure ont également été décrites sous le terme d'amylosphéroïdes. Elles possèdent un fort pouvoir neurotoxique. Ces structures présentent une conformation sphéroïde et leur diamètre est compris entre 10 et 15 nm [[Hoshi, 2003](#)].

Chez les souris Tg2576, les premiers oligomères de peptide A β apparaissent vers l'âge de 6 mois, âge auquel ces souris présentent les premières altérations cognitives. Une étude par électrophorèse en SDS-PAGE et en gel filtration a permis de caractériser ces oligomères, principalement sous la forme de nonamères et de dodécamères [[Lesne, 2006](#)]. Le niveau de ces oligomères est corrélé avec les altérations de la mémoire spatiale, mesurée à l'aide de la piscine de Morris. De plus, l'injection de ces dodécamères dans le ventricule latéral de rats entraîne une importante perturbation de la mémoire spatiale. Ainsi, une fraction soluble et diffusible de 56 kDa, dérivée des cerveaux de souris transgéniques modèles de MA, pourrait médier les effets délétères sur les fonctions cognitives. Toutefois, les premiers troubles cognitifs et les perturbations de la LTP observés chez la souris Tg2576 précèdent l'apparition des dodécamères au niveau de leur cerveau [[Lesne, 2006](#)].

De ce fait, d'autres événements pathologiques précèdent l'apparition de ces dodécamères, qui ne peuvent à eux seuls expliquer l'ensemble des perturbations structurales et fonctionnelles dans ce modèle de MA.

Des études plus récentes se sont focalisées sur des oligomères de plus petite taille, en essayant de corréliser leur taille avec leur toxicité. Différents oligomères de peptide A β peuvent être générés dans des systèmes cellulaires 7PA2, constitués de cellules CHO exprimant une forme mutante de protéine APP (V717F). Les oligomères sécrétés par ces cellules sont principalement des dimères et des trimères, ainsi que, dans une moindre proportion, des tétramères [[Podlisny, 1995](#)].

Des monomères, dimères, trimères de peptide A β ont pu être détectés dans le surnageant d'échantillons issus du cortex frontal et du *putamen* de patients atteints de MA [[McLean, 1999](#)]. A partir d'un panel de cerveaux atteints ou non de MA, une autre équipe a tenté de caractériser les formes biochimiques de peptide A β et leur relation avec la présence d'une démence de type MA [[Mc Donald, 2010](#)]. Les monomères de peptide A β sont spécifiquement détectés dans la fraction soluble des cerveaux atteints de MA. Les dimères sont présents à la fois dans la fraction soluble et dans la fraction extraite à l'acide formique, notamment dans les cortex frontaux et temporaux. Ces dimères sont électivement détectés

dans les échantillons provenant de patients atteints de MA, alors qu'ils sont quasi absents chez les sujets sains. Cette dernière étude met en évidence un lien étroit entre la présence de ces oligomères de faible masse moléculaire et la MA. Une troisième équipe a rapporté la présence de dimères non dissociables par le SDS dans la région CA1 de l'hippocampe de patients, que ceux-ci présentent ou non des DNF.

Ce point renforce l'idée selon laquelle les oligomères de peptide A β interviennent dans la pathogenèse de la MA avant la participation de la protéine Tau. Ces oligomères stables dans le SDS ont été également détectés dans le LCR humain [Vigo-Pelfrey, 1993]. Dans le LCR, ces oligomères peuvent être constitués de dimères de peptide A β (1-40) et de trimères de peptide A β (6-42) ou A β (1-35) [Vigo-Pelfrey, 1993]. Enfin, ces oligomères ont été directement mis en évidence au sein des plaques amyloïdes [Enya, 1999]. De ce fait, les oligomères pourraient être séquestrés dans les plaques amyloïdes, afin de réduire leur toxicité. À l'inverse, ces plaques pourraient également constituer des réservoirs d'oligomères pouvant être libérés et exercer leurs effets délétères au niveau des neurones voisins.

En termes de pouvoir cytotoxique sur des cellules PC12, les dimères, trimères et tétramères sont beaucoup plus toxiques que les monomères. Il existe une relation non linéaire entre l'ordre des oligomères et leur pouvoir toxique (tétramères > trimères > dimères > monomères). Cette relation existe également entre l'ordre des oligomères et leur pouvoir à initier la formation de fibrilles [Ono, 2009]. Il a été également montré que les trimères de peptide A β , issus de milieu de culture conditionné, peuvent totalement inhiber la LTP, alors que les dimères et les tétramères n'entraînent qu'une inhibition partielle [Townsend, 2006]. Les dimères et trimères issus de ce même milieu provoquent également une perte progressive de synapses au niveau de cultures organotypiques d'hippocampe de rat [Shankar, 2007]. L'injection intra cérébro ventriculaire (ICV) de ces oligomères de faible masse moléculaire dans le ventricule latéral de rats est capable d'inhiber la LTP *in vivo* [Walsh, 2002]. Le fractionnement préalable de ces oligomères a montré que seuls ces oligomères de faible masse moléculaire pouvaient inhiber la LTP, alors que les monomères et les oligomères d'ordre supérieur étaient dépourvus de cette capacité [Walsh, 2005]. De plus, la neutralisation de ces oligomères par un anticorps (Ac) monoclonal permet de contrecarrer leurs effets délétères [Klyubin, 2005]. L'injection ICV de dimères de peptide A β modifié (A β S26C), stabilisés par la création d'un pont disulfure entre les cystéines, entraîne une inhibition rapide de la LTP [Hu, 2008].

Plus récemment, l'injection ICV d'oligomères de peptide A β à des rats subissant un test d'évitement passif provoque une altération de la consolidation de cet apprentissage [Freir, 2011]. Cette altération est associée à une raréfaction du nombre de synapses dans le gyrus denté. Ceci suggère que les oligomères de peptide A β perturbent spécifiquement certains processus du remodelage synaptique associés à la consolidation. La contribution des oligomères de faible masse moléculaire aux autres aspects de la MA semble moins évidente. Dans le modèle de souris triple transgénique, qui associe les pathologies amyloïde et Tau, les oligomères de peptide A β , principalement des dimères, trimères et pentamères, apparaissent initialement dans les neurones [Oddo, 2006a]. De plus, l'administration ICV d'un anticorps dirigé spécifiquement contre ces oligomères est suffisante pour supprimer à la fois la pathologie amyloïde et les manifestations liées à la protéine Tau.

Un nouveau modèle de souris transgénique, qui exprime une forme mutante de l'APP (E963 Δ), est caractérisé par une production accrue d'oligomères de faible masse moléculaire (dimères, trimères et tétramères), associée à un dysfonctionnement synaptique important. La délétion d'un aa au niveau du peptide A β empêche la formation de fibrilles [Tomiyama, 2010]. Cette souris présente une accumulation d'oligomères à l'intérieur des neurones, associée à une phosphorylation anormale de la protéine Tau dès l'âge de 8 mois. Une activation de la microglie est détectable à partir de 12 mois, suivie d'une participation astrocytaire vers 18 mois. Les pertes neuronales surviennent à 24 mois.

Ainsi, les oligomères de faible masse moléculaire n'entraînent pas uniquement des altérations synaptiques, mais sont potentiellement responsables des autres manifestations caractéristiques de la MA dans des modèles *in vivo*.

Cependant, ces oligomères de faible masse moléculaire présentent une instabilité structurale qui rend leur étude délicate. De ce fait, les relations entre leur structure et leur toxicité sont relativement difficiles à élucider. Pour contourner cet obstacle, les structures peuvent être stabilisées grâce à des pontages entre les peptides qui les composent, générés par l'action de la lumière. Cette technique, connue sous le terme de *Photo – Induced Cross-linking of Unmodified Proteins (PICUP)*, permet d'étudier la conformation et les propriétés neurotoxiques de ces oligomères de faible masse moléculaire. Il a été ainsi montré que la taille des oligomères s'accroît avec leur ordre. De plus, les monomères d'A β sont largement déstructurés, alors que les oligomères présentent un accroissement de leur contenu en feuillet β tandis que leur ordre augmente. Ce changement de conformation est corrélé avec

la capacité des oligomères à initier la formation de fibrilles, ainsi qu'avec leur toxicité sur les neurones [Ono, 2009]. Cependant, toutes ces données sont à considérer avec précautions, puisqu'il est difficile de transposer les données obtenues avec ces oligomères stabilisés par la technique PICUP aux oligomères issus de cultures cellulaires ou obtenus par l'agrégation de peptide A β synthétique. De la même façon, la transposition de ces données *in vitro* aux phénomènes ayant lieu dans les cerveaux de patients atteints de la MA est soumise à d'énormes réserves.

A côté de l'hétérogénéité en termes de masse moléculaire (souvent appréciée par la mobilité électrophorétique) et d'aspect (la structure de ces oligomères étant difficile à apprécier à l'échelle atomique), une hétérogénéité en termes de conformation a pu être mise en évidence par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Ainsi, des oligomères de masses moléculaires identiques et d'aspects morphologiques similaires peuvent renfermer des variants structuraux. La reconnaissance par un anticorps donné nécessite l'exposition de son épitope spécifique, lequel peut être masqué à l'intérieur de l'oligomère, selon sa conformation. Ainsi, l'emploi de deux anticorps différents, A11 et OC, reconnaissant spécifiquement les oligomères et les fibrilles de peptide A β , respectivement, permet de distinguer deux types d'oligomères [Glabe, 2008] :

- les oligomères préfibrillaires, qui sont A11 positifs et OC négatifs
- les oligomères fibrillaires, qui sont A11 négatifs et OC positifs.

De même, l'anticorps 6E10 reconnaît les oligomères formés par le peptide A β synthétique à pH acide, mais pas ceux formés à pH neutre, ce qui indique que les conditions d'oligomérisation influencent la conformation des oligomères [Necula, 2007].

I – 3 c. Mécanismes de toxicité cellulaire des oligomères de peptide A β

En plus de la caractérisation de leur structure hautement hétérogène, l'étude des mécanismes d'action des oligomères de peptide A β constitue la thématique de très nombreux travaux. Deux grandes hypothèses s'opposent à ce sujet : celle de la présence d'un récepteur et celle d'une action membranaire directe.

Bien que les oligomères modifient plusieurs grandes voies de signalisation intracellulaires et que plusieurs récepteurs potentiels aient été identifiés, cette question reste ouverte en raison de la structure oligomérique trop mal définie.

Une action directe des oligomères sur la membrane est possible, notamment avec la formation de pores, mais la (les) structure(s) des oligomères reste(nt) encore trop mal caractérisée(s) pour apporter une conclusion ferme à cette hypothèse.

Enfin, il ne faut pas oublier que le peptide A β est d'abord produit à l'intérieur du neurone et qu'il n'est pas exclu qu'une partie de son action biologique se déroule à l'intérieur de la cellule.

a) Voies de signalisation cellulaires altérées par le peptide A β et récepteurs potentiels

Les oligomères de peptide A β induisent un processus apoptotique, dépendant des caspases [[Rohn, 2008](#)]. A l'inverse, le peptide A β sous forme fibrillaire entraînerait plutôt une mort cellulaire par nécrose [[Suzuki A, 1997](#)]. Ainsi, la formation de monomères et d'oligomères solubles pourrait jouer un rôle déterminant dans la toxicité et la mort neuronales observées au cours de la MA [[Cleary, 2005](#)].

En préalable ou non à l'apoptose, les oligomères de peptide A β modifient plusieurs grandes voies de signalisation ce qui est cohérent avec l'existence de récepteur(s). Ainsi les oligomères A β peuvent perturber les courants calciques présynaptiques de type P/Q, qui sont impliqués dans la neurotransmission et la plasticité synaptique, au niveau de synapses glutamatergiques et GABAergiques [[Nimmrich, 2008](#)]. Cet effet est spécifique des oligomères de peptide A β : ni les monomères, ni les fibrilles ne peuvent exercer de telles perturbations synaptiques.

La tyrosine kinase Fyn assure au moins en partie l'induction de l'apoptose par les oligomères A β . En effet, dans des modèles murins, l'invalidation génique de cette protéine confère une résistance contre l'apoptose induite par le peptide A β [[Lambert, 1998](#)]. Cette protéine est surexprimée dans le cerveau des patients atteints de la MA.

Les oligomères de peptide A β modifient également plusieurs activités phospholipase A₂ dans le cerveau, qui seront développées dans un chapitre spécifique.

L'interaction entre le peptide A β et la membrane cellulaire semble, du moins en partie, médiée par un récepteur protéique. Cette interaction pourrait initier les diverses altérations des voies de signalisation [[Lacor, 2004](#)]. En effet, l'interaction du peptide A β avec les membranes neuronales est réduite lorsque les cellules ont été préalablement trypsinées. On peut donc supposer que cette interaction implique un ou plusieurs partenaires protéiques dégradés par l'action protéolytique de la trypsine [[Lambert, 1998](#)]. Par la suite,

de nombreuses protéines « partenaires potentielles » ont été proposées ([Figure 16](#)). Parmi ces dernières, on peut notamment citer :

- **Le récepteur aux neurotrophines p75^{NRT} (ou récepteur de faible affinité pour le NGF) :** L'interaction des oligomères de peptide A β avec ce récepteur entraîne la mort des neurones par apoptose et l'activation de différentes voies de signalisation, notamment celle de la c-Jun N-terminal kinase [[Coulson, 2006](#)]. Néanmoins, ce même récepteur peut aussi exercer des effets anti apoptotiques, en induisant la survie des neurones et leur différenciation [[Dechant, 2002](#)].

- **Le récepteur au TNF de type I :** Le peptide A β ne provoque pas d'altération du LTP chez des souris TNF-R1^{-/-}. De plus, cette protection peut être mimée par l'administration d'anticorps anti-TNF α ou d'antagonistes de ce récepteur, ainsi que par l'administration de thalidomide, qui réduit la production de TNF α . La perturbation du LTP médiée par le TNF-R1 implique l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate, ainsi que la p38-MAPK [[Wang, 2005](#)].

- **Le récepteur AMPA au glutamate :** La sous unité GluR2 participe probablement à la liaison des oligomères à la surface du neurone. Toutefois, la réduction de l'expression des récepteurs AMPA ne diminue la liaison des oligomères que de manière incomplète [[Zhao, 2010](#)]. La sous-unité GluR2 constitue également un candidat potentiel pour la médiation des effets délétères des oligomères A β sur la synapse. En effet, l'inactivation du gène de GluR5 a montré l'implication de ce dernier dans la réorganisation de la synapse après exposition aux oligomères (sans pour autant démontrer de liaison de ceux-ci avec cette sous-unité) [[Renner, 2010](#)].

- **Le récepteur au glutamate N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) :** La liaison des ADDLs à ce récepteur entraîne une perturbation de l'homéostasie calcique, conduisant à la perte synaptique et au développement d'un stress oxydant [[De Felice, 2007](#)].

- **Le récepteur à l'acétyl choline α 7nAChR (α 7 nicotinic acetylcholine receptor) :** Ce récepteur à l'acétylcholine peut se lier au peptide A β au niveau de sa séquence A β ₁₂₋₂₈. [[Wang, 2000](#)]. La liaison du peptide A β ₄₂ soluble à ce récepteur entraîne la phosphorylation rapide et réversible de la protéine Tau, cette observation faisant un lien entre les deux principales hypothèses physiopathologiques de la MA [[Wang, 2003](#)].

- **Le récepteur aux produits avancés de glycation RAGE** (receptor for advanced glycation end products) : Un lien épidémiologique entre le diabète et la MA a été établi. Le récepteur RAGE, récepteur membranaire ubiquitaire, assure la médiation des effets toxiques du peptide A β à la fois au niveau des neurones et de la microglie. Enfin, une augmentation de l'expression de ce récepteur a été décrite dans les cerveaux de patients atteints de MA [[Yan, 1996](#)]
- **Le récepteur de l'insuline** [[Xie, 2002](#)] : Le peptide A β et l'insuline partagent une séquence homologue au niveau de leur chaîne peptidique, laquelle pourrait permettre leur interaction [[Klein, 2001](#)]. De plus, il a été montré des perturbations du métabolisme du glucose et un degré de résistance à l'insuline au niveau du cerveau des patients atteints de MA. Certains auteurs ont même été jusqu'à qualifier cette pathologie de « *diabète de type 3* » [[Verdier, 2004b](#)].
- **Le récepteur de l'amyline** : Il est activé par un polypeptide pancréatique isolé de patients diabétiques. L'inhibition de ce récepteur contrecarre les effets électrophysiologiques et toxiques du peptide A β sur des neurones humains en culture [[Jhamandas, 2011](#)].
- **Le récepteur SEC-R** (*serpin complex receptor*) : Ce récepteur interagirait avec le peptide A β au niveau de la séquence A β ₂₅₋₃₁ de sa chaîne peptidique [[Joslin, 1991](#)]. L'interaction du peptide A β avec ce récepteur entraîne leur internalisation conjointe par endocytose, suivie de leur dégradation. Ainsi, ce récepteur potentiel participerait à la clairance du peptide A β , plutôt qu'à la médiation de sa neurotoxicité [[Boland, 1996](#)]. D'autres protéines participent à l'élimination du peptide A β , toujours par un mécanisme d'endocytose. Parmi ces dernières, les intégrines et plus particulièrement l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ semblent jouer un rôle important [[Matter, 1998](#)].
- **Le récepteur Frizzled (Fz)** : Ce récepteur à la protéine Wnt peut être inhibé par sa liaison avec les oligomères A β , conduisant à un dysfonctionnement de la cellule. La voie de signalisation Wnt induit la prolifération des cellules progénitrices et leur différenciation en neurones au cours du développement du cerveau. Elle inactive aussi la glycogène synthase kinase 3 β et augmente les niveaux cellulaires en β -caténine. L'inhibition de la voie Wnt par les oligomères A β entraîne la phosphorylation anormale de Tau et la formation de DNF [[Magdesian, 2008](#)].

- **Le récepteur à l'éphrine B2 (EphB2)** : La perte de ce récepteur réduit la liaison des oligomères A β aux neurones en culture [[Lacor, 2007](#)]. La liaison de dimères et de trimères de peptide A β à l'EphB2R conduit à l'internalisation de ce dernier, suivie de sa dégradation au niveau du protéasome, ainsi qu'à une réduction de l'expression de la sous-unité NR1 du récepteur au glutamate à la surface du neurone [[Cisse, 2011](#)].

- **La protéine Prion PrP^C** : Cette protéine peut également se comporter comme un récepteur pour les oligomères A β avec une affinité nanomolaire et participe à la dysfonction synaptique [[Lauren, 2009](#)]. Cette interaction implique la protéine prion sous sa conformation physiologique PrP^C, indépendamment de toute participation de la forme infectieuse PrP^{SC}. Cette interaction perturbe l'association entre PrP^C et un corécepteur tel que le NMDAR, ce qui impacte les voies de transduction neuronales.

- **La protéine APP** : Le peptide A β peut interagir directement et spécifiquement avec son précurseur, la protéine APP, au niveau de sa séquence homologue (597 – 624). Cette interaction entraîne l'homo-oligomérisation de la protéine APP et favorise son clivage en position 664, laquelle produit un fragment C31 potentiellement toxique [[Shaked, 2006](#)]. L'interaction entre la région C-ter de la protéine APP et les protéines G_o est réduite en présence de peptide A β . Ainsi, cette activation des protéines G liée à l'interaction entre APP et A β entraîne une dysrégulation de l'homéostasie calcique, conduisant à l'apoptose neuronale [[Shaked, 2009](#)].

- **Les protéines APLP1 et APLP2** : Ces deux protéines sont des homologues de la protéine APP, et peuvent donc potentiellement lier le peptide A β , voire participer à la médiation de ses effets délétères. Des neurones APP^{-/-} présentent une susceptibilité réduite à la toxicité du peptide A β [[White, 1998](#)]. Celui-ci peut néanmoins se lier à la surface de ces cellules, cette liaison impliquant potentiellement ces homologues d'APP [[Lorenzo, 2000](#)]. Le traitement d'astrocytes et de neurones en culture primaire par les peptides A β et prion entraîne la surexpression d'APP et d'APLP2, mais pas d'APLP1 [[White, 1998](#)] [[White, 2003](#)].

La longue liste des récepteurs potentiels montre qu'aucun n'a pu être caractérisé comme un récepteur spécifique, au sens pharmacologique du terme, sans doute en raison de l'ambiguïté persistante sur la structure exacte de l'espèce (ou des espèces) oligomérique(s) « toxique(s) ».

En outre, plusieurs études ont proposé un rôle neurotrophique et neuroprotecteur pour le peptide A β , lorsqu'il est présent à des concentrations nanomolaires dans le cerveau. En effet, le peptide A β (1-40) améliore la survie de neurones de l'hippocampe [Yankner, 1990]. De la même manière, les peptides A β (1-42) et A β (1-28) stimulent la croissance neuritique et augmentent le nombre et l'arborisation des dendrites [Whitson, 1990]. Enfin, le peptide A β (1-40) pourrait moduler la croissance des astrocytes [Pena, 1995]. Aucun récepteur n'a cependant été identifié pour expliquer ces différents effets neurotrophiques du peptide A β .

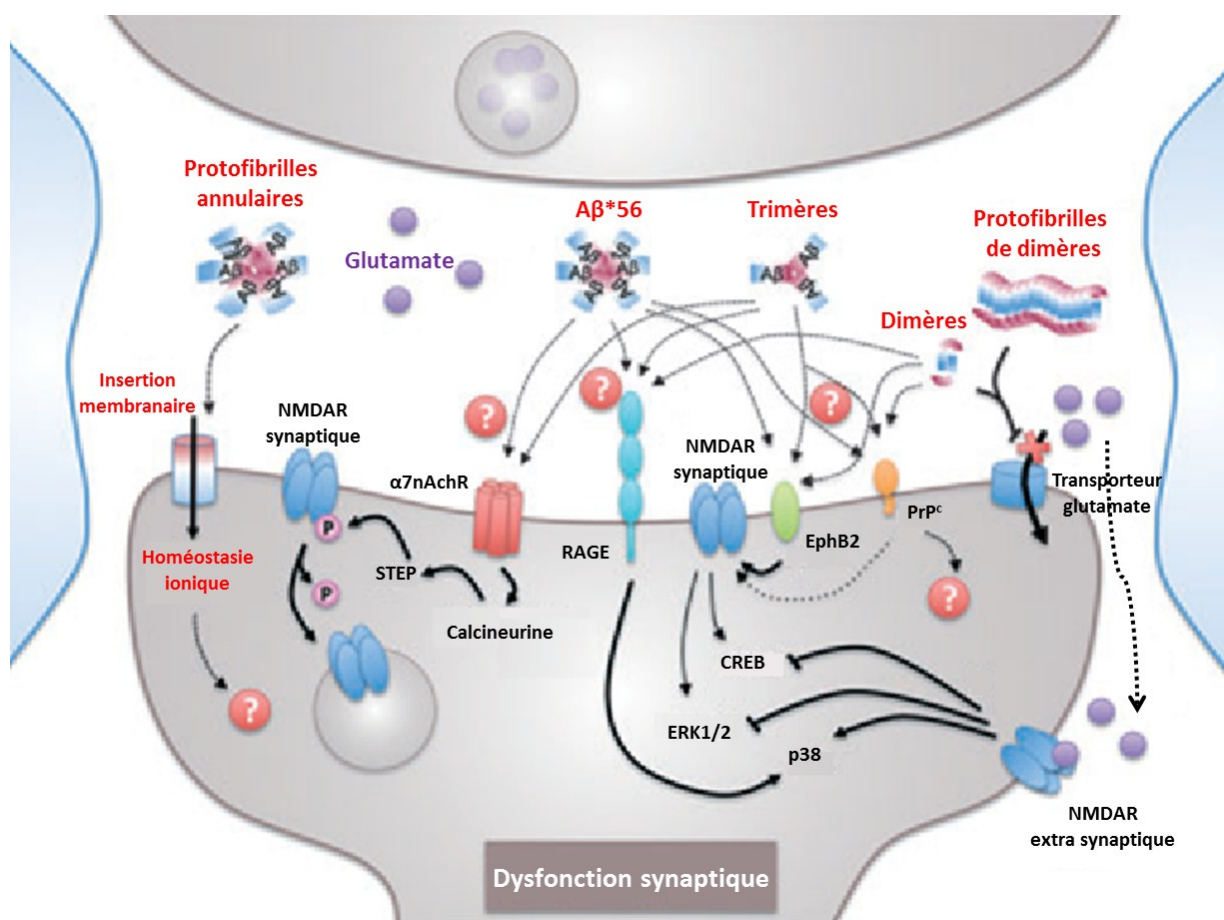


Figure 16 : Toxicité des oligomères solubles de peptide A β : cibles potentielles et toxicité directe [Larson, 2012]

Cette figure illustre les différents récepteurs potentiels aux oligomères solubles de peptide A β et leurs voies assurant la médiation de leur toxicité. Comme aucune liaison directe entre les oligomères A β et les récepteurs NMDAR n'a été décrite, les auteurs ont préféré indiquer un rôle de modulateur des oligomères A β sur l'expression et/ou l'activité de ces récepteurs. Les oligomères A β pourraient ainsi moduler l'activité des récepteurs NMDAR. A côté d'une action médiée par des récepteurs spécifiques, les oligomères A β peuvent également agir directement sur la membrane synaptique, comme il est montré sur le versant gauche. Abbréviations : α 7nAChR : récepteur α 7 à l'acétylcholine ; EphB2 : récepteur à l'ephrine B2 ; NMDAR : récepteur au NMDA ; PrP^c : forme cellulaire de la protéine du prion ; RAGE : *receptor for advanced glycation end products*.

b) Interaction directe du peptide A β avec les membranes synaptiques

Le peptide A β soluble présente des propriétés fusogènes, qui lui permettent d'interagir avec les membranes cellulaires [Pillot, 1996]. Ces propriétés fusogènes résultent d'une structure tridimensionnelle très particulière adoptée par le peptide en solution [Morgan, 2004]. Différents modèles de structures ont ainsi pu être proposés, dont le plus récent a été établi par l'étude en résonance magnétique nucléaire (RMN) de peptides A β en solution aqueuse, où des micelles de SDS reproduisent l'interface membrane plasmique / milieu extracellulaire. Ce modèle met en évidence une région non structurée entre les résidus 1 à 14, suivie d'une hélice α hydrophobe [Coles, 1998].

Le peptide A β soluble interagit de manière majoritaire, voire presque exclusive, avec les membranes synaptiques, comme il a été montré par des approches *in vitro* sur des cultures primaires de neurones corticaux de rat. Ces dernières ont en effet révélé une colocalisation majoritaire du peptide A β avec la protéine post-synaptique PSD95 (près de 90 % du peptide) [Lacor, 2004].

Les peptides A β peuvent former des canaux ioniques au sein des bicouches lipidiques planes, des liposomes, dans les membranes des neurones, des ovocytes et des fibroblastes [Fraser, 1997]. Des canaux amyloïdes, impliquant au moins 8 classes différentes de peptides A β , ont été retrouvés dans différentes pathologies neurodégénératives, notamment les maladies de Parkinson, de Huntington, et de Creutzfeld-Jakob [Glabe, 2006].

Les canaux formés par les peptides A β (1-40) et A β (1-42) présentent des caractéristiques similaires en termes de taille et de sélectivité ionique [Kagan, 2002]. Ces canaux sont relativement larges et ne présentent pas de spécificité vis-à-vis des cations. Ils sont perméables au Ca²⁺ et peuvent être bloqués en présence de Zn²⁺. Ils sont par ailleurs sensibles à diverses conditions physicochimiques, notamment au pH, aux solvants, à la concentration en peptide A β , ainsi qu'aux agents de nucléation [Kagan, 2002]. La présence de ces canaux dans les membranes neuronales pourraient initier les phénomènes neurotoxiques observés dans la MA. Leur formation pourrait notamment induire une dépolarisation de la membrane, accompagnée d'un influx calcique, pouvant activer les cascades pro-apoptotiques.

Les variants de peptide A β d'une taille inférieure à 10 aa ne peuvent pas former de canaux, ce qui suppose qu'une structure minimale soit requise pour l'insertion membranaire. Toutefois, des observations contraires ont été rapportées, où des oligomères de peptides

A β (31-35) pouvaient former des canaux dans les membranes *in vitro* [Qi, 2001]. Ainsi, les peptides A β (1-40) et A β (1-42) peuvent induire des mouvements ioniques dans les membranes de neurones corticaux de rat [Furukawa, 1994].

Comme l'oligomérisation des peptides A β est rapide et variable, différentes formes de canaux pourraient ainsi être générées [Kagan, 2004]. De nombreux modèles structuraux ont ainsi pu être proposés [Arispe, 2004], dont celui présenté sur la [figure 17](#).

Ces canaux amyloïdes suggèrent que les mécanismes moléculaires de neurotoxicité reposent principalement sur un influx calcique majeur dans le neurone, *via* ces canaux. Ce modèle oriente également vers un rôle prépondérant des formes solubles de peptide A β dans la pathogenèse de la MA [Glabe, 2006] [Kagan, 2004].

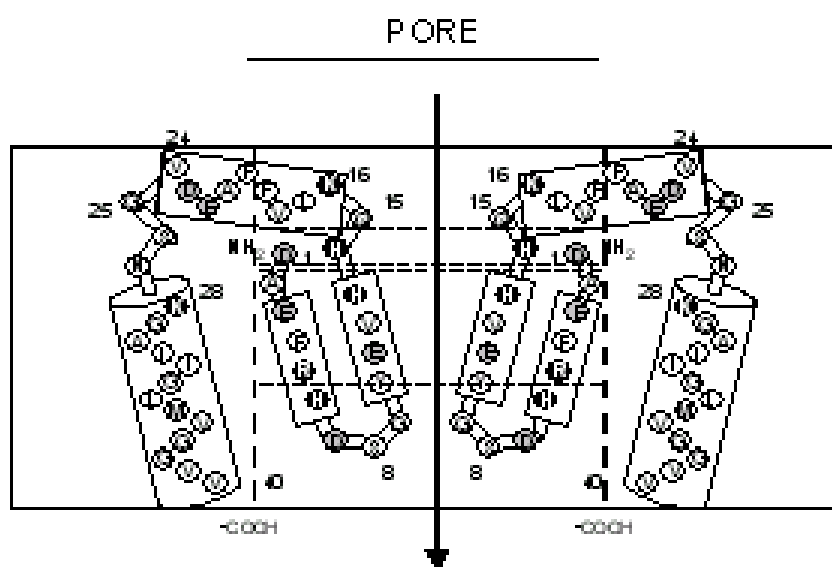


Figure 17 : Composition d'un canal amyloïde [Arispe, 2004]

Les résidus acides sont représentés en gris, les résidus basiques en noir.

c) Action intracellulaire des oligomères de peptide A β

Bien que le peptide A β ait été initialement mis en évidence au niveau des plaques amyloïdes, un nombre croissant d'observations montre que celui-ci est également généré à l'intérieur des cellules (Revue en [LaFerla, 2007]). Comme nous l'avons mentionné dans le [paragraphe](#) spécifique sur l'APP, cette protéine est localisée dans de nombreux organelles des neurones, en particulier le TGN, le RE, ainsi que dans les membranes endosomales, lysosomiales ou mitochondriales. Le peptide A β résulte du clivage séquentiel de l'APP par les β -, puis par les γ -sécrétases, tant au niveau des endosomes que de la membrane cellulaire [Kinoshita, 2003]. Le peptide A β est ainsi produit à l'intérieur des cellules, au niveau du TGN

et du RE, le long de la voie sécrétoire. L'identification d'une protéine intracellulaire appelée *endoplasmic reticulum associated binding protein* ([ERAB](#)), capable de lier le peptide A β , renforce encore cette hypothèse de l'existence d'A β à l'intérieur des cellules [[Yan, 1997](#)].

De plus, du peptide A β précédemment sécrété et présent dans le pool extracellulaire peut être recapté par les cellules et internalisé *via* divers récepteurs et transporteurs. Parmi ces derniers, on peut citer le récepteur nicotinique à l'Ach, le NMDAR, le récepteur aux lipoprotéines de faible densité ou encore le récepteur RAGE [[LaFerla, 2007](#)]. Le peptide A β associé à ces récepteurs pourrait être internalisé dans les endosomes.

Par ailleurs, des études récentes montrent que le peptide A β est également présent dans le cytosol. Cette accumulation d'A β à l'intérieur de la cellule, dans les corps multivésiculaires, peut résulter d'une inhibition du protéasome [[Almeida, 2006](#)]. De même, l'inhibition du protéasome tant *in vitro* qu'*in vivo*, majore les niveaux de peptide A β [[Oh, 2005](#)]. Le protéasome étant localisé au niveau cytosolique, on peut en déduire que le peptide A β qu'il dégrade l'est aussi. De plus, l'A β extracellulaire qui pénètre dans le compartiment cytosolique peut inhiber l'activité du protéasome dans des neurones en culture, et conduire ainsi à son accumulation dans le cytosol [[Oh, 2005](#)].

L'injection de peptide A β marqué par un fluorochrome, au niveau de la queue de souris, présentant des troubles de la perméabilité de la barrière hémato encéphalique ([BHE](#)), conduit à la localisation de ce peptide marqué au niveau du cytoplasme des neurones pyramidaux du cortex cérébelleux [[Clifford, 2007](#)]. Ainsi, les neurones peuvent internaliser le peptide A β extracellulaire. C'est ainsi que le peptide A β pourrait perturber les membranes des mitochondries et modifier les activités enzymatiques de la chaîne respiratoire qui lui sont associées, entraînant de ce fait la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* ou [ROS](#)) [[Reddy, 2006](#)]. En réponse au stress oxydant induit, diverses enzymes (notamment les calpaïnes et les caspases) sont activées, et le cytosquelette de la cellule subit divers phénomènes de désorganisation, notamment au niveau des dendrites [[Fifre, 2006](#)].

Les ROS perturberaient aussi la membrane plasmique et les membranes des organites cellulaires, ce qui activerait la protéine BACE et, par voie de conséquence, détournerait le métabolisme de la protéine APP vers la voie de l'amyloïdogénèse, avec une production accrue de peptide A β .

Dans les cerveaux de patients atteints de MA, on note une proportion élevée de structures vésiculaires témoignant d'autophagie. Ces structures témoignent d'un défaut de maturation des autophagosomes en lysosomes [[Nixon, 2006](#)]. Bien que le peptide A β formé dans les endosomes soit dégradé dans les lysosomes, celui-ci peut s'accumuler dans les lysosomes et conduire à la déstabilisation de leur membrane, permettant sa libération dans le cytosol [[Yang, 1998](#)].

Partie II : Phospholipase A₂ cytosolique, implication potentielle dans la maladie d'Alzheimer

Les phospholipases A₂ ([PLA₂](#)) constituent une vaste famille d'enzymes impliquées aussi bien dans le remaniement des membranes cellulaires que dans la synthèse de médiateurs dérivés des AG et ayant de nombreux effets dans la transduction du signal, la survie cellulaire, l'inflammation. Compte tenu de leurs interactions avec les membranes cellulaires et de leurs effets sur les voies de signalisation, les oligomères Aβ pourraient potentiellement interagir avec les phospholipases A₂.

De plus, dans cette famille d'enzymes, l'une d'entre elles, la phospholipase A₂ cytosolique ([cPLA₂](#)), libère spécifiquement l'AA estérifié dans les PL membranaires. L'AA est un neuromodulateur important dans le SNC et un acteur de la plasticité neuronale [[Massicotte, 2000](#)]. En effet, la stimulation de neurones par divers neuromédiateurs agonistes, comme l'AMPA, le NMDA ou le glutamate entraîne la libération d'AA au sein de la cellule. [[Sun, 2004](#)].

Par ailleurs, cet AA peut être converti en un grand nombre de composés, PG, leucotriènes ([LT](#)), epoxydes qui ont des activités diverses dans le SNC et notamment dans la neuro-inflammation. L'initiation du processus inflammatoire sous forme de l'activation de la microglie ou de la surexpression des protéines impliquées dans les mécanismes inflammatoires, en particulier la cyclo-oxygénase 2 ([COX2](#)), constitue un élément précoce dans la pathogenèse de la MA [[Combrinck, 2006](#)]. Or l'action de la cPLA₂ et la libération de l'acide arachidonique sont une étape préliminaire à l'action des COX.

Ces éléments invitent à étudier le rôle de la cPLA₂ dans la MA, ce qui constitue le cœur de cette thèse. Nous allons voir dans ce chapitre la position de la cPLA₂ dans la vaste famille des PLA₂ et son rôle dans le SNC ainsi que dans les pathologies qui l'affectent chez l'homme.

II – 1 La phospholipase A₂ cytosolique dans le monde des autres phospholipases A₂

II – 1 a. Diversité et classification des phospholipases A₂, introduction

Les PLA₂ (PLA₂ ; EC 3.1.14) constituent une importante superfamille d'estérases qui clivent de manière spécifique la liaison ester en position sn-2 des phospholipides membranaires, cette hydrolyse produisant un acide gras libre (AGL) et un lysophospholipide (lysoPL) [Farooqui, 2000] (Figure 18).

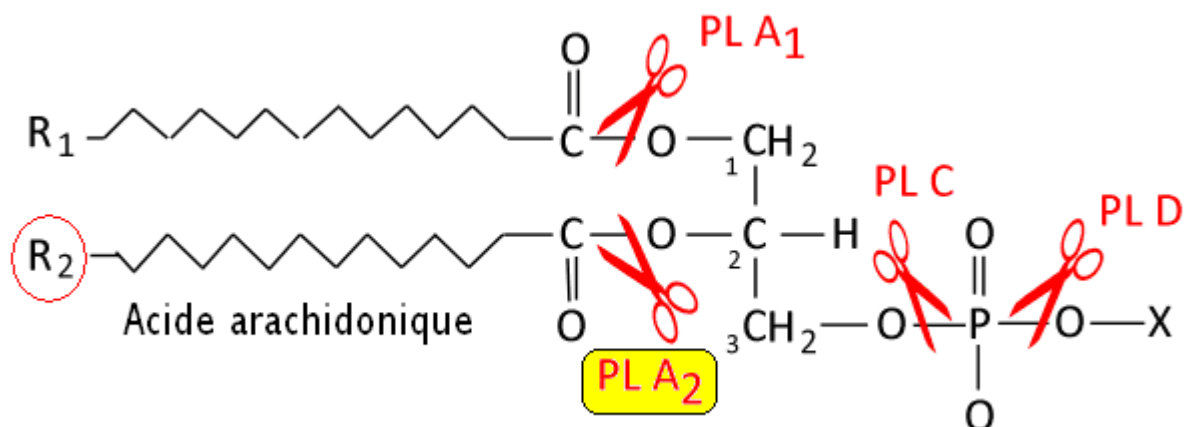


Figure 18 : Action des phospholipases

Dès la fin du XIX^{ème} siècle, une activité enzymatique, caractérisée ultérieurement comme une activité PLA₂, a été détectée dans le venin du cobra. Par la suite, une activité PLA₂ sécrétée fut trouvée en grande quantité dans le pancréas de porc. Elle fut caractérisée comme dépendante du Ca²⁺, possédant de nombreux ponts disulfures ainsi que des résidus histidine et aspartate dans son site catalytique. Au fil des années, de nombreuses autres PLA₂ sécrétées furent découvertes dans des venins et des sucs pancréatiques de nombreux animaux. Une classification en deux groupes fut élaborée en fonction de la position des ponts disulfures et de la localisation du site catalytique... Le groupe II des PLA₂ fut conséquemment étendu pour inclure les PLA₂ non pancréatiques de mammifères, appelées sPLA₂ car sécrétées dans la synovie et classées actuellement dans le groupe IIA [Kramer, 1989]. Ces vingt dernières années de nombreuses autres PLA₂ sécrétées ont été découvertes et, malgré leurs ressemblances avec les précédentes, il fallut établir de nouveaux groupes pour les classer (groupe V, IX, X et XI). Cependant en 1991, cette classification de PLA₂ devint obsolète lorsque la cPLA₂ fut séquencée et clonée dans les polynucléaires neutrophiles [Alonso, 1986] puis dans les plaquettes sanguines [Clark, 1991]. La séquence révèle une

protéine de 85 kDa, contenant une sérine dans le site catalytique et aucun pont disulfure [Clark, 1991]. Cette nouvelle PLA₂ dite cPLA₂ est alors classée dans le groupe IV des PLA₂. Par la suite, d'autres groupes de PLA₂, dont les iPLA₂, ont été découverts (groupes VI, VII et VIII) portant à 14 le nombre total de groupes (Tableaux 2 & 3) [Balsinde, 2002b].

A l'heure actuelle, 14 groupes de PLA₂ ont été décrits chez les mammifères. Certains critères sont à respecter pour assigner une enzyme à un groupe de PLA₂ [Six, 2000] :

- La protéine doit hydrolyser l'ester d'AG en position sn-2 des phospholipides et posséder une activité spécifique suffisante, même si elle possède d'autres activités par ailleurs.
- La séquence complète de la protéine doit être établie pour que des numéros de groupe et de sous-groupe puissent lui être assignés.
- Les enzymes homologues d'une même espèce définies comme paralogues sont désignées par des lettres de sous-groupes (IVA, IVB, etc.) mais pas celles de différentes espèces définies comme orthologues.
- Les variants d'épissage sont distingués nominalement par un chiffre arabe accolé à ceux des sous-groupes (VIA-I, VIA-2, etc).

Il existe deux types de classification. L'une historique, se base sur les propriétés biologiques des PLA₂ et est constituée de 4 groupes :

- Les sPLA₂ : PLA₂ de petite taille, sécrétées, dépendantes du Ca²⁺
- Les cPLA₂ : PLA₂ de grande taille, cytosoliques, dépendantes du Ca²⁺
- Les iPLA₂ : PLA₂ intracellulaires, indépendantes du Ca²⁺
- Les PAF-acétylhydrolases (PAF-AH) : indépendantes du Ca²⁺, agissant sur le *platelet activating factor* (PAF) et les lipides oxydés.

L'autre classification distingue les PLA₂ en fonction de leur séquence. On distingue deux groupes majeurs en fonction du résidu impliqué dans le site catalytique :

- PLA₂ utilisant une histidine dans le site catalytique

A l'intérieur de cette famille qui regroupe 10 familles de PLA₂ (Tableau 2), certaines familles peuvent être reliées entre elles. Par exemple, les groupes I, II, V et X sont proches et partagent le même mécanisme de clivage de la liaison ester sn-2 des phospholipides. On retrouve dans ce groupe la famille des sPLA₂.

- PLA₂ utilisant une sérine dans le site catalytique

Cette famille, comprend 4 groupes (IV, VI, VII et VIII) incluant les cPLA₂, les iPLA₂ et les PAF-AH (Tableau 3).

La classification en fonction des propriétés biologiques des PLA₂ renferme quelques incohérences, puisque la PLA₂ IVC (ou -γ) y est généralement classée comme une cPLA₂ en dépit du fait que ce soit une enzyme indépendante du Ca²⁺, contrairement aux autres cPLA₂.

La distinction entre les PLA₂ répond donc à deux grandes frontières : action intra/extracellulaire, dépendance/indépendance vis-à-vis du Ca²⁺ sachant que les milieux extracellulaires sont riches en Ca²⁺ alors que le cytosol des cellules n'atteint des concentrations micromolaires qu'après une activation et l'ouverture des canaux des mitochondries et du RE.

Nous allons décrire les structures, régulations et rôles connus dans le cerveau des PLA₂ en les regroupant en trois familles ([Tableau 4](#)) :

- 1- les PLA₂ extracellulaires (PLA₂ secrétées et PAF-AH), qui sont pour les unes dépendantes du Ca²⁺ et les autres indépendantes du Ca²⁺ et qui libèrent une grande diversité d'AG et de LPL
- 2- les enzymes cytosoliques Ca²⁺ indépendantes, dont certaines peuvent jouer un rôle important dans la libération du DHA
- 3- la PLA₂ cytosolique du groupe IV (cPLA₂α ou cPLA₂-IVA), dont nous avons étudié le rôle potentiel dans la MA et à laquelle nous consacrerons un chapitre spécifique.

Groupe	Source	Taille (kDa)	Ponts disulfures	Locus (humain)	
I	A	Cobra	13-15	7	ND
	B	Pancréas (mammifères)	13-15	7	12q23-24
II	A	Synovie humaine, plaquettes sanguines, venin de serpent	13-15	7	1p34-36
	B	Venin de serpent (vipère)	13-15	6	ND
	C	Testicules (rats, souris)	15	8	ND
	D	Rate, pancréas (humain, murin)	14-15	7	1p36.12
	E	Cerveau, cœur, utérus (humain, murin)	14-15	7	1p36
	F	Testicule, peau (humain, souris)	16-17	7	ND
III	Abeille, lézard, scorpion, humain	15-18	5	22q	
V	Cœur, poumon, macrophages (mammifères)	14	6	1p34-36	
IX	<i>Conus majus</i> (cône marin)	14	6	ND	
X	Rate, thymus, leucocytes (humain)	14	8	16p12-13.1	
XI	A	Pousse de riz	12,4	6	ND
	B	Pousse de riz	12,9	6	ND
XII	Cœur, rein, peau, muscle (mammifères)	18,7	7	ND	
XIII	Parvovirus	<10	0	ND	
XIV	<i>Streptomyces</i>	13-19	2		

Tableau 2 : Phospholipases A₂ utilisant une histidine dans leur site catalytique [Balsinde, 2002b]

Groupe	Source	Autre dénomination	Taille (kDa)	Activation par le Ca ²⁺	Locus (humain)
IV	A	Cellules U937, plaquettes humaines, rein de rat	cPLA ₂ α	< mM	1q25
	B	Pancréas, foie, cœur, cerveau (humain)	cPLA ₂ β	< mM	15
	C	Muscle cardiaque et squelettique (humain)	cPLA ₂ γ	Aucune	19
VI	A-1	Cellules P388D ₁ (macrophage), cellules CHO	iPLA ₂ A ou iPLA ₂	Aucune	22q13.1
	A-2	Lymphocytes B, testicule (humain)	iPLA ₂ B	Aucune	22q13.1
	B	Muscle cardiaque et squelettique (humain)	iPLA ₂ γ ou iPLA ₂	Aucune	7q31
VII	A	Plasma (humain, bovin, porc, murin)	PAF-AH	Aucune	ND
	B	Foie, rein (humain, bovin), cerveau (bovin)	PAF-AH (II)	Aucune	ND
VIII	A	Cerveau (humain)	PAF-AH Ib α ₁	Aucune	ND
	B	Cerveau (humain)	PAF-AH Ib α ₂	Aucune	11q23

Tableau 3 : Phospholipases A₂ utilisant une sérine dans leur site catalytique [Balsinde, 2002b]

Enzyme	Effets du calcium	Expression tissulaire	Préférence de substrat
sPLA ₂	Activation ([Ca ²⁺] = mM)	Ubiquitaire	Aucun
cPLA ₂	Translocation ([Ca ²⁺] = μM)	Ubiquitaire	AA
iPLA ₂	Pas d'effet	Cœur, cerveau, placenta, îlots de Langerhans, testicules, muscle strié	DHA
PLA ₂ lysosomale	Pas d'effet	Cœur, poumon, foie, rein, rate, cerveau, thymus, macrophages	Oléate et linoléate (> AA)
PAF-AH	Pas d'effet	Ubiquitaire	DHA et AA

Tableau 4 : Caractéristiques des principales catégories de phospholipases A₂

II – 1 b. Les phospholipases A₂ extracellulaires

a) Structure et mécanisme d'action

Les sPLA₂ sont des enzymes de faible masse moléculaire (environ 14 kDa) qui possèdent une structure tertiaire très rigide. La présence de 5 à 8 ponts disulfures (chez les mammifères) leur confère une résistance vis-à-vis de la protéolyse et de la dénaturation [Six, 2000]. *In vitro*, les sPLA₂ ne manifestent pas de spécificité de substrat particulière vis-à-vis de l'acide gras en position sn-2 des PL. Leur activité catalytique requiert la présence de concentrations millimolaires de Ca²⁺, ce qui est cohérent avec leur localisation et leur activité extra-cellulaires (Tableau 4). Elles possèdent bien évidemment un peptide signal permettant leur adressage vers l'exocytose, qui explique leur localisation et leur action extracellulaires.

A l'heure actuelle, 9 sPLA₂ ont été identifiées chez les mammifères, lesquelles peuvent être classées dans différents sous-groupes suivant leur structure primaire, notamment le nombre et la position des résidus cystéine. On distingue ainsi le groupe I (qui comprend la sPLA₂ IB), le groupe II (avec les enzymes IIA, IIC, IID, IIE, IIF), ainsi que les groupes III, V, X et XII [Six, 2000]. Ces protéines sont codées par des gènes répartis sur des chromosomes différents, le chromosome 12 pour la sPLA₂ IB, le chromosome 1 pour les groupes II et V, et le chromosome 16 pour le groupe X. Les sPLA₂ des groupes I, II, X présentent une importante similarité : toutes ces enzymes ont une taille de 14-17 kDa et possèdent 2 domaines relativement conservés, la boucle de fixation du Ca²⁺ (X-Cys-Gly-X-Gly-Gly) et le site catalytique (Asp-X-Cys-Cys-X-X-His-Asp). Par ailleurs, on peut également distinguer certaines sPLA₂ (des groupes IIA, IID, V) qui sont cationiques et vont donc se lier à des héparanoïdes anioniques, notamment l'héparine ou les héparane sulfates [Murakami, 1996]. Comme de nombreuses surfaces cellulaires sont riches en protéoglycanes de type sulfates d'héparane, une grande proportion de ces sPLA₂ se retrouve fixée à ces membranes plutôt que dans l'espace extracellulaire.

Les sPLA₂ utilisent un résidu histidyl dans leur site catalytique. Le résidu histidyl sert à former une liaison hydrogène avec une molécule d'eau. Cette liaison étant nécessaire au mécanisme d'action des sPLA₂, ces dernières doivent, pour être activées, être à un pH compris entre 7 et 9 (pKa de His) [Dennis, 1994]. De plus, près de l'histidine, se trouve un résidu aspartyl, conservé dans les différentes isoformes. Ce résidu permet la fixation du Ca²⁺, ce qui entraîne la formation d'un oxyanion, lequel stabilise l'état de transition de la réaction. Ce phénomène explique la dépendance de l'activité catalytique des PLA₂ à histidine vis-à-vis du Ca²⁺ en concentration millimolaire. Par ailleurs, la structure primaire de ces enzymes comporte d'autres résidus conservés, qui participent à la réaction catalytique, comme la tyrosine et la glycine.

Les PAF-AH sont d'autres PLA₂ extracellulaires constituant les groupes VII et VIII des PLA₂, eux-mêmes divisés en 2 sous-groupes A et B. La fonction qui les a caractérisées est d'hydrolyser le PAF acéther et de libérer le radical acétyl en position sn-2 du glycérol. Le PAF acéther (1-alkyl-2-acétyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) est un PL à choline avec une liaison éther en position sn-1 et une liaison ester (acétyl) en sn-2. Le PAF acéther a de nombreux effets physiologiques, incluant des effets pro-inflammatoires qui sont supprimés par l'hydrolyse de la liaison ester en sn-2 et la formation du lyso-PAF [Peplow, 1999]. Certaines

PAF-AH possèdent également une activité d'hydrolyse sur les courtes chaînes d'AG oxydés (jusqu'à 9 atomes de carbone) en position sn-2 dans des PC ou des PE [Min, 1999] ce qui leur confèrent un rôle dans la protection contre l'oxydation des AG des lipoprotéines notamment dans l'athérosclérose. Contrairement aux autres PLA₂, ces enzymes peuvent se lier à leur substrat en milieu aqueux, et cette liaison est indépendante du Ca²⁺. La PLA₂ VIIA est la plus étudiée des PAF-AH [Karasawa, 2003] mais la PLA₂ VIIB est une enzyme intracellulaire isolée et caractérisée initialement dans le cerveau de bovin [Hattori, 1993]. Elle possède une identité de séquence de 41% avec la PLA₂ VIIA. C'est un monomère de 40 kDa composé de 392 aa et possédant également un motif lipase.

b) Expression et rôles cérébraux des sPLA₂

Les sPLA₂ IIA et IIC semblent exprimées de manière variable dans le cerveau de rats [Molloy, 1998] : Si l'expression de sPLA₂ IIA est maximale au niveau du tronc cérébral et du mésencéphale, celle de la sPLA₂ IIC est intense dans l'ensemble du cerveau, à l'exception de certaines régions comme le tronc cérébral, le thalamus et le cervelet [Molloy, 1998]. Cette enzyme semble exclusivement localisée au niveau du cerveau. Aucune trace de sPLA₂ IB n'a par contre été retrouvée dans le SNC. Enfin, l'expression de la sPLA₂ V est relativement faible dans le cerveau, à l'exception de l'hypothalamus, où elle est fortement exprimée. Chez la souris, l'expression des sPLA₂ est beaucoup plus restreinte. L'ARNm de la sPLA₂ XII, une des sPLA₂ les plus récemment décrites, a ainsi pu être détectée dans le cerveau de souris par RT-PCR [Gelb, 2000]. De la même manière, la sPLA₂ IIF a pu être retrouvée dans le cerveau de souris après administration intrapéritonéale de lipopolysaccharide [Murakami, 2002b]. Par ailleurs, ces enzymes ont également été mises en évidence au niveau de synaptosomes de cerveau de rat. La dépolarisation de ces vésicules, obtenue par exposition à de fortes concentrations de potassium, entraîne le relargage de l'enzyme dans le milieu extérieur [Matsuzawa, 1996]. *In vitro*, l'ARNm de la sPLA₂ IIA est exprimé dans les astrocytes en culture, et peut être induit par diverses cytokines pro-inflammatoires, notamment, le TNF α , l'IL-1 β et l'interféron γ (INF- γ), ce qui confirme le rôle de cette enzyme dans l'inflammation, y compris la neuroinflammation [Li, 1999]. En situation de souffrance cérébrale, comme après une ischémie transitoire ou un choc endotoxinique, une surexpression importante et transitoire des sPLA₂, et notamment de la sPLA₂ IIA, est immédiatement détectée. Cette surexpression est localisée au niveau des régions vulnérables à l'ischémie, comme l'hippocampe et le néocortex [Lauritzen, 1994]. Des récepteurs pour les sPLA₂ IIA ont été mis

en évidence à la surface des neurones, ce qui suggère que ces enzymes puissent jouer un rôle important dans la modulation de la composition lipidique des membranes neuronales et modifier leur fonctionnalité [Kolko, 1996]. En effet, les sPLA₂ peuvent moduler la neurotransmission : le glutamate et ses analogues stimulent l'activité sPLA₂ d'une manière dose et temps dépendante [Kim, 1995]. D'un point de vue pathologique, l'incubation de neurones corticaux de rat en présence de sPLA₂ conduit à l'apoptose de ces cellules [Yagami, 2002]. De même, la neurotoxicité du glutamate sur des neurones en culture est augmentée de manière synergique après adjonction de sPLA₂. Enfin, l'injection intracérébrale de sPLA₂ chez le rat conduit à l'apparition de crises convulsives [Dorandeu, 1998].

En conclusion, diverses sPLA₂ et PAF-AH sont exprimées dans le cerveau et contribuent à la réponse à la neuroinflammation et à différents traumatismes du SNC mais la caractérisation de leurs rôles exacts souffre de leur hétérogénéité. Elles ne libèrent pas spécifiquement un acide gras ou un lysophospholipide particulier.

II – 1 c. Les phospholipases A₂ intracellulaires indépendantes du calcium : à la recherche de l'enzyme spécifique de l'acide docosahexaénoïque

Le DHA, un AG essentiel de 22 carbones comportant 6 doubles liaisons, représente près de 20% de la masse totale des AG dans le cerveau d'un rat adulte. Il est particulièrement concentré dans certains organites des neurones, notamment les synaptosomes, les vésicules synaptiques, ou les cônes de croissance [Hamano, 1996]. Il est également concentré dans certaines espèces de PL, les phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines et particulièrement dans les plasmalogènes qui possèdent une liaison vinyl ether en position sn-1 du glycérol dans ces groupes de phospholipides [Farooqui, 2001]. Dans le cerveau, l'activité iPLA₂ représente près de 70 % des activités PLA₂ [Yang, 1999a]. La recherche d'enzyme libérant spécifiquement le DHA a donc été un des objectifs de la caractérisation des activités iPLA₂.

Deux iPLA₂ dont les gènes se trouvent respectivement sur les chromosomes 22 et 7 constituent le groupe VI des PLA₂. Ce sont les PLA₂VIA (soit iPLA₂β) et VIB (soit iPLA₂γ). Parmi ces iPLA₂, la plus étudiée correspond au groupe VIA-1 (ou iPLA₂-A). Cette-dernière a été initialement purifiée à partir de la lignée macrophagique P388D [Ackermann, 1994]. L'ADNc codant pour cette protéine a ensuite été cloné et retrouvé dans de nombreux types cellulaires. La PLA₂ VIA-1 présente une masse moléculaire de 84 – 85 kDa, et contient

environ 750 aa. Au niveau de sa structure, cette iPLA₂ présente une séquence consensus lipase, ainsi que 8 motifs à ankyrine, au niveau de sa partie N-ter [Tang, 1997]. Elle est inactivée par des inhibiteurs de sérine réactive, ce qui semble indiquer la présence d'une sérine dans son site catalytique [Lio, 1996]. Un variant actif de plus grande taille (88 kDa), possédant 54 aa supplémentaires, insérés dans les 8 motifs à ankyrine, a été trouvé et classé comme PLA₂ VIA-2. Cinq autres variants d'épissage ont été décrits pour cette enzyme, tous caractérisés par la répétition des motifs ankyrine, certains ne pouvant se lier à la membrane. La PLA₂ VIB, quant à elle, ne possède pas les motifs ankyrine. Par contre, elle présente un peptide signal permettant son adressage aux peroxisomes, ce qui suppose une activité localisée au sein de ces organites [Murakami, 2002a]. De plus une PLA₂ spécifique des plasmalogènes (PlsEtn-PLA₂) a été purifiée et caractérisée, entre autres, à partir de fractions cytosoliques de cerveau bovin [Hirashima, 1992]. Elle présente une masse moléculaire apparente de 39 à 42 kDa et est exprimée par les neurones et des astrocytes [Farooqui, 2001]. La PlsEtn-PLA₂ libère aussi bien de l'AA que du DHA [Strokin, 2003]. D'autres PLA₂ Ca²⁺-indépendantes constituent les groupes IVC que nous verrons ci-dessous.

Les iPLA₂ VIA et VIB ont été mises en évidence au niveau du cerveau humain [Larsson Forsell, 1999]. L'iPLA₂ VIA est très fortement exprimée dans toutes les régions du cerveau, les niveaux maximaux d'expression étant détectés au niveau de l'hippocampe et du striatum, et dans une moindre mesure, de l'hypothalamus [Yang, 1999b]. Des études d'immunomarquage sur des cerveaux de rat ont également rapporté que les cellules granulaires, les cellules étoilées et les noyaux des cellules de Purkinje contiennent l'iPLA₂ [Shirai, 2004]. Des niveaux importants d'iPLA₂ ont été également rapportés dans le bulbe olfactif, les régions CA1-3 de l'hippocampe, le gyrus denté et le tronc cérébral. Le cervelet de rat contient 3 des 5 variants de la PLA₂ VIA-1. *In vitro*, l'iPLA₂ VIA est exprimée par les cellules astrocytaires 1231N1 [Balboa, 2002].

Des expériences basées sur l'inhibition des iPLA₂ par la bromoènone lactone (BEL) ou l'utilisation d'ASO ont démontré que, dans de nombreux systèmes cellulaires, les iPLA₂ jouent un rôle clef dans le remodelage des PLs membranaires et l'homéostasie lipidique [Ramanadham, 1999]. La PLA₂ VIA est, pour certains auteurs, l'enzyme assurant majoritairement la libération de DHA dans le cerveau, ce qui souligne son importance dans l'homéostasie lipidique et le remodelage des PL membranaires au sein du SNC [Green, 2008]. L'inactivation du gène de l'iPLA₂ VIB entraîne également une perturbation de

l'homéostasie membranaire, accompagnée d'une accumulation de protéines ubiquitinylées chez la souris [[Malik, 2008](#)]. Ces troubles reproduisent le tableau clinique de dystrophie neuro-axonale infantile observée chez l'humain et consécutive à des mutations de ce gène.

Les iPLA₂ sont des enzymes de grande taille, de localisation intracellulaire, comme la cPLA₂ que nous allons décrire au chapitre suivant. De plus, ces deux groupes de PLA₂ possèdent probablement un mécanisme similaire d'hydrolyse des PL. Il est à noter que les iPLA₂ ne présentent pas de spécificité de substrat apparente pour l'AA en position sn-2 dans les PL, comme les sPLA₂ [[Burke, 2009](#)].

II – 2 La phospholipase A₂ cytosolique, une structure et une régulation particulières

II – 2 a. Structure et activité catalytique de la cPLA₂

Le gène codant pour la cPLA₂α humaine est localisé sur le chromosome 1, en position 1q25, entre les marqueurs F13B et D1S74, chez l'humain, et sur le chromosome 13 chez le rat, près du gène de la PGH synthase 2 [Tay, 1995]. Le transcrit de ce gène, d'une taille de 3,4 kb, est exprimé de façon constitutive par de nombreux types cellulaires humains, et peut être considéré comme un gène « domestique ». Ce dernier code pour une protéine composée de 749 aa, d'une masse moléculaire de 85 kDa. Deux régions peuvent être distinguées au sein de sa séquence primaire (Figure 19) :

- Du côté N-ter, il existe une séquence de 68 résidus aa appelée domaine « [CaLB](#) » (Ca²⁺ Lipid Binding domain). Ce domaine assure la liaison Ca²⁺-dépendante de la cPLA₂ à la membrane ou à un substrat phospholipidique [Nalefski, 1994]. Ce type de domaine se retrouve également dans la phospholipase C ([PLC](#)) et est similaire au domaine C2 de la protéine kinase C ([PKC](#)).
- Le site actif de la cPLA₂ correspond au reste de la protéine. Il fait intervenir la Ser²²⁸ comme résidu nucléophile (Figure 20) qui permet la formation d'un intermédiaire sérine-acyl dans la réaction de clivage de l'AA [Reynolds, 1993]. Cette sérine est présente dans un pentapeptide « G-L-S-GS » qui est similaire au « motif lipase » (G-X-S-X-G) trouvé dans les PAF-AH.
En plus de la Ser²²⁸, l'Asp⁵⁴⁹ est essentiel à l'activité de la cPLA₂ (Figure 21). A l'inverse d'autres sérine-estérases, aucun résidu histidine n'intervient dans le mécanisme catalytique de cette enzyme [Pickard, 1996]. Dans le cas présent, la catalyse implique l'arginine située en position 200, ce qui suggère un mécanisme enzymatique différent des sérine-estérases classiques.

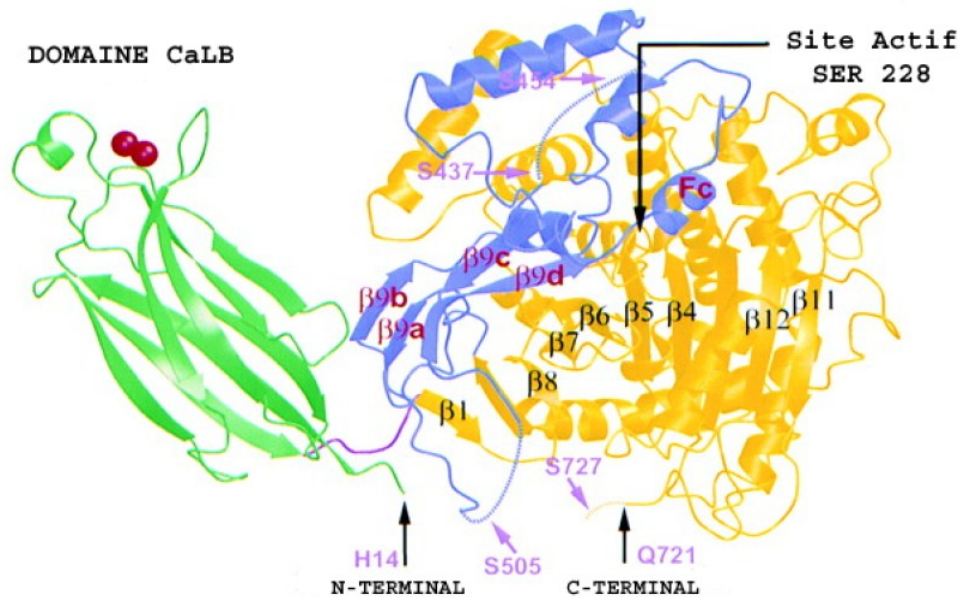


Figure 19 : Structure tridimensionnelle de la cPLA₂ [Dessen, 1999]

On observe un domaine CaLB (calcium lipid binding) permettant la fixation de la protéine à la membrane et un domaine catalytique lui permettant d'exercer son rôle d'hydrolase.

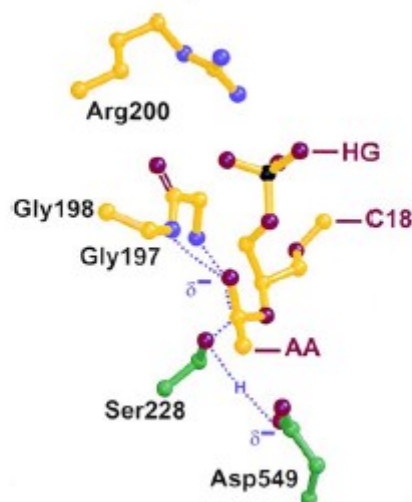


Figure 20 : Mécanisme d'action possible de la cPLA₂ α [Dessen, 1999]

Le groupement phosphate est en noir. Les résidus impliqués dans le mécanisme catalytique sont en vert. L'Arg²⁰⁰ stabilise le groupement phosphate des phospholipides. HG : *Head Group* (= groupement polaire) ; AA : Acide Arachidonique ; C18 : acide gras à 18 carbones.

La cPLA₂ contient également de nombreux sites de phosphorylation, à la fois pour des Ser/Thr kinases et des tyrosine-kinases [Sharp, 1991]. Sur les 4 sérines phosphorylées chez l'Homme (sérines 437, 454, 505 et 727), seules les Ser⁵⁰⁵ et Ser⁷²⁷ sont conservées dans les autres espèces (Figure 19). On notera également la présence du côté C-ter d'une région riche en proline qui pourrait être responsable de la migration électrophorétique anormale de la cPLA₂ (au niveau de 100 kDa).

Comme son nom l'indique, la cPLA₂ possède une activité catalytique majeure, à savoir une action de type phospholipase sur la liaison (sn-2) au niveau des PL, avec une préférence marquée pour l'AA. Des études sur des membranes naturelles ou synthétiques ont démontré la préférence de la cPLA₂ pour les AGPI, spécialement ceux possédant 3 doubles liaisons cis entre les carbones 5 et 6, 8 et 9, et 11 et 12. Ainsi, elle hydrolyse préférentiellement les PL contenant l'AA en position sn-2 [$>$ ac. linoléique (18 : 3 n-3) $>$ ac. linoléique (18 : 2 n-6) $>$ ac. oléique (18 : 1 n-9) $>$ ac. palmitoléique (16 : 1 n-7)] [Hanel, 1993]. Il semblerait qu'elle ne clive pas préférentiellement les PL dont l'AG en position sn-2 est peroxydé [Nigam, 2000]. Il est intéressant de noter que la cPLA₂ α possède une forte affinité pour l'ester de l'acide α -linoléique (18 : 3 n-3) et de l'acide éicosapentaénoïque (EPA, 20 : 5 n-3) qui sont présents en faible quantité dans les membranes. L'AA est cependant l'acide gras le plus libéré des PL par la cPLA₂ α , préférentiellement dans les phosphatidylcholines et les phosphatidyléthanolamines [Kramer, 1997].

A côté de cette activité prédominante, la cPLA₂ possède des activités lysophospholipase et transacylase. L'activité lysophospholipase implique le même site catalytique que l'activité phospholipasique « classique ». Elle nécessite notamment la présence de la Ser²²⁸ [Leslie, 1991]. Il semblerait que la cPLA₂ soit capable de catalyser une transacylation indépendante du coenzyme A; elle peut ainsi former un 1,2 dipalmitoyl-PC à partir de deux 1 palmitoyl lysoPC. Cependant, cette activité ne représente que 8 à 10 % de l'activité lysophospholipase de la cPLA₂ et sa réelle valeur physiologique reste incertaine [Reynolds, 1993].

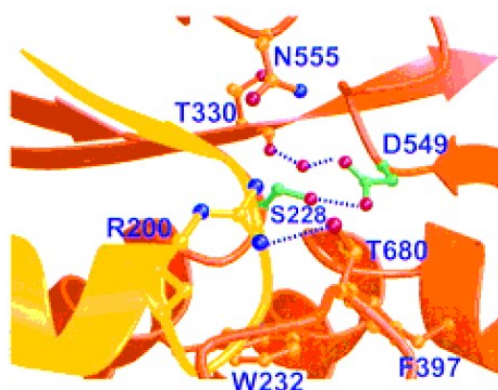


Figure 21 : Domaine catalytique de la cPLA₂ [Dessen, 1999]

Les deux résidus directement impliqués dans la catalyse figurent en vert (Ser²²⁸ et Asp⁵⁴⁹).

II – 2 b. La cPLA₂ et ses paralogues

A côté du gène de la cPLA₂ (ou cPLA₂α ou IV-A), cinq autres gènes ont été clonés. Leurs produits constituent, avec la cPLA₂α, le groupe IV des PLA₂. Ces gènes sont désignés par les suffixes β, γ, δ, ε et ζ ou également IVB à IVF. Ils sont répartis sur différents chromosomes, à savoir les chromosomes 1 (cPLA₂α), 15 (cPLA₂β, δ, ε, ζ) et 19 (cPLA₂γ) [Farooqui, 2006b]. Seules les enzymes β, γ et δ ont été en partie caractérisées (Figure 22).

La cPLA₂β partage 30% d'identité dans sa séquence peptidique avec la cPLA₂α. [Pickard, 1996]. Son ARNm est exprimé de façon ubiquitaire, mais il est trouvé en plus grande quantité dans le pancréas, le foie, le cœur et le cerveau [Song, 1999]. C'est une enzyme de 114 kDa, dépendante du Ca²⁺, possédant une forte homologie de séquence avec la cPLA₂α au niveau du site catalytique. Par contre, elle ne possède aucune des 4 sérines phosphorylées retrouvées dans la cPLA₂α. Elle clive à la fois les AG des PL en position (sn-1) et (sn-2), et possède bien moins d'affinité pour la [2-AA] phosphatidylcholine que la cPLA₂α [Song, 1999].

La cPLA₂γ (ou PLA₂ du groupe IVC) a été identifiée récemment et clonée par comparaison avec la cPLA₂ du groupe IVA (cPLA₂α.) [Pickard, 1999]. Il s'agit d'une enzyme de 61 kDa, qui présente une homologie de 30% avec la cPLA₂α. Elle ne possède pas de domaine CaLB (Ca²⁺-dépendant), mais contient un motif de liaison au groupe prényl, ce qui suggère des propriétés d'ancrage aux lipides et, par conséquent, de liaison à la membrane. Comme la cPLA₂β, la cPLA₂γ ne possède pas les sites de phosphorylation pour les MAPK. La cPLA₂γ agit sur des PL contenant d'autres AG que l'AA en position sn-2. Cette enzyme peut non seulement hydrolyser la liaison ester en sn-2 comme la cPLA₂α, mais également la liaison sn-1, avec une efficacité similaire [Song, 1999]. La surexpression de la cPLA₂γ augmente les proportions des AGPI dans les phosphatidyléthanolamines, ce qui suggère que cette enzyme puisse modifier la composition en PL de la cellule [Asai, 2003]. La cPLA₂γ est exprimée de manière constitutive dans le RE, où elle est impliquée dans le remodelage des PL membranaires, ainsi que dans le maintien de leur composition en AG, en particulier en conditions de stress oxydant.

Enfin la cPLA₂δ, enzyme de 109 kDa est principalement localisée au niveau de la peau [Chiba, 2004]. Contrairement aux autres paralogues de la cPLA₂ présentés plus haut, la cPLA₂δ présente une affinité préférentielle pour l'acide linoléique, au lieu de l'AA.

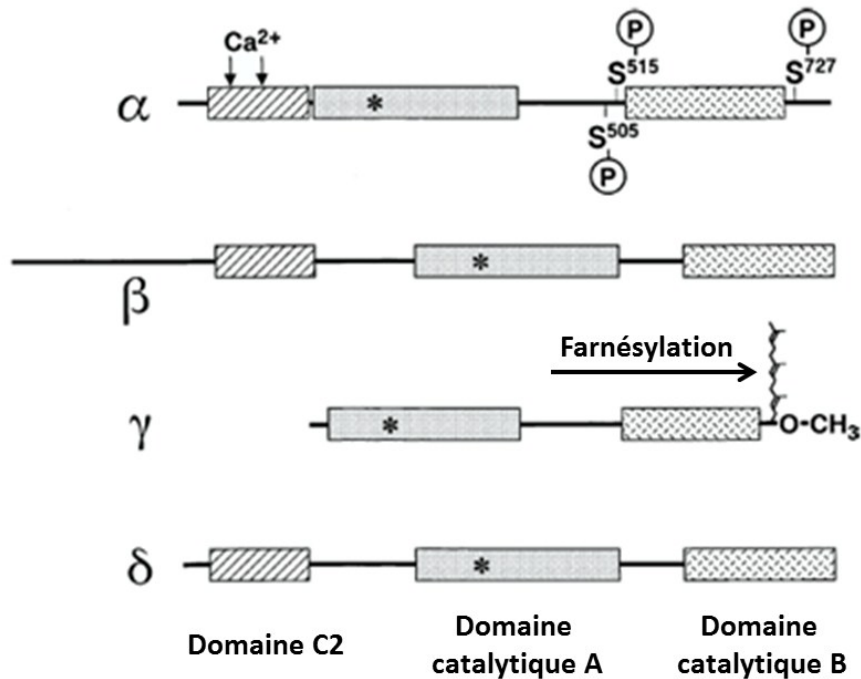


Figure 22 : Paralogues de la cPLA₂ : Les membres du groupe IV des PLA₂ [Hirabayashi, 2004]

Les structures des 4 principaux membres du groupe IV des PLA₂, auquel appartient la cPLA₂, sont représentées sur cette figure, à savoir la cPLA₂α, la cPLA₂β, la cPLA₂γ et la cPLA₂δ. Ce schéma comparatif montre les domaines conservés entre les différentes enzymes, notamment le domaine catalytique et le domaine de liaison au Ca²⁺. Les sites de modification post traductionnelle sont également figurés, à savoir les 3 sérines sujettes à la phosphorylation (Ser⁵⁰⁵, Ser⁵¹⁵ et Ser⁷²⁷) sur la cPLA₂α et le site de farnésylation de la cPLA₂γ.

II – 2 c. Activation et régulations de la cPLA₂

Deux phénomènes majeurs, dont les actions sont différentes et complémentaires aboutissent à l'activation de la cPLA₂ (Figure 23) :

- l'augmentation de la concentration calcique dans le cytosol, qui favorise la liaison de l'enzyme à son substrat,
- la phosphorylation de l'enzyme par diverses kinases, qui va lui conférer son activité catalytique.

D'autres facteurs moduleraient l'activité de la cPLA₂, tels que son interaction avec les phosphatidylinositides membranaires et avec d'autres protéines.

La cPLA₂ est une enzyme qui devient active en présence de 0,3 à 2 μM de Ca²⁺ [Clark, 1995]. Cependant, l'activité catalytique de la cPLA₂ peut être observée en absence de Ca²⁺, grâce à de fortes concentrations en sels ou à d'autres ions divalents. Ceci suggère que le Ca²⁺ n'est pas nécessairement requis pour l'activité catalytique propre de l'enzyme [Reynolds,

[1993](#)]. En réalité, le Ca^{2+} permet uniquement l'interaction de l'enzyme avec la membrane *via* le domaine CaLB.

Différents facteurs peuvent être à l'origine de la variation intracellulaire de Ca^{2+} :

- l'inositol tri-phosphate ([IP3](#)), libéré des PL membranaires par l'action hydrolytique de la PLC. Ce médiateur induit la libération du Ca^{2+} contenu dans le système tubulaire dense vers le cytosol. L'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} va ensuite activer divers effecteurs.
- l'AMP cyclique ([AMPC](#)), formé à partir de l'ATP par l'action de l'adénylate cyclase, qui bloque l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire.

La phosphorylation est le deuxième élément de régulation de la cPLA₂ [[Lin, 1993](#)]. La Ser⁵⁰⁵ est située dans une séquence consensus Pro-Leu-Ser-Pro, cible privilégiée des MAPK. Dans la majorité des modèles cellulaires, les p42/44 MAPK (*extracellular signal-regulated kinases-1/2* ou [ERK-1/2](#)) sont à l'origine de la phosphorylation de la Ser⁵⁰⁵. D'autres kinases comme la PKC jouent aussi un rôle important dans l'activation de la cPLA₂ puisque le [PMA](#) (Phorbol Myristate Acetate), activateur de PKC, est capable d'induire la phosphorylation de l'enzyme et de stimuler la libération d'AA au niveau des macrophages [[Qiu, 1998](#)].

Il faut noter que la phosphorylation de la cPLA₂ n'est pas complètement nécessaire à l'activité de cette dernière, mais elle permet un réarrangement structural la rendant plus affine pour son substrat [[Dessen, 1999](#)].

L'interaction de la cPLA₂ avec les membranes est favorisée par des lipides anioniques. La cPLA₂ présente une forte affinité et une spécificité élevée pour le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ([PIP2](#)) et donc les domaines membranaires qui les contiennent [[Mosior, 1998](#)]. Cette interaction de l'enzyme avec l'interface membranaire entraîne l'augmentation de l'activité cPLA₂.

Bien que ce type d'interaction soit généralement médié *via* un domaine [PH](#) (*pleckstrin homology*), celui-ci n'existe apparemment pas dans la cPLA₂, [[Dessen, 1999](#)]. Cependant, certains auteurs ont identifié un domaine homologue au sein de la cPLA₂ [[Mosior, 1998](#)]. Ainsi il a été rapporté une augmentation de la libération d'AA concomitante avec une augmentation de PIP2 sans augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire [[Balsinde, 2000](#)] [[Mosior, 1998](#)]. L'activité de la cPLA₂ peut être également modulée par d'autres PL anioniques le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate et le céramide 1-phosphate [[Hirabayashi, 2004](#)].

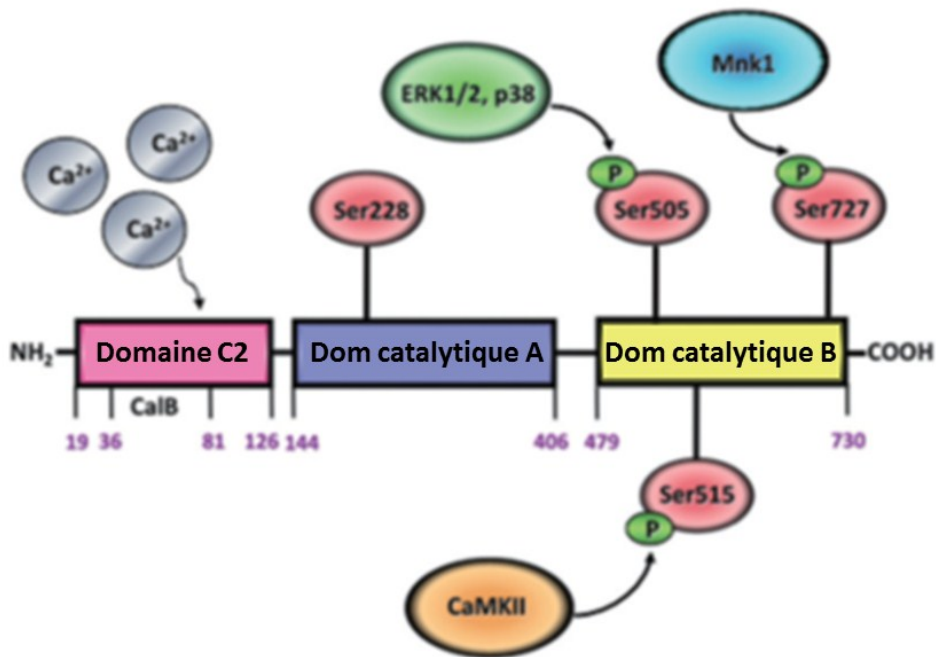


Figure 23 : Structure et activation de la cPLA₂ [Linkous, 2010]

L'activation de la cPLA₂ résulte de deux événements : la liaison du Ca²⁺ au niveau du domaine C2, et la phosphorylation de plusieurs sérines au niveau du site catalytique par différentes kinases. La liaison du Ca²⁺ permet à l'enzyme de se fixer sur son substrat (PL membranaires) et la phosphorylation lui confère son activité catalytique.

Les interactions de la cPLA₂ avec quelques protéines ont été caractérisées. Ces interactions constitueraient une voie de modulation de l'activité de la cPLA₂.

La vimentine, un composant des filaments intermédiaires présent dans la région périnucléaire, se fixe à l'enzyme de façon Ca²⁺-dépendante [Nakatani, 2000]. Cette interaction stabilise l'interaction de l'enzyme avec la membrane nucléaire.

La calpactine, p11, l'un des membres de la famille des protéines S100, se fixe de façon Ca²⁺-dépendante au domaine C-terminal de la cPLA₂ et inhibe son activité *in vitro* [Wu, 1997].

L'annexine 1 exerce un effet négatif sur la cPLA₂ en se fixant sur son domaine CaLB [Kim, 2001].

Il convient également de noter que les autres enzymes de la cascade de l'AA, intervenant en aval de la cPLA₂, sont également localisées au niveau des membranes des organites cellulaires. C'est notamment le cas des COX et lipoxygénases (LOX), qui interviennent dans la conversion de l'AA en éicosanoïdes.

II – 2 d. Expression de la cPLA₂ : régulation et rôle en pathologie

a) Expression tissulaire de la cPLA₂

Chez l'Homme, l'expression de la cPLA₂ est ubiquitaire à l'exception des lymphocytes T et B [[Hirabayashi, 2000](#)]. Une fois activée, la cPLA₂ se transloque du cytosol vers la membrane dont la nature varie selon le type cellulaire. Dans les plaquettes, il s'agit de la membrane plasmique [[McNicol, 1998](#)] alors que pour les autres types cellulaires, il s'agira de la membrane du noyau ou du RE [[Glover, 1995](#)]. Cette translocation semble logique puisqu'elle rapproche l'enzyme de son substrat phospholipidique.

La cPLA₂ est retrouvée dans le cerveau des mammifères ainsi que ses paralogues cPLA₂β et cPLA₂γ. La cPLA₂β est principalement localisée dans le cervelet, tandis que les cPLA₂α et γ sont distribuées de manière plus ubiquitaire et uniforme dans le cerveau de rat. Plus récemment, les ARNm de la cPLA₂β et de la cPLA₂δ ont été identifiés par RT-PCR au niveau d'échantillons de cerveaux humains [[Hirabayashi, 2004](#)] [[Pickard, 1999](#)] [[Song, 1999](#)]. Néanmoins, les rôles respectifs de ces différents paralogues dans le SNC humain demeurent pour l'instant mal compris.

Parmi les différentes régions du cerveau, l'activité PLA₂ est particulièrement importante au niveau de l'hippocampe, et cette activité enzymatique est superposable aux niveaux élevés d'expression de cette cPLA₂ dans des neurones de l'hippocampe [[Sanchez-Mejia, 2008](#)]. L'ARN de la cPLA₂ a été mis en évidence au sein des neurones de l'hippocampe de rat [[Kishimoto, 1999](#)]. De plus, la cPLA₂α est majoritairement retrouvée au niveau des astrocytes de la substance grise [[Pardue, 2003](#)], ainsi que dans les neurones de l'hippocampe [[Kishimoto, 1999](#)] [[Sandhya, 1998](#)]. Son expression est constitutive au sein des neurones [[Kishimoto, 1999](#)] [[Sanchez-Mejia, 2008](#)] [[Sandhya, 1998](#)] et peut être induite par divers stimuli au niveau des cellules gliales [[Clemens, 1996](#)]. Enfin, des neurones de rat en culture expriment à la fois la cPLA₂ et la sPLA₂ [[Morioka, 2002](#)].

b) Régulation de l'expression du gène de la cPLA₂

Le gène de la cPLA₂ est considéré comme un gène de ménage, dont la transcription est permanente à un niveau basal. La région 5' de ce gène possède en effet certaines caractéristiques d'un gène domestique, dont l'absence de TATA box (bien qu'une CAAT box soit possible en position -111). Toutefois, elle ne présente ni la richesse en bases GC ni le site SP1, éléments pourtant caractéristiques d'un gène de ce type ([Figure 24](#)).

L'activité transcriptionnelle de ce promoteur a été évaluée à près de 30% de celle du promoteur du SV40 [[Miyashita, 1995](#)]. La région promotrice minimale requise pour générer la transcription du gène est comprise entre -40 pb et le site d'initiation de la transcription. Ce site comporte un élément initiateur ([Inr](#)), dont la fonction dépend des bases -3(C) et -2(T). Un motif AAGGAG, localisé entre -35 et -30 pb peut lier la protéine de liaison à la TATA box (*TATA box binding protein* ou [TBP](#)) et apparaît critique pour entretenir un niveau basal d'expression [[Cowan, 2004](#)].

Le promoteur du gène de la cPLA₂ comporte également une répétition CA de 48 bases, deux éléments de réponse aux glucocorticoïdes, cinq éléments de réponse à l'interferon γ ([IFN- \$\gamma\$](#)) (*γ -interferon response element* ou [\$\gamma\$ -IRE](#)) et une séquence activée par l'IFN- γ [[Wu, 1994](#)]. Cependant, d'autres travaux ont rapporté des résultats opposés, où des glucocorticoïdes de synthèse inhibaient la transcription du gène de la cPLA₂, expliquant ainsi une partie de leurs propriétés anti inflammatoires [[Dolan-O'keefe, 1999](#)].

Il possède également un site de liaison potentiel pour le facteur de réponse à l'hypoxie (*Hypoxia Inducible Factor 1* ou [HIF-1](#)), localisé entre -1087 et -996 pb du point de départ de la transcription [[Alexandrov, 2006](#)]. Un site de liaison pour le facteur de transcription [LKLF](#) (*Lung Krüppel Like Factor*) est également présent dans une région riche en GC entre les bases -37 et -30. Ce facteur LKLF est contrôlé par ERK et pourrait jouer un rôle important dans la prolifération cellulaire normale et tumorale [[Wick, 2005](#)]. Le complexe d'acétylation p300 se lie au promoteur du gène de la cPLA₂, où il entraîne l'acétylation de l'histone H4 et module ainsi l'expression du gène [[Lee C, 2011](#)]. Les facteurs de transcription AP-1 [[Cheng, 2009](#)] et AP-2 [[Rao, 2007b](#)] peuvent également réguler positivement la transcription du gène de la cPLA₂. D'autres facteurs de transcription tels que NF- κ B, NF-IL6 ou PEA3 peuvent se lier au promoteur de la cPLA₂ [[Morri, 1994](#)].

Ce promoteur héberge également divers polymorphismes, en particulier des répétitions (CA)_n et (T)_n, qui peuvent moduler l'activité du promoteur. Certains génotypes de ces polymorphismes, ainsi que plusieurs *single nucleotide polymorphisms* ([SNP](#)) contenus dans le promoteur, ont été associés à une prévalence accrue de maladie asthmatique [[Sokolowska, 2007](#)]. Des recherches similaires d'associations entre des polymorphismes du gène de la cPLA₂ et un risque accru de forme sporadique de la MA ont produit des résultats contradictoires [[Cordeiro, 2010](#)] [[Feher, 2010](#)].

Dans les cellules musculaires lisses trachéales humaines ([HTSMCs](#)), divers agonistes (notamment le TNF α) ou la production de ROS peuvent induire l'expression de la cPLA₂ et la

production de PGE2. Cette induction implique notamment l'activation de p47 (phox), de diverses kinases (p38 MAPK, ERK, MEK1/2, JNK), de NFκB et de CBP/p300 [Cheng, 2009] [Lee, 2010] [Lee C, 2011] [Lin, 2011]. Toutefois, d'autres études ont rapporté des résultats partiellement contradictoires, en particulier, la p38 MAPK ne participerait pas à l'induction de l'expression de la cPLA₂ en réponse à l'oncogène H-Ras dans les cellules épithéliales de rat, contrairement aux kinases ERK et JNK [Van Putten, 2001]. Les céramides [Hayakawa, 1996], le lipopolysaccharide (LPS) [Flynn, 1995] ou le TNF [Wu, 1996] peuvent stimuler l'expression de la cPLA₂ et d'enzymes en aval dans la cascade de l'AA (telle que la COX2 ou les PG synthases) et ainsi participer à l'instauration et/ou l'entretien de la réponse inflammatoire dans divers types cellulaires.

L'administration chronique de NMDA à des rats entraîne une augmentation de l'expression (ARNm et protéine), de la phosphorylation et de l'activité enzymatique de la cPLA₂ au niveau du cortex frontal [Rao, 2007b]. L'action du NMDA sur l'expression de la cPLA₂ semble impliquer le facteur de transcription AP-2 [Rao, 2007b]. A l'inverse, des médicaments thymorégulateurs comme le lithium ou la carbamazépine exercent une action inhibitrice *via* ce même facteur [Weerasinghe, 2003].

L'expression de la cPLA₂ est donc majoritairement régulée au niveau transcriptionnel.

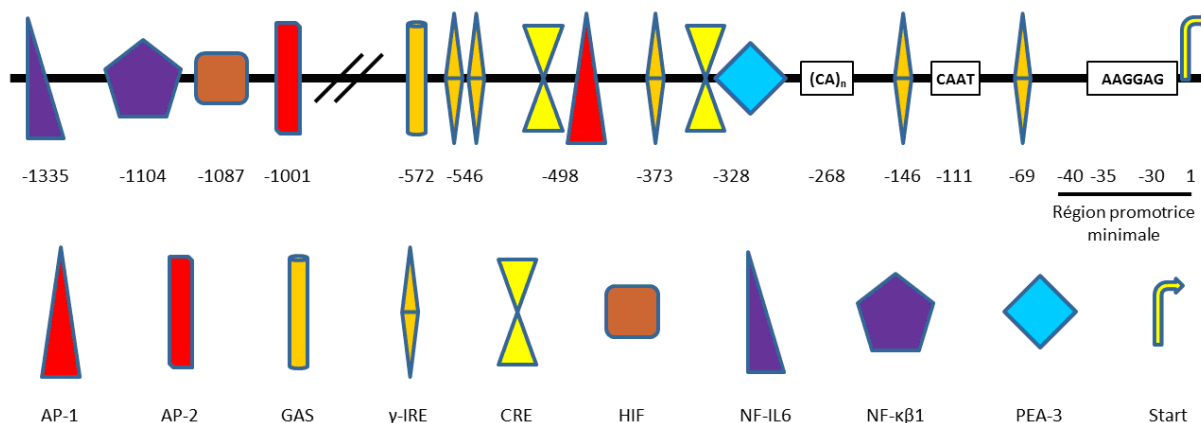


Figure 24 : Représentation schématique du promoteur du gène de la cPLA₂

Cette figure reprend les différents éléments constitutifs notables du promoteur du gène de la cPLA₂ et les positionne par rapport au point de départ de la transcription, modélisé par une flèche courbée jaune (Start). La position de chaque élément est indiquée en paires de bases. Cette représentation est purement figurative et ne respecte pas la distance entre les éléments. Ce promoteur comporte les 5 éléments de réponse à l'interféron γ (γ-IRE), les 2 éléments de réponse aux glucocorticoïdes (CRE) et la séquence activée par l'interféron γ (GAS). On notera aussi les sites de liaison des facteurs de transcription AP-1 et AP-2, NF-IL6, NF-κB et PEA-3, ainsi que le site de liaison potentiel pour le facteur de réponse à l'hypoxie (HIF).

Cependant, il existe également des régulations au niveau post transcriptionnel, au niveau de la stabilité de son ARNm. En effet, dans les cellules HTSMCs, l'exposition au LPS entraîne une augmentation de l'expression de la cPLA₂ *via* le facteur HuR. Ce dernier augmente l'expression du gène en se liant à son extrémité non transcrite 3'-UTR et stabilise celui-ci [Lin, 2011]. De la même manière, dans des cellules mésangiales de rat, divers agonistes (*epidermal growth factor* ou [EGF](#), *platelet-derived growth factor* ou [PDGF](#)...) modulent l'expression de la cPLA₂ au niveau post transcriptionnel. La présence de trois motifs ATTTA au niveau de l'extrémité 3' non traduite du gène modulerait de manière critique la durée de vie de l'ARNm [Tay, 1994].

c) Modulation de la cPLA₂ par les acides gras et leurs dérivés

La cPLA₂ peut être modulée physiologiquement par divers AGPI à longue chaîne. Ces derniers sont des constituants des PL des membranes neuronales et peuvent être libérés par l'hydrolyse de ces PL, catalysée par les PLA₂. Parmi ces AGPI à longue chaîne, on trouve l'AA (appartenant à la série n-6), l'EPA et le DHA (appartenant à la série n-3). Si l'AA résulte de l'action hydrolytique de la cPLA₂, l'EPA et le DHA sont libérés par la PlsEtn-PLA₂ et l'iPLA₂ [Strokin, 2003]. *In vitro*, l'adjonction de DHA réduit les activités PLA₂ au niveau des neurites et des cônes de croissance des cellules PC12 en culture [Martin, 1998]. *In vivo*, la déprivation alimentaire en AGPI (n-3) pendant 15 semaines chez le rat induit une réduction significative du contenu cérébral en DHA, mais une augmentation de l'expression de la cPLA₂ et de la sPLA₂, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine. De plus, un tel régime alimentaire diminue l'expression du gène de l'iPLA₂ afin d'augmenter la durée de vie intracérébrale du DHA [Rao, 2007a]. A l'inverse, une déprivation alimentaire en AGPI (n-6) pendant la même durée entraîne des effets opposés, à savoir une augmentation de l'expression de l'iPLA₂ et une réduction de la cPLA₂ [Kim, 2011]. Par ailleurs, la préincubation de cellules HL60 en présence de DHA les protège contre l'apoptose induite par la sphingosine, cette protection résultant d'une inhibition de l'activité de la cPLA₂ [Kishida, 1998].

De plus, l'EPA entre en compétition avec l'AA au niveau des COX pour produire les PG de la série 3 (PGE₃, PGI₃ et thromboxane A₃ -TXA₃-). De la même manière, ces AGPI (n-3) peuvent entrer en compétition avec les AGPI (n-6) au niveau des enzymes métabolisant l'AA. C'est notamment le cas des LOX, où l'EPA peut être converti en LT de la série 5 (LTPB₅, LTC₅, LTD₅), ces composés étant moins actifs biologiquement que leurs homologues dérivés de l'AA [Anderle, 2004]. Si le DHA ne constitue pas un substrat pour les COX, il peut par contre

inhiber ces enzymes. Il peut également être métabolisé en docosanoïdes, lesquels incluent les 10,17S-docosatriènes et les 17S-résolvines [[Hong, 2003](#)]. Ces diverses substances peuvent antagoniser les effets des dérivés de l'AA, mais également réduire le trafic leucocytaire, ainsi que l'expression des cytokines au niveau des cellules gliales [[Hong, 2003](#)]. Parmi les résolvines, on trouve la neuroprotectine D1 ([NPD1](#)), un 10,17S-docosatriène, qui possède des propriétés antiapoptotiques et neuroprotectrices. Le contenu de l'hippocampe en NPD1 est réduit au cours de la MA, de même que l'expression des enzymes assurant sa synthèse. La NPD1 pourrait ainsi être impliquée dans la physiopathologie de la MA [[Lukiw, 2005](#)].

II – 3 Fonctions physiologiques et implication potentielle de la cPLA₂ dans la maladie d'Alzheimer et les pathologies neurodégénératives

II – 3 a. cPLA₂, métabolisme et renouvellement des phospholipides

Les niveaux d'AA libre dans le cerveau résultent probablement, en conditions physiologiques, de l'activité de la cPLA₂. Toutefois, l'AA peut également être libéré par l'hydrolyse des EC *via* l'action de l'hydrolase d'amides d'acide gras (*fatty acid amide hydrolase* ou [FAAH](#)) et de la monoacyl glycérol lipase ([MAGL](#)) [[Ahn, 2008](#)].

Des études sur le métabolisme des lipides dans le cerveau des souris cPLA₂^{-/-} indiquent qu'il n'existe aucune modification du taux d'AA non estérifié, par rapport aux souris cPLA₂^{+/+}. En revanche, ces travaux ont rapporté une réduction de l'ordre de 50% de la quantité d'AA estérifié au sein de la phosphatidylcholine, ce qui souligne une implication de la cPLA₂ dans l'incorporation de l'AA au sein de cette catégorie de PL chez les souris cPLA₂^{+/+} [[Rosenberger, 2003](#)]. Les souris cPLA₂^{-/-} présentent également des taux diminués d'incorporation de l'AA au sein des glycéroPL à éthanolamine et à choline. A l'inverse, ces taux d'incorporation de l'AA sont augmentés au sein du phosphatidylinositol. De plus, les taux de DHA sont également touchés dans le cerveau de ces souris et les auteurs avancent l'idée que la cPLA₂ puisse être impliquée dans le *turn over* du DHA comme de l'AA, malgré sa spécificité pour ce dernier [[Rosenberger, 2003](#)].

Ces souris cPLA₂^{-/-} présentent également des diminutions de l'ordre de 30% de la production de PGE₂, ce qui laisse supposer qu'il existe un couplage fonctionnel entre les activités cPLA₂ et COX [[Bosetti, 2003](#)]. De même, mais dans un modèle « périphérique », des fibroblastes issus de souris cPLA₂^{-/-} montrent une synthèse réduite de PGE₂, par rapport à des souris sauvages [[Ghosh, 2004](#)].

Par ailleurs, les souris cPLA₂^{-/-} présentent une expression réduite du gène de la COX-2, qui se traduit par un niveau réduit d'ARNm et une activité enzymatique diminuée, à la fois en conditions basales et après stimulation par le LPS [[Murakami, 2011](#)]. Cette diminution semble très spécifique de la COX-2, puisqu'aucun changement n'est rapporté pour la COX-1, la 5-LOX, ou la cytochrome P450 époxygénase [[Murakami, 2011](#)]. Cette observation tend à confirmer le couplage fonctionnel entre la cPLA₂ et la COX-2 pour la synthèse des PG.

Enfin, il n'a pas été noté de modification des autres PLA₂, tant au niveau de l'expression de la protéine que de l'activité enzymatique correspondante, dans les souris cPLA₂^{-/-}. Il semble donc que ni les sPLA₂ ni les iPLA₂ ne compensent ce déficit en cPLA₂ [[Bosetti, 2007](#)].

II – 3 b. cPLA₂, stress oxydant et réaction inflammatoire

La cPLA₂ est considérée comme l'enzyme responsable de la libération d'AA ainsi que de la production d'éicosanoïdes dans les neurones. Toutefois, la sPLA₂ pourrait également être impliquée dans ces différents processus. La sPLA₂ et la cPLA₂ modulent le métabolisme de l'AA dans la lignée d'astrocytome 1321N1, en réponse à l'activation des MAPK [[Hernandez, 2000](#)]. Au niveau cellulaire, l'action conjuguée de la libération intracellulaire de Ca²⁺, de la phosphorylation de la cPLA₂ et des récepteurs extracellulaires à la sPLA₂ entraîne une production accrue d'éicosanoïdes. La cPLA₂ peut également participer à la réduction de l'activité de la nitric oxyde synthase ([NOS](#)), et pourrait ainsi constituer un intermédiaire entre les voies de signalisation calcique et du NO dans les neurones [[Palomba, 2004](#)]. En conditions pathologiques, les interactions entre les mouvements de Ca²⁺, la cPLA₂ et la NOS pourraient être conjointement impliquées dans l'induction de l'inflammation et du stress oxydatif.

a) cPLA₂ et inflammation

Les cellules gliales du SNC regroupent les astrocytes et les cellules de la microglie, ces dernières étant minoritaires et donc, plus difficiles à étudier. Ces différentes cellules sont des acteurs importants des phénomènes inflammatoires du SNC, contrairement aux neurones. En effet, ces cellules peuvent être activées par différentes cytokines (TNFα, IL-1β, et INFγ) et par des médiateurs pro-inflammatoires tels que le lipopolysaccharide ([LPS](#)). Dans les astrocytes de rat en culture, ces différentes cytokines vont induire la phosphorylation de la cPLA₂ ainsi qu'une augmentation de la transcription de la COX2, de la sPLA₂ et éventuellement de la cPLA₂ [[Sun, 2004](#)] [[Xu, 2003a](#)]. Ces différents effets convergent vers une production accrue d'AA et de PGE2.

D'autres cytokines comme le TNFα peuvent également activer diverses voies menant à la phosphorylation de la cPLA₂ et à la libération d'AA, ainsi qu'à l'activation de la COX2 [[Hernandez, 1999](#)]. Ainsi, dans des cellules d'astrocytome humain (cellules 1321N1), le TNFα induit la phosphorylation de la cPLA₂ *via* les kinases c-jun et la MAPK p38, mais cette

phosphorylation n'implique pas la kinase ERK [[Hernandez, 1999](#)]. Par ailleurs, le TNF α active d'autres types de PLA₂ dans les astrocytes, en particulier les sPLA₂ IIA et V [[Thomas, 2000](#)].

Les cellules microgliales BV-2 contiennent des niveaux importants de cPLA₂ (ces cellules, obtenues à partir de souris C57Bl/6 sont par conséquent déficientes en sPLA₂ IIA). Dans ces cellules, l'INF γ et le PMA activent les voies de la PKC et d'ERK, et provoquent la libération d'AA. Cette production d'AA en réponse aux médiateurs inflammatoires résulte très probablement de l'action phospholipasique de la cPLA₂ [[Sun, 2004](#)]. De même, dans des cellules microgliales humaines, le LPS peut induire l'expression de l'ARNm de la COX2 et la production de PGE2 [[Hoozemans, 2002](#)].

Par ailleurs, ces différents médiateurs pro-inflammatoires augmentent la sensibilité des astrocytes à d'autres signaux, en particulier aux médiateurs métabotropiques, tels que l'ATP. L'ATP peut activer la cPLA₂ dans les astrocytes et entraîner une libération d'AA, lui-même converti en PGE2. La pré-incubation d'astrocytes de rat avec des cytokines pro-inflammatoires multiplie par 70 la production de PGE2 en réponse à des activateurs comme le PMA ou l'ATP [[Xu, 2003a](#)].

Il peut donc y avoir un phénomène d'auto-entretien du processus inflammatoire, auquel participe la cPLA₂. L'inhibition de la cPLA₂ peut donc représenter un moyen de limiter ce phénomène d'auto-amplification.

Par ailleurs, la cPLA₂ est impliquée dans l'activation des cellules gliales et le contrôle de la libération de médiateurs pro-inflammatoires par ces dernières. Ainsi, l'inhibition des PLA₂ dans des cellules de lignée N9 empêche la synthèse de TNF α après exposition des cellules au LPS [[Paris, 2000](#)].

Les phénomènes inflammatoires impliquant la cPLA₂ participent à la pathogenèse de la MA. Ainsi, dans des échantillons de cerveaux de patients atteints de MA, comme dans des souris transgéniques modélisant cette maladie, une expression accrue de la cPLA_{2a} a été mise en évidence au niveau des cellules gliales activées adjacentes aux zones de perte neuronale [[Stephenson, 1999](#)]. A l'inverse, dans les zones où les neurones ne dégèrent pas et sont épargnés par l'apoptose, les cellules gliales n'expriment pas la cPLA₂.

b) cPLA₂ et stress oxydatif

Les ROS sont produites dans les systèmes biologiques, *via* des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques. La production d'H₂O₂ constitue un phénomène physiologique, résultant de nombreuses réactions intracellulaires. Une production excessive de ROS a été décrite

comme un facteur majeur de toxicité neuronale au cours de diverses pathologies, dont l'ischémie cérébrale et la MA. Ainsi, les cerveaux de patients atteints de MA renferment des quantités anormalement élevées de 24S-hydroxycholestérol (produit primaire de l'oxydation du cholestérol et marqueur de stress oxydant) [[Schonknecht, 2002](#)].

Ces ROS peuvent exercer leurs effets délétères à plusieurs niveaux, en particulier, en altérant l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane cellulaire, ainsi que la fonction de la mitochondrie. Ces différentes atteintes s'accompagnent d'une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire [[Rohrdanz, 1998](#)].

De plus, la production excessive d' H_2O_2 entraîne l'activation de multiples voies de signalisation, notamment celles de la PKC, des tyrosines kinases et des MAPK. L'activation de ces kinases, associée à une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, peut activer la cPLA₂ [[Suzuki J, 1997](#)]. Ainsi, dans les astrocytes murins, l'incubation en présence d' H_2O_2 entraîne l'activation conjointe des phospholipases cPLA₂ et iPLA₂ ainsi qu'une libération d'AA [[Xu, 2003b](#)].

De même, l'injection ICV de citrate d'ammonium ferreux, un puissant inducteur de stress oxydant, dans l'hippocampe de rat, induit une surexpression significative de la cPLA₂ au niveau des neurones pyramidaux, associée à une production accrue de 4-hydroxy nonéal ([4-HNE](#)), un marqueur de stress oxydant [[Ong, 2005](#)].

Ces produits du stress oxydant peuvent à leur tour activer les PLA₂, conduisant à un autoentretien du processus pathologique. Ainsi, le 24S-hydroxycholestérol induit une surexpression de gènes impliqués dans le métabolisme de l'AA, dont la COX₂ et la cPLA₂, dans un modèle de coculture de neurones et de cellules gliales [[Alexandrov, 2005](#)].

A côté des neurones, la cPLA₂ peut assurer la médiation des effets délétères des oligomères de peptide A β dans d'autres types cellulaires. C'est notamment le cas des astrocytes, dont l'exposition aux oligomères A β (1-42) entraîne l'activation de la cPLA₂ (mais également de la iPLA₂) [[Zhu, 2006](#)]. L'activation de la NADPH oxydase entraîne la phosphorylation de la cPLA₂ par les MAPK. Cette activation de la cPLA₂ s'accompagne de la libération d'AA, ainsi que de la relocalisation de la cPLA₂ au niveau de la membrane mitochondriale. L'activation de la cPLA₂ entraîne ensuite divers effets délétères au niveau de la mitochondrie, à savoir sa dépolarisation et une production accrue de ROS. Les effets délétères des oligomères de peptide A β peuvent également toucher d'autres types cellulaires du SNC ou apparentés, *via* l'activation de la cPLA₂, comme les oligodendrocytes en

culture primaire (données non publiées de notre laboratoire) ou les péricytes rétiens [[Nicotra, 2005](#)]. Dans ces différents modèles, la médiation de la toxicité des oligomères implique la phosphorylation des kinases ERK1/2, MAPK et de la cPLA₂.

Par ailleurs, l'exposition de neurones corticaux en culture à des oligomères de peptide Aβ(1-42) ou à du NMDA induit l'activation de la cPLA₂ (attestée par sa phosphorylation et la production d'AA), *via* la production de ROS par la NADPH oxydase [[Shelat, 2008](#)]. L'incubation préalable des neurones avec des antagonistes des récepteurs NMDA au glutamate empêche la libération d'AA après exposition au peptide Aβ, ce qui souligne le rôle de ce récepteur comme un des médiateurs potentiels de la toxicité des oligomères Aβ. Dans cette étude, l'activation de la cPLA₂ en réponse aux oligomères Aβ et au NMDA dépend de voies de signalisation impliquant les kinases ERK1/2 et de la PKC.

II – 3 c. cPLA₂, apoptose et cycle cellulaire

La cPLA₂ est impliquée non seulement dans la régulation de la prolifération des cellules, mais également dans l'apoptose. Ces deux effets opposés varient selon le type cellulaire et la situation physiopathologique rencontrée.

a) cPLA₂ et contrôle de la prolifération

La cPLA₂ et les produits de son activité hydrolytique sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et la régulation de la prolifération des cellules ([Figure 25](#)). Son activité varie ainsi fortement entre les phases M, G1 et S du cycle, avec une activité relativement haute au moment de l'entrée en phase S [[Boonstra, 2003](#)]. Cette régulation de la prolifération pourrait impliquer d'autres isoformes en plus de la cPLA₂, ainsi que des métabolites en aval de l'AA [[van Rossum, 2002](#)].

Dans les tumeurs prostatiques et des lignées cellulaires qui en dérivent, la cPLA₂ est surexprimée et anormalement phosphorylée, lorsque la tumeur devient hormono-réfractaire. A l'inverse, l'inhibition de l'enzyme, par voie pharmacologique ou par ASO, réduit considérablement la prolifération cellulaire, de même que l'expression de la cycline D1 et la phosphorylation de Akt, et entraîne l'apoptose des cellules de lignée et des xénogreffes [[Patel, 2008](#)].

De la même manière, dans les tumeurs mammaires, la phosphorylation de la cPLA₂ (plus particulièrement sur la Ser⁵⁰⁵) en réponse aux oestrogènes, médiée par l'oncogène HER2 et la voie ERK, favorise la prolifération des cellules [[Caiazza, 2010](#)].

A côté des cellules cancéreuses, la cPLA₂ et la voie de l'AA participent également à la promotion de la prolifération de cellules normales comme les kératinocytes en culture. Dans ces cellules, cette action pro-prolifération de la cPLA₂ est inhibée par diverses protéines régulatrices comme l'annexine A1. Cette inhibition peut être annulée par des facteurs stimulant la prolifération des cellules, tels que l'EGF, au sein de kératinocytes cancéreux [[Sakaguchi, 2007](#)].

De même, la prolifération des cellules épithéliales de cordon ombilical humain (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells* ou [HUVEC](#)) est contrôlée par l'activité catalytique de la cPLA₂. Ainsi, l'inhibition pharmacologique de la cPLA₂ diminue leur prolifération d'une manière dose-dépendante. L'association de la cPLA₂ avec le Golgi module l'activité de l'enzyme et dépend du statut prolifératif des cellules [[Herbert, 2005](#)].

Des données similaires reliant la prolifération cellulaire à l'expression et à l'activité de la cPLA₂ ont été obtenues pour des cellules musculaires lisses vasculaires aortiques [[Anderson, 1997](#)]. Dans des cellules de rein embryonnaire humain (cellules [HEK](#)), la surexpression de la cPLA₂ (ou le prétraitement des cellules par l'AA) peut minimiser les effets proapoptotiques d'une surcharge intracellulaire en Ca²⁺ induite par l'ionophore calcique ionomycine [[Casas, 2006](#)].

Enfin, la cPLA₂ peut réguler la prolifération des cellules en modulant la signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance. Ainsi, l'inactivation du gène de la cPLA₂ entraîne également une dérégulation de la voie de signalisation de l'*insulin-like growth factor* ([Igf-1](#)). Ceci se traduit par une hypertrophie des muscles striés squelettiques chez les souris cPLA₂^{-/-} [[Haq, 2003](#)].

b) cPLA₂ et induction de l'apoptose

A l'inverse, la cPLA₂ et les médiateurs en aval de l'AA peuvent également participer aux phénomènes apoptotiques, en réponse à divers stimuli tels que le TNF [[Wu, 1998](#)] ou à certains stress cellulaires ([Figure 25](#)). Ainsi, dans des cellules HUVEC, l'incubation en présence de [PEDF](#) (*pigment epithelium derived factor*) conduit à l'apoptose des cellules par l'activation séquentielle des voies p38 MAPK – cPLA₂ – PPARγ – p53 [[Ho, 2009](#)]. De la même manière, dans des cardiomyocytes néonataux, la cPLA₂ est impliquée dans la médiation de l'apoptose induite par l'ischémie / reperfusion et la p38 MAPK participe de manière critique à cette signalisation pro apoptotique [[Engelbrecht, 2007](#)].

Dans des lignées de fibroblastes murins C3HA, l'apoptose induite par différents agents implique l'activation de la cPLA₂ par une augmentation des niveaux intracellulaires de Ca²⁺ et sa translocation, notamment vers la membrane nucléaire. Le prétraitement des cellules par un inhibiteur calcique les protège contre l'apoptose [[Draper, 2004](#)].

La cPLA₂ participe également à la médiation de l'apoptose dans d'autres types cellulaires et diverses situations physiopathologiques, telles que l'apoptose des cellules endothéliales déclenchée par les LDL oxydées [[Panini, 2001](#)] ou celle des macrophages infectés par le bacille tuberculeux [[Duan, 2001](#)].

De plus, au cours de l'apoptose, la cPLA₂ subit un clivage protéolytique par les caspases, en particulier au niveau de l'Asp⁵²². Les caspases impliquées dans ce processus peuvent être les caspases 3 [[Adam-Klages, 1998](#)], 1 et 8 [[Luschen, 1998](#)]. La forme tronquée cPLA₂(1-522) qui en résulte est localisée au niveau du noyau et semble se comporter comme un dominant négatif, rendant la cellule incapable de produire de l'AA en réponse à divers stimuli. De manière similaire, l'iPLA₂ est également clivée par les caspases au niveau de l'Asp¹⁸³. Ce clivage augmente son activité catalytique et pourrait participer aux changements observés dans les PL membranaires au cours de l'apoptose [[Atsumi, 2000](#)].

Toutefois, le rôle de la cPLA₂ est variable selon le type cellulaire et la situation considérés : elle semble pouvoir assurer autant la médiation de l'apoptose que celle de la prolifération. Ainsi, dans les cellules de cancer colique, la réduction de l'expression de la cPLA₂ par l'acide acétyl salicylique serait à l'origine des propriétés antiprolifératives et apoptotiques de ce médicament [[Yu, 2003](#)]. A l'inverse, une autre étude, utilisant un modèle de cancérogenèse induite et des échantillons de tumeurs humaines, a montré que l'expression de la cPLA₂ se réduisait à mesure que les cellules progressaient dans la tumorigénèse [[Dong, 2003](#)].

c) cPLA₂, survie et apoptose dans le SNC

Dans le SNC, différentes études montrent que la cPLA₂ peut intervenir soit dans l'apoptose, soit au contraire dans la survie et la prolifération cellulaires, selon le contexte et le modèle utilisé.

Ainsi, l'implication de la cPLA₂ dans la médiation de l'apoptose a été mise en évidence dans des astrocytes en culture soumis à une ischémie combinée à une déprivation en glucose [[Gabryel, 2006](#)] ou dans les neurones ganglionnaires des racines dorsales [[Hornfelt, 1999](#)].

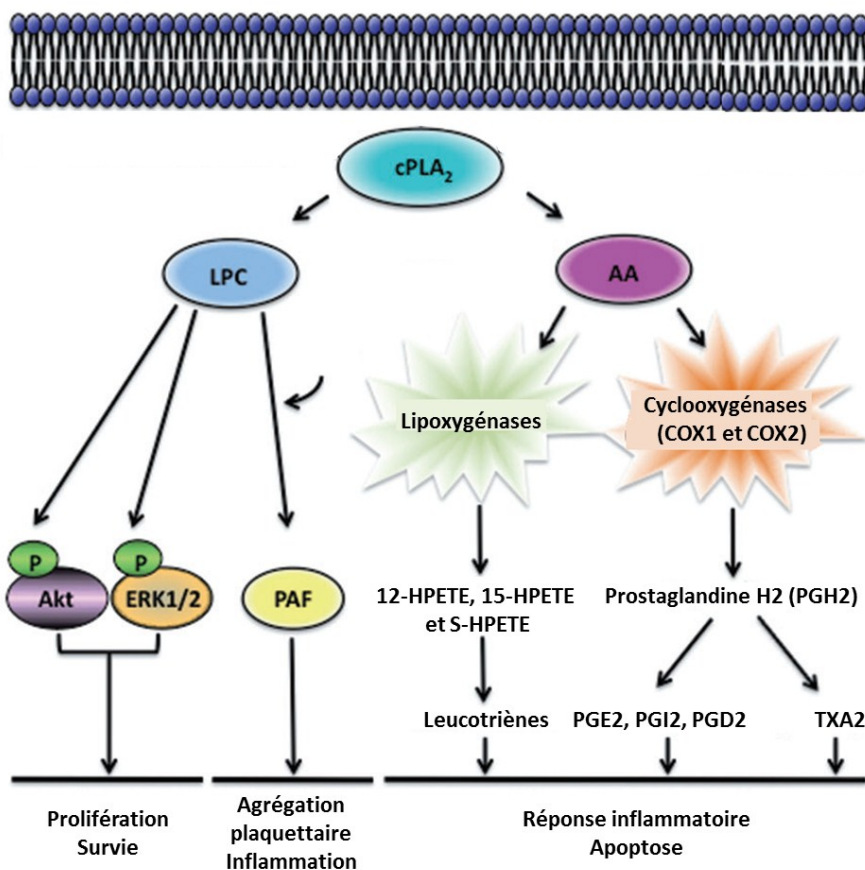


Figure 25 : Implication de la cPLA₂ dans la prolifération et l'apoptose cellulaires [Linkous, 2010]

Les différents produits issus de l'hydrolyse des PL membranaires par l'action catalytique de la cPLA₂ (AA et LPC) peuvent être convertis en divers médiateurs. Ces différentes molécules peuvent activer des voies de survie ou, au contraire, apoptotiques, activer la réaction inflammatoire ou exercer divers autres effets biologiques (en particulier, l'agrégation plaquettaire).

L'activation du récepteur p75 NGFR par le NGF conduit à une augmentation de l'expression de la cPLA₂. Cette augmentation pourrait être à l'origine de l'induction de l'apoptose favorisée par cette neurotrophine [MacEwan, 1996]. Le traitement de cellules NG 108-15 avec l'AACOCF3, un inhibiteur pharmacologique de la cPLA₂, réduit la formation des neurites, de manière concentration-dépendante [Smalheiser, 1996]. Au contraire, l'inhibition pharmacologique de la cPLA₂ par de faibles concentrations d'AACOCF3, de l'ordre de 10 µM, réduit fortement la mort des neurones de la région CA1 de l'hippocampe après déprivation en oxygène et glucose (un modèle d'ischémie cérébrale) [Arai, 2001]. Dans des cultures de neurones primaires, cet inhibiteur empêche à la fois l'activation de la caspase 3 et l'apoptose neuronale induites par l'exposition aux oligomères Aβ et à la protéine prion [Bate, 2004]. D'une façon similaire, dans les astrocytes, le HgMe²⁺ induit une production accrue de ROS, laquelle peut être inhibée par l'AACOCF3 [Shanker, 2003]. Dans les neurones en culture,

l'AACOCF3 raccourcit l'association entre la PCKy et la membrane plasmique, et peut influencer de cette manière la plasticité neuronale [Yagi, 2004]. Enfin, l'AACOCF3 bloque également la toxicité de la L-buthionine sulfoximine dans des cultures de cellules mésencéphaliques déplétées en glutathion [Kramer, 2004].

II – 3 d. cPLA₂, trafic membranaire et vésiculaire

La cPLA₂ est impliquée dans divers processus de trafics membranaires et vésiculaires, notamment ceux gouvernant les voies de l'endocytose et du Golgi [Brown, 2003].

Le rôle de la cPLA₂ dans la fonctionnalité membranaire et le trafic vésiculaire peut résulter de plusieurs mécanismes, qui ne sont pas forcément mutuellement exclusifs. Comme nous l'avons vu plus haut, les PLA₂ sont impliquées dans la génération de nombreuses molécules de signalisation, aux effets biologiques variés (en premier lieu, l'AA), lesquelles peuvent activer ou inhiber diverses voies de transduction. De plus, les PLA₂ peuvent agir directement sur la composition de la membrane de la cellule et de ses organites, *via* leur activité enzymatique. En effet, l'hydrolyse des PL et/ou la génération de lyso PL et d'AGL peuvent influencer les phénomènes membranaires, par exemple en modifiant la forme des membranes, la liaison de partenaires protéiques ou l'activité de protéines membranaires.

a) cPLA₂, fusion membranaire et exocytose

La fusion de vésicules avec les membranes cellulaires est impliquée dans une multitude de fonctions cellulaires, incluant la croissance de la cellule, la réparation membranaire, la croissance et la ramification axonales, la libération de neurotransmetteurs ou encore le recyclage de protéines membranaires. Les AGPI sont impliqués dans la régulation des phénomènes de fusion membranaire, et ceci de plusieurs manières.

Tout d'abord, ces AGPI peuvent moduler le fonctionnement de canaux ioniques membranaires impliqués dans la régulation de la fusion vésiculaire. Au niveau du pancréas exocrine, la cPLA₂, activée par la protéine G_{α3}, contrôle la croissance des vésicules sécrétoires *via* l'aquaporine 1 [Abu-Hamdah, 2004]. Dans les neurones, ce même phénomène survient au niveau des vésicules synaptiques, où l'aquaporine 6 est activée par la protéine G_{α0} [Jeremic, 2005].

De plus, les AGPI peuvent interagir avec le cytosquelette. Ainsi, le traitement de cellules chromaffines surrénaliennes bovines avec la taipoxine, une neurotoxine possédant une

activité PLA₂, provoque une fragmentation de la F-actine et augmente la libération de vésicules sécrétoires par ces cellules [Neco, 2003].

Enfin, les AGPI peuvent interagir directement avec des protéines impliquées dans la fusion des vésicules avec la membrane. Parmi ces protéines, les AGPI peuvent interagir avec la syntaxine, une protéine membranaire qui appartient à la famille des **SNARE** (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*). Un complexe de protéines de fusions impliquées dans l'exocytose de neurotransmetteurs comprendra typiquement la syntaxine I, le **SNAP25** (*synaptosomal-associated protein 25*) et la synaptobrevine. Ces trois protéines vont former un complexe à 4 hélices alpha enlacées entre les deux membranes en rapprochement, et vont probablement initier la fusion membranaire [Rizo, 2002]. L'administration d'AA sur des vésicules sécrétoires ou le traitement des membranes avec des PLA₂ sont suffisants pour potentialiser l'action du complexe SNARE [Darios, 2006]. Par contre, les PG ne présentent pas cette propriété, ce qui laisse supposer que ce sont les AGPI eux-mêmes qui interagissent directement avec le complexe et déclenchent la fusion vésiculaire [Connell, 2007].

La syntaxine 3, qui assure la fusion vésiculaire pendant la croissance neuronale, est sensible aux deux AGPI les plus représentés dans le SNC, à savoir l'AA et le DHA [Darios, 2006]. La syntaxine 1, qui est l'isoforme la plus représentée dans le cerveau, est également sensible à l'action de l'AA, ce qui indique un mécanisme d'activation conservé entre les isoformes [Connell, 2007] (Figure 26).

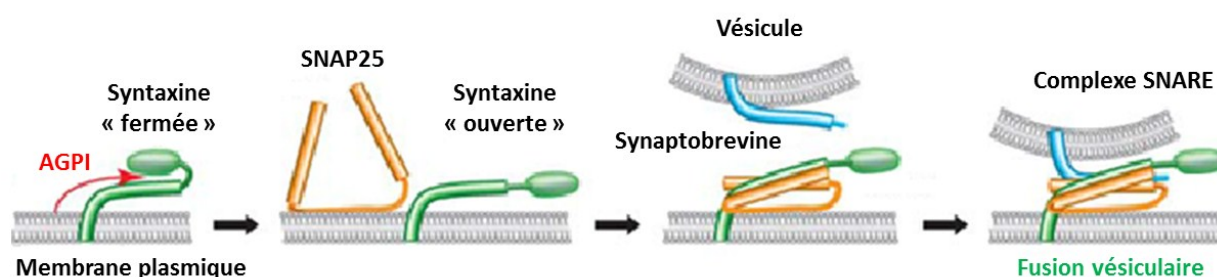


Figure 26 : Action des acides gras poly insaturés sur la syntaxine 1 [Darios, 2007]

La syntaxine se présente sous sa conformation « fermée » en l'absence d'AGPI. Ce dernier induit un changement de conformation de la syntaxine, conduisant à une ouverture de celle-ci, ce qui lui permet d'interagir avec SNAP25. Par le biais de cette interaction, SNAP25 adopte une structure en hélice α repliée. Cet hétérodimère s'associe avec la synaptobrevine présente sur la vésicule, ce qui permet la formation du complexe ternaire SNARE, lequel provoque la fusion de la vésicule avec la membrane.

Au repos, la syntaxine 1 interagit avec un partenaire cytosolique, la protéine Munc18, et forme avec elle un complexe inactif. Munc18 maintient alors la syntaxine 1 dans une conformation fermée et inactive [[Misura, 2000](#)]. L'AA est capable d'activer la syntaxine 1, même associée à Munc18 et provoque son engagement, avec les autres partenaires protéiques, dans la constitution d'un complexe SNARE [[Connell, 2007](#)].

b) cPLA₂ et trafic intracellulaire

La modification du contenu des membranes en PL, par l'action des PLA₂ et des acyltransférases, influence la courbure des membranes et peut réguler la génération de tubules et de vésicules [[San Pietro, 2009](#)] ([Figure 27](#)). A l'inverse, la composition en lipides, notamment en cholestérol, des membranes de certains organites comme l'appareil de Golgi peut en modifier la forme et la fonctionnalité. Ces phénomènes impliquent la cPLA₂ et d'autres éléments régulateurs comme la dynamine [[Grimmer, 2005](#)] ou l'annexine 6 [[Cubells, 2008](#)]. La cPLA₂ est également requise pour la genèse de tubules qui connectent les citernes du Golgi, ainsi que pour la régulation des transports de protéines à l'intérieur de celui-ci [[San Pietro, 2009](#)]. Lorsque le transport au niveau du Golgi est activé, la cPLA₂ est recrutée au niveau du pourtour des citernes du Golgi, ainsi que des tubules qui y sont attenants. Une translocation similaire du domaine C2 de la cPLA₂ lors des phénomènes de transport suggère l'implication d'une augmentation locale du Ca²⁺ intracellulaire, pouvant provenir des stocks calciques contenus dans le Golgi. La cPLA₂ est également associée au Golgi en dehors de toute tubulation de celui-ci. La régulation de la formation des tubules et du trafic à l'intérieur du Golgi semble spécifique à la cPLA₂. Par contre, la formation de vésicules et les autres voies de trafic peuvent être également régulées par d'autres mécanismes.

La cPLA₂ est également impliquée dans la régulation du trafic de nombreuses protéines au sein de divers systèmes cellulaires.

Par exemple, dans les cellules endothéliales en culture, la cPLA₂ régule le transport de protéines de jonction du Golgi vers la membrane plasmique, lorsque les cellules arrivent à confluence [[Regan-Klapisz, 2009](#)]. A ce stade, la cPLA₂ se transloque du cytoplasme vers le Golgi. La rupture des jonctions adhérentes inhibe cette relocalisation de l'enzyme. De même, l'inhibition de la cPLA₂ provoque une réduction de diverses protéines au niveau des jonctions intercellulaires et leur accumulation dans le Golgi.



Figure 27 : Effet de l'hydrolyse des phospholipides membranaires sur la courbure des membranes cellulaires

La $cPLA_2$ hydrolyse les PL membranaires, de forme cylindrique, au niveau de la position sn-2, produisant un AG libre et un lysoPL. L'accumulation de lyso PL, au niveau d'un feuillet de la membrane, va imprimer une courbure à cette dernière, en raison de la forme cônica de ces molécules et d'un encombrement stérique différent.

Par ailleurs, la transfection de la $cPLA_2\alpha$ dans des cellules LLC-PK1 inhibe l'adressage constitutif de l'aquaporine 2 à la membrane de ces cellules et désorganise l'architecture cisternale du Golgi (la $cPLA_2\alpha$ étant alors exprimée au niveau de cet organite) [Choukroun, 2000]. Aucune anomalie dans la structure et/ou le fonctionnement du Golgi n'a été remarquée chez les souris $cPLA_2^{-/-}$. Cependant, ces animaux développent un déficit dans le pouvoir de concentration des urines, lequel s'accroît avec le vieillissement. Cette anomalie résulte d'une distribution anormale de l'aquaporine 1 au niveau des cellules du tubule proximal du rein. Cette perturbation semble spécifique des cellules proximales, tandis que les cellules du tubule distal demeurent rigoureusement normales [Choukroun, 2000].

II – 3 e. $cPLA_2$, neurotransmission et excitotoxicité

La $cPLA_2$ est impliquée dans différents phénomènes de transmission synaptique et d'activation neuronale. Elle contribue à ce titre aux propriétés de plasticité des synapses, qui sont à la base des fonctions de mémorisation et d'apprentissage du SNC. En situation pathologique, une stimulation anormalement élevée des neurones conduit à des effets délétères définis sous le terme d'excitotoxicité. La $cPLA_2$ est également impliquée dans la genèse de ces troubles.

a) cPLA₂ et neurotransmission

Dans le cerveau de rat, la cPLA₂ est principalement retrouvée dans le versant post-synaptique des synapses, suggérant son implication dans les phénomènes de neurotransmission [[Massicotte, 2000](#)].

Dans les neurones, l'activité de la cPLA₂ et la libération d'AA sont régulées par les récepteurs à la dopamine, au glutamate, à la sérotonine, aux récepteurs purinergiques P2, aux récepteurs muscariniques, aux cytokines et aux facteurs de croissance. Cette régulation fait intervenir différents mécanismes de couplage Certains de ces couplages reposent sur une médiation par les protéines G. La stimulation de ces divers récepteurs module le niveau d'AA et de seconds messagers à l'intérieur des neurones [[Farooqui, 2006a](#)]. Ainsi, l'administration de NMDA au niveau de l'hippocampe chez le rat, *via* un système de microdialyse, entraîne l'activation de la cPLA₂ et l'expression de la COX2, ainsi que la production de PGE2 et de PGF2α [[Pepicelli, 2002](#)].

La potentialisation à long terme ([LTP](#)) et la dépression à long terme (*long term depression* ou [LTD](#)) constituent deux modèles électrophysiologiques témoignant de la plasticité de la synapse. Ils permettent à un réseau neuronal de stocker de manière durable des informations, suite à une stimulation appropriée [[Massicotte, 2000](#)]. Dans la plupart des régions du cerveau, ces deux formes de plasticité synaptique peuvent être induites par une dépolarisation des dendrites, l'amplitude de l'afflux de Ca²⁺ (et le niveau de stimulation de la synapse qui l'induit) constituant le déterminant majeur pour l'induction de la LTP ou de la LTD ([Figure 28](#)). Cet afflux de Ca²⁺ sur le versant post synaptique est assuré par les récepteurs au glutamate de type NMDA. La potentialisation de la synapse est quant à elle assurée par la densité et l'activité de récepteurs au glutamate de type AMPA [[Massicotte, 2000](#)]. Ainsi, une stimulation de la synapse entraînera un afflux de Ca²⁺ dans la cellule. Celui-ci provoquera l'activation de différentes kinases, dont les ERK1/2 ou la PKC-γ, qui peuvent à leur tour activer la cPLA₂ [[Cohen-Matsliah, 2007](#)]. La cPLA₂ ainsi activée peut modifier la composition de la membrane synaptique et libérer de l'AA, lequel peut à son tour être converti en ses métabolites d'aval [[Normandin, 1996](#)]. Ces modifications de l'environnement lipidique des récepteurs au glutamate de type AMPA peuvent moduler leur état d'affinité et leur réponse à leur ligand [[Chabot, 1998](#)]. Elles peuvent également modifier le trafic intracellulaire de ces récepteurs et leur distribution à la synapse, comme cela a été rapporté dans les cellules de Purkinje du cervelet [[Mashimo, 2008](#)]. Ainsi, la cPLA₂ est impliquée dans

ces phénomènes de plasticité synaptique en apparence opposés, la nature de la stimulation et d'autres facteurs associés déterminent l'instauration de la LTP ou de la LTD.

L'administration d'inhibiteurs pharmacologiques de PLA₂ (non spécifiques de la cPLA₂) chez les rats, altère leurs performances de mémoire à long terme évaluée par le test de la piscine de Morris [[Holscher, 1995](#)]. De même, cette inhibition non spécifique de l'activité PLA₂ compromet les fonctions mnésiques des animaux dans un test d'évitement passif [[Schaeffer, 2007](#)]. L'emploi d'inhibiteurs plus spécifiques de la cPLA₂ produit des effets similaires, à savoir une diminution des performances des animaux soumis au labyrinthe en Y [[Fujita, 2000](#)].

En revanche, l'inactivation spécifique du gène de la cPLA₂ (souris KO) n'a aucune conséquence néfaste sur les performances d'apprentissage et de mémoire de ces animaux, évalués par la piscine de Morris [[Sanchez-Mejia, 2008](#)]. D'autres études apparaissent donc indispensables pour déterminer les rôles exacts des isoformes de la PLA₂ (groupe IVA / cPLA₂, groupe VIA / iPLA₂, et autres) dans les mécanismes biochimiques soutenant les fonctions comportementales et mémorielles.

Enfin le blocage de la cPLA₂ dans le système rétinotectal du *zebra fish* aboutit à une arborisation neuronale plus ample avec une dynamique plus rapide de façon similaire à ce qui est obtenu avec le blocage des récepteurs NMDA [[Leu, 2010](#)]. Ces résultats appuient fortement le rôle de la cPLA₂ à la fois dans le développement du système nerveux et dans les voies de transduction liées aux récepteurs NMDA.

Les astrocytes sont également capables de moduler la transmission synaptique par le biais de leurs récepteurs aux nucléotides P2Y, encore appelés récepteurs métabotropiques. Ces récepteurs couplés aux protéines G participent à la régulation de la transmission de l'influx nerveux au niveau de la synapse. En effet, les vésicules synaptiques contiennent d'importantes quantités d'ATP, qui sont libérées dans la synapse en même temps que les neurotransmetteurs lors de l'excitation neuronale [[Burnstock, 1997](#)]. L'activation de ces récepteurs par les purines induit une augmentation de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire, ainsi que l'activation de nombreuses voies de signalisation au sein de ces cellules [[Weisman, 1999](#)]. Ainsi, l'ATP et l'UTP peuvent stimuler la libération d'AA au sein des astrocytes et cette production d'AA impliquerait l'activation de la cPLA₂, *via* l'influx en Ca²⁺, la kinase ERK et la PKC [[Xu, 2002](#)]. Ainsi, la cPLA₂ pourrait participer à la communication entre cellules nerveuses et gliales.

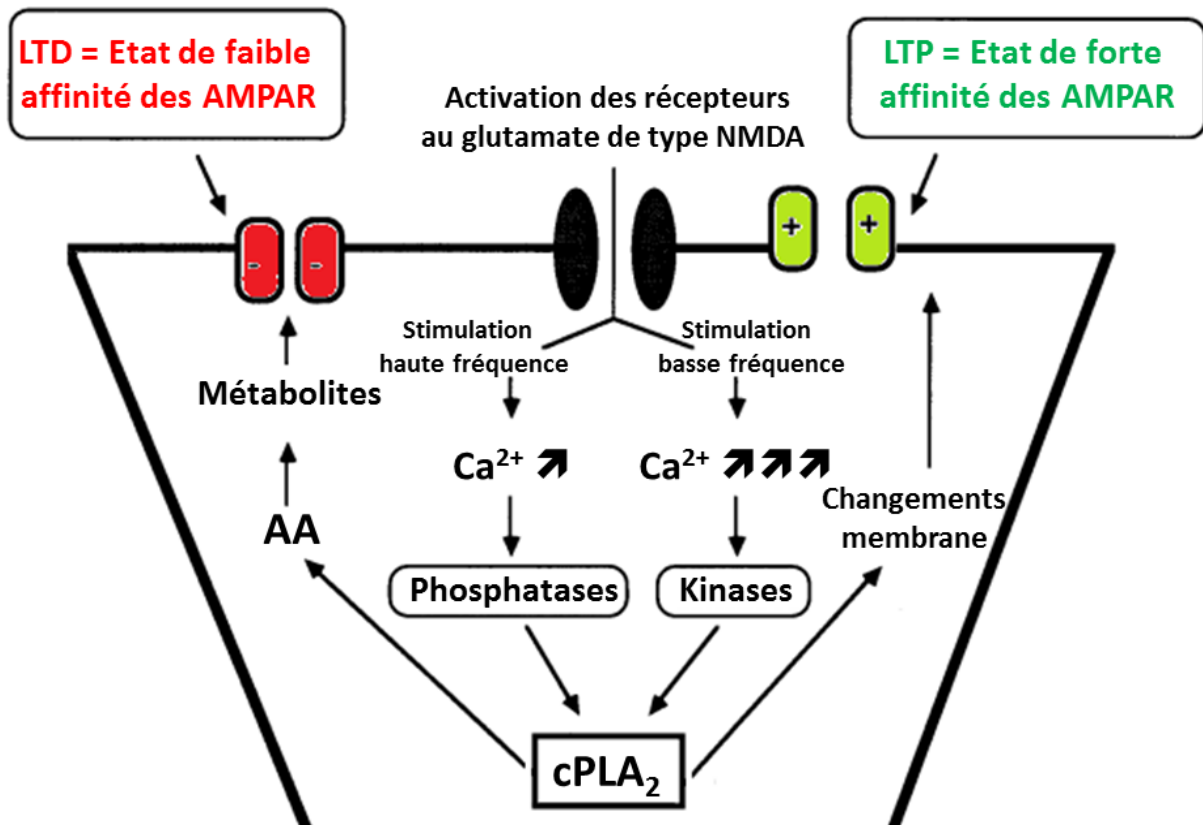


Figure 28 : Modèle biochimique intégrant la modulation de la plasticité synaptique par la cPLA₂ et la cascade de l'acide arachidonique [Chabot, 1998]

Ce modèle biochimique intègre la cPLA₂ et les métabolites de l'AA, ainsi que les événements de phosphorylation et de déphosphorylation dans l'établissement de la LTP et de la LTD. La stimulation des récepteurs NMDA au glutamate provoque un afflux de Ca²⁺ dans la cellule, dont l'amplitude dépend de la fréquence du stimulus. Selon l'augmentation de la concentration calcique intra cellulaire, différentes kinases et phosphatases seront activées, agissant de manière opposée sur la cPLA₂. L'hydrolyse des PL et la génération d'AA et de ses métabolites modifie la composition lipidique de la membrane synaptique. Ceci influence l'état d'affinité des récepteurs au glutamate de type AMPA et donc l'excitabilité de la synapse. De plus, l'activation de la cPLA₂ peut modifier le trafic des récepteurs AMPA vers la membrane synaptique.

Cette modulation de la réceptivité de la synapse par sa stimulation préalable constitue la base biochimique de la plasticité synaptique et le substratum neurophysiologique des phénomènes de mémoire.

Cette activation des récepteurs P2Y est également impliquée dans des phénomènes pathologiques, en particulier la réaction astrogliale observée dans de multiples maladies neurodégénératives, dont la MA [James, 2002].

b) cPLA₂ et excitotoxicité

L'AA possède la propriété physiologique d'augmenter l'activation neuronale. En situation pathologique, cette activation des cellules peut atteindre des niveaux anormaux, jusqu'à entraîner des conséquences délétères, pouvant aboutir à la mort de la cellule. Cette

hyperactivité neuronale peut être auto-entretenu, voire majorée, par divers mécanismes de rétrocontrôle positif, auxquels peut participer la cPLA₂.

L'activation par stimulation électrique des neurones du gyrus denté augmente l'activité PLA₂ et entraîne la libération d'AA [Clements, 1991]. De même, l'hyperactivation neuronale, résultant d'une stimulation électrique de l'hippocampe, s'accompagne de la surexpression de la cPLA₂ et de la COX2. Cette observation souligne l'implication de la voie de l'AA dans la médiation des phénomènes d'excitotoxicité [Tu, 2003].

De façon similaire, l'activation de neurones en culture par le glutamate entraîne une augmentation de l'activité PLA₂ et des niveaux d'AA libéré, cet effet étant Ca²⁺-dépendant. Cette augmentation de l'activité PLA₂ résulte de l'activation des récepteurs NMDA et AMPA [Stella, 1995]. Le traitement des neurones par le NMDA entraîne également une augmentation de la production d'AA [Dumuis, 1988].

Des composés comme la 1-méthyl-4-phényl-1.2.3.6-tétrahydropyridine (MPTP) ou la 6-OH-dopamine peuvent entraîner des phénomènes d'hyperactivation du neurone, dénommés excitotoxicité, conduisant à la neurodégénérescence. De telles substances peuvent engendrer des symptômes semblables à ceux de la maladie de Parkinson, lorsqu'ils intéressent le *locus niger*. La quinacrine, un inhibiteur non sélectif des PLA₂, peut réduire significativement la déplétion en dopamine dans des modèles murins de Parkinson [Tariq, 2001]. De même, des souris cPLA₂^{-/-} présentent une moindre déplétion en dopamine, induite par le MPTP, par rapport aux animaux contrôles, ce qui souligne l'implication de la voie de l'AA dans la médiation de la toxicité de ce composé [Klivenyi, 1998].

L'acide kainique, un agoniste des récepteurs glutamatergiques, constitue un autre agent neurotoxique, qui induit des phénomènes épileptiques et de neurodégénérescence, lorsqu'il est administré à des rongeurs par voie intracérébrale ou systémique. L'injection de kaïnate dans le ventricule latéral chez le rat entraîne une majoration de l'expression de la cPLA₂, à 3 et 7 jours post-injection [Sandhya, 1998]. L'administration de quinacrine atténue cette surexpression de la cPLA₂ [Ong, 2003] et réduit la perte neuronale [Sandhya, 1998].

Enfin, il a été montré que l'activité neuronale pouvait augmenter *per se* la production et la libération de peptide Aβ [Cirrito, 2005], lequel va à son tour augmenter l'activation de la cPLA₂ et la libération d'AA au sein des neurones [Malaplate-Armand, 2006] [Sanchez-Mejia, 2008]. Il pourrait donc s'établir un véritable cercle vicieux : l'excitotoxicité, résultant d'une exposition des neurones au peptide Aβ, induit une production accrue de ce même peptide, ce qui majore ainsi le stimulus délétère pour les cellules.

II – 3 f. cPLA₂ et maladie d'Alzheimer

Comme nous l'avons vu précédemment, les oligomères solubles de peptide A β exercent sur les neurones des effets cyto- et synaptotoxiques par divers mécanismes, très probablement associés, notamment la dérégulation de l'homéostasie calcique, l'activation de diverses voies de signalisation intra cellulaires, la dysfonction mitochondriale et la production de ROS. Par ailleurs, ces mêmes oligomères activent les astrocytes et les cellules de la microglie, conduisant à la production de médiateurs pro inflammatoires [[Lee J, 2011](#)] [[Stephenson, 1999](#)]. La cPLA₂ pourrait donc être impliquée dans ces divers processus, et constituer un des médiateurs de l'action toxique des oligomères A β .

a) Activation de la cPLA₂ au cours de la MA

Diverses études soulignent l'implication de la cPLA₂ dans la médiation des effets délétères du peptide A β dans de multiples modèles cellulaires. Dans des péricytes rétiens en culture primaire, l'exposition aux peptides A β (1-42) et A β (25-35) pendant 24 h entraîne l'activation de la cPLA₂ et sa translocation au niveau de la membrane cellulaire [[Anfuso, 2004](#)]. Dans ces mêmes cellules, l'inhibition des MAPK (ERK1/2) empêche la phosphorylation de la cPLA₂ en réponse à l'exposition au peptide A β (25-35) [[Nicotra, 2005](#)]. Ceci suggère l'implication de la voie des MAPK dans l'activation de la cPLA₂ au cours de la MA. Cette hypothèse a été largement confirmée par notre équipe, puisque le laboratoire Lipidomix a montré que le traitement de cultures de neurones corticaux de rat par des peptides A β (1-40) et A β (1-42) solubles entraîne une libération précoce et transitoire d'AA, dépendante du Ca²⁺, associée à une relocalisation de la cPLA₂ au niveau de la membrane cellulaire [[Kriem, 2005](#)] ([Figure 29](#)). De plus, le traitement des cellules avec des inhibiteurs pharmacologiques ou des ASO dirigés contre la cPLA₂ empêche cette production d'AA et protège ces cellules contre l'apoptose induite par les oligomères A β (1-42). Par ailleurs, des inhibiteurs de la PKC, de p38 et de la voie ERK/MEK, qui sont impliquées dans la phosphorylation et l'activation de la cPLA₂, protègent les neurones contre l'apoptose induite par les oligomères A β . De plus, l'exposition au peptide A β de cellules non neuronales, telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales, provoque une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire et une activation de la PKC [[Gentile, 2004](#)]. Cette observation souligne que le peptide A β peut déclencher divers événements intracellulaires convergeant vers la translocation membranaire et l'activation de la cPLA₂. Par ailleurs, le peptide A β peut également activer la cPLA₂ d'une manière indépendante de l'afflux calcique. En effet, il a été montré que le peptide A β (1-42)

induit une production accrue de ROS au niveau de neurones corticaux en culture primaire *via* l'activation de la NADPH oxydase [He, 2011] [Shelat, 2008] (Figure 29). Les ROS ainsi générées entraînent l'activation de la kinase ERK1/2, qui phosphoryle et active à son tour la cPLA₂. Là encore, la médiation des effets toxiques du peptide Aβ soluble par la cPLA₂ implique la kinase ERK1/2, ce qui rejoint les observations publiées par notre équipe [Kriem, 2005]. Cette kinase apparaît actuellement comme un acteur critique de l'homéostasie et de la plasticité des neurones. Son activation excessive pourrait ainsi conduire aux phénomènes neurodégénératifs [Colucci-D'Amato, 2003].

Diverses altérations du métabolisme des lipides ont été mises en évidence dans des souris transgéniques modèles de MA, de la lignée hAPP-J20 [Sanchez-Mejia, 2008]. Ces souris ont également permis de montrer l'implication critique de la cPLA₂ dans les phénomènes neurodégénératifs *in vivo*. En effet, des niveaux accrus d'AA et de ses divers métabolites, en particulier les PG, ont été mis en évidence dans le cerveau de ces souris hAPP-J20 [Sanchez-Mejia, 2008]. Cette augmentation des PG pourrait résulter d'une majoration de l'AA métabolisé par la COX-2. En effet, l'AA libéré à partir des PL membranaires peut accroître la transcription du gène de la COX-2, majorant le niveau d'expression de l'enzyme et, par voie de conséquence, la conversion de l'AA en PG [Fiala, 2002]. Par ailleurs, une augmentation de l'activation de la cPLA₂ a été mise en évidence dans l'hippocampe de ces souris transgéniques. Cette structure cérébrale est particulièrement impliquée dans les phénomènes de mémorisation et d'apprentissage. On pouvait alors suspecter un lien entre l'activation de cette enzyme et les effets délétères sur les performances comportementales de ces animaux. Cette suspicion a été confirmée lorsque des souris hAPP-J20 ont été croisées avec des souris cPLA₂^{-/-}, l'inactivation constitutive du gène de la cPLA₂ protégeant totalement les animaux hybrides contre les déficits mnésiques et d'apprentissage observés chez les animaux dont les gènes cPLA₂ étaient fonctionnels [Sanchez-Mejia, 2008].

Le statut lipidique de la membrane cellulaire, notamment sa teneur en cholestérol, modifie sa réceptivité à l'action toxique du peptide Aβ. En effet, la squalostatine ou la simvastatine, deux inhibiteurs de la HMG-CoA-réductase, enzyme impliquée dans la synthèse du cholestérol, peuvent réduire le niveau d'activation de la cPLA₂ et la production de PGE2 induits par le peptide Aβ, de même que la mortalité neuronale qui en découle [Bate, 2007]. Ces traitements protecteurs ne modifient pas la liaison du peptide Aβ aux

neurones, mais réduisent uniquement l'activation de la cPLA₂ et la libération d'AA. De plus, la déplétion de la membrane en cholestérol empêche la colocalisation des oligomères Aβ et de la cPLA₂ au niveau de zones membranaires appelées « radeaux lipidiques », riches en cavéoline 1. A l'inverse, l'enrichissement des membranes cellulaires en cholestérol exogène annule cette protection [Sponne, 2004]. Ces radeaux lipidiques membranaires pourraient donc contenir d'autres médiateurs de la toxicité du peptide Aβ, impliqués dans l'activation de la cPLA₂, parmi lesquels on peut citer les récepteurs NMDA au glutamate, ainsi que la protéine PrP^c [Rushworth, 2010].

b) Effets délétères de la cPLA₂ et neurotoxicité

Diverses altérations du métabolisme des PL dans le SNC ont été rapportées au cours de la MA [Wells, 1995]. Parmi ces altérations, des niveaux accrus de phosphomonoesters (PME) ont été mis en évidence par imagerie de résonance magnétique (RMN) fonctionnelle au ³¹P et ceci dès les stades précoces de la maladie. A un stade plus avancé, une augmentation de phosphodiester (PDE) tels que la glycérophosphoéthanolamine et la glycérophosphorylcholine, est détectée dans le cerveau des patients [Brown, 1989]. Les PME constituent des intermédiaires du métabolisme des PL tandis que les PDE constituent une de leurs formes de dégradation. Ainsi, le métabolisme des PL est perturbé au cours de la MA, ce qui implique nécessairement les enzymes qui le régulent, dont la cPLA₂ [Sanchez-Mejia, 2010]. Le peptide Aβ(25-35) peut activer la cPLA₂, la PLC et la PLD dans des lignées de neuroblastome humain LAN-2. Plus particulièrement, l'activation de la cPLA₂ après exposition de ces cellules au peptide Aβ(25-35) dépend de stocks calciques mobilisés à partir de réserves sensibles à la ryanodine, et non de stocks activés par l'IP3 [Kanfer, 1996].

Cette activation excessive de la cPLA₂ par le peptide Aβ soluble pourrait augmenter la destruction des PL membranaires. Dans les premiers stades de la maladie, cette destruction peut être compensée par une synthèse accrue de PL et un *turn over* accéléré de ces derniers. A des stades plus avancés, l'action hydrolytique accrue de la cPLA₂ dépasse les capacités de régénération de la cellule. La demande énergétique supplémentaire réclamée par la synthèse des PL n'est plus assurée par la cellule, ce qui retentit sur ses autres fonctions indispensables à la survie, notamment l'activité Na⁺/K⁺ ATPase, les pompes ioniques et le transport axoplasmique [Garnham, 2002]. Par ailleurs, le non remplacement des PL membranaires hydrolysés de manière excessive par la cPLA₂ peut modifier les paramètres physicochimiques de la membrane neuronale et en compromettre la fonctionnalité. Ainsi,

l'incubation d'astrocytes de la lignée DITNC en présence de peptide A β (1-42) induit un changement profond du degré d'organisation moléculaire de leurs membranes plasmiques. Cette modification membranaire peut être supprimée en administrant un inhibiteur de la NADPH oxydase ou de la cPLA₂ aux cellules avant l'exposition au peptide A β [Hicks, 2008].

Enfin, la production accrue d'AA et de ses métabolites d'aval, ainsi que de lysoPL, peut à son tour activer d'autres voies de signalisations délétères. Notre équipe a en effet montré que l'activation de la cPLA₂ en réponse au peptide A β entraîne l'activation des sphingomyélinases acides et neutres (A-SMases et N-SMases, respectivement) [Malaplate-Armand, 2006]. Ces enzymes produisent des céramides dont les effets pro apoptotiques peuvent participer aux phénomènes de mort neuronale induits par le peptide A β [He, 2010] (Figure 29).

c) Surexpression et activation de la cPLA₂ chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer

Une surexpression de la cPLA₂ a été mise en évidence au cours de la MA. Des études immunohistochimiques ont rapporté une augmentation importante de l'immunoréactivité de la cPLA₂, associée à des astrocytes activés (exprimant la *glial fibrillary acidic protein* ou GFAP) au sein de cerveaux MA [Stephenson, 1996]. Dans un autre travail, une analyse par *micro array* de l'expression de plus de 12600 gènes, au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe, a rapporté une majoration de l'expression de la cPLA₂ et de la COX₂ chez les patients, par rapport aux sujets contrôles. Cette surexpression de ces enzymes de la voie de l'AA est associée à une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose et dans l'inflammation. A l'inverse, les facteurs de transcription et les médiateurs neurotrophiques tendent à être sous exprimés [Colangelo, 2002]. L'origine de cette surexpression est inconnue mais elle pourrait survenir progressivement au cours du vieillissement et favoriser l'évolution vers la MA. En plus de sa surexpression, une augmentation de la phosphorylation de la cPLA₂ sur la Ser⁵⁰⁵ a été également décrite au niveau de l'hippocampe de patients atteints de MA, par rapport à des sujets témoins ou à des malades atteints de démence fronto temporale [Sanchez-Mejia, 2008]. La phosphorylation de cette sérine constitue un élément important de régulation de l'activation de la cPLA₂ et souligne encore son implication dans la pathogenèse de la MA. Par ailleurs, elle rejoint la constatation effectuée sur les souris transgéniques hAPP-J20 modèles de MA [Sanchez-Mejia, 2008]. Une augmentation chronique et progressive de l'expression du

gène de la cPLA₂ entraînerait une augmentation conséquente de son activité enzymatique. Cette surexpression de la cPLA₂ pourrait favoriser l'évolution du patient vers la MA, *via* la perturbation des diverses fonctions de cette enzyme, tant physiologiques que pathologiques, que nous avons examinées dans ce chapitre.

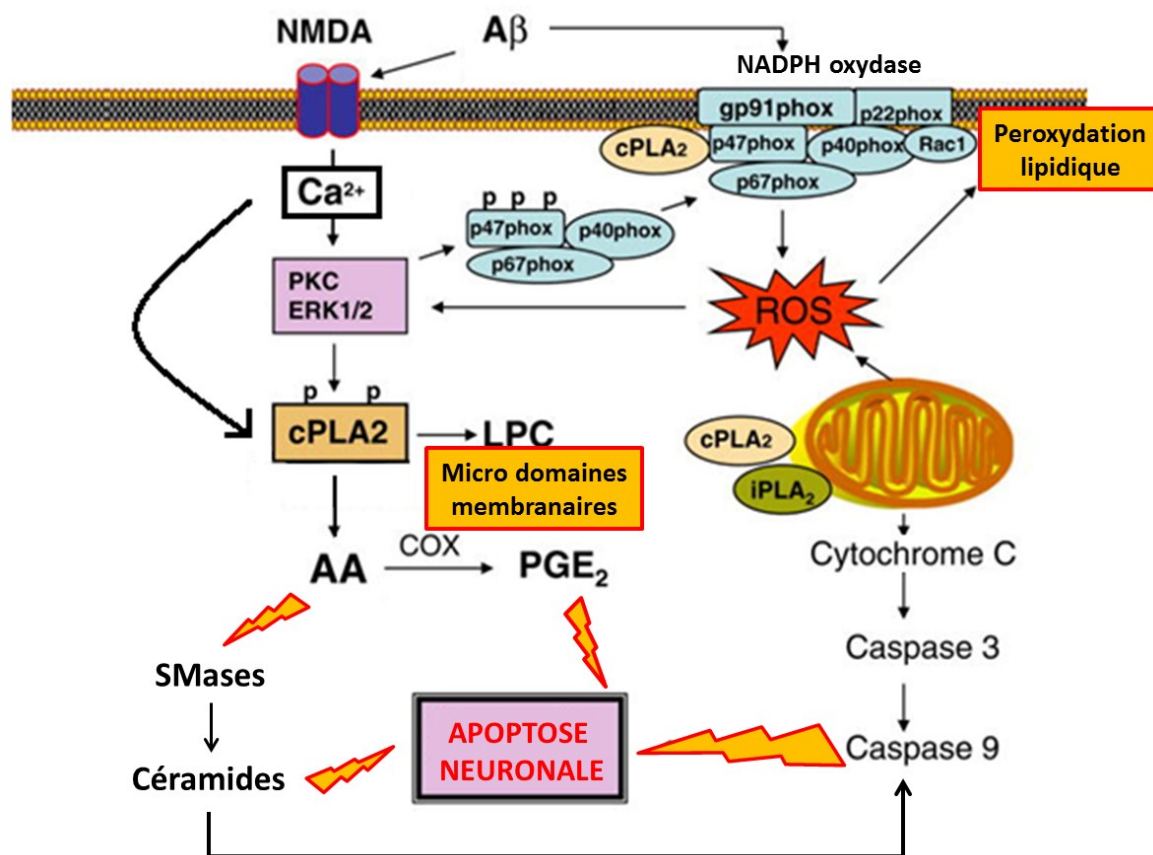


Figure 29 : Implication de la cPLA₂ dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Voies d'activation potentielles et principaux mécanismes effecteurs [Simonyi, 2010]

L'interaction des oligomères solubles de peptide Aβ avec leur(s) récepteur(s) potentiel(s) sur la membrane cellulaire induit l'afflux de Ca²⁺ à l'intérieur de la cellule et entraîne l'activation de la NADPH oxydase. L'augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire et la génération de ROS par la NADPH oxydase activent ERK1/2 et la PKC, qui vont phosphoryler la cPLA₂. L'afflux de Ca²⁺ et cette phosphorylation activent la cPLA₂, qui hydrolyse les PL membranaires en libérant de l'AA et des lysoPL (LPC). L'hydrolyse des PL membranaires déstabilise les microdomaines membranaires et altère l'organisation et la fonctionnalité de la membrane. De même, la peroxydation des lipides membranaires par les ROS compromet son intégrité. L'AA libéré par la cPLA₂ peut à son tour activer les SMases ou être converti en PG et LT par les COX et les LOX, respectivement. Les SMases produisent des céramides pro apoptotiques, qui vont à leur tour activer les caspases, impliquées dans la mort cellulaire. Enfin, la cPLA₂ peut se relocaliser au niveau de la membrane mitochondriale et contribuer à son dysfonctionnement, ce qui induit une production accrue de ROS. Ces différents événements pathologiques convergent vers l'apoptose neuronale.

II – 4. Inhibiteurs thérapeutiques de la cPLA₂ : état actuel des travaux

Comme nous l'avons décrit plus haut, les PLA₂ remplissent de nombreuses fonctions physiologiques au sein des cellules, mais certaines d'entre elles sont également impliquées dans des voies pathogènes. De ce fait, il est très important de développer des inhibiteurs spécifiques des isoformes de PLA₂ impliquées dans les dits phénomènes délétères. En ce qui concerne la MA, l'inhibition spécifique de la cPLA₂ peut constituer une approche préventive et/ou curative intéressante, au regard des observations expérimentales et cliniques rapportées ci-dessus. Toutefois, il est difficile de développer des inhibiteurs sélectifs pour des isoformes spécifiques de PLA₂. En effet, de nombreux inhibiteurs initialement décrits comme spécifiques ont ensuite été présentés comme agissant sur d'autres isoformes. Par exemple, l'AA-trifluorométhylketone ([AACOCF3](#)) présente une forte affinité pour la cPLA₂ par rapport aux isoformes de PLA₂. Mais cette molécule inhibe également l'activité d'autres enzymes comme la iPLA₂, la thromboxane synthase et la FAAH.

II – 4 a. Inhibiteurs « classiques » de la cPLA₂

Ces inhibiteurs pharmacologiques ont été les premiers à être développés. Leur spécificité sur la cPLA₂ n'est pas absolue. Ces molécules présentent ainsi une toxicité *in vitro* et *in vivo* non négligeable. De même, leur pouvoir inhibiteur n'est pas suffisamment élevé pour envisager leur utilisation en clinique. De ce fait, ces inhibiteurs ont été principalement utilisés dans des travaux sur des cellules en culture et rarement chez l'animal entier.

a) Arachidonyl Trifluoromethyl Ketone (AACOCF3)

L'[AACOCF3](#) constitue un puissant inhibiteur de la cPLA₂ ([Figure 30](#)). Des études en RMN ont montré que la chaîne carbonée de la molécule se liait à une poche hydrophobe de la cPLA₂, et que le groupement carbonyle se liait de manière covalente à la sérine 008 au niveau du site actif de l'enzyme. Cette liaison entraîne la génération d'un oxoanion hémicétal, qui va interagir avec un groupement p au niveau de l'enzyme [[Trimble, 1993](#)]. L'AACOCF3 inhibe la cPLA₂ avec une efficacité 500 fois supérieure à la sPLA₂ [[Trimble, 1993](#)], ce qui souligne sa spécificité pour la cPLA₂.

En raison de ses propriétés physicochimiques, l'AACOCF3 peut pénétrer à l'intérieur des membranes cellulaires. A des concentrations comprises entre 5 et 20 µM, elle peut totalement inhiber la libération d'AA au niveau de plaquettes stimulées par la thrombine, de

monocytes humains stimulés par des ionophores calciques ou encore, des cellules mésangiales soumises à l'IL-1 [Gronich, 1994]. L'AACOFC3 inhibe les cPLA₂ et iPLA₂ issues de cerveau bovin, de manière dose-dépendante, avec des IC₅₀ comprises entre 1,5 et 6 μM, respectivement.

L'AACOFC3 est décrite comme un inhibiteur spécifique de la cPLA₂, mais des études réalisées sur des cellules non neuronales indiquent que cet inhibiteur pourrait également agir sur d'autres enzymes comme les COX [Riendeau, 1994] et les LOX [Cummins, 2000]. L'AACOFC3 apparaît donc comme un inhibiteur puissant, mais non sélectif, de la cPLA₂.

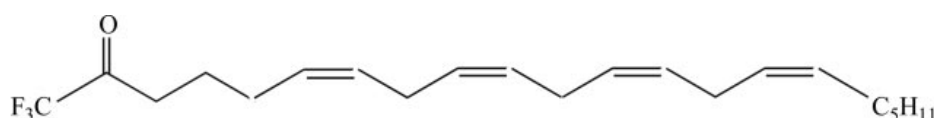


Figure 30 : Structure chimique de l'arachidonyl trifluorométhyle ketone

b) Méthyl Arachidonyl Fluorophosphate (MAFP)

Le [MAFP](#) est un inhibiteur irréversible de la cPLA₂, avec des IC₅₀ avoisinant les 0,5 μM, et il ne présente aucun effet sur les sPLA₂ ([Figure 31](#)). Le MAFP inhibe l'activité catalytique de la cPLA₂ en réagissant avec les résidus sérine du site actif. Le MAFP inhibe également l'iPLA₂ contenue dans le cerveau de bœuf, d'une manière dose dépendante, avec un IC₅₀ à 0,75 μM. A 5 μM, le MAFP inhibe totalement l'activité iPLA₂ de cerveau bovin.

Le MAFP provoque l'inhibition irréversible de l'hydrolyse enzymatique de l'arachidonyl éthanolamine (anandamine) par la fatty amide hydrolase. Le MAFP pourrait donc constituer un antagoniste irréversible des récepteurs CB₁ aux EC [[Fernando, 1997](#)].



Figure 31 : Structure chimique du méthyl arachidonyl fluorophosphate

c) Bromoénol Lactone (BEL)

La [BEL](#) (ou 6-(bromométhylène)-tétrahydro-3-(1-naphtenyl)-2H-pyran-2-one) constitue un puissant inhibiteur de l'iPLA₂ et de la PlsEtnPLA₂ de cerveaux de bœuf, avec des IC₅₀ de 60 et 40 nM, respectivement [[Balsinde, 2002a](#)] ([Figure 32](#)). La BEL présente un certain degré de ressemblance avec les plasmalogènes. A de très hautes concentrations (de l'ordre de 500 μM), la BEL inhibe à la fois l'iPLA₂ et la cPLA₂.

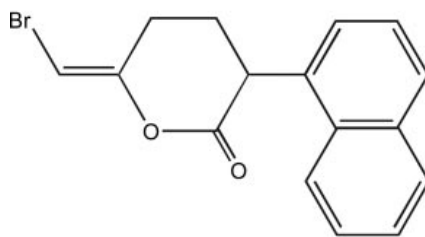


Figure 32 : Structure chimique de la bromoenol lactone

II – 4 b. Nouveaux inhibiteurs de la cPLA₂

A côté des premiers inhibiteurs pharmacologiques, de nouvelles molécules ont été plus récemment développées. Leur haute spécificité et leur affinité élevée pour la cPLA₂ permettent d'envisager une utilisation chez l'humain. L'application potentielle aux patients atteints de MA des travaux présentés dans ce document fera sans nul doute appel à de tels médicaments.

a) Inhibiteurs dérivés de la pyrrolidine

Les composés dérivés de la pyrrolidine inhibent fortement la cPLA₂ *in vivo* et bloquent la libération d'AA en réponse aux ionophores calciques dans des cellules non neuronales [[Seno, 2000](#)].

L'inhibiteur le plus puissant de ce groupe est représenté par la pyrrolidine-1 ([Figure 33 gauche](#)). Dans un essai enzymatique fluorométrique, la pyrrolidine-1 inhibe la cPLA₂ d'une manière dose-dépendante, avec des IC₅₀ de 0,18 μM. Dans un système expérimental de micelles mixtes, ce même composé présente une action inhibitrice avec un IC₅₀ de 1,8 μM. La variation de l'IC₅₀ entre ces deux expériences peut résulter de différences dans la répartition des concentrations de la pyrrolidine-1 au niveau de l'interface. Le traitement de cellules CHO avec la pyrrolidine-1 entraîne une inhibition importante de la libération d'AA induite par le A23187, avec une IC₅₀ comprise entre 0,2 et 0,5 μM. Le degré d'inhibition avoisine les 100% lorsque la concentration de pyrrolidine-1 atteint 4 à 10 μM [[Ghomashchi, 2001](#)]. De la même manière, le traitement de cellules rénales canines Madin-Darby avec la pyrrolidine-1 réduit la libération d'AA en réponse à l'ATP, avec une IC₅₀ de 0,8 μM. Il convient de noter que la pyrrolidine-1 peut également inhiber la cPLA₂γ et la iPLA₂β à très fortes concentrations, mais qu'elle demeure sans effet sur les sPLA₂.

La pyrrophénone, un dérivé triphénylméthyl thioéther de la pyrrolidine, possède un pouvoir inhibiteur sur la cPLA₂ 39 fois supérieur à celui de la pyrrolidine-1 (K_i 4,2 nM) [[Ono, 2002](#)] ([Figure 33 droite](#)). L'administration de dithiocarbamate de pyrrolidine à des rats protège ces

derniers contre l'excitotoxicité induite par le kaïnate [Shin, 2004]. Des études *in vitro* montrent que la pyrrophénone peut développer de puissants effets anti inflammatoires [Ono, 2002]. Pour l'instant, aucun inhibiteur de PLA₂ contenant des dérivés de la pyrrolidine n'a été administré sur un modèle de pathologie neurologique et leurs effets thérapeutiques potentiels, de même que leurs effets secondaires et leur demi-vie plasmatique, demeurent de ce fait inconnus.

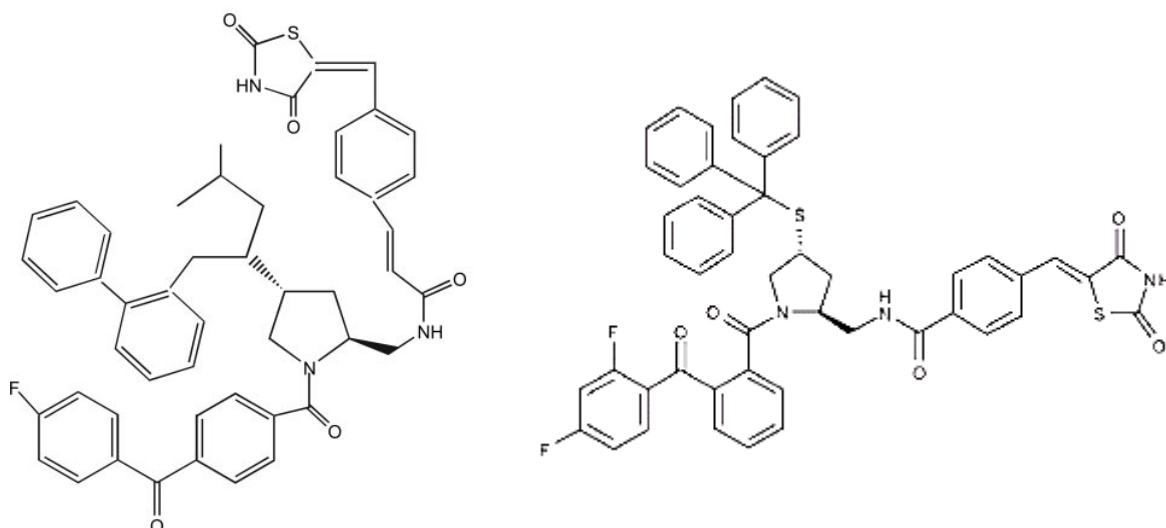


Figure 33 : Structures chimiques de la pyrrolidine-1 (à gauche) et de la pyrrophénone (à droite)

b) Benzènesulfonamides et alkobenzamidines

Le benzènesulfonamide et son dérivé pipéridine constituent les inhibiteurs les plus puissants de l'activité PLA₂ associée à la membrane des cellules musculaires cardiaques, avec des IC₅₀ de 28 et 9 nM, respectivement [Oinuma, 1991] (Figure 34 gauche). L'injection IV de ces composés chez le rat protège leur myocarde contre les lésions induites par l'ischémie. Ces produits sont relativement stables dans le plasma, avec des demi-vies comprises entre 1 et 2 h. Pour l'instant, il n'existe pas de données concernant leur capacité à traverser la BHE.

Les 4-alkobenzamidines ont été testées comme inhibiteurs des PLA₂ et ont démontré une action inhibitrice sur les PLA₂ contenues dans le suc pancréatique de bœuf et les PLA₂ plaquettaires chez le lapin, avec des IC₅₀ de 3 et 5 µM, respectivement [Aitdafoun, 1996] (Figure 34 droite). La 4-tétradécyloxybenzamidine possède un effet *in vivo* contre l'œdème induit par l'administration de carragénane chez le rat [Aitdafoun, 1996].

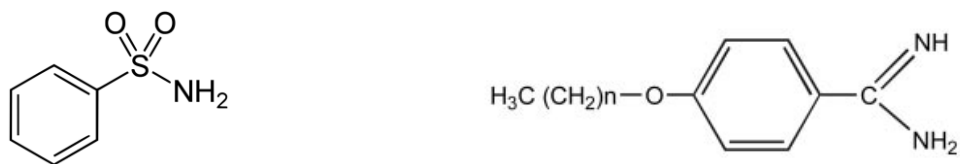


Figure 34 : Structures chimiques du benzènesulfonamide (à gauche) et de la 4-alkoxybenzamide (à droite)

c) Acide 3-(pyrrol)-2-propionique

Différents composés dérivés de cet acide ont été proposés comme inhibiteurs de la cPLA₂ et ont été testés sur les plaquettes sanguines, avec des IC₅₀ allant de 0,5 à 10 μM. Leurs effets sur d'autres PLA₂ restent à démontrer [Lehr, 2000] (Figure 35). Ces composés n'ont pour l'instant pas été validés sur les isoformes de la cPLA₂ dans le cerveau. De même, aucune expérience d'administration sur un modèle animal de pathologie neurologique n'a pour l'instant été entreprise. Ainsi, peu de données sont disponibles concernant leur tolérance, demi-vie plasmatique, toxicité et effets indésirables potentiels. Enfin, la capacité de ces composés à franchir la BHE demeure hypothétique.

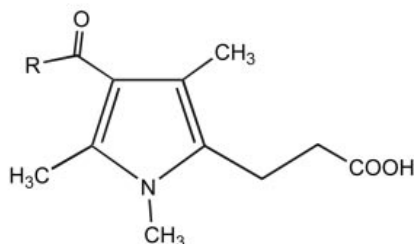


Figure 35 : Structure chimique de l'acide 3-(pyrrol)-2-propionique

d) 2-Oxoamide et propan-2-ones 1,3-disubstituées

Les dérivés 2-oxoamides à longue chaîne de l'acide γ-aminobutyrique et de la γ-norleucine (AX006, AX007 et AX008) sont des inhibiteurs réversibles de l'activité cPLA₂, avec une action temps- et dose-dépendante [Kokotos, 2004] (Figure 36). Ces composés peuvent inhiber la libération d'AA par la cPLA₂ dans des macrophages murins de la lignée P388 D1, avec des IC₅₀ de 8, 7,6 et 4,6 μM, respectivement. Ces valeurs d'IC₅₀ sont nettement inférieures à celles rapportées pour le MAFP (25 μM). Ainsi, les 2-oxoamides pourraient constituer des inhibiteurs beaucoup plus efficaces de la cPLA₂. Les effets anti inflammatoires de ces produits ont été testés sur un modèle d'œdème de la patte induit par le carragénane chez le rat [Kokotos, 2004]. Toutefois, aucune donnée concernant l'efficacité de ces composés sur la cPLA₂ dans le SNC n'est pour l'instant disponible.

Les propan-2-ones 1,3-disubstituées ont été récemment synthétisées [Connolly, 2002]. Ces composés démontrent une activité inhibitrice sur la cPLA₂ dans des expériences *in vitro*, avec un IC₅₀ de 0,03 µM. Ce pouvoir inhibiteur sur la cPLA₂ est 10 fois supérieur à celui des 2-oxoamides et de l'AACOCF₃. Ces propan-2-ones 1,3-disubstituées inhibent la libération d'AA dans les cellules HL60 avec une IC₅₀ de 2,8 µM. Ces inhibiteurs n'ont pour l'instant pas été administrés à des animaux vivants, et encore moins dans le contexte de modèle de pathologie neurologique. De ce fait, aucune donnée n'est à ce jour disponible sur leur tolérance, leur demi-vie plasmatique ni leur toxicité potentielle. De même, leur capacité à pénétrer la BHE reste inconnue.

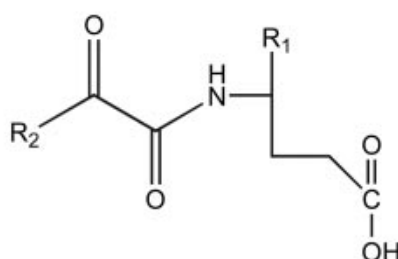


Figure 36 : Structure chimique d'un dérivé 2-oxoamide

e) Cytidine-5-diphosphoamines (CDP-amines)

Les [CDP-amines](#) constituent des intermédiaires très importants dans la biosynthèse de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine (Figure 37). La CDP-choline ou citicoline réduit l'activation de la cPLA₂ et la production de radicaux hydroxyl après ischémie cérébrale transitoire [Adibhatla, 2003]. Cette action inhibitrice entraîne une réduction de la concentration en AGL, d'une manière temps- et dose-dépendante. La CDP-choline protège les membranes neuronales, non seulement en accélérant la re-synthèse des PL, mais également en neutralisant les radicaux libres générés par les isozymes de PLA₂ [Adibhatla, 2002].

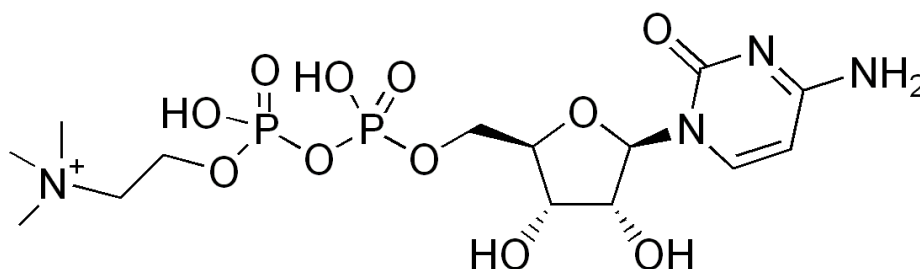


Figure 37 : Structure chimique de la CDP-choline

II – 4 c. Diminution de l'expression de la cPLA₂ par les thymo-régulateurs

L'ion lithium (Li⁺) est un médicament thymorégulateur, utilisé dans le traitement des troubles bipolaires [Phiel, 2001]. L'ion Li⁺ possède des propriétés neuroprotectrices. L'administration chronique de Li⁺ chez le rat entraîne une réduction des niveaux de l'ARNm et de la protéine de la cPLA₂, sans effet décelable sur les niveaux d'iPLA₂ ou de sPLA₂ [Chang, 1998]. Par contre, l'ion Li⁺ ne modifie pas le degré de phosphorylation de la cPLA₂. Ainsi, la diminution de l'activité cPLA₂ après administration chronique de Li⁺ résulte d'une diminution de la transcription du gène (Figure 39) [Weerasinghe, 2004]. Cette réduction de la cPLA₂ pourrait entraîner une diminution sélective du renouvellement de l'AA, par rapport au DHA, dans les PL du cerveau de rat [Basselin, 2003]. Le marquage des dendrites de cellules de Purkinje pour la cPLA₂ et la COX2 est aboli après administration de Li⁺, ce qui souligne son effet inhibiteur sur la cascade de l'AA dans la neurotransmission [Weerasinghe, 2004].

La carbamazépine (CBZ) est une substance anti convulsivante, classiquement utilisée pour la prévention et le traitement de l'épilepsie (Figure 38). Elle peut également être employée comme thymorégulateur pour le traitement des troubles bipolaires. L'administration chronique de CBZ inhibe l'activité de la cPLA₂ mais réduit également son expression, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine (Figure 39). Elle n'a pas d'effet sur les activités enzymatiques et les niveaux d'expression de l'iPLA₂ et de la sPLA₂ [Ghelardoni, 2004]. L'effet de la CBZ sur l'expression de la cPLA₂ s'accompagne d'une diminution de l'activité COX2 et des concentrations de PGE2 dans le cerveau. Ainsi, la CBZ pourrait inhiber à la fois la libération d'AA à partir des PL et sa conversion en PGE2 par la COX2 (Figure 39) [Ghelardoni, 2004].

Toutefois, d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme de l'AA en aval de la cPLA₂ ne sont pas affectées par la CBZ, notamment la 5-LOX ou le cytochrome P450, de même que les niveaux de LTB₄, qui demeurent inchangés sous traitement.

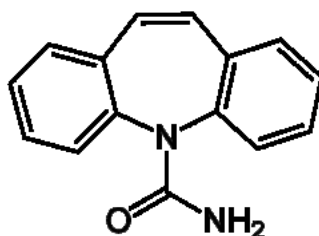


Figure 38 : Structure chimique de la carbamazépine

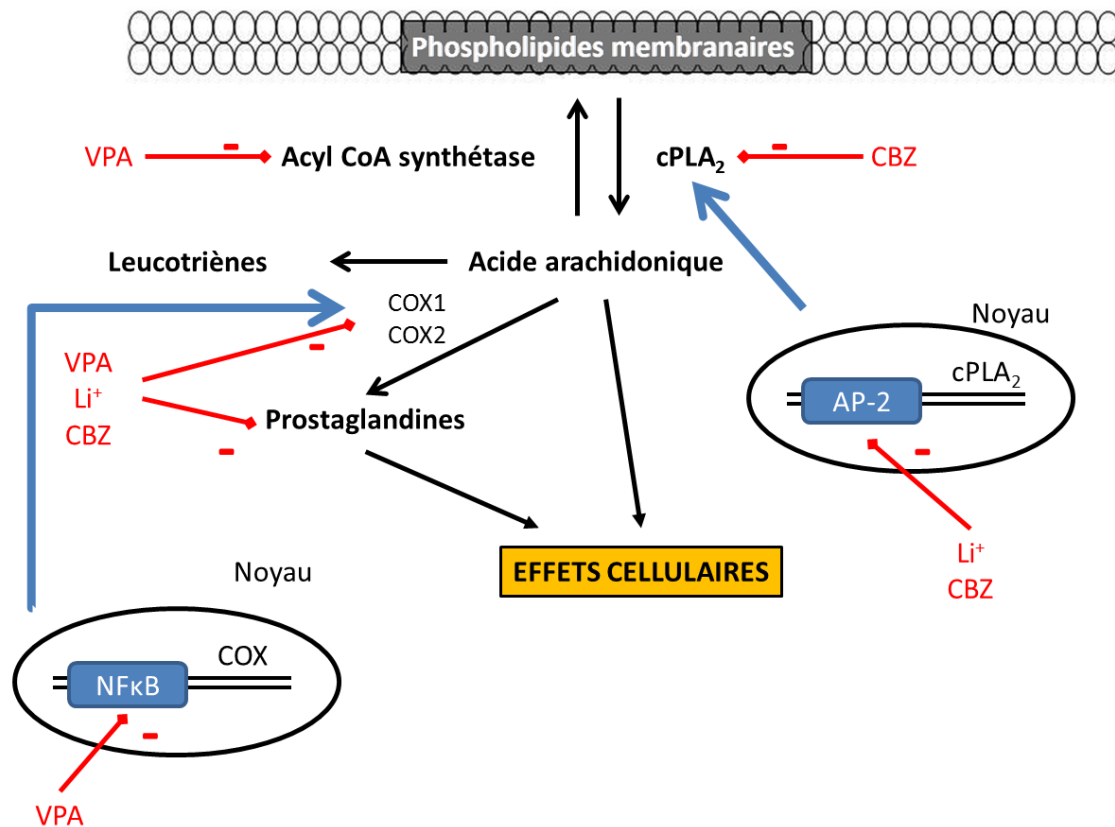


Figure 39 : Principales cibles d'action des médicaments thymorégulateurs dans le métabolisme de l'acide arachidonique

La cPLA₂ est soumise à l'action inhibitrice du lithium (Li⁺) et de la carbamazépine (CBZ). Ces médicaments peuvent agir sur l'activité enzymatique de la cPLA₂ et/ou sur la transcription de son gène et ainsi réduire son expression. Ces thymorégulateurs agissent également sur la cascade de l'AA en aval de la cPLA₂, en particulier sur les COX et les PG, notamment la PGE₂. Cette figure présente également l'action d'un autre médicament anti épileptique utilisé comme thymorégulateur, l'acide valproïque (VPA). Celui-ci n'agit pas directement sur la cPLA₂, mais joue sur les métabolites d'aval de la cascade de l'AA et sur l'acyl COA synthétase. Il module donc aussi le *turn over* de l'AA dans les PL membranaires.

II – 4 d. Modulation de l'expression de la cPLA₂ par oligonucléotides antisens et ARN interférants

Des ASO ont été développés pour inhiber les différentes isoformes de la PLA₂ [Yoo, 2001]. Ces ASO inhibent l'activité enzymatique d'une PLA₂ particulière en bloquant spécifiquement son expression au niveau des cellules.

Ces ASO peuvent être utilisés pour le traitement de pathologies neurologiques, dont ils ciblent l'aspect inflammatoire et/ou oxydatif. Cette approche a d'ailleurs été utilisée par notre équipe de recherche pour inhiber l'expression de la cPLA₂ dans des cultures primaires de neurones [Kriem, 2005] [Malaplate-Armand, 2006]. Cette inhibition est également

applicable à d'autres modèles *in vitro*, comme des astrocytes ou des cellules granulaires de cervelet [[Palomba, 2009](#)], ou *in vivo* dans l'arbre rétinotectal de la larve de *zebra fish* [[Leu, 2008](#)].

Toutefois, l'efficacité *in vivo* de ces ASO ne peut être prédite de manière certaine à partir d'études *in vitro*. En effet, ces ASO peuvent activer le système immunitaire et induire une réponse neutralisante [[Eckstein, 2007](#)].

Par ailleurs, leur utilisation pour le traitement de pathologies neurologiques est compliquée par différents problèmes spécifiques, tels que leur distribution suffisante et spécifique dans une région précise du SNC, ou encore la fabrication à échelle industrielle de telles molécules. L'inhibition de l'expression de la cPLA₂ dans les neurones du ganglion spinal chez le rat a pu être obtenue après injection intratéchale d'ASO [[Kim, 2008a](#)]. Cette inhibition s'accompagne d'une réduction de l'expression du gène et de la quantité de protéine, ainsi que d'une réduction des phénomènes hyperalgiques. Ce travail démontre que cette approche est applicable au SNC chez l'animal entier.

L'interférence ARN peut également être utilisée pour inhiber l'expression des isoformes de PLA₂. Les neurones peuvent en effet inhiber l'expression d'un de leurs gènes lorsque son ARN double-brin correspondant est présent dans la cellule [[Hannon, 2002](#)]. Ainsi, l'introduction d'un ARN double-brin synthétique, spécifique d'une isoforme de PLA₂, telle que la cPLA₂, dans un neurone, peut entraîner une extinction prolongée de l'expression du gène dans cette cellule. Des ARN interférants ([ARNi](#)) ont déjà été développés pour inhiber efficacement l'expression de la cPLA₂, dans des lignées neuronales [[Khanna, 2010](#)], des astrocytes en culture [[Zhu, 2006](#)] ou des cellules HEK [[Bavencoffe, 2011](#)]. De nombreux travaux ont été entrepris pour moduler l'expression de divers gènes impliqués dans la MA, autres que la cPLA₂, par des ARNi, démontrant la faisabilité de cette approche [[Orlacchio, 2007](#)].

Enfin, de nouvelles approches permettent d'administrer par voie systémique les ARNi, et ainsi de s'affranchir de la voie ICV. Ainsi, des ARNi contenus dans des exosomes et injectés IV chez la souris peuvent spécifiquement inhiber l'expression de gènes comme la GAPDH ou BACE1 dans le cerveau [[Alvarez-Erviti, 2011](#)].

Partie III : Modèles animaux d'études de la maladie d'Alzheimer

Les études *in vitro* fournissent des apports considérables dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la MA, notamment la cytotoxicité du peptide A β ou le métabolisme de l'APP [[Drouet, 2000](#)]. Cependant, comme la MA atteint le SNC et les fonctions supérieures, il est nécessaire de compléter ces approches par des modèles animaux, afin de reproduire au mieux la physiopathologie et la chronologie caractéristiques de cette maladie. On ne peut pas limiter la MA à la simple toxicité synaptique et neuronale du peptide A β . D'autres éléments participent indubitablement à la pathogenèse, notamment : l'influence du vieillissement, l'implication des cellules gliales et leurs interactions avec les neurones, la réaction inflammatoire, ou les interactions des cellules avec la matrice extracellulaire.

Les altérations de la mémoire observées au cours de la MA peuvent être grossièrement reproduites chez l'animal par des lésions spécifiques de certaines régions du circuit de Papez (hippocampe, noyaux basaux ou *fornix*) ou par l'administration de neurotoxiques (notamment la scopolamine) [[McDonald, 1998](#)]. Mais ces altérations mnésiques ne résultent pas des mécanismes physiopathologiques propres à la MA.

Divers modèles animaux reproduisent certains aspects de la physiopathologie de la MA. Ces modèles peuvent être subdivisés en plusieurs catégories, suivant le ou les éléments pathogènes étudiés. La majorité des modèles s'intéresse à la toxicité du peptide A β . Cette dernière peut être reproduite dans des animaux transgéniques exprimant une ou plusieurs protéines de la cascade amyloïde, avec les mutations responsables de formes familiales de MA. La toxicité du peptide A β peut également être modélisée en injectant directement du peptide A β exogène (sous ses diverses formes) directement dans le cerveau d'un animal *wild type*. La protéine Tau, autre acteur de la physiopathologie de la MA, a également donné naissance à des modèles transgéniques exprimant la protéine humaine, sous forme normale ou porteuse de mutation(s). Enfin, le vieillissement normal et pathologique du SNC peut être étudié, entre autres, chez les primates non humains.

Dans ce chapitre, nous présenterons les modèles classiques de transgénèse et d'administration de peptide A β . Nous analyserons ensuite plus en détail les modèles d'injection intra cérébro ventriculaire.

III – 1 Modèles transgéniques de la maladie d'Alzheimer

Les deux dernières décennies ont été marquées par le développement de nombreux modèles murins de MA. Ces modèles ont bénéficié conjointement des progrès de la biologie moléculaire (transgénèse, invalidation de gènes) et de la caractérisation de protéines impliquées dans la MA (protéines de la cascade A β : APP, PS1 et PS2, ou facteurs de risque génétique : ApoE). Le développement de ces modèles transgéniques a permis d'importants progrès dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous jacents aux formes familiales de MA associées à des mutations des gènes impliqués dans le métabolisme de l'APP et la surproduction de peptide A β .

III – 1 a. Souris mono-transgéniques

a) Souris transgéniques pour la protéine APP

Ces modèles murins reproduisent les formes familiales de MA, liées à des mutations sur le gène de l'APP, responsables d'une augmentation des taux intracérébraux d'A β et entraînant chez les patients le développement d'une démence précoce. Ces souris transgéniques permettent de modéliser la cascade amyloïde. Elles expriment ainsi des formes normales ou mutantes du gène de l'APP humain et présentent certains aspects de la MA [[Goate, 1998](#)] ([Tableau 5](#)). Les modèles transgéniques initialement développés ne reproduisent cependant pas les caractéristiques des phases tardives de la MA [[Quon, 1991](#)].

Les souris transgéniques surexprimant l'APP humain sous sa forme APP751, non muté, présentent des signes histologiques et un comportement comparables aux phases précoces de la MA [[Higgins, 1994](#)]. Elles présentent en effet de rares dépôts diffus non congophiles de peptide A β (1-42), une gliose, des neurites dystrophiques ainsi qu'une expression aberrante de la protéine Tau. Ces souris présentent des déficits de la mémoire spatiale dans la piscine de Morris, ainsi que des déficits de la mémoire de travail dans le labyrinthe en Y dès l'âge de 12 mois [[Moran, 1995](#)].

Les souris PDAPP expriment une forme mutante de l'APP humain, avec une substitution d'aa en position 717 (mutation V717F, encore appelée APP22) [[Games, 1995](#)]. Ces dernières présentent des altérations de l'apprentissage et de la mémoire, une atrophie de l'hippocampe et une apparition des dépôts amyloïdes dès l'âge de 3 mois [[Dodart, 2000](#)]. A 6 mois, on note une augmentation du nombre des dépôts amyloïdes, ainsi qu'une perte synaptique, une astrogliose et une microgliose, plus particulièrement marquées dans

l'hippocampe et le cortex [[Dodart, 2000](#)]. A 12 mois apparaissent les dégénérescences neurofibrillaires. L'accumulation de la protéine Tau hyperphosphorylée n'est détectable qu'à l'âge de 14 mois [[Masliah, 2001](#)].

Les souris Tg2576 expriment l'APP695 humain présentant la double mutation suédoise K670N / M671L (APP^{swe}), l'expression du transgène étant contrôlée par le promoteur du gène du prion [[Hsiao, 1996](#)]. Dès 9 mois, les souris Tg2576 présentent des déficits des fonctions d'apprentissage à la piscine de Morris et de la mémoire de travail [[Westerman, 2002](#)]. Ces déficits mnésiques sont sous-tendus sur le plan neurophysiologique par une inhibition de la LTP [[Jacobsen, 2006](#)]. A l'âge de 9 mois, leur cerveau renferme des plaques séniles et des dépôts diffus de peptide A β , ces dépôts étant associés à une astrogliose et à des neurites dystrophiques. On note également une surproduction de peptide A β avec un contenu cérébral en peptide A β (1-40) multiplié par 5 et le contenu en peptide A β (1-42/43) par 14 [[Kawarabayashi, 2001](#)]. Il semble que les troubles mnésiques observés chez ces souris Tg2576, âgées de 6 à 14 mois, résultent spécifiquement de l'accumulation des oligomères solubles de peptides A β (1-40) et A β (1-42), en absence de mort cellulaire massive [[Lesne, 2006](#)].

Deux autres lignées de souris mono transgéniques ont été développées [[Sturchler-Pierrat, 1997](#)]. La première de ces lignées surexprime l'APP humain combinant les mutations K670N / M671L et V717F, placé sous le contrôle du promoteur du gène de la glycoprotéine Tyh-1 murine (souris hAPP-J20 ou TgCRND8). Ces souris présentent des dépôts amyloïdes diffus dans le néocortex et l'hippocampe à partir de 18 mois, ainsi que quelques plaques amyloïdes [[Sturchler-Pierrat, 1997](#)]. La deuxième lignée de souris exprime la mutation suédoise de l'APP (APP23). Ces souris développent à partir de 6 mois des plaques amyloïdes, associées à des atteintes des prolongements neuronaux et des fibres cholinergiques dystrophiques, et une importante inflammation [[Gartner, 2003](#)]. Ces animaux développent des déficits d'apprentissage dès l'âge de 3 mois, dont la sévérité s'accroît avec le vieillissement [[Kelly, 2003](#)].

Enfin, diverses lignées de souris présentant d'autres mutations de la protéine APP (mutation *Dutch*, *Artic*), éventuellement combinées au sein d'un même transgène, ont été générées et sont listées à la fin du [tableau 5](#). Ces souris présentent principalement une accumulation variable de peptide A β sous forme de plaques amyloïdes, éventuellement associée à des dépôts intra neuronaux et une angiopathie cérébrale amyloïde [[Cheng, 2004](#)] [[Davis, 2004](#)] [[Knobloch, 2007](#)] [[Herzig, 2004](#)] [[Ronnbäck, 2011](#)].

Souris	Transgène (mutations)	A β intra neuronal	Plaques amyloïdes	Tau	DNF	Perte neuronale	Perte synaptique	ACA	Référence
hAPP	APP751	-	OUI	-	-	-	OUI	-	[Higgins, 1994]
PDAPP	APP (V717F)	-	OUI	OUI	NON	NON	OUI	-	[Games, 1995]
Tg2576	APP (K670N / M671L)	OUI	OUI	-	-	NON	NON	-	[Hsiao, 1996]
hAPP-J20	APP (K670N / M671L, V717F)	-	OUI	-	NON	NON	-	-	[Sturchler-Pierrat, 1997]
APP23	APP (K670N / M671L)	-	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	OUI	[Gartner, 2003]
APP Dutch	APP (E693Q)	-	OUI	-	-	-	-	OUI	[Herzig, 2004]
APP Arc	APP (E693G)	-	OUI	-	-	-	-	OUI	[Ronnback, 2011]
Tg-SwDI	APP (E693Q, D694N)	-	OUI	-	-	-	-	OUI	[Davis, 2004]
Tg-ArcSwe	APP (E693G, K670N / M671L)	OUI	OUI	-	-	-	-	OUI	[Knobloch, 2007]
hAPP-Arc	APP (E693G, K670N / M671L, V717F)	-	OUI	-	-	-	-	OUI	[Cheng, 2004]

Tableau 5 : Souris transgéniques pour la protéine APP

Tau : hyperphosphorylation de Tau, DNF : dégénérescence neuro fibrillaire, ACA : angiopathie cérébrale amyloïde
OUI : caractère présent, **NON** : caractère absent, - : caractéristique non recherchée et/ou non mentionnée

b) Souris transgéniques pour la protéine Tau

La protéine Tau représente l'autre acteur majeur dans la physiopathologie de la MA. Ainsi, des souris Tg4510 expriment la protéine Tau humaine porteuse de la mutation P301L, dont l'expression est régulée par le promoteur du gène du prion [[Lewis, 2000](#)]. Ces souris présentent des DNF dans différentes zones du cerveau et des pré-DNF dans l'hippocampe et les ganglions basaux, ainsi qu'une atrophie cérébrale. Cette atrophie est associée à de sévères altérations motrices, ainsi qu'à une perte neuronale particulièrement marquée (30% de la population neuronale) dans la région CA1 de l'hippocampe à l'âge de 5,5 mois [[Santacruz, 2005](#)]. Les souris Tg4510 présentent des perturbations mnésiques, apparaissant dès 4,5 mois et atteignant un stade critique à 9,5 mois [[Ramsden, 2005](#)]. Il semble que la mort neuronale soit dissociée de la dégénérescence neurofibrillaire chez ces souris Tg4510. En effet, la mort neuronale précède la DNF dans l'hippocampe, alors que des DNF apparaissent massivement dans le *striatum* en absence de mort neuronale [[Spires, 2006](#)]. Les agrégats intracellulaires de protéine Tau seraient donc insuffisants pour entraîner par eux-mêmes la mort neuronale.

c) Souris transgéniques pour les présénilines 1 et 2

A côté de la protéine APP en elle-même, les présénilines 1 et 2 ([PS1](#) et [PS2](#)) sont aussi impliquées dans la cascade amyloïde. Ainsi, des mutations sur les gènes codant ces enzymes vont altérer le métabolisme de l'APP en déviant celui-ci vers la voie amyloïdogène. Les premières souris transgéniques ainsi générées expriment la protéine PS1 portant les mutations M146L ou M146V, sous le contrôle du promoteur du gène du PDGF β [[Duff, 1996](#)]. Ces souris présentent une production accrue de peptides A β (1-42) et A β (1-43), alors que les souris exprimant la PS1 humaine non mutée présentent des taux normaux de peptide A β [[Duff, 1996](#)].

Des souris transgéniques exprimant la protéine PS2 humaine sauvage ou mutée (mutation N141I) sous le contrôle du promoteur du gène de l'énolase spécifique des neurones (*neuron specific enolase* ou [NSE](#)) ont également été développées [[Hwang, 2002](#)]. Ces souris présentent, dès 12 mois, des déficits mnésiques, ainsi qu'une surproduction du peptide A β (1-42), associés à des signes d'apoptose et d'inflammation au niveau du cortex et de l'hippocampe [[Hwang, 2002](#)].

d) Souris transgéniques pour la β -secrétase

Des souris transgéniques exprimant le gène humain de BACE-1 sous le contrôle du promoteur du gène de la Cam Kinase II et des souris *KO* BACE^{-/-}, ont été générées [Harrison, 2003]. Aucun phénotype particulier n'a été observé dans ces deux lignées. Par contre, la surexpression de BACE-1 combinée avec celle de l'APP humaine reproduit les atteintes caractérisant la MA, que l'APP soit de séquence sauvage [Bodendorf, 2002] ou mutante [Lee, 2005] [Willem, 2004].

e) Souris transgéniques pour l'apolipoprotéine E

L'ApoE est impliquée autant dans les formes sporadiques que familiales de la MA, l'allèle $\epsilon 4$ de l'ApoE constituant un facteur de risque majeur de MA [Saunders, 1993]. Des souris *KO* (ApoE^{-/-}) ou exprimant exclusivement une isoforme de l'ApoE humaine ont ainsi été générées. Dès 4 mois, les souris ApoE^{-/-} présentent une diminution de l'expression de certaines protéines présynaptiques (MAP2, synaptophysine), cette diminution s'aggravant avec l'âge [Masliah, 1995]. Une atteinte des prolongements dendritiques a également été décrite dans différentes zones du cortex et de l'hippocampe [Ji, 2003]. A 12 mois, ces souris ApoE^{-/-} développent une fragmentation des neurites, associée à une diminution de l'expression de l' α - et de la β -tubuline [Masliah, 1995]. Ces mêmes souris pourraient développer des troubles mnésiques dès 6 mois [Gordon, 1995], mais ces résultats n'ont pas été vérifiés par d'autres équipes [Anderson, 1998]. Des souris exprimant les isoformes ApoE3 ou ApoE4 de l'ApoE humaine, sous le contrôle du promoteur de la GFAP ont été générées à partir de souris ApoE^{-/-} [Hartman, 2001]. Les souris GFAP-ApoE4 présentent un déficit important de la mémoire de travail dès 11 mois, à l'inverse des souris ApoE^{-/-} de la souche d'origine. Ces perturbations sont accompagnées par une inhibition de la LTP et des perturbations de la transmission synaptique [Trommer, 2004].

III – 1 b. Souris double- et triple-transgéniques

a) Souris transgéniques pour la protéine APP et les PS

Le [tableau 6](#) récapitule la plupart des souches double-transgéniques APP / PS décrites dans la littérature. Ces souris PS / APP peuvent être obtenues par le croisement entre la souche Tg2576 et la souche PS1 M146L [Holcomb, 1998]. Ces souris présentent un développement accéléré du phénotype MA, avec une apparition plus précoce des dépôts de peptide A β (6 mois pour la souche double-transgénique contre 9 mois pour la souche Tg2576). Ces souris

présentent également un rapport $A\beta(1-42) / A\beta(1-40)$ élevé, qui est caractéristique de la souche PS1 M146L. Enfin, ces souris développent des perturbations de la mémoire de travail, dont l'intensité est corrélée à la densité des dépôts amyloïdes. D'autres souris double-transgéniques pour APP et les PS ont également été développées et sont présentées dans le [tableau 6](#). La souris APP Dutch / PS1 se distingue de la souris précédente par la nature de la mutation de la protéine APP (mutation *Dutch* E693Q) et la présence d'une angiopathie cérébrale amyloïde modérée [[Herzig, 2004](#)]. D'autres souris présentant des mutations multiples sur le gène d'APP et/ou de PS1 ont également été générées [[Casas, 2004](#)] [[Oakley, 2006](#)] [[Wirhhs, 2002](#)] ([Tableau 6](#)). Le phénotype de ces souris se rapproche plus encore de celui des patients atteints de MA, avec notamment l'accumulation intraneuronale de peptide $A\beta$, ainsi que des pertes neuronales et synaptiques.

b) Souris transgéniques pour les protéines APP et BACE-1

Ces souris associent l'expression de l'APP695 humaine sauvage ou mutante et la suppression ou la surexpression de BACE-1 ([Tableau 7](#)). Les souris APP695 / BACE-1^{-/-} ne présentent plus la surproduction de peptide $A\beta$, observée dans la lignée APP695, ni aucun phénomène de compensation par BACE-2 [[Luo, 2003](#)]. Par contre, les souris co-exprimant l'APP^{swe} et BACE-1 présentent une surproduction de peptide $A\beta$, associée à la majoration de certains traits phénotypiques, comme l'apparition des dépôts amyloïdes ou l'activation de la microglie par rapport à la lignée parentale APP^{swe} [[Mohajeri, 2004](#)].

c) Souris transgéniques pour les protéines APP et Tau

Le croisement entre les souris JNPL3 (souris transgéniques exprimant la forme mutante P301L de la protéine Tau) et Tg2576 produit des animaux développant des DNF dans différentes zones du cerveau dès 3 mois, ainsi que des plaques amyloïdes à 6 mois (comme la lignée parentale Tg2576) ([Tableau 7](#)). Ces souris présentent des déficits moteurs similaires à la lignée JNPL3. Ces souris ont notamment permis de montrer que le peptide $A\beta$ potentialise la formation des DNF, alors que la protéine Tau n'influence pas la production du peptide $A\beta$ [[Lewis, 2001](#)].

Souris	Transgènes (mutations)	A β intra neuronal	Plaques amyloïdes	Tau	DNF	Perte neuronale	Perte synaptique	ACA	Référence
APP/PS1	APP (K670N/M671L) PS1 (M146L)	-	OUI	-	-	-	-	-	[Holcomb, 1998]
APPDutch/PS1	APP (E693Q) PS1 (G384A)	-	OUI	-	-	-	-	OUI	[Heizig, 2004]
APP ₅₄ /PS1	APP (K670N/M671L, V717I) PS1 (M146L)	OUI	OUI	-	-	OUI	OUI	-	[Wirhns, 2002]
APP/PS1KI	APP (K670N/M671L, V717I) PS1 (M233T/L235P)	OUI	OUI	-	-	OUI	OUI	-	[Casas, 2004]
5xFAD	APP (K670N/M671L, I716V, V717I) PS1 (M146L/ L286V)	OUI	OUI	-	-	OUI	OUI	-	[Oakley, 2006]

Tableau 6 : Souris transgéniques pour les protéines APP/PS

Tau : hyperphosphorylation de Tau, DNF : dégénérescence neuro fibrillaire, ACA : angiopathie cérébrale amyloïde
OUI : caractère présent, **NON** : caractère absent, - : caractéristique non recherchée et/ou non mentionnée

d) Souris transgéniques pour les protéines APP et ApoE

Les souris double-transgéniques exprimant l'APP mutant V717E et une isoforme de l'ApoE (ApoE3 ou ApoE4) humaine ont souligné le rôle modulateur de l'ApoE dans la MA [[Holtzman, 2000](#)] ([Tableau 7](#)). En effet, les souris exprimant l'ApoE4 présentent des dépôts amyloïdes 10 fois plus nombreux que celles exprimant l'ApoE3, alors que les souris ApoE^{-/-} ne présentent aucune perturbation. De même, des souris exprimant l'APP695 sauvage et l'isoforme ApoE4 développent un déficit de la mémoire de travail et à long terme, dès 6 mois, et ceci en l'absence de dépôts amyloïdes [[Raber, 2000](#)].

e) Souris triple-transgéniques

Ces souris vont exprimer trois protéines mutantes, qui modélisent à la fois la cascade amyloïde et l'effet toxique de Tau : la protéine APP^{swe}, la protéine PS1-M146V et la protéine Tau-P301L [[Oddo, 2003](#)] ([Tableau 7](#)). Ces souris développent des plaques amyloïdes dans le cortex à 3 mois, puis au niveau de l'hippocampe à 6 mois. Les DNF sont retrouvées dans l'hippocampe à 12 mois, puis dans le cortex vers 18 mois. Ces souris présentent également une perte synaptique, associée à des perturbations de la LTP, ainsi qu'une augmentation de l'activation astrocytaire. Cette chronologie des différents événements pourrait bien modéliser l'évolution de la MA chez l'homme. De plus, l'administration d'anticorps anti-A β à ces souris réduit non seulement les dépôts amyloïdes et le taux de peptide A β soluble [[Oddo, 2004](#)], mais également les signes histopathologiques liés à la protéine Tau [[Oddo, 2006a](#)]. Cette dernière observation suggère fortement que les oligomères solubles de peptide A β participeraient à l'initiation de la pathologie Tau.

Ces différents modèles transgéniques reproduisent, le plus souvent de façon incomplète, les formes familiales de la MA, le plus souvent dans ses phases tardives. Seules certaines lignées comme les souris Tg2576 permettent de modéliser des formes sporadiques de MA où l'apparition de troubles cognitifs et mnésiques est corrélée avec l'accumulation d'oligomères solubles de peptide A β , et ceci en absence de plaques amyloïdes [[Hsia, 1999](#)] [[Koistinaho, 2001](#)].

Souris	Transgènes (mutations)	Aβ intra neuronal	Plaques amyloïdes	Tau	DNF	Perte neuronale	Perte synaptique	ACA	Référence
BACE1 ^{-/-} /APPtg	APP695 BACE1 ^{-/-}	NON	NON	-	-	-	-	-	[Luo, 2003]
APPSwe/BACE1	APP (K670N/M671L) BACE1	OUI	OUI	-	-	-	-	-	[Mohajeri, 2004]
JNPL3	APP (K670N/M671L) Tau (P301L)	-	OUI	-	OUI	-	-	-	[Lewis, 2001]
APP/ApoE	APP (V717E) ApoE ^{-/-} , ApoE3 / ApoE4	-	OUI	OUI	NON	NON	OUI	-	[Holtzman, 2000]
3XTg-AD	APP (K670N/M671L) Tau (P301L) PS1 (M146V)	OUI	OUI	OUI	OUI	-	NON	-	[Oddo, 2003]

Tableau 7 : Souris double-transgéniques APP/BACE1, APP/Tau, APP/ApoE et triple-transgéniques APP/PS/Tau

Tau : hyperphosphorylation de Tau, DNF : dégénérescence neuro fibrillaire, ACA : angiopathie cérébrale amyloïde

OUI : caractère présent, **NON** : caractère absent, - : caractéristique non recherchée et/ou non mentionnée

III – 2 Modèles d’injection intracérébrale de peptide A β

Afin de pallier les limites des approches transgéniques, décrites précédemment, et de se focaliser sur les formes sporadiques de la MA, en particulier dans leurs phases précoces, l’administration de peptide A β exogène, directement dans le SNC, représente une alternative intéressante. Ce modèle permet, en effet, de reproduire rapidement les différentes altérations moléculaires et cellulaires induites par le peptide A β et de les corrélérer avec les performances cognitives des animaux.

Les tableaux [8](#) à [11](#) regroupent les principaux modèles d’injection intracérébrale du peptide A β chez le Rat (Tableaux [8](#) et [9](#)) et la Souris (Tableaux [10](#) et [11](#)) développés durant ces 20 dernières années, ainsi que les principaux résultats obtenus. Pour une plus grande lisibilité, les effets de l’administration de peptide A β exogène ont été subdivisés en deux sous-rubriques distinctes, pour chacune des espèces de rongeur.

Un premier tableau décrit pour chaque espèce les effets comportementaux induits par ces injections, en particulier sur les mémoires à court et long termes, que celles-ci soient évaluées par un paradigme spatial ou non spatial (Tableaux [8](#) et [10](#)).

Le second tableau résume les principaux effets délétères du peptide A β *in vivo* sur les neurones et les synapses chez le Rat et la Souris (Tableaux [9](#) et [11](#)). Ces effets comprennent principalement l’atteinte de l’intégrité et de la fonctionnalité de la synapse, évaluées par la LTP, la mort neuronale, les marqueurs de stress cellulaire, la réaction inflammatoire, l’atteinte du système cholinergique, la présence de DNF et les anomalies de la protéine Tau.

Notre recherche bibliographique s’est limitée aux 3 principales séquences de peptide A β couramment utilisées dans ces expériences, à savoir A β (1-40), A β (1-42) et A β (25-35). La plupart des travaux réalisés consistent en des injections ICV de peptide A β sous forme agrégée. De plus, dans certains articles, y compris récents, les modalités de préparation de peptide A β ne sont pas clairement mentionnées et il est difficile d’apprécier quel niveau d’oligomérisation a été utilisé.

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	Mémoire court terme spatiale	Mémoire court terme non spat.	Mémoire long terme spatiale	Mémoire long terme non spat.	Locom.	Anxiété	Références
Aβ(1-40)											
ICV	Unique	soluble	2 nmol		X		O	O			[Sweeney, 1997]
	Répétée	agrégé	4,4–5,5 nmol				X				[Hashimoto, 2002]
		soluble	185 pmol/j	28 j		X	X				[Lee, 2007]
			300 pmol/j	12–14 j		O	X				[Tanaka, 1998]
										[Hashimoto, 2005] [Nabeshima, 1994] [Nag, 1999b] [Nag, 2001] [Nitta, 1994] [Nguyen, 2007] [Nitta, 1997] [Wang, 2001] [Yamada, 1998] [Yamaguchi, 2006]	
										[Oka, 2000] [Yamada, 1998] [Yamaguchi, 2006]	
											[Nguyen, 2007]
											[Viel, 2008]
Hip	Unique	agrégé	924 pmol			X					[Nakamura, 2006]
	soluble		1–3 nmol			X					[Cleary, 1995]
			2,31 nmol +/- X2			X					
	NP		2,31 nmol				X				[Huang, 2007] [Jiang, 2008]

Tableau 8 : Effets comportementaux de l'injection de peptide Aβ chez le rat

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	Mémoire court terme		Mémoire long terme		Locom.	Anxiété	Références
					spatiale	non spat.	spatiale	non spat.			
Aβ(1-40)											
Hip	Unique	NP	924 pmol		X						[McDonald, 1996]
	Répétée	agrégé	3 nmol			X					[Malin, 2001]
		soluble	NP				X				
		NP	4,62 nmol		O						[von Linstow Roloff, 2002]
MS	Unique	soluble	3 nmol			X					[Terranova, 1996]
Aβ(1-42)											
ICV	Unique	NP	400 pmol					X			[van der Stelt, 2006]
	Répétée	agrégé	2,22-4,43 nmol	3 j		X					
		soluble	300 pmol/j	20 j				X			
Hip	Unique	agrégé	2,22 nmol			X					[Christensen, 2008]
		NP	222 pmol				X				[Winkler, 1994]
	Répétée	agrégé	3 nmol	NP			X				[Malin, 2001]
		soluble	1 nmol +/- X2	NP			X				

Tableau 8 : Effets comportementaux de l'injection de peptide Aβ chez le rat

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	Mémoire court terme		Mémoire long terme		Locom.	Anxiété	Références
					spatiale	non spat.	spatiale	non spat.			
Aβ(1-42)											
Ent Cx	Unique	agrégé	1,5 nmol		O		X	X	O		[Sipos, 2007]
Amyg	Répétée	NP	975 pmol/j	8 sem			X				[Shalova, 2007]
MBN	Unique	soluble	200 µmol							X	[Harkany, 2001]
MS	Unique	soluble	3 nmol			X					[Terranova, 1996]
Aβ(25-35)											
ICV	Unique	agrégé	15 nmol		X	X	O	O			[Stepanichev, 2003a]
			15-30 nmol		X			O			[Stepanichev, 2005]
			15-25 nmol		X	X		X			[Stepanichev, 2006] [Tohda, 2006]
			9,5 nmol							X	[Um, 2009]
			10 nmol		X				O		[Yamada, 2005]
		NP	0,1-10 nmol		X	X		X	X		[Alkam, 2008b] [Stepanichev, 1998]
			10,3-14 µmol							X	[Stepanov, 2007] [Wang D, 2007] [Wang F, 2007]
	Répétée	NP	2,83 nmol/j	14 j			X	X	X	X	[Olariu, 2001]

Tableau 8 : Effets comportementaux de l'injection de peptide Aβ chez le rat

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	Mémoire court terme		Mémoire long terme		Locom.	Anxiété	Références
					spatiale	non spat.	spatiale	non spat.			
Aβ(25-35)											
Hip	Unique	agrégé	15 nmol	X		X					[Stepanichev, 2004]
			9,43 nmol			X					[Chen, 1996] [Perez-Severiano, 2004] [Yang, 2007]
		NP	1,9 pmol					X			[Roesler, 2006]
Amyg	Unique	agrégé	5 nmol			X					[Sigurdsson, 1997]
MBN	Unique	agrégé	0,8 nmol			O		X	X		[Giovannelli, 1995]
			9,5 nmol								[Harkany, 1998]
MS	Unique	soluble	3 nmol					X			[Terranova, 1996]
Striat	Unique	agrégé	3 nmol						X		[Yagami, 2004]

Tableau 8 : Effets comportementaux de l'injection de peptide Aβ chez le rat

Abréviations : Agrégat : état d'agrégation ; non spat. : non spatiale ; Locom : activité locomotrice – Amyg : amygdale ; Ent Cx : cortex entorhinal ; Hip : hippocampe ; ICV : intra cérébro ventriculaire ; MBN : noyau basal magnocellulaire (*nucleus basalis magnocellularis*) ; MS : septum median ; Striat : striatum – X : effet délétère ; O : absence d'effet ; NP : non précisé

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	LTP	Toxicité cellulaire	Système AcChol	Inflammation	Stress cellulaire	Tau / DNF	Références		
Aβ(1-40)													
ICV	Unique	agrégé	0,05–3,5 nmol	1–14 j	X						[Cullen, 1996] [Cullen, 1997] [Klyubin, 2004]		
											[Prediger, 2007] [Jin, 2006]		
											[Minogue, 2007]		
Répétée	NP	10–300 pmol/j	1–14 j	X							[Chen, 2006] [Hu, 2008] [Itoh, 1999] [Lynch, 2007] [Minogue, 2003] [Wu, 2008]		
											[Harris-White, 2001] [Niita, 1997]		
											[Fukuta, 2001] [Olariu, 2002] [Tang, 2000]		
											[Nabeshima, 1994] [Niita, 1994] [Yamada, 1998]		
											[Nauven, 2007] [Wang, 2001]		
											[Lee, 2007] [Nag, 2001] [Iran, 2003] [Yamaguchi, 2006]		
											[Nag, 1999a] [Nag, 2001]		
Hip	Unique	agrégé	1,8 nmol	14 j							[Liu J, 2004]		
											3 nmol	X	[Miguel-Hidalgo, 1998]

Tableau 9 : Effets cellulaires de l'injection de peptide Aβ chez le rat

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	LTP	Toxicité cellulaire	Système AcChol	Inflammation	Stress cellulaire	Tau / DNF	Références
Aβ(1-40)											
Hip	Unique	agrégé	5 nmol					X			[Rosales-Corral, 2004]
		soluble	2,3 nmol +/- X2		X	X		X			[Stephan, 2001]
	Répétée	agrégé	3 nmol	NP		X		X			[Mailin, 2001]
			11,5 nmol/j	14 j		O		X			[Holcomb, 2000]
	Continu		NP	NP			X				[Itoh, 1996]
Cortex	Unique	agrégé	NP			X	X				[Emre, 1992]
			NP			O		O			[Games, 1992]
	Continu	soluble	NP			X		X			[Kowall, 1991]
Retsp Cx	Unique	agrégé	231–462 pmol			X					[Gonzalo-Ruiz, 2003]
MBN	Unique	agrégé	2,3 nmol			X					[Giovannelli, 1995]
			2,3 nmol			O					[Liang, 2008]
MS	Unique	agrégé	1,85 nmol			X					[Colom, 2010]
Striat	Unique	agrégé	1 nmol			X					[Weldon, 1998]

Tableau 9 : Effets cellulaires de l'injection de peptide Aβ chez le rat

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	LTP	Toxicité cellulaire	Système AcChol	Inflammation	Stress cellulaire	Tau / DNF	Références	
Aβ(1-42)												
ICV	Unique	agrégé	0,05–3,5 nmol		X						[Cullen, 1997]	
											[Nakamura, 2001]	
	Répétée	agrégé	2 nmol/j	7 j								[Nakagawa, 2004]
												[Barghorn, 2005]
												[Winkler, 1994]
Hip	Unique	agrégé	1 nmol								[Ryu, 2006]	
											[Cetin, 2007]	
	Répétée	agrégé	2,22 +/- 1,11 nmol	8 sem								[Stephan, 2001]
												[Winkler, 1994]
												[Ryu, 2008]
Répétée	agrégé	3 nmol/j	NP								[Malin, 2001]	
											[Shalova, 2007]	
											[Shalova, 2007]	

Tableau 9 : Effets cellulaires de l'injection de peptide Aβ chez le rat

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	LTP	Toxicité cellulaire	Système AcChol	Inflammation	Stress cellulaire	Tau / DNF	Références
Aβ(1-42)											
Ent Cx	Unique	soluble	1 nmol					X		X	[Zou, 2003]
Fr Cx	Unique	NP	6,65 pmol			X					[van der Stelt, 2006]
Amyg	Unique	agrégé	NP			X	X				[Abraham, 2000]
	Continu	soluble	5 nmol	NP						X	[Chambers, 2000]
Corp Cal	Unique	agrégé	1 nmol			X		X			[Jantaratnotai, 2003]
MBN	Unique	agrégé	200 pmol			X	X				[Harkany, 1995b]
			886 pmol						X		[Boyd-Kimball, 2005]
			1,1 nmol				X	X	X		[Giovannini, 2002]
		soluble	200 pmol				X				[Harkany, 2001]
MS	Unique	agrégé	0,35 nmol				X		X		[Harkany, 1995a]
			5 nmol				X				[Abe, 1994]
Aβ(25-35)											
ICV	Unique	agrégé	15 nmol			X					[Stepanichev, 2006]
		NP	10, 25 & 100 nmol					X			[Freir, 2001] [Freir, 2003] [Gault, 2008a] [Gault, 2008b] [Wu, 2008]

Tableau 9 : Effets cellulaires de l'injection de peptide Aβ chez le rat

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	LTP	Toxicité cellulaire	Système AcChol	Inflammation	Stress cellulaire	Tau / DNF	Références
Aβ(25-35)											
ICV	Répétée	agrégé	20 nmol/j	7 j			X				[Saez-Valero, 2002]
	Continu	agrégé	5–20 nmol/j	7 j		X		X			[Pavia, 2000]
HPC	Unique	agrégé	3 ou 15 nmol	5 j		X	X	X			[Meunier, 2006]
											[Yamada, 2005]
Cortex	Unique	agrégé	9,4 nmol			X		X			[Stepanichev, 2003a]
											[Stepanichev, 2004]
Amyg	Unique	agrégé	5 nmol			O	O	O	X	X	[Yang, 2007]
											[Stein-Behrens, 1992]
MBN	Unique	agrégé	200 & 400 pmol			O	O	O	X	X	[Games, 1992]
											[Sigurdsson, 1997]
MS	Unique	agrégé	5 nmol			O	O	O	X	X	[Chambers, 2000]
											[Dudas, 2002]
MS	Unique	agrégé	5 nmol			X	X	X	X	X	[O'Mahony, 1998]
											[Abe, 1994]

Tableau 9 : Effets cellulaires de l'injection de peptide Aβ chez le rat

Abréviations : Agrégat : état d'agrégation ; LTP : *long term potentiation* ; Système AcChol : système cholinergique ; Tau / DNF : hyperphosphorylation de Tau / apparition de DNF – Amyg : amygdale ; Corp cal : corps calleux (corpus callosum) ; Ent Cx : cortex entorhinal ; Fr Cx : cortex frontal ; Hip : hippocampe ; ICV : intra cérébro ventriculaire ; MBN : noyau basal magnocellulaire (nucleus basalis magnocellularis) ; MS : septum median ; RetSp Cx : cortex rétrosplénial ; Striat : striatum – X : effet délétère ; O : absence d'effet ; NP : non précisé

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	Mémoire court terme		Mémoire long terme		Locom.	Anxiété	Références						
					spatiale	non spat.	spatiale	non spat.									
Aβ(1-40)																	
ICV	Unique	agrégé	400 pmol			X		X			[Medeiros, 2007] [Prediger, 2008]						
											soluble	1,15 nmol			X		[Alkam, 2008a]
	Répétée	agrégé	460 pmol /j					X			[Amaral, 2010]						
Hip	Unique	NP	2,31 nmol			X		X			[Huang, 2007] [Jiang, 2008]						
Aβ(1-42)																	
ICV	Unique	agrégé	400 pmol			X		X			[Jho, 2004] [Yan J, 2001]						
											2,2 nmol				X	X	[Chauhan, 2003]
			400-685 pmol					O			[Choi, 2001]						
		NP	400 pmol					X			[Yan, 2004]						

Tableau 10 : Effets comportementaux de l'injection de peptide Aβ chez la souris

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	Mémoire court terme spatiale	Mémoire court terme non spat.	Mémoire long terme spatiale	Mémoire long terme non spat.	Locom.	Anxiété	Références					
Aβ(1-42)																
ICV	Répétée	soluble	NP	NP	X	X	X	X	X	X	[Craft, 2004a]					
											2,22–41 nmol/j	14 j	X			[Malm, 2006]
											NP	28 j	X	X		[Zaheer, 2008]
Cortex	Unique	agrégé	443 pmol	21 j	X	X	O	O			[Chiba, 2005]					
															[El Khoury, 2003]	
Aβ(25-35)																
ICV	Unique	agrégé	2,83–45 nmol	15 nmol	X	X	X	X	X	X	[Maurice, 1996]					
											3 nmol	X	X	X	X	[Stepanichev, 2003b]
											205 pmol	X	X	X	X	[Tsunekawa, 2008]
											mixte					[Shibata, 2000]
Cortex	Unique	agrégé	2,83–45 nmol	15 nmol	X	X	X	X	X	X	[Delobette, 1997] [Kong, 2005] [Tohda, 2003] [Tohda, 2004]					
											0,1 nmol – 14 μmol	X	X	X	X	[Ahn, 2006] [Fang, 2006] [Fu, 2006]

Tableau 10 : Effets comportementaux de l'injection de peptide Aβ chez la souris

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	Mémoire court terme spatiale	Mémoire court terme non spat.	Mémoire long terme spatiale	Mémoire long terme non spat.	Locom.	Anxiété	Références
A β (25-35)											
ICV	Unique	NP	3 nmol					X			[Alkam, 2008a]
					X	X	X			[Alkam, 2007] [Kim, 2008b] [Meunier, 2006]	
					X		O			[Chiba, 2005]	
Répétée	NP		2,83 nmol/j	14 j	X						[Holscher, 2007] [Tajima, 2005]
							O			[Olariu, 2001]	

Tableau 10 : Effets comportementaux de l'injection de peptide A β chez la souris

Abréviations : Agrégat : état d'agrégation ; non spat. : non spatiale ; Locom : activité locomotrice – Hip : hippocampe ; ICV : intra cérébro ventriculaire – X : effet délétère ; O : absence d'effet ; NP : non précisé

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	LTP	Toxicité cellulaire	Système AcChol	Inflammation	Stress cellulaire	Tau / DNF	Références
Aβ(1-40)											
ICV	Unique	agrégé	400 pmol						X		[Medeiros, 2007]
			0,4-5 nmol			X					[Jin, 2006] [Prediger, 2007]
Aβ(1-42)											
ICV	Unique	agrégé	400 pmol		X		X				[Yan J, 2001]
			400 pmol					X			[Jhoo, 2004]
	Répétée	NP	300 pmol/j	21 j		X					[Chiba, 2005]
Hip	Unique	agrégé	375 pmol							X	[Gotz, 2001]
		soluble	11 pmol				X				[Sotthibundhu, 2008]
Aβ(25-35)											
ICV	Unique	Agrégé	3 nmol		X			X			[Maurice, 1998]
			2,83-9 nmol					X		X	[Alkam, 2007] [Meunier, 2006]
			4 - 16 nmol					X			[Kim, 2008b] [Mazzola, 2003]
			4 nmol				X		X	X	[Fu, 2006]

Tableau 11 : Effets cellulaires de l'injection de peptide Aβ chez la souris

Site	Injection	Agrégat	Dose	Durée	LTP	Toxicité cellulaire	Système AcChol	Inflammation	Stress cellulaire	Tau / DNF	Références
Aβ(25-35)											
ICV	Unique	agrégé	5–25 nmol			X					[Tohda, 2003] [Tohda, 2004]
			9,4 nmol			X		X	X		[Um, 2009]
	Répétée	NP	1–6 nmol/1–2 j	5 j – 3 sem			X				[Chiba, 2005] [Meunier, 2006] [Yamada, 2005]

Tableau 11 : Effets cellulaires de l'injection de peptide Aβ chez la souris

Abréviations : Agrégat : état d'agrégation ; LTP : *long term potentiation* ; Système AcChol : système cholinergique ; Tau / DNF : hyperphosphorylation de Tau / apparition de DNF – Hip : hippocampe ; ICV : intra cérébro ventriculaire – X : effet délétère ; O : absence d'effet ; NP : non précisé

III – 2 a. Facteurs expérimentaux modulant l'effet du peptide A β

Parmi les différents travaux réalisés jusqu'à présent, il est important de considérer les modalités opératoires employées, extrêmement variables d'un travail à l'autre. Parmi les critères techniques à considérer, il nous semble capital de prendre en considération les caractéristiques suivantes : la quantité de peptide injecté et sa séquence, son degré d'oligomérisation, les modalités et le site anatomique d'injection, l'âge des animaux employés et les paramètres mesurés.

a) Quantité de peptide A β injecté

La quantité de peptide A β administré varie fortement selon les expérimentations et couvre une gamme allant de 200 pmoles [[Mazzola, 2003](#)] à 10 nmoles [[Yamada, 2005](#)]. De petites quantités de peptide A β (1-40) agrégé (0,5 à 1 nmole), injecté dans le cortex rétrosplénial, suffisent pour induire une perte neuronale dans différents noyaux centraux, au bout de 7 à 15 jours [[Gonzalo-Ruiz, 2003](#)]. A l'inverse, l'injection intra-hippocampale de plus grandes quantités (3 nmoles) de peptide A β (1-40) agrégé, chez le rat, provoque une dégénérescence neuronale apoptotique, localisée dans la région du CA1 et le gyrus denté de l'hippocampe, seulement dès 5 jours après l'injection [[Miguel-Hidalgo, 1998](#)]. Les pertes cellulaires engendrées concernent une large variété de neurones, puisqu'elles touchent les neurones GABAergiques [[Cullen, 1996](#)], sérotoninergiques, noradrénergiques, dopaminergiques et cholinergiques [[Gonzalo-Ruiz, 2003](#)].

b) Séquence du peptide A β utilisé

Le choix du peptide injecté et de ses caractéristiques physicochimiques est guidé non seulement par la nature des phénomènes pathologiques et le stade de la MA étudiés, mais également par le degré de toxicité, la stabilité et la demi-vie du peptide dans le cerveau. Plusieurs types de peptide A β ont été injectés aussi bien chez le rat que chez la souris (Tableaux [8](#) à [11](#)). Il s'agit notamment des peptides A β (1-40), A β (1-42) et A β (25-35).

Le devenir du peptide A β après injection dans le cerveau est conditionné en partie par sa séquence. Une étude de l'efflux de peptides A β (1-40) et A β (1-42) radiomarqués après injection ICV dans le cerveau de souris montre que le peptide A β (1-40) est rapidement éliminé *via* la BHE (50% d'élimination à 5 min post injection), alors que le peptide A β (1-42) est éliminé plus lentement [[Ji, 2001](#)]. L'élimination du peptide A β serait assurée par le récepteur membranaire LRP-1 retrouvé dans les capillaires formant la BHE. Chez le rat, 2 à 7

jours après l'injection de peptide A β (1-42), des agrégats insolubles se forment dans le système ventriculaire. La plupart de ces agrégats sont pris en charge par des cellules phagocytaires et sont déposés dans les vaisseaux méningés ou encore au niveau des plexus choroïdes [Nakagawa, 2004]. Ceci suggère une clairance active de ce peptide hors du système ventriculaire. Il existe également des endopeptidases intracérébrales (insulysine et néprisyline) qui interviennent dans l'élimination du peptide A β [Tanzi, 2004].

Toutefois, les effets à court terme de l'administration *in situ* de peptide A β sur la mémoire ne semblent pas dépendre de la séquence en aa du peptide. En effet, des déficits ont pu être induits chez la souris et le rat avec différents peptides tels que le peptide A β (1-40) [McDonald, 1994] [Sweeney, 1997], les formes tronquées A β (1-28), A β (12-28), A β (18-28) et A β (12-20) [Flood, 1991]. Des résultats similaires ont également été obtenus avec le peptide A β (25-35) sous forme agrégée [Maurice, 1996]. Il est assez étonnant que tous ces peptides ne partagent pas de séquence conservée commune, pouvant expliquer leur toxicité. Il est également très probable que la conformation du peptide A β module sa toxicité comportementale *in vivo* comme cela a été montré pour ses propriétés neurotoxiques *in vitro* avec les peptides A β (1-40) et A β (1-42).

c) Oligomérisation du peptide A β

On distinguera ainsi les expériences ayant recours au peptide A β sous forme monomérique, oligomérique et fibrillaire. Comme nous l'avons évoqué plus haut, le peptide A β , injecté en ICV, sous forme d'oligomères solubles ou sous forme fibrillaire, est neurotoxique et entraîne une perte neuronale [Craft, 2004b] [Kowall, 1991] [Miguel-Hidalgo, 1998]. Le peptide A β injecté sous forme fibrillaire semble provoquer une plus forte réaction inflammatoire, avec activation de la microglie, augmentation de la réactivité astrocytaire [El Khoury, 2003] [Weldon, 1998] et libération de médiateurs inflammatoires [Rosales-Corral, 2004]. Cette réaction inflammatoire s'accompagne de l'induction de stress oxydant [Stepanichev, 2004] [Boyd-Kimball, 2005]. Ces différents éléments pourraient expliquer, du moins en partie, les différents effets neurotoxiques observés après injection ICV d'A β fibrillaire [Jantaratnotai, 2003]. Les oligomères solubles de peptide A β présentent également des effets neurotoxiques [Malin, 2001], bien que des résultats contradictoires aient également été rapportés [Yan J, 2001]. De la même façon, l'injection ICV de peptide A β non agrégé induit une réponse inflammatoire et un stress oxydant [Craft, 2004b] [Kim H, 2004] [Yan J, 2001].

Les propriétés *in vivo* les plus marquantes des oligomères solubles de peptide A β semblent résider dans leur toxicité sur le fonctionnement et la plasticité synaptique. En effet, l'injection ICV de doses sub-nanomolaires d'oligomères de peptide A β est suffisante pour perturber la LTP au niveau de l'hippocampe [Freir, 2001] [Walsh, 2002], et pour induire une perte synaptique [Craft, 2004b]. Cette altération synaptique se traduit sur le plan comportemental par des atteintes des processus de consolidation, tant au niveau de la mémoire de travail [Stephan, 2005] que de la mémoire à long terme [Yan J, 2001]. Il semble clairement établi que les formes oligomériques solubles de peptide A β sont responsables des effets délétères observés, les monomères étant dépourvus de toxicité [Cleary, 2005] [Walsh, 2002].

L'injection du peptide A β agrégé entraîne également des modifications de la LTP [Stephan, 2001], ainsi que des perturbations comportementales chez les rongeurs [Delobette, 1997] [Maurice, 1996]. Les effets toxiques concernent principalement la mémoire à court terme [Stepanichev, 2003a] [Stepanichev, 2005]. Par contre, les études des effets du peptide A β agrégé sur la mémoire à long terme ont donné lieu à des résultats contradictoires entre différentes équipes [Chen, 1996] [Harkany, 1998] [Nakamura, 2001] [Sigurdsson, 1997] [Stepanichev, 2003a] [Yamada, 1999a].

Il est à noter que les conditions d'oligomérisation *in vitro* du peptide A β ont été peu décrites jusqu'à une période relativement récente [Stine, 2003]. De ce fait, il est fort probable que les premières expériences d'injection ICV ne maîtrisaient pas ou peu ce paramètre. On opposait classiquement les préparations « fraîches » de peptide A β , contenant des formes solubles aux préparations « âgées » dans lesquelles les peptides étaient agrégés de manière variable. Cette variabilité dans l'état biophysique des préparations de peptide A β (réalisées à partir de peptides synthétiques) peut expliquer la grande diversité des résultats obtenus entre les équipes.

d) Mode d'administration et séquence d'injection

La plupart des administrations de peptide A β ont été réalisées sous forme d'injection unique. Certaines équipes ont également eu recours à la microdialyse [Yamada, 1998], par injections répétées dans le temps [Cleary, 1995] [Malin, 2001] ou encore par des injections continues, grâce à des mini-pompes osmotiques [Nakamura, 2001] [Nitta, 1994] [Olariu, 2002] [Yamada, 1998]. Cette dernière technique a permis d'injecter des quantités plus importantes de peptide A β sur des périodes plus longues. Ainsi, une administration continue de peptide

A β (1-40) agrégé, chez le rat, durant 14 jours, entraîne une accumulation de ce peptide dans le cortex cérébral et l'hippocampe, associée à une diminution de l'activité de l'acétyl choline transférase [Nakamura, 2001] [Nitta, 1994]. Ces effets délétères de l'injection continue du peptide seraient indépendants du vieillissement des animaux [Nag, 2001]. L'administration chronique de peptide A β s'accompagne également d'une diminution des défenses anti oxydantes dans les structures cérébrales [Kim, 2003]. Sur le plan comportemental, les effets délétères de l'administration continue de peptide A β concernent principalement la mémoire à long terme [Nakamura, 2001] [Nitta, 1994] [Yamada, 1999a]. L'atteinte de la mémoire de travail est moins systématiquement retrouvée [Nakamura, 2001] [Yamada, 1999a]. Ces altérations mnésiques résulteraient d'une diminution de l'activation de la PKC [Olariu, 2002].

e) Site anatomique et voie d'injection

La plupart des injections ont été réalisées dans l'hippocampe [Flood, 1991] [Games, 1992] [Stephan, 2001], le cortex [Emre, 1992] et différents noyaux centraux tels que le striatum [Weldon, 1998] ou le noyau magnocellulaire [Harkany, 1995a] [Harkany, 1995b]. Les effets du peptide A β dépendront donc de la structure au sein de laquelle il est administré. En effet, les différents types de mémoires font appel à des structures anatomiques spécifiques. Certains types de mémoire dépendent de l'hippocampe pendant une courte période de temps après l'apprentissage. Ainsi, au-delà de cette période, les interventions sur l'hippocampe demeureront sans effet. De ce fait, une tâche, apprise par des rats dans le labyrinthe radial, préalablement à l'injection répétée de peptide A β (1-40), dans l'hippocampe, pendant 26 jours, demeure correctement restituée après l'intervention [McDonald, 1994]. En effet, il semble que l'intégrité de l'hippocampe ne soit pas indispensable pour le rappel d'une information correctement consolidée. Ainsi, le site de l'injection de peptide A β conditionnera fortement ses effets sur la mémoire. Les premières études ont en effet montré qu'une injection intraparenchymateuse était plus efficace dans l'induction de l'amnésie que la même dose administrée en ICV [Flood, 1991].

A côté du site anatomique d'injection, il convient de distinguer la voie d'administration : intra-tissulaire ou intra-ventriculaire. La voie intra-tissulaire suppose que l'apport direct du peptide dans la structure ciblée en optimisera les effets. Toutefois, cette injection tissulaire induit une forte activation de la microglie, qui aboutit à l'élimination du peptide par phagocytose. Cet effet indésirable serait moins important lorsque le peptide est injecté dans les ventricules cérébraux [Weldon, 1998]. Les injections ICV s'effectuent dans les ventricules

latéraux ([VL](#)) ou le troisième ventricule ([VIII](#)). Les injections ICV permettent l'utilisation de plus grandes quantités de peptide et autorisent des périodes d'injections plus longues (jusqu'à 30 jours) grâce à des mini-pompes osmotiques ou des canules à demeure.

f) Age des animaux utilisés

Les capacités de transfert à travers la BHE diminuent avec l'âge : une réduction de 55 à 65% de la clairance du peptide A β (1-40) a été mesurée chez la souris C57BL/6 âgée de 9 mois [[Shibata, 2000](#)]. D'autres auteurs ont montré que l'efflux de peptide A β (1-42) se faisait *via* un transport non saturable chez les souris jeunes, alors qu'il disparaît complètement chez les souris âgées [[Banks, 2003](#)]. De même, la susceptibilité aux effets toxiques du peptide A β augmente avec l'âge. Cela a notamment été vérifié en comparant les effets d'une injection ICV de peptide A β (1-42) agrégé sur la réduction de la densité synaptique et l'activation astrocytaire chez des souris âgées de 8 et 24 mois [[Chauhan, 2003](#)].

g) Type de mémoire considérée

Les effets délétères de l'administration de peptide A β sont également variables suivant le type de mémoire considérée. La plupart des études s'accordent pour conclure aux perturbations de la mémoire de travail et de la mémoire à court terme, que ces travaux utilisent du peptide A β soluble ou agrégé.

Par contre, les effets sur la mémoire à long terme sont beaucoup plus variables d'une étude à l'autre. Par exemple, l'administration intra hippocampique de peptides A β (1-42), A β (1-40) ou A β (25-35), éventuellement répétée, présente un effet délétère à la fois sur la mémoire à court et long termes [[Chen, 1996](#)] [[Nakamura, 2001](#)]. A l'inverse, aucune altération n'est observée sur la mémoire à long terme lors d'épreuves comme la piscine de Morris ou l'évitement passif [[Harkany, 1998](#)] [[Stepanichev, 2003a](#)].

De même, l'administration intra hippocampique de peptides A β (1-40) et A β (1-43) peut perturber la mémoire de travail dans le labyrinthe radial, mais pas la mémoire de référence, qui est assimilée à la mémoire à long terme [[Stephan, 2001](#)].

III – 2 b. Effets de l'injection intracérébrale du peptide A β sur la mémoire

a) Effets à court terme des oligomères solubles

Les premières expériences d'injection ICV chez le rongeur ont montré que l'administration de peptide A β de différentes séquences (A β (1-28), A β (12-28), A β (18-28) et A β (12-20)) pouvait induire une amnésie à court terme dans un test d'évitement passif [[Flood, 1991](#)]. De

plus, cette amnésie ne concernait que les animaux soumis à l'injection 24 h avant l'apprentissage. Cette perturbation de l'apprentissage par l'administration d'oligomères de peptide A β a ensuite été confirmée par d'autres travaux, explorant la mémoire spatiale chez des souris et des rats injectés avec des oligomères de peptide A β (1-40) et A β (25-35) immédiatement avant ou après l'étape d'apprentissage [[McDonald, 1994](#)], alors que ce même effet délétère n'était pas mis en évidence chez des animaux injectés avant l'étape de restitution [[Maurice, 1996](#)]. D'une manière similaire, dans un test de labyrinthe radial, l'injection intra hippocampique de peptide A β (1-40) chez le rat entraînait une perturbation de la mémoire de travail [[Sweeney, 1997](#)]. Aucune perturbation ne pouvait être obtenue chez ces mêmes animaux injectés quelques jours plus tard, indiquant que les perturbations induites par les oligomères étaient générées de manière aiguë et transitoire. Ces perturbations mnésiques résultent d'une altération de la fonctionnalité des synapses par le peptide A β (donc un phénomène transitoire et réversible), plutôt que d'une destruction des structures sous-jacentes (qui aurait des conséquences nettement plus prolongées, voire irréversibles).

Toutes les études utilisant l'administration de peptide A β dans le cerveau de rongeur, immédiatement avant ou après le processus d'apprentissage, montrent que celui-ci n'a aucun effet sur la rétention et/ou le stockage d'une tâche qui a déjà été apprise [[Flood, 1991](#)] [[Maurice, 1996](#)] [[McDonald, 1994](#)]. Ces observations suggèrent que le peptide A β affecte spécifiquement les processus de consolidation et de mémoire de travail, sans perturber de manière globale les fonctions mnésiques, et en particulier, la restitution d'une information précédemment enregistrée.

b) Effets à long terme des oligomères et des fibrilles de peptide A β

Afin de modéliser la cascade amyloïde *in vivo*, certaines équipes ont tenté d'induire des dépôts amyloïdes dans le cerveau de rongeurs non transgéniques. Contrairement aux oligomères solubles, qui exercent des effets à court terme sur la mémoire, les effets à long terme peuvent uniquement être produits par du peptide A β sous forme agrégée, laquelle garantit une meilleure stabilité et une durée de vie prolongée dans le SNC des animaux. Ainsi, l'administration de peptide A β (25-35) agrégé perturbe les capacités d'apprentissage lorsque celui-ci est réalisé plus de 14 jours après l'injection ICV. Ces effets à long terme sont plus marqués pour le peptide A β (25-35) agrégé que pour le même peptide sous forme soluble [[Delobette, 1997](#)]. De même, des peptides hautement agrégatifs comme le peptide

A β (1-43) ou un mélange A β (1-40)/A β (1-43) peuvent perturber l'apprentissage spatial plus de 7 semaines après l'administration, en produisant un dépôt amyloïde au point d'injection, alors que le peptide A β (1-40) sous forme soluble n'est plus actif après un délai aussi long [[Stephan, 2001](#)]. Des injections répétées ou l'administration ICV continue de peptide A β induisent une diminution progressive des performances de mémoire de travail ou de mémoire spatiale, associée à l'apparition de dépôts amyloïdes au niveau du site d'administration [[Cleary, 1995](#)] [[Nitta, 1994](#)] [[Nitta, 1997](#)]. De même, dans certaines études, l'administration de peptide A β agrégé induit des effets retardés (parfois à plus de 60 jours après l'injection) [[Giovannelli, 1995](#)], dont l'intensité augmente avec le temps [[Nakamura, 2001](#)].

Ces différents effets retardés pourraient résulter de l'induction de l'inflammation et du stress oxydant par les fibrilles de peptides A β sur les cellules gliales et microgliales voisines du site d'administration.

III – 3 Intérêts potentiels des modèles d'injection de peptide A β par rapport aux modèles transgéniques

Comme nous l'avons vu plus haut, l'administration intracérébrale de peptide A β exogène, sous forme oligomérique ou agrégée, permet de modéliser différentes caractéristiques neuropathologiques et comportementales de la MA. Ce modèle *in vivo* permet d'évaluer précisément les effets de la composante amyloïde de cette pathologie. De manière similaire, des modèles murins transgéniques de plus en plus élaborés ont été développés dans le même but. Ces modèles transgéniques (sur)expriment certains gènes ou formes mutantes de gènes responsables des formes familiales de MA. Elles constituent donc des supports *in vivo* de choix pour l'étude des altérations moléculaires, cellulaires et neuropathologiques responsables de la maladie. Un certain nombre de souris transgéniques reproduisent plus ou moins partiellement les caractéristiques neuropathologiques et comportementales de la MA, notamment la surproduction de peptide A β , les dépôts amyloïdes, la réaction inflammatoire et les altérations de la fonction synaptique, ainsi que les déficits comportementaux qui en découlent. De plus, ces différentes perturbations apparaissent et/ou s'aggravent avec l'âge des animaux. Enfin, la création d'animaux double ou triple transgéniques, combinant plusieurs gènes mutés, reproduisent de manière plus fidèle les caractéristiques de la MA observées chez les patients (présence de DNF au niveau des neurones, déficit de clairance du peptide A β). Toutefois, il existe encore certaines différences entre les modèles transgéniques et les observations chez le patient, en particulier, sur la participation des DNF chez la souris, ces dernières étant souvent absentes. De plus, de par leur nature même, ces modèles miment les formes familiales de MA, liées à une anomalie dans le métabolisme de la protéine APP, déviant celui-ci vers la voie amyloïdogène, et à une surproduction très importante de peptide A β . On peut donc s'interroger sur la valeur de tels modèles pour reproduire les formes sporadiques de MA, pourtant très largement majoritaires parmi les patients. Les mécanismes physiopathologiques mis en jeu par ces différents types de modèles animaux de MA, ainsi que les phases de la maladie qu'ils ciblent, sont illustrés sur la [figure 40](#).

De plus, le phénotype observé chez ces modèles transgéniques résulte de l'action combinée de multiples acteurs physiopathologiques. Parmi ces derniers, on peut notamment citer la réaction inflammatoire. Une activation de la microglie est décrite à la fois chez les patients et

dans les modèles transgéniques. Celle-ci peut participer à la formation des plaques amyloïdes, mais également à l'élimination du peptide A β . De plus, la réaction inflammatoire peut perturber l'intégrité et la fonctionnalité des synapses, en plus de la toxicité directe du peptide A β sur celles-ci. Il devient alors difficile de déterminer la part respective de ces différents acteurs pathogènes dans les altérations fonctionnelles et comportementales observées chez les souris transgéniques. Par ailleurs, le système immunitaire de la souris et de l'humain étant largement différents, on peut supposer que la réaction inflammatoire dans ces modèles ne sera pas superposable à celle présente chez les patients. A titre d'exemple, on peut citer le contraste existant entre la très faible inflammation notée sur un modèle de souris exprimant la mutation *Swedish* de la protéine APP (KM670/671NL) et l'inflammation importante observée chez les patients [[Schwab, 2004](#)]. Un modèle d'administration de peptide A β exogène, en faible quantité, permet de s'affranchir de la participation de la réaction inflammatoire et de se focaliser sur la synaptotoxicité intrinsèque du peptide A β .

D'une manière similaire, on peut s'interroger sur la participation et les effets respectifs des différentes formes d'agrégation du peptide A β sur les phénotypes observés dans les modèles transgéniques. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, les oligomères solubles et les agrégats insolubles de peptide A β semblent impliquer des voies de toxicité différentes sur les synapses et les neurones. De ce fait, il est difficile d'étudier de manière précise l'effet de telle forme de peptide A β dans un modèle transgénique, où la (sur)production de ce peptide n'est ni contrôlée, ni modulable. L'administration exogène de peptide A β permet de déterminer précisément la quantité, la séquence et l'état d'agrégation du peptide que l'on souhaite étudier, dans des conditions parfaitement définies et reproductibles.

Les lésions observées au cours de la MA sont localisées à certaines régions du cerveau, du moins dans les premières phases de la maladie. La surexpression du transgène peut être limitée à un type cellulaire particulier, par le choix d'un promoteur spécifique, dans les modèles transgéniques. Toutefois, cette expression est difficilement modulable en fonction de la région cérébrale considérée ou de l'âge de l'animal. L'administration exogène de peptide A β permet de cibler spécifiquement une zone parfaitement définie du SNC et de s'assurer que les altérations mnésiques et comportementales observées résultent bien de l'effet du peptide A β sur les structures où il a été introduit.

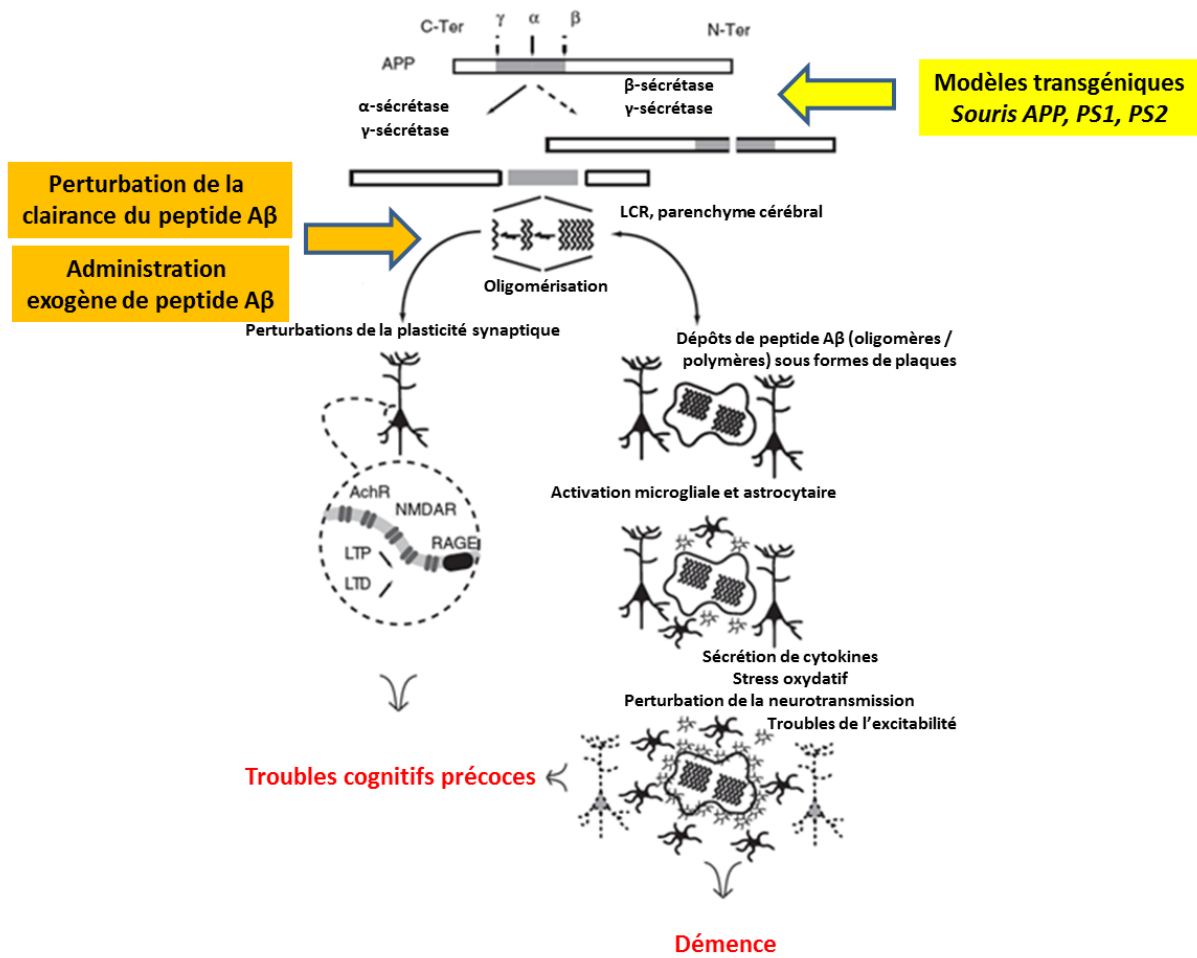


Figure 40 : Représentation schématique des mécanismes physiopathologiques de la MA reproduits par ses différents modèles *in vivo* (transgéniques vs administration exogène) [Stephan, 2005]

Les altérations synaptiques et neuronales observées au cours de la MA résultent de plusieurs évènements pathogènes. Les premiers font intervenir la toxicité directe des oligomères solubles de peptide Aβ sur les synapses et les neurones et conduisent aux altérations synaptiques observées précocement au cours de la maladie. Ces altérations sont reproduites par les modèles d'administration de peptide Aβ exogène, où la quantité et la nature moléculaire du peptide administré peuvent être déterminées précisément. A côté de cela, le peptide Aβ agrégé entraîne divers évènements délétères, impliquant le stress oxydant, l'inflammation... Cette accumulation de peptide Aβ est reproduite dans les modèles transgéniques, où la protéine APP, précurseur du peptide Aβ est exprimée sous une forme normale ou mutée, cette dernière conduisant à la surproduction de peptide Aβ.

L'administration de peptide Aβ permet également l'introduction concomitante ou différée de cofacteurs de toxicité ou, au contraire, de protection (facteurs neurotrophiques,...). Enfin, cette procédure permet la réalisation des expériences sur de courtes périodes de temps et l'emploi immédiat d'animaux à un âge défini, plutôt que d'attendre leur vieillissement dans le cas des souris transgéniques.

Le modèle d'injection ICV, développé par notre équipe, repose sur l'administration de très faibles doses de peptide A β (1-42) dans le ventricule latéral de souris âgées de 12 semaines. Il permet de modéliser les atteintes synaptiques en l'absence d'apoptose neuronale ou de réaction inflammatoire décelables. Il reproduit ainsi les phases précoces de la MA. Les altérations synaptiques ont été décrites non seulement sur le plan structural, avec une réduction du niveau d'expression de marqueurs synaptiques au niveau de l'hippocampe, mais également sur le plan fonctionnel, les souris présentant des altérations de la mémoire de travail et à long terme [[Garcia, 2010](#)] [[Youssef, 2008](#)].

Bien évidemment, les modèles d'administration de peptide A β sont également soumis à quelques limitations et réserves, notamment, en raison du traumatisme lié à la procédure chirurgicale ou aux effets intrinsèque du vecteur utilisé pour l'injection du peptide A β .

III – 4 Autres modèles d'étude de la maladie d'Alzheimer

L'étude de la MA sur des modèles murins implique l'emploi de techniques de transgénèse ou d'apport exogène de peptide A β . Bien que difficile d'accès, certaines espèces de primates non-humains peuvent représenter des modèles intéressants pour l'étude de la MA. En effet, ces espèces présentent des homologies des séquences pour les différentes protéines impliquées dans la MA, comme l'APP [[Podlisny, 1991](#)] et l'ApoE [[Morelli, 1996](#)]. Fait capital, le vieillissement de ces animaux s'accompagne de l'apparition spontanée de certains aspects caractéristiques de la MA : plaques amyloïdes, angiopathie amyloïde, perte neuronale et perturbations comportementales et cognitives. De plus, la distribution anatomique de ces atteintes amyloïdes est similaire à celle observée chez les patients atteints de MA. Au cours du vieillissement, les primates accumulent spontanément du peptide A β dans différentes structures cérébrales, sous forme de dépôts diffus et de plaques amyloïdes. Ces dépôts reproduisent l'aspect des plaques amyloïdes, notamment, par les neurites dystrophiques et les cellules gliales activées qui les entourent. Par contre, on ne retrouve aucun signe de DNF associée à ces lésions [[Sani, 2003](#)].

Les dépôts amyloïdes apparaissent initialement dans différentes aires corticales, comme le cortex temporal et cingulé, puis atteignent en fonction de l'âge les structures limbiques [[Sani, 2003](#)]. Les structures paralimbiques, comme l'hypothalamus, ne sont que faiblement atteintes [[Sani, 2003](#)] [[Sloane, 1997](#)]. Il n'existe aucune corrélation entre le nombre de plaques amyloïdes et les perturbations cognitives chez les singes rhésus [[Sloane, 1997](#)], à l'image de ce qui est observé dans les modèles transgéniques Tg2576 [[Hsia, 1999](#)] [[Koistinaho, 2001](#)] et chez les patients atteints de MA [[Lee, 1999](#)].

Une angiopathie amyloïde a également été décrite au niveau des vaisseaux du cortex cérébral et de ceux des leptoméniges [[Gearing, 1997](#)].

A côté des primates non humains, d'autres modèles animaux plus « originaux » ont été proposés, mais ils sont plus destinés à l'étude des effets du peptide A β qu'à la modélisation de la MA. C'est notamment le cas du chien, de l'embryon de poulet et du *zebra fish* [[Sarasa, 2009](#)]. Compte-tenu de l'éloignement de ces modèles avec le travail présenté ici, nous ne les détaillerons pas davantage.

RESULTATS ANTERIEURS DU LABORATOIRE, HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

La maladie d'Alzheimer apparaît comme un processus pathologique s'étalant sur une longue durée avec des phases asymptomatiques puis prodromales, dont l'intervalle de temps est inconnu en l'état actuel des connaissances. Il serait important de stopper l'évolution de la MA, dès ses premiers stades, afin de limiter la perte irréversible des capacités cognitives. Une analyse des travaux les plus récents permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle les altérations cognitives observées résulteraient du dysfonctionnement et de la perte synaptiques induits par les oligomères du peptide A β , comme nous l'avons vu ci-dessus dans la partie bibliographique. L'identification des facteurs induisant ces effets initiaux des oligomères du peptide A β permettrait de chercher des inhibiteurs pouvant être utilisés en thérapeutique contre l'évolution de la MA.

Les altérations générant les dysfonctionnements synaptiques, au cours des phases précoces de la MA, sont encore très partiellement connues à l'heure actuelle. Parmi les voies et les médiateurs incriminés, l'AA apparaît comme un candidat très important. En effet, celui-ci joue un rôle capital dans le fonctionnement de la synapse, notamment en régulant le LTP et en constituant un messager rétrograde après activation des récepteurs au glutamate [Williams, 1989]. L'AA exerce un effet direct sur le neurone, notamment en inhibant les canaux pré et postsynaptiques, ainsi qu'en régulant le trafic des vésicules synaptiques [Marza, 2008]. De plus, l'AA peut être transformé en PG et en EC, sous l'action de différents enzymes (COX, LOX). Ces dérivés de la voie de l'AA participent également à la signalisation synaptique et à la neuroinflammation [Sheinin, 2008]. L'AA est libéré de la liaison (sn-2) des phospholipides membranaires par la cPLA₂. Ainsi, la cPLA₂ pourrait constituer un médiateur, à la fois très important et d'intervention très précoce, dans la toxicité synaptique et cellulaire du peptide A β . En partant de cette hypothèse, l'équipe du laboratoire de recherche Lipidomix a précédemment rapporté que l'incubation de neurones primaires avec du peptide A β provoque une translocation de la cPLA₂ au niveau des membranes, associée à une libération précoce mais de durée brève d'AA (pic de la libération d'AA à 10 min d'incubation et normalisation après 30 min). De plus, l'inhibition de la cPLA₂ par des inhibiteurs pharmacologiques et des ASO inhibe l'apoptose induite par les oligomères de peptide A β [Kriem, 2005]. Par ailleurs, cette apoptose implique une activation des N- et A-

SMases, que l'inhibition de la cPLA₂ bloque également [[Malaplate-Armand, 2006](#)]. Ces résultats de l'équipe sur l'implication de la cPLA₂ dans les effets précoces des oligomères du peptide Aβ dans les systèmes de culture cellulaire ont été corroborés entre 2005 et 2008 par les travaux d'autres équipes [[Hicks, 2008](#)] [[Nicotra, 2005](#)] [[Sanchez-Mejia, 2008](#)] [[Shelat, 2008](#)] [[Shen, 2008](#)] [[Zhu, 2006](#)].

Néanmoins ces travaux, obtenus surtout sur cultures de neurones embryonnaires, n'indiquent pas si la cPLA₂ peut assurer à elle seule la médiation de l'action des oligomères de peptide Aβ dans cet organe complexe qu'est le cerveau. En effet, celui-ci comprend plusieurs types cellulaires autres que les neurones, en interactions étroites avec ces derniers, et qui peuvent également participer aux dysfonctions et aux pertes synaptiques, survenant aux phases précoces de la MA.

Juste avant ce travail, le laboratoire a montré qu'une injection ICV unique de faibles quantités d'oligomères de peptide Aβ chez la souris induit une diminution des capacités cognitives et une perte synaptique. Cette administration d'oligomères Aβ exogènes constituerait ainsi un modèle des effets précoces du peptide Aβ [[Youssef, 2008](#)].

Notre étude s'est donc basée sur l'hypothèse de travail principale du laboratoire Lipidomix, qui attribue aux oligomères de peptide Aβ un rôle capital dans le dysfonctionnement, puis dans la perte synaptiques observés au cours des phases précoces de la MA. Nous avons utilisé un modèle d'injection ICV pour reproduire les phases précoces de la maladie et y préciser le rôle joué par la cPLA₂. La souris cPLA₂^{-/-} représentait un outil intéressant d'inactivation constitutive, totale et permanente de l'enzyme. Celui-ci permettrait de mieux préciser l'implication de l'enzyme dans la physiopathologie de la MA, et d'identifier ses voies d'activation par le peptide Aβ, et les voies de signalisation délétères en aval. Nous avons basé notre travail sur l'hypothèse que l'activation rapide de la cPLA₂ par les oligomères de peptide Aβ est responsable de leurs effets délétères prolongés.

Notre travail s'est articulé autour des axes suivants :

- 1- Déterminer le niveau de protection conférée par la réduction de l'activité cPLA₂ vis-à-vis de la neurotoxicité du peptide Aβ oligomérique chez la souris
- 2- Analyser les voies de transduction et les types cellulaires impliqués dans les effets du peptide Aβ médiés par la cPLA₂, notamment la part de l'inflammation et la contribution neuronale

3- Etudier les relations entre la cPLA₂ et les protéines actrices de la MA, notamment la protéine APP.

Par suite, notre travail a principalement utilisé la lignée murine cPLA₂^{-/-}. En effet, si les souris iPLA₂^{-/-} présentent des déficits moteurs sévères [[Shinzawa, 2008](#)], les souris cPLA₂^{-/-} ne développent aucun problème neurologique majeur. Par contre, elles démontrent une résistance particulière à différents stress, notamment aux phénomènes ischémiques et inflammatoires. De plus, ces souris sont résistantes aux agents excitotoxiques comme le MPTP [[Klivenyi, 1998](#)]. Comme nous l'avons vu plus haut dans ce document, l'excitotoxicité constitue un élément important de la physiopathologie de la MA. Cette lignée représente donc un bon modèle pour déterminer le rôle de la cPLA₂ dans la toxicité synaptique induite par les oligomères de peptide Aβ.

MATERIEL ET METHODES

I – Animaux et manipulations animales

I – 1 Origine et hébergement des animaux

Les souris $cPLA_2^{-/-}$ ont été gracieusement fournies à notre laboratoire par le Dr BONVENTRE (*Renal Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts*). Les souris Balb/c RJ (génotype sauvage $cPLA_2^{+/+}$) ont été acquises auprès du centre d'élevage Janvier (Le Genest–Saint–Isle). Toutes ces souris ont été hébergées dans une animalerie agréée, certifiée « *specific pathogen free* ». Les animaux étaient répartis à raison de 5 à 6 souris par cage et bénéficiaient d'un libre accès à l'eau et à la nourriture. Tous les paramètres de l'environnement étaient contrôlés et maintenus rigoureusement constants (température ambiante = $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humidité = $50 \pm 5\%$, cycle lumière / obscurité = 12 h jour / 12 h nuit). Les animaux utilisés pour la partie *in vivo* de ce travail étaient des mâles âgés de 12 semaines. Toutes les interventions (chirurgie et études comportementales) ont été conduites selon les recommandations du Comité National de Réflexion d'Éthique sur l'Expérimentation Animale.

I – 2 Entretien de la lignée transgénique et génotypage

I – 2 a. Entretien de la lignée transgénique $cPLA_2^{-/-}$

Afin d'entretenir la lignée $cPLA_2^{-/-}$, sans provoquer de dérive du fond génétique par endogamie, nous avons maintenu un pool d'animaux reproducteurs à l'état hétérozygote $cPLA_2^{+/-}$. Les souris $cPLA_2^{+/-}$ mâles ont été croisées avec des souris femelles de même lignée et de génotype sauvage (souris Balb/c RJ $cPLA_2^{+/+}$). Les souriceaux issus de ces croisements ont été génotypés à la naissance. Les mâles $cPLA_2^{+/-}$ ont été sélectionnés comme reproducteurs pour établir la génération suivante ([Tableau 12](#)).

Pour générer les animaux des différents génotypes utilisés dans les expériences, nous avons croisé des animaux hétérozygotes (mâles et femelles $cPLA_2^{+/-}$). Les souriceaux issus de ce croisement présentaient les différents génotypes $cPLA_2^{-/-}$, $cPLA_2^{+/-}$ et $cPLA_2^{+/+}$ ([Tableau 13](#)). Seuls les animaux mâles du génotype désiré ont été inclus dans les expériences.

		Souris cPLA ₂ ^{+/-} ♂	
		Allèle WT	Allèle KO
Souris cPLA ₂ ^{+/+} ♀	Allèle WT	cPLA ₂ ^{+/+}	cPLA ₂ ^{+/-}
	Allèle WT	cPLA ₂ ^{+/+}	cPLA ₂ ^{+/-}

Tableau 12 : Croisement des souris en vue de l'entretien de la lignée cPLA₂^{-/-}

Des souris cPLA₂^{+/-} mâles ont été croisées avec des souris cPLA₂^{+/+} femelles importées de l'animalerie Janvier. Le choix d'utiliser des femelles de génotype sauvage était guidé par la volonté d'éviter tout problème lors de la mise bas, constaté chez les souris cPLA₂^{-/-} femelles et résultant d'une production réduite de PG. De plus, le recours à des souris femelles importées d'un élevage extérieur permettait de ventiler le fond génétique des animaux et nous mettait à l'abri des risques inhérents à l'endogamie. Après génotypage, seules les souris cPLA₂^{+/-} mâles ont été conservées comme reproducteur pour obtenir la génération suivante.

		Souris cPLA ₂ ^{+/-} ♂	
		Allèle WT	Allèle KO
Souris cPLA ₂ ^{+/-} ♀	Allèle WT	cPLA ₂ ^{+/+}	cPLA ₂ ^{+/-}
	Allèle KO	cPLA ₂ ^{+/-}	cPLA ₂ ^{-/-}

Tableau 13 : Croisement des souris en vue de l'obtention des différents génotypes nécessaires aux expérimentations

Des souris cPLA₂^{+/-} mâles ont été croisées avec des souris cPLA₂^{+/-} femelles, tous issus des croisements d'entretien de la lignée résumés dans le tableau précédent. Le croisement d'animaux hétérozygotes a généré des descendants possédant l'ensemble des génotypes (+/+, +/- et -/-), sur un fond génétique homogène. Après génotypage, les animaux ont été inclus dans les différents groupes expérimentaux. Les souris mâles ont été utilisées pour les expériences de comportement et comme reproducteurs. Les souris femelles ont servi à la production d'embryons pour les cultures de neurones.

I – 2 b. Procédure de génotypage des animaux

a) Principe

L'inactivation du gène de la cPLA₂ chez les animaux KO a été obtenue par insertion d'une cassette *Neo* au sein du premier exon [Bonventre, 1997] (Figure 41). Le génotypage repose sur cette inactivation, en utilisant une réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR), encadrant la zone d'insertion de cette cassette. Cette PCR utilise donc 3 amorces. Deux amorces s'hybrident de part et d'autre de la zone d'insertion (allèle sauvage), l'autre s'hybride dans la cassette *Neo* (allèle KO).

Cette PCR produit donc deux fragments d'ADN, de longueur variable en fonction du génotype :

- un fragment de 100 pb pour l'allèle sauvage (allèle WT)
- un fragment de 300 pb pour l'allèle inactivé (allèle KO).

Les séquences des amorces utilisées pour cette PCR sont les suivantes :

Primer # 1 : 5'-CGACTCATACAGTGCCTTCATCAC-3'

Primer # 2 : 5'-GGGAACTTCCTGACTAGGGG-3'

Primer # 3 : 5'-TGTGTACAATCTTTGTGTTGTTTCA-3'

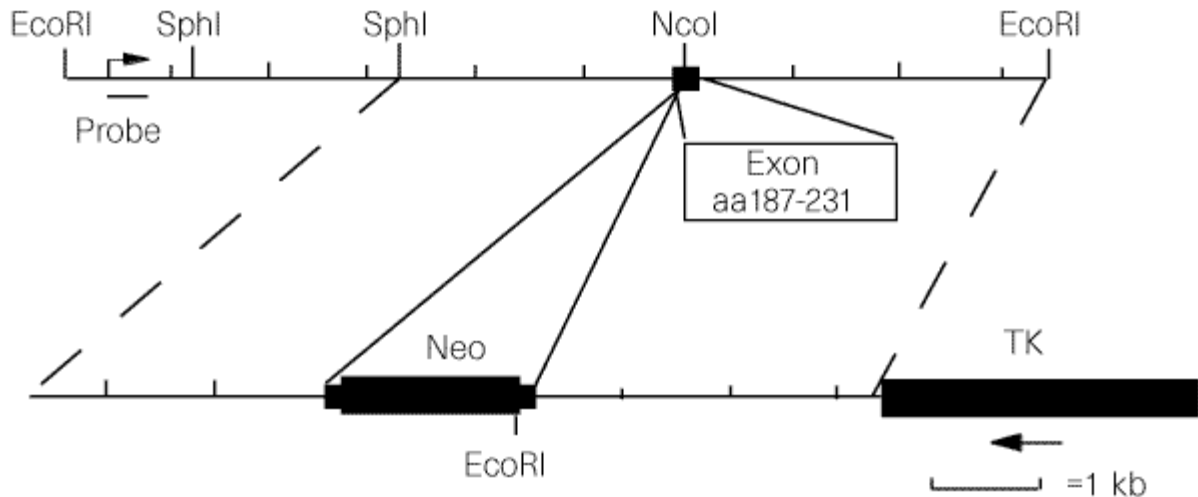


Figure 41 : Inactivation du gène de la cPLA₂ [Bonventre, 1997]

Le gène de la cPLA₂ a été inactivé par l'insertion d'une cassette *Neo* au niveau du premier exon de ce gène. La portion interrompue commence au niveau du codon codant pour l'aa 187 et se termine au niveau du 2nd nucléotide codant pour l'aa 232.

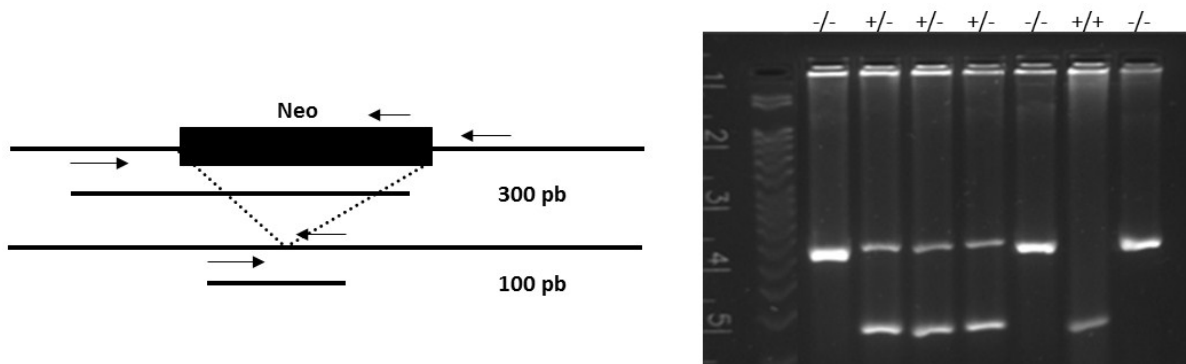


Figure 42 : Principe et exemple du génotypage des souris cPLA₂^{-/-}

Le génotypage des souris est basé sur les conséquences mêmes de l'inactivation du gène de la cPLA₂. Un couple de primers s'hybride de part et d'autre du site d'insertion de la cassette *Neo*. Un autre primer s'hybride au sein même de cette cassette *Neo*, responsable de l'inactivation du gène et uniquement présente sur l'allèle cPLA₂ KO (schéma de gauche). L'amplification d'un allèle cPLA₂ KO par PCR entraîne la génération d'un fragment d'ADN compris entre le premier primer jouxtant le site d'insertion et celui hybridé à la cassette *Neo*. Ce fragment possède une taille de 300 pb (en haut). L'amplification d'un allèle WT génère un fragment d'ADN limité par les deux primers répartis de part et d'autre du site d'insertion de la cassette et distant d'environ 100 pb. Le fragment ainsi produit a donc une taille de 100 pb (en bas). L'étude des produits de PCR permet donc le génotypage des animaux (à droite) : une souris cPLA₂^{+/+} donne une seule bande de 100 pb, une souris cPLA₂^{-/-} une bande unique de 300 pb et une souris cPLA₂^{+/-} ces deux bandes.

L'amplification par PCR d'un échantillon d'ADN, suivie de l'étude par électrophorèse des produits, permet de déterminer le génotype des animaux. On distinguera ainsi les 3 génotypes suivants ([Figure 42](#)) :

- génotype sauvage ($cPLA_2^{+/+}$) = 1 bande de 100 pb
- génotype hétérozygote ($cPLA_2^{+/-}$) = 1 bande à 100 pb et une bande à 300 pb
- génotype *KO* ($cPLA_2^{-/-}$) = 1 bande à 300 pb.

b) Protocole

1. Extraction de l'ADN à partir de la queue des souris

Après anesthésie de la souris à l'isoflurane (Minerve), un court fragment de queue (1 mm de longueur) est coupé au bistouri. Celui-ci est placé dans 200 μ L d'une solution de lyse, comportant la protéinase K et incubé à 55°C pendant une nuit sous agitation constante. Le lendemain, les tubes sont placés au bain-marie à 95 °C pendant 5 min, de manière à inactiver la protéinase K. Après une courte agitation au vortex, ils sont centrifugés à 10.000 x g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est récupéré et conservé à 4 °C jusqu'au génotypage.

2. Amplification par PCR

25 à 50 ng d'ADN (soit un volume de 10 μ L d'extrait) sont amplifiés dans un volume de réaction de 30 μ L. Les 20 μ L de solution de réaction contiennent 150 pmol de chaque amorce (Eurogentec), du tampon PCR 1X, 10 mM de dNTP, de la Taq polymérase (1 UI / 25 μ L), du $MgCl_2$ à 1,5 μ M, et de l' H_2O ultra pure qsp 20 μ L.

L'amplification consiste en 30 cycles de PCR dont les modalités ont été:

- dénaturation : 94 °C pendant 30 s
- hybridation : 55 °C pendant 30 s
- élongation : 72 °C pendant 30 s.

3. Etudes des produits de PCR par électrophorèse

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %, puis visualisés sous lumière UV.

5 μ L de tampon de dépôt 6 X (PCR Orange Loading Buffer, Jean Bioscience) ont été ajoutés aux 30 μ L de la réaction de PCR et homogénéisés. La composition de ce tampon de dépôt est la suivante : 60 mM Tris-HCl (pH 7,5), 60 mM acide éthylène diamine tétra acétique ([EDTA](#)), 60% (w/v) glycérol, Orange G, Eva Green[®].

20 µL de mélange ont été déposés sur un gel d'agarose à 2 %, immergé dans un tampon de migration Tris EDTA (90 mM Tris, 90 mM borate, 2 mM EDTA). La migration est effectuée sous une tension de 100 V pendant 40 min.

Les bandes correspondant aux produits d'amplification ont été visualisées sous UV dans l'analyseur d'images Versadoc (modèle 1000, Bio-Rad) *via* le logiciel d'analyse d'images *Quantity one V4.4* (Bio-Rad).

I – 3 Techniques d'injection intracérébroventriculaire

Les peptides Aβ(1-42) ont été synthétisés par la firme Bachem (Ref. : H-1368). Les solutions stock de peptides (à 1mM dans l'hexafluoro-2-propanol) ont été rapidement solubilisées à la concentration de 500 µM dans du tampon [PBS](#) (*phosphate buffered saline* : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄).

Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine – xylazine (Sigma Chemicals) respectivement à 0,08 % et 0,01 % en tampon PBS.

L'animal anesthésié est placé dans un appareil stéréotaxique muni d'un micro injecteur (Unimécanique). La tête de la souris est maintenue en place grâce à un système permettant la fixation sur les plans sagittal et frontal. La fixation sur le plan sagittal est réalisée grâce à deux barres d'oreilles introduites dans les conduits auditifs. La fixation sur le plan frontal se fait grâce à une plaque munie d'un anneau dans lequel les incisives sont engagées jusqu'à leur base et la distance antéropostérieure est réglée en tirant la plaquette vers l'avant jusqu'à apprécier la résistance des incisives. La position de la tête doit être ajustée pour que la hauteur de la surface osseuse soit la même aux points lambda et bregma. Une fois l'animal placé dans l'appareil à stéréotaxie, la peau de la région dorsale du crâne est nettoyée à l'éthanol 70 %, rasée puis incisée selon une ligne médio-longitudinale. On peut alors observer les points de repère osseux (lambda, bregma et suture sagittale) à partir desquels seront calculées les coordonnées d'injection, en prenant le *bregma* comme référence (Figures [43](#) et [44](#)).

Les coordonnées d'implantation sont calculées sur la base d'un trièdre de référence défini à la surface du crâne par :

- le plan horizontal, passant par la droite qui relie les conduits auditifs
- le plan sagittal médian, contenant la suture sagittale
- le plan vertical frontal contenant la ligne interaurale.

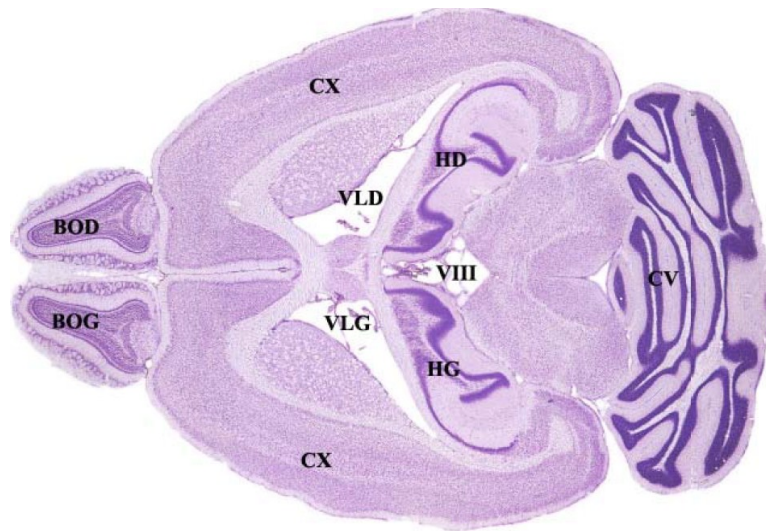


Figure 43 : Coupe horizontale d'un cerveau de souris après coloration à l'hématoxyline éosine

Abréviations : CX : cortex ; VIII : 3^{ème} ventricule ; CV : cervelet ; HD : hippocampe droit ; HG : hippocampe gauche ; BOD : bulbe olfactif droit ; BOG : bulbe olfactif gauche ; VLD : ventricule latéral droit ; VLG : ventricule latéral gauche.

Dans l'ensemble de nos manipulations *in vivo*, les injections intra cérébro ventriculaires (ICV) ont été réalisées dans le ventricule latéral droit (VLD).

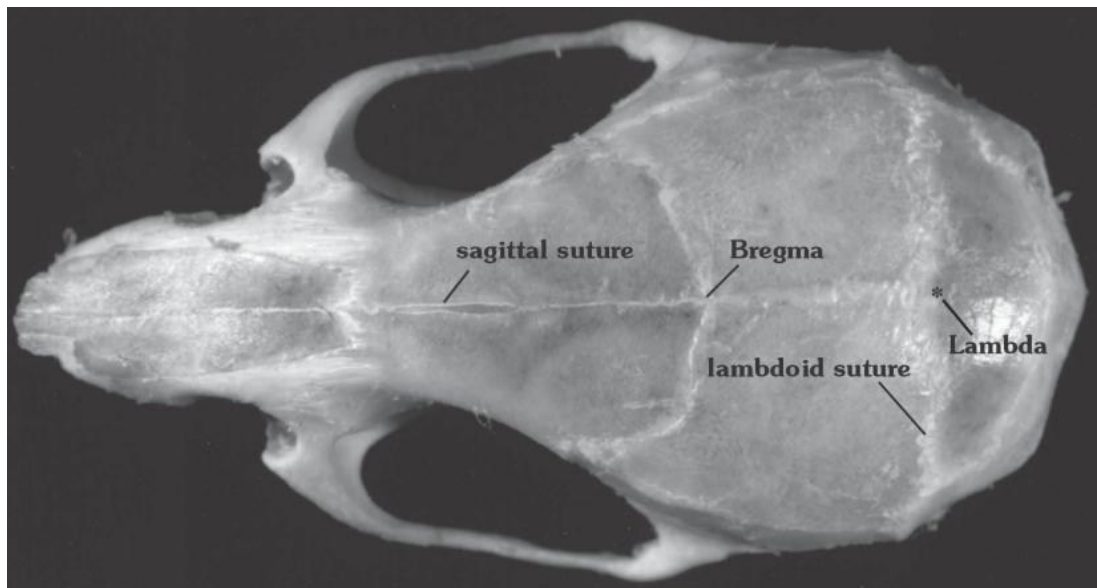


Figure 44 : Radiographie d'un crâne de souris indiquant les différents repères anatomiques utilisés comme référence pour les injections stéréotaxiques de peptide A β soluble

Le point anatomique utilisé pour positionner la référence du système stéréotaxique est le bregma, lequel permet de situer les différentes structures anatomiques selon le trièdre de référence, déterminé par : le plan horizontal, passant par la droite qui unit les conduits auditifs externes, le plan sagittal, contenant la suture sagittale, et le plan frontal, contenant la ligne interaurale.

La recherche des coordonnées du ventricule latéral droit a été réalisée à partir de l'atlas stéréotaxique du cerveau de souris et adaptée à nos conditions expérimentales [Youssef, 2008] (Figure 43) :

- Antéropostériorité = 0,22 mm antérieurement au plan vertical frontal
- Latéralité = 1 mm latéralement au plan sagittal médian
- Profondeur = 2,5 mm par rapport au plan horizontal.

A l'aide d'une fraise de dentiste (\varnothing 0,5 mm), un petit orifice est percé dans la voûte osseuse en prenant soin d'éviter toute lésion du sinus veineux sagittal supérieur et du réseau capillaire sous-jacent. Le système de micro-injection est alors introduit dans le ventricule droit. Ce système se compose d'une micro-seringue Hamilton 5 μ L (7000 Series Modified Microliter, Knurled Hub, 24 G, modèle 7105), actionnée par un moteur pas-à-pas et munie d'une aiguille de calibre 26. La solution de peptide A β (0,5 nmol dans 1 μ L) ou un volume équivalent de PBS (soluté contrôle) sont alors injectés automatiquement avec un débit 1 μ L/min pendant 1 min. A la fin de l'injection, l'aiguille est laissée en place pendant 2 min afin d'éviter le reflux de la solution injectée, puis remontée doucement. L'orifice est recouvert de cire hémostatique (Finescience, Phymep) et la peau de la région dorsale du crâne est recousue. A la fin de l'opération, l'animal est placé dans une cage individuelle. Les suites de l'intervention consistent essentiellement en une surveillance de l'état général et en la recherche d'infection locale. Compte-tenu de notre thématique de recherche, aucune médication, notamment des anti-inflammatoires non stéroïdiens, n'a été administrée aux animaux après l'intervention.

I – 4 Analyses comportementales

Le protocole expérimental mis en place dans le cadre de l'étude *in vivo* des troubles comportementaux et synaptiques, induits par les oligomères solubles de peptide A β , est présenté ci-dessous (Figure 45). Dans ce protocole, chaque groupe comporte 12 animaux.

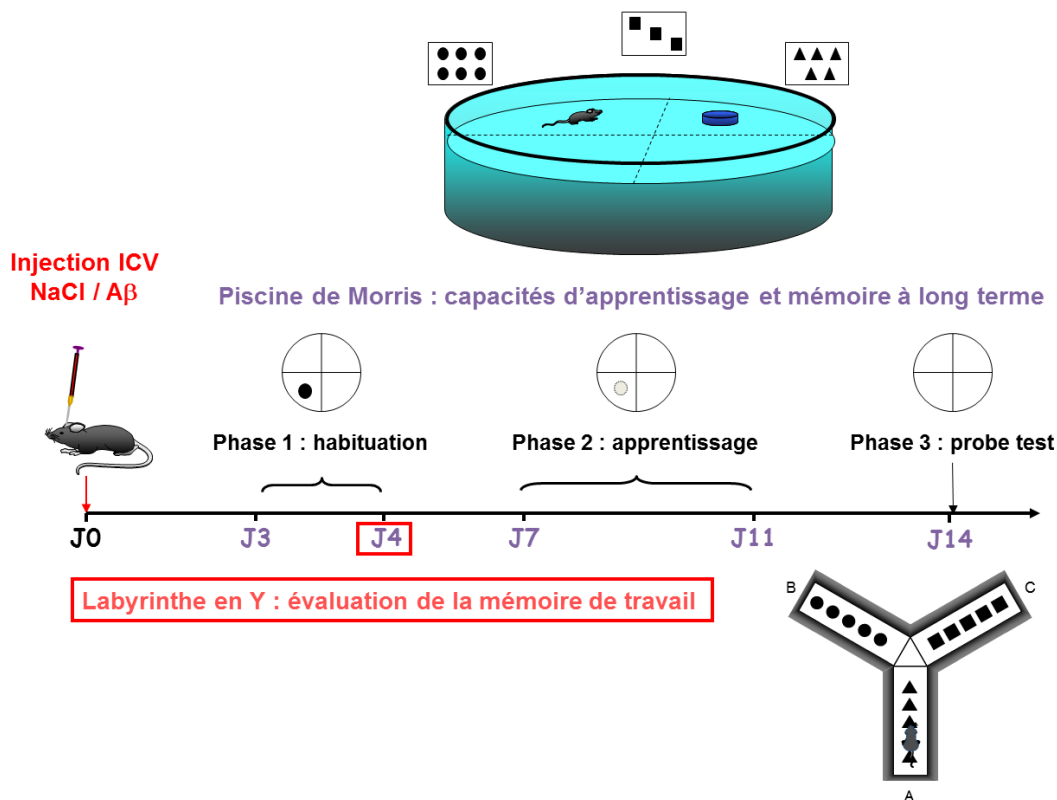


Figure 45 : Chronologie des différents tests comportementaux effectués après l'injection intra cérébro ventriculaire de peptide A β soluble

Les souris des différents génotypes ont été injectées en ICV avec 500 pmol d'oligomères solubles de peptide A β 42 ou un volume équivalent de PBS, utilisé comme contrôle. Le test du labyrinthe en Y, destiné à évaluer la mémoire de travail, a été effectué au 4^{ème} jour post injection. Le test de la piscine de Morris, qui explore les capacités d'apprentissage et de mémoire à long terme, se décompose en 3 phases réparties sur 14 jours après l'injection : une phase d'habitude à J3 - J4, une phase d'apprentissage sur 4 jours consécutifs, entre J7 et J11, et une phase finale de restitution ou *probe test* à J14. A la fin de ce *probe test*, les animaux ont été sacrifiés et leur cerveaux récupérés pour les analyses biochimiques.

I – 4 a. Labyrinthe en Y

Ce test apprécie la mémoire de travail et la mémoire de référence de chaque souris [Kokkinidis, 1976]. Le test est réalisé à J+4 après l'injection ICV.

Le labyrinthe en Y est composé de trois allées identiques disposées selon les médianes d'un triangle équilatéral (Figure 46). Les allées ont une longueur de 40 cm, une largeur de 9 cm et une hauteur de 16 cm (Nancy-Plast, Nancy). La structure est faite de plexiglas, les parois des allées sont opaques et le plancher est transparent. Le plancher de chaque allée (A, B et C) est recouvert de formes géométriques visibles par l'animal, destinées à lui servir de repères visuels différents ; les formes affichées étant différentes d'une allée à l'autre.

Le test commence lorsque la souris est introduite dans le labyrinthe, à l'extrémité d'une allée. A partir de ce moment, elle peut évoluer librement dans la structure pendant 5 min.

Son trajet est filmé par une caméra CCD reliée à un ordinateur, qui numérise les déplacements et les enregistre grâce à un logiciel spécifique (*VLIR track*, Intellibio). Pendant 5 min, chaque entrée de la souris dans un bras est notée, en suivant l'ordre de ses déplacements. L'entrée dans un bras est validée à partir du moment où la patte postérieure de la souris franchit la limite du bras considéré ; cette validation étant soumise à l'examen de la vidéo par l'opérateur. Les alternances sont considérées comme correctes lorsque la souris visite successivement les 3 bras du labyrinthe. Le résultat du test est exprimé en pourcentage d'alternances, soit le nombre d'alternances correctes divisé par le nombre total d'alternances possibles (soit nombre total d'entrées - 2), multiplié par 100. Ce calcul des résultats est résumé par la formule suivante :

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

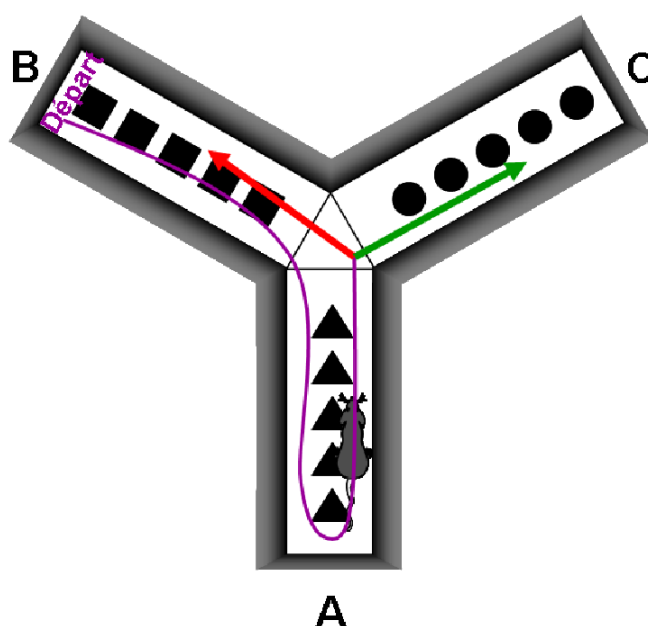


Figure 46 : Labyrinthe en Y ou *Y-maze test*

Ce test étudie la mémoire à court terme. L'appareil est composé de 3 bras (notés A, B et C) en plexiglas noir opaque orientés à 120° les uns par rapport aux autres. Le sol est couvert de figures géométriques constituant autant d'indices permettant à l'animal de se retrouver dans les différents bras. Pendant 5 min, l'animal explore librement le dispositif et la séquence des bras visités est enregistrée à l'aide du système vidéo. L'entrée de l'animal dans un bras est validée lorsque son train arrière passe une ligne fictive située à 5 cm de l'entrée du bras correspondant.

Dans cet exemple, l'animal est introduit dans le bras B (**Départ**) et va dans le bras A. Lorsque l'animal repart vers le centre du dispositif, il a alors le choix entre le bras B d'où il vient (flèche **rouge**) et le bras C qu'il n'a pas encore exploré (flèche **verte**). Le choix du bras inexploré conduit à une alternance, soit la séquence B - A - C.

I – 4 b. Labyrinthe aquatique de Morris

Ce test, conçu par Morris, permet d'évaluer les capacités de l'animal à mémoriser et à gérer l'information spatiale, lorsqu'il est placé dans une situation aversive (l'eau d'un bassin) [Morris, 1984]. Il va ainsi chercher à atteindre un refuge le plus rapidement possible (une plateforme rendue invisible par immersion), en se basant sur ses souvenirs.

Le dispositif expérimental de ce test est constitué d'un bassin cylindrique en Altuglace gris (diamètre : 90 cm ; hauteur : 50cm) rempli d'eau sur une hauteur de 25 cm (Figure 47). L'eau du bassin est maintenue à une température de 22°C, ce qui est aversif pour l'animal. Elle est rendue opaque après adjonction d'une faible quantité de peinture acrylique blanche (Nancy-Plast, Nancy), afin de masquer l'emplacement de la plateforme. Ce bassin est arbitrairement découpé en 4 quadrants de surface égale : le quadrant « Plateforme », où est placée la plateforme, le quadrant « Anti-plateforme », diamétralement opposé au précédent, les deux quadrants restant étant dénommés « Nord – Est » et « Sud – Ouest ». La plateforme est formée d'un cylindre en plastique gris opaque. Elle est disposée dans le bassin, au centre d'un des quadrants. Comme elle est située à 1cm en dessous de la surface, elle n'est pas visible par l'animal. Le bassin est placé dans une pièce éclairée de façon homogène à une intensité lumineuse de 100 lux. Autour du bassin, sont disposés plusieurs repères distaux (feuilles comportant des formes géométriques différentes), fournissant des repères spatiaux à la souris et lui permettant de s'orienter. Ainsi, la souris peut repérer la position de la plateforme par rapport à un ensemble de références allocentriques.

Le trajet effectué par l'animal dans la piscine est filmé par une caméra reliée à un ordinateur qui numérise les images et les enregistre grâce au logiciel VLIR TRACK[®] (Intellibio). Ce logiciel permet d'exploiter automatiquement les données et de calculer entre autres, le temps mis par l'animal pour atteindre la plateforme (Figure 48).

Le test se déroule en 3 phases :

a) Phase d'habituation (J+3 et J+4 post-injection) : Durant cette période, la plateforme est déposée dans la piscine et sa surface reste émergée. Elle est donc visible pour l'animal. Cette étape vise à montrer à l'animal que la plateforme est son seul refuge dans la piscine (Figure 49). Au cours de cette étape, il n'y a pas de repères extérieurs disposés autour du bassin. Quatre passages sont organisés par jour (deux le matin et deux l'après-midi), avec changement de l'emplacement de la plateforme et de l'endroit de mise à l'eau de l'animal à chaque passage. Si l'animal ne parvient pas à trouver la plateforme et à s'y hisser au bout de

1 min, l'expérimentateur l'y amène manuellement et l'y laisse dessus pendant 30 s. La souris est ensuite replacée dans sa cage. La position de la plateforme et les points de mise à l'eau sont choisis de manière aléatoire dans les 4 quadrants du bassin.

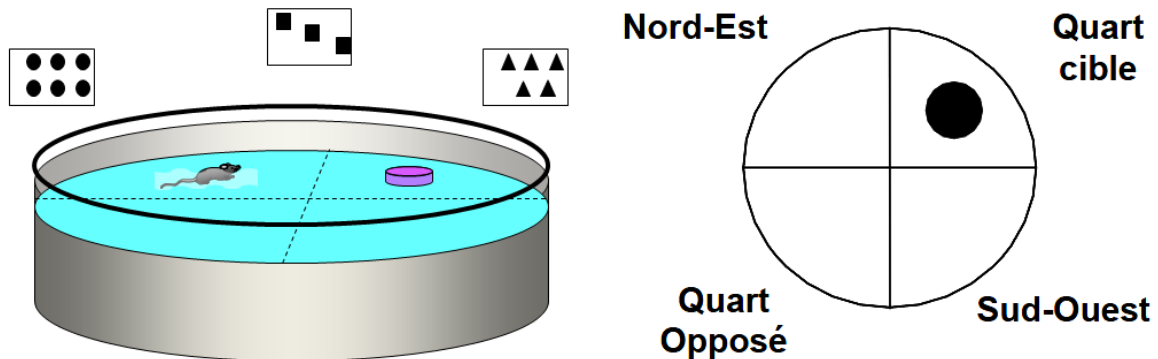


Figure 47 : Labyrinthe aquatique de Morris ou *Morris water maze*

La souris est déposée dans un cylindre rempli d'eau et contenant une plate forme sur laquelle la souris peut se hisser. Des indices visuels entourent le bassin de manière à fournir des repères à la souris afin qu'elle puisse plus facilement localiser sa position et retrouver la plateforme. La piscine est subdivisée en quatre quadrants égaux, nommés suivant leur position par rapport à la plate forme. Le quadrant contenant cette dernière est qualifié de « quadrant cible ».

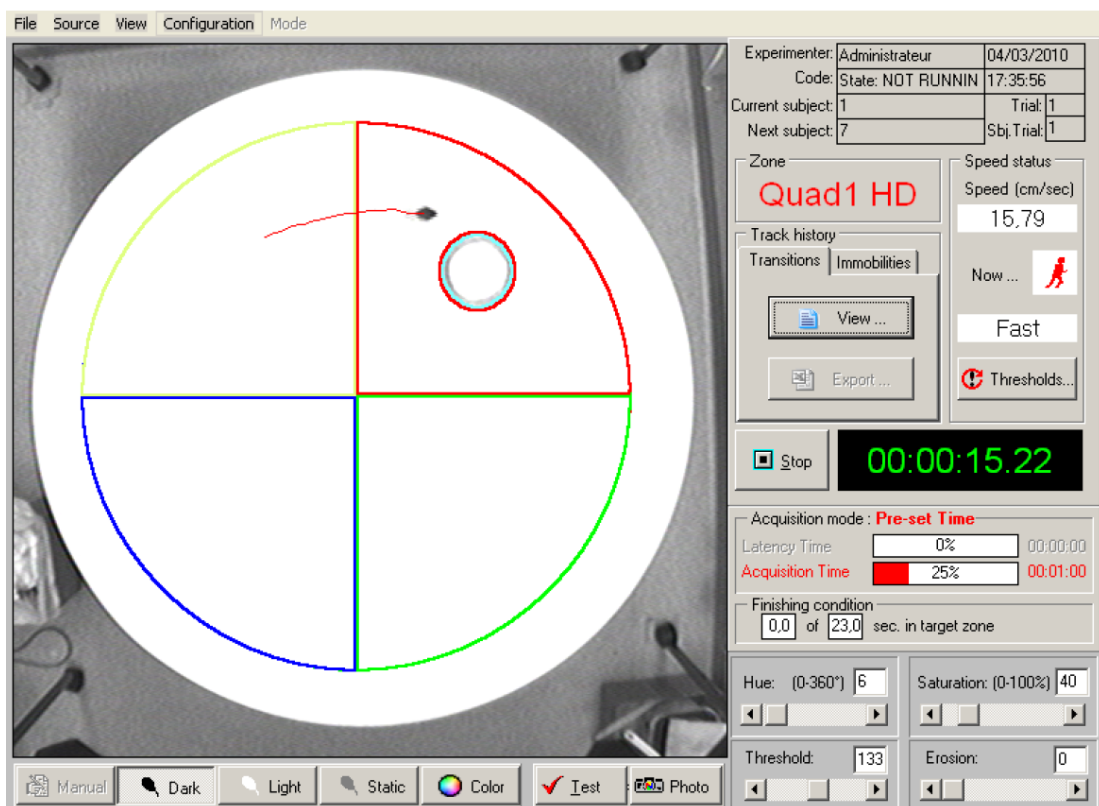


Figure 48 : Système de *video tracking* utilisé pour l'exploitation quantitative des déplacements de la souris dans le labyrinthe aquatique de Morris

En plus du conditionnement, cette étape permet de vérifier que les capacités motrices des animaux n'ont pas été altérées suite à l'injection. Après cette première étape, les souris disposent de 2 jours de repos avant le test de la mémoire spatiale.

b) Test de la mémoire spatiale (J+7 à J+11 post injection) : Au cours de cette étape, la plateforme est immergée, et donc rendue invisible. Sa position dans le bassin reste constante tout au long du test. De plus, des formes géométriques sont affichées tout autour de la piscine. La tâche de la souris consiste donc à localiser la plateforme immergée, en s'aidant de ses souvenirs et des repères spatiaux mis à sa disposition. Chaque souris subit 4 passages quotidiens (deux le matin et deux l'après-midi), ces passages étant séparés d'au moins 45 min ([Figure 49](#)). A chaque passage, l'animal est déposé dans l'eau face à la paroi depuis un point de départ déterminé, ce point de départ étant choisi de manière aléatoire pour chaque souris. L'essai se termine lorsque l'animal atteint la plateforme, ou bien lorsque 60 s se sont écoulées depuis sa mise à l'eau. Si la souris ne parvient pas à trouver la plateforme durant ce délai, elle y est amenée par l'opérateur. Une fois que la souris s'est hissée sur la plateforme (ou qu'elle y a été amenée), l'opérateur la laisse dessus pendant 30 s supplémentaires, avant de la ramener dans sa cage. Les différentes variables mesurées sont la latence d'atteinte de la plateforme (maximum 60 s), la distance parcourue entre le point de mise à l'eau et la plateforme, ainsi que la vitesse de nage. La performance d'apprentissage est évaluée par la diminution de la latence d'atteinte de la plateforme et de la distance parcourue au cours des 5 jours de mesure.

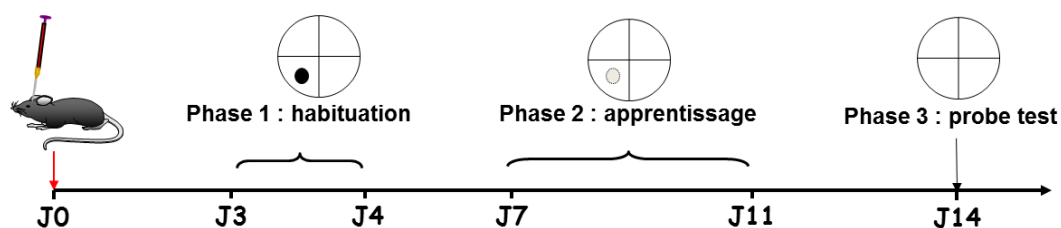
c) Test de rétention (ou « *Probe Test* », à J+14 post injection) : Durant cette ultime phase, la plateforme est retirée du bassin ([Figure 49](#)). La souris dispose de 60 s de nage libre, où elle explore le bassin à la recherche de la plateforme, qu'elle n'arrivera pas à trouver. Le test de rétention mnésique étudie le souvenir de la position de la plateforme dans le bassin. Il mesure donc le temps passé par l'animal dans chaque quadrant pendant la durée du test, ainsi que le nombre de passages au niveau de l'ancien emplacement de la plateforme.

I – 4 c. Analyses des données

Les données obtenues dans les différents tests comportementaux vont se décliner sous forme de :

a) mesures quantitatives : temps de latence pour atteindre la plateforme, distance totale parcourue, vitesse de nage ou temps passé dans un quadrant (piscine de Morris)

**Injection ICV
NaCl / A β**



Phase du test	Habituation	Apprentissage	Restitution
Objectifs	Connaissance de la plateforme Capacités motrices	Performances d'apprentissage Mémoire à long terme	Souvenir de la position de la plateforme Mémoire à long terme
Plateforme	Présente et visible	Présente et invisible	Absente
Position plateforme	Aléatoire	Constante	Sans objet
Position de lâcher	Aléatoire	Fixe	Fixe
Indices visuels	Absents	Présents	Présents
Durée (jours)	2	4	1
Passages / jour	4 (2 + 2)	4 (intervalle = 45 min)	1
Durée passage(s)	60 s	60 s	60 s
Paramètres mesurés	Aucun	Latence d'atteinte de la plateforme Distance parcourue Vitesse de nage	Temps passé dans chaque quadrant Nombre de passages dans le quadrant cible

Figure 49 : Etapes du labyrinthe aquatique de Morris : chronologie et objectifs

La piscine de Morris (ou labyrinthe aquatique de Morris ou *Morris water maze*) explore les capacités d'apprentissage et de mémorisation à long terme. Elle se décompose en 3 étapes successives, réparties entre le 3^{ème} et le 14^{ème} jour suivant l'injection ICV d'oligomères solubles de peptide A β . Le schéma donne la chronologie de ces différentes phases par rapport à l'injection. Le tableau qui lui est accolé synthétise les différentes caractéristiques de chacune de ces phases, notamment la position et la visibilité de la plateforme, la présence d'indices visuels, l'organisation des lâchers dans la piscine, et surtout les objectifs de chacune de ces phases et les paramètres mesurés par l'opérateur.

b) pourcentage d'alternances effectuées par rapport au nombre total d'alternances possibles (labyrinthe en Y).

L'ensemble de ces données a été traité par analyse de variance ([ANOVA](#)) à un ou plusieurs facteurs, selon le paramètre considéré (traitement, quadrant...). Certains paramètres ont éventuellement pu faire l'objet de mesures répétées (plusieurs mesures par jour ou mesures répétées plusieurs jours d'affilée). Lorsqu'une interaction est significative, un ANOVA à un seul facteur, suivi du test de Fisher est utilisé pour comparer les différents groupes. Le degré de significativité retenu est alors : $p < 0,05$.

I – 5 Préparation des échantillons tissulaires pour analyses biochimiques

I – 5 a. Homogénats de structures cérébrales

La souris est sacrifiée par inhalation d'une dose létale d'halothane (Mundipharma, Boulogne-Billancourt), sous hotte chimique. La boîte crânienne est ouverte et le cerveau extrait, ce qui permet d'en disséquer les principales régions d'intérêt (hippocampe, cortex, bulbe olfactif, cortex frontal, cervelet).

Les structures ainsi isolées sont ensuite broyées et homogénéisées à l'aide d'un appareil de Potter dans du tampon de lyse RIPA froid additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete cocktail[®] Roche). La composition de ce tampon RIPA est la suivante : 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% nonidet NP-40, 1% sodium déoxycholate, 0.1% SDS. Le volume de tampon utilisé est variable suivant la taille de la structure cérébrale préparée : 200 µL pour le cortex frontal, 500 µL pour l'hippocampe et 1,5 mL pour le cortex hémisphérique.

Ce broyage est suivi d'une homogénéisation supplémentaire du lysat avec une seringue à tuberculine équipée d'une aiguille de 23 Gauge, en effectuant une dizaine d'« allers-retours ».

Les homogénats sont ensuite soumis à 3 cycles de congélation et décongélation, puis centrifugés à 4°C pendant 20 min à 10000 x g. Le surnageant est alors récupéré pour dosage des protéines par la méthode BCA (kit Interchim, cf. [paragraphe III – 2](#)), puis conservé à –80°C jusqu'à utilisation.

I – 5 b. Préparation de fractions enrichies en neurosynaptosomes

Les fractions de synaptosomes (vésicules issues des membranes synaptiques) ont été préparées à partir de structures cérébrales, notamment l'hippocampe, selon la technique décrite par Keller [[Keller, 1997](#)].

Après sacrifice de l'animal, les régions cérébrales sont disséquées de manière analogue à celle décrite pour la réalisation d'homogénats de structures cérébrales (cf. [paragraphe I-5 a](#)). Les structures sont rapidement homogénéisées dans un appareil de Potter contenant un tampon Tris 10 mM (pH 7,4) glacé, contenant 0,32 mM de sucrose, 2 mL d'EDTA, 10 µg/mL d'orthovanadate de sodium et des inhibiteurs de protéases (Complete cocktail[®] Roche).

L'homogénat est alors centrifugé à 800 x g pendant 15 min, de manière à éliminer les noyaux et autres débris cellulaires.

Le surnageant résultant subit ensuite une nouvelle centrifugation à 12000 x g pendant 20 min. A l'issue de cette 2^{ème} centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension en tampon PBS, de manière à obtenir la préparation synaptosomale. Un dosage de protéines est immédiatement réalisé sur cette préparation par la technique BCA (kit Interchim, cf. [paragraphe III – 2](#)). Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

L'ensemble des opérations décrites ci-dessus, ainsi que la conservation des échantillons entre les différentes étapes, sont réalisées sur lit de glace pilée. De même, toutes les centrifugations sont réalisées à 4 °C, afin de prévenir toute dégradation des protéines.

II – Cultures cellulaires et expérimentations *in vitro* sur neurones corticaux

II – 1 Cultures de neurones corticaux et de cellules HEK exprimant la protéine APP humaine

II – 1 a. Cultures primaires de neurones corticaux de souris et de rat à JE16

L'ensemble de l'opération est effectué sous hotte à flux laminaire, en respectant les règles de base d'asepsie. Le matériel employé pour les cultures est soit préalablement stérilisé (matériel à dissection), soit à usage unique (plaques, consommables, pointes, cônes, pipettes).

Préalablement à la culture (la veille ou au minimum 3 h avant), les supports de culture sont traités par une solution stérile de poly-ornithine (Sigma) à la concentration de 15 µg/mL pour les boîtes de culture en plastique (Falcon, Becton-Dickinson & Co) et de 150 µg/mL pour les lamelles de verre destinées à la microscopie. Les plaques sont ensuite conservées dans un incubateur (IGO150, JOUAN) à 35°C sous 6% CO₂ en atmosphère humide, jusqu'à utilisation. La poly-ornithine forme un réseau polymérique homogène à la surface des supports de culture, qui permet l'adhérence des neurones [Pillot, 1999].

La composition de ces différents milieux de culture est indiquée dans le [tableau 14](#).

Immédiatement avant la dissection, la poly-ornithine est aspirée et les puits sont rincés 2 fois à l'eau MilliQ stérile, puis lavés 1 fois avec une solution de PBS-glucose (tampon PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ (Invitrogen, Réf. 14200-091), 330 µM glucose).

Au 17^{ème} jour de gestation, la souris (ou la rate) est sacrifiée par inhalation d'une dose létale d'halothane (Mundipharma, Boulogne-Billancourt), sous hotte extractive. Après désinfection rapide à l'éthanol, l'abdomen est incisé et l'utérus gravide est récupéré puis rincé avec une solution de PBS-glucose.

Après ouverture de la paroi utérine et du sac vitellin, les embryons sont décapités dans du PBS-glucose. Une incision transversale permet alors d'ouvrir la boîte crânienne et ainsi d'en dégager le cerveau. Celui-ci est ensuite disséqué en milieu PBS-glucose sous loupe binoculaire : les hémisphères sont séparés du tronc cérébral, les méninges et les bulbes olfactifs sont retirés, les cortex sont prélevés et conservés en milieu MH.

Milieu	Composition	Concentration	Fournisseur (& référence)
Milieu de base (pH = 7,4)	DMEM (<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>)		Invitrogen (31600-083)
	Ham's F12		Invitrogen (32500-035)
	L-glutamine	200 mM	Invitrogen
	D-glucose	35 mM	Sigma
	NaHCO ₃	800 mM	Sigma
	HEPES	100 mM	Invitrogen
	Pénicilline / Streptomycine	10 UI/L	Invitrogen
Milieu complet (pH = 7,4) (milieu M2)	Milieu de base		
	Apotransferrine	1,25 µM	Sigma
	Insuline	4,5 µM	Sigma
	Progestérone	20 µM	Sigma
	Putrescine	60 µM	Sigma
	Sélénium	30 µM	Sigma
Milieu de croissance (milieu M2-OV)	Milieu complet		
	Ovalbumine	20 µM	Sigma

Tableau 14 : Composition des différents milieux utilisés pour la culture primaire de neurones corticaux embryonnaires de souris et de rat

Les cortex sont découpés en fins fragments, en poolant les cortex de 4 à 5 embryons, puis les morceaux sont incubés dans 10 mL d'une solution de trypsine-EDTA en PBS (18,8 µM trypsine, 6,8 µM EDTA (Invitrogen, Réf. 15400-054)), pendant 4 min à température ambiante, sous agitation lente et douce. Après une phase de décantation durant 1 min, la trypsine est aspirée et les tissus sont incubés dans 3,8 mL de solution d'arrêt pendant 10 min à 37°C. Cette solution d'arrêt est composée de sérum de veau fœtal ([SVE](#)) (Invitrogen) à 2,5% et 0,06 mg de DNase (soit 24 à 48 unités Kunitz), en milieu MH.

Les cellules sont dissociées par une série d'aspiration / refoulement à la pipette. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois en PBS-glucose, chaque lavage étant suivi d'une centrifugation de 5 min à 700 x g.

Finalement, le culot est remis en suspension dans 4 à 6 mL de milieu MSS 1X (ce volume étant variable en fonction du nombre d'embryons récupérés). Après homogénéisation, la densité cellulaire est évaluée par comptage des cellules sur un hématimètre de Thoma.

Les plaques de culture sontensemencées à une densité cellulaire de 0,3 x 10⁶ par puits de 1,9 cm² de surface (plaques 24 puits) ou 1,5 x 10⁶ par puits de 9,5 cm² de surface (plaques 6

puits), les neurones étant alors placés dans du milieu de croissance, contenant de l'ovalbumine à 20 μ M (M2-OV).

Les neurones primaires sont conservés dans un incubateur (IGO150, JOUAN) à 35°C sous 6% de CO₂, dans une atmosphère humidifiée.

Après 7 jours *in vitro* (DIV), la population cellulaire est caractérisée, par immunomarquage, comme étant composée de neurones à plus de 95 %.

Toutes les expériences décrites ici ont été réalisées à ce stade (7 DIV).

II – 1 b. Cultures de cellules de rein embryonnaire humain exprimant la forme non mutée de la protéine APP (HEK-APPwt)

Nous avons choisi un système cellulaire exprimant la forme non mutante de la protéine APP humaine (hAPPwt). Ce système a été établi dans des cellules HEK 293, une lignée de cellules de rein embryonnaire humain. Ces cellules ont été transfectées par un plasmide contenant l'ADNc de la forme sauvage de la protéine APP humaine. Ces cellules expriment donc de manière stable la protéine APP humaine [[Seiffert, 2000](#)]. Elles ont été utilisées, entre autres, pour l'étude du métabolisme de l'APP et l'analyse d'inhibiteurs pharmacologiques des γ -sécrétases [[Laras, 2005](#)]. Des cellules HEK transfectées avec un vecteur vide ont été utilisées comme témoin.

Ces différentes cellules ont été gracieusement données par le Dr Jean-Louis KRAUS (Département de Chimie – Faculté des Sciences de Luminy ; Université de la Méditerranée) au Dr Thierry PILLOT (Laboratoire Lipidomix – Institut National Polytechnique de Lorraine, Université de Lorraine).

Les cellules HEK-293 exprimant la protéine APP (HEK-APPwt) et les cellules HEK témoins (HEK) ont été cultivées dans du milieu [DMEM](#) (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco), contenant 10 % de SVF, 100 UI/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine. Ces cultures cellulaires ont été conservées jusqu'à utilisation dans un incubateur (IGO150, JOUAN) à 35°C sous 6% de CO₂, dans une atmosphère humidifiée.

II – 2 Traitements par le peptide A β et les inhibiteurs

II – 2 a. Traitement par le peptide A β soluble

Les traitements par le peptide A β sont réalisés 6 jours après la mise en culture des neurones. Les solutions stock de peptides (à 1mM dans l'hexafluoro-2-propanol) sont rapidement solubilisées dans du milieu complet M2 sans ovalbumine, pour une concentration finale de 1 ou 5 μ M. Le milieu précédent est aspiré des supports de culture et immédiatement remplacé par du milieu frais contenant le peptide A β soluble. Les neurones sont exposés à des concentrations 1 ou 5 μ M d'oligomères solubles de peptide A β (1-42), pendant des durées variables allant de 6 h à 48 h. La toxicité cellulaire du peptide a été évaluée après 24 à 48 h de traitement. Pour les expériences cherchant à évaluer l'impact du peptide A β oligomérique sur les voies de signalisation, des temps d'incubation réduits (6 h) ont été employés. Les différentes modalités d'exposition des neurones en culture aux oligomères solubles de peptide A β sont mentionnées dans le [tableau 15](#).

II – 2 b. Traitement par le méthyl arachidonyl fluorophosphonate

L'inhibiteur pharmacologique choisi pour notre travail est le MAFP (Sigma Ref.: M2939). Il s'agit d'un inhibiteur irréversible de la cPLA $_2$, dirigé contre le site actif de l'enzyme [[Farooqui, 1999](#)]. Les neurones ont été incubés en présence de MAFP à 1 ou 2 μ M, dissous dans du milieu complet M2, pendant 24 h ([Tableau 15](#)).

La structure chimique du MAFP est rappelée dans la [figure 50](#) ci-dessous.

II – 2 c. Traitement par les oligonucléotides antisens

Les ASO utilisés dans ce travail pour inhiber l'expression de la cPLA $_2$ sont identiques à ceux employés par notre équipe dans une précédente étude [[Kriem, 2005](#)]. Deux couples d'ASO ont été administrés aux neurones : deux oligonucléotides antisens AS1 et AS2 (inhibiteurs) et deux oligonucléotides sens S1 et S2 (témoins). Les neurones ont été incubés pendant 48 h en présence de ces différents oligonucléotides, préalablement dilués à 4 μ M dans du milieu complet M2 ([Tableau 15](#)). Les séquences respectives de ces ASO sont mentionnées dans le [tableau 16](#) ci-après.

II – 2 d. Traitement par le pseudo substrat de la PKC ζ

Afin d'étudier l'origine de la résistance des neurones cPLA $_2$ ^{-/-}, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de la PKC ζ . Celui-ci correspond à un peptide synthétique dont la séquence

est homologue au domaine régulateur de l'enzyme. Il est ainsi qualifié de pseudo substrat de la PKC ζ ([PKC \$\zeta\$ -PS](#)). Ce peptide peut ainsi se lier au domaine catalytique de la PKC ζ et inhiber son activité enzymatique. Afin de favoriser sa pénétration dans les cellules, ce peptide est myristoylé ([Figure 51](#)). La séquence de ce peptide est indiquée ci-dessous :

Myr-Ser-Ile-Tyr-Arg-Arg-Gly-Ala-Arg-Arg-Trp-Arg-Lys-Leu-OH

Le PKC ζ -PS a été obtenu auprès de la firme Invitrogen (Ref. : 77749). Les neurones ont été incubés en présence de PKC ζ -Ps à 1 μ M et de peptide A β (1-42) à 1 μ M, dissous dans du milieu M2, pendant 24 h ([Tableau 15](#)).

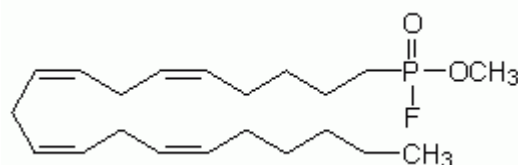


Figure 50 : Structure chimique du méthyl arachidonoyl fluorophosphonate

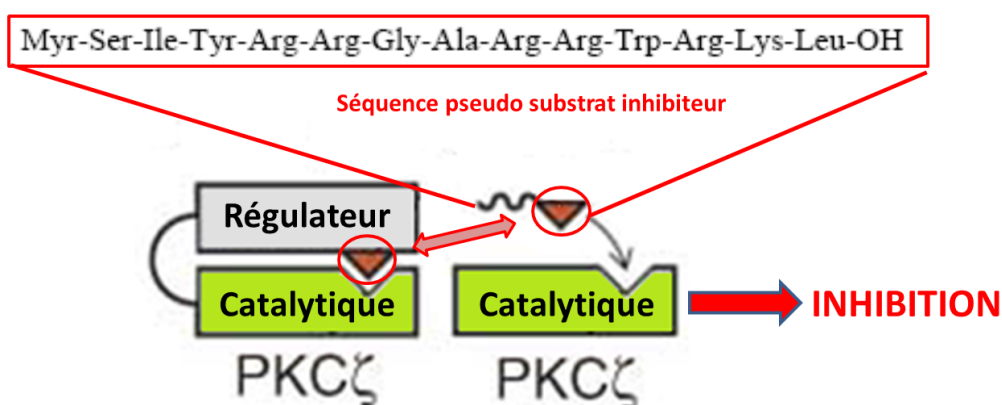


Figure 51 : Séquence peptidique et principe de l'inhibition de la PKC ζ par son pseudo substrat

Le pseudo substrat est composé d'un peptide ayant une séquence homologue à la séquence inhibitrice du domaine régulateur de la PKC ζ . Il pénètre dans la cellule grâce à son extrémité N-ter myristoylée. Il occupe la place de la séquence régulatrice au niveau du domaine catalytique, empêchant ce dernier de fonctionner.

Traitement	Concent°	Durée	Paramètres	Fournisseur	Référence
Peptide A β (1-42)	1 μ M	6 h	SMases, Akt, PSD95	Bachem	H-1368
	1 μ M	24 h	Apoptose		
	5 μ M	24 h	Apoptose		
PKC ζ -PS	1 μ M	24 h	En association avec A β 1 μ M : Apoptose	Invitrogen	77749
MAFP	1 et 2 μ M	24 h	Expression APP	Calbiochem	454565
ASO	4 μ M	48 h	Expression APP	Eurogentec	AS1, AS2, SC1, SC2

Tableau 15 : Récapitulatif des différents traitements utilisés sur les neurones corticaux embryonnaires en culture primaire

Désignation	Type	Séquence
AS1	Antisens	5'-TCC CCT TGG TTA CTT TGG TG-3'
AS2	Antisens	5'-CAT TTT GGT CCC AGC TGC AG-3'
S1	Sens	5'-CAC CAA AGT AAC CAA GGG GA-3'
S2	Sens	5'-CTG CAG CTG GGA CCA AAA TG-3'

Tableau 16 : Oligonucléotides antisens utilisés pour l'inhibition de l'expression de la cPLA₂ dans les neurones corticaux en culture primaire

II – 3 Préparation des échantillons cellulaires

Des neurones primaires, cultivés dans les différentes conditions expérimentales précédemment décrites, ont été lavés deux fois avec du PSB glacé. Les cellules ont ensuite été solubilisées dans 25 mL de tampon de lyse RIPA : 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% nonidet NP-40, 1% sodium déoxycholate, 0.1% SDS et des inhibiteurs de protéases (Complete Roche). Après homogénéisation à la seringue, les cellules recueillies ont été lysées par 3 cycles de congélation et décongélation. Finalement, le lysat a été centrifugé à 4°C pendant 10 min à 10000 x g et le surnageant récupéré et conservé à -20°C. La concentration de protéines dans le surnageant a été déterminée par la méthode à l'acide bicinchoninique (« *BCA Protein Assay Kit* », Pierce, Ref. : 23227).

II – 4 Etude de la viabilité cellulaire

II – 4 a. Mesure de la cytotoxicité par test au bromure de 3-(4,5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5 -diphényl tétrazolium (ou *Test MTT*)

a) Principe

Les sels de tétrazolium sont des composés organiques hétérocycliques qui forment, après réduction, des formazans insolubles et colorés. Comme la réduction de ces composés ne peut avoir lieu que dans des cellules métaboliquement actives, ces composés sont utilisés pour apprécier la viabilité des cellules et l'état de leurs systèmes redox [[Mosmann, 1983](#)].

Le bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ([MTT](#)) est un sel de monotétrazolium couramment utilisé pour mesurer la prolifération cellulaire et la cytotoxicité [[Sponne, 2004](#)]. Dans les cellules vivantes, le sel de tétrazolium est converti dans les mitochondries intactes en formazan qui, sous l'action de déshydrogénases génératrices de NADH, forme un précipité violet pouvant être détecté par spectrophotométrie après

solubilisation dans du diméthylsulfoxyde ([DMSO](#)). Cette conversion cellulaire est considérée comme directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

b) Protocole

Les neurones sont incubés pendant 1 h dans l'incubateur (IGO150, JOUAN) à 35°C en présence de MTT 12 mM (Sigma), puis lysés par l'ajout d'une solution de DMSO (Prolabo), à raison de 150 µL/puits. Les cristaux de formazan sont dissous par 10 min d'agitation vigoureuse sur un agitateur de plaques (Heidorph). Des prélèvements de 100 µL par puits sont transférés dans les puits d'une microplaque de 96 puits (Nunc) et l'absorbance est mesurée à 570 nm dans un lecteur de microplaques (Fluostar Galaxy, BMG-Labtechnologies). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux valeurs obtenues à partir de neurones témoins.

II – 4 b. Détection des corps apoptotiques par marquage nucléaire au DAPI

a) Principe

La morphologie nucléaire et la structure de la chromatine sont fortement affectées au cours de la mort cellulaire programmée [[Sponne, 2004](#)]. L'état du noyau et la structure de la chromatine peuvent être visualisés par l'incorporation d'un fluorochrome, le 4,6-diamidino-2- phénylindole ([DAPI](#), Sigma Chemicals) qui se fixe sur les séquences nucléotidiques composées d'une succession de bases A-T. On peut ainsi distinguer les corps apoptotiques des cellules intactes et quantifier la proportion de cellules en apoptose [[Sponne, 2004](#)].

b) Protocole

Les neurones sont mis en culture sur des lamelles de verre préalablement déposées au fond des puits des plaques de culture. Le milieu de culture est retiré par aspiration et les cellules sont rincées 3 fois dans la solution de PBS 1X, puis fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde à 4%. Après 3 rinçages successifs dans la solution de PBS 1X, les cellules sont incubées en présence d'une solution de DAPI 0,001 % (Sigma), pendant 10 à 15 min, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 3 rinçages successifs au PBS suivis d'une étape dans H₂O ultra pure, les lamelles sont retirées des puits et fixées sur des lames à l'aide d'une goutte de milieu de montage (Gel Mont, Microm). Après une nuit de séchage à 4°C, les noyaux des cellules sont observés au microscope à fluorescence (Nikon) équipé d'un filtre UV ($\lambda_{exc} = 358 \text{ nm}$, $\lambda_{émi} = 461 \text{ nm}$).

Pour évaluer le pourcentage de cellules apoptotiques, les cellules sont comptées dans 10 champs microscopiques indépendants, choisis de façon aléatoire (environ 400 cellules). Ce comptage a été réalisé dans 3 expériences séparées avec 3 déterminations chacune [[Kriem, 2005](#)].

III – Techniques d’analyse biochimiques

III – 1 Préparation des oligomères solubles de peptide A β

Les oligomères solubles de peptide A β (1-42) ont été préparés selon le protocole mis au point par Pillot et coll. [Pillot, 1999]. Les peptides synthétiques fournis par Bachem (Ref. : H-1368) ont été solubilisés dans l’hexafluoro-2-propanol (Sigma Aldrich) à une concentration de 1 mM. Au moment de l’utilisation, des aliquotes de la solution stock sont rapidement solubilisés, à la concentration voulue, dans le milieu de culture pour les expérimentations *in vitro*, ou dans du PBS pour les injections *in vivo*.

Le niveau d’oligomérisation du peptide A β est apprécié par électrophorèse de la préparation en gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie (Figure 52).

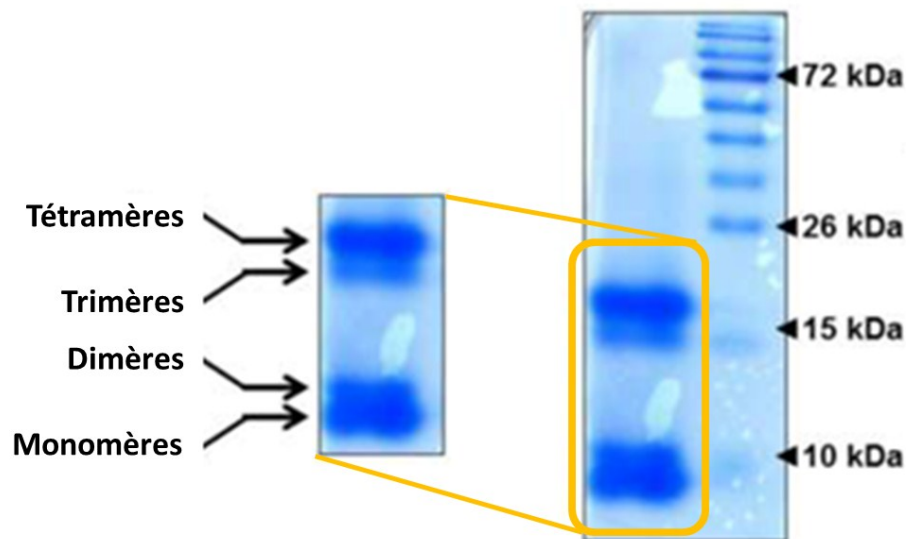


Figure 52 : Contrôle d’une préparation d’oligomères solubles de peptide A β par électrophorèse SDS-PAGE

La séparation électrophorétique permet d’apprécier l’état d’oligomérisation du peptide A β dans nos préparations, en fonction de la masse moléculaire des espèces retrouvées (gauche). Celles-ci contiennent majoritairement des monomères, des dimères, des trimères et des tétramères (droite). A noter que les tétramères et les monomères sont plus abondants que les dimères et les trimères.

III – 2 Détermination de la concentration en protéines

a) Principe

La concentration en protéines dans les essais a été mesurée par la méthode colorimétrique à l’acide bicinchoninique (*bicinchoninic acid* ou [BCA](#)). Cette méthode combine la réduction des ions cuivre Cu²⁺ en Cu⁺ par les protéines en milieu alcalin (réaction classique du Biuret) à une

détection colorimétrique d'une grande sensibilité de l'ion Cu^+ en présence de BCA. La coloration rouge pourpre est obtenue par la chélation de 2 molécules de BCA avec un ion Cu^+ .

Cette coloration est proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon, la relation étant linéaire jusqu'à 2 mg/mL. L'absorbance est lue à 570 nm et la concentration en protéines est déduite de la densité optique ([DO](#)) grâce à une gamme étalon, réalisée à partir d'une solution d'albumine bovine, incluse dans le kit.

b) Protocole

Nous avons utilisé le kit de dosage colorimétrique « *BCA Protein Assay Kit* » (Pierce – Ref. : 23227). Des aliquotes de 25 μL /puits provenant des échantillons à doser (solution initiale ou dilution) sont transférés dans une plaque 96 puits. 200 μL du réactif sont ensuite ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont incubées pendant 30 min à 37 °C puis l'absorbance est mesurée à 570 nm sur les mêmes microplaques 96 puits par un lecteur Fluostar (BMG – Labtechnologies). Les concentrations protéiques sont alors déterminées par rapport à une gamme étalon préparée à partir d'une solution d'albumine sérique bovine à 2 mg/mL.

III – 3 Mesure des activités sphingomyélinases

III – 3 a. Principe

Les SMases acides et neutres sont activées au cours des processus apoptotiques [[Malaplate-Armand, 2006](#)]. L'activité des SMases peut être appréciée *in vitro* par une méthode de cinétique enzymatique, en faisant agir un extrait cellulaire sur un substrat synthétique, dont le clivage par les SMases produit un composé fluorescent ([Figure 53](#)). Ainsi, la quantité d'enzyme présente dans l'échantillon peut être mesurée par la vitesse d'apparition de la fluorescence. Les activités respectives des SMases acides et neutres peuvent être différenciées, en faisant varier le pH du tampon dans lequel a lieu la réaction. Cette activité enzymatique est ensuite rapportée à la concentration protéique de l'échantillon. Par souci d'homogénéité, les résultats sont normalisés par rapport aux activités des témoins.

III – 3 b. Protocole

Des neurones en culture ont été lavés 2 fois avec du PBS, pH = 7,4 (2×10^6 neurones par essai). Ces cellules ont été lysées avec du Triton X-100 pendant 10 min, à 4 °C. Les lysats ont été soniqués pendant 30 s dans de la glace pilée, puis centrifugés. Les concentrations

protéiques du surnageant sont déterminées par le kit de dosage « *BCA Protein Assay Kit* » (Pierce). Les activités SMases acides et neutres ont été mesurées par fluorimétrie avec le substrat 6-hexadecanoyl amino-4-méthyl umbelliféryl phosphocholine ([HMU-P-cho](#) ; substrat Moscerdam) [[Kilkus, 2003](#)]. 25 µg de protéines ont été utilisés pour la mesure. Ces protéines étaient tamponnées dans un milieu différent suivant le type de SMases étudié :

- Tampon contenant 150mM d'acétate de sodium et 0,1% de Triton X -100, 0,2% de 3[(3cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate ([CHAPS](#)) (pH 4,5) pour les SMases acides
- Solution saline tamponnée phosphate ([PBS](#)), contenant 0,1% Triton X-100, 0,2 % CHAPS et 0,5 mM de MgCl₂ (pH 7,4), pour les SMases neutres.

Les extraits protéiques ainsi préparés ont été incubés pendant 10 h avec 0,6 mM de HMU-P-cho. La fluorescence a été mesurée à $\lambda_{exc} = 370$ nm et $\lambda_{emi} = 460$ nm sur un lecteur de microplaques Fluostar (BMG-Labtechnologies).

Les activités SMases ont été calculées à partir de la pente du graphique de la fluorescence intrinsèque en fonction du temps. L'activité enzymatique des échantillons a été rapportée à leur concentration en protéines, puis normalisée par rapport aux valeurs des neurones témoins et exprimée en pourcentage.

III – 4 Electrophorèse en conditions dénaturantes et immunoblot

III – 4 a. Electrophorèse

a) Principe

La technique d'électrophorèse est une méthode de séparation des protéines en fonction de leur taille et/ou de leur charge électrique sous l'effet d'un champ électrique, au sein d'un support (dans le cas présent : un gel de polyacrylamide ou gel PAGE). Nous avons réalisé des électrophorèses en conditions dénaturantes, c'est-à-dire en présence de SDS qui confère une charge négative à toutes les protéines. De ce fait, leur séparation au sein du gel n'est plus soumise qu'à la seule différence de masse moléculaire.

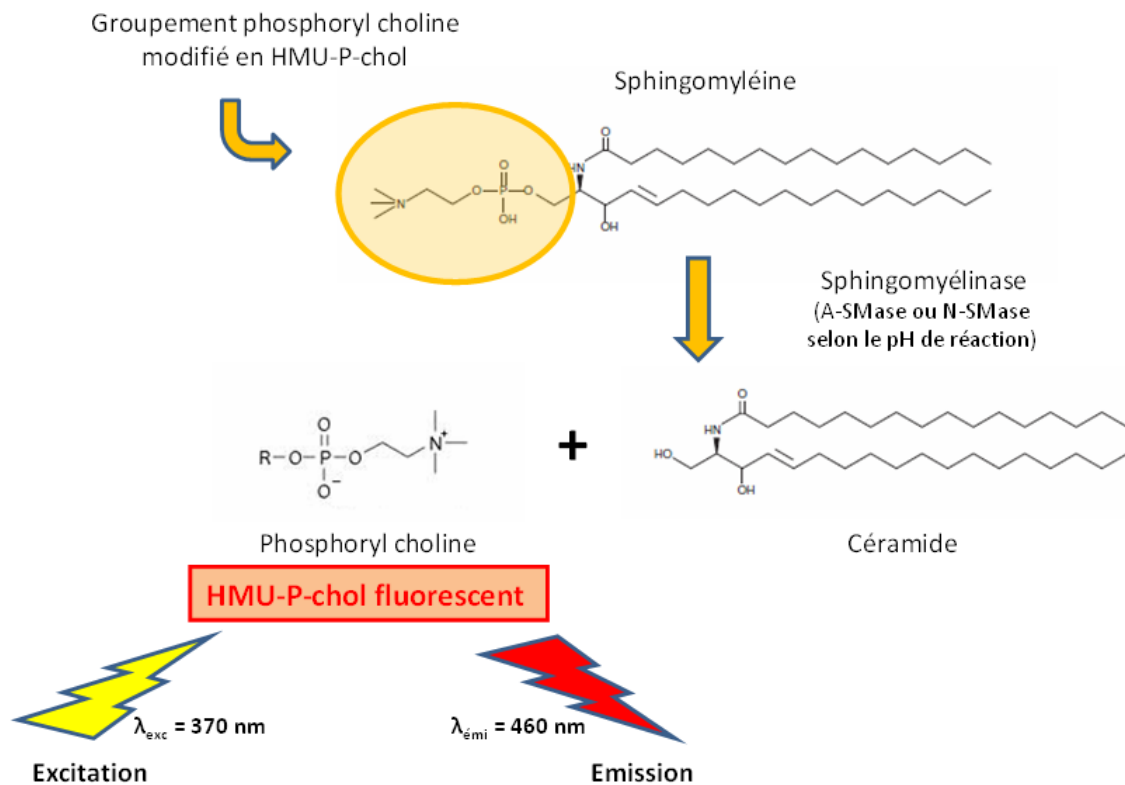


Figure 53 : Schéma explicatif du dosage de l'activité sphingomyélinases acides et neutres sur les neurones corticaux primaires [Malaplate-Armand, 2006]

L'activité sphingomyélinase est appréciée par la cinétique de clivage d'un substrat sphingomyéline modifié, où le groupement phosphoryl choline est remplacé par le HMU-P-chol. Après hydrolyse par les SMases, le HMU-P-chol devient fluorescent. La cinétique de la fluorescence est proportionnelle à la quantité de SMases présentes dans le milieu. En faisant varier le pH du milieu réactionnel, on peut cibler un type de SMase particulier (N-SMase à pH 7,4 et A-SMase à pH 4,5). L'activité enzymatique de l'échantillon est rapportée à sa concentration en protéines.

b) Réactifs

- **Tampon de dépôt de Laemmli 2X** : 125 mM Tris – HCl, 4 % SDS, 10 % (v/v) 2-mercaptoéthanol, 0,004 % bleu de bromophénol
- **Gel de concentration à 5%** : 0,5 M Tris – HCl (pH 6,8), 17 % (v/v) acrylamide / bis acrylamide (29 % / 1 %), 1 % (v/v) SDS 10 %, 10% (v/v) persulfate d'ammonium 10 %, 0,001 % (v/v) TEMED
- **Gel de séparation à 12%** : 0,75 M Tris – HCl (pH 8,8), 40 % (v/v) acrylamide / bis acrylamide (29 % / 1 %), 1 % (v/v) SDS 10 %, 1 % (v/v) persulfate d'ammonium 10 %, 0,04 % TEMED
- **Tampon de migration (10X)** : 25 mM Tris – HCl (pH 8,3), 0,1% SDS, 192 mM glycine. A utiliser sous forme 1X.

c) Protocole

L'électrophorèse est réalisée dans un système de migration verticale (Mini Protean II, Bio-Rad). Les échantillons sont déposés dans les puits du gel de concentration, après dénaturation dans un volume identique de tampon de dépôt Laemmli 2X, pendant 5 min à 95 °C. Les protéines sont ensuite soumises à migration sous l'effet d'un champ électrique de voltage constant (120 V) pendant 1h30 dans le tampon de migration.

III – 4 b. Immunoblot

a) Principe

Après séparation électrophorétique au niveau du gel, les protéines d'intérêt sont révélées et quantifiées par une méthode immunologique, utilisant des anticorps spécifiques. Cette méthode ne peut être réalisée sur un gel PAGE ; aussi, les protéines sont préalablement transférées, sous l'effet d'un courant électrique, sur une membrane polymère en fluorure de polyvinylidène (*polyvinylidene fluoride* ou [PVDF](#)). La membrane est ensuite saturée par incubation dans une solution de blocage, composée d'albumine sérique bovine ou de lait, afin d'éviter toute fixation aspécifique des anticorps. Les protéines sont alors révélées par une méthode dite en "sandwich". Un premier anticorps spécifique se fixe sur la protéine d'intérêt, puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase se fixe sur le premier anticorps. Ces anticorps sont également dilués dans la solution de blocage. La révélation est faite par chimiluminescence amplifiée ("*Enhanced chemi luminescence*" ou [ECL](#)). La peroxydase, en présence de son substrat, le luminol, génère une émission lumineuse, laquelle impressionne un film radiographique sous la forme d'une bande, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéine présente. L'intensité de cette bande peut être quantifiée par densitométrie.

b) Réactifs

- **Tampon de transfert (10X)** : 48 mM Tris – HCl (pH 9,2), 39 mM glycine, 1,3 mM SDS, 10 % méthanol. A utiliser sous forme 1X.
- **Tampon de lavage TBS (10X)** : 20 mM Tris – HCL (pH 7,4), 1,5 M NaCl. A utiliser sous forme 1X.
- **Tampon de lavage TBST (1X)** : 0,1 % (v/v) Tween 20 dans du tampon TBS 1X.
- **Solution de blocage** : albumine sérique bovine à 5% en tampon TBST.

c) Protocole

Après électrophorèse, les protéines séparées dans le gel de polyacrylamide sont transférées sur une membrane PVDF, en utilisant le système de transfert Bio-Rad (BIO-RAD). Ce transfert est réalisé dans le tampon de transfert, sous l'effet d'un courant de 350 mA pendant 45 min. A la fin du transfert, la membrane PVDF est colorée au Rouge Ponceau (acide trichloracétique 3 %, Rouge Ponceau 0,2 % (Sigma)), afin de visualiser les protéines et de contrôler *de visu* la qualité du transfert. Ensuite, la membrane est décolorée au méthanol puis lavée 2 fois au TBST pendant 5 min.

Le schéma d'immunorévélation est le suivant : la membrane est incubée dans les différentes solutions sous agitation douce selon ces étapes successives :

- Solution de blocage pendant 1 h à température ambiante
- Lavages TBST (2 x 5 min)
- Incubation avec l'anticorps primaire (spécifique) pendant une nuit à 4°C
- Lavages TBST (2 lavages rapides suivis de 4 lavages de 5 min)
- Incubation avec l'anticorps secondaire pendant 1 h, à température ambiante
- Lavages TBST (2 lavages rapides suivis de 4 lavages de 5 min).

Les différents anticorps primaires utilisés et leurs concentrations respectives sont indiqués dans le [tableau 17](#). Les anticorps secondaires qui leur sont associés sont mentionnés dans le [tableau 18](#).

Les anticorps primaires ont été révélés par incubation avec des anticorps secondaires, dirigés contre l'espèce correspondante et conjugués à la peroxydase du raifort (*horseradish peroxidase* ou [HRP](#) – Cell Signaling). Ces anticorps étaient dilués au 1/2000 en tampon bloquant.

Les protéines d'intérêt ont alors été détectées selon un protocole de chimiluminescence amplifiée (Amersham Biosciences). Le signal lumineux a été recueilli sur un film « Hyperfilm » ECL (Amersham Biosciences). Ce film a été développé avec des réactifs Kodak (révélateur LX24 et fixateur AL4, Merck Eurolab) L'intensité des bandes de migration électrophorétique des protéines est quantifiée par densitométrie grâce à l'analyseur d'images Versadoc (modèle 1000, Bio-Rad) *via* le logiciel d'analyse d'images *Quantity one V4.4* (Bio-Rad).

Protéine	Ac primaire				Ac secondaire	
	Origine	Dilution	Fournisseur	Référence	Origine	Dilution
Voies de survie et signalisation						
Akt/PKP	Lapin	1/1000	Cell Signaling	9272	Chèvre	1/2000
P-Akt (Ser⁴⁷³)	Souris	1/1000	Cell Signaling	9271	Cheval	1/2000
ERK1/2	Lapin	1/1000	Cell Signaling	9102	Chèvre	1/2000
P-ERK1/2	Souris	1/1000	Cell Signaling	9216	Cheval	1/2000
GSK3β	Chèvre	1/1000	Santa Cruz	sc-8257	Ane	1/2000
P-GSK3β (Ser⁹)	Lapin	1/1000	Cell Signaling	9336	Chèvre	1/2000
Enzymes et protéines diverses						
APP A4 (22C11)	Souris	1/1000	Chemicon	MAB348	Cheval	1/2000
cPLA₂	Lapin	1/500	Cell Signaling	2832	Chèvre	1/1000
P-cPLA₂ (Ser⁵⁰⁵)	Lapin	1/1000	Cell Signaling	2831	Chèvre	1/2000
Marqueurs synaptiques						
PSD95	Lapin	1/500	Cell Signaling	3450	Chèvre	1/2000
Synaptophysine	Souris	1/1000	Chemicon	MAB5258	Cheval	1/2000
Synaptotagmine	Lapin	1/500	Calbiochem	573828	Chèvre	1/1000
Marqueurs de l'inflammation						
GFAP	Souris	1/5000	Millipore	MAB360	Cheval	1/5000
Iba1	Chèvre	1/1000	Abcam	ab5076	Ane	1/2000
Marqueurs de charge (<i>loading controls</i>)						
Actine C11	Chèvre	1/1000	Santa Cruz	sc-1615	Ane	1/2000
B-tubuline	Lapin	1/1000	Santa Cruz	sc-9104	Chèvre	1/2000

Tableau 17 : Anticorps primaires utilisés pour les immunoblots

Détection des protéines d'intérêt préalablement séparées par électrophorèse.

Cible antigénique	Espèce	Dilution	Fournisseur	Référence
IgG Chèvre	Ane	1/2000	Santa Cruz	sc-2020
IgG Lapin	Chèvre	1/2000	Cell Signaling	7074
IgG Souris	Cheval	1/2000	Cell Signaling	7076

Tableau 18 : Anticorps secondaires utilisés pour les immunoblots

Détection et révélation des anticorps primaires hybridés aux protéines d'intérêt. Tous ces anticorps secondaires étaient couplés à la peroxydase du raifort (HRP).

III – 5 Dosage intra-tissulaire d'interleukine 1 β

III – 5 a. Principe

L'interleukine 1 β ([IL-1 \$\beta\$](#)) constitue une cytokine pro-inflammatoire, dont l'action a été incriminée dans la toxicité du peptide A β , notamment en initiant les phénomènes de neuroinflammation. Afin d'étudier la part de ces phénomènes dans notre modèle d'injection

ICV d'oligomères A β et d'apprécier les mécanismes de la protection conférée par l'inactivation de la cPLA₂, nous avons suivi la cinétique de cette cytokine après l'injection [Tyagi, 2008].

Dans ce but, différents groupes de souris ont été sacrifiés à 6 h, 24 h et 48 h après l'injection d'A β ou de sérum physiologique. Leurs hippocampes ont été récupérés et homogénéisés. L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants des homogénats par un test [ELISA](#) (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de type *sandwich* ([Figure 54](#)).

III – 5 b. Préparation des échantillons tissulaires

La récupération des structures a été réalisée à 6 h, 24 h et 48 h après l'injection ICV de peptide A β ou de NaCl 0,9 %, selon le protocole précédemment décrit.

L'hippocampe est ainsi isolé puis broyé et homogénéisé à l'aide d'un appareil de Potter dans un tampon d'homogénéisation froid, contenant du Tris 50 mM, de l'EDTA 1 mM, du MgCl₂ 6 mM, du cocktail anti protéases (Roche), pH ajusté à 7,2. Ces homogénats ont ensuite été soniqués sur lit de glace, puis centrifugés à 10.000 x g, pendant 20 min, à 4 °C. Puis les surnageants ont été collectés et conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

III – 5 c. Dosage de l'interleukine 1 β par technique ELISA

La trousse réactif utilisée pour le dosage était fournie par RayBiotech (Ref. : ELM-IL1beta-001C) et a été utilisée conformément aux instructions du fabricant. Tous les calibrants et les échantillons ont été analysés en duplicats. Les étapes du dosage sont les suivantes :

- 100 μ L de chaque calibrant ou échantillon ont été déposés dans les puits de la microplaque. Les puits ont été couverts et la plaque a été incubée pendant 2h30 à température ambiante, sous agitation douce (étapes 1 et 2).
- Les puits ont été lavés 4 fois avec 300 μ L de solution de lavage 1x.
- 100 μ L d'anticorps marqué 1x ont été ajoutés dans chaque puits, pour une incubation d'1 h à température ambiante, sous agitation douce (étape 3).
- Les puits ont été lavés 4 fois avec 300 μ L de solution de lavage 1x.
- 100 μ L de conjugué HRP – streptavidine ont été déposés dans les puits (étape 4).

La plaque a été incubée pendant 45 min à température ambiante, sous agitation douce.

- Les puits ont été lavés 4 fois avec 300 μ L de solution de lavage 1x.
- 100 μ l de substrat TMB *One-Step* ont été déposés dans chaque puits et la plaque a été incubée pendant 30 min à température ambiante, dans l'obscurité (étape 5).

- 50 µl de solution stop ont été ajoutés au substrat TMB de manière à bloquer la réaction de conversion du substrat.

- La DO à 450 nm est immédiatement lue sur un lecteur de microplaque Fluostar. (BMG – Labtechnologies). Les concentrations en IL-1β des échantillons sont alors déduites de la DO par rapport à la courbe de calibration (obtenue à partir d'une gamme étalon d'IL-1β recombinante, fournie dans le kit).

Le taux de protéines de l'homogénat a été parallèlement déterminé par la méthode utilisant le BCA (coffret « Protein Assay Kit » Pierce).

Enfin, le taux d'IL-1β a été normalisé par rapport à la concentration en protéines des échantillons et est donc exprimé en pg/mL de protéines totales.

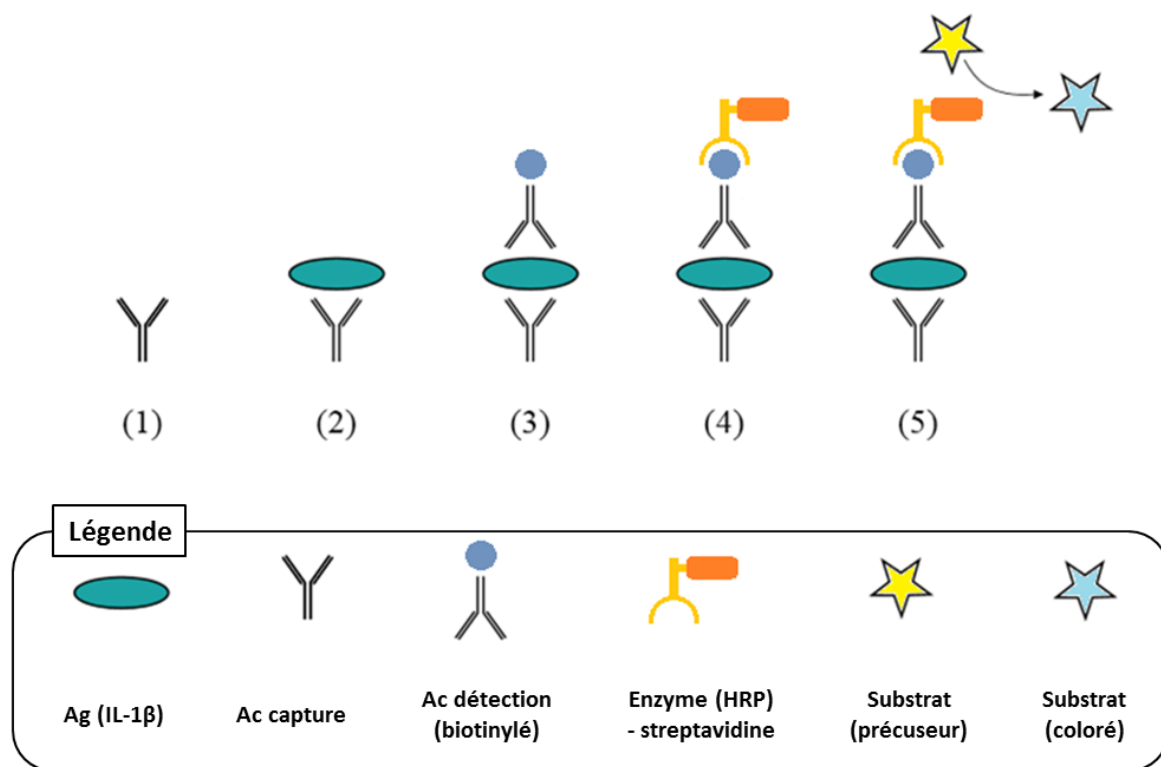


Figure 54 : Principe du test ELISA utilisé pour la détermination de la concentration en IL-1β dans les échantillons tissulaires de cerveaux de souris

Le test utilisé est un test ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de type *sandwich*. L'anticorps de capture est fixé sur la phase solide (micro puits). L'anticorps de détection est biotinylé. L'enzyme assurant la conversion du substrat (signal) est couplée à la streptavidine, de manière à se fixer sur l'anticorps de détection. La quantité de substrat converti par l'enzyme est directement proportionnelle à la quantité d'IL-1β présente dans l'échantillon analysé.

Chaque étape du test est désignée par un numéro, lequel renvoie à la partie correspondante dans le texte.

III – 6 Etude de l'expression du gène de l'APP au niveau de structures cérébrales par RT-PCR

III – 6 a. Principe

L'expression du gène de la protéine APP a été évaluée par RT-PCR au niveau d'échantillons d'hippocampe provenant de souris $cPLA_2^{+/+}$ et $cPLA_2^{-/-}$. Les ARN totaux ont été extraits et purifiés à partir d'échantillons cérébraux fraîchement disséqués, en utilisant le kit *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit*® de Qiagen. Ces ARN ont ensuite été convertis en ADNc sous l'action d'une reverse transcriptase. L'ADNc du gène de l'APP a été amplifié en utilisant une PCR spécifique. Les fragments obtenus ont été analysés après migration électrophorétique et visualisation sous lumière UV. Une analyse quantitative a été réalisée après numérisation des images. Afin de rapporter l'abondance du transcrite de l'APP au contenu en ARNm total, nous avons également évalué l'ARNr 18s comme gène de ménage. La PCR utilisée était une PCR couplée, qui nous a permis de procéder à l'amplification concomitante de ces deux ADNc au niveau d'une même réaction. Cela nous mettait également à l'abri d'une éventuelle variabilité inter essai.

Les séquences des amorces utilisées pour la PCR sont indiquées dans le [tableau 19](#) ci-dessous :

Gène	Amorce	Séquence
APP	<i>Forward</i>	5'- CCG TGG CAC CCT TTT GG -3'
	<i>Reverse</i>	5'- GGG CGG GCG TCA ACA -3'
ARNr 18s	<i>Forward</i>	5'- CAT TAA ATC AGT TAT GGT TCC TTT GG -3''
	<i>Reverse</i>	5'- TCG GCA TGT ATT AGC TCT AGA ATT ACC -3'

Tableau 19 : Amorces utilisées pour la RT-PCR du gène de l'APP et de l'ARNr 18s dans des échantillons d'hippocampe de souris

III – 6 b. Protocole

a) Extraction et purification des ARN totaux à partir d'échantillons d'hippocampe

Après anesthésie à l'isoflurane (Minerve), la souris a été décapitée. Après ouverture de la boîte crânienne, le cerveau a été prélevé et disséqué. L'hippocampe a été immédiatement placé dans 1 mL de *QIAzol Lysis Reagent* (tampon de lyse contenu dans le kit). Les échantillons ont été conservés dans ce tampon à 4°C jusqu'à extraction des ARN.

L'extraction des ARN a été réalisée avec le kit *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit*® de Quiagen, en suivant scrupuleusement les indications du fabricant.

Les échantillons ont été homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax IKA T50 dans 1 mL de *QIAzol Lysis Reagent*, directement dans le tube ayant servi à leur conservation.

L'homogénat ainsi préparé a été conservé à température ambiante pendant 5 min.

200 µL de chloroforme sont ajoutés à chaque échantillon, le mélange est ensuite vortexé pendant 15 s, puis laissé à température ambiante pendant 3 min.

Les tubes sont ensuite centrifugés à 12.000 x g pendant 15 min à 4°C.

La phase aqueuse, constituant le surnageant, est transférée dans un nouveau tube, dans lequel on ajoute 600 µL d'éthanol à 70%. Le mélange est vortexé pendant 30 s.

700 µL de cette préparation sont alors transférés dans une colonne *RNeasy Mini*, elle-même montée sur un tube de 2 mL. L'ensemble est alors centrifugé sous 8.000 x g pendant 15 s à 20°C. Le filtrat présent dans le tube est éliminé.

Cette opération est répétée avec le reste de la préparation, sur la même colonne. Le filtrat obtenu après centrifugation est également éliminé.

700 µL de tampon de lavage RW1 sont déposés dans la colonne *RNeasy Mini*. Celle-ci est placée sur un tube de 2 mL, puis centrifugée à 8000 x g pendant 15 s à 20°C. Le filtrat est éliminé.

500 µL de tampon RPE sont déposés dans la colonne *RNeasy Mini*. Celle-ci est placée sur un tube de 2 mL, puis centrifugée à 8000 x g pendant 15 s à 20°C. Le filtrat est éliminé.

500 µL de tampon RPE sont de nouveau déposés dans la colonne *RNeasy Mini*. Celle-ci est placée sur un tube de 2 mL, puis centrifugée à 8000 x g pendant 20 min à 20°C. Le filtrat est éliminé.

La colonne *RNeasy Mini* est alors placée sur un tube de 1,5 mL. 50 µL d'eau distillée *RNAse-free* sont déposés sur la colonne et celle-ci est centrifugée à 8.000 x g pendant 1 min à 20°C.

Un nouveau volume de 50 µL d'eau distillée *RNAse-free* est déposé sur la colonne *RNeasy Mini* et celle-ci est centrifugée dans les mêmes conditions que précédemment.

Après l'extraction, la concentration des échantillons en ARN totaux a été déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm, en sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration en ARN de 40 µg/mL. L'absorbance à 280 nm et le ratio DO

260 nm / DO 280 nm permettent d'apprécier la présence résiduelle de protéines (ratio satisfaisant si > 1,8).

De même, la qualité des ARN extraits a été vérifiée en réalisant une électrophorèse en gel d'agarose à 1,4%. Cette séparation permet de visualiser les ARNr 18s et 28s. La présence de ces deux bandes et l'absence de trainée (*smear*) témoignent de l'intégrité des ARN extraits. Les échantillons d'ARN sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

b) Rétro transcription des ARN et amplification par PCR

L'étape de RT-PCR permet d'obtenir l'ADN complémentaire ([ADNc](#)) à partir des ARN préalablement extraits et quantifiés. 2 µg d'ARN totaux ont ainsi été rétro transcrits pour chaque échantillon. 2 µg d'ARN (dans un volume de 8µL) sont incubés en présence de 3 µL d'amorces oligo(dT₂₀) à 10 µM (soit une concentration finale de 1,5 µM) pendant 10 min à 65°C, puis placés dans la glace. On ajoute alors à ce mélange 4 µL de tampon de l'enzyme 5X, du DTT (10 mM) ; les dNTP (0,5 mM chacun) et 10 UI de transcriptase inverse Superscript II RT (soit 1 µL). Les mélanges réactionnels sont alors incubés 50 min à 42°C, pour la reverse transcription proprement dite, puis 15 min à 70°C, afin d'inactiver l'enzyme.

Les échantillons ainsi rétro transcrits ont été immédiatement amplifiés par PCR.

5 µL de produit de rétro transcription (contenant les ADNc) sont amplifiés dans un volume de réaction de 50 µL. La composition du mélange réactionnel est la suivante : amorces APP à 500 nM (Eurogentec), amorces ARN à 18s 300 nM (Eurogentec), tampon PCR 1X, dNTP à 5 mM, MgCl₂ à 1,5 µM, 0,25 µL de Taq polymérase (1 UI / 25 µL) et de l'H₂O ultra pure qsp 50 µL.

L'amplification consiste en 35 cycles de PCR dont les modalités sont:

- dénaturation : 95 °C pendant 30 s
- hybridation : 55 °C pendant 1 min
- élongation : 72 °C pendant 1 min.

c) Etudes des produits de PCR par électrophorèse

Les fragments d'ADNc amplifiés par PCR ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %, puis visualisés sous lumière UV.

2 µL de tampon de dépôt 6 X (PCR Orange Loading Buffer, Jean Bioscience) ont été ajoutés à 10 µL de la réaction de PCR et homogénéisés. La composition de ce tampon de dépôt est la suivante : 60 mM Tris-HCl (pH 7,5), 60 mM acide éthylène diamine tétra acétique ([EDTA](#)), 60% (w/v) glycérol, Orange G, Eva Green[®].

12 μ L de mélange ont été déposés sur un gel d'agarose à 2 %, immergé dans un tampon de migration Tris EDTA (90 mM Tris, 90 mM borate, 2 mM EDTA). La migration est effectuée sous une tension de 100 V pendant 45 min. Le marqueur utilisé pour déterminer la taille des fragments est le *50 bp DNA Ladder*[®] (Invitrogen).

Les bandes correspondant aux produits d'amplification ont été visualisées sous UV dans l'analyseur d'images Versadoc (modèle 1000, Bio-Rad) *via* le logiciel d'analyse d'images *Quantity one V4.4* (Bio-Rad).

IV – Analyses statistiques et exploitation des données

Le logiciel *STAT VIEW*® a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats.

Les données ont été obtenues à partir de 3 à 5 expériences indépendantes, comportant chacune 6 déterminations.

Les différences entre les groupes contrôles et traités ont été déterminées en employant le test t de Student. Des comparaisons multiples ont été réalisées au sein de groupes expérimentaux appariés, en utilisant des analyses de variances (*analysis of variance* ou [ANOVA](#)), afin de mettre en évidence d'éventuelles différences. Toutes les différences mises en évidence par ANOVA ont ensuite été confirmées par un test *post hoc* de Scheffe.

Des valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme témoignant d'une différence significative entre les groupes expérimentaux étudiés.

Toutes les valeurs rapportées dans la partie « [Résultats](#) » de ce document ont été exprimées en associant la moyenne des valeurs et l'erreur standard de la moyenne (moyenne +/- [SEM](#)).

RESULTATS

Notre premier objectif a été de déterminer le niveau de résistance conférée par la réduction de l'activité cPLA₂ vis-à-vis de la neurotoxicité du peptide Aβ chez la souris. Par la suite, nous avons étudié, au niveau cellulaire et moléculaire, sur des neurones embryonnaires en culture, cette résistance observée au niveau comportemental chez les animaux cPLA₂^{-/-}. Enfin, nous nous sommes focalisés sur l'origine possible de cette protection résultant de l'inactivation de la cPLA₂, en étudiant successivement différentes voies de transduction et divers récepteurs.

I – Neurotoxicité du peptide Aβ oligomérique et protection conférée par l'inactivation de la cPLA₂

Cette première partie de notre travail s'est focalisée sur l'implication de la cPLA₂ dans la médiation des effets neurotoxiques du peptide Aβ oligomérique chez la souris. Ainsi, nous avons voulu déterminer : 1) si la cPLA₂ contribue *in vivo* aux troubles cognitifs résultant de la toxicité des oligomères Aβ solubles, 2) si l'inactivation de son expression assure une protection contre les effets de ces oligomères et 3) préciser le niveau de cette protection. Dans ce but, nous avons évalué les capacités mnésiques à court terme (mémoire de travail) et long terme des souris de phénotype sauvage (WT, cPLA₂^{+/+}) et cPLA₂^{-/-} après injection ICV de peptide Aβ(1-42) ou de PBS et mesuré l'expression des marqueurs synaptiques dans l'hippocampe.

I – 1 Effet des oligomères Aβ sur la mémoire à court terme, implication de la cPLA₂

Afin de mettre en évidence l'implication de la cPLA₂ dans la médiation des effets délétères du peptide Aβ oligomérique sur les capacités mnésiques et d'apprentissage, nous avons procédé à l'administration ICV de 500 pmol d'oligomères Aβ(1-42) solubles chez des souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} (n=12 par groupe). Les animaux contrôles de chaque génotype ont reçu un volume équivalent de PBS. Au quatrième jour suivant l'injection, la mémoire de travail de ces animaux a été évaluée par le test du labyrinthe en Y. Ce test mesure la mémoire immédiate des souris, en évaluant leur mémoire spatiale dans un labyrinthe à 3 branches. La

performance des animaux est reflétée par le pourcentage d'alternances spontanées observées au cours du test.

Les différents groupes de souris, tous génotypes et traitements confondus, présentent un nombre similaire d'entrées dans les bras du labyrinthe ([Figure 55](#)). Cette similitude dans les déplacements des souris indique que les capacités locomotrices, sensorielles, motivationnelles, exploratoires sont similaires entre les génotypes (cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-}) et qu'elles ne sont pas non plus affectées par le traitement administré aux animaux.

Il n'existe aucune différence entre le pourcentage d'alternances spontanées chez les souris cPLA₂^{+/+} et les souris cPLA₂^{-/-} des groupes contrôles, c'est-à-dire injectées en ICV avec le PBS. L'inactivation du gène de la cPLA₂ n'influence donc pas les capacités basales de mémoire à court terme chez ces animaux.

Les souris cPLA₂^{+/+}, ayant reçu une injection de peptide Aβ oligomérique, présentent des altérations importantes de leur mémoire de travail. En effet, on note une réduction du pourcentage d'alternances spontanées de 10% par rapport aux souris cPLA₂^{+/+} injectées avec le PBS (p<0,01) ([Figure 56](#)). Par contre, les souris cPLA₂^{-/-} injectées avec du peptide Aβ oligomérique présentent un pourcentage d'alternances comparable à celui des souris ayant reçu du PBS, quel que soit leur génotype ([Figure 56](#)). Ces souris cPLA₂^{-/-} bénéficient donc d'une protection totale de leur mémoire de travail contre les effets délétères du peptide Aβ oligomérique.

I – 2 Effet des oligomères Aβ sur la mémoire à long terme, implication de la cPLA₂

Le test de la piscine de Morris (encore appelé labyrinthe aquatique de Morris) permet d'évaluer les capacités d'apprentissage et de mémorisation à long terme chez les souris. Celles-ci doivent, en effet, apprendre à trouver une plateforme dans une piscine en s'aidant d'indices visuels, puis se souvenir de la localisation initiale de celle-ci. Après une phase initiale d'habituation au 3^{ème} et 4^{ème} jour, les capacités d'apprentissage des animaux sont régulièrement évaluées entre le 7^{ème} et le 11^{ème} jour. Le paramètre mesuré est le temps mis par les souris pour atteindre la plateforme (temps d'échappement), ce temps devant décroître au fil de l'exercice.

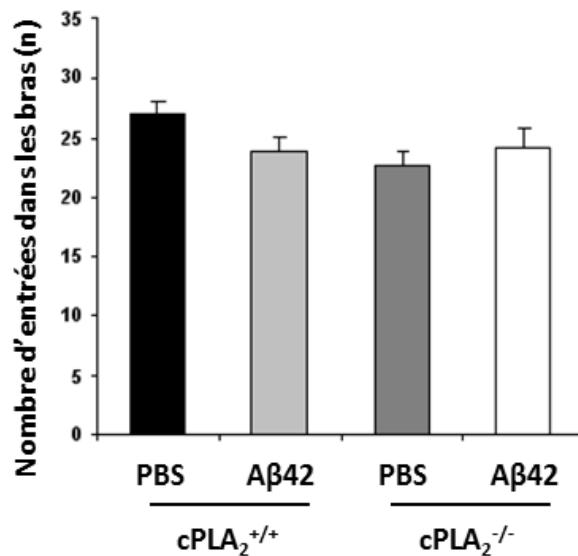


Figure 55 : Exploration des capacités locomotrices des souris : nombres d'entrées totales réalisées dans les bras du labyrinthe en Y

Le nombre d'entrées dans chacun des 3 bras du labyrinthe a été enregistré au cours des 5 min du test. L'entrée dans un bras est considérée comme valide lorsque la patte postérieure de la souris a franchi la limite du bras considéré. Les données sont représentées comme la moyenne +/- SEM du nombre total d'entrées dans les bras du labyrinthe pour chaque groupe de souris. On n'observe aucune différence significative entre le nombre total d'entrées entre les différents groupes expérimentaux. Ceci indique que ni le génotype (cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-}) ni le traitement reçu (Aβ oligomérique vs PBS) n'influence les performances locomotrices, sensorielles, motivationnelles... des souris.

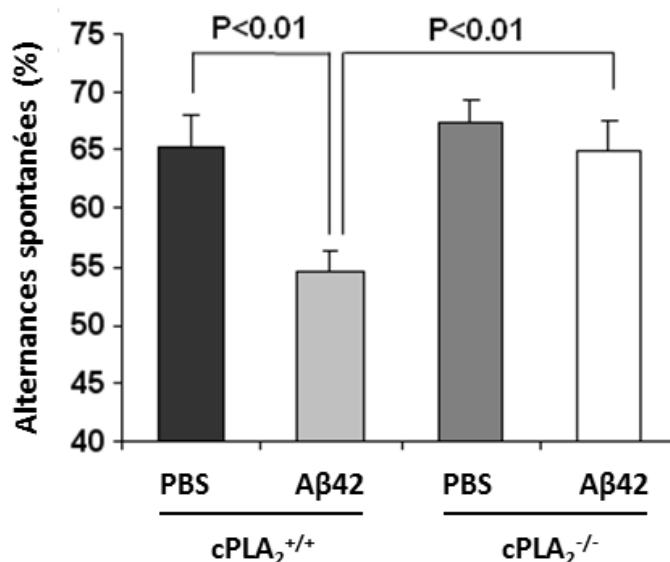


Figure 56 : Exploration de la mémoire de travail : pourcentage d'alternances spontanées des différents groupes expérimentaux dans le labyrinthe en Y

Le pourcentage d'alternances spontanées a été enregistré pour chaque groupe de souris pendant les 5 min du test (n=12). Une alternance spontanée est considérée comme correcte lorsque la souris passe successivement dans les 3 bras du labyrinthe. Le pourcentage d'alternances est défini comme le ratio du nombre d'alternances correctes sur le nombre d'alternances possibles, ramené à 100 %. Les données sont représentées comme la moyenne +/- SEM du pourcentage d'alternances spontanées de chaque groupe de souris.

Il n'existe aucune différence entre les performances des souris $cPLA_2^{+/+}$ et $cPLA_2^{-/-}$ injectées avec le PBS, indiquant que leur capacités mnésiques sont comparables. Les souris $cPLA_2^{+/+}$ injectées avec le peptide A β oligomérique présentent une diminution significative du nombre d'alternances par rapport aux souris contrôles (55% vs 65%, $p < 0,01$). Par contre, les souris $cPLA_2^{-/-}$ injectées avec le peptide A β présentent des performances similaires aux souris ayant reçu le véhicule (65% à 67%, $p = ns$), ce qui indique que leurs capacités de mémoire à court terme sont totalement protégées contre les effets délétères du peptide A β .

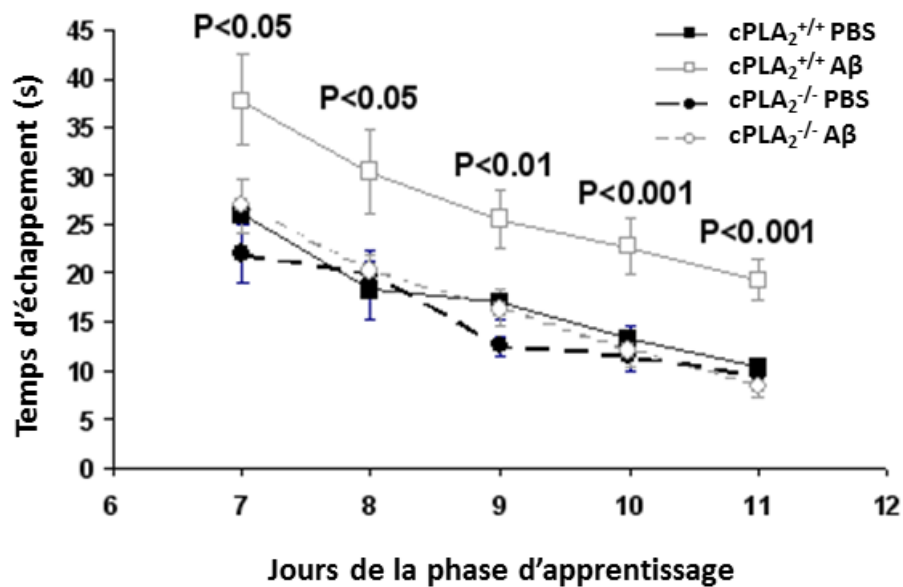


Figure 57 : Evaluation des capacités d'apprentissage des souris grâce au labyrinthe aquatique de Morris

Le temps nécessaire aux souris pour trouver la plateforme a été enregistré pendant les 5 jours consécutifs de la phase d'apprentissage, à raison de 4 passages quotidiens séparés par un intervalle d'au moins 45 min. Les données sont représentées comme la moyenne +/- SEM de ces 4 passages pour chaque groupe de souris ($n=12$) à un jour donné de la phase d'apprentissage.

Les souris des 2 groupes contrôles présentent des performances similaires, tandis que le temps d'échappement des souris $cPLA_2^{+/+}$ injectées avec A β est systématiquement allongé d'un délai moyen de 12 à 20 s ($p < 0,001$ à 0,05). Par contre, les souris $cPLA_2^{-/-}$ présentent une résistance totale aux altérations mnésiques induites par l'injection de peptide A β , puisque leur temps d'échappement de la piscine est rigoureusement similaire à ceux des groupes contrôles.

Donc, l'injection ICV de peptide A β chez les souris $cPLA_2^{+/+}$ perturbe leurs capacités d'apprentissage, puisque ces souris présentent des temps d'échappement systématiquement plus longs que les autres groupes, quel que soit le moment du test considéré.

Les souris $cPLA_2^{+/+}$ et $cPLA_2^{-/-}$ des groupes contrôles présentent des performances tout à fait similaires dans ce test, ce qui indique que les capacités d'apprentissage ne sont pas influencées par l'inactivation du gène de la $cPLA_2$, et que la procédure chirurgicale n'entraîne aucun effet délétère *per se* (Figure 57).

Les souris $cPLA_2^{+/+}$ injectées avec le peptide $A\beta$ oligomérique montrent par contre un temps d'échappement allongé de 12 à 20 s (soit 40 %) par rapport aux autres groupes, ceci pendant l'ensemble du test ($p < 0,001$ à $0,05$).

Toutefois, ce temps d'échappement tend à diminuer au cours de l'épreuve, d'une manière similaire à celui des autres groupes. Il semble que l'injection ICV de peptide $A\beta$ perturbe les capacités d'apprentissage des souris $cPLA_2^{+/+}$ et que celles-ci apprennent plus lentement la localisation de la plateforme.

Par contre, les souris $cPLA_2^{-/-}$ injectées avec le peptide $A\beta$ soluble mettent autant de temps à trouver la plateforme que les souris des groupes contrôles ($p = ns$), ce qui montre que leurs capacités d'apprentissage ne sont pas altérées par l'exposition au peptide $A\beta$.

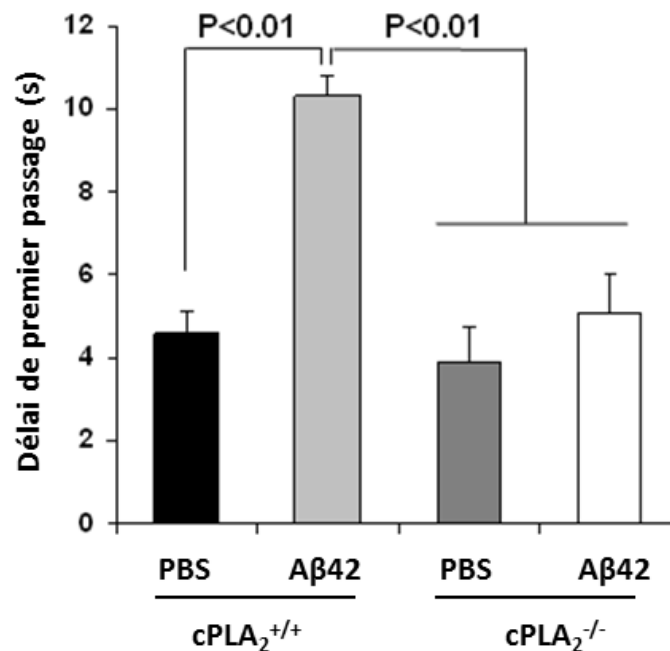


Figure 58 : Exploration de la mémoire à long terme au cours de la dernière phase du labyrinthe aquatique de Morris : délai de premier passage sur l'emplacement initial de la plateforme

Le délai nécessaire aux souris pour atteindre le lieu où se trouvait initialement la plateforme a été enregistré pour les différents groupes ($n=12$). Les données sont présentées comme la moyenne \pm SEM de ce délai de premier passage.

Les souris contrôles des deux génotypes présentent un délai similaire et relativement bref, compris entre 4 et 5 s ($p = ns$).

Les souris $cPLA_2^{+/+}$ injectées avec le peptide $A\beta$ mettent 2,5 fois plus de temps que les témoins pour atteindre cette zone, ce qui témoigne d'un souvenir altéré, et donc, d'une mémoire à long terme perturbée ($p < 0,01$).

A l'inverse, les souris $cPLA_2^{-/-}$ injectées avec le peptide $A\beta$ atteignent la zone avec un délai comparable aux souris contrôles ($p = ns$), ce qui indique que leur mémoire à long terme n'est pas perturbée par le peptide $A\beta$ oligomérique.

La dernière étape de la piscine de Morris, effectuée au 14^{ème} jour du test, permet d'évaluer la mémoire à long terme des animaux en mesurant le temps passé dans le quadrant de la piscine où se trouvait initialement la plateforme. On mesure ainsi la consolidation du souvenir de la localisation de celle-ci, 3 jours après la fin de la phase d'apprentissage. Celle-ci est mesurée de deux façons : en évaluant le temps passé par la souris dans chacun des quadrants de la piscine (et, en particulier, celui où se trouvait initialement la plateforme, ainsi que le quadrant opposé) et en mesurant le délai nécessaire pour que la souris atteigne la localisation initiale de la plateforme (délai de premier passage).

Les souris des groupes contrôles présentent un délai similaire de premier passage sur l'emplacement initial de la plateforme (Figure 58). De même, il n'existe pas de différence significative dans la durée totale passée dans le quadrant cible et le quadrant opposé entre ces deux groupes (Figure 59). Ces deux observations indiquent que la mémoire à long terme n'est pas affectée par l'inactivation du gène de la cPLA₂.

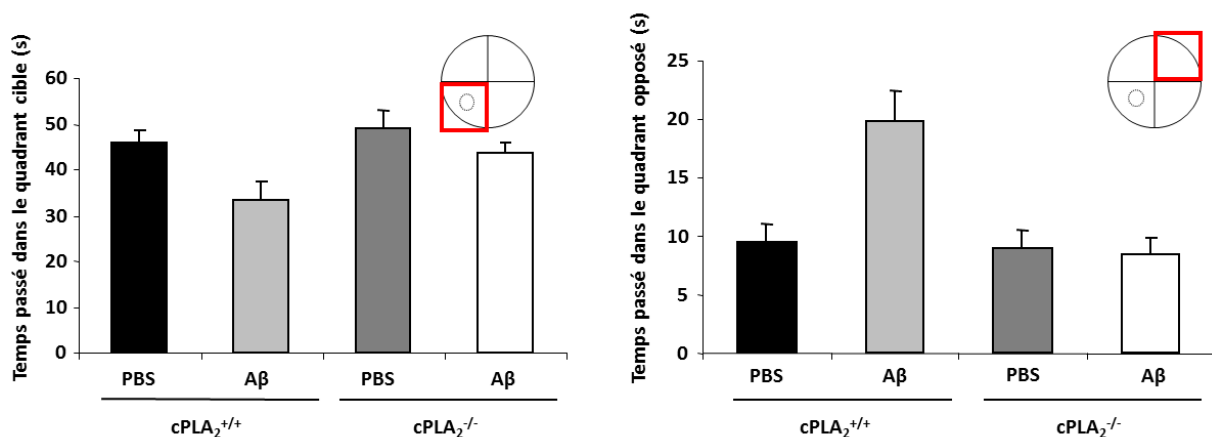


Figure 59 : Exploration de la mémoire à long terme au cours de la dernière phase du labyrinthe aquatique de Morris: temps passés par les souris dans les différents quadrants de la piscine

Durant cette dernière phase du test, la souris dispose de 60 s pour trouver la localisation initiale de la plateforme. Un système de *video tracking* permet de déterminer le temps passé par la souris dans les différents quadrants de la piscine. On s'intéresse plus particulièrement au quadrant cible (ayant contenu la plateforme) et au quadrant diamétralement opposé. Les données sont présentées comme la moyenne +/- SEM du temps passé par les souris des différents groupes dans les quadrants considérés (n=12 souris par groupe).

Il n'existe pas de différence dans l'occupation des quadrants entre les souris témoins des deux génotypes. Les souris cPLA₂^{+/+} injectées avec le peptide Aβ passent significativement moins de temps dans le quadrant cible (p<0,05) et 2 fois plus de temps dans le quadrant opposé (p<0,001) que les contrôles. A l'inverse, les souris cPLA₂^{-/-} injectées avec le peptide Aβ présentent un comportement similaire aux animaux témoins, ce qui montre que leur mémoire à long terme n'est pas altérée par l'injection de peptide Aβ.

Par contre, les souris $cPLA_2^{+/+}$ injectées avec le peptide A β présentent un délai de premier passage 2,5 fois plus long que les témoins ([Figure 58](#)). On note aussi un doublement du temps passé dans le quadrant opposé à la plateforme par rapport aux souris contrôles, ainsi qu'une réduction significative de l'occupation du quadrant cible ([Figure 59](#)). Ceci montre que l'exposition des animaux $cPLA_2^{+/+}$ au peptide A β altère fortement leur mémoire à long terme. Par contre, aucune modification significative de ces paramètres n'est observée chez les souris $cPLA_2^{-/-}$ injectées avec les oligomères A β ([Figures 58](#) et [59](#)). Ainsi, l'inactivation du gène de la $cPLA_2$ protège complètement la mémoire à long terme de ces animaux contre les altérations induites par les oligomères de peptide A β .

L'ensemble de ces données indique clairement qu'une délétion du gène de la $cPLA_2$ protège totalement la mémoire à court et long terme, ainsi que les capacités d'apprentissage des souris contre les effets délétères des oligomères solubles du peptide A β .

I – 3 Protection conférée par une délétion partielle de la $cPLA_2$: étude des animaux hétérozygotes

Nous avons ensuite cherché à évaluer le niveau de protection conféré par l'inactivation d'un seul allèle du gène. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris hétérozygotes $cPLA_2^{+/-}$ et comparé leurs performances à celles de souris sauvages $cPLA_2^{+/+}$, dans les différents tests comportementaux décrits dans les [paragraphe](#)s précédents. Comme nous n'avons trouvé aucune influence de la chirurgie sur les performances des animaux pour la comparaison des animaux $cPLA_2^{-/-}$ et $cPLA_2^{+/+}$, nous n'avons pas utilisé d'animaux témoins et nous avons comparé directement les performances des animaux injectés avec le peptide A β .

Les souris $cPLA_2^{+/-}$ présentent un nombre d'entrées dans les bras du labyrinthe en Y similaire à celui des souris $cPLA_2^{+/+}$ ([Figure 60](#)). Ce nombre d'entrées est également comparable à celui mesuré pour les animaux $cPLA_2^{+/+}$ et $cPLA_2^{-/-}$ lors de la précédente évaluation de mémoire à court terme (environ 25 entrées sur les 5 min du test). Comme pour l'expérience précédente, cette similitude indique que la délétion d'un allèle de la $cPLA_2$ ne modifie pas les capacités locomotrices, exploratoires ou motivationnelles des animaux.

Là encore, les souris $cPLA_2^{+/+}$ injectées avec le peptide A β soluble présentent une diminution significative du nombre d'alternances spontanées par rapport aux souris $cPLA_2^{+/-}$ recevant le même traitement (54% vs 70% ; $p=0,04$) ([Figure 60](#)). Le nombre d'alternances des souris

cPLA₂^{+/+} est comparable à celui des animaux sauvages injectés avec le peptide Aβ dans l'expérience précédente. Les souris cPLA₂^{+/-} présentent par contre des performances similaires aux animaux témoins et aux souris cPLA₂^{-/-} injectées avec le peptide Aβ, soit des performances non altérées.

On peut donc en conclure que la délétion partielle de la cPLA₂ confère une protection de la mémoire de travail.

Les effets du peptide Aβ soluble sur les capacités d'apprentissage ont été évalués par le test du labyrinthe aquatique de Morris, lors de la phase d'apprentissage, entre les jours 7 et 11 du test. Au cours de cette évaluation, les souris cPLA₂^{+/+} présentent un temps d'échappement sur la plateforme toujours plus important que les souris cPLA₂^{+/-}, bien que cette différence ne soit pas significative le premier jour du test (soit le 7^{ème} jour post injection) ([Figure 61](#)). Par contre, cette différence de performance demeure significative pour les autres jours de l'épreuve, jusqu'à la fin de celle-ci. Cette différence de temps d'échappement oscille entre 9 et 14 s selon le temps du test (cette différence était de 12 à 20 s entre les souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} injectées avec le peptide Aβ). Les délais d'échappement des souris cPLA₂^{+/+} de cette expérience sont comparables à celles des animaux de même génotype injectés avec le peptide Aβ dans la précédente expérience (cPLA₂^{+/+} vs cPLA₂^{-/-}). De même, les performances des souris cPLA₂^{+/-} sont superposables à celles des souris cPLA₂^{-/-} de la précédente manipulation.

On peut donc en conclure que la délétion hétérozygote de la cPLA₂ protège également la mémoire de travail contre les effets délétères du peptide Aβ.

La mémoire à long terme a été évaluée lors de la dernière phase du test de la piscine de Morris. Les souris cPLA₂^{+/+} injectées avec le peptide Aβ ont présenté un nombre de passages sur l'emplacement initial de la plateforme significativement inférieur aux souris cPLA₂^{+/-} ayant reçu le même traitement (p=0,04) ([Figure 62](#)). De même, le délai moyen nécessaire aux souris pour atteindre cette zone est plus long de 2 s pour les souris cPLA₂^{+/+} que pour les souris cPLA₂^{+/-}. Cependant, cette dernière différence n'est pas significative, en raison d'une variabilité importante des valeurs pour chaque groupe. Enfin, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative dans les durées totales passées dans chaque quadrant de la piscine entre les deux groupes de souris (données non présentées).

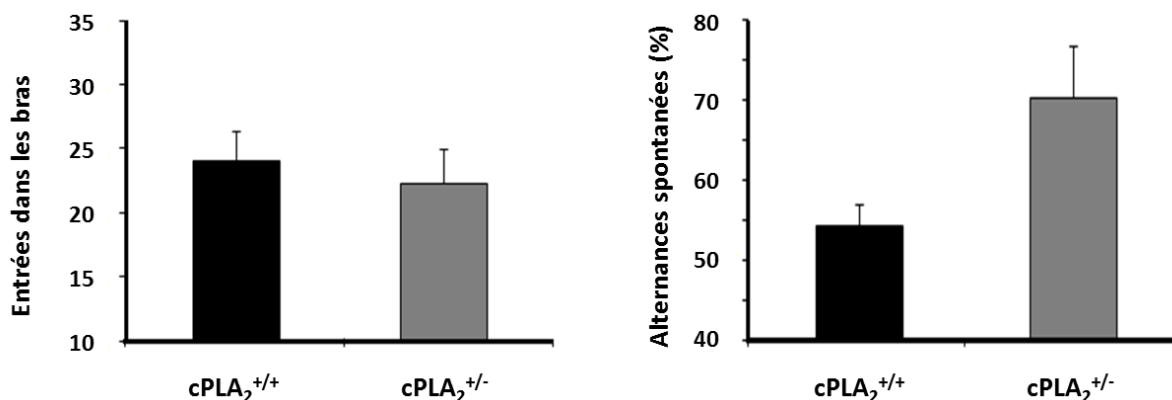


Figure 60 : Etude de la mémoire de travail chez les souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{+/-} injectées avec le peptide A β oligomérique

Le nombre d'entrées dans chacun des 3 bras du labyrinthe et le nombre d'alternances spontanées ont été enregistrés au cours des 5 min du test. L'entrée dans un bras est considérée comme valide lorsque la patte postérieure de la souris a franchi la limite du bras considéré. Une alternance spontanée est considérée comme correcte lorsque la souris passe successivement dans les 3 bras du labyrinthe. Le pourcentage d'alternances est défini comme le ratio du nombre d'alternances correctes sur le nombre d'alternances possibles, ramené à 100 %. Les données sont représentées comme la moyenne \pm SEM du nombre total d'entrées dans les bras du labyrinthe pour chaque groupe de souris (n=12 animaux par groupe). On n'observe aucune différence significative du nombre total d'entrées entre les souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{+/-} injectées avec le peptide A β . Par contre, il existe une réduction significative du nombre d'alternances spontanées pour les souris cPLA₂^{+/+} par rapport aux souris cPLA₂^{+/-}, injectées avec le peptide A β (54% vs 70%, p = 0,04).

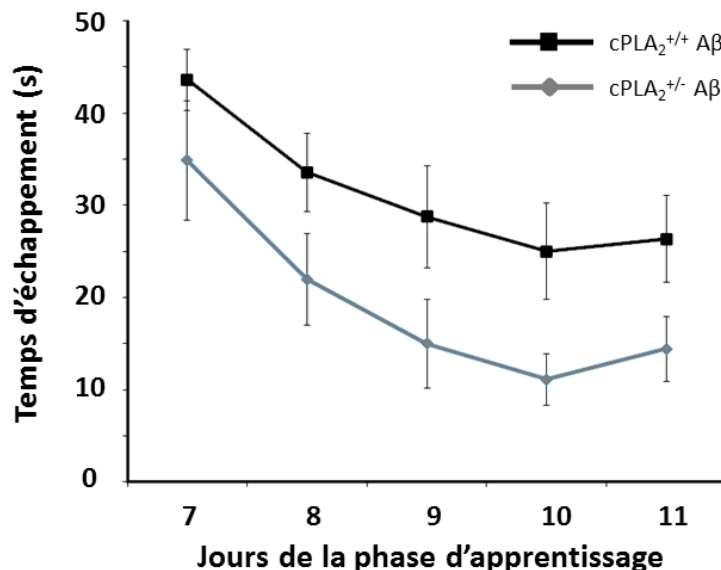


Figure 61 : Exploration des capacités d'apprentissage des souris grâce au labyrinthe aquatique de Morris

Le temps nécessaire aux souris pour trouver la plateforme a été enregistré pendant les 5 jours consécutifs de la phase d'apprentissage, à raison de 4 passages quotidiens séparés par un intervalle d'au moins 45 min. Les données sont représentées comme la moyenne \pm SEM de ces 4 passages pour chaque groupe de souris (n=12) à un jour donné de la phase d'apprentissage.

Le temps d'échappement des souris cPLA₂^{+/+} injectées avec A β est systématiquement allongé d'un délai moyen de 9 à 14 s par rapport aux souris cPLA₂^{+/-} injectées avec A β (p < 0,05). Toutefois, cette différence n'est pas significative pour le premier jour du test.

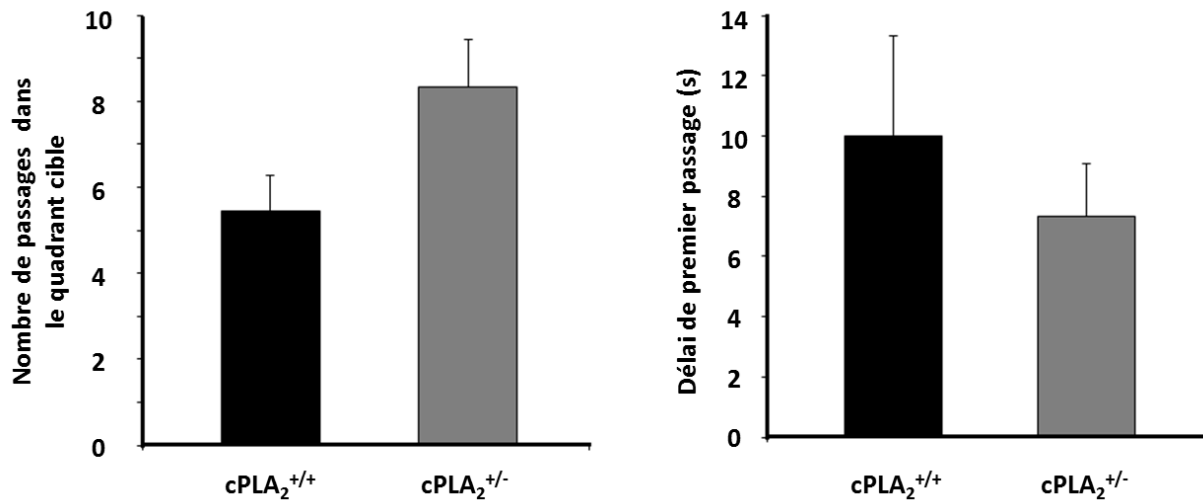


Figure 62 : Exploration de la mémoire à long terme au cours de la dernière phase du labyrinthe aquatique de Morris : nombre de passages et délai de premier passage sur le quadrant cible (position initiale de la plateforme)

Durant cette dernière phase du test, la souris dispose de 60 s pour trouver la localisation initiale de la plateforme. Un système de videotracking permet de suivre le trajet de la souris dans les différents quadrants de la piscine. On s'intéresse plus particulièrement au quadrant cible (ayant contenu la plateforme). Les données sont présentées comme la moyenne +/- SEM du nombre de passages sur le quadrant cible et le délai initial nécessaire à la souris pour atteindre ce quadrant au début du test (n=12 souris par groupe).

Les souris cPLA₂^{+/+} injectées avec le peptide A β passent significativement moins souvent sur le quadrant cible que les souris cPLA₂^{+/-} ayant reçu un traitement similaire (p=0,04). Le délai de premier passage au quadrant cible est allongé de plus de 2 s pour les souris cPLA₂^{+/+} par rapport aux cPLA₂^{+/-}, mais cette différence n'est pas significative (p=0,36).

La délétion hétérozygote du gène de la cPLA₂ pourrait donc conférer aux souris un certain niveau de protection sur la mémoire à long terme. Cette protection serait cependant moins importante que pour les souris cPLA₂^{-/-}.

Cependant, il semble nécessaire d'évaluer conjointement les animaux des 3 génotypes (cPLA₂^{+/+}, cPLA₂^{+/-} et cPLA₂^{-/-}), soumis aux différents traitements (contrôle vs A β) en effectif suffisant pour comparer de manière certaine les niveaux de vulnérabilité au peptide A β .

Il apparaît donc que la délétion d'un seul allèle de la cPLA₂ est suffisante pour protéger les fonctions de mémoire à court terme et d'apprentissage des souris contre les effets délétères de l'administration ICV de peptide A β soluble. Cette protection semble moins efficace au niveau de la mémoire à long terme. Compte tenu de cette observation, nous avons limité le reste de nos investigations aux souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-}.

I – 4 Oligomères A β et perte synaptique, implication de la cPLA $_2$

Nous avons précédemment montré que l'inactivation du gène de la cPLA $_2$ procure aux souris une résistance complète contre les altérations mnésiques induites par l'exposition au peptide A β soluble. Nous avons voulu caractériser les événements cellulaires, synaptiques et biochimiques associés aux observations comportementales. En utilisant le même modèle d'injection ICV, notre équipe avait précédemment montré que l'exposition au peptide A β induisait une perturbation des synapses, accompagnée d'une réduction de différentes protéines synaptiques [[Garcia, 2010](#)] [[Youssef, 2008](#)]. Nous avons focalisé nos investigations sur la région de l'hippocampe, puisque celle-ci constitue la première région cérébrale touchée lors de la MA. De plus, notre modèle d'injection ICV permet l'administration de peptide A β dans cette région du cerveau [[Youssef, 2008](#)].

Après le dernier test comportemental de la série, les souris cPLA $_2^{+/+}$ et cPLA $_2^{-/-}$ ont été sacrifiées et leurs cerveaux ont été immédiatement récupérés et disséqués. Nous avons ainsi pu préparer des fractions membranaires, enrichies en synaptosomes, à partir de ces échantillons d'hippocampe. Nous avons pu mesurer le niveau d'expression de différentes protéines synaptiques au sein de ces fractions par immuno blot.

Chez les souris cPLA $_2^{+/+}$, 14 jours après l'injection d'oligomères A β , les protéines pré- et post synaptiques : synaptotagmine, synaptophysine et PSD95, sont très nettement diminuées par rapport aux souris de même génotype injectées avec du PBS ([Figure 63](#)). Une analyse densitométrique des bandes a permis de quantifier le niveau d'expression de ces protéines et de le normaliser par rapport à celui de l'actine. Cette exploitation quantitative a ainsi permis de montrer le caractère significatif de leur diminution ($p < 0,05$) ([Figure 63](#)).

Au contraire, dans les fractions membranaires provenant de l'hippocampe des souris cPLA $_2^{-/-}$ injectées avec le peptide A β soluble, les taux de ces différentes protéines demeurent inaltérés et sont comparables à ceux des souris contrôles ([Figure 63](#)).

L'inactivation du gène de la cPLA $_2$ protège donc l'intégrité des synapses de l'hippocampe contre les déstructurations induites par les oligomères solubles de peptide A β .

Ces observations biochimiques confortent donc les données comportementales rapportées plus haut. Elles proposent un substratum neurophysiologique à la protection conférée par l'inactivation du gène de la cPLA $_2$ contre les effets du peptide A β .

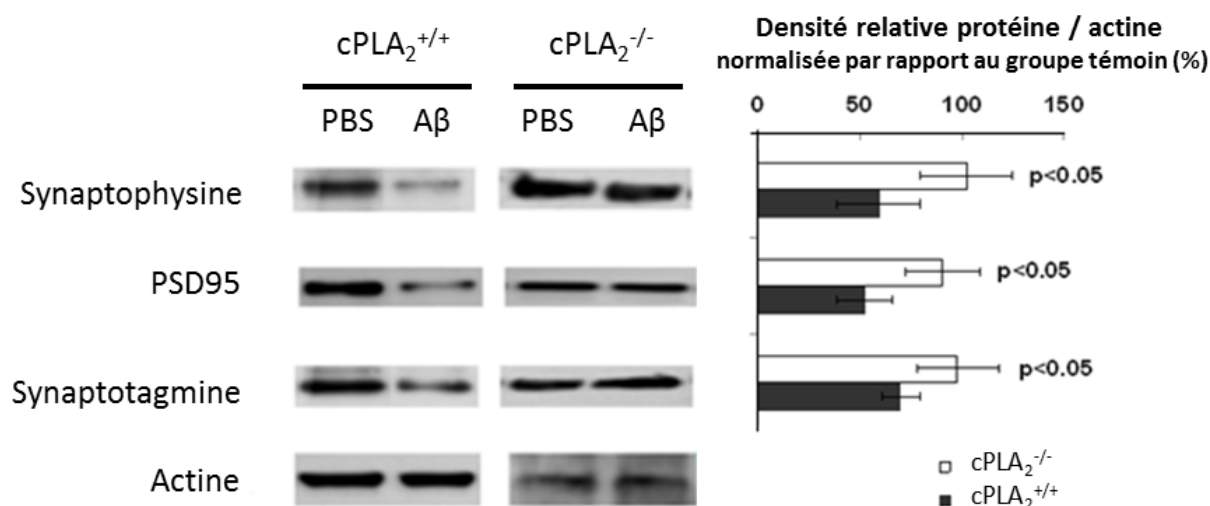


Figure 63 : Etude des niveaux d'expression de protéines synaptiques : synaptophysine, synaptotagmine et PSD95, dans les fractions membranaires préparées à partir d'hippocampes de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} après injection ICV de peptide Aβ ou de soluté contrôle

Ces niveaux d'expression ont été mesurés par immunoblot (à gauche), avec quantification des bandes par densitométrie (à droite). Les souris ont été sacrifiées 14 jours après l'injection ICV de peptide Aβ ou de PBS (contrôle). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge (*loading control*) pour l'analyse par immuno blot. Les mesures densitométriques de chaque protéine ont été normalisées par rapport à l'actine. Les niveaux d'expression des protéines chez les souris injectées avec le peptide Aβ sont exprimés en pourcentage par rapport au groupe témoin du même génotype. Les données sont présentées comme la moyenne +/- SEM de 3 mesures indépendantes.

On note une diminution significative des protéines synaptiques dans l'hippocampe des souris cPLA₂^{+/+} injectées avec du peptide Aβ. Par contre, les souris cPLA₂^{-/-} exposées au peptide Aβ ne subissent aucune modification de la composition en protéines synaptiques au niveau des synaptosomes de l'hippocampe.

I – 5 Résistance des neurones cPLA₂^{-/-} aux oligomères de peptide Aβ

Notre équipe a précédemment montré que l'exposition de neurones au peptide Aβ soluble entraîne une réduction importante de la viabilité neuronale [Kriem, 2005] [Malaplate-Armand, 2006]. De même, notre groupe a également apporté la preuve que l'inhibition de la cPLA₂, par voie pharmacologique ou par l'utilisation d'ASO, protège ces cellules contre l'apoptose induite par les oligomères de peptide Aβ [Kriem, 2005]. Les souris cPLA₂^{-/-} étant totalement résistantes aux effets délétères du peptide Aβ, tant sur le plan comportemental que synaptique, nous avons alors cherché à déterminer le niveau de sensibilité *in vitro* de neurones issus de ces souris cPLA₂^{-/-} à la toxicité du peptide Aβ.

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'apoptose de neurones corticaux embryonnaires en culture primaire, issus de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+}, induite par l'exposition à 1 et 5 μM de peptide Aβ pendant 24 h. Comme notre équipe l'avait montré

précédemment, les neurones de souris $cPLA_2^{+/+}$ présentent une réduction significative de leur viabilité après 24 h d'incubation, celle-ci atteignant 60 et 50 % de la valeur du témoin, pour ces deux concentrations de peptide A β , respectivement ([Figure 64](#)). Cette réduction de la viabilité cellulaire s'accompagne d'une augmentation de la proportion de noyaux apoptotiques, celle-ci atteignant 5 fois la valeur du contrôle pour des cellules traitées par 1 μ M de peptide A β pendant 24 h.

Ainsi, l'exposition de neurones $cPLA_2^{+/+}$ aux oligomères solubles de peptide A β induit une apoptose importante de ceux-ci.

Par contre, la viabilité des neurones $cPLA_2^{-/-}$ demeure inaltérée après une incubation de 24 h en présence de 1 μ M de peptide A β ([Figure 64](#)). De même, la proportion de noyaux apoptotiques n'est pas affectée par l'exposition au peptide A β dans les neurones $cPLA_2^{-/-}$. Cependant, on détecte une discrète diminution de la viabilité cellulaire pour des cellules $cPLA_2^{-/-}$ exposées à 5 μ M de peptide A β pendant 24 h (réduction de viabilité de 15% par rapport au contrôle).

Ainsi, l'inactivation du gène de la $cPLA_2$ assure une protection significative des cellules contre l'apoptose induite par le peptide A β soluble *in vitro*.

Ensuite, nous avons cherché à établir un parallèle entre la résistance aux effets délétères du peptide A β soluble observée *in vivo* chez les souris $cPLA_2^{-/-}$ et *in vitro* dans les neurones embryonnaires issus de ces mêmes souris. Nous avons, en effet, montré que la protection des fonctions mnésiques des souris $cPLA_2^{-/-}$ injectées avec le peptide A β s'accompagne du maintien du niveau d'expression de diverses protéines synaptiques, dont PSD95 ([Figure 63](#)). Nous avons alors cherché à mettre en évidence une protection similaire des protéines synaptiques sur des neurones $cPLA_2^{-/-}$ en culture exposés au peptide A β soluble.

Dans ce but, des neurones embryonnaires provenant de souris $cPLA_2^{-/-}$ et $cPLA_2^{+/+}$ ont été exposés pendant 6 h à 1 μ M d'oligomères solubles de peptide A β , ou de milieu contrôle. Les cellules ont ensuite été récupérées et le niveau de PSD95 a été mesuré par immunoblot. Les films radiographiques ont été numérisés et le niveau d'expression de PSD95 a été quantifié par densitométrie, puis normalisé par rapport à celui de la tubuline.

L'incubation des neurones $cPLA_2^{+/+}$ avec le peptide A β oligomérique entraîne une réduction significative du niveau de PSD95 par rapport aux cellules traitées avec le milieu contrôle ([Figure 65](#)). A l'inverse, aucune variation de PSD95 n'est mise en évidence dans les neurones $cPLA_2^{-/-}$ traités avec le peptide A β pendant 6 h.

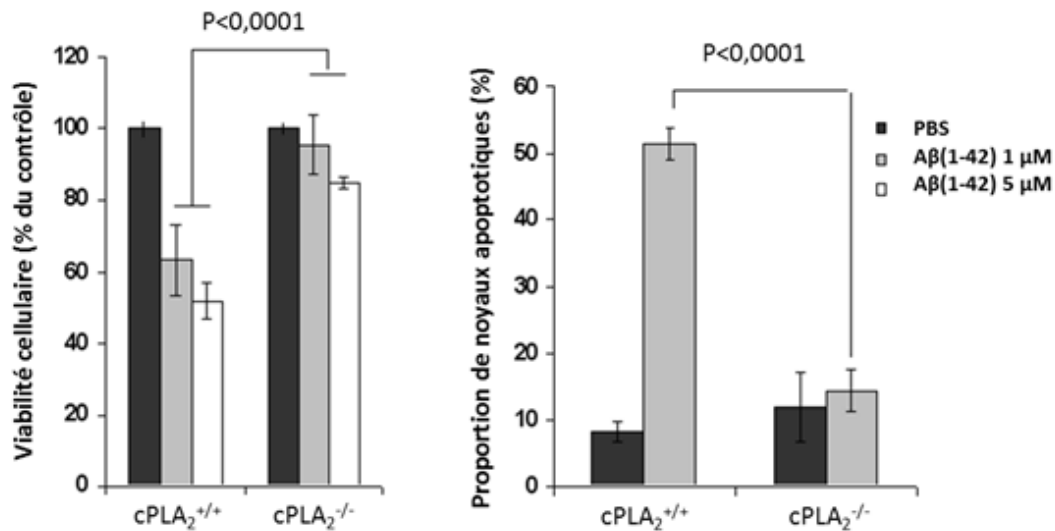


Figure 64 : Etude de l'apoptose induite par l'exposition de neurones corticaux en culture primaire aux oligomères solubles de peptide Aβ pendant 24 heures

La viabilité cellulaire a été appréciée par le test MTT (gauche). La proportion de noyaux apoptotiques a été déterminée par comptage après coloration nucléaire au DAPI. 10 champs indépendants de microscope ont été étudiés par puits (droite). Pour chaque condition expérimentale, les données sont exprimées comme la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes avec 4 déterminations individuelles chacune (soit $n=12$).

L'inactivation du gène de la cPLA₂ entraîne une réduction de la mortalité cellulaire après exposition au peptide Aβ, accompagnée d'une diminution de la proportion de noyaux apoptotiques. Ainsi, l'inactivation constitutive de la cPLA₂ confère aux neurones une résistance contre l'apoptose induite par les oligomères solubles de peptide Aβ.

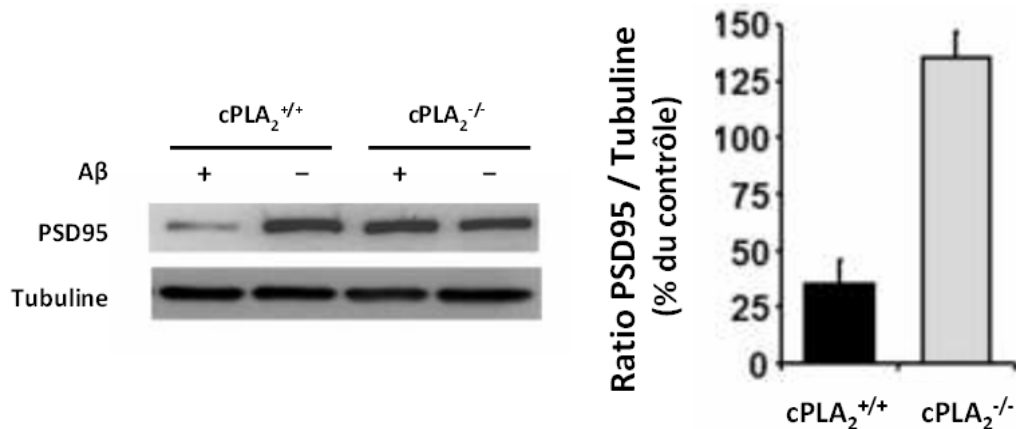


Figure 65 : Etude des protéines synaptiques dans des neurones en culture primaire exposés aux oligomères solubles de peptide Aβ

Des neurones corticaux issus de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} ont été exposés à des oligomères solubles de peptide Aβ(1-42) à 1 μM ou à du milieu contrôle pendant 6 h. Le niveau d'expression de la protéine synaptique PSD95 a alors été évalué par immunoblot (gauche). L'analyse densitométrique a permis de déterminer le niveau de PSD95, et de rapporter celui-ci à la β-tubuline, utilisée comme *loading control* (droite). L'expression de PSD95 est normalisée par rapport à la tubuline pour les cellules traitées par Aβ et rapportée à celle des cellules de même génotype, traitées par le soluté contrôle. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm SEM de 2 expériences indépendantes.

L'incubation de neurones primaires issus de souris cPLA₂^{+/+} en présence de peptide Aβ soluble pendant 6 h entraîne une réduction du niveau d'expression de PSD95. A l'inverse, on ne retrouve aucune variation de PSD95 dans les neurones issus de souris cPLA₂^{-/-} soumis à cette même exposition au peptide Aβ.

La protection des neurones $cPLA_2^{-/-}$ *in vitro* s'accompagne donc également d'une protection des protéines synaptiques contre les effets délétères du peptide A β soluble. On peut ainsi établir un parallèle entre les observations *in vivo* et *in vitro* sur le plan biochimique.

I – 6 Conclusion

Nos résultats montrent clairement que l'administration ICV d'oligomères solubles de peptide A β induit de profondes altérations dans les fonctions mnésiques et d'apprentissage chez les souris sauvages ($cPLA_2^{+/+}$). Ces altérations comportementales s'accompagnent et sont soutenues par une déstructuration des synapses, se traduisant sur le plan biochimique par une diminution importante de diverses protéines synaptiques. *In vitro*, les neurones corticaux en culture primaire subissent les effets pro apoptotiques du peptide A β . Parallèlement aux observations *in vivo*, l'incubation de ces cellules $cPLA_2^{+/+}$ avec des oligomères A β solubles entraîne une profonde réduction de la protéine synaptique PSD95.

Ces différentes observations rejoignent et illustrent divers travaux précédemment publiés par notre équipe, tant sur les effets pro apoptotiques du peptide A β *in vitro* [[Kriem, 2005](#)] [[Malaplate-Armand, 2006](#)] que sur sa toxicité sur le plan comportemental et synaptique *in vivo* [[Garcia, 2010](#)] [[Youssef, 2008](#)].

Cependant, on note une résistance totale contre les effets délétères des oligomères solubles de peptide A β , conférée par l'inactivation du gène de la $cPLA_2$.

En effet, sur le plan *in vivo*, les souris $cPLA_2^{-/-}$ présentent une mémoire à court et long terme, ainsi que des fonctions d'apprentissage inaltérées après injection ICV de peptide A β soluble, et comparables à celles des animaux témoins des deux génotypes. Une délétion partielle de la $cPLA_2$ confère également une protection contre les effets délétères du peptide A β , puisque les animaux hétérozygotes $cPLA_2^{+/-}$ présentent également une protection totale de leur mémoire de travail. Cette résistance se manifeste à un moindre degré en ce qui concerne les fonctions d'apprentissage et de mémoire à long terme. Cette protection sur le plan comportemental est associée à la conservation de l'intégrité des synapses, qui se traduit par des niveaux constants de protéines synaptiques après injection ICV de peptide A β soluble.

Enfin, sur le plan *in vitro*, les neurones corticaux issus de souris $cPLA_2^{-/-}$ en culture primaires résistent totalement à l'apoptose induite par l'exposition aux oligomères solubles de peptide

A β . On note également un maintien du niveau d'expression des protéines synaptiques dans les cellules cPLA₂^{-/-} exposées au peptide A β soluble.

L'inactivation du gène de la cPLA₂ protège donc totalement les neurones contre les effets délétères du peptide A β , tant *in vitro* qu'*in vivo*. Ces observations confirment les précédents travaux de notre équipe, qui montraient que l'inhibition de la cPLA₂ sur des neurones en culture, au moyen d'inhibiteurs pharmacologiques ou d'ASO, confère une protection partielle contre l'apoptose induite par le peptide A β soluble [[Kriem, 2005](#)]. Nous consolidons ces travaux en utilisant ici un animal KO, en élevant encore le degré de protection vers la résistance totale, et en étendant cette résistance au plan *in vivo*, tant au niveau comportemental que synaptique.

Nous avons alors cherché à préciser l'implication de la cPLA₂ dans la médiation des effets délétères des oligomères solubles de peptide A β .

II – Fonctions physiologiques et voies de transduction impliquées dans la résistance des souris $cPLA_2^{-/-}$ à la neurotoxicité des oligomères $A\beta$

Nous avons montré que l'inactivation du gène de la $cPLA_2$ confère une protection contre la toxicité des oligomères solubles de peptide $A\beta$, tant par une protection des fonctions mnésiques et d'apprentissage, que par l'intégrité biochimique des synapses et que par une résistance à l'apoptose. Nous avons alors focalisé nos investigations sur l'origine de cette protection résultant de l'inactivation constitutive de cette enzyme. Nous avons successivement exploré les fonctions physiologiques et les voies de transduction pouvant être impliquées dans la toxicité des oligomères solubles de peptide $A\beta$ et potentiellement altérées par l'inactivation de la $cPLA_2$.

II – 1 Activation de la $cPLA_2$ par les oligomères $A\beta$

La première partie de nos investigations s'est focalisée sur l'activation de la $cPLA_2$ en réponse à l'exposition aux oligomères solubles de peptide $A\beta$. En effet, l'activation de cette enzyme par le peptide $A\beta$ constitue un argument important en faveur de son implication dans la médiation des effets délétères de ces molécules. De même, l'inactivation constitutive de la $cPLA_2$ pourrait alors expliquer, du moins en partie la protection conférée aux animaux et aux cellules, puisque la médiation de la toxicité d' $A\beta$ serait alors plus ou moins totalement interrompue.

II – 1 a. Etude de la phosphorylation de la $cPLA_2$ après exposition aux oligomères solubles de peptide $A\beta$

La $cPLA_2$ est activée par deux évènements : en premier lieu, sa translocation au niveau de la membrane des organites cellulaires, qui lui permet d'accéder à son substrat phospholipidique, et en second lieu, sa phosphorylation, sur plusieurs sérines, par diverses kinases, qui lui confère son activité catalytique. La phosphorylation au niveau de la Ser⁵⁰⁵ joue un rôle critique pour l'activation de la $cPLA_2$.

Nous avons donc mesuré le niveau de phosphorylation de la $cPLA_2$ sur la Ser⁵⁰⁵ sur des échantillons d'hippocampe de souris $cPLA_2^{+/+}$, prélevés 6 h après l'injection ICV de 500 pmol d'oligomères solubles de peptide $A\beta$ ou de soluté PBS contrôle. Cette évaluation a été

réalisée par immunoblot sur des homogénats de tissus, en mesurant de manière concomitante le niveau de la phospho cPLA₂ ([P-cPLA₂ Ser⁵⁰⁵](#)) et de la cPLA₂ totale, au moyen d'anticorps spécifiques. L'analyse densitométrique des images a quantifié l'abondance des deux formes de la protéine et de rapporter le niveau de P-cPLA₂ Ser⁵⁰⁵ à la cPLA₂ totale.

Le niveau de la cPLA₂ totale est similaire entre les animaux injectés avec le PBS et ceux injectés avec le peptide Aβ ([Figure 66](#)). On note par contre une augmentation du niveau de phosphorylation de la cPLA₂ chez les souris injectées avec le peptide Aβ par rapport aux animaux contrôles ([Figure 66](#)). Cette augmentation est relativement faible, et à la limite de la significativité (p=0,05).

Il existe donc une activation de la cPLA₂ au niveau de l'hippocampe après administration ICV de peptide Aβ soluble, comme en témoigne le niveau de sa phosphorylation.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la cinétique de cette activation dans le temps, et, pour ce faire, nous avons répété l'expérience 24 h après injection ICV de peptide Aβ sur des souris cPLA₂^{+/+}. Le protocole expérimental était rigoureusement identique à celui présenté ci-dessus.

La mesure de l'abondance relative de la P-cPLA₂ Ser⁵⁰⁵ et de la cPLA₂ totale n'a retrouvé aucune différence du niveau de phosphorylation de la cPLA₂ entre les souris injectées avec le peptide Aβ et celles injectées avec le PBS ([Figure 67](#)).

Par suite, l'activation de la cPLA₂ en réponse au peptide Aβ soluble constitue un événement à la fois très précoce et très transitoire. La cPLA₂ constitue donc un acteur des phases initiales de la médiation des effets délétères du peptide Aβ oligomérique.

Cette observation sur la précocité de l'implication de la cPLA₂ confirme les effets sur la réduction de PSD95 au bout de 6 h d'exposition au peptide Aβ, ou sur la mort cellulaire par apoptose après 24 h d'incubation en présence d'oligomères solubles.

II – 1 b. Etude des voies d'activation en amont de la cPLA₂ : médiation de la toxicité des oligomères solubles de peptide Aβ

L'exposition aux oligomères solubles de peptide Aβ entraîne l'activation de la cPLA₂ par sa phosphorylation. Nous nous sommes intéressés aux voies d'activation en amont de la cPLA₂. Parmi les différentes kinases assurant la phosphorylation de la cPLA₂ sur la Ser⁵⁰⁵ figure la kinase ERK1/2. Une précédente étude de notre équipe a montré que des inhibiteurs de la voie des MAPK protègent des neurones en culture contre l'apoptose induite par le peptide Aβ soluble [[Kriem, 2005](#)].

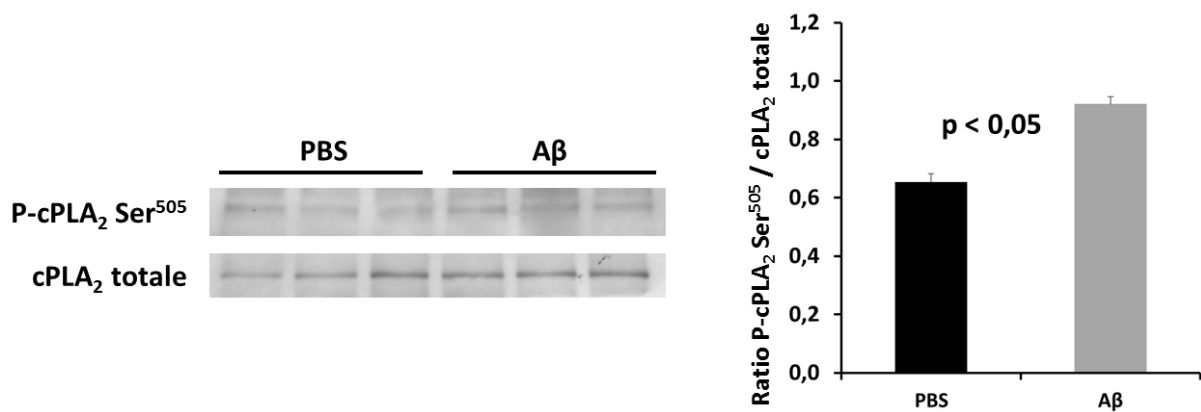


Figure 66 : Mesure du niveau de phosphorylation de la cPLA₂ sur la sérine 505 dans des homogénats d'hippocampe, 6 heures après injection ICV d'oligomères solubles de peptide Aβ

Des souris cPLA₂^{+/+} ont été injectées en ICV avec 500 pmol de peptide Aβ soluble ou un volume équivalent de PBS (soluté contrôle). 6 h après l'injection, les animaux ont été sacrifiés et leur cerveau récupéré et disséqué. Les niveaux d'expression de la P-cPLA₂ Ser⁵⁰⁵ et de la cPLA₂ totale ont été mesurés par immunoblots sur des homogénats d'hippocampe. Chaque groupe expérimental comprenait 3 souris. L'expérience a été répétée deux fois. Les données sont présentées comme la moyenne +/- SEM du ratio P-cPLA₂ Ser⁵⁰⁵ / cPLA₂ totale sur les deux expériences.

L'exposition *in vivo* aux oligomères solubles de peptide Aβ entraîne une augmentation de la phosphorylation de la cPLA₂ sur la Ser⁵⁰⁵ (p= 0,031) et témoigne de son activation très précoce après administration de peptide Aβ exogène.

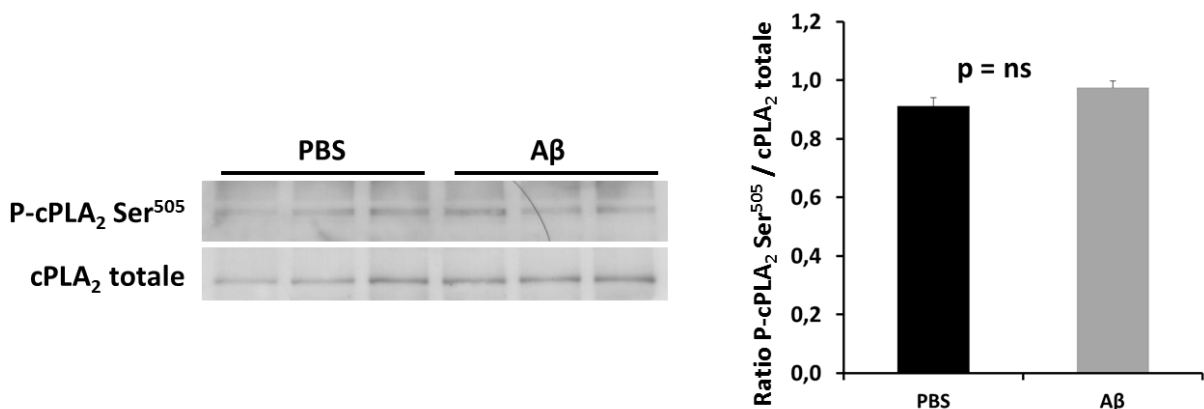


Figure 67 : Mesure du niveau de phosphorylation de la cPLA₂ sur la sérine 505 dans des homogénats d'hippocampe, 24 heures après injection ICV d'oligomères solubles de peptide Aβ

Des souris cPLA₂^{+/+} ont été injectées en ICV avec 500 pmol de peptide Aβ soluble ou un volume équivalent de PBS (soluté contrôle). 24 h après l'injection, les animaux ont été sacrifiés et leur cerveau récupéré et disséqué. Les niveaux d'expression de la P-cPLA₂ Ser⁵⁰⁵ et de la cPLA₂ totale ont été mesurés par immunoblots sur des homogénats d'hippocampe. Chaque groupe expérimental comprenait 3 souris. L'expérience a été répétée deux fois. Les données sont présentées comme la moyenne +/- SEM du ratio P-cPLA₂ Ser⁵⁰⁵ / cPLA₂ totale sur les deux expériences.

On ne détecte plus aucune augmentation de la phosphorylation de la cPLA₂ sur la Ser⁵⁰⁵ 24 h après l'administration d'oligomères solubles de peptide Aβ *in vivo*, ce qui témoigne du caractère extrêmement précoce et transitoire de son activation.

Nous avons alors exploré l'état d'activation de cette kinase dans des structures cérébrales de souris $cPLA_2^{+/+}$ et $cPLA_2^{-/-}$ après injection d'oligomères de peptide A β ou de soluté témoin (PBS).

Nous avons donc injecté des souris $cPLA_2^{+/+}$ et $cPLA_2^{-/-}$ avec 500 pmol d'oligomères solubles de peptide A β ou un volume équivalent de PBS en ICV. Sept jours après, les animaux ont été sacrifiés et leur cerveau récupéré et disséqué. Des homogénats tissulaires ont été préparés à partir de l'hippocampe et du cortex. Les niveaux d'ERK1/2 phosphorylé ([P-ERK1/2](#)) et total ont été mesurés par immunoblot. L'abondance relative de ces 2 formes d'ERK a été déterminée par analyse densitométrique.

On constate que le niveau d'ERK total ne varie pas suivant la nature du produit injecté, ni selon le génotype des souris, dans les 2 structures cérébrales étudiées ([Figure 68](#)).

Le niveau de P-ERK1/2 est plus élevé dans l'hippocampe des souris $cPLA_2^{-/-}$ injectées avec le PBS, par rapport aux souris $cPLA_2^{+/+}$ ayant reçu le même traitement.

L'administration de peptide A β entraîne une nette augmentation de P-ERK1/2 dans l'hippocampe des souris $cPLA_2^{+/+}$. Par contre, chez les animaux $cPLA_2^{-/-}$, l'injection ICV de peptide A β soluble n'entraîne aucune modification de la phosphorylation d'ERK1/2, son niveau demeurant identique chez les souris recevant du peptide A β ou du PBS.

Enfin, au niveau du cortex, on ne note aucune différence de phosphorylation d'ERK1/2 entre les animaux $cPLA_2^{+/+}$ et $cPLA_2^{-/-}$ en conditions basales. L'administration de peptide A β n'entraîne aucune modification du niveau de phosphorylation de la kinase dans le cortex pour tous les génotypes étudiés.

II – 2 Neuro inflammation et effets rapides des oligomères solubles de peptide A β

L'AA, une fois libéré des PL membranaires sous l'action hydrolytique de la $cPLA_2$, peut être transformé en une série de médiateurs pro-inflammatoires. Ces derniers peuvent initier et entretenir une neuroinflammation et une prolifération gliale. Nous avons donc cherché à déterminer si l'injection ICV d'A β entraînait une réaction inflammatoire et/ou une activation des cellules gliales. En effet, ces différents phénomènes pourraient participer, du moins en partie, à la genèse des altérations structurales et fonctionnelles observées chez les souris $cPLA_2^{+/+}$.

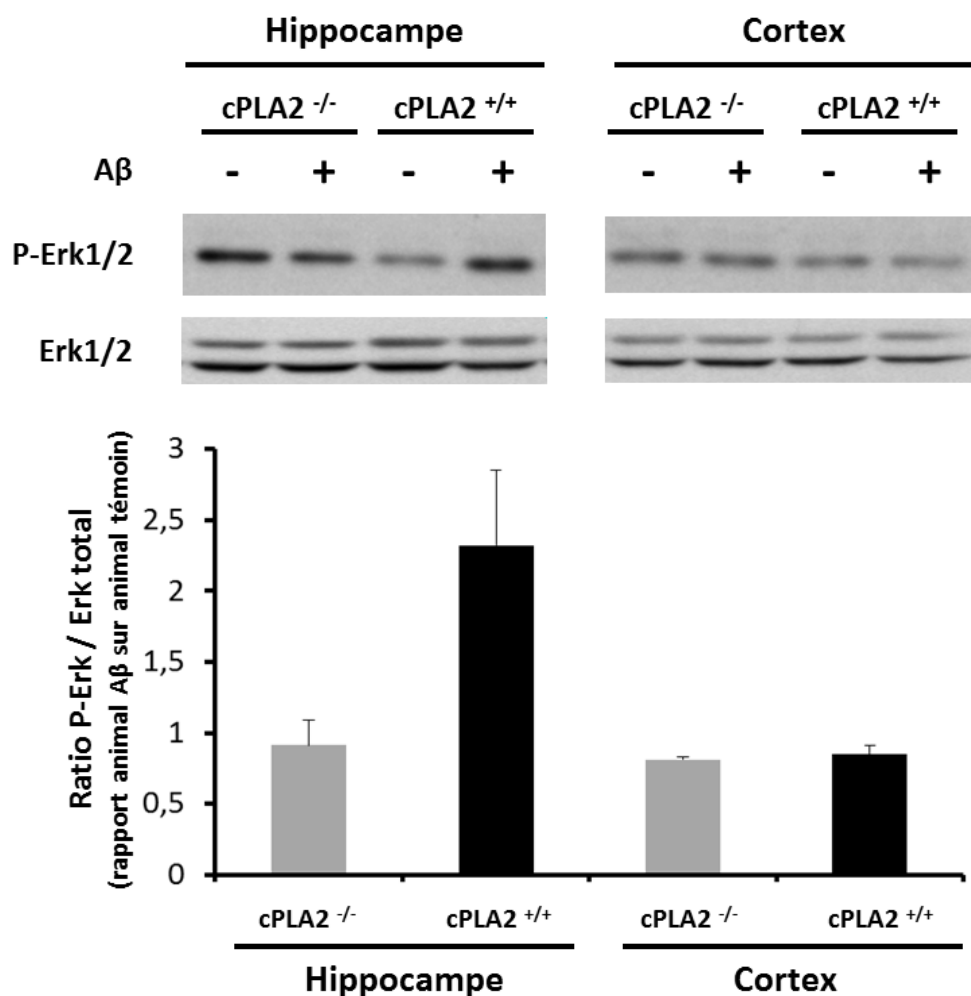


Figure 68 : Etude de la phosphorylation de la kinase ERK1/2 dans des homogénats d'hippocampe et de cortex après injection ICV de peptide Aβ soluble chez des souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-}

Des souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-} ont été injectées en ICV avec 500 pmol d'oligomères solubles de peptide Aβ. Ces animaux ont été sacrifiés 7 jours après l'injection et leurs cerveaux récupérés et disséqués. Le niveau d'expression de ERK1/2 phosphorylé (P-ERK1/2) et total (ERK1/2) a été mesuré par immunoblot, complété par une analyse densitométrique des images. Chaque groupe expérimental comportait 3 souris et les expériences ont été réalisées en double. Fig. 68 haut : Les images présentées ci-dessus montrent les niveaux de P-ERK1/2 et de ERK1/2 total sur un animal représentatif de chaque condition expérimentale. Fig. 68 bas : Le graphique montre les variations du niveau de phosphorylation d'ERK1/2 après injection ICV de peptide Aβ, dans les différentes structures cérébrales et selon les différents génotypes. Celui-ci est défini comme le ratio de P-ERK1/2 sur ERK1/2 total chez les souris injectées avec Aβ, rapporté aux animaux témoins de même génotype. Les résultats sont exprimés comme la moyenne +/- SEM de ce rapport sur les deux séries d'expériences (n=6).

Il n'existe aucune variation de l'expression de ERK1/2 total en fonction du génotype, dans aucune des structures cérébrales étudiées. Par contre, il existe une phosphorylation plus importante de ERK1/2 chez les souris cPLA₂^{-/-} injectées avec le PBS, par rapport aux souris cPLA₂^{+/+} ayant reçu un traitement similaire. L'injection ICV de peptide Aβ entraîne une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2, de l'ordre du doublement, au niveau de l'hippocampe des souris cPLA₂^{+/+}. Au contraire, chez les souris cPLA₂^{-/-}, on n'observe aucune modification de la phosphorylation de ERK1/2 dans l'hippocampe entre les animaux injectés avec le PBS et ceux injectés avec le peptide Aβ. Aucune variation de P-ERK1/2 n'est notée au niveau du cortex entre les animaux ayant reçu du peptide Aβ et du PBS, quel que soit leur génotype.

Comme l'inactivation constitutive de la cPLA₂ entraîne une diminution des phénomènes inflammatoires dans divers modèles expérimentaux, celle-ci pourrait expliquer la résistance observée chez les animaux cPLA₂^{-/-}.

Nous avons donc mesuré l'expression de plusieurs marqueurs gliaux, la GFAP pour la macroglie et Iba1 pour la microglie, ainsi que les taux d'IL-1β au niveau de l'hippocampe de souris cPLA₂^{+/+}, après injection ICV de peptide Aβ soluble ou de soluté contrôle (PBS).

Des prélèvements réalisés à 6, 24 et 48 h post injection nous ont permis d'apprécier la cinétique de ces différents marqueurs et d'apprécier l'activation des différents contingents de cellules gliales en réponse au peptide Aβ.

II – 2 a. Activation astrogliale après injection intra cérébro ventriculaire de peptide Aβ soluble

Nous avons étudié l'expression de la GFAP par immunoblot dans des homogénats d'hippocampe et de cortex, prélevés sur des souris cPLA₂^{+/+} à 6, 24 et 48 h post injection ICV de 500 pmol de peptide Aβ soluble ou de soluté contrôle (PBS). L'intensité des bandes a été déterminée par densitométrie et rapportée à celle de la β-tubuline, utilisée comme marqueur de charge.

On n'observe aucune augmentation significative des taux de GFAP chez les souris ayant reçu le peptide Aβ soluble par rapport à celles injectées avec le PBS, ni pour l'hippocampe, ni pour le cortex, à aucun des temps de l'étude ([Figure 69](#)).

On remarque même à 48 h une discrète augmentation du taux de GFAP chez les souris injectées avec le PBS par rapport à celles ayant reçu le peptide Aβ, dans l'hippocampe comme dans le cortex. Cette différence est toutefois à la limite de la significativité.

Enfin, on ne remarque aucune diminution significative des taux de GFAP à 24 et 48 h par rapport au taux initiaux (6h), suivant l'injection, pour les souris injectées avec le peptide Aβ ou le PBS.

Il semble donc que l'injection ICV de peptide Aβ n'entraîne aucune augmentation significative de la GFAP et donc, ne s'accompagne pas d'activation astrogliale. Ceci suggère que la toxicité des oligomères solubles de peptide Aβ n'est pas médiée par l'activation des astrocytes dans notre modèle d'injection ICV.

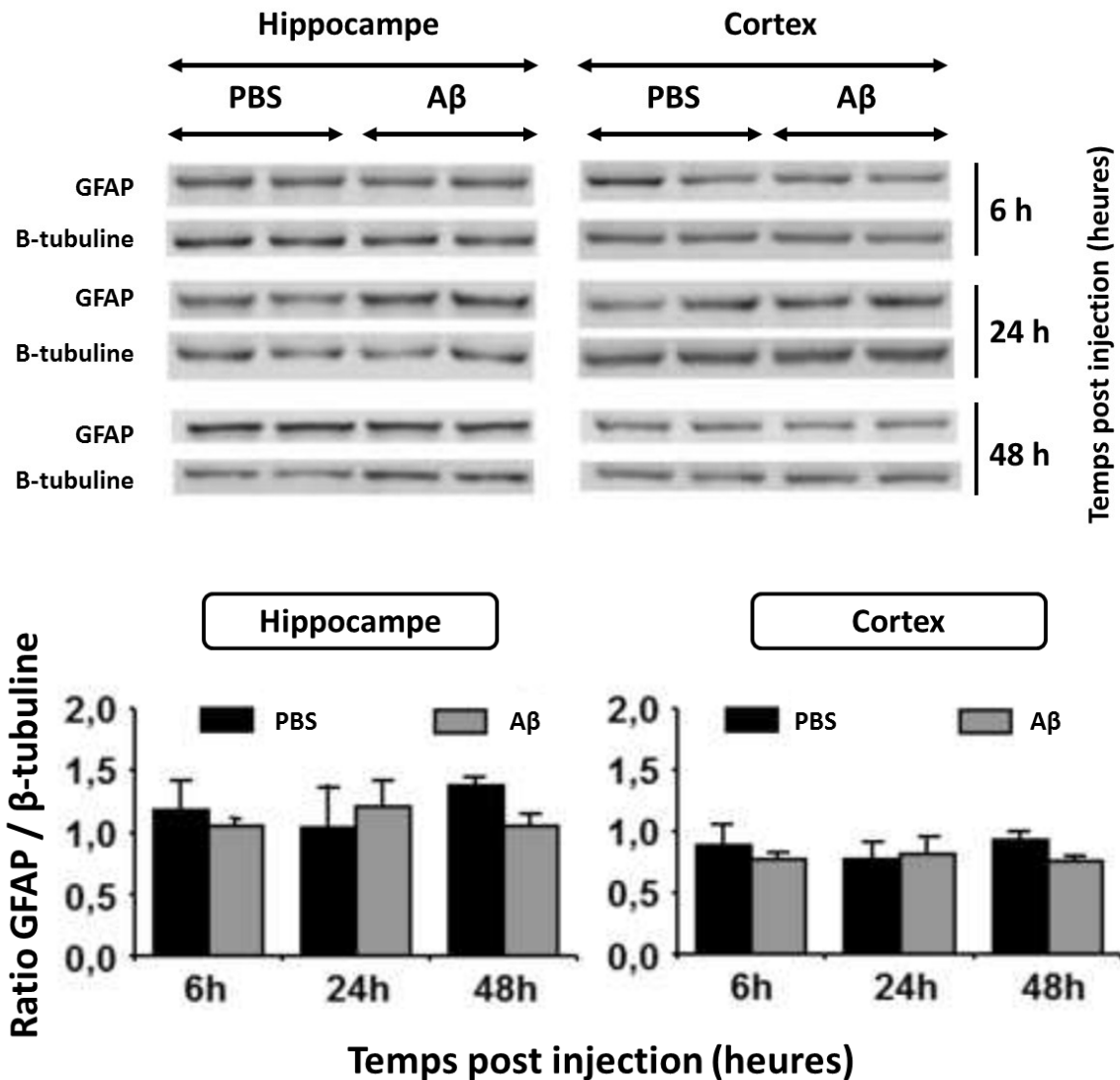


Figure 69 : Cinétique de l'expression de la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) après injection ICV de peptide A β soluble ou de soluté contrôle chez des souris cPLA $_2^{+/+}$

Les souris cPLA $_2^{+/+}$ ont été sacrifiées à 6, 24 et 48 h après l'injection ICV de 500 pmol de peptide A β soluble ou d'un volume équivalent de PBS. Immédiatement après le sacrifice des animaux, des homogénats d'hippocampe et de cortex ont été préparés et analysés par immunoblot. La figure du haut montre l'expression de la GFAP et de la β -tubuline dans les homogénats aux différents temps après injection. L'analyse densitométrique de l'expression de la GFAP, rapportée à celle de la β -tubuline est représentée sur la figure du bas. Les données sont exprimées comme la moyenne \pm SEM du ratio GFAP / β -tubuline, obtenue avec 2 immunoblots indépendants, réalisés sur 2 souris chacun (n=4).

L'injection ICV de peptide A β n'entraîne aucune augmentation significative de la concentration de GFAP, dans aucune structure considérée, à aucun des temps expérimentaux considérés. 48 h après l'injection, on note une discrète augmentation du ratio GFAP / β -tubuline dans l'hippocampe et le cortex des souris injectées avec le PBS par rapport à celles ayant reçu les oligomères A β . Cette différence reste toutefois à la limite de la significativité.

II – 2 b. Activation microgliale après injection intra cérébro ventriculaire de peptide A β soluble

Nous avons étudié l'expression du marqueur d'activation microgliale Iba1 par immunoblot dans des homogénats d'hippocampe et de cortex, prélevés sur des souris cPLA₂^{+/+} à 6, 24 et 48 h post injection ICV de 500 pmol de peptide A β soluble ou de soluté contrôle (PBS). L'intensité des bandes a été déterminée par densitométrie et rapportée à celle de la β -tubuline, utilisée comme marqueur de charge.

On n'observe aucune augmentation significative des taux d'Iba1 au niveau du cortex des souris injectées avec le peptide A β par rapport à celles recevant le PBS, à aucun des temps post injection considérés ([Figure 70](#)). De même, l'expression d'Iba1 ne varie pas au cours du temps au niveau du cortex, dans les 2 groupes expérimentaux.

Au niveau de l'hippocampe, on ne note aucune différence significative des niveaux d'Iba1 entre les 2 groupes, sauf à la 48^{ème} heure, où le niveau d'Iba1 dans l'hippocampe des souris injectées avec le peptide A β est supérieur à celui des animaux recevant le PBS, cette augmentation demeure toutefois à la limite de la significativité. On note également une tendance à la décroissance du niveau d'Iba1 au cours du temps chez les souris ayant reçu l'injection ICV de PBS, mais cette décroissance n'est réellement significative que pour la 48^{ème} heure. A l'inverse, on ne note aucune variation des taux d'Iba1 au cours du temps chez les animaux injectés avec les oligomères de peptide A β .

Ainsi, l'injection ICV de peptide A β n'entraîne aucune augmentation significative du niveau d'expression d'Iba1 au niveau de l'hippocampe, et encore moins du cortex.

Ces observations suggèrent que les effets délétères, provoqués par l'injection ICV de peptide A β soluble, ne résultent pas, dans notre modèle, de l'activation de la microglie.

II – 2 c. Cinétique de l'interleukine 1 β (IL-1 β) après injection intra cérébro ventriculaire de peptide A β soluble

Enfin, afin d'exclure l'hypothèse d'une éventuelle participation de l'inflammation dans la genèse des altérations observées dans notre modèle d'administration ICV de peptide A β oligomérique, nous avons étudié la cinétique d'une cytokine, l'IL-1 β , au niveau de l'hippocampe de souris cPLA₂^{+/+} aux mêmes temps que précédemment.

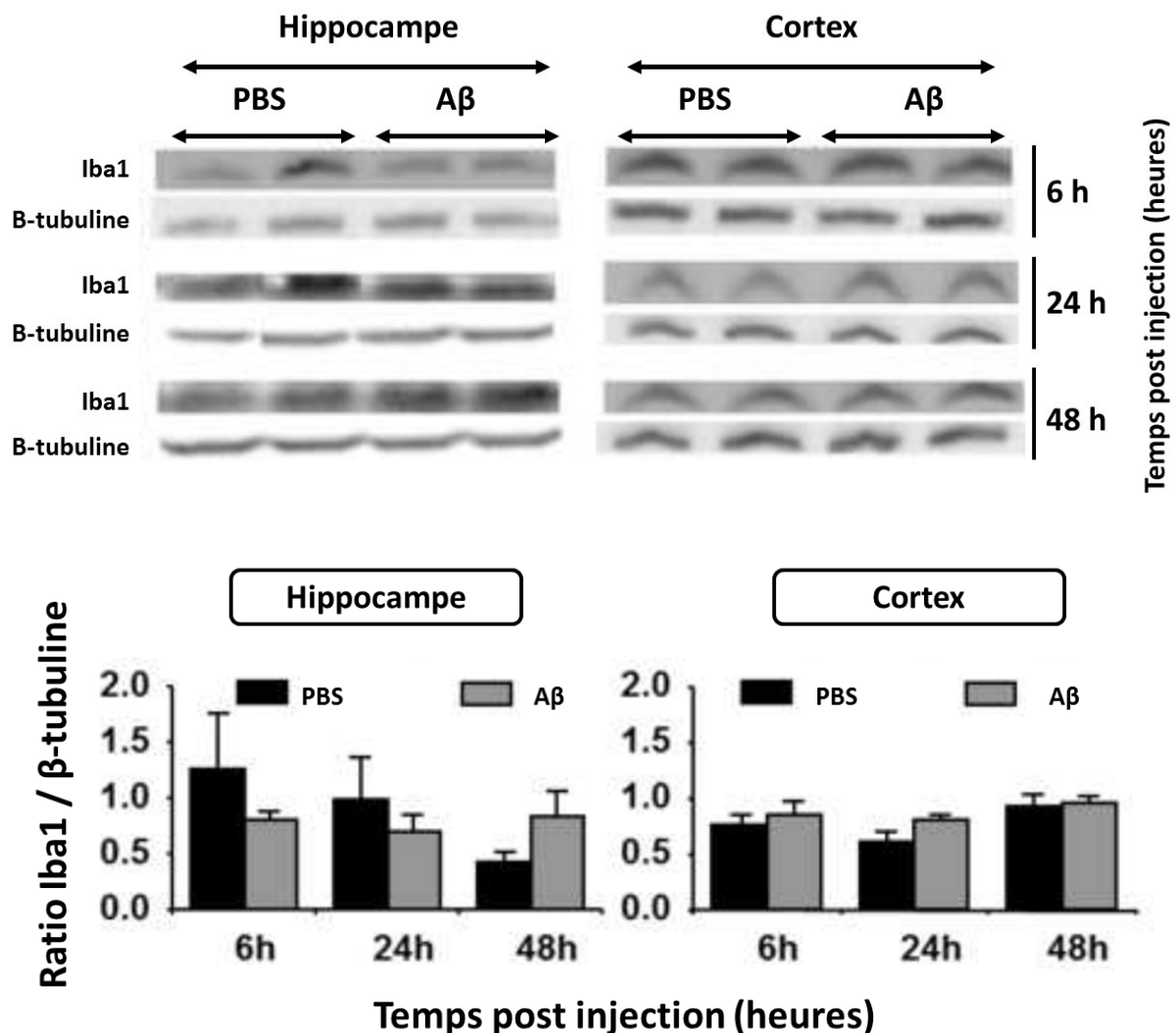


Figure 70 : Cinétique de l'expression de la *ionized calcium binding adapter molecule 1* (Iba1) après injection ICV de peptide Aβ soluble ou de soluté contrôle chez des souris cPLA₂^{+/+}

Les souris cPLA₂^{+/+} ont été sacrifiées à 6, 24 et 48 h après l'injection ICV de 500 pmol de peptide Aβ soluble ou d'un volume équivalent de PBS. Immédiatement après le sacrifice des animaux, des homogénats d'hippocampe et de cortex ont été préparés et analysés par immunoblot.

La figure du haut montre l'expression d'Iba1 et de la β-tubuline dans les homogénats aux différents temps après injection. L'analyse densitométrique de l'expression d'Iba1, rapportée à celle de la β-tubuline est représentée sur la figure du bas. Les données sont exprimées comme la moyenne +/- SEM du ratio Iba1 / β-tubuline, obtenu pour 2 immunoblots indépendants, réalisés sur 2 souris chacun (n=4).

L'injection ICV de peptide Aβ n'entraîne aucune augmentation significative de l'expression d'Iba1 par rapport à l'injection de PBS, à l'exception de l'hippocampe à H48 où on note une augmentation à la limite de la significativité. Il existe une diminution du ratio Iba1 / β-tubuline au cours du temps dans l'hippocampe des souris injectées avec le PBS, qui devient significative 48 h après l'injection. Par contre, on ne note aucune variation significative de l'expression d'Iba1 chez les animaux soumis à l'injection de peptide Aβ soluble, ni dans l'hippocampe, ni dans le cortex.

Les souris ont été injectées avec 500 pmol d'oligomères solubles de peptide A β ou un volume équivalent de PBS (soluté contrôle). Puis les animaux ont été sacrifiés 6, 24 et 48 h après l'injection et leurs cerveaux ont été prélevés et disséqués. Des homogénats d'hippocampe ont été préparés selon un protocole spécifique [Tyagi, 2008] et la concentration tissulaire en IL-1 β a été déterminée par dosage immuno enzymatique et rapportée à la concentration en protéines totales.

A aucun des temps expérimentaux, on n'observe de différence significative des taux d'IL-1 β entre les souris injectées avec le peptide A β et celles ayant reçu le PBS (Figure 71). De même, si on note une élévation des concentrations en IL-1 β à 6 et 24 h post injection pour les 2 groupes d'animaux, celle-ci ne franchit jamais le seuil de significativité. A la 48^{ème} heure après injection, les taux intra-tissulaires d'IL-1 β redeviennent identiques à ceux observés en condition basale (temps 0).

Cette dernière observation indique que l'injection ICV de peptide A β oligomérique ne provoque aucune augmentation des taux d'IL-1 β dans l'hippocampe des souris cPLA $_2^{+/+}$. L'augmentation transitoire et non significative observée entre 6 et 24 h post injection est comparable dans les 2 groupes et résulte donc de la procédure opératoire en elle-même, plutôt que de la nature du produit administré.

Ce résultat suggère donc que les processus inflammatoires ne sont pas impliqués dans les atteintes comportementales et synaptiques induites par A β , dans notre modèle expérimental.

L'injection ICV de peptide A β soluble n'entraîne donc aucune augmentation significative de divers marqueurs inflammatoires. Ces données suggèrent que la réaction inflammatoire n'est pas impliquée dans la médiation des effets toxiques du peptide A β dans notre modèle. De ce fait, la résistance observée chez les souris cPLA $_2^{-/-}$ ne peut pas résulter d'une moindre production de médiateurs proinflammatoires, elle-même liée à une réduction de la libération d'AA (et donc, d'une moindre production des médiateurs d'aval que sont les PG et les LT).

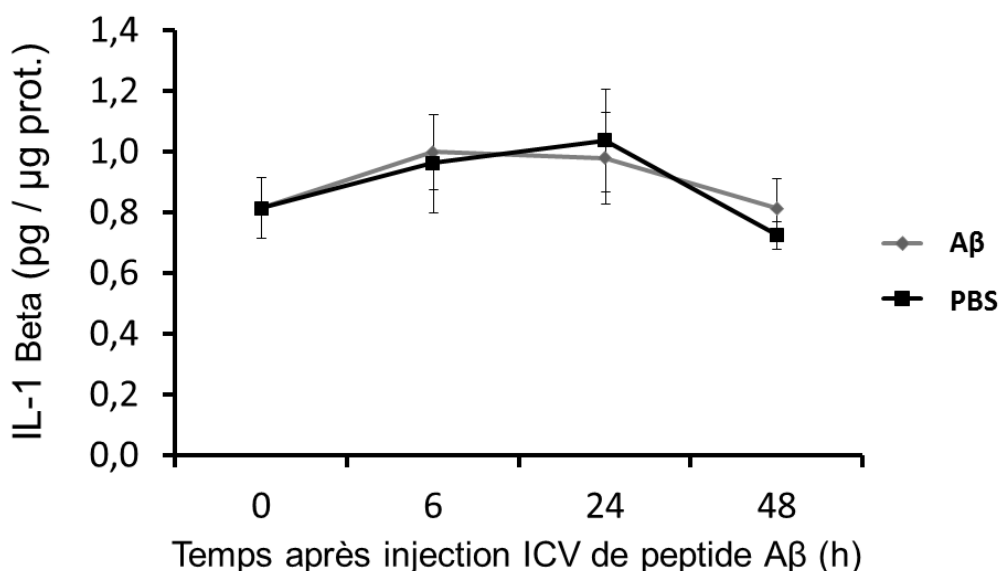


Figure 71 : Etude de la cinétique de la concentration intra tissulaire en interleukine 1β dans l'hippocampe de souris cPLA₂^{+/+} après administration de peptide Aβ oligomérique

Des souris cPLA₂^{+/+} ont été injectées avec 500 pmol de peptide Aβ soluble ou avec un volume équivalent de PBS (soluté contrôle). Les animaux ont été sacrifiés 6, 24 et 48 h après l'injection et leurs cerveaux ont été prélevés et disséqués. Après homogénéisation des échantillons, la concentration en IL-1β a été déterminée par dosage ELISA, puis rapportée à la concentration en protéines totales. Chaque groupe expérimental (pour un temps de récupération et un type de produit injecté donnés) comportait 3 animaux. 6 animaux n'ont pas subi d'injection et ont été utilisés comme référence, pour évaluer le contenu de l'hippocampe en IL-1β en conditions basales. Les données sont représentées comme la moyenne +/- SEM de la concentration en IL-1β rapportée à la teneur en protéines dans les homogénats d'hippocampe.

Les concentrations en IL-1β des 2 groupes expérimentaux ne sont pas statistiquement différentes, pour tous les temps expérimentaux considérés. De la même manière, on observe une augmentation de la concentration en IL-1β entre 6 et 24 h post injection, mais cette augmentation n'est pas statistiquement différente des taux de base. Enfin, 48 h après l'injection, les taux d'IL-1β retournent à leurs valeurs basales, pour les 2 groupes.

L'injection ICV de peptide Aβ chez des souris cPLA₂^{+/+} n'entraîne donc aucune augmentation des taux intra hippocampiques d'IL1β.

II – 3 Peptide Aβ oligomérique et équilibre survie / apoptose des neurones : implication de la cPLA₂

Notre groupe a précédemment montré que l'exposition des neurones aux oligomères solubles de peptide Aβ induit des phénomènes d'apoptose *in vitro* [Kriem, 2005] [Malaplate-Armand, 2006] et des perturbations mnésiques et synaptiques *in vivo* [Garcia, 2010] [Youssef, 2008]. Notre travail montre clairement que la délétion de la cPLA₂ protège les neurones et les synapses contre les altérations induites par le peptide Aβ soluble, mais cette protection semble ne pas impliquer les phénomènes d'inflammation et d'activation gliale.

Afin de préciser le niveau de résistance des neurones $cPLA_2^{-/-}$, nous avons exploré certaines voies de survie et d'apoptose, impliquées dans la médiation de la toxicité du peptide A β . Nous avons ainsi comparé l'état de ces voies entre les souris $cPLA_2^{-/-}$ et $cPLA_2^{+/+}$, soumises à l'administration de peptide A β , tant *in vitro* qu'*in vivo*.

II – 3 a. Altérations de la voie de survie Akt au niveau cérébral après injection intra cérébro ventriculaire de peptide A β soluble

Des altérations de la voie de survie impliquant Akt/PBK apparaissent comme un élément important dans la mort neuronale au cours de la MA. L'exposition de neurones au peptide A β peut en effet induire une déphosphorylation de la kinase Akt, et ainsi induire l'apoptose des cellules [[Ryder, 2004](#)].

Nous avons donc exploré l'état de phosphorylation d'Akt dans des homogénats de cerveaux provenant de souris $cPLA_2^{-/-}$ et $cPLA_2^{+/+}$ 7 jours après l'injection ICV de 500 pmol de peptide A β ou d'un volume équivalent de soluté PBS contrôle.

Nous n'avons retrouvé aucune différence de phosphorylation d'Akt à l'état basal en fonction du génotype des animaux ([Figure 72](#)). La délétion de la $cPLA_2$ n'influence pas l'état basal de phosphorylation d'Akt. De même, dans aucun des groupes étudiés, l'injection de peptide A β n'entraîne de variation du niveau d'Akt totale ou de sa phosphorylation.

Ces résultats peuvent sembler surprenants à première vue, mais ils peuvent être expliqués par deux mécanismes éventuellement complémentaires :

- Premièrement, la déphosphorylation d'Akt constitue un évènement transitoire après l'injection ICV de peptide A β et une étude à J+7 post injection est trop tardive pour identifier une variation de la phosphorylation d'Akt.
- Deuxièmement, les homogénats d'hippocampe et de cortex utilisés dans ce travail renferment des populations cellulaires très hétérogènes, dont certaines comme les astrocytes, sont beaucoup moins sensibles au peptide A β soluble que les neurones.

Afin de nous focaliser exclusivement sur les neurones, nous avons donc choisi d'explorer les altérations d'Akt sur un modèle de cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires exposés *in vitro* au peptide A β soluble.

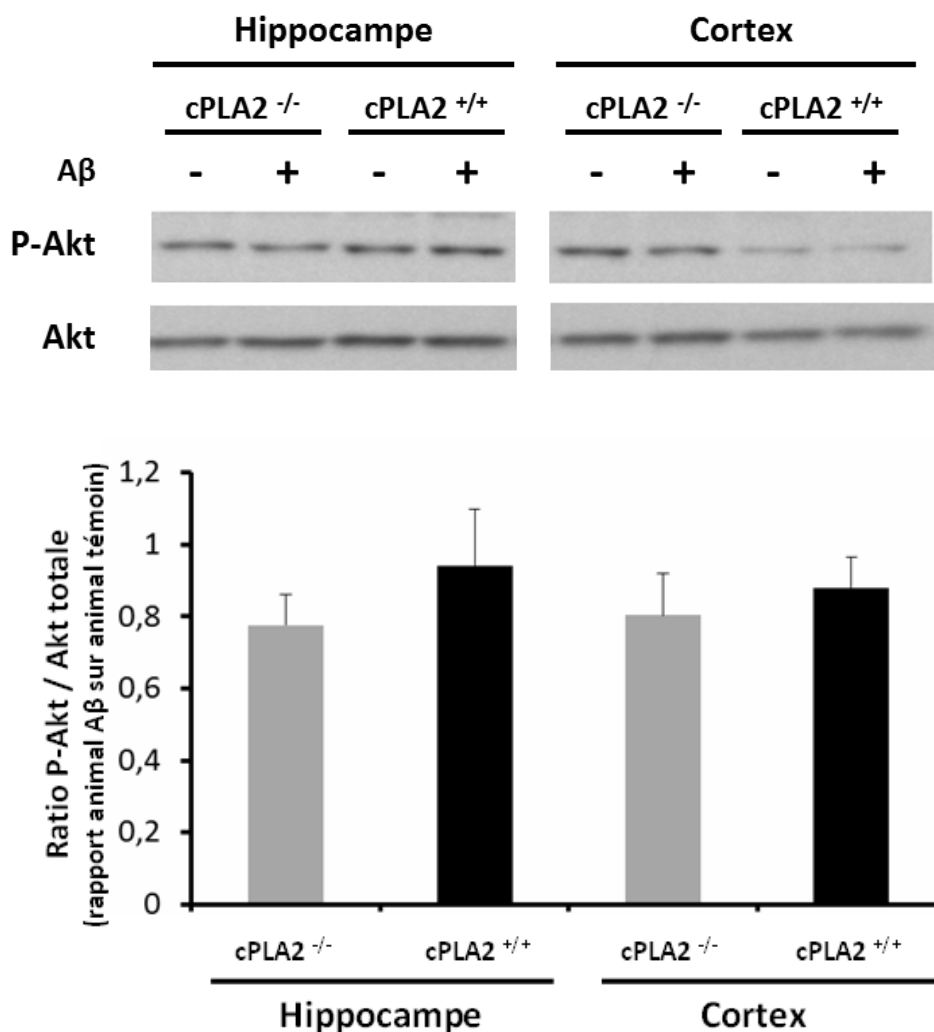


Figure 72 : Etude de la phosphorylation de la kinase Akt dans des homogénats d'hippocampe et de cortex, 7 jours après injection intra cérébro ventriculaire de 500 pmol d'oligomères solubles de peptide Aβ ou de PBS chez des souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-}

Des souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} ont été injectées en ICV avec 500 pmol d'oligomères solubles de peptide Aβ ou un volume équivalent de PBS (soluté contrôle). Chaque groupe expérimental comportait 3 animaux. Sept jours après l'injection, les animaux ont été sacrifiés et leurs cerveaux récupérés et disséqués. Des homogénats tissulaires ont été préparés à partir du cortex et de l'hippocampe puis analysés par immunoblot.

Fig. 72 haut : Les images présentées ci-dessus montrent les niveaux de P-Akt et de Akt totale sur un animal représentatif de chaque condition expérimentale. Fig. 72 bas : Le graphique montre les variations du niveau de phosphorylation d'Akt après injection ICV de peptide Aβ, dans les différentes structures cérébrales et selon les différents génotypes. Celui-ci est défini comme le ratio de P-Akt sur Akt totale chez les souris injectées avec Aβ, rapporté aux animaux témoins de même génotype. Les résultats sont exprimés comme la moyenne +/- SEM de ce rapport sur les deux séries d'expériences (n=6).

Il n'existe aucune variation significative du niveau d'Akt totale ou de son état de phosphorylation en conditions basales en fonction du génotype. De même, le niveau de phosphorylation d'Akt n'est pas modifié par l'injection ICV de peptide Aβ soluble, quel que soit le génotype.

II – 3 b. Altérations de la voie de survie Akt dans des neurones corticaux en culture primaire induites par l'exposition aux oligomères de peptide A β

Comme nous n'avons trouvé aucune variation du niveau de phosphorylation d'Akt au niveau d'homogénats tissulaires issus de cerveaux de souris, nous avons utilisé un modèle *in vitro* d'exposition au peptide A β oligomérique.

Nous avons ainsi préparé des cultures primaires de neurones corticaux issus d'embryons de souris cPLA $_2$ ^{-/-} et cPLA $_2$ ^{+/+} et exposé ces cellules aux oligomères de peptide A β pendant 6 h. Après cette période d'incubation, les cellules ont été récupérées et les niveaux d'Akt totale et phosphorylée ont été déterminés par immunoblot.

On n'observe aucune variation du niveau d'Akt totale en fonction du génotype des cellules en conditions basales. De la même manière, le contenu en Akt totale n'est pas modifié après incubation des neurones en présence d'oligomères de peptide A β (Figure 73).

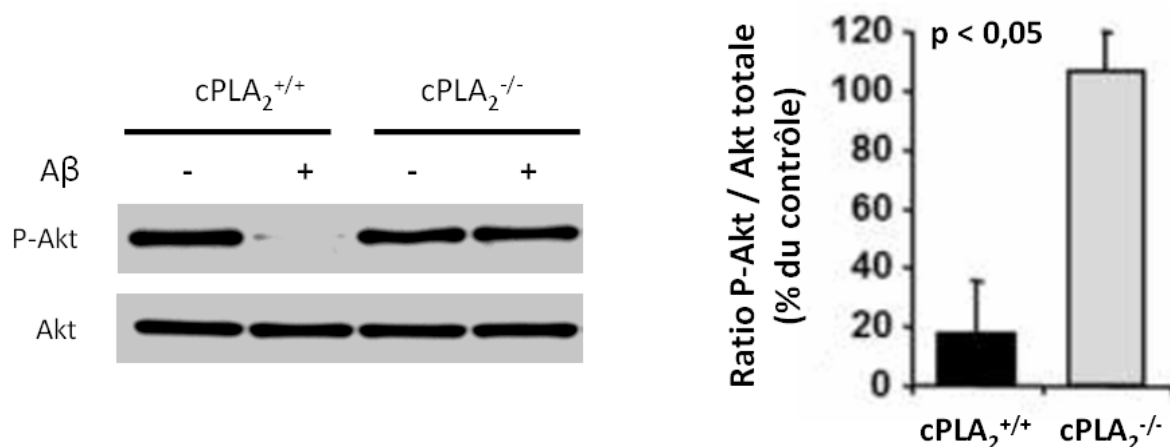


Figure 73 : Etude de la phosphorylation de la kinase Akt dans des neurones corticaux en culture primaire exposés aux oligomères solubles de peptide A β

Des neurones corticaux en culture primaire ont été préparés à partir d'embryons de souris cPLA $_2$ ^{-/-} et cPLA $_2$ ^{+/+} et exposés au peptide A β soluble à une concentration de 1 μ M pendant 6 h. Les cellules ont ensuite été récupérées et analysées par immunoblot. Le niveau d'Akt totale et de P-Akt a ainsi pu être déterminé pour chaque condition expérimentale. Un immunoblot représentatif de 3 expériences indépendantes est affiché à gauche de la figure. L'analyse densitométrique des immunoblots montre la variation du niveau de phosphorylation d'Akt (à droite). Le niveau de P-Akt est rapporté à celui d'Akt totale et les données sont représentées comme le ratio P-Akt / Akt totale dans les cellules traitées par A β , normalisé par rapport au ratio dans les cellules témoins de même génotype. Les données sont exprimées comme la moyenne +/- SEM de ce ratio normalisé, obtenu dans 3 expériences indépendantes.

L'exposition au peptide A β induit une déphosphorylation quasi complète de la kinase Akt dans les neurones cPLA $_2$ ^{+/+}, tandis que le niveau de phosphorylation de la kinase demeure inaltéré dans les cellules cPLA $_2$ ^{-/-}.

Dans les neurones de souris $cPLA_2^{+/+}$, Akt est presque totalement déphosphorylée après exposition au peptide A β soluble. A l'inverse, son niveau de phosphorylation reste inchangé dans les cellules $cPLA_2^{-/-}$ exposées au peptide A β et est comparable à celui des cellules non traitées des deux génotypes ([Figure 73](#)).

II – 3 c. Activation des sphingomyélinases acides et neutres dans les neurones corticaux en culture primaire exposés aux oligomères solubles de peptide A β

Les SMases ont été précédemment identifiées par notre équipe comme étant des acteurs potentiels de la cascade pro-apoptotique, initiée par l'activation de la $cPLA_2$, après exposition des neurones au peptide A β soluble [[Malaplate-Armand, 2006](#)].

Nous avons comparé l'état d'activation de ces enzymes, après exposition au peptide A β soluble, dans des neurones corticaux issus de souris $cPLA_2^{-/-}$ et $cPLA_2^{+/+}$.

Des cultures de neurones corticaux ont été préparées à partir d'embryons de souris des 2 génotypes, et incubées pendant 6 h avec des oligomères de peptide A β soluble à la concentration de 1 μ M, ou avec du milieu de culture seul. Après ce délai d'incubation, les cellules ont été récupérées et les protéines extraites. Les activités des SMases acides ([A-SMases](#)) et neutres ([N-SMases](#)) ont été déterminées par une réaction de cinétique enzymatique sur un substrat synthétique, le pH du milieu réactionnel permettant de distinguer ces 2 formes de SMases. L'activité enzymatique a ensuite été rapportée à la concentration en protéines du milieu.

L'incubation des neurones corticaux $cPLA_2^{+/+}$ en présence d'oligomères A β à 1 μ M pendant 6 h entraîne une très nette augmentation des activités A-SMase et N-SMase par rapport aux cellules contrôles exposées au simple milieu de culture. Cette augmentation d'activité est de 3 fois le témoin pour les A-SMases et de 2,5 fois le témoin pour les N-SMases ([Figure 74](#)).

En revanche, on ne note qu'une très faible augmentation des activités A- et N-SMases, qui est inférieure à la limite de la significativité, dans les neurones $cPLA_2^{-/-}$ exposés au peptide A β soluble, ce qui est en accord avec leur viabilité inaltérée mesurée précédemment dans des conditions expérimentales similaires ([Figure 74](#)).

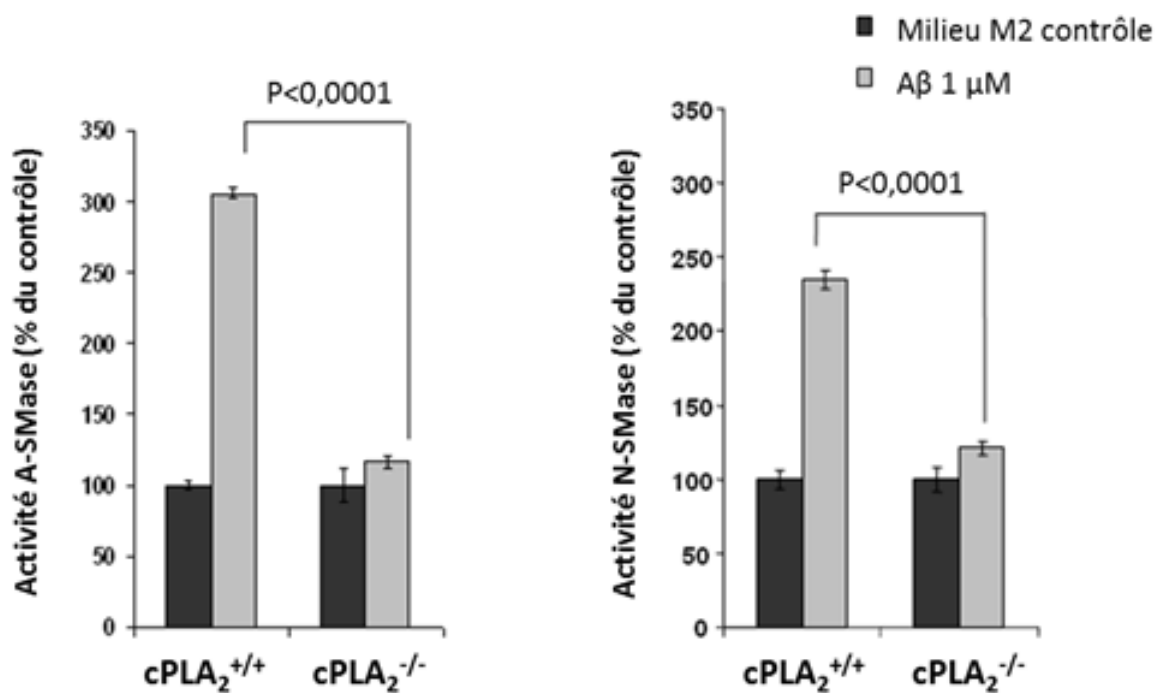


Figure 74 : Activation des sphingomyélinases acides et neutres après exposition de neurones corticaux de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} aux oligomères solubles de peptide Aβ 1μM pendant 6 heures

Des cultures primaires de neurones corticaux ont été préparées à partir d'embryons de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+}. Ces cellules ont été exposées pendant 6 h à des oligomères solubles de peptide Aβ à 1 μM ou à du milieu de culture seul (contrôle). Les activités A-SMases (gauche) et N-SMases (droite) ont été déterminées en mesurant la cinétique de clivage d'un substrat synthétique, à un pH réactionnel permettant de discriminer les 2 activités enzymatiques. Cette activité a été rapportée à la concentration en protéines des extraits cellulaires. Les données sont représentées comme la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes, comportant chacune 4 déterminations. Ces données ont été normalisées, pour chaque génotype, par rapport aux cellules témoins, traitées par du milieu M2 seul (l'activité de cette condition expérimentale étant ramenée à 100%).

L'exposition aux oligomères Aβ induit une augmentation des activités A-SMases et N-SMases de l'ordre de 3 et 2,5 fois, respectivement, dans les neurones cPLA₂^{+/+}. Par contre, on n'observe aucune activation des SMases dans les neurones cPLA₂^{-/-}, exposés au peptide Aβ, comme leur viabilité inaltérée dans des conditions similaires le laissait supposer.

II – 4 Conclusion

En résumé, nous avons montré que l'exposition des neurones aux oligomères solubles de peptide Aβ entraîne une augmentation de la phosphorylation de la cPLA₂, dans notre modèle d'injection ICV. De plus, la kinase ERK1/2, un activateur potentiel de la cPLA₂, est également hyperphosphorylée après administration ICV de peptide Aβ soluble. Ces observations témoignent donc de l'activation de la cPLA₂ après exposition des cellules aux oligomères solubles de peptide Aβ.

De plus, les effets délétères observés sur le plan comportemental et mnésique, dans ce même modèle, ne semblent pas résulter d'une activation de la réaction inflammatoire, puisque nous n'avons pas observé d'augmentation de marqueurs d'activation astrogliaux et microgliaux, ni d'augmentation de la concentration en IL-1 β , après injection ICV de peptide A β dans le cerveau de souris cPLA $_2$ ^{+/+}.

Enfin, nous avons pu confirmer que l'exposition des neurones en cultures au peptide A β soluble entraîne une apoptose résultant de l'altération des voies de survie et de l'activation de la voie pro apoptotique des SMases. Ces observations rejoignent celles précédemment publiées par notre équipe [[Kriem, 2005](#)] [[Malaplate-Armand, 2006](#)].

Par contre, la délétion de la cPLA $_2$ rend les neurones totalement résistants à ces multiples altérations initiées par l'incubation avec les oligomères solubles A β .

Ces différentes données illustrent sur le plan moléculaire la résistance à l'apoptose des neurones cPLA $_2$ ^{-/-} évoquée dans le précédent chapitre. La cPLA $_2$ apparaît dès lors comme un médiateur crucial dans la cascade apoptotique induite par les oligomères A β .

Face à ce constat, nous avons recherché la (les) origine(s) possible(s) de cette résistance conférée par la délétion de la cPLA $_2$ en explorant successivement différentes cibles potentielles : la PKC ζ , la GSK3- β et la protéine APP.

III – Recherche d'un mécanisme de résistance aux oligomères solubles de peptide A β induit par l'inactivation de la cPLA₂

Nos résultats montrent que la délétion de la cPLA₂ confère aux neurones une résistance totale, tant *in vitro* qu'*in vivo*, contre les effets délétères des oligomères solubles de peptide A β . Nous avons également rapporté que l'administration ICV de peptide A β provoque à la fois une augmentation de la phosphorylation de kinases en amont de la cPLA₂ (kinase ERK1/2) ainsi que de l'enzyme elle-même. De plus, les altérations provoquées par le peptide A β impliquent, du moins en partie, la cPLA₂ et les voies de toxicité en aval de celle-ci (voie Akt/PKB, SMases).

Cependant, il semble que la protection conférée par la délétion de la cPLA₂ ne résulte pas de la réduction de la réaction inflammatoire, liée à une moindre libération d'AA et à une production diminuée de médiateurs en aval (PG, LT).

Nous avons alors cherché l'origine potentielle de cette résistance, en nous basant sur les fonctions physiologiques et pathologiques de la cPLA₂ et en testant nos hypothèses sur le modèle murin cPLA₂^{-/-}.

III – 1 Effet de l'inhibition de la protéine kinase C ζ sur la sensibilité des neurones aux effets pro apoptotiques des oligomères solubles de peptide A β

Les souris cPLA₂^{-/-} ne présentent qu'une variation de phénotype extrêmement discrète par rapport aux souris sauvages de la même lignée (fertilité réduite, réduction du pouvoir de concentration des urines...). Toutefois, Haq et coll. ont rapporté que ces souris présentaient une hypertrophie des muscles striés squelettiques et cardiaques [[Haq, 2003](#)]. Cette hypertrophie résulte d'une dérégulation de la signalisation de la voie Igf-1.

En effet, la cPLA₂ régule négativement la voie de signalisation Igf-1. L'AA libéré par la cPLA₂ agit comme un activateur de PDK-1, qui provoque le recrutement de PKC ζ . Ainsi, la délétion de la cPLA₂ augmente la signalisation Igf-1 en diminuant le recrutement de la PKC ζ par la PDK1.

Or, un déficit de la signalisation Igf-1 (et de l'insuline) a été rapporté au cours de la MA, la faisant parfois dénommer « diabète de type 3 ». Cette déficience de signalisation pro survie et pro prolifération pourrait être, au moins partiellement, à l'origine de la dégénérescence neuronale observée au cours de la MA.

De fait, la résistance des neurones $cPLA_2^{-/-}$, tant *in vitro* qu'*in vivo*, pourrait également résulter d'une suractivation des voies de survie liée à cette levée de l'inhibition par la PKC ζ .

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons essayé de reconstituer cette inhibition de la PKC ζ , par voie pharmacologique, dans des neurones corticaux en culture primaire, issus de souris $cPLA_2^{+/+}$. Si la $cPLA_2$ confère une protection aux cellules *via* une action indirecte sur la PKC ζ , l'inhibition de cette kinase devrait protéger également les neurones contre l'apoptose induite par l'incubation en présence de peptide A β soluble.

L'inhibiteur pharmacologique de la PKC ζ que nous avons utilisé est un peptide synthétique dont la séquence est homologue au domaine régulateur de l'enzyme, lequel se lie à son site catalytique. Pour cette raison d'homologie, il est qualifié de « pseudo substrat » ([PKC \$\zeta\$ -PS](#)). Ce peptide est myristoylé, de manière à faciliter le franchissement des membranes cellulaires et sa pénétration dans le cytoplasme.

Nous avons donc incubé des neurones $cPLA_2^{+/+}$ pendant 24 h en présence d'oligomères de peptide A β et de PKC ζ -PS, tous deux à la concentration de 1 μ M. Après cette période d'incubation, la mortalité cellulaire a été évaluée par le test de viabilité MTT. La concentration d'inhibiteur a été fixée à la valeur de 1 μ M, car c'est au-delà de cette concentration qu'apparaissent les premiers signes de toxicité à 24 h d'incubation ([Figure 75](#)). Ainsi, l'incubation des neurones en présence de PKC ζ -PS seul pendant 24 h n'entraîne aucune mortalité par rapport aux cellules témoins.

Comme nous l'avons précédemment rapporté, l'incubation de neurones en présence d'A β soluble à 1 μ M pendant 24 h provoque une diminution de viabilité de l'ordre de 25% ([Figure 76](#)). Par contre, l'incubation des neurones en présence de PKC ζ -PS et d'A β , simultanément, présente un effet toxique comparable à celui observé en présence d'A β seul. De ce fait, le PKC ζ -PS n'exerce aucune protection contre la toxicité du peptide A β .

Une autre série d'expériences, utilisant une pré incubation des neurones avec le PKC ζ -PS à différentes concentrations (0,5 et 1 μ M) pendant 2 h, suivie d'une co-incubation avec A β pendant 24 h, n'a pas non plus montré d'effet protecteur.

Il semble donc que la résistance conférée aux neurones par la délétion de la $cPLA_2$ résulte d'un mécanisme autre que la suractivation des voies de survie *via* l'inhibition de la PKC ζ .

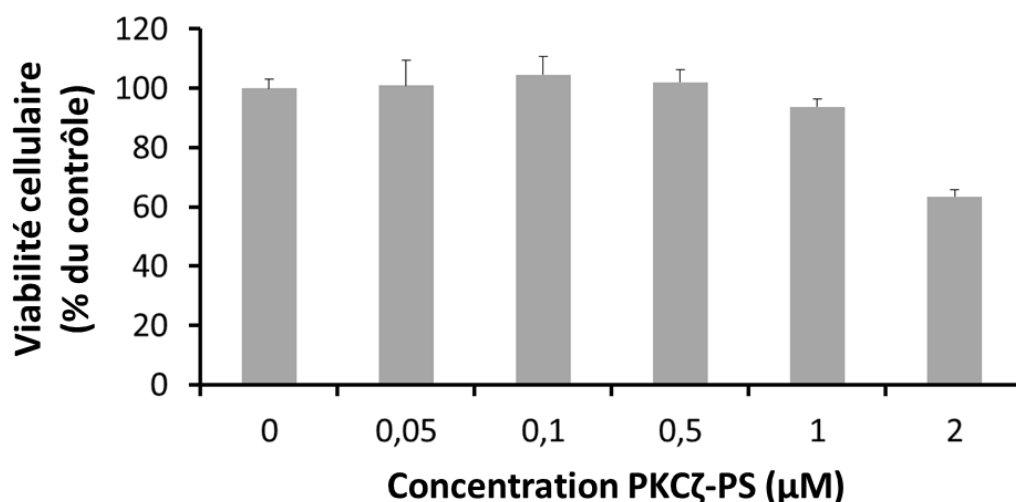


Figure 75 : Toxicité du pseudo substrat de la PKCζ

La toxicité du pseudo substrat de la PKCζ (PKCζ-PS) a été évaluée en incubant des neurones corticaux issus d'embryons de souris $cPLA_2^{+/+}$ en culture primaire avec des concentrations croissantes de PKCζ-PS pendant 24 h. A la fin de l'incubation, la survie des cellules a été appréciée par un test MTT pour chacune des concentrations. La DO à 570 nm a été normalisée par rapport aux cellules témoins (traitées avec du milieu M2 pendant 24 h). On ne détecte aucun signe de toxicité pour des neurones incubés pendant 24 h en présence de 1 μM de PKCζ-PS.

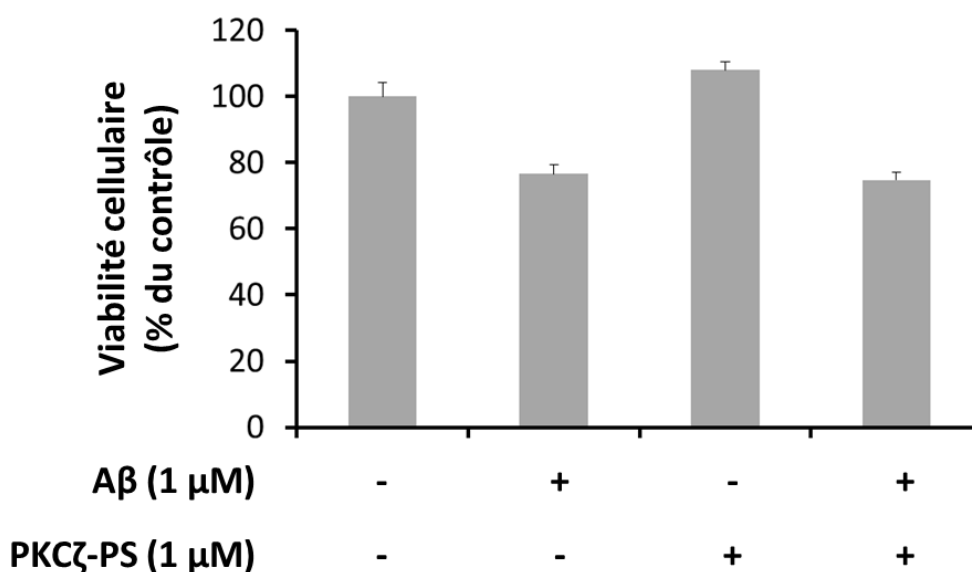


Figure 76 : Protection conférée aux neurones primaires, par l'inhibition pharmacologique de la PKCζ, contre l'apoptose induite par les oligomères solubles de peptide Aβ

Des neurones corticaux de souris $cPLA_2^{+/+}$ en culture primaire ont été incubés en présence d'oligomères solubles de peptide Aβ à 1 μM et/ou de PCKζ-PS à 1 μM pendant 24 h. A 24 h, la survie neuronale a été appréciée par un test MTT pour chacune des conditions. La DO à 570 nm a été normalisée par rapport aux cellules témoins (milieu M2 pendant 2 h puis 24 h). L'inhibition de la PKCζ n'entraîne aucune altération de la viabilité des neurones à 24 h. La mortalité cellulaire est identique pour les cellules exposées au peptide Aβ soluble, que celles-ci aient été co-incubées avec le PKCζ-PS ou non. De ce fait, l'inhibition pharmacologique de la PKCζ ne protège pas les neurones primaires contre les effets pro apoptotiques des oligomères solubles de peptide Aβ.

Par la suite, nous avons cherché l'origine de l'importante toxicité du PKCζ-PS sur les neurones en culture. Cela nous a amenés à remettre en question la spécificité de cet inhibiteur pharmacologique. En effet, son homologie de séquence avec le domaine régulateur de la PKCζ lui permet d'inhiber l'enzyme, en occupant son site catalytique.

Pour savoir si ce peptide pouvait se lier à d'autres analogues de la PKCζ, nous avons blasté sa séquence ([Figure 77](#)). Parmi les séquences homologues, se trouve la PKCι. Cette PKC joue un rôle important dans la survie neuronale [[Lin, 1997](#)] et son inhibition peut fortement compromettre la viabilité des neurones en culture.

De ce fait, il peut être délicat de mettre en évidence des propriétés protectrices contre l'apoptose pour une telle substance. Nous avons donc décidé de nous orienter vers d'autres cibles pour expliquer la résistance des neurones cPLA₂^{-/-}.

```
Séquence requête de BLAST :
SIYRRGARRWRKL

Résultats :

>  gb|AAH22016.3| UG Protein kinase C, iota [Homo sapiens]
Length=587
  GENE ID: 5584 PRKCI | protein kinase C, iota [Homo sapiens]
(Over 10 PubMed links)
  Score = 46.4 bits (102), Expect = 7e-06, Method: Composition-based stats.
  Identities = 13/13 (100%), Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

Query 1      SIYRRGARRWRKL  13
          SIYRRGARRWRKL
Sbjct 114    SIYRRGARRWRKL  126

>  emb|CAA78813.1| UG protein kinase C zeta [Homo sapiens]
Length=584
  GENE ID: 5590 PRK CZ | protein kinase C, zeta [Homo sapiens]
(Over 100 PubMed links)
  Score = 45.6 bits (100), Expect = 1e-05, Method: Composition-based stats.
  Identities = 13/13 (100%), Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

Query 1      SIYRRGARRWRKL  13
          SIYRRGARRWRKL
Sbjct 105    SIYRRGARRWRKL  117
```

Figure 77 : Homologie de séquence du pseudo substrat de la PKCζ

La comparaison de la séquence peptidique du PKCζ-PS montre son homologie avec le domaine inhibiteur de la PKCζ, mais également avec celui de la PKCι. De ce fait, l'activité catalytique de cette PKC sera également inhibée après exposition des neurones au PKCζ-PS. Cette absence de spécificité vis-à-vis de la PKCζ et son effet inhibiteur potentiel sur d'autres PKC peuvent expliquer la toxicité de cet inhibiteur sur les neurones en culture.

III – 2 Rôle de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) dans la résistance aux effets délétères des oligomères de peptide A β

La glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) a été impliquée dans la pathogenèse de la MA. Cette sérine / thréonine kinase est présente en quantité abondante dans le SNC et est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires (signalisation de la voie de la β -caténine). Des altérations de la GSK3 β ont été reliées à de nombreux aspects de la pathogenèse de la MA, en particulier l'hyperphosphorylation de Tau, la médiation des effets délétères du peptide A β et, plus récemment, la modulation de la production du peptide A β lui-même. Enfin, cette kinase est indirectement impliquée dans la transduction de la signalisation de facteurs de croissance comme l'insuline ou l'Igf-1, laquelle est perturbée au cours de la MA. Cette kinase apparaît dès lors comme une cible de choix pour la prévention et/ou le traitement de la MA.

Afin d'explorer cette voie, nous avons étudié l'état d'activation (donc de déphosphorylation) de GSK3 β après administration d'oligomères solubles de peptide A β à des souris cPLA $_2$ ^{-/-} et cPLA $_2$ ^{+/+}.

Des souris des 2 souches ont été injectées en ICV avec 500 pmol de peptide A β soluble ou un volume équivalent de PBS. Sept jours après l'injection, les animaux ont été sacrifiés, leurs cerveaux prélevés et disséqués et des homogénats ont été préparés à partir des différentes structures anatomiques. L'abondance des formes phosphorylée et totale de GSK3 β a alors été évaluée par immunoblot, complété par une analyse densitométrique du degré de phosphorylation de la kinase ([Figure 78](#)).

L'état basal de phosphorylation de GSK3 β est comparable entre les 2 génotypes, comme on peut le constater pour les animaux témoins injectés avec le PBS. Chez les souris cPLA $_2$ ^{+/+}, l'administration de peptide A β entraîne une réduction de P-GSK3 β , correspondant à une activation de celle-ci. Le peptide A β entraîne une réduction identique de la forme phosphorylée de GSK3 β dans les animaux cPLA $_2$ ^{-/-} ([Figure 78](#)).

De ce fait, l'activation de GSK3 β n'est pas influencée par le génotype des animaux. Ainsi, la protection conférée par la délétion de la cPLA $_2$ ne résulte pas d'une moindre activation de GSK3 β en réponse à l'exposition aux oligomères de peptide A β .

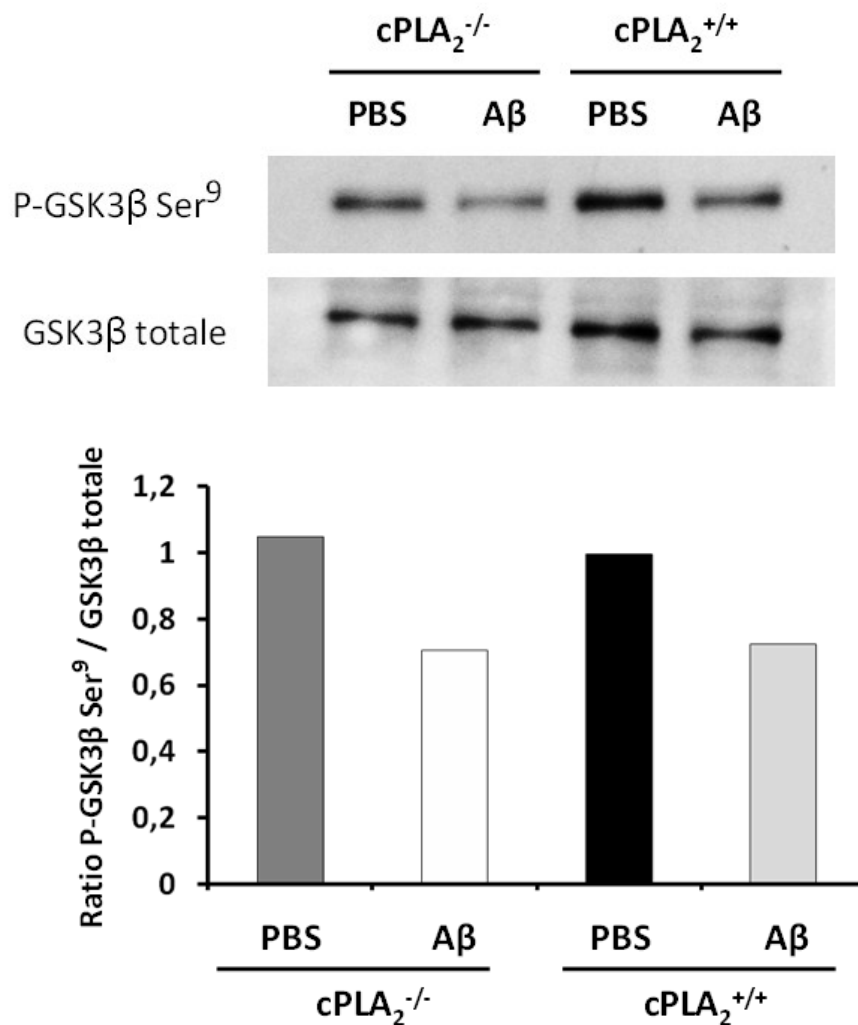


Figure 78 : Phosphorylation de la glycogène synthase kinase 3β au niveau d'homogénats d'hippocampe de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} après administration d'oligomères solubles de peptide Aβ

Des souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} ont reçu une injection ICV de 500 pmol de peptide Aβ oligomérique ou d'un volume équivalent de PBS. Au 7^{ème} jour suivant l'injection, les animaux ont été sacrifiés et leur cerveau a été récupéré et disséqué pour la préparation d'homogénats à partir des différentes structures. Chaque groupe expérimental comportait 3 animaux. L'abondance de GSK3β totale et phosphorylée sur la Ser⁹ (P-GSK3β Ser⁹) dans des homogénats d'hippocampe a été déterminée par immunoblot. Un blot représentatif montre les deux formes de la kinase (en haut). L'analyse densitométrique des immunoblots permet d'évaluer les variations de la phosphorylation de GSK3β dans les différents groupes expérimentaux (en bas). Les données sont exprimées comme la moyenne +/- SEM du ratio P-GSK3β Ser⁹ / GSK3β totale, obtenue avec 3 immunoblots indépendants (n=3).

L'administration d'oligomères Aβ solubles entraîne une réduction de P-GSK3β Ser⁹, autant chez les souris cPLA₂^{-/-} que cPLA₂^{+/+}. La protection conférée aux animaux cPLA₂^{-/-} ne résulte donc pas d'une modulation de l'état de phosphorylation de GSK3β.

III – 3 Relations entre expression des protéines cPLA₂ et APP : Origine de la résistance des souris cPLA₂^{-/-} ?

La protéine APP nous est apparue comme une candidate intéressante pour expliquer la résistance à la toxicité des oligomères solubles de peptide Aβ, conférée par la délétion de cPLA₂, tant *in vitro* qu'*in vivo*. En effet, le métabolisme de la protéine APP constitue non seulement la source du peptide Aβ, mais cette protéine pourrait également être impliquée dans la médiation des effets délétères de celui-ci.

L'APP est une protéine membranaire, qui subit un métabolisme complexe faisant intervenir des processus d'endocytose et de trafic vésiculaire. On peut donc supposer qu'une modification, même discrète, de la composition des membranes en PL, liée à l'inactivation de la cPLA₂, puisse modifier le métabolisme et/ou la localisation de l'APP.

Par voie de conséquence, ceci pourrait retentir sur la production de peptide Aβ et/ou la médiation de ses effets délétères au niveau des neurones.

III – 3 a. L'inactivation du gène de la cPLA₂ réduit l'expression de la protéine APP au niveau des homogénats d'hippocampe

Dans un premier temps, nous avons cherché si l'abondance de la protéine APP dans le cerveau des souris était influencée par la délétion de la cPLA₂.

Nous avons estimé l'expression de l'APP par immunoblot dans des homogénats d'hippocampe provenant de souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-}. Nous nous sommes focalisés sur l'hippocampe car cette région joue un rôle critique dans la pathogenèse de la MA, et nous y avons décrit les altérations synaptiques résultant de l'injection ICV de peptide Aβ. Cette région présente de toute évidence une sensibilité particulière aux effets délétères des oligomères solubles de peptide Aβ.

Les homogénats d'hippocampe provenant de souris cPLA₂^{-/-} présentent une quantité d'APP significativement diminuée par rapport à ceux réalisés à partir de souris cPLA₂^{+/+}. Cette réduction de la teneur en APP dans les homogénats avoisine 50% (p<0,01) ([Figure 79](#)).

La délétion de la cPLA₂ réduit donc considérablement le contenu cellulaire en APP dans l'hippocampe.

III – 3 b. La délétion de la cPLA₂ réduit l'expression de la protéine APP dans les neurones corticaux en culture primaire

Les homogénats tissulaires contiennent une grande variété de cellules. Ainsi, les homogénats d'hippocampe, étudiés précédemment, contiennent-ils non seulement des neurones, mais également une grande variété de cellules gliales, endothéliales... Afin de nous focaliser sur les neurones, nous avons reproduit notre étude sur des cultures primaires de neurones corticaux.

Nous avons donc comparé l'expression de l'APP dans des extraits protéiques obtenus à partir de cultures de neurones corticaux issus d'embryons de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} à 7 jours de culture *in vitro*.

Les neurones corticaux issus de souris cPLA₂^{-/-} présentent un contenu en protéine APP fortement réduit, de l'ordre de 60% ($p < 0,001$) ([Figure 80](#)). Cette réduction d'expression, observée dans les cellules en culture, est comparable à celle déterminée dans les homogénats d'hippocampe (pour mémoire : 50%, cf. [ci-dessus](#)).

Ainsi, l'inactivation du gène de la cPLA₂ entraîne une réduction de l'expression d'APP, tant *in vitro* qu'*in vivo*.

III – 3 c. L'inactivation du gène de la cPLA₂ sur des neurones cPLA₂^{+/+} entraîne une diminution d'expression de la protéine APP

Jusqu'à présent, nous n'avons fait que rapporter une diminution de la quantité d'APP présente dans des cultures cellulaires et des structures cérébrales issues de souris déficientes en cPLA₂, par rapport à des animaux de phénotype sauvage. Cependant, nous n'avons pas établi de lien entre l'inactivation de l'enzyme et la modulation de l'expression d'APP. En effet, une telle diminution peut résulter d'un phénotype adaptatif établi au cours du développement de la souris cPLA₂^{-/-}.

Pour établir ce lien, nous avons cherché à reproduire la délétion de la cPLA₂ au moyen d'inhibiteurs pharmacologiques et d'ASO dirigés contre la cPLA₂, dans des cultures de neurones de rats (non déficients en cPLA₂). Nous avons ainsi confronté un modèle d'inhibition « acquise » de la cPLA₂, à notre précédent modèle « constitutif » cPLA₂^{-/-}.

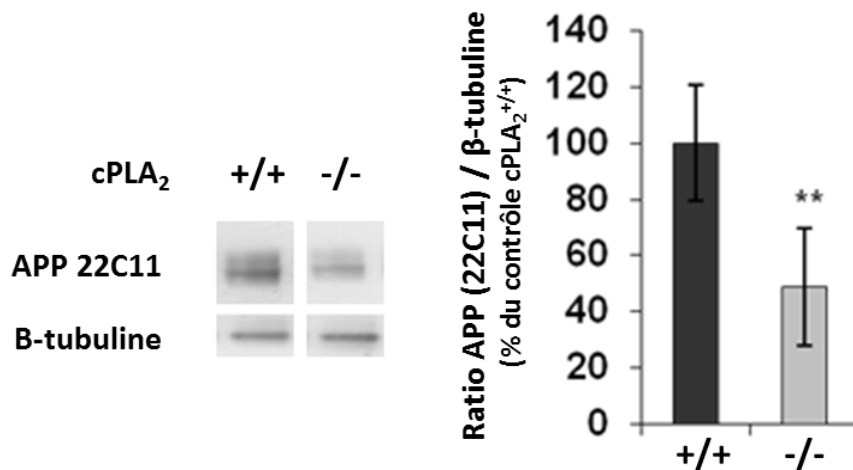


Figure 79 : Expression de la protéine APP dans des homogénats d'hippocampe de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+}

Des homogénats ont été préparés à partir d'hippocampe de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+}, n'ayant subi aucun traitement préalable. Chaque groupe comportait 3 souris. L'expression de l'APP dans ces homogénats a été étudiée par immunoblot, en utilisant l'anticorps spécifique de la région N-ter (APP22C11) (gauche). La β-tubuline a été parallèlement évaluée et utilisée comme *loading control*. L'analyse densitométrique des données a permis de rapporter l'expression de l'APP à celle de la β-tubuline et de quantifier précisément les variations d'expression (droite). Les données sont représentées comme la moyenne +/- SEM du ratio APP(22C11) / β-tubuline obtenu pour 3 expériences indépendantes.

L'inactivation du gène de la cPLA₂ induit une réduction de l'expression d'APP dans des homogénats d'hippocampe de l'ordre de 50% (p<0,01).

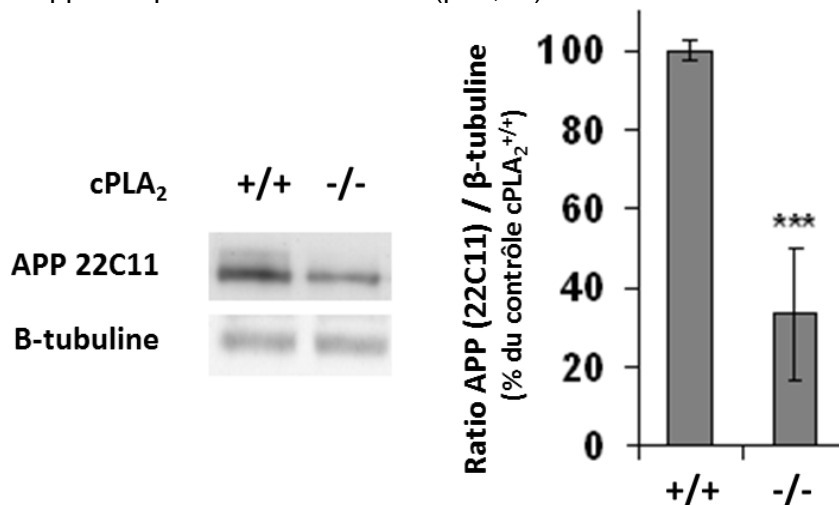


Figure 80 : Expression de la protéine APP dans des cultures primaires de neurones corticaux de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+}

Des cultures primaires de neurones corticaux ont été préparées à partir d'embryons de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+}. Ces cultures n'ont subi aucun traitement préalable avant la récupération des protéines. Les expériences ont été réalisées sur 3 cultures indépendantes. Chaque culture comportait 3 puits par génotype. L'expression de l'APP dans les extraits protéiques de ces cultures a été étudiée par immunoblot, en utilisant l'anticorps spécifique de la région N-ter (APP22C11) (à gauche). La β-tubuline a été parallèlement évaluée et utilisée comme *loading control*. L'analyse densitométrique des données a permis de rapporter l'expression de l'APP à celle de la β-tubuline et de quantifier précisément les variations d'expression (à droite). Les données sont représentées comme la moyenne +/- SEM du ratio APP(22C11) / β-tubuline obtenu pour 3 expériences indépendantes.

L'inactivation du gène de la cPLA₂ induit une réduction de l'expression d'APP dans les neurones en culture de l'ordre de 60% (p<0,001).

Dans un premier temps, des cultures primaires de neurones corticaux de rats ont été incubées pendant 24 h en présence de l'inhibiteur pharmacologique MAFP, à 1 et 2 μM . L'expression de la cPLA_2 a été évaluée par immunoblot à la fin de cette période, et comparée à des cellules incubées avec du simple milieu de culture.

Cette inhibition de la cPLA_2 par le MAFP à 1 et 2 μM entraîne une réduction dose-dépendante de la quantité d'APP dans les cellules, de l'ordre de 25 à 70 %, respectivement ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement) ([Figure 81](#)).

Pour compléter cette approche d'inhibition pharmacologique, nous avons tenté de réduire l'expression de l'enzyme au moyen d'ASO. Ces ASO, dirigés contre l'ARNm de la cPLA_2 , ont été utilisés dans un précédent travail, dans lequel ceux-ci avaient assuré une protection contre l'apoptose induite par le peptide $\text{A}\beta$ soluble [[Kriem, 2005](#)].

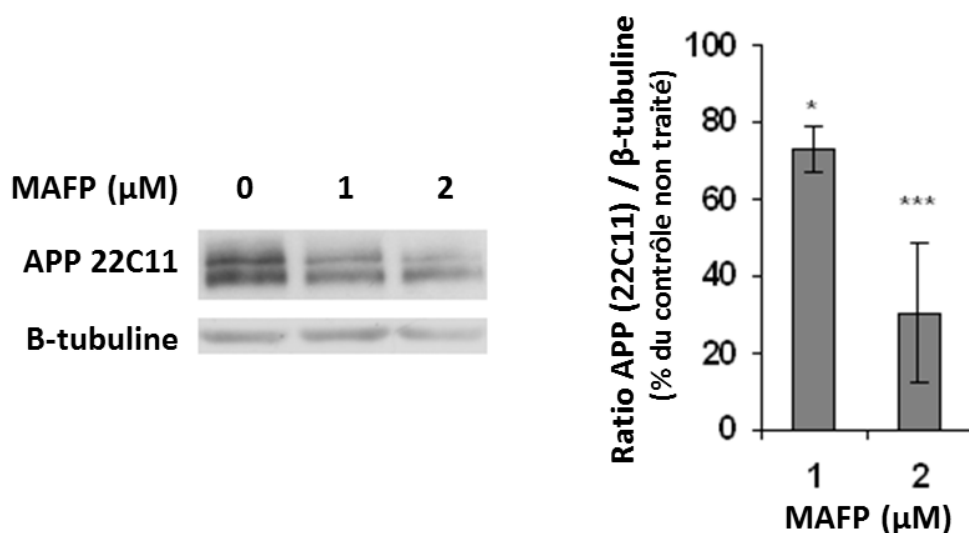


Figure 81 : Effet de l'inhibition pharmacologique de la cPLA_2 par le MAFP sur l'expression de la protéine APP dans des cultures primaires de neurones corticaux de rats

Des cultures primaires de neurones corticaux de rats ont été préparées à partir d'embryons de rats Wistar. Ces cultures ont été incubées en présence de MAFP à 1 et 2 μM pendant 24 h. L'expression de la protéine APP a été ensuite évaluée par immunoblot en utilisant l'anticorps 22C11 dirigé contre la partie N-ter de la protéine. La β -tubuline a été conjointement quantifiée et utilisée comme *loading control* (à gauche). L'analyse densitométrique des images a permis de rapporter l'expression de l'APP à celle de la β -tubuline (à droite). Chaque culture comportait 2 puits par condition. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les données sont exprimées, pour chaque dose de MAFP, comme le ratio APP(22C11) / β -tubuline, rapporté au témoin. Le graphique expose la valeur moyenne de ce ratio +/- SEM sur les 3 expériences indépendantes.

L'inhibition de la cPLA_2 par le MAFP provoque une réduction dose-dépendante et significative de l'expression de l'APP au bout de 24 h. Cette réduction avoisine 25 et 75% pour des concentrations de MAFP de 1 et 2 μM , respectivement ($p < 0,05$ et $p < 0,001$).

Il nous apparaissait intéressant de confirmer que cette protection des neurones s'accompagne bien d'une réduction de leur contenu en APP.

Des neurones corticaux en culture primaire, issus d'embryons de rat Wistar, ont été incubés pendant 48 h en présence d'ASO (ou de séquences sens témoins) à 4 μ M. Ces conditions correspondaient exactement à celles utilisées dans l'étude où les ASO conféraient une protection partielle aux neurones [Kriem, 2005]. Après 48 h d'incubation, les protéines ont été extraites des cultures et le contenu en APP a été évalué par immunoblot.

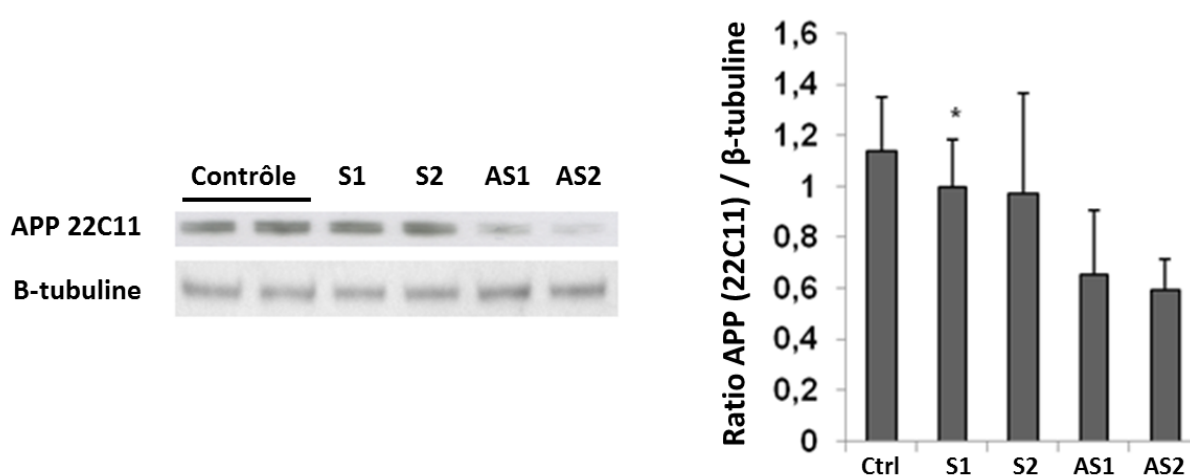


Figure 82 : Effet de l'inhibition de l'expression de la cPLA₂ par des oligonucléotides antisens sur l'expression de la protéine APP dans des cultures primaires de neurones corticaux de rats

Des cultures primaires de neurones corticaux de rats ont été préparées à partir d'embryons de rats Wistar. Ces cultures ont été incubées en présence d'ASO dirigés contre l'ARNm de la cPLA₂ (AS1 et AS2), des oligonucléotides témoins (séquence sens : S1 et S2) ou du milieu de culture seul (contrôle ou Ctrl) pendant 48 h. Les oligonucléotides antisens et sens étaient à une concentration dans le milieu de 4 μ M. L'expression de la protéine APP dans les cultures a été évaluée par immunoblot en utilisant l'anticorps 22C11 dirigé contre la partie N-ter de cette protéine. La β -tubuline a été conjointement quantifiée et utilisée comme *loading control* (à gauche). L'analyse densitométrique des images a permis de rapporter l'expression de l'APP à celle de la β -tubuline (à droite). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les données sont exprimées comme la moyenne du ratio APP(22C11) / β -tubuline +/- SEM pour 3 expériences indépendantes.

L'inhibition de l'expression de la cPLA₂ au moyen des ASO conduit à une réduction significative de l'expression de l'APP, par rapport aux cellules témoins, à 48 h d'incubation. Cette réduction avoisine 50% pour les oligonucléotides AS1 et AS2 ($p < 0,05$). Par contre, les oligonucléotides sens S1 et S2 provoquent une discrète réduction du contenu en APP, mais cette diminution n'est pas significative.

L'incubation des neurones avec les ASO entraîne une réduction de la quantité d'APP de l'ordre de 50 % ($p < 0,05$), alors que les séquences sens n'ont aucun effet notable sur la quantité d'APP ([Figure 82](#)).

Ainsi, l'inhibition de la cPLA₂, tant au moyen d'inhibiteurs pharmacologiques que d'ASO, entraîne une réduction du contenu cellulaire en protéine APP. Ces résultats, obtenus par la manipulation de cellules de phénotype sauvage non déficientes en cPLA₂, rejoignent les données obtenues pour les cellules et les animaux cPLA₂^{-/-}.

III – 4 c. La diminution de l'expression de la protéine APP *in vivo* ne résulte pas d'une réduction d'expression du gène de l'APP

Nous avons réussi à mettre en évidence un lien entre l'inhibition constitutive ou acquise de la cPLA₂ et la réduction de l'expression de la protéine APP. Nous avons alors souhaité savoir à quel niveau cette réduction prenait son origine.

L'expression d'une protéine résulte de la traduction de son ARNm et de sa maturation post traductionnelle d'une part, et de sa dégradation d'autre part. De même, l'expression d'un gène résulte de la transcription et de la maturation de l'ARN d'une part, et de sa dégradation d'autre part.

Par suite, nous avons cherché une différence d'expression du gène de l'APP entre les animaux cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+}, pour déterminer si la réduction d'expression de cette protéine était d'origine pré ou post traductionnelle. Comme cette différence d'expression a été mise en évidence au niveau de l'hippocampe des animaux, nous avons prélevé ces structures sur des souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} et nous en avons extrait les ARN. Nous avons évalué l'expression du gène de la protéine APP par RT-PCR dans ces extraits, en utilisant l'ARNr 18s comme gène de référence.

L'analyse des résultats a montré une légère réduction du contenu en ARNm de l'APP chez les animaux cPLA₂^{-/-}, mais cette différence n'est pas significative ($p = 0,06$) ([Figure 83](#)).

Il semble que la réduction importante de l'expression d'APP (de l'ordre de 50 %), générée par la délétion de la cPLA₂, ne résulte pas de phénomènes intéressant l'ARNm, mais plutôt d'évènements post traductionnels. L'étude du métabolisme complexe de la protéine APP dans les neurones devrait permettre de préciser l'origine de cette réduction.

III – 4 d. La protéine APP est impliquée dans la médiation de la toxicité neuronale des oligomères solubles de peptide A β

Jusqu'à présent, nous avons pu décrire un lien entre l'inactivation de la cPLA₂ et une réduction de l'expression de la protéine APP au niveau des neurones, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Cette même inactivation de la cPLA₂ protège totalement les neurones contre les effets délétères des oligomères solubles de peptide A β . Ces deux éléments suggèrent que la protéine APP est impliquée dans la médiation des altérations induites par le peptide A β soluble. Ainsi, la protection des neurones déficients en cPLA₂ proviendrait d'une réduction de la médiation des effets neurotoxiques et synaptotoxiques des oligomères solubles.

Il nous restait alors à établir un lien entre la réduction de l'expression de la protéine APP et la protection des neurones contre la toxicité du peptide A β .

Nous avons choisi un système cellulaire présentant un haut niveau d'expression de la protéine APP et nous avons testé la vulnérabilité de ces cellules à l'apoptose induite par le peptide A β soluble, par rapport à des cellules non transfectées. Nous avons utilisé des cellules de rein embryonnaire humain HEK exprimant de façon stable le gène de la protéine APP humaine non mutée.

Des cellules exprimant APP (HEK-APPwt) et des cellules HEK contrôles ont été exposées à des oligomères solubles de peptide A β à 1 μ M pendant 24 h. La viabilité cellulaire a été appréciée par un test MTT à la fin de la période d'incubation.

L'exposition de cellules HEK aux oligomères solubles conduit à une réduction de viabilité d'environ 10% par rapport aux cellules incubées avec du milieu seul ([Figure 84](#)). Les cellules HEK-APPwt présentent une sensibilité accrue aux oligomères A β , puisque l'exposition à ceux-ci produit une réduction de viabilité de 35 %. Il existe donc une différence significative dans la réduction de viabilité après exposition aux oligomères solubles de peptide A β entre ces deux types de cellules ($p < 0,05$).

Cette différence de vulnérabilité au peptide A β soluble semble donc résulter de l'expression accrue de la protéine APP.

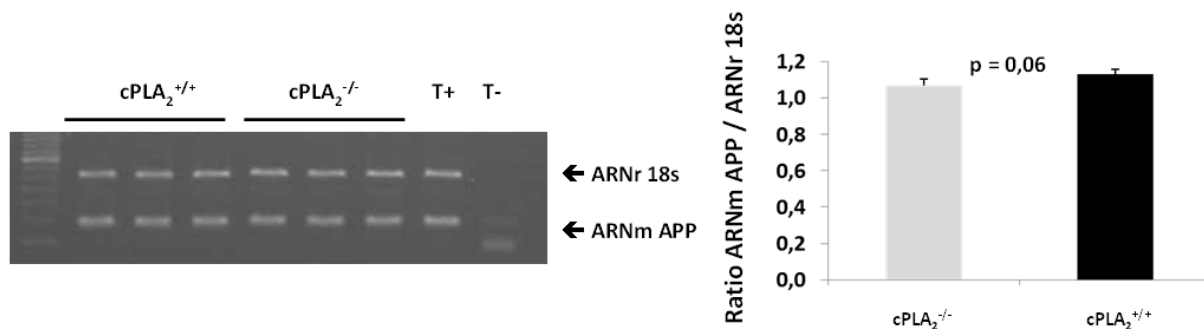


Figure 83 : Expression du gène de la protéine APP au niveau de l'hippocampe de souris et influence de l'inactivation du gène de la cPLA₂

Des souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-} âgées de 12 semaines, n'ayant subi aucun traitement préalable, ont été sacrifiées et leurs cerveaux récupérés et disséqués. Les ARN ont été extraits à partir d'homogénats d'hippocampe (n=3 souris par génotype). L'ARNm de l'APP et l'ARNr 18s ont ensuite été amplifiés par RT-PCR et les produits d'amplification séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % et révélés après coloration au bromure d'éthidium (à gauche). Une analyse densitométrique a permis de normaliser la quantité d'ARNm de l'APP par rapport à l'ARNr 18s (à droite). Les données sont exprimées comme la moyenne du rapport ARNm APP / ARNr 18s +/- SEM de 3 échantillons de chaque génotype.

Il existe une légère réduction du contenu en ARNm de l'APP dans les hippocampes de souris cPLA₂^{-/-} par rapport aux souris cPLA₂^{+/+}, mais cette variation n'est pas significative (p=0,06).

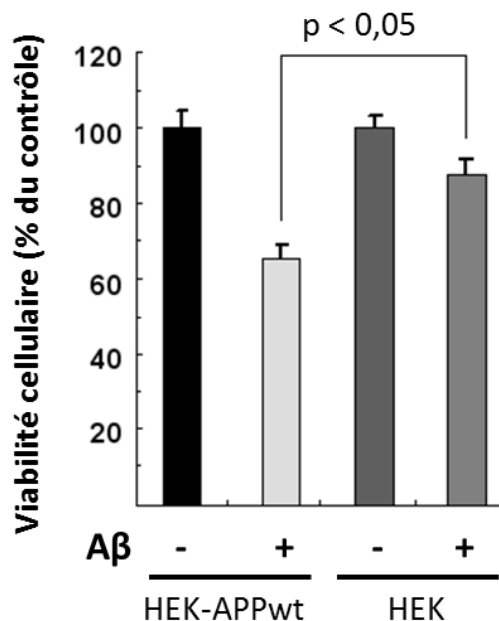


Figure 84 : Sensibilité à l'apoptose induite par les oligomères solubles de peptide Aβ dans un système de cellules HEK exprimant la protéine APP humaine non mutée

Des cellules HEK exprimant la protéine APP humaine non mutée (HEK-APPwt) et des cellules contrôles (HEK) ont été exposées pendant 24 h à des oligomères solubles de peptide Aβ. A la fin de la période d'incubation, la viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTT. Les données sont exprimées comme la moyenne +/- SEM de la DO à 570 nm, rapportée au contrôle non traité (considéré comme 100%). Les déterminations ont été réalisées sur 3 expériences indépendantes, comportant chacune 4 puits par condition (type de cellule et traitement).

L'expression de la protéine APP dans ce système cellulaire HEK augmente la vulnérabilité des cellules à l'apoptose induite par les oligomères solubles de peptide Aβ, la mortalité induite par ceux-ci passant de 10 à 35 % (p<0,05).

III – 4 Conclusion

La dernière partie de ce travail est axée sur la recherche du mécanisme à l'origine de la résistance contre la toxicité des oligomères solubles de peptide A β , conférée par l'inactivation de la cPLA₂. Les différents aspects de cette résistance et l'implication potentielle de la cPLA₂ avaient été évoqués dans les parties précédentes de ce travail. Nous nous sommes basés sur la littérature pour explorer successivement différents candidats potentiels dans la protection conférée aux neurones, tant *in vitro* qu'*in vivo*.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la voie des facteurs de croissance, insuline et Igf-1, dont la signalisation était positivement dérégulée chez les animaux cPLA₂^{-/-}. Cette transduction accrue du signal résultait de l'inactivation relative de la PKC ζ , induite par une moindre libération endogène d'AA. Cependant, l'inhibition de cette kinase au moyen d'agents pharmacologiques n'a pas permis de protéger les neurones contre l'apoptose induite par le peptide A β soluble. De plus, l'inhibiteur utilisé présentait une toxicité relativement importante, liée à un manque de spécificité, et à une action potentielle sur d'autres kinases.

Ensuite, nous avons exploré l'activation de GSK3 β , kinase fortement impliquée dans l'apoptose induite par le peptide A β oligomérique, dans les neurones cPLA₂^{-/-} : Nous avons retrouvé une activation similaire de cette kinase dans les hippocampes de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} après injection ICV de peptide A β . De fait, cette kinase ne nous apparaît pas comme un candidat potentiel pour expliquer la résistance aux effets délétères du peptide A β , conférée par l'inactivation de la cPLA₂.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la protéine APP elle-même, précurseur du peptide A β , mais qui peut être également impliquée dans la médiation de ses effets délétères. Nous avons retrouvé un contenu en protéine APP diminué dans les neurones corticaux en culture et les hippocampes, issus de souris cPLA₂^{-/-}, par rapport aux animaux cPLA₂^{+/+}. De plus, cette réduction de l'expression d'APP peut être obtenue dans des cellules non déficientes en enzyme, après administration d'un inhibiteur pharmacologique ou d'ASO.

Le mécanisme par lequel la délétion de la cPLA₂ réduit l'expression de l'APP reste pour l'instant inconnu, mais il semble qu'il n'implique pas une modulation de la transcription du gène de l'APP. Les taux d'ARNm sont en effet comparables dans l'hippocampe de souris des 2 génotypes.

Enfin, nous avons apporté un argument important pour attribuer l'origine de la résistance des souris $cPLA_2^{-/-}$ à l'expression réduite d'APP : La transfection de cellules HEK avec la protéine APP non mutée augmente la vulnérabilité de ces cellules à l'apoptose induite par les oligomères solubles de peptide A β .

Il apparaît donc clairement que la délétion de la $cPLA_2$ protège les neurones à la fois *in vitro* et *in vivo* en diminuant l'expression de l'APP, et en réduisant la transduction des effets délétères du peptide A β soluble.

DISCUSSION

Les recherches précédentes de notre équipe, effectuées sur des cultures de neurones, ont fait apparaître la cPLA₂ comme un médiateur précoce et d'importance cruciale de la neurotoxicité des oligomères solubles de peptide Aβ [[Kriem, 2005](#)] [[Malaplate-Armand, 2006](#)]. Dans le présent travail, nous avons confirmé ces résultats à la fois *in vitro* et *in vivo*. En outre, notre travail établit que la cPLA₂ est impliquée fortement dans les déficits cognitifs et la synaptotoxicité induits par les oligomères solubles de peptide Aβ.

Nous avons pu établir que l'inactivation du gène de la cPLA₂ confère aux souris une protection totale contre les altérations des fonctions d'apprentissage et de mémoire à court et long terme, consécutives à l'administration ICV de peptide Aβ soluble. Nous avons également pu observer qu'une extinction partielle du gène cPLA₂ procurait une protection incomplète contre les troubles cognitifs induits par ces mêmes oligomères.

Nous avons associé cette protection des capacités cognitives à une résistance au niveau cellulaire et moléculaire. En effet, nous avons constaté un maintien de l'intégrité des synapses de l'hippocampe chez les souris cPLA₂^{-/-} après injection de peptide Aβ. Cette intégrité se traduit par la conservation des niveaux d'expression de diverses protéines impliquées dans la structure et la fonction des synapses (PSD95, synaptophysine, synaptotagmine). Par contre, ces mêmes protéines voient leurs niveaux d'expression diminuer de manière significative chez les animaux cPLA₂^{+/+} exposés aux oligomères de peptide Aβ. De plus, l'activation des voies proapoptiques induite par les oligomères Aβ est inhibée dans les neurones corticaux primaires issus de souris cPLA₂^{-/-}.

Ces résultats suggèrent que la cPLA₂ est une cible potentielle dans la prévention et/ou le traitement de la MA. Ils ont été obtenus avec un modèle d'injection ICV unique d'oligomères de peptide Aβ, dont nous allons discuter ci-dessous la place et l'intérêt dans les études sur la MA, par rapport à d'autres modèles, plus particulièrement dans le contexte du rôle de la cPLA₂. Nous discuterons ensuite de l'implication possible de la cPLA₂ dans la plasticité synaptique puis nous aborderons les mécanismes potentiels de la résistance aux oligomères de peptide Aβ conférée par la suppression de l'expression de la cPLA₂. Enfin nous verrons les perspectives qui peuvent être déduites de nos travaux en terme de stratégies thérapeutiques, curatives ou préventives, contre la MA.

I – Intérêts du modèle d’injection intra cérébro ventriculaire des oligomères solubles de peptide A β pour l’étude du rôle de la cPLA₂ dans les phases précoces de la maladie d’Alzheimer

I – 1 Similitudes entre le modèle d’injection de peptide A β soluble et les modèles transgéniques par rapport à l’implication de la cPLA₂ dans la maladie d’Alzheimer

Les études sur les mécanismes de la MA et la sélection de cibles thérapeutiques potentielles ont largement utilisé des modèles animaux de souris transgéniques, exprimant les gènes humains de l’APP et des PS1 et PS2. Ces modèles sont caractérisés par la production massive et précoce de grandes quantités de peptide A β . Ceci entraîne l’apparition de plaques amyloïdes, résultant de l’accumulation de ces peptides. Sanchez-Mejia et coll. ont ainsi utilisé une lignée de souris transgéniques hAPP-J20 pour montrer que l’inactivation du gène de la cPLA₂ empêche le développement du processus neurodégénératif de la MA [[Sanchez-Mejia, 2008](#)]. Comme nous l’avons vu dans le [paragraphe](#) consacré aux modèles transgéniques de MA, ces souris hAPP-J20 expriment un transgène de la protéine APP humaine, porteur de la mutation *Swedish* (K670N / M671L) et de la mutation *Indiana* (V717F), responsables de formes familiales de MA [[Sturchler-Pierrat, 1997](#)]. En raison de cette double mutation, ces animaux produisent de grandes quantités de peptide A β (et notamment de peptide A β (1-42) au niveau de l’hippocampe et du néocortex, avec des dépôts diffus de peptide A β dans le gyrus denté et le néocortex vers 5 – 7 mois et des plaques vers 8 – 10 mois.

Sanchez-Mejia et coll. ont mis en évidence une augmentation des eicosanoïdes et des AG dans les souris de la lignée hAPP-J20. Les souris hAPP-J20 présentent des déficits dans les fonctions d’apprentissage et de mémoire. Les auteurs ont également décrit une phosphorylation accrue de la cPLA₂ au niveau de l’hippocampe de ces souris, ce qui témoigne d’une activation de cette enzyme. Ces dernières observations rejoignent et confirment les données obtenues avec notre modèle d’injection ICV présentées précédemment. De plus, une augmentation de la phosphorylation de la cPLA₂ a également

été observée dans des échantillons issus de cerveaux de patients atteints de la MA [[Sanchez-Mejia, 2008](#)].

Ces souris hAPP-J20 ont été croisées avec des souris $cPLA_2^{-/-}$ (sur fond C57Bl6), pour obtenir des animaux doublement transgéniques. L'inactivation constitutive de la $cPLA_2$, dans les souris hAPP-J20 / $cPLA_2^{-/-}$, réduit considérablement les différents déficits des fonctions d'apprentissage et de mémoire présentés par les animaux hAPP-J20 / $cPLA_2^{+/+}$. Ainsi, l'inactivation constitutive de la $cPLA_2$ protège les fonctions mnésiques et synaptiques, autant dans un modèle d'exposition chronique que d'exposition aiguë au peptide A β .

Les souris hAPP-J20 présentent également d'autres modifications comportementales, telles que la désinhibition et l'hyperactivité. Ces diverses modifications peuvent résulter de déficits dans l'encodage de nouvelles informations, liés aux troubles mnésiques [[Kobayashi, 2005](#)]. Là encore, la diminution ou la suppression de la $cPLA_2$ améliore ces divers troubles du comportement. Enfin, les souris hAPP-J20 présentent une mortalité prématurée, laquelle peut résulter, du moins partiellement d'une tendance épileptique [[Palop, 2007](#)]. La délétion de la $cPLA_2$ chez ces souris hAPP-J20 réduit leur mortalité prématurée, probablement par une augmentation du seuil d'excitabilité, liée à la diminution de l'excitation neuronale induite par A β .

Les déficits des fonctions d'apprentissage et de mémoire observés chez ces souris hAPP-J20 sont corrélés avec la diminution de marqueurs spécifiques de l'activité et de la fonctionnalité synaptiques, tels que la calbindine ou, comme nous l'avons rapporté, dans notre modèle d'injection ICV, la synaptophysine, la synaptotagmine ou le PSD95 [[Palop, 2003](#)]. De manière très intéressante, la suppression de la $cPLA_2$ permet de conserver des niveaux inaltérés de protéines synaptiques comme la calbindine chez des souris hAPP-J20 / $cPLA_2^{-/-}$. Cette protection de l'intégrité biochimique et fonctionnelle de la synapse se rapproche de celle rapportée pour nos souris $cPLA_2^{-/-}$ injectées avec des oligomères de peptide A β .

I – 2 Complémentarités entre le modèle d'injection de peptide A β soluble et les modèles transgéniques : des stades différents de la maladie d'Alzheimer

La souris transgénique hAPP-J20 utilisée par Sanchez-Mejia et coll. produit de manière constitutive de grandes quantités de peptide A β et modélise de ce fait une forme héréditaire de MA et/ou une MA à un stade très avancé [[Sanchez-Mejia, 2008](#)]. Elle n'apparaît donc pas comme le modèle le plus approprié pour l'étude des stades précoces des formes sporadiques de la MA. En effet, il semble très difficile de repérer, dans de tels animaux transgéniques, les contributions respectives des différentes formes de peptide A β : formes intraneuronales, monomères extracellulaires, oligomères ou fibrilles amyloïdes.

Notre étude est centrée sur l'analyse de la neurotoxicité des oligomères de peptide A β et l'implication de la cPLA₂ dans la médiation de leurs effets délétères. Nous focalisons nos recherches sur les étapes initiales de la MA, où ces oligomères provoquent les premières altérations de la plasticité cérébrale et du renouvellement des synapses, en l'absence de symptômes décelables, ou sur les premières étapes du déclin cognitif. Le fondement rationnel de notre étude est que ces étapes doivent être ciblées par les stratégies thérapeutiques afin de bloquer l'évolution de la maladie et de préserver au mieux les capacités cognitives. Nous avons donc choisi un modèle plus adéquat pour modéliser ces stades précoces de la MA sporadique, dans lequel les troubles comportementaux et les altérations synaptiques sont induits par une exposition aiguë à une faible quantité d'oligomères A β extracellulaires [[Youssef, 2008](#)] ([Figure 85](#)).

Les préparations d'oligomères A β 42 synthétiques, que nous avons utilisées, permettent de cibler plus particulièrement une variété précise d'oligomères et de déterminer avec précision la quantité administrée. L'étude électrophorétique de nos préparations a montré que ces dernières contenaient de façon prédominante des trimères et des tétramères. Cet état d'oligomérisation semble comparable aux préparations obtenues à partir de lots synthétiques ou aux milieux conditionnés issus de systèmes cellulaires recombinants [[Berman, 2008](#)]. Cette approche permet de cibler un état particulier d'oligomérisation du peptide A β , qui apparaît jouer un rôle déterminant dans les phases précoces de la MA.

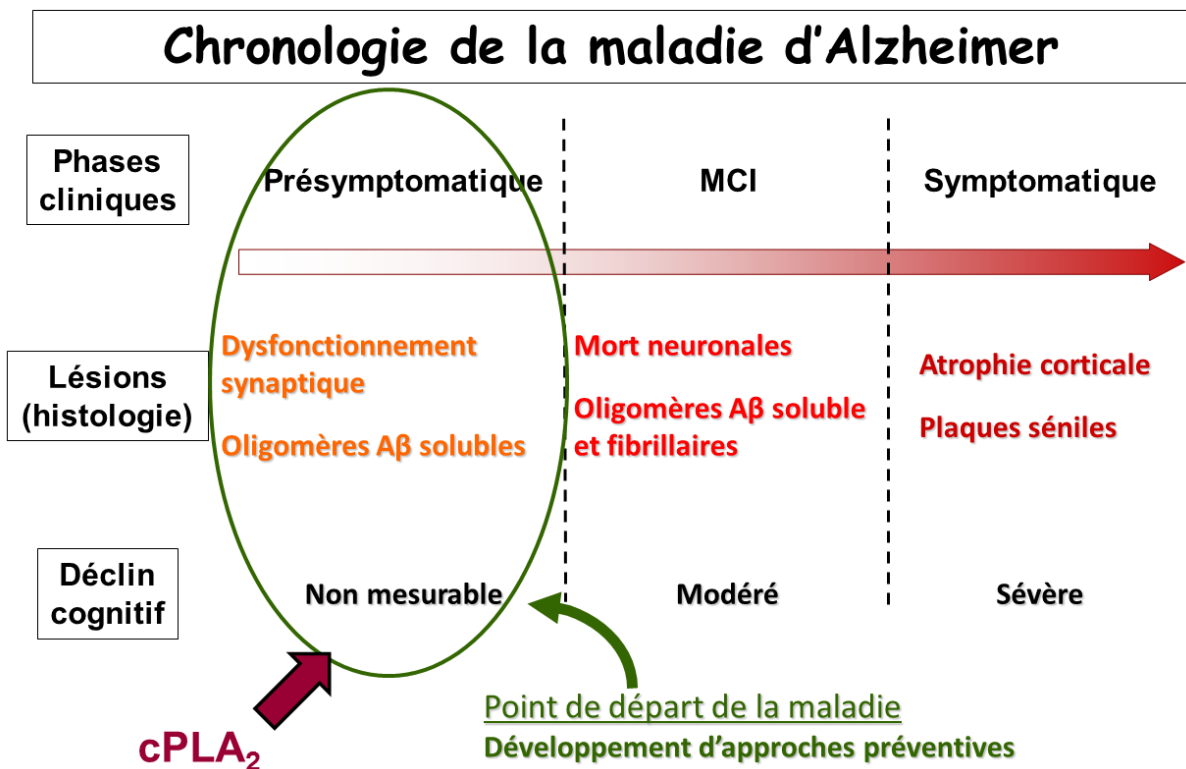


Figure 85 : Implication de la cPLA₂ dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer : intérêt de l'utilisation du modèle murin d'injection intra cérébro ventriculaire

Le stade présymptomatique de la MA (avant l'apparition du déclin cognitif) constitue la cible de choix pour les approches préventives contre cette pathologie. Ce stade est majoritairement caractérisé par un dysfonctionnement synaptique lié à l'action délétère des oligomères solubles de peptide Aβ, avant l'apparition de la mort neuronale et des signes histologiques observés aux stades plus tardifs. Il est nécessaire de disposer d'un modèle reproduisant la phase présymptomatique de la MA, afin d'apprécier l'implication de la cPLA₂ et d'évaluer son intérêt comme cible thérapeutique potentielle. Notre modèle d'injection ICV d'une faible quantité d'oligomères solubles permet de reproduire l'atteinte synaptique, en dehors de toute mort neuronale ou d'autres phénomènes associés comme l'inflammation.

De ce fait, ce modèle d'injection ICV offre la possibilité d'étudier les voies de transduction assurant la médiation des effets neurotoxiques des oligomères Aβ. Il devrait donc permettre l'identification des cibles thérapeutiques potentielles pour protéger les neurones (ou, tout du moins, diminuer leur sensibilité) vis-à-vis des oligomères de peptide Aβ.

Nous n'avons pas observé dans ce modèle de réaction neuro inflammatoire dans la médiation de la toxicité du peptide Aβ soluble, puisque nous n'avons mis en évidence aucune variation significative du niveau de divers marqueurs astrogliaux et microgliaux chez les animaux cPLA₂^{+/+} injectés en ICV avec du peptide Aβ soluble. A l'inverse, il existe une importante réaction inflammatoire, avec une activation astrocytaire et microgliale, accompagnée d'une production accrue de médiateurs neuro-inflammatoires, dans les phases tardives de la MA et dans les modèles transgéniques murins [Schwab, 2010].

Sanchez-Mejia et coll. ont rapporté une production massive de peptide A β , ainsi que d'importantes quantités d'éicosanoïdes pro-inflammatoires au niveau de l'hippocampe des souris de la lignée hAPP-J20 [[Sanchez-Mejia, 2008](#)]. Cette dernière observation tendrait à suggérer que la suppression du gène cPLA₂ inhibe le processus neurodégénératif responsable de la MA par une réduction de la production de ces éicosanoïdes proinflammatoires. Par ailleurs, une augmentation de l'expression de la cPLA₂ (ARNm et protéine) avait été notée par plusieurs études au niveau de la région CA1 de l'hippocampe de patients atteints de MA [[Stephenson, 1996](#)].

Il semble que le modèle hAPP-J20 utilisé par Sanchez-Mejia et coll. fasse intervenir une part non négligeable de neuro inflammation dans la genèse des altérations synaptiques et des troubles comportementaux observés chez les souris hAPP-J20 / cPLA₂^{+/+}. On peut ainsi comprendre que la délétion de la cPLA₂ confère une protection aux animaux par une réduction de la libération de l'AA et de la synthèse d'éicosanoïdes pro-inflammatoires, dont il est le précurseur.

La délétion de la cPLA₂ procure également un certain niveau de protection aux souris dans d'autres modèles pathologiques, comme l'ischémie / reperfusion [[Tabuchi, 2003](#)] et l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, un modèle de la sclérose en plaques [[Marusic, 2005](#)]. La réaction inflammatoire occupe une place prédominante dans la genèse et l'entretien de ces différentes pathologies, tant chez l'animal de laboratoire, qui les modélise, que chez le patient qui en est atteint. Il n'est donc pas surprenant que l'inactivation constitutive de la cPLA₂, entraînant une moindre production de médiateurs pro inflammatoires, garantisse aux souris *KO* un certain niveau de protection contre ces atteintes.

Nos résultats obtenus à partir d'un modèle d'injection ICV unique d'oligomères de peptide A β sont confortés par ceux de Sanchez-Mejia et coll. et soulignent l'importance de la cPLA₂ dans la MA [[Sanchez-Mejia, 2008](#)].

Toutefois, les mécanismes impliqués dans la médiation de la toxicité du peptide A β au sein de notre modèle et modifiés par l'inhibition de l'expression de la cPLA₂ semblent différents de ceux proposés pour le modèle transgénique. Les altérations observées ne sont accompagnées ni de phénomènes neuro inflammatoires, ni d'activation gliale persistante. Les altérations structurales et fonctionnelles observées après administration ICV de peptide A β soluble semblent donc résulter d'une toxicité plus « directe » des oligomères A β .

II – Implication de la cPLA₂ dans les voies de transduction aboutissant à l'apoptose neuronale et à la perte des synapses

II – 1 cPLA₂ et neurotoxicité des oligomères solubles de peptide Aβ

Le laboratoire Lipidomix a démontré que les oligomères de peptide Aβ activent précocément la cPLA₂ dans des neurones corticaux en culture primaire. Cette activation s'accompagne d'une relocalisation membranaire de la cPLA₂ et d'une libération d'AA. De plus, cette activation est de courte durée, les manifestations précédemment rapportées diminuant 30 mn après le début de l'exposition aux oligomères [[Kriem, 2005](#)].

Par ailleurs, notre groupe a prouvé que la cPLA₂ est impliquée de manière cruciale dans l'initiation du processus d'apoptose neuronale induite par les oligomères de peptide Aβ [[Kriem, 2005](#)]. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et d'ASO, dirigés contre la cPLA₂, protège partiellement les neurones en culture primaire contre l'apoptose induite par les oligomères de peptide Aβ. De plus, des inhibiteurs de la cascade des MAPK, responsables de l'activation de la cPLA₂, protègent également partiellement les cultures neuronales contre l'effet pro-apoptotiques du peptide Aβ ([Figure 86](#)).

Ultérieurement, l'équipe a démontré que l'activation de la cPLA₂ par les oligomères Aβ précède celle des A-SMases et des N-SMases, dans des cultures neuronales ([Figure 86](#)). En effet, l'inhibition de la cPLA₂, au moyen d'agents pharmacologiques ou d'ASO, bloque l'activation des SMases dans des neurones primaires exposés au peptide Aβ soluble [[Malaplate-Armand, 2006](#)]. Il est par ailleurs connu que l'activation des SMases et la synthèse intracellulaires de céramides constituent un pivot du processus apoptotique [[Alessenko, 2004](#)].

Notre travail a confirmé ces différents résultats précédemment acquis sur des neurones de phénotype sauvage en culture primaire. En effet, nous avons transposé cette démarche *in vitro* sur un modèle d'inactivation constitutive de la cPLA₂, représenté par la souris cPLA₂^{-/-}, avec une double approche, *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons mis en évidence une phosphorylation de la cPLA₂ ainsi que des kinases ERK1/2, principales kinases activatrices de la cPLA₂, dans l'hippocampe des souris de phénotype sauvage, après injection ICV d'oligomères de peptide Aβ.

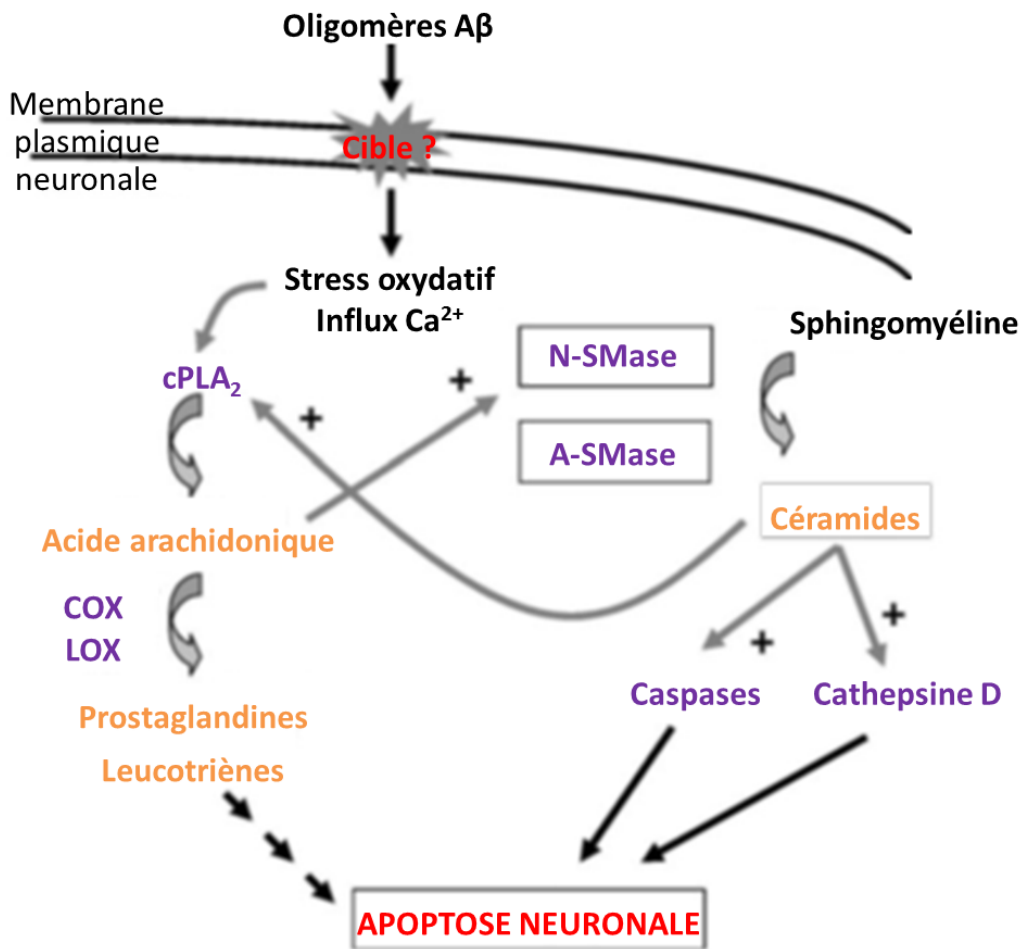


Figure 86 : Implication de la cPLA₂ dans la médiation de la toxicité des oligomères solubles de peptide Aβ [Malaplate-Armand, 2006]

L'interaction des oligomères solubles de peptide Aβ avec un récepteur situé au niveau de la membrane neuronale entraîne un afflux de Ca²⁺ dans le cytoplasme, ainsi que l'induction d'un stress oxydatif. Ces deux éléments conduisent à l'activation de la cPLA₂, de manière directe et par l'intervention des MAP kinases. La cPLA₂ hydrolyse les PL membranaires en libérant de l'AA. Celui-ci peut activer directement les SMases et être converti par les COX et les LOX en éicosanoïdes. Les SMases convertissent la sphingomyéline en céramides, qui activent les caspases et la cathepsine D. Les céramides peuvent à leur tour activer la cPLA₂. L'ensemble de ces acteurs moléculaires, mis en jeu en réponse à l'activation de la cPLA₂ et de la cascade de l'AA, vont entraîner la mort du neurone par apoptose.

Les kinases ERK1/2 sont impliquées dans l'activation de la cPLA₂ après exposition aux différentes formes de peptide Aβ, dans de nombreux modèles cellulaires, neuronaux [He, 2011] [Kriem, 2005] [Shelat, 2008] ou non [Nicotra, 2005]. A l'heure actuelle, l'activation excessive des kinases ERK1/2, liée à un état de phosphorylation anormal, semble constituer un évènement moléculaire commun et capital dans les processus de neurodégénérescence induits par différents stimuli pathologiques, dont le peptide Aβ [Colucci-D'Amato, 2003].

De même, Sanchez-Mejia et coll. ont rapporté une phosphorylation accrue de la cPLA₂ sur la Ser⁵⁰⁵, dans leur modèle murin transgénique de MA. Ils ont transposé cette observation à

des échantillons d'hippocampe provenant de sujets humains. Là encore, le niveau de phosphorylation de la cPLA₂ est plus important chez les patients atteints de MA que chez des sujets indemnes de toute démence, ou des patients atteints de démence frontotemporale [[Sanchez-Mejia, 2008](#)].

Nos présentes observations sont donc confortées par les travaux antérieurs de notre groupe et ceux d'autres équipes de recherche. L'ensemble de ces données indique clairement que l'exposition des neurones au peptide Aβ soluble aboutit à une activation de la cPLA₂ et que cette activation implique les kinases ERK1/2 et la phosphorylation de la cPLA₂ sur la Ser⁵⁰⁵.

Nous avons également montré que l'inactivation du gène de la cPLA₂ bloque totalement l'activation des A-SMases et N-SMases et l'apoptose induites par les oligomères de peptide Aβ. Cette résistance à l'effet apoptotique du peptide Aβ rejoint celle conférée par les inhibiteurs pharmacologiques et les ASO [[Malaplate-Armand, 2006](#)].

De plus, nous avons observé le maintien de la voie de survie Akt / PKB dans des neurones corticaux primaires issus de souris cPLA₂^{-/-} incubés avec des oligomères de peptide Aβ. Au contraire, l'incubation de neurones cPLA₂^{+/+} avec ces mêmes oligomères entraîne une réduction drastique de la phosphorylation de cette kinase, impliquée dans la survie des cellules. Le maintien de la voie Akt / PKB peut donc témoigner sur le plan moléculaire de la résistance des neurones cPLA₂^{-/-} à l'apoptose induite par le peptide Aβ soluble.

Nos résultats appuient donc fortement l'implication critique de la cPLA₂ dans les phénomènes de neurotoxicité induite par le peptide Aβ.

II – 2 cPLA₂ et synaptotoxicité des oligomères de peptide Aβ

De nombreux travaux, réalisés tant sur des modèles animaux que sur des échantillons provenant de patients atteints de MA, ont identifié la dysfonction synaptique comme une caractéristique essentielle de sa pathogénèse [[Selkoe, 2002](#)]. Ce déficit synaptique, qu'il touche l'intégrité de la synapse ou sa plasticité, représente un évènement très précoce, détectable dès les premières phases de la maladie [[Walsh, 2004](#)]. Plusieurs études ont rapporté que cette perte synaptique résulte de perturbations au niveau des récepteurs au glutamate de type AMPA et NMDA, ainsi que de modifications du trafic et de l'endocytose d'autres protéines synaptiques [[Parameshwaran, 2008](#)].

Notre modèle utilise une injection ICV unique d'une faible quantité d'oligomères A β , et cette injection apparaît suffisante pour induire une réduction drastique et durable des taux de plusieurs marqueurs synaptiques, tels que la synaptotagmine, la synaptophysine ou le PSD95. Une diminution des taux de PSD95 a d'ailleurs été observée dans l'hippocampe de patients MCI, stade qui correspond aux phases prodromales de la MA [[Sultana, 2010](#)]. Ces altérations structurales de la synapse compromettent sa fonctionnalité et induisent, chez la souris de phénotype sauvage, des troubles mnésiques et comportementaux, mimant les stades précoces de la MA [[Garcia, 2010](#)] [[Youssef, 2008](#)].

Cette diminution des protéines synaptiques est encore observable 14 jours après l'injection ICV, ce qui témoigne du caractère durable de ces altérations, pourtant occasionnées par une administration unique d'une quantité relativement faible de peptide A β . Par ailleurs, cette persistance dans le temps des altérations biochimiques au niveau de l'hippocampe est cohérente avec les troubles de mémoire et d'apprentissage décrits chez les animaux cPLA $_2^{+/+}$, les investigations comportementales étant réalisées pendant les 14 jours suivant l'injection ICV.

Par ailleurs Van Guilder et coll. ont suggéré, en utilisant des rats d'âges différents, que les taux de ces marqueurs synaptiques diminuent avec le vieillissement et sont corrélés avec la diminution de la transmission synaptique et des capacités cognitives [[VanGuilder, 2010](#)]. Les souris de phénotype sauvage montrent, après injection des oligomères de peptide A β , une diminution de leurs capacités d'apprentissage, même si ces capacités ne sont pas abolies. Il est possible que la diminution des marqueurs synaptiques dans l'hippocampe des souris cPLA $_2^{+/+}$ corresponde en fait à une augmentation, induite par l'apprentissage, de moindre amplitude que chez les animaux cPLA $_2^{-/-}$, dont les capacités cognitives sont protégées. Cette diminution des marqueurs synaptiques reflèterait ainsi la réduction de la plasticité synaptique et des capacités de mémorisation occasionnée par l'administration de peptide A β soluble.

Notre résultat le plus marquant réside dans la protection intégrale des taux de protéines synaptiques après injection ICV de peptide A β chez les souris cPLA $_2^{-/-}$, lesquels taux sont identiques à ceux des animaux cPLA $_2^{-/-}$ et cPLA $_2^{+/+}$ injectés avec le soluté contrôle. Cela indique que la cPLA $_2$ participe de manière critique à la médiation des phénomènes de neurotoxicité et de synaptotoxicité induits par les oligomères solubles de peptide A β .

Ces observations *in vivo* ont pu être reproduites *in vitro* sur des cultures primaires de neurones corticaux. En effet, l'incubation de ces neurones pendant 6 h en présence de 1 μ M

de peptide A β soluble entraîne une réduction très importante de PSD95 dans les neurones issus de souris cPLA $_2$ ^{+/+}. Inversement, on n'observe aucune réduction de PSD95 dans des neurones issus de souris déficientes en cPLA $_2$ et traités dans des conditions identiques. Une observation contraire a été rapportée par Sanchez-Mejia et coll. Ces derniers montrent en effet qu'une concentration de 10 μ M d'oligomères A β augmentent transitoirement l'expression des sous unités des récepteurs AMPA, GluR1 et GluR2 à la surface des neurones en culture. L'incubation préalable des cellules avec de l'AACOCF3, un inhibiteur pharmacologique de la cPLA $_2$, supprime ce phénomène [[Sanchez-Mejia, 2008](#)]. Bien que ces résultats apparaissent contradictoires à première vue, on peut supposer que la surexpression de récepteurs au glutamate prédispose les neurones aux phénomènes d'excitotoxicité, et constitue une des voies de toxicité des oligomères A β , dont la médiation est assurée par la cPLA $_2$. La réduction du niveau de PSD95 témoignerait des phénomènes de dégénérescence subis par les neurones après exposition au peptide A β . Il est à noter que la concentration d'oligomères A β diffère grandement entre nos deux études, puisque Sanchez-Mejia et coll. utilisent des doses 10 fois supérieures aux nôtres pour traiter leurs cultures cellulaires. Cette différence de traitement peut également expliquer une divergence des effets observés.

De manière générale, l'ensemble de ces résultats plaide fortement en faveur de l'implication de la cPLA $_2$ dans la toxicité synaptique des oligomères A β .

Des protéines pré-synaptiques, telles que la synaptotagmine et la synaptophysine, interviennent dans la formation de complexes SNARE. Ces complexes SNARE participent à des phénomènes tels que l'exocytose, et donc à la libération de neurotransmetteurs. Ces complexes renferment d'autres partenaires protéiques, comme la syntaxine 1, SNAP25 et Munc18. L'AA stabilise les interactions entre la syntaxine 1, Munc18 et SNAP25, favorisant ainsi l'exocytose des neurotransmetteurs [[Connell, 2007](#)] [[Latham, 2007](#)]. La libération d'AA à partir des PL membranaires, après l'activation de la cPLA $_2$ par les oligomères A β , pourrait ainsi perturber les fonctions synaptiques.

Par ailleurs, après son activation par l'afflux de Ca $^{2+}$ intracellulaire et sa phosphorylation au niveau de la Ser⁵⁰⁵, une partie de la cPLA $_2$ se localise au niveau de l'appareil de Golgi [[Tucker, 2009](#)]. Des articles antérieurs ont montré que l'activité cPLA $_2$ pouvait modifier le transport de plusieurs protéines entre les vésicules du Golgi et la membrane plasmique, dans des cellules non neuronales [[Choukroun, 2000](#)] [[Regan-Klapisz, 2009](#)]. Cette activation de la

cPLA₂ pourrait altérer la composition en protéines de la membrane synaptique, ce qui pourrait expliquer les modifications des protéines synaptiques que nous décrivons dans les souris cPLA₂^{+/+}.

Enfin, la cPLA₂ influe sur l'organisation de la membrane cellulaire, ainsi que sur la formation de vésicules lipidiques [[Gubern, 2008](#)]. Or, ces différents éléments prennent une importance critique pour le maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité de la membrane synaptique.

On peut donc en déduire que l'activation de la cPLA₂, en réponse à l'exposition aux oligomères Aβ, influence la constitution protéique et lipidique de la synapse. Ces modifications pourraient être, du moins en partie, à l'origine du dysfonctionnement et de la perte synaptiques observés au cours de la MA.

III – Protection contre la neurotoxicité des oligomères de peptide A β et cPLA₂ : quel(s) mécanisme(s) ?

Nous avons cherché à mettre en évidence les différents mécanismes potentiellement à l'origine de cette protection conférée par la délétion du gène de la cPLA₂.

III – 1 Implication de la PKC ζ dans la genèse de la protection contre les effets délétères du peptide A β soluble

Nous avons montré un maintien du niveau d'activation de Akt/PKB dans les neurones de souris cPLA₂^{-/-} exposés aux oligomères de peptide A β , alors que cette kinase est déphosphorylée en présence de peptide A β soluble dans les neurones de souris cPLA₂^{+/+}.

L'activation d'Akt/PKB en réponse aux facteurs de croissance et à l'insuline peut être inhibée par l'AA [[Haq, 2003](#)]. Ainsi, la production d'AA, liée à l'activation de la cPLA₂ par les oligomères A β , entraînerait une inhibition des voies de survie, telle que celle décrite dans les neurones cPLA₂^{+/+}. A l'inverse, la délétion de la cPLA₂ augmente la sensibilité des cellules aux facteurs de croissance et de survie chez les animaux KO. Ceci pourrait expliquer, du moins partiellement, leur résistance à l'apoptose.

Ce phénomène a été mis en évidence dans les cellules musculaires des souris cPLA₂^{-/-}, chez lesquelles on constate une tendance à l'hypertrophie musculaire et cardiaque [[Haq, 2003](#)], mais cette sensibilité accrue pourrait fort bien être extrapolée aux neurones. De plus, une diminution de la sensibilité à l'insuline et aux facteurs de croissance a été rapportée dans les neurones de patients atteints de MA, et pourrait être à l'origine des phénomènes de dégénérescence neuronale. Cette résistance à l'insuline a même conduit à qualifier la MA de « diabète de type 3 » [[Verdier, 2004b](#)]. Sachant l'implication potentielle des facteurs de croissance dans la MA, on peut envisager que la résistance conférée par la délétion de la cPLA₂ résulte, du moins en partie, d'une restauration, voire d'une majoration, de cette signalisation des voies de survie.

Ceci nous a conduits à examiner l'implication de la signalisation des facteurs de croissance de type IGF-1/insuline et de l'activation de la voie Akt/PKB dans l'origine de la résistance conférée par l'inactivation de la cPLA₂.

La première cible testée a été la PKC ζ . Haq et coll. ont en effet montré que l'AA libéré par la cPLA₂ agit comme un inhibiteur du signal de l'IGF-1 dans les cellules musculaires lisses. En

effet, l'AA active la PDK-1, laquelle recrute et phosphoryle la PKC ζ . La PKC ζ se comporte comme un régulateur négatif de la signalisation de l'IGF-1, cette voie aboutissant, entre autres, à l'activation de PKB/Akt [Haq, 2003] (Figure 87). Ainsi, la suppression du gène de la cPLA $_2$, en réduisant la production endogène d'AA, inhibe l'activation de la PDK-1, et par conséquent, l'inhibition de la PKC ζ sur la voie IGF-1-PKB/Akt dans les cellules musculaires lisses. A l'inverse, l'administration d'AA sur des cellules musculaires en culture restaure l'inhibition de la signalisation des facteurs de croissance.

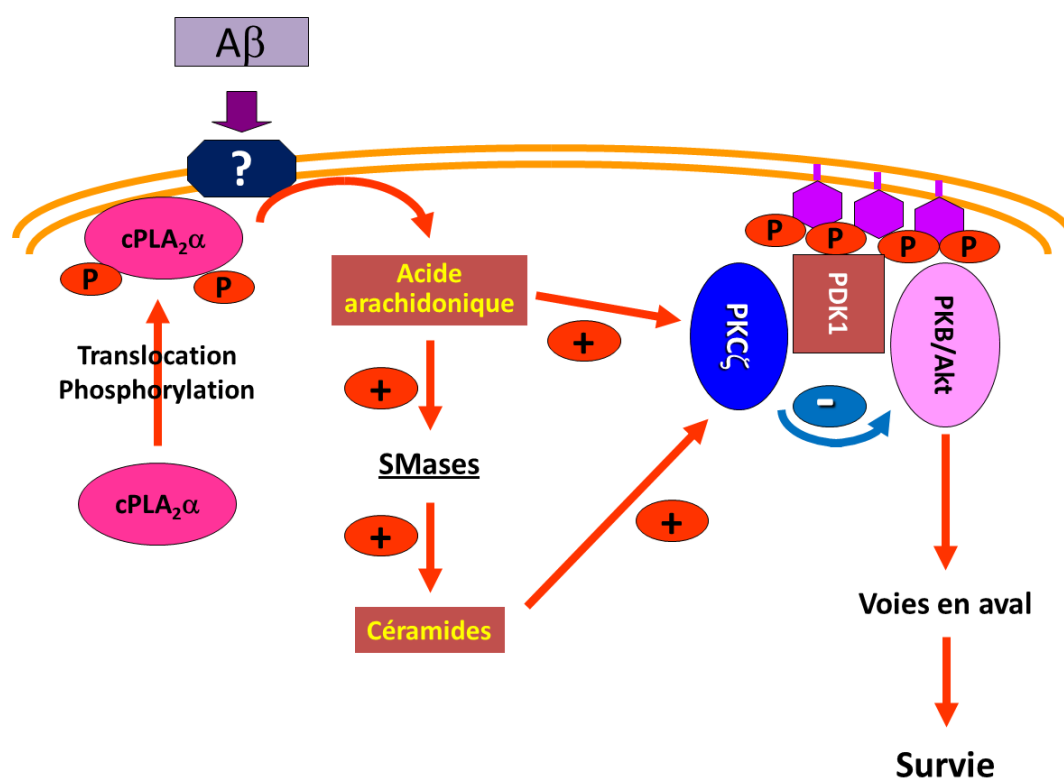


Figure 87 : Implication de la PKC ζ dans la médiation de la toxicité des oligomères solubles de peptide A β via l'activation de la cPLA $_2$

L'AA agit comme un régulateur négatif de la voie de signalisation de l'IGF-1, par l'intermédiaire de la PKC ζ . Cette voie des facteurs de croissance aboutit, entre autres, à l'activation de la PKB/Akt, qui assure une signalisation pro survie au sein des cellules. En effet, l'AA (libéré des PL membranaires sous l'action de la cPLA $_2$) active la PDK-1, laquelle recrute et phosphoryle la PKC ζ . La PKC ζ , une fois activée, se comporte comme un régulateur négatif de la signalisation de l'IGF-1. L'inactivation constitutive de la cPLA $_2$ dans les animaux KO pourrait entraîner une suractivation des voies de survie, responsable entre autres, d'une hypertrophie des muscles striés. De même, cette suractivation des voies de survie pourrait être à l'origine de la résistance des neurones contre les effets délétères des oligomères solubles de peptide A β .

Nous avons testé l'existence d'un tel phénomène dans les neurones en présence de peptide A β à l'aide d'un peptide inhibiteur de PKC ζ . Mais, ce peptide s'est révélé toxique pour les neurones et nous n'avons pu démontrer une implication de la PKC ζ dans la réponse aux oligomères de peptide A β . Une analyse des séquences homologues à celle du peptide inhibiteur de PKC ζ , dans le génome de la souris, a montré que ce peptide pouvait également se lier à la séquence catalytique de la PKC ι ([Figure 77](#)). Cette PKC joue un rôle important dans la survie neuronale [[Lin, 1997](#)]. De ce fait, une inhibition concomitante de la PKC ζ et de la PKC ι peut compromettre fortement la viabilité des neurones en culture, et masquer tout effet protecteur, même discret de l'inhibition de la PKC ζ . Une autre stratégie d'inhibition de la PKC ζ , plus spécifique, devrait être envisagée pour d'éventuelles études de cette origine de la résistance des neurones cPLA $_2^{-/-}$. L'utilisation d'ASO ou d'ARNi semble ainsi beaucoup plus prometteuse que le PKC ζ -PS.

III – 2 Implication de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) dans la genèse de la protection contre les effets délétères du peptide A β

Toujours dans ce contexte de la réponse IGF-1-Akt/PKB, nous avons également étudié l'implication possible de la kinase GSK3 β . La glycogène synthase kinase 3 β ([GSK3 \$\beta\$](#)) a été impliquée dans la pathogenèse de la MA [[Petit-Paitel, 2010](#)]. En effet, cette sérine / thréonine kinase a été initialement découverte pour son rôle dans la signalisation intracellulaire de facteurs de croissance comme l'insuline ou l'Igf-1, laquelle est perturbée au cours de la MA [[Bondy, 2004](#)]. De plus, cette protéine est présente en quantité abondante dans le SNC et est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires (signalisation de la voie de la β -caténine, entre autres).

Des altérations de la GSK3 β ont été reliées à de nombreux aspects de la pathogenèse de la MA, en particulier l'hyperphosphorylation de Tau et, par voie de conséquence, la genèse des DNF [[Brownlees, 1997](#)] ([Figure 88](#)). De plus, cette kinase est impliquée dans la régulation du processing de la protéine APP et la production du peptide A β [[Wen, 2008](#)]. De même, des inhibiteurs de GSK3 β comme le Li $^+$ peuvent diminuer la production de peptide A β et réduire la toxicité de ce dernier, chez des souris transgéniques surexprimant APP [[Su, 2004](#)]. *In vitro*, la GSK3 β peut phosphoryler la protéine APP [[Aplin, 1996](#)]. Le peptide A β pourrait également activer directement la GSK3 β et induire ainsi l'hyperphosphorylation de Tau [[Terwel, 2008](#)]. A ce titre, cette kinase pourrait constituer une « interconnexion » entre le versant amyloïde

et le versant Tau de la MA. Cette enzyme apparaît dès lors comme une cible de choix pour la prévention et/ou le traitement de la MA.

Or, la GSK3 β peut être activée par différents médiateurs lipidiques, dont les céramides, les produits de la voie de la PLC et de la cascade de l'AA [Rankin, 2008]. Ainsi, la cPLA₂ pourrait jouer un rôle de modulateur de l'activité de GSK3 β .

De ce fait, cette kinase apparaît comme un candidat potentiel pour expliquer la protection *in vivo* et *in vitro* des neurones cPLA₂^{-/-}. Afin d'explorer cette piste, nous avons mesuré l'état de phosphorylation de GSK3 β dans l'hippocampe de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} injectées avec des oligomères de peptide A β soluble. Une moindre production d'AA en réponse aux oligomères de peptide A β chez les souris cPLA₂^{-/-} devrait entraîner une moindre activation de GSK3 β , donc une phosphorylation accrue de cette enzyme.

Nous avons bien observé une diminution des niveaux de phosphorylation de cette kinase dans les neurones traités par les oligomères de peptide A β . Cette observation rejoint plusieurs travaux montrant que l'exposition des neurones au peptide A β active GSK3 β . Par contre, nous n'avons noté aucune différence de phosphorylation entre les neurones issus de souris cPLA₂^{+/+} et cPLA₂^{-/-}. L'activation de GSK3 β par le peptide A β oligomérique n'est donc pas influencée par le génotype des souris.

On peut donc conclure que la résistance aux oligomères de peptide A β induite par l'inactivation du gène de la cPLA₂ n'implique aucune de ces deux protéines kinases.

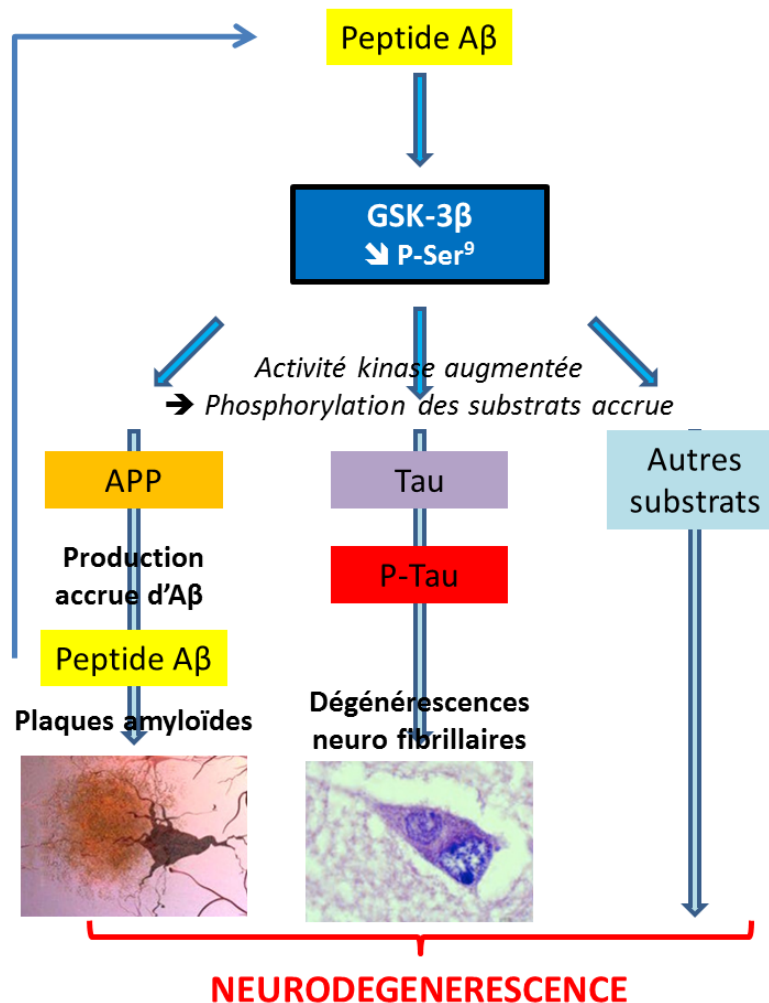


Figure 88 : Interactions entre les différentes voies pathogènes au sein de la maladie d'Alzheimer : Lien entre la signalisation Aβ et GSK-3β [Petit-Paitel, 2010]

L'exposition des neurones au peptide Aβ entraîne une activation de la GSK-3β, via une diminution de sa phosphorylation sur la Ser9 (enzyme active sous forme déphosphorylée). La GSK-3β va à son tour phosphoryler différents substrats, dont certains sont impliqués dans la pathogenèse de la MA et la formation de ses lésions histologiques caractéristiques. Parmi ces substrats, on retrouve notamment les protéines APP et Tau. La perturbation du métabolisme de l'APP entraîne une production accrue de peptide Aβ, qui exerce ses effets toxiques sur les neurones et s'agrège sous la forme de PA. L'hyper phosphorylation de Tau désorganise le cytosquelette, perturbe le fonctionnement du neurone et provoque l'apparition de DNF. D'autres voies de signalisation impliquées dans la MA peuvent également être activées par la GSK-3β. Ces différentes perturbations convergent vers la dégénérescence et la mort du neurone.

III – 3 Implication de la protéine APP dans la genèse de la protection contre les effets délétères du peptide A β soluble

L'inactivation constitutive de la cPLA₂ peut réduire l'expression et/ou l'exposition membranaire d'un ou plusieurs récepteurs aux oligomères solubles de peptide A β . Notre travail a permis d'identifier la protéine APP comme un candidat potentiel à l'origine de la résistance des souris cPLA₂^{-/-}.

La protéine APP joue des rôles multiples au sein du SNC. En effet, elle participe à diverses fonctions au sein du SNC, notamment à la plasticité synaptique [Dawson, 1999] [Priller, 2006]. De plus, cette protéine constitue l'origine même du peptide A β , lorsque son métabolisme emprunte la voie amyloïdogène, impliquant son clivage successif par les β - et γ -sécrétases [Evin, 2002].

En plus de constituer la source de peptides A β solubles, la protéine APP est également impliquée dans la médiation de leurs effets délétères. Les oligomères A β peuvent se lier à la protéine APP, au niveau de la séquence A β présente sur la partie extracellulaire de la protéine. Cette liaison initie une voie de signalisation intracellulaire, impliquant la dimérisation de l'APP et médiée par les protéines G [Shaked, 2006] [Shaked, 2009].

Divers travaux ont montré que la voie cPLA₂ / AA module le métabolisme et l'hydrolyse de la protéine APP [Emmerling, 1993] [Kinouchi, 1995]. De plus, la transfection de cellules de phéochromocytome de rat PC12 par des formes normale et mutante de l'APP humain entraîne une augmentation du contenu des cellules en cPLA₂ et majore son état de phosphorylation [Chalimoniuk, 2007]. Récemment, Culicchia et coll. ont décrit une surexpression simultanée de la cPLA₂ et de l'APP au sein de plusieurs lignées de glioblastomes humains [Culicchia, 2008]. Ces deux dernières observations suggèrent un lien supplémentaire entre l'expression de ces deux protéines.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'inactivation du gène de la cPLA₂ conduit à une réduction de l'expression de la protéine APP, que ce soit sur des neurones embryonnaires en culture, en conditions basales, ou sur des homogénats de cerveaux.

Ces dernières observations contrastent avec l'étude de Sanchez-Mejia et coll. qui ne montre pas de variation du taux d'APP humain, ni de la production d'A β dans leurs souris transgéniques hAPP-J20 [Sanchez-Mejia, 2008]. Toutefois, leur étude repose sur des souris surexprimant de manière constitutive l'APP humain et elle ne mentionne pas si l'expression

de la protéine APP endogène murine était modifiée en fonction du génotype cPLA₂ des souris.

L'inhibition de l'expression de la cPLA₂ au moyen d'ASO ou d'inhibiteurs pharmacologiques sur des neurones cPLA₂^{+/+} conduit également à une réduction de la quantité d'APP présente dans les cellules. Or, ces mêmes inhibiteurs de la cPLA₂ confèrent une résistance aux neurones contre la toxicité du peptide Aβ [Kriem, 2005]. Cette dernière donnée nous permet de proposer une origine à la protection partielle conférée par ces molécules contre l'apoptose induite par les oligomères du peptide Aβ, que nous avons rapportée dans nos travaux précédents [Kriem, 2005]. Il est donc licite de rapprocher cette résistance des neurones au peptide Aβ de la diminution de leur expression d'APP.

Ainsi, la suppression de l'activité de la cPLA₂, qu'elle soit constitutive ou acquise, entraîne une diminution de l'expression de la protéine APP. Comme l'APP participe à la médiation des signaux proapoptotiques induits par le peptide Aβ, la résistance des neurones cPLA₂^{-/-} pourrait résulter, du moins partiellement, d'une diminution de la transduction du signal proapoptotique par la protéine APP [Kriem, 2005] [Malaplate-Armand, 2006].

Par la suite, nous avons recherché le lien mécanistique reliant l'inactivation ou l'inhibition de la cPLA₂ à la diminution de l'expression de l'APP. La première hypothèse était que la cPLA₂ module, d'une manière ou d'une autre, l'expression du gène de l'APP. C'est pourquoi, nous avons mesuré par RT-PCR l'expression du gène de l'APP au sein de différentes structures, issues d'animaux de différents génotypes (cPLA₂^{-/-} et ^{+/+}). Nous n'avons mis en évidence aucune variation significative de l'ARNm de l'APP, lequel ne semble pas influencé par le génotype. De ce fait, il semble que la différence d'expression de l'APP résulte de phénomènes postérieurs à la transcription du gène de l'APP.

La cPLA₂ et, d'une manière plus générale, la composition lipidique des membranes cellulaires influencent le trafic des vésicules, l'adressage des protéines et la fonctionnalité des organites. Le transport rétrograde des endosomes vers le RE et la membrane est notamment contrôlé par la voie cPLA₂ / AA [Choukroun, 2000] [Regan-Klapisz, 2009].

Différents travaux sur les souris cPLA₂^{-/-} ont montré un déficit du pouvoir de concentration des urines, lié à un adressage incorrect de l'aquaporine 1 au pôle apical des cellules du tubule rénal [Downey, 2001]. Cette perturbation apparaît très spécifique vis-à-vis d'une protéine particulière, puisque la distribution des autres aquaporines n'apparaît pas perturbée. On peut ainsi imaginer que le métabolisme de la protéine APP soit également modifié par l'inactivation de la cPLA₂.

Après sa maturation et son transport à partir du RE et de l'appareil de Golgi vers les membranes synaptiques, l'APP est rapidement internalisée. Elle est ensuite transportée *via* les endosomes vers la surface cellulaire ou bien dégradée dans les lysosomes [[Thinakaran, 2008](#)]. L'inactivation de la cPLA₂ pourrait donc dévier le « *processing* » de l'APP vers les voies de dégradation, et ainsi entraîner une diminution de la quantité d'APP présente au niveau de la membrane.

D'autres travaux ont également montré que l'activation de la voie cPLA₂ / AA dévie le métabolisme de la protéine APP vers la voie amyloïdogène [[Emmerling, 1993](#)] [[Kinouchi, 1995](#)]. Ainsi, la cPLA₂ pourrait réguler le transport et le métabolisme de l'APP d'une manière similaire à d'autres protéines synaptiques dans les compartiments lipidiques. L'activation de la cPLA₂ conduirait donc à une surexpression de l'APP au niveau de la membrane synaptique et, par voie de conséquence, à une vulnérabilité accrue de la synapse aux oligomères de peptide Aβ.

De même, l'activation de la voie de survie Akt/PKB et de la PI3 kinase module également le trafic de l'APP et sa dégradation au niveau des lysosomes [[Shineman, 2009](#)]. Nous avons montré que cette voie Akt/PKB demeure inaltérée après exposition des neurones cPLA₂^{-/-} aux oligomères de peptide Aβ. Ainsi, les oligomères de peptide Aβ peuvent induire une déviation du métabolisme de l'APP vers la voie amyloïdogène *via* l'inhibition de cette voie Akt/PKB et/ou *via* la diminution de la sensibilité des neurones aux facteurs de croissance et de survie.

De ce fait, l'activation de la cPLA₂ par les oligomères solubles de peptide Aβ (ou par un autre effecteur, pro inflammatoire ou autre), pourrait augmenter la production de peptide Aβ (et donc d'oligomères solubles), lesquels exerceraient à leur tour des effets délétères sur les neurones et les synapses environnantes, ainsi qu'une activation supplémentaire de la cPLA₂. On se trouverait donc en présence d'un phénomène pathologique auto entretenu, reposant en grande partie sur l'activation de la voie cPLA₂ / AA par les oligomères Aβ.

Cette voie cPLA₂ / AA apparaît donc comme une cible thérapeutique de premier choix pour la prise en charge de la MA, dès les stades les plus précoces.

Enfin, il semblait nécessaire de démontrer si la résistance des neurones cPLA₂^{-/-} à l'apoptose induite par les oligomères Aβ résultait bien d'une diminution de l'APP, ou bien si cette dernière observation ne constituait qu'un épiphénomène, sans lien avec la résistance des cellules. Nous avons utilisé un système de cellules de rein embryonnaire humain (cellules HEK) qui n'expriment pas la protéine APP et sont résistantes aux effets toxiques du peptide

A β , du moins aux concentrations habituellement utilisées. Afin de démontrer l'implication de l'APP dans la médiation de la toxicité du peptide A β , des cellules HEK transfectées avec le gène de l'APP humain (HEK-hAPP) ont été exposées aux oligomères A β . Les cellules HEK-APP présentent une mortalité importante après traitement par le peptide A β , ce qui souligne que l'apoptose qui en résulte implique l'expression de la protéine APP.

D'autres travaux seront nécessaires pour préciser comment l'inactivation de l'enzyme modifie le métabolisme de la protéine APP.

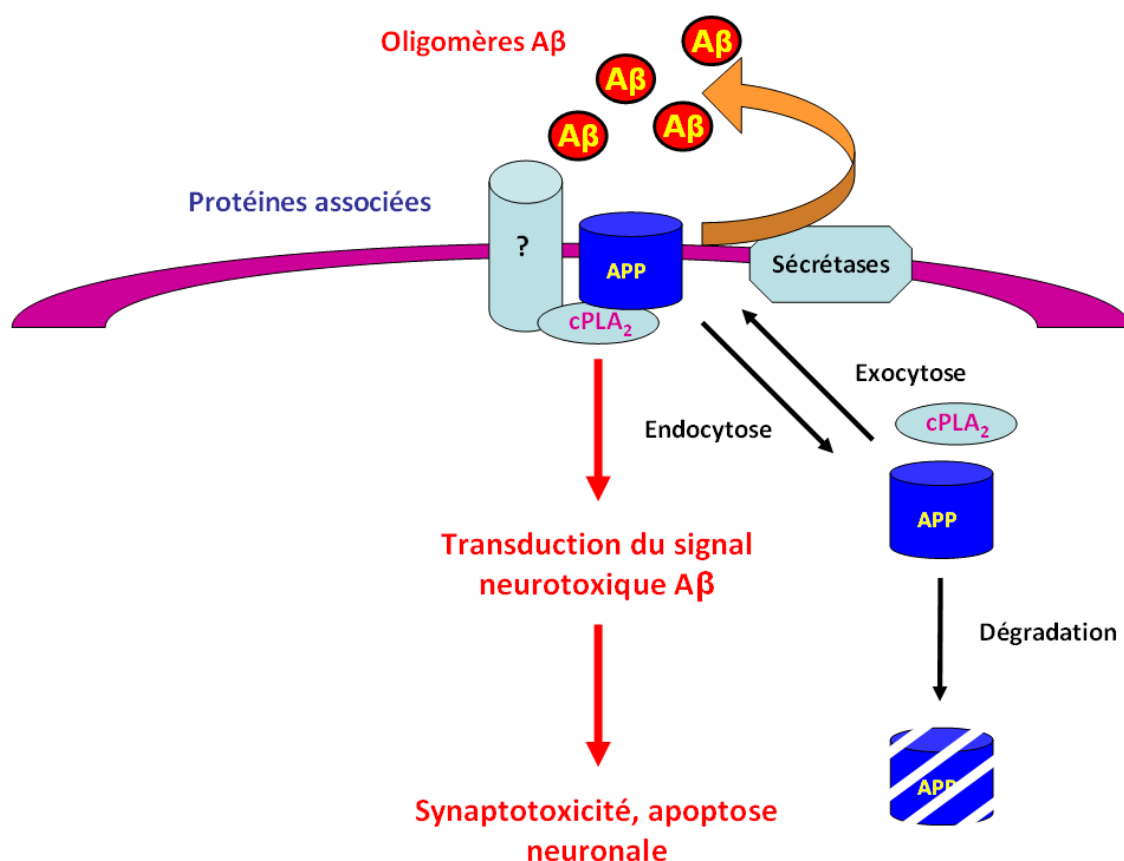


Figure 89 : Implication de la protéine APP et de la cPLA₂ dans la médiation des effets délétères des oligomères solubles de peptide A β

La protéine APP constitue la source de peptide A β , mais peut également constituer un des récepteurs impliqués dans la médiation de leurs effets synaptotoxiques et neurotoxiques. La cPLA₂ et la voie de l'AA sont impliquées dans la signalisation pro apoptotique en aval de ce récepteur. Elles sont également impliquées dans la modulation du métabolisme de la protéine APP et conditionnent ainsi son exposition au niveau de la membrane cellulaire, sa protéolyse en peptide A β par les β - et γ -sécrétases et sa dégradation dans les lysosomes. L'activation de la cPLA₂ par les oligomères solubles de peptide A β pourrait donc majorer son exposition à la membrane cellulaire et dévier son métabolisme vers la voie amyloïdogène. Le phénomène délétère pourrait ainsi s'auto entretenir et conduire à l'apoptose du neurone. A l'inverse, la protection conférée par l'inactivation constitutive de la cPLA₂ résulterait non seulement d'une moindre médiation du signal proapoptotique par la cascade de l'AA, mais également par une expression réduite d'un des récepteurs potentiels aux oligomères solubles de peptide A β .

III – 4 Participation des phénomènes d’excitotoxicité à la protection contre les effets délétères du peptide A β soluble

Les phénomènes d’excitotoxicité constituent un autre effecteur de la toxicité des oligomères solubles de peptide A β . En effet, le peptide A β soluble peut majorer le niveau d'activité des neurones, jusqu'à atteindre des seuils pathologiques, pouvant entraîner de multiples dommages cellulaires [Blanchard, 2002] [Snyder, 2005]. Ces phénomènes excitotoxiques impliquent l’activation excessive des récepteurs aux glutamates, lesquels provoquent une entrée massive de Ca²⁺ dans le neurone et une activation excessive de la cellule. Les propriétés excitotoxiques de l’AA ont été décrites depuis plusieurs décennies [Phillis, 2004] [Sanchez-Mejia, 2008]. En effet, l’administration ICV d’AA à un rat est suffisante pour déclencher une crise convulsive. Comme nous l’avons vu précédemment, l’exposition de neurones au peptide A β soluble conduit à l'activation de la cPLA₂, et à la libération conséquente d'AA à partir des PL membranaires. Ainsi, la production d'AA peut conduire à la dégénérescence et à la perte neuronale par l’initiation de phénomènes excitotoxiques délétères [Blanchard, 2002] [Sanchez-Mejia, 2008] (Figure 90). A l’inverse, la souris cPLA₂^{-/-} résiste aux lésions provoquées par l’administration de kaïnate, un agent excitotoxique.

Dans leur étude, Sanchez-Mejia et coll. ont montré que l’incubation de neurones en présence de peptide A β oligomérique provoque une augmentation intense et transitoire de l’expression des récepteurs au glutamate de type AMPA à la surface de ces cellules [Sanchez-Mejia, 2008]. Fait très intéressant, l’incubation des neurones en présence d’AA produit des effets similaires. Ces deux observations peuvent expliquer, tout du moins en partie, l’implication de phénomènes d'excitotoxicité, impliquant les récepteurs AMPAR dans les effets neurotoxiques et neurodégénératifs des oligomères solubles de peptide A β (Figure 89) [Brorson, 1995] [Snyder, 2005].

Dans notre modèle d’administration ICV d’oligomères solubles de peptide A β , nous avons principalement remarqué une diminution des protéines synaptiques telles que le PSD95, la synaptophysine et la synaptotagmine. Ce comportement « paradoxal » par rapport à l’étude de Sanchez-Mejia et coll. peut s’expliquer entre autres, par la nature des protéines considérées et un adressage différent en réponse à l’activation de la cPLA₂. Par ailleurs, nous utilisons un modèle de MA très différent de cette équipe, puisque nous administrons de manière ponctuelle une faible quantité d’oligomères solubles, alors que Sanchez-Mejia et

coll. se basent sur une souris transgénique caractérisée par une surproduction de peptide A β . Les conséquences cellulaires de ces stress peuvent ainsi être radicalement différentes.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation de la cPLA₂ peut fortement modifier le trafic de vésicules lipidiques et l'adressage de multiples protéines aux membranes cellulaires [Choukroun, 2000] [Regan-Klapisz, 2009]. Cette augmentation transitoire de l'expression des récepteurs AMPAR à la surface des neurones pourrait donc résulter d'une perturbation des trafics intracellulaires, liée à la production d'AA libre et/ou à la modification de la composition lipidique des membranes et organelles, par l'activation de la cPLA₂ en réponse aux oligomères A β .

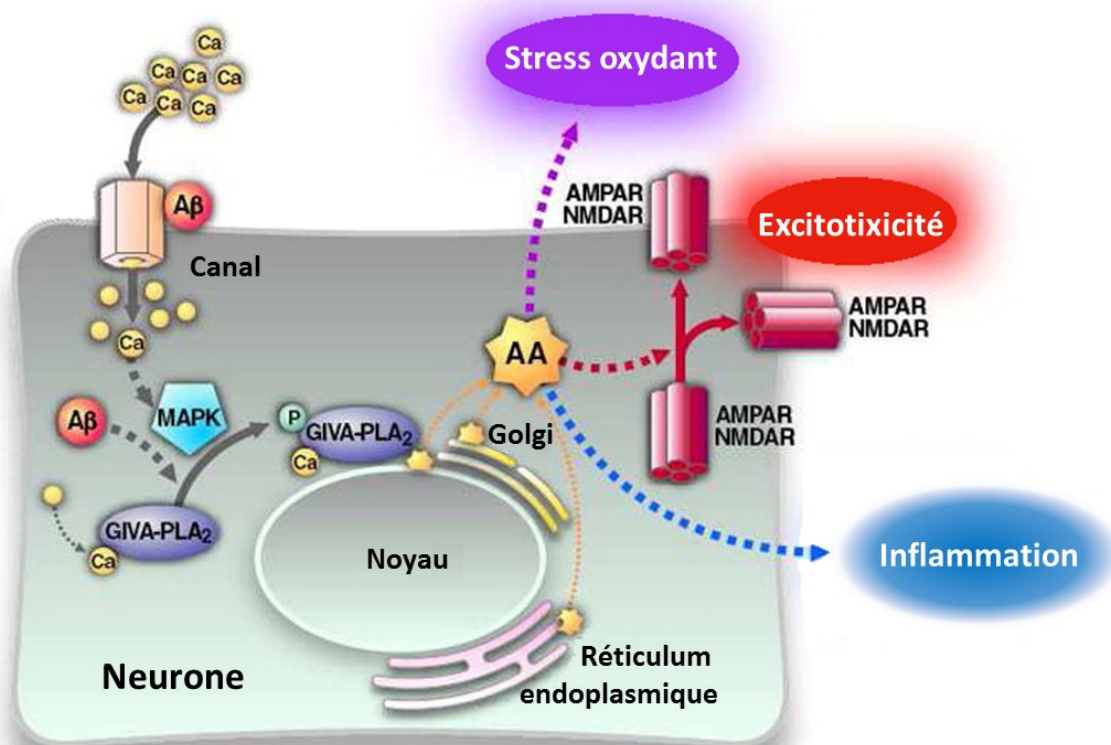


Figure 90 : Implication de la cPLA₂ dans les phénomènes d'excitotoxicité [Sanchez-Mejia, 2010]

L'activation de la cPLA₂, résultant de l'afflux de Ca²⁺ intracellulaire et de l'activation des MAPK entraîne une libération d'AA à partir des PL membranaires. L'AA ainsi libéré augmente l'excitabilité neuronale, en particulier par l'exposition de récepteurs au glutamate de type NMDA et AMPA à la surface du neurone. L'activation de ces derniers par le glutamate majore encore l'influx calcique et l'activation de la cellule, créant un cercle vicieux aboutissant à la mort neuronale. De plus, l'AA et ses métabolites participent à d'autres phénomènes pathologiques, comme le stress oxydatif ou la dysfonction cérébro vasculaire.

De plus, ces phénomènes d'excitotoxicité, résultant de l'activation des récepteurs NMDAR, peuvent entraîner l'afflux de Ca^{2+} au niveau du cytoplasme et la dépolarisation de la membrane du neurone. Une augmentation des concentrations en Ca^{2+} intracellulaires active en retour la cPLA₂, et conduit ainsi à la libération d'AA. On arriverait ainsi à un phénomène d'activation en boucle de la cPLA₂ et de la voie de l'AA, se majorant spontanément jusqu'à atteindre des niveaux toxiques pour la cellule.

Enfin, l'AA et ses métabolites d'aval sont diffusibles et peuvent ainsi perturber le fonctionnement des neurones environnants. Cette perturbation des cellules de voisinage pourrait expliquer les phénomènes d'activité épileptiforme observés à la fois chez des souris modèles hAPP ainsi que chez les patients MA [[Palop, 2006](#)] [[Palop, 2007](#)]. Les oligomères solubles de peptide A β pourraient ainsi non seulement compromettre la fonctionnalité et la survie de neurones sur lesquels ils se fixent, mais également celles de neurones environnants, non directement exposés à ces derniers.

Il serait intéressant d'étudier le comportement des récepteurs au glutamate dans notre modèle d'injection ICV, tant chez les souris cPLA₂^{+/+} que cPLA₂^{-/-}. Celui-ci pourrait reproduire l'exposition des neurones en culture au peptide A β . On pourrait donc s'attendre à une moindre exposition des récepteurs AMPA au niveau des animaux cPLA₂^{-/-}, liée à une production endogène restreinte d'AA.

Dans cette conception physiopathologique, l'inhibition de la cPLA₂ apparaît comme une approche thérapeutique importante pour limiter ces phénomènes d'excitotoxicité au cours de la MA.

IV – Perspectives

IV – 1 La résistance des souris $cPLA_2^{-/-}$ aux oligomères de peptide $A\beta$, un effet direct de l'inhibition de la $cPLA_2$ ou un phénomène adaptatif ?

On peut se demander pourquoi l'inhibition pharmacologique de la $cPLA_2$ ou l'extinction de son expression ne procurent qu'une protection partielle contre la toxicité du peptide $A\beta$ soluble, alors que la délétion constitutive du gène confère une protection totale, tant *in vitro* qu'*in vivo*.

Il semble que les inhibiteurs pharmacologiques et les ASO ne produisent qu'une réduction partielle de l'activité $cPLA_2$. Cette supposition est confirmée par nos observations comportementales réalisées chez les souris $cPLA_2^{+/-}$. Ces dernières, qui ne possèdent qu'un seul allèle du gène de la $cPLA_2$ et donc n'expriment que 50% de la protéine, présentent des fonctions mnésiques et d'apprentissage partiellement altérées après injection ICV de peptide $A\beta$ oligomérique. Il semble donc exister un lien entre la quantité de $cPLA_2$ exprimée au sein des neurones et leur sensibilité au peptide $A\beta$ soluble.

On peut aussi supposer que la protection complète vis-à-vis des oligomères $A\beta$ implique un phénotype adaptatif, que seule une inactivation constitutive de la $cPLA_2$ peut procurer. Ce phénotype adaptatif pourrait expliquer la différence de niveau de protection entre une inhibition ponctuelle de la $cPLA_2$ (inhibiteurs pharmacologiques ou ASO) et une inhibition constitutive (souris $cPLA_2^{-/-}$).

Plusieurs éléments plaident en faveur d'un phénotype adaptatif au niveau des souris $cPLA_2^{-/-}$. Tout d'abord, la $cPLA_2$ est impliquée dans de nombreux processus de mémorisation et de plasticité cérébrale, en particulier la potentialisation à long terme, qui constitue une base des phénomènes de mémorisation. De ce fait, l'inactivation du gène de la $cPLA_2$ devrait provoquer des troubles profonds de la mémoire et de l'apprentissage chez les souris $cPLA_2^{-/-}$. Or nos travaux et ceux des équipes qui se sont intéressées au SNC de ces animaux ont trouvé des performances tout à fait comparables aux animaux $cPLA_2^{+/+}$ dans divers tests comportementaux [[Sanchez-Mejia, 2008](#)].

De la même manière, les souris $cPLA_2^{-/-}$ ne présentent que de subtiles altérations dans le métabolisme de l'AA au niveau de leur SNC, lesquelles ne peuvent être mises en évidence

qu'en étudiant l'incorporation des AG dans les différentes sous-classes de PL, ainsi que la cinétique de cette incorporation [[Rosenberger, 2003](#)].

Il semble donc que d'autres enzymes remplacent plus ou moins totalement l'action déficiente de la cPLA₂, tout au moins dans le SNC. A ce sujet, il serait intéressant d'étudier l'expression et l'activité des autres isoformes de la cPLA₂ (cPLA₂β et cPLA₂γ) dans le SNC des souris cPLA₂α^{-/-}. Cette compensation permet également aux neurones de développer une résistance contre la toxicité du peptide Aβ oligomérique.

Une étude comparative de structures cérébrales, en particulier l'hippocampe, issues de souris cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+} (et éventuellement cPLA₂^{+/-}), devrait permettre de déterminer des cibles potentielles pour la résistance des neurones. Cette étude pourrait reposer sur l'utilisation de techniques protéomiques, comme l'électrophorèse 2D, pour la mise en évidence de protéines dont le niveau varie spécifiquement selon le génotype, suivie d'une identification des cibles par spectrométrie de masse [[Sizova, 2007](#)].

Trois moyens peuvent être utilisés pour faire la part d'un phénotype adaptatif éventuel dans la résistance au stress Aβ conférée par la délétion de la cPLA₂. Ces approches visent soit à reproduire une inactivation ponctuelle de la cPLA₂ dans un animal modèle sauvage, soit à transposer les expériences *in vitro* de notre groupe [[Kriem, 2005](#)] à un modèle *in vivo*. Cette inhibition peut faire appel à :

- L'utilisation d'un KO inducible de la cPLA₂. Cette approche permettrait de moduler l'expression de la cPLA₂ chez la souris, et d'inhiber son expression de manière progressive, et ponctuelle. On pourrait ainsi apprécier l'influence du niveau d'expression de l'enzyme et de la durée de son inhibition sur la protection conférée aux neurones. A notre connaissance, il n'existe pas de tel modèle transgénique cPLA₂ inducible dans la littérature.
- L'administration d'inhibiteurs pharmacologiques de la cPLA₂ à une souris de génotype sauvage. Cette approche reproduirait *in vivo* les expériences passées de notre groupe sur des cultures primaires de neurones corticaux. Elle nous permettrait de valider le pouvoir protecteur des inhibiteurs de cPLA₂ contre la toxicité des oligomères solubles Aβ dans notre modèle d'injection ICV. Différents inhibiteurs de la cPLA₂ ont été testés chez l'animal, mais pas dans des modèles de MA (cf. ci-dessous : [Partie IV-2](#)).
- L'utilisation d'ASO ou d'ARNi sur un animal de génotype sauvage. Cette approche présente une haute spécificité vis-à-vis de la cPLA₂ et permettrait d'écarter l'inhibition d'autres enzymes. Cette technique s'avère très difficilement transposable au patient,

et se heurte à la difficulté pour les oligonucléotides à traverser la BHE. L'efficacité des oligonucléotides peut être majorée par leur couplage à différents peptides porteurs, favorisant leur intégration dans la cellule, tels que la pénétratine [[Bendifallah, 2006](#)]. Par ailleurs, cette approche a été utilisée par diverses équipes pour moduler l'expression de diverses protéines au niveau du SNC (cerveau ou moelle épinière) [[Yoshimura, 2001](#)]. Nous avons donc tenté un essai en implantant des canules intra ventriculaires à demeure chez les souris, afin de procéder à l'administration régulière d'ASO dirigés contre la cPLA₂ pendant 4 jours. Toutefois, cette approche n'a donné aucun résultat significatif sur l'expression de la cPLA₂ au niveau de l'hippocampe des souris ([Figure 91](#)). D'autres travaux s'avèrent donc nécessaires pour déterminer les conditions expérimentales nécessaires à une inhibition correcte de la cPLA₂. Cette dernière approche peut également bénéficier d'une amélioration du mode de délivrance des ASO à travers la BHE. En effet, l'administration par voie systémique d'ASO, couplés ou non à une protéine endogène, comme la ferritine, ou à des protéines virales, peut permettre leur délivrance au niveau des neurones et la modulation efficace de l'expression de la protéine cible [[Erickson, 2012](#)].

IV – 2 La cPLA₂ et la voie de l'acide arachidonique comme cibles thérapeutiques pour la prévention et/ou le traitement de la maladie d'Alzheimer

Jusqu'à présent, la MA demeure une maladie incurable, dont l'issue demeure systématiquement fatale, qui engendre un état de dépendance croissant du patient. Il apparaît donc capital de trouver une approche préventive et/ou curative pour cette maladie dont la prévalence ne cesse et ne cessera de croître, en raison du vieillissement de la population, dans les pays industrialisés.

La cPLA₂ apparaît comme une nouvelle cible thérapeutique intéressante autant pour la prévention que pour le traitement de la MA.

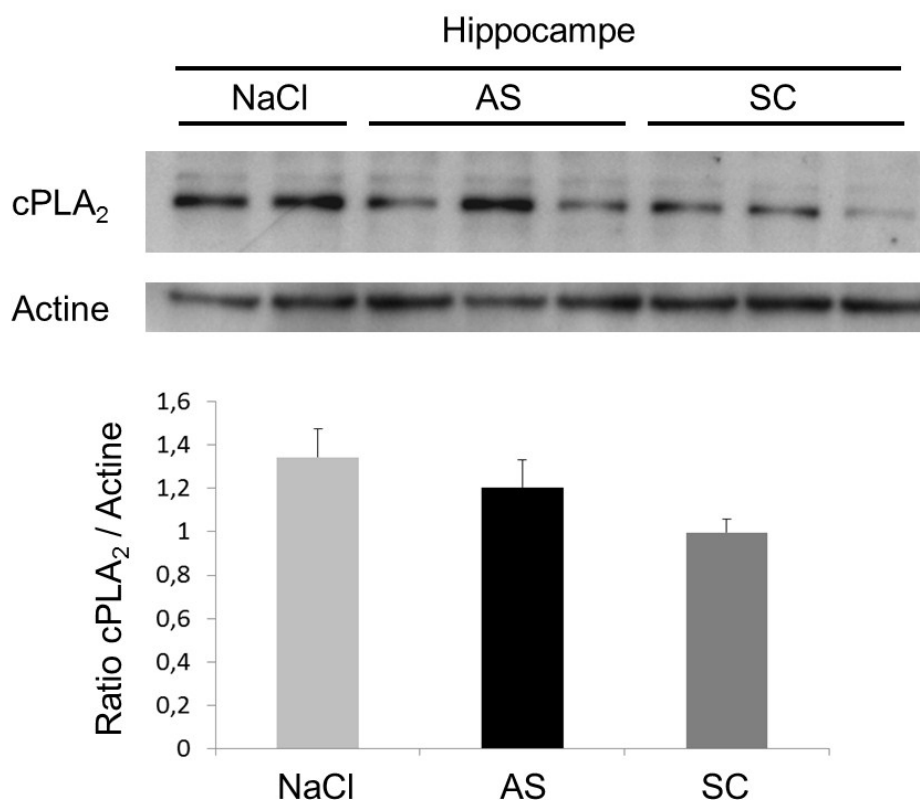


Figure 91 : Modulation *in vivo* de l'expression de la cPLA₂ au niveau de l'hippocampe, par des injections intra cérébro ventriculaires répétées d'oligonucléotides antisens couplés à la pénétratine (Données non publiées)

Des souris Balb/c cPLA₂^{+/+} mâles âgées de 10 semaines ont été implantées avec des canules intraventriculaires à demeure, permettant des injectoins ICV répétées. La pose de ces canules a été réalisée selon les mêmes modalités que les injections stéréotaxiques. Les coordonnées d'injection pour la pose d'une canule sont 0,22 mm en antérieur, +/- 0,9 mm en latéralité et 1,6 mm en profondeur (par rapport au bregma). La canule est implantée dans le ventricule latéral, à l'aide du système stéréotaxique, et est fixée à l'aide de ciment dentaire (Palavit G, Heraeus). Un mandrin est placé dans la canule, jusqu'à utilisation de celle-ci.

À l'issue de la chirurgie, les animaux sont laissés en convalescence pendant 10 jours, pendant lesquels ils subissent une procédure d'habituation à l'expérimentateur.

Les souris ont alors subi une série d'injections ICV d'oligonucléotides antisens (AS) et sens (SC), couplés à la pénétratine, pendant 4 j consécutifs. Chaque injection consistait en 0,32 nmol d'oligonucléotides, couplés à une quantité égale de pénétratine, dans un volume de 2,5 µL de sérum physiologique (NaCl 0,9%).

Le lendemain de la dernière injection, les animaux ont été sacrifiés, leur cerveau prélevé et disséqué et des homogénats ont été préparés à partir des différentes structures. L'expression de la cPLA₂ et de l'actine ont été évaluées par immunoblot (protocole comparable à l'étude de l'expression *in vivo* de la protéine APP) (haut). Une analyse densitométrique des gels a permis une quantification de l'abondance des protéines. Les données sont exprimées comme la moyenne +/- SEM du ratio cPLA₂ / actine, obtenu avec 2 immunoblots indépendants (n=12).

On ne note aucune diminution de l'expression de la cPLA₂ entre les animaux témoins injectés avec du NaCl et ceux traités avec les AS. Toutefois, les animaux ayant reçu les SC présentent une réduction du contenu en cPLA₂ dans l'hippocampe par rapport aux animaux traités avec le NaCl (p<0,05) et ceux traités avec les AS. On peut toutefois conclure que le traitement par les ASO ne réduit pas l'expression de la cPLA₂ dans l'hippocampe.

Un autre protocole d'inhibition basé sur des doses croissantes d'ASO couplés à la pénétratine (0,13, 0,32 et 1,3 nmol / injection pendant 4 j consécutifs) n'a pas non plus montré de réduction de l'expression de la cPLA₂ dans l'hippocampe (résultat non présenté).

Nous avons passé en revue dans la partie bibliographique les différents inhibiteurs pharmacologiques disponibles pour inhiber la cPLA₂. Les premières molécules développées ne sont cependant pas utilisables chez les patients, en raison d'une faible efficacité, caractérisée par des IC50 élevés (0,5 µM pour le MAFP et 1,5 µM pour l'AACOCF3), ainsi que par une faible spécificité. Ces deux caractéristiques constituent le gage d'effets secondaires très importants et d'une efficacité limitée.

Toutefois, de nouveaux inhibiteurs ont été développés, avec des IC50 et une spécificité vis-à-vis de la cPLA₂ tout à fait compatibles avec une administration chez le patient. C'est notamment le cas de fingolimod (FTY720), qui est actuellement en essai clinique de phase 2 pour la sclérose en plaque [[Kappos, 2006](#)].

D'autres molécules sont également en cours de tests sur différents modèles de pathologies inflammatoires et auto immunes, où ils démontrent une certaine efficacité : On peut ainsi citer l'exemple du pyrroxyphène et de l'Efipladib sur des modèles d'arthrite auto immune [[McKew, 2008](#)] [[Tai, 2010](#)] ou encore du WAY-196025 dans l'encéphalomyélite auto immune [[Marusic, 2008](#)].

Toutefois, l'utilisation de ces molécules sur des pathologies à forte composante inflammatoire et leur efficacité sur des modèles animaux et/ou dans des essais cliniques ne préjugent pas forcément d'une efficacité assurée dans la prévention et/ou le traitement de la MA. En effet, dans ces pathologies, la réaction inflammatoire joue un rôle prépondérant et la cPLA₂ y occupe une place importante, en produisant de l'AA, lui-même converti en médiateurs pro inflammatoires (PG, LT). Ces médiateurs assurent la genèse des lésions par divers mécanismes : recrutement de cellules inflammatoires, induction de stress oxydant, libération de métalloprotéinases, phénomènes vasculaires... L'inhibition de la cPLA₂ dans de telles pathologies apparaît naturellement bénéfique en réduisant la production d'AA délétère.

L'application de différentes conditions inflammatoires à la souris cPLA₂^{-/-}, dans le SNC ou d'autres organes, a permis de montrer la grande résistance de cette souris dans ces différents modèles pathologiques. Cette résistance a été attribuée à une moindre production de médiateurs pro inflammatoires [[Hegen, 2003](#)] [[Marusic, 2005](#)] [[Munoz, 2007](#)]. Or, comme nous l'avons vu, la MA n'implique des phénomènes neuro inflammatoires qu'à un niveau minoritaire, en particulier dans les stades initiaux. D'ailleurs, notre modèle animal, qui reproduit des phases très précoces de la pathologie, n'a montré aucune réaction inflammatoire, du moins avec les différents paramètres étudiés.

La protection conférée par l'inactivation constitutive de la cPLA₂ implique donc d'autres phénomènes, probablement une modification de l'adressage des protéines et du trafic des vésicules lipidiques au sein des neurones, ces derniers étant totalement indépendants de l'inflammation. De ce fait, il est difficile de prévoir la capacité des inhibiteurs de cPLA₂, actuellement disponibles, à reproduire les effets d'une délétion du gène de la cPLA₂, suffisants pour induire ces modifications neuronales et synaptiques chez l'humain.

De plus, le risque d'effets secondaires résultant d'une inhibition complète de la cPLA₂, comparable à celle observée chez la souris cPLA₂^{-/-}, n'est pas totalement exclue. Il a en effet été rapporté de rares cas de mutations inactivatrices du gène de la cPLA₂, conduisant à des troubles importants de l'hémostase, ainsi qu'à des lésions ulcéraives du tube digestif [[Adler, 2008](#)] [[Adler, 2009](#)]. Le passage d'un modèle murin *KO* au patient peut donc s'avérer délicat.

A côté des inhibiteurs pharmacologiques, il existe d'autres moyens de réduire l'activité de la cPLA₂ chez l'humain. Les médicaments thymorégulateurs tels que le Li⁺ ou la CBZ peuvent notamment réduire l'expression de la cPLA₂ et modifier le *turn over* de l'AA au niveau du SNC, cette propriété étant à la base de leur utilisation dans les troubles bipolaires [[Rao, 2009](#)]. Ces médicaments, administrés au long cours pour régulariser la thymie des patients maniaque dépressifs, pourraient également être utilisés pour la prise en charge de la MA, si bien sûr leur effet inhibiteur s'avère suffisant pour garantir une protection efficace des neurones contre les effets toxiques du peptide Aβ oligomérique.

Enfin, la supplémentation en AGPI Ω-6 tels que le DHA dans l'alimentation permet de réduire l'expression de la cPLA₂ dans l'hippocampe de rats au bout de 15 semaines [[Rapoport, 2008](#)]. L'efficacité d'une telle approche sur la vulnérabilité des neurones au stress amyloïde a pu être suggérée par diverses études tant épidémiologiques qu'expérimentales [[Florent-Bechard, 2009](#)].

Il existe donc de multiples réserves quant à la transposition d'un modèle animal *KO* à une application thérapeutique chez un patient humain. Cependant, quelle que soit l'approche envisagée, la cPLA₂ constitue une cible thérapeutique extrêmement prometteuse pour la prévention et/ou le traitement de la MA.

Les principaux axes de recherche pour son utilisation en pratique clinique devront donc s'articuler autour (i) d'une meilleure connaissance des mécanismes par lesquels son inhibition conduit à la protection des neurones, en particulier *via* l'expression de la protéine APP, (ii) du développement et (iii) de la validation de molécules inhibitrices de la cPLA₂, ou reproduisant ses effets protecteurs sur les cibles neuronales précédemment identifiées.

Ainsi, la cPLA₂ peut constituer une cible de choix pour le *screening* de nouvelles molécules neuroprotectrices.

CONCLUSION

La MA se traduit cliniquement par d'importants déficits dans les fonctions d'apprentissage et de mémorisation. Ces atteintes du SNC, initialement localisées au niveau de l'hippocampe, résultent d'altérations dans la fonctionnalité, puis dans l'intégrité des synapses. Cette atteinte synaptique constitue un évènement très précoce de la maladie et précède la mort neuronale. Un nombre croissant d'études, tant cliniques qu'expérimentales, ont souligné la toxicité synaptique des oligomères solubles de peptide A β . La médiation des effets délétères du peptide A β constitue une cible potentielle, tant pour la prévention que pour le traitement de la MA. De plus, il apparaît de plus en plus évident que cette pathologie est associée à un déséquilibre du métabolisme des lipides.

Dans cette optique, notre groupe a initialement mis en évidence l'implication de la voie de l'AA dans la toxicité neuronale *in vitro* du peptide A β et, plus particulièrement, de l'enzyme initiant cette cascade de signalisation, la cPLA₂. En effet, l'exposition des neurones aux oligomères solubles conduit à l'activation de l'enzyme, et des voies en aval. A l'inverse, son inhibition protège partiellement ces cellules contre l'apoptose induite par le peptide A β .

En partant de ces résultats préliminaires, nous avons voulu démontrer ici l'implication de la cPLA₂ dans l'apoptose neuronale et la synaptotoxicité induite par le peptide A β , tant *in vitro* qu'*in vivo*. Nos travaux ont ainsi montré que des neurones dépourvus de cPLA₂ présentent une résistance totale contre l'apoptose induite par l'exposition au peptide A β , avec protection des voies de survie. Cette résistance à l'apoptose s'accompagne d'une absence d'activation des voies de signalisation en aval de la cPLA₂, en particulier la voie des SMases.

Cette résistance a été ensuite confirmée chez l'animal entier, en utilisant cette même lignée cPLA₂^{-/-} dans un modèle d'injection ICV de faibles quantités de peptide A β , mimant les stades précoces de la MA. Les souris cPLA₂^{-/-} présentent une protection de la mémoire à court et long terme, ainsi que des capacités d'apprentissage inaltérées après exposition au peptide A β , contrairement aux souris cPLA₂^{+/+}. Cette résistance sur le plan comportemental est sous-tendue par une intégrité des marqueurs synaptiques au niveau de l'hippocampe.

Par ailleurs, ces investigations *in vivo* ont montré que l'injection ICV de peptide A β chez des souris cPLA₂^{+/+} s'accompagne d'une majoration de la phosphorylation de la cPLA₂, témoignant de son activation.

Ainsi, nos travaux démontrent le rôle crucial de la cPLA₂ et de la voie de l'AA dans la toxicité synaptique, la neurodégénérescence et les troubles mnésiques, aux stades précoces de la MA.

Par la suite, nous avons cherché à étudier les mécanismes par lesquels la suppression de l'expression du gène de la cPLA₂ protège les synapses et les neurones contre la toxicité des oligomères Aβ. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une diminution de l'expression de la protéine précurseur du peptide Aβ (protéine APP) chez les souris cPLA₂^{-/-}. Cette dernière pourrait être impliquée dans la médiation des effets délétères des oligomères de peptide Aβ, en plus d'en être la source de production.

Le lien entre l'inactivation de la cPLA₂ et la modification du métabolisme de la protéine APP requiert à l'heure actuelle des investigations complémentaires. Cependant, les animaux cPLA₂^{-/-} présentent une expression du gène de l'APP similaire à celle des animaux cPLA₂^{+/+}. De discrètes modifications dans la composition en phospholipides des membranes neuronales pourraient donc influencer le processing de la protéine et sa dégradation.

Il apparaît donc important de poursuivre nos investigations, selon deux axes de recherche :

- Sur le plan fondamental, il est nécessaire d'approfondir les mécanismes par lesquels l'inactivation de la cPLA₂ influence le processing de la protéine APP. Dans cette optique, des études sur des neurones en culture et sur animaux entiers permettraient d'évaluer l'influence du métabolisme des PL sur la localisation et l'activité des différents acteurs impliqués. Ces études pourraient utiliser autant la comparaison d'animaux cPLA₂^{-/-} et cPLA₂^{+/+}, que l'administration d'inhibiteurs de la cPLA₂ à des animaux *wild type*. Le développement d'un système de *KO* conditionnel pourrait s'avérer également intéressant. Par la suite, le lien entre l'expression de la protéine APP et la sensibilité à la toxicité du peptide Aβ pourrait être approfondi. D'autres moyens de modulation de l'expression de la protéine APP et des effecteurs de son métabolisme (ASO, inhibiteurs pharmacologiques) pourraient être testés pour confirmer son implication.
- Sur un plan plus clinique, l'inhibition *in vivo* de la cPLA₂ comme moyen d'approches préventive et/ou curative de la MA devra être validé. Différents moyens de modulation pourront être envisagés. Cette inhibition peut s'appuyer sur des agents modulant l'expression de la cPLA₂, comme le Li⁺ ou la CBZ, ou sur des inhibiteurs pharmacologiques, comme ceux utilisés *in vitro* dans notre étude. L'emploi de tels

agents en pratique courante pourrait cependant être limité par l'apparition d'effets secondaires, qu'il conviendra d'identifier dès le stade pré clinique.

Quoi qu'il en soit, nos résultats permettent de considérer la cPLA₂ comme une cible thérapeutique potentielle pour les traitements préventifs et/ou curatifs de la MA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, E., F. Casamenti, et al. (1994). "Administration of amyloid beta-peptides into the medial septum of rats decreases acetylcholine release from hippocampus in vivo." *Brain Res* 636(1): 162-4.
- Abraham, I., T. Harkany, et al. (2000). "Chronic corticosterone administration dose-dependently modulates Abeta(1-42)- and NMDA-induced neurodegeneration in rat magnocellular nucleus basalis." *J Neuroendocrinol* 12(6): 486-94.
- Abu-Hamdah, R., W. J. Cho, et al. (2004). "Regulation of the water channel aquaporin-1: isolation and reconstitution of the regulatory complex." *Cell Biol Int* 28(1): 7-17.
- Ackermann, E. J., E. S. Kempner, et al. (1994). "Ca(2+)-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization." *J Biol Chem* 269(12): 9227-33.
- Adam-Klages, S., R. Schwandner, et al. (1998). "Caspase-mediated inhibition of human cytosolic phospholipase A2 during apoptosis." *J Immunol* 161(10): 5687-94.
- Adibhatla, R. M. and J. F. Hatcher (2003). "Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia." *J Neurosci Res* 73(3): 308-15.
- Adibhatla, R. M., J. F. Hatcher, et al. (2002). "Citicoline: neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia." *J Neurochem* 80(1): 12-23.
- Adler, D. H., J. D. Cogan, et al. (2008). "Inherited human cPLA(2alpha) deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction." *J Clin Invest* 118(6): 2121-31.
- Adler, D. H., J. A. Phillips, 3rd, et al. (2009). "The enteropathy of prostaglandin deficiency." *J Gastroenterol* 44 Suppl 19: 1-7.
- Ahn, J., M. Um, et al. (2006). "Protective effects of Glycyrrhiza uralensis Fisch. on the cognitive deficits caused by beta-amyloid peptide 25-35 in young mice." *Biogerontology* 7(4): 239-47.
- Ahn, K., M. K. McKinney, et al. (2008). "Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system." *Chem Rev* 108(5): 1687-707.
- Ahn, K., C. C. Shelton, et al. (2010). "Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(50): 21435-40.
- Aitdafoun, M., C. Mounier, et al. (1996). "4-Alkoxybenzamidines as new potent phospholipase A2 inhibitors." *Biochem Pharmacol* 51(6): 737-42.
- Alessenko, A. V., A. E. Bugrova, et al. (2004). "Connection of lipid peroxide oxidation with the sphingomyelin pathway in the development of Alzheimer's disease." *Biochem Soc Trans* 32(Pt 1): 144-6.
- Alexandrov, P., J. G. Cui, et al. (2005). "24S-hydroxycholesterol induces inflammatory gene expression in primary human neural cells." *Neuroreport* 16(9): 909-13.
- Alexandrov, P. N., J. G. Cui, et al. (2006). "Hypoxia-sensitive domain in the human cytosolic phospholipase A2 promoter." *Neuroreport* 17(3): 303-7.
- Alkam, T., A. Nitta, et al. (2008a). "The extensive nitration of neurofilament light chain in the hippocampus is associated with the cognitive impairment induced by amyloid beta in mice." *J Pharmacol Exp Ther* 327(1): 137-47.
- Alkam, T., A. Nitta, et al. (2007). "A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta(25-35)." *Behav Brain Res* 180(2): 139-45.

Alkam, T., A. Nitta, et al. (2008b). "Restraining tumor necrosis factor-alpha by thalidomide prevents the amyloid beta-induced impairment of recognition memory in mice." *Behav Brain Res* 189(1): 100-6.

Allinson, T. M., E. T. Parkin, et al. (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." *J Neurosci Res* 74(3): 342-52.

Almeida, C. G., R. H. Takahashi, et al. (2006). "Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system." *J Neurosci* 26(16): 4277-88.

Alonso, A. D., I. Grundke-Iqbal, et al. (1997). "Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(1): 298-303.

Alonso Adel, C., B. Li, et al. (2006). "Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23): 8864-9.

Alonso Adel, C., A. Mederlyova, et al. (2004). "Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations." *J Biol Chem* 279(33): 34873-81.

Alonso, F., P. M. Henson, et al. (1986). "A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine." *Biochim Biophys Acta* 878(2): 273-80.

Alvarez-Erviti, L., Y. Seow, et al. (2011). "Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes." *Nat Biotechnol* 29(4): 341-5.

Amaral, F. A., M. T. Lemos, et al. (2010). "Participation of kinin receptors on memory impairment after chronic infusion of human amyloid-beta 1-40 peptide in mice." *Neuropeptides* 44(2): 93-7.

Anderle, P., P. Farmer, et al. (2004). "Nutrigenomic approach to understanding the mechanisms by which dietary long-chain fatty acids induce gene signals and control mechanisms involved in carcinogenesis." *Nutrition* 20(1): 103-8.

Andersen, O. M., J. Reiche, et al. (2005). "Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(38): 13461-6.

Anderson, K. M., A. Roshak, et al. (1997). "Cytosolic 85-kDa phospholipase A2-mediated release of arachidonic acid is critical for proliferation of vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* 272(48): 30504-11.

Anderson, R., J. C. Barnes, et al. (1998). "Behavioural, physiological and morphological analysis of a line of apolipoprotein E knockout mouse." *Neuroscience* 85(1): 93-110.

Andreadis, A., W. M. Brown, et al. (1992). "Structure and novel exons of the human tau gene." *Biochemistry* 31(43): 10626-33.

Anfuso, C. D., G. Assero, et al. (2004). "Amyloid beta(1-42) and its beta(25-35) fragment induce activation and membrane translocation of cytosolic phospholipase A2 in bovine retina capillary pericytes." *Biochim Biophys Acta* 1686(1-2): 125-38.

Aplin, A. E., G. M. Gibb, et al. (1996). "In vitro phosphorylation of the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein by glycogen synthase kinase-3beta." *J Neurochem* 67(2): 699-707.

Arai, K., Y. Ikegaya, et al. (2001). "Phospholipase A2 mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional difference of neuronal vulnerability." *Eur J Neurosci* 13(12): 2319-23.

Arbuckle, T. Y., U. Maag, et al. (1998). "Individual differences in trajectory of intellectual development over 45 years of adulthood." *Psychol Aging* 13(4): 663-75.

Arispe, N. (2004). "Architecture of the Alzheimer's A beta P ion channel pore." *J Membr Biol* 197(1): 33-48.

Arrasate, M., S. Mitra, et al. (2004). "Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death." *Nature* 431(7010): 805-10.

Arriagada, P. V., J. H. Growdon, et al. (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." *Neurology* 42(3 Pt 1): 631-9.

Asai, K., T. Hirabayashi, et al. (2003). "Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2gamma). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress." *J Biol Chem* 278(10): 8809-14.

Atsumi, G., M. Murakami, et al. (2000). "Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release." *J Biol Chem* 275(24): 18248-58.

Atwood, C. S., S. V. Meethal, et al. (2005). "Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis with menopause and andropause promotes neurodegenerative senescence." *J Neuropathol Exp Neurol* 64(2): 93-103.

Balboa, M. A., I. Varela-Nieto, et al. (2002). "Expression and function of phospholipase A(2) in brain." *FEBS Lett* 531(1): 12-7.

Ballatore, C., V. M. Lee, et al. (2007). "Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders." *Nat Rev Neurosci* 8(9): 663-72.

Balsinde, J. (2002a). "Roles of various phospholipases A2 in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling." *Biochem J* 364(Pt 3): 695-702.

Balsinde, J., M. A. Balboa, et al. (2000). "Cellular regulation of cytosolic group IV phospholipase A2 by phosphatidylinositol bisphosphate levels." *J Immunol* 164(10): 5398-402.

Balsinde, J., M. V. Winstead, et al. (2002b). "Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization." *FEBS Lett* 531(1): 2-6.

Banks, W. A., S. M. Robinson, et al. (2003). "Efflux of human and mouse amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 from brain: impairment in a mouse model of Alzheimer's disease." *Neuroscience* 121(2): 487-92.

Barghorn, S., V. Nimmrich, et al. (2005). "Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 95(3): 834-47.

Basselín, M., L. Chang, et al. (2003). "Chronic lithium administration potentiates brain arachidonic acid signaling at rest and during cholinergic activation in awake rats." *J Neurochem* 85(6): 1553-62.

Bate, C., M. Salmona, et al. (2004). "The role of platelet activating factor in prion and amyloid-beta neurotoxicity." *Neuroreport* 15(3): 509-13.

Bate, C. and A. Williams (2007). "Squalestatin protects neurons and reduces the activation of cytoplasmic phospholipase A2 by Abeta(1-42)." *Neuropharmacology* 53(2): 222-31.

Bavencoffe, A., A. Kondratskyi, et al. (2011). "Complex regulation of the TRPM8 cold receptor channel: role of arachidonic acid release following M3 muscarinic receptor stimulation." *J Biol Chem* 286(11): 9849-55.

Beckett, C., N. N. Nalivaeva, et al. (2012). "Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma." *Cell Signal* 24(2): 402-9.

Behr, D., L. Hesse, et al. (1996). "Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I." *J Biol Chem* 271(3): 1613-20.

Bekris, L. M., C. E. Yu, et al. (2010). "Genetics of Alzheimer disease." *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23(4): 213-27.

Bendifallah, N., F. W. Rasmussen, et al. (2006). "Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA)." *Bioconj Chem* 17(3): 750-8.

- Bennett, B. D., S. Babu-Khan, et al. (2000). "Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues." *J Biol Chem* 275(27): 20647-51.
- Berman, D. E., C. Dall'Armi, et al. (2008). "Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism." *Nat Neurosci* 11(5): 547-54.
- Blanchard, B. J., V. L. Thomas, et al. (2002). "Mechanism of membrane depolarization caused by the Alzheimer Abeta1-42 peptide." *Biochem Biophys Res Commun* 293(4): 1197-203.
- Bodendorf, U., S. Danner, et al. (2002). "Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid." *J Neurochem* 80(5): 799-806.
- Boland, K., M. Behrens, et al. (1996). "The serpin-enzyme complex receptor recognizes soluble, nontoxic amyloid-beta peptide but not aggregated, cytotoxic amyloid-beta peptide." *J Biol Chem* 271(30): 18032-44.
- Bondy, C. A. and C. M. Cheng (2004). "Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain." *Eur J Pharmacol* 490(1-3): 25-31.
- Bonventre, J. V., Z. Huang, et al. (1997). "Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2." *Nature* 390(6660): 622-5.
- Boonstra, J. and G. S. van Rossum (2003). "The role of cytosolic phospholipase A2 in cell cycle progression." *Prog Cell Cycle Res* 5: 181-90.
- Borchelt, D. R., G. Thinakaran, et al. (1996). "Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo." *Neuron* 17(5): 1005-13.
- Bordji, K., J. Becerril-Ortega, et al. (2010). "Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-ss production." *J Neurosci* 30(47): 15927-42.
- Borg, J. P., Y. Yang, et al. (1998). "The X11alpha protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Abeta40 and Abeta42 secretion." *J Biol Chem* 273(24): 14761-6.
- Bormann, B. J., W. J. Knowles, et al. (1989). "Synthetic peptides mimic the assembly of transmembrane glycoproteins." *J Biol Chem* 264(7): 4033-7.
- Bosetti, F. and G. R. Weerasinghe (2003). "The expression of brain cyclooxygenase-2 is down-regulated in the cytosolic phospholipase A2 knockout mouse." *J Neurochem* 87(6): 1471-7.
- Bosetti F (2007). "Arachidonic acid metabolism in brain physiology and pathology: lessons from genetically altered mouse models." *J Neurochem* 102(3): 577-586.
- Boyd-Kimball, D., R. Sultana, et al. (2005). "Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid beta-peptide (1-42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease." *Neuroscience* 132(2): 313-24.
- Braak, H., R. A. de Vos, et al. (1998). "Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Prog Brain Res* 117: 267-85.
- Brandt, R., M. Hundelt, et al. (2005). "Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models." *Biochim Biophys Acta* 1739(2-3): 331-54.
- Bredesen, D. E. (2009). "Neurodegeneration in Alzheimer's disease: caspases and synaptic element interdependence." *Mol Neurodegener* 4: 27.
- Brorson, J. R., V. P. Bindokas, et al. (1995). "The Ca²⁺ influx induced by beta-amyloid peptide 25-35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation." *J Neurobiol* 26(3): 325-38.
- Brown, G. G., S. R. Levine, et al. (1989). "In vivo 31P NMR profiles of Alzheimer's disease and multiple subcortical infarct dementia." *Neurology* 39(11): 1423-7.

- Brown, W. J., K. Chambers, et al. (2003). "Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function." *Traffic* 4(4): 214-21.
- Brownlee, J., N. G. Irving, et al. (1997). "Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3 β transgenes." *Neuroreport* 8(15): 3251-5.
- Burke, J. E. and E. A. Dennis (2009). "Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling." *J Lipid Res* 50 Suppl: S237-42.
- Burnstock, G. (1997). "The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules." *Neuropharmacology* 36(9): 1127-39.
- Cai, D., W. J. Netzer, et al. (2006). "Presenilin-1 uses phospholipase D1 as a negative regulator of beta-amyloid formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(6): 1941-6.
- Cai, H., Y. Wang, et al. (2001). "BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons." *Nat Neurosci* 4(3): 233-4.
- Caiazza, F., B. J. Harvey, et al. (2010). "Cytosolic phospholipase A2 activation correlates with HER2 overexpression and mediates estrogen-dependent breast cancer cell growth." *Mol Endocrinol* 24(5): 953-68.
- Caille, I., B. Allinquant, et al. (2004). "Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone." *Development* 131(9): 2173-81.
- Caporaso, G. L., K. Takei, et al. (1994). "Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein." *J Neurosci* 14(5 Pt 2): 3122-38.
- Caputo, C. B., L. A. Sygowski, et al. (1992). "Role of tau in the polymerization of peptides from beta-amyloid precursor protein." *Brain Res* 597(2): 227-32.
- Casas, C., N. Sergeant, et al. (2004). "Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model." *Am J Pathol* 165(4): 1289-300.
- Casas, J., M. A. Gijon, et al. (2006). "Overexpression of cytosolic group IVA phospholipase A2 protects cells from Ca²⁺-dependent death." *J Biol Chem* 281(9): 6106-16.
- Cash, A. D., G. Aliev, et al. (2003). "Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation." *Am J Pathol* 162(5): 1623-7.
- Castano, E. M., J. Ghiso, et al. (1986). "In vitro formation of amyloid fibrils from two synthetic peptides of different lengths homologous to Alzheimer's disease beta-protein." *Biochem Biophys Res Commun* 141(2): 782-9.
- Caughey, B. and P. T. Lansbury (2003). "Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders." *Annu Rev Neurosci* 26: 267-98.
- Cetin, F. and S. Dincer (2007). "The effect of intrahippocampal beta amyloid (1-42) peptide injection on oxidant and antioxidant status in rat brain." *Ann N Y Acad Sci* 1100: 510-7.
- Chabot, C., J. Gagne, et al. (1998). "Bidirectional modulation of AMPA receptor properties by exogenous phospholipase A2 in the hippocampus." *Hippocampus* 8(3): 299-309.
- Chalimoniuk, M., A. Stolecka, et al. (2007). "Amyloid beta enhances cytosolic phospholipase A2 level and arachidonic acid release via nitric oxide in APP-transfected PC12 cells." *Acta Biochim Pol* 54(3): 611-23.
- Chambers, C. B., E. M. Sigurdsson, et al. (2000). "Amyloid-beta injection in rat amygdala alters tau protein but not mRNA expression." *Exp Neurol* 162(1): 158-70.
- Chang, M. C. and C. R. Jones (1998). "Chronic lithium treatment decreases brain phospholipase A2 activity." *Neurochem Res* 23(6): 887-92.

Chauhan, N. B., T. Lichtor, et al. (2003). "Aging potentiates Abeta-induced depletion of SNAP-25 in mouse hippocampus." *Brain Res* 982(2): 219-27.

Chen, L., K. Yamada, et al. (2006). "alpha7 Nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in beta-amyloid infused rats." *Neuropharmacology* 50(2): 254-68.

Chen, S. Y., J. W. Wright, et al. (1996). "The neurochemical and behavioral effects of beta-amyloid peptide(25-35)." *Brain Res* 720(1-2): 54-60.

Cheng, I. H., J. J. Palop, et al. (2004). "Aggressive amyloidosis in mice expressing human amyloid peptides with the Arctic mutation." *Nat Med* 10(11): 1190-2.

Cheng, S. E., S. F. Luo, et al. (2009). "Cigarette smoke extract induces cytosolic phospholipase A2 expression via NADPH oxidase, MAPKs, AP-1, and NF-kappaB in human tracheal smooth muscle cells." *Free Radic Biol Med* 46(7): 948-60.

Chiba, H., H. Michibata, et al. (2004). "Cloning of a gene for a novel epithelium-specific cytosolic phospholipase A2, cPLA2delta, induced in psoriatic skin." *J Biol Chem* 279(13): 12890-7.

Chiba, T., M. Yamada, et al. (2005). "Development of a femtomolar-acting humanin derivative named colivelin by attaching activity-dependent neurotrophic factor to its N terminus: characterization of colivelin-mediated neuroprotection against Alzheimer's disease-relevant insults in vitro and in vivo." *J Neurosci* 25(44): 10252-61.

Choi, S. H., C. H. Park, et al. (2001). "Memory impairment and cholinergic dysfunction by centrally administered Abeta and carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP in mice." *FASEB J* 15(10): 1816-8.

Choukroun, G. J., V. Marshansky, et al. (2000). "Cytosolic phospholipase A(2) regulates golgi structure and modulates intracellular trafficking of membrane proteins." *J Clin Invest* 106(8): 983-93.

Christensen, R., A. B. Marcussen, et al. (2008). "Abeta(1-42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT(2A) levels." *Exp Neurol* 210(1): 164-71.

Chyung, J. H., D. M. Raper, et al. (2005). "Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage." *J Biol Chem* 280(6): 4383-92.

Cirrito, J. R., K. A. Yamada, et al. (2005). "Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo." *Neuron* 48(6): 913-22.

Cisse, M., B. Halabisky, et al. (2011). "Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model." *Nature* 469(7328): 47-52.

Clark, J. D., L. L. Lin, et al. (1991). "A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP." *Cell* 65(6): 1043-51.

Clark, J. D., A. R. Schievella, et al. (1995). "Cytosolic phospholipase A2." *J Lipid Mediat Cell Signal* 12(2-3): 83-117.

Cleary, J., J. M. Hittner, et al. (1995). "Beta-amyloid(1-40) effects on behavior and memory." *Brain Res* 682(1-2): 69-74.

Cleary, J. P., D. M. Walsh, et al. (2005). "Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function." *Nat Neurosci* 8(1): 79-84.

Clemens, J. A., D. T. Stephenson, et al. (1996). "Reactive glia express cytosolic phospholipase A2 after transient global forebrain ischemia in the rat." *Stroke* 27(3): 527-35.

Clements, M. P., T. V. Bliss, et al. (1991). "Increase in arachidonic acid concentration in a postsynaptic membrane fraction following the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus." *Neuroscience* 45(2): 379-89.

Clifford, P. M., S. Zarrabi, et al. (2007). "Abeta peptides can enter the brain through a defective blood-brain barrier and bind selectively to neurons." *Brain Res* 1142: 223-36.

Cochran, E., B. Bacci, et al. (1991). "Amyloid precursor protein and ubiquitin immunoreactivity in dystrophic axons is not unique to Alzheimer's disease." *Am J Pathol* 139(3): 485-9.

Cohen-Matsliah, S. I., I. Brosh, et al. (2007). "A novel role for extracellular signal-regulated kinase in maintaining long-term memory-relevant excitability changes." *J Neurosci* 27(46): 12584-9.

Colangelo, V., J. Schurr, et al. (2002). "Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling." *J Neurosci Res* 70(3): 462-73.

Colciaghi, F., B. Borroni, et al. (2002). "[alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients." *Mol Med* 8(2): 67-74.

Coles, M., W. Bicknell, et al. (1998). "Solution structure of amyloid beta-peptide(1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is?" *Biochemistry* 37(31): 11064-77.

Colom, L. V., M. T. Castaneda, et al. (2010). "Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function." *Neurobiol Aging* 31(1): 46-57.

Colucci-D'Amato, L., C. Perrone-Capano, et al. (2003). "Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases." *Bioessays* 25(11): 1085-95.

Combrinck, M., J. Williams, et al. (2006). "Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline, and survival in Alzheimer's disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77(1): 85-8.

Connell, E., F. Darios, et al. (2007). "Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin-Munc18." *EMBO Rep* 8(4): 414-9.

Connolly, S., C. Bennion, et al. (2002). "Design and synthesis of a novel and potent series of inhibitors of cytosolic phospholipase A(2) based on a 1,3-disubstituted propan-2-one skeleton." *J Med Chem* 45(6): 1348-62.

Cordeiro, Q., R. Noguti, et al. (2010). "Study of association between genetic polymorphisms of phospholipase A2 enzymes and Alzheimer's disease." *Arq Neuropsiquiatr* 68(2): 189-93.

Coulson, E. J. (2006). "Does the p75 neurotrophin receptor mediate Abeta-induced toxicity in Alzheimer's disease?" *J Neurochem* 98(3): 654-60.

Cowan, M. J., X. L. Yao, et al. (2004). "The role of TFIID, the initiator element and a novel 5' TFIID binding site in the transcriptional control of the TATA-less human cytosolic phospholipase A2-alpha promoter." *Biochim Biophys Acta* 1680(3): 145-57.

Craft, J. M., L. J. Van Eldik, et al. (2004a). "Aminopyridazines attenuate hippocampus-dependent behavioral deficits induced by human beta-amyloid in a murine model of neuroinflammation." *J Mol Neurosci* 24(1): 115-22.

Craft, J. M., D. M. Watterson, et al. (2004b). "Aminopyridazines inhibit beta-amyloid-induced glial activation and neuronal damage in vivo." *Neurobiol Aging* 25(10): 1283-92.

Craft, J. M., D. M. Watterson, et al. (2006). "Human amyloid beta-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration." *Glia* 53(5): 484-90.

Craig, M. C. and D. G. Murphy (2010). "Estrogen therapy and Alzheimer's dementia." *Ann N Y Acad Sci* 1205: 245-53.

Creemers, J. W., D. Ines Dominguez, et al. (2001). "Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family." *J Biol Chem* 276(6): 4211-7.

Cubells, L., S. Vila de Muga, et al. (2008). "Annexin A6-induced inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 is linked to caveolin-1 export from the Golgi." *J Biol Chem* 283(15): 10174-83.

Culicchia, F., J. G. Cui, et al. (2008). "Upregulation of beta-amyloid precursor protein expression in glioblastoma multiforme." *Neuroreport* 19(9): 981-5.

Cullen, W. K., Y. H. Suh, et al. (1997). "Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments." *Neuroreport* 8(15): 3213-7.

Cullen, W. K., J. Wu, et al. (1996). "beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus." *Neuroreport* 8(1): 87-92.

Cummings, B. S., J. McHowat, et al. (2000). "Phospholipase A(2)s in cell injury and death." *J Pharmacol Exp Ther* 294(3): 793-9.

Cupers, P., M. Bentahir, et al. (2001). "The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein." *J Cell Biol* 154(4): 731-40.

Czech, C., G. Tremp, et al. (2000). "Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms." *Prog Neurobiol* 60(4): 363-84.

Dahlgren, K. N., A. M. Manelli, et al. (2002). "Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability." *J Biol Chem* 277(35): 32046-53.

Darios, F., E. Connell, et al. (2007). "Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis." *J Physiol* 585(Pt 3): 699-704.

Darios, F. and B. Davletov (2006). "Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3." *Nature* 440(7085): 813-7.

Dasilva, K. A., J. E. Shaw, et al. (2010). "Amyloid-beta fibrillogenesis: structural insight and therapeutic intervention." *Exp Neurol* 223(2): 311-21.

Davis, J., F. Xu, et al. (2004). "Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor." *J Biol Chem* 279(19): 20296-306.

Dawson, G. R., G. R. Seabrook, et al. (1999). "Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein." *Neuroscience* 90(1): 1-13.

De Felice, F. G., P. T. Velasco, et al. (2007). "Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine." *J Biol Chem* 282(15): 11590-601.

de Sauvage, F. and J. N. Octave (1989). "A novel mRNA of the A4 amyloid precursor gene coding for a possibly secreted protein." *Science* 245(4918): 651-3.

Deane, R., Z. Wu, et al. (2004). "LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms." *Neuron* 43(3): 333-44.

Dechant, G. and Y. A. Barde (2002). "The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system." *Nat Neurosci* 5(11): 1131-6.

Dei, R., A. Takeda, et al. (2002). "Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* 104(2): 113-22.

Delacourte, A., J. P. David, et al. (1999). "The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease." *Neurology* 52(6): 1158-65.

Delaere, P., Y. He, et al. (1993). "Beta A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians." *Neurobiol Aging* 14(2): 191-4.

Delobette, S., A. Privat, et al. (1997). "In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat." *Eur J Pharmacol* 319(1): 1-4.

Deng, Y., B. Li, et al. (2008). "Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease." *FASEB J* 22(1): 138-45.

Dennis, E. A. (1994). "Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2." *J Biol Chem* 269(18): 13057-60.

Dessen, A., J. Tang, et al. (1999). "Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism." *Cell* 97(3): 349-60.

Deyts, C., K. S. Vetrivel, et al. (2012). "Novel GalphaS-protein signaling associated with membrane-tethered amyloid precursor protein intracellular domain." *J Neurosci* 32(5): 1714-29.

Dingwall, C. (2001). "Spotlight on BACE: the secretases as targets for treatment in Alzheimer disease." *J Clin Invest* 108(9): 1243-6.

Dodart, J. C., C. Mathis, et al. (2000). "Neuroanatomical abnormalities in behaviorally characterized APP(V717F) transgenic mice." *Neurobiol Dis* 7(2): 71-85.

Dolan-O'keefe, M. and H. S. Nick (1999). "Inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 expression by glucocorticoids in rat intestinal epithelial cells." *Gastroenterology* 116(4): 855-64.

Dominguez, D., J. Tournoy, et al. (2005). "Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice." *J Biol Chem* 280(35): 30797-806.

Dominguez, D. I., B. De Strooper, et al. (2001). "Secretases as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease." *Amyloid* 8(2): 124-42.

Dong, J., R. Revilla-Sanchez, et al. (2010). "Multiphoton in vivo imaging of amyloid in animal models of Alzheimer's disease." *Neuropharmacology* 59(4-5): 268-75.

Dong, M., K. Guda, et al. (2003). "Inverse association between phospholipase A2 and COX-2 expression during mouse colon tumorigenesis." *Carcinogenesis* 24(2): 307-15.

Dorandeu, F., I. Pernot-Marino, et al. (1998). "Secreted phospholipase A2-induced neurotoxicity and epileptic seizures after intracerebral administration: an unexplained heterogeneity as emphasized with paradoxin and crotoxin." *J Neurosci Res* 54(6): 848-62.

Downey, P., A. Sapirstein, et al. (2001). "Renal concentrating defect in mice lacking group IV cytosolic phospholipase A(2)." *Am J Physiol Renal Physiol* 280(4): F607-18.

Draper, D. W., V. G. Harris, et al. (2004). "Calcium and its role in the nuclear translocation and activation of cytosolic phospholipase A2 in cells rendered sensitive to TNF-induced apoptosis by cycloheximide." *J Immunol* 172(4): 2416-23.

Drouet, B., M. Pincon-Raymond, et al. (2000). "Molecular basis of Alzheimer's disease." *Cell Mol Life Sci* 57(5): 705-15.

Duan, L., H. Gan, et al. (2001). "Cytosolic phospholipase A2 participates with TNF-alpha in the induction of apoptosis of human macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis H37Ra." *J Immunol* 166(12): 7469-76.

Dudas, B., U. Cornelli, et al. (2002). "Oral and subcutaneous administration of the glycosaminoglycan C3 attenuates Abeta(25-35)-induced abnormal tau protein immunoreactivity in rat brain." *Neurobiol Aging* 23(1): 97-104.

Duff, K., C. Eckman, et al. (1996). "Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1." *Nature* 383(6602): 710-3.

Dulubova, I., A. Ho, et al. (2004). "Three-dimensional structure of an independently folded extracellular domain of human amyloid-beta precursor protein." *Biochemistry* 43(30): 9583-8.

Dumuis, A., M. Sebben, et al. (1988). "NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons." *Nature* 336(6194): 68-70.

Ebneth, A., R. Godemann, et al. (1998). "Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease." *J Cell Biol* 143(3): 777-94.

Eckstein, F. (2007). "The versatility of oligonucleotides as potential therapeutics." *Expert Opin Biol Ther* 7(7): 1021-34.

Edbauer, D., E. Winkler, et al. (2002). "Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13): 8666-71.

Edbauer, D., E. Winkler, et al. (2003). "Reconstitution of gamma-secretase activity." *Nat Cell Biol* 5(5): 486-8.

El Khoury, J. B., K. J. Moore, et al. (2003). "CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid." *J Exp Med* 197(12): 1657-66.

Emmerling, M. R., C. J. Moore, et al. (1993). "Phospholipase A2 activation influences the processing and secretion of the amyloid precursor protein." *Biochem Biophys Res Commun* 197(1): 292-7.

Emre, M., C. Geula, et al. (1992). "The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected beta-amyloid in the rat brain." *Neurobiol Aging* 13(5): 553-9.

Engelbrecht, A. M. and B. Ellis (2007). "Apoptosis is mediated by cytosolic phospholipase A2 during simulated ischaemia/reperfusion-induced injury in neonatal cardiac myocytes." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77(1): 37-43.

Enya, M., M. Morishima-Kawashima, et al. (1999). "Appearance of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid beta-protein (A β) dimer in the cortex during aging." *Am J Pathol* 154(1): 271-9.

Erickson, M. A., M. L. Niehoff, et al. (2012). "Peripheral administration of antisense oligonucleotides targeting the amyloid-beta protein precursor reverses A β PP and LRP-1 overexpression in the aged SAMP8 mouse brain." *J Alzheimers Dis* 28(4): 951-60.

Esch, F. S., P. S. Keim, et al. (1990). "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor." *Science* 248(4959): 1122-4.

Evin, G. and A. Weidemann (2002). "Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides." *Peptides* 23(7): 1285-97.

Fang, F. and G. T. Liu (2006). "Protective effects of compound FLZ on beta-amyloid peptide-(25-35)-induced mouse hippocampal injury and learning and memory impairment." *Acta Pharmacol Sin* 27(6): 651-8.

Farooqui, A. A. and L. A. Horrocks (2001). "Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia." *Neuroscientist* 7(3): 232-45.

Farooqui, A. A. and L. A. Horrocks (2006a). "Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly." *Neuroscientist* 12(3): 245-60.

Farooqui, A. A., L. A. Horrocks, et al. (2000). "Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids." *J Mol Neurosci* 14(3): 123-35.

Farooqui, A. A., M. L. Litsky, et al. (1999). "Inhibitors of intracellular phospholipase A2 activity: their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders." *Brain Res Bull* 49(3): 139-53.

Farooqui, A. A., W. Y. Ong, et al. (2006b). "Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders." *Pharmacol Rev* 58(3): 591-620.

Farzan, M., C. E. Schnitzler, et al. (2000). "BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17): 9712-7.

Feher, A., A. Juhasz, et al. (2010). "Association study of interferon-gamma, cytosolic phospholipase A2, and cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in Alzheimer disease." *Am J Geriatr Psychiatry* 18(11): 983-7.

Fernando, S. R. and R. G. Pertwee (1997). "Evidence that methyl arachidonyl fluorophosphonate is an irreversible cannabinoid receptor antagonist." *Br J Pharmacol* 121(8): 1716-20.

Fiala, M., Q. N. Liu, et al. (2002). "Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier." *Eur J Clin Invest* 32(5): 360-71.

Fifre, A., I. Sponne, et al. (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(1): 229-40.

Flood, J. F., J. E. Morley, et al. (1991). "Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(8): 3363-6.

Florent-Bechard, S., C. Desbene, et al. (2009). "The essential role of lipids in Alzheimer's disease." *Biochimie* 91(6): 804-9.

Flynn, J. T. and H. Hoff, 3rd (1995). "Lipopolysaccharide induces time-dependent increases in prostaglandin H synthase-2 and cytosolic phospholipase A2 mRNA in cultured human microvessel-derived endothelial cells." *Shock* 4(6): 433-40.

Fortna, R. R., A. S. Crystal, et al. (2004). "Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the gamma-secretase complex." *J Biol Chem* 279(5): 3685-93.

Francis, R., G. McGrath, et al. (2002). "aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation." *Dev Cell* 3(1): 85-97.

Fraser, S. P., Y. H. Suh, et al. (1997). "Ionic effects of the Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein and its metabolic fragments." *Trends Neurosci* 20(2): 67-72.

Fratiglioni, L., S. Paillard-Borg, et al. (2004). "An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia." *Lancet Neurol* 3(6): 343-53.

Fratiglioni, L., M. Viitanen, et al. (1997). "Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm." *Neurology* 48(1): 132-8.

Freir, D. B., D. A. Costello, et al. (2003). "A beta 25-35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 in vivo and in vitro is attenuated by verapamil." *J Neurophysiol* 89(6): 3061-9.

Freir, D. B., R. Fedriani, et al. (2011). "Abeta oligomers inhibit synapse remodelling necessary for memory consolidation." *Neurobiol Aging* 32(12): 2211-8.

Freir, D. B., C. Holscher, et al. (2001). "Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo." *J Neurophysiol* 85(2): 708-13.

Fu, A. L., Z. H. Dong, et al. (2006). "Protective effect of N-acetyl-L-cysteine on amyloid beta-peptide-induced learning and memory deficits in mice." *Brain Res* 1109(1): 201-6.

Fujita, S., Y. Ikegaya, et al. (2000). "Ca²⁺-independent phospholipase A2 inhibitor impairs spatial memory of mice." *Jpn J Pharmacol* 83(3): 277-8.

Fukuta, T., A. Nitta, et al. (2001). "Difference in toxicity of beta-amyloid peptide with aging in relation to nerve growth factor content in rat brain." *J Neural Transm* 108(2): 221-30.

Furukawa, K., Y. Abe, et al. (1994). "Amyloid beta protein-induced irreversible current in rat cortical neurones." *Neuroreport* 5(16): 2016-8.

Furukawa, K., B. L. Sopher, et al. (1996). "Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain." *J Neurochem* 67(5): 1882-96.

Gabryel, B., M. Chalimoniuk, et al. (2006). "Inhibition of arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A2 is involved in the antiapoptotic effect of FK506 and cyclosporin a on astrocytes exposed to simulated ischemia in vitro." *J Pharmacol Sci* 102(1): 77-87.

Games, D., D. Adams, et al. (1995). "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein." *Nature* 373(6514): 523-7.

Games, D., K. M. Khan, et al. (1992). "Lack of Alzheimer pathology after beta-amyloid protein injections in rat brain." *Neurobiol Aging* 13(5): 569-76.

Garcia, P., I. Youssef, et al. (2010). "Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease." *J Neurosci* 30(22): 7516-27.

Garnham, B. M., S. Fitzpatrick-Wong, et al. (2002). "Activation of phospholipases A2 and D of a human neuroblastoma cell line (LA-N-2) by N-dodecyl-L-lysine amide (compound 24), a putative G protein activator: characteristics of inhibition by (-)-nicotine." *Neurochem Res* 27(12): 1613-8.

Gartner, U., M. K. Bruckner, et al. (2003). "Amyloid deposition in APP23 mice is associated with the expression of cyclins in astrocytes but not in neurons." *Acta Neuropathol* 106(6): 535-44.

Gault, V. A. and C. Holscher (2008a). "GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid." *Eur J Pharmacol* 587(1-3): 112-7.

Gault, V. A. and C. Holscher (2008b). "Protease-resistant glucose-dependent insulinotropic polypeptide agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid." *J Neurophysiol* 99(4): 1590-5.

Gearing, M., J. Tigges, et al. (1997). "beta-Amyloid (A beta) deposition in the brains of aged orangutans." *Neurobiol Aging* 18(2): 139-46.

Gelb, M. H., E. Valentin, et al. (2000). "Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A2." *J Biol Chem* 275(51): 39823-6.

Gentile, M. T., C. Vecchione, et al. (2004). "Mechanisms of soluble beta-amyloid impairment of endothelial function." *J Biol Chem* 279(46): 48135-42.

Gervais, F. G., D. Xu, et al. (1999). "Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation." *Cell* 97(3): 395-406.

Geschwind, D. H. (2003). "Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg?" *Neuron* 40(3): 457-60.

Ghelardoni, S., Y. A. Tomita, et al. (2004). "Chronic carbamazepine selectively downregulates cytosolic phospholipase A2 expression and cyclooxygenase activity in rat brain." *Biol Psychiatry* 56(4): 248-54.

Ghomashchi, F., A. Stewart, et al. (2001). "A pyrrolidine-based specific inhibitor of cytosolic phospholipase A(2)alpha blocks arachidonic acid release in a variety of mammalian cells." *Biochim Biophys Acta* 1513(2): 160-6.

Ghosh, M., A. Stewart, et al. (2004). "Role of cytosolic phospholipase A(2) in prostaglandin E(2) production by lung fibroblasts." *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(1): 91-100.

Giliberto, L., D. Zhou, et al. (2008). "Evidence that the Amyloid beta Precursor Protein-intracellular domain lowers the stress threshold of neurons and has a "regulated" transcriptional role." *Mol Neurodegener* 3: 12.

Giovannelli, L., F. Casamenti, et al. (1995). "Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis." *Neuroscience* 66(4): 781-92.

Giovannini, M. G., C. Scali, et al. (2002). "Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway." *Neurobiol Dis* 11(2): 257-74.

Glabe, C. G. (2006). "Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease." *Neurobiol Aging* 27(4): 570-5.

Glabe, C. G. (2008). "Structural classification of toxic amyloid oligomers." *J Biol Chem* 283(44): 29639-43.

Glover, S., M. S. de Carvalho, et al. (1995). "Translocation of the 85-kDa phospholipase A2 from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen." *J Biol Chem* 270(25): 15359-67.

Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." *Nature* 349(6311): 704-6.

Goate, A. M. (1998). "Monogenetic determinants of Alzheimer's disease: APP mutations." *Cell Mol Life Sci* 54(9): 897-901.

Goedert, M., M. G. Spillantini, et al. (1989). "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." *Neuron* 3(4): 519-26.

Gong, C. X., F. Liu, et al. (2005). "Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease." *J Neural Transm* 112(6): 813-38.

Gong, C. X., F. Liu, et al. (2006). "Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation." *J Alzheimers Dis* 9(1): 1-12.

Gonzalo-Ruiz, A., I. Gonzalez, et al. (2003). "Effects of beta-amyloid protein on serotonergic, noradrenergic, and cholinergic markers in neurons of the pontomesencephalic tegmentum in the rat." *J Chem Neuroanat* 26(3): 153-69.

Gordon, I., E. Grauer, et al. (1995). "Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice." *Neurosci Lett* 199(1): 1-4.

Gotz, J., F. Chen, et al. (2001). "Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils." *Science* 293(5534): 1491-5.

Gouras, G. K., C. G. Almeida, et al. (2005). "Intraneuronal A β accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 26(9): 1235-44.

Goutte, C., M. Tsunozaki, et al. (2002). "APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 775-9.

Gralle, M., M. M. Botelho, et al. (2002). "Solution studies and structural model of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein." *Biophys J* 83(6): 3513-24.

Gray, C. W. and A. J. Patel (1993). "Regulation of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs by transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta in astrocytes." *Brain Res Mol Brain Res* 19(3): 251-6.

Green, J. T., S. K. Orr, et al. (2008). "The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A2 in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids." *J Lipid Res* 49(5): 939-44.

Greenfield, J. P., J. Tsai, et al. (1999). "Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2): 742-7.

Griffin, W. S., J. G. Sheng, et al. (1998). "Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression." *Brain Pathol* 8(1): 65-72.

Grimmer, S., M. Ying, et al. (2005). "Golgi vesiculation induced by cholesterol occurs by a dynamin- and cPLA2-dependent mechanism." *Traffic* 6(2): 144-56.

Gronich, J., M. Konieczkowski, et al. (1994). "Interleukin 1 alpha causes rapid activation of cytosolic phospholipase A2 by phosphorylation in rat mesangial cells." *J Clin Invest* 93(3): 1224-33.

Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(13): 4913-7.

Gubern, A., J. Casas, et al. (2008). "Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets." *J Biol Chem* 283(41): 27369-82.

Haass, C., A. Y. Hung, et al. (1993). "Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules." *Ann N Y Acad Sci* 695: 109-16.

Hamano, H., J. Nabekura, et al. (1996). "Docosahexaenoic acid reduces GABA response in substantia nigra neuron of rat." *J Neurophysiol* 75(3): 1264-70.

Han, P., F. Dou, et al. (2005). "Suppression of cyclin-dependent kinase 5 activation by amyloid precursor protein: a novel excitoprotective mechanism involving modulation of tau phosphorylation." *J Neurosci* 25(50): 11542-52.

Hanel, A. M., S. Schuttel, et al. (1993). "Processive interfacial catalysis by mammalian 85-kilodalton phospholipase A2 enzymes on product-containing vesicles: application to the determination of substrate preferences." *Biochemistry* 32(23): 5949-58.

Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." *Nature* 418(6894): 244-51.

Haq, S., H. Kilter, et al. (2003). "Deletion of cytosolic phospholipase A2 promotes striated muscle growth." *Nat Med* 9(7): 944-51.

Harada, A., K. Oguchi, et al. (1994). "Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein." *Nature* 369(6480): 488-91.

Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." *Science* 256(5054): 184-5.

Harkany, T., G. I. De Jong, et al. (1995a). "Beta-amyloid (1-42) affects cholinergic but not parvalbumin-containing neurons in the septal complex of the rat." *Brain Res* 698(1-2): 270-4.

Harkany, T., Z. Lengyel, et al. (1995b). "Cholinotoxic effects of beta-amyloid (1-42) peptide on cortical projections of the rat nucleus basalis magnocellularis." *Brain Res* 695(1): 71-5.

Harkany, T., S. O'Mahony, et al. (2001). "Beta-amyloid(1-42)-induced cholinergic lesions in rat nucleus basalis bidirectionally modulate serotonergic innervation of the basal forebrain and cerebral cortex." *Neurobiol Dis* 8(4): 667-78.

Harkany, T., S. O'Mahony, et al. (1998). "Beta-amyloid(Phe(SO₃H)₂₄)₂₅₋₃₅ in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation." *Behav Brain Res* 90(2): 133-45.

Harrison, S. M., A. J. Harper, et al. (2003). "BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes." *Mol Cell Neurosci* 24(3): 646-55.

Harris-White, M. E., T. Chu, et al. (2001). "Estrogen (E2) and glucocorticoid (Gc) effects on microglia and A beta clearance in vitro and in vivo." *Neurochem Int* 39(5-6): 435-48.

Hartley, D. M., D. M. Walsh, et al. (1999). "Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons." *J Neurosci* 19(20): 8876-84.

Hartman, R. E., D. F. Wozniak, et al. (2001). "Behavioral phenotyping of GFAP-apoE3 and -apoE4 transgenic mice: apoE4 mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology." *Exp Neurol* 170(2): 326-44.

Hashimoto, M., S. Hossain, et al. (2005). "Docosahexaenoic acid-induced amelioration on impairment of memory learning in amyloid beta-infused rats relates to the decreases of amyloid beta and cholesterol levels in detergent-insoluble membrane fractions." *Biochim Biophys Acta* 1738(1-3): 91-8.

Hashimoto, M., S. Hossain, et al. (2002). "Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats." *J Neurochem* 81(5): 1084-91.

Hass, M. R. and B. A. Yankner (2005). "A γ -secretase-independent mechanism of signal transduction by the amyloid precursor protein." *J Biol Chem* 280(44): 36895-904.

Hattori, M., H. Arai, et al. (1993). "Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase." *J Biol Chem* 268(25): 18748-53.

Hauw, J. J., P. Vignolo, et al. (1986). "[Neuropathological study of 12 centenarians: the incidence of Alzheimer type senile dementia is not particularly increased in this group of very old patients]." *Rev Neurol (Paris)* 142(2): 107-15.

Hayakawa, M., S. Jayadev, et al. (1996). "Role of ceramide in stimulation of the transcription of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2." *Biochem Biophys Res Commun* 220(3): 681-6.

Hayashi, H., N. Kimura, et al. (2004). "A seed for Alzheimer amyloid in the brain." *J Neurosci* 24(20): 4894-902.

He, X., Y. Huang, et al. (2010). "Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 31(3): 398-408.

He, Y., J. Cui, et al. (2011). "Prolonged exposure of cortical neurons to oligomeric amyloid-beta impairs NMDA receptor function via NADPH oxidase-mediated ROS production: protective effect of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate." *ASN Neuro* 3(1): e00050.

Heber, S., J. Herms, et al. (2000). "Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members." *J Neurosci* 20(21): 7951-63.

Hegen, M., L. Sun, et al. (2003). "Cytosolic phospholipase A2 α -deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis." *J Exp Med* 197(10): 1297-302.

Helmer, C., F. Pasquier, et al. (2006). "[Epidemiology of Alzheimer disease and related disorders]." *Med Sci (Paris)* 22(3): 288-96.

Hendrie, H. C., J. Murrell, et al. (2006). "International studies in dementia with particular emphasis on populations of African origin." *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20(3 Suppl 2): S42-6.

Herbert, S. P., S. Ponnambalam, et al. (2005). "Cytosolic phospholipase A2- α mediates endothelial cell proliferation and is inactivated by association with the Golgi apparatus." *Mol Biol Cell* 16(8): 3800-9.

Hernandez, M., Y. Bayon, et al. (1999). "Signaling mechanisms involved in the activation of arachidonic acid metabolism in human astrocytoma cells by tumor necrosis factor- α : phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and transactivation of cyclooxygenase-2." *J Neurochem* 73(4): 1641-9.

Hernandez, M., M. L. Nieto, et al. (2000). "Cytosolic phospholipase A2 and the distinct transcriptional programs of astrocytoma cells." *Trends Neurosci* 23(6): 259-64.

Herzig, M. C., D. T. Winkler, et al. (2004). "Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis." *Nat Neurosci* 7(9): 954-60.

Hicks, J. B., Y. Lai, et al. (2008). "Amyloid-beta peptide induces temporal membrane biphasic changes in astrocytes through cytosolic phospholipase A2." *Biochim Biophys Acta* 1778(11): 2512-9.

Higgins, L. S., D. M. Holtzman, et al. (1994). "Transgenic mouse brain histopathology resembles early Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 35(5): 598-607.

Hirabayashi, T., T. Murayama, et al. (2004). "Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2." *Biol Pharm Bull* 27(8): 1168-73.

Hirabayashi, T. and T. Shimizu (2000). "Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2)." *Biochim Biophys Acta* 1488(1-2): 124-38.

Hirashima, Y., A. A. Farooqui, et al. (1992). "Identification and purification of calcium-independent phospholipase A2 from bovine brain cytosol." *J Neurochem* 59(2): 708-14.

Hirokawa, N., Y. Shiomura, et al. (1988). "Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules." *J Cell Biol* 107(4): 1449-59.

Ho, A. and T. C. Sudhof (2004). "Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8): 2548-53.

Ho, T. C., S. L. Chen, et al. (2009). "Cytosolic phospholipase A2- α is an early apoptotic activator in PEDF-induced endothelial cell apoptosis." *Am J Physiol Cell Physiol* 296(2): C273-84.

Holcomb, L., M. N. Gordon, et al. (1998). "Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes." *Nat Med* 4(1): 97-100.

Holcomb, L. A., M. N. Gordon, et al. (2000). "A beta and perlecan in rat brain: glial activation, gradual clearance and limited neurotoxicity." *Mech Ageing Dev* 112(2): 135-52.

Holscher, C., L. Canevari, et al. (1995). "Inhibitors of PLA2 and NO synthase cooperate in producing amnesia of a spatial task." *Neuroreport* 6(5): 730-2.

Holscher, C., S. Gengler, et al. (2007). "Soluble beta-amyloid[25-35] reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning." *Eur J Pharmacol* 561(1-3): 85-90.

Holtzman, D. M., K. R. Bales, et al. (2000). "Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2892-7.

Hong, S., K. Gronert, et al. (2003). "Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation." *J Biol Chem* 278(17): 14677-87.

Hook, V. Y., M. Kindy, et al. (2009). "Genetic cathepsin B deficiency reduces beta-amyloid in transgenic mice expressing human wild-type amyloid precursor protein." *Biochem Biophys Res Commun* 386(2): 284-8.

Hooper, N. M. and A. J. Turner (2002). "The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease." *Curr Med Chem* 9(11): 1107-19.

Hoozemans, J. J., R. Veerhuis, et al. (2002). "The role of cyclo-oxygenase 1 and 2 activity in prostaglandin E(2) secretion by cultured human adult microglia: implications for Alzheimer's disease." *Brain Res* 951(2): 218-26.

Hornfelt, M., A. Edstrom, et al. (1999). "Upregulation of cytosolic phospholipase A2 correlates with apoptosis in mouse superior cervical and dorsal root ganglia neurons." *Neurosci Lett* 265(2): 87-90.

Hoshi, M., M. Sato, et al. (2003). "Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6370-5.

Hsia, A. Y., E. Masliah, et al. (1999). "Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 3228-33.

Hsiao, K., P. Chapman, et al. (1996). "Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice." *Science* 274(5284): 99-102.

Hu, N. W., I. M. Smith, et al. (2008). "Soluble amyloid-beta peptides potently disrupt hippocampal synaptic plasticity in the absence of cerebrovascular dysfunction in vivo." *Brain* 131(Pt 9): 2414-24.

Hu, X., C. W. Hicks, et al. (2006). "Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system." *Nat Neurosci* 9(12): 1520-5.

Huang, H. J., K. C. Liang, et al. (2007). "Intrahippocampal administration of A β (1-40) impairs spatial learning and memory in hyperglycemic mice." *Neurobiol Learn Mem* 87(4): 483-94.

Hung, A. Y. and D. J. Selkoe (1994). "Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein." *EMBO J* 13(3): 534-42.

Hussain, I., D. J. Powell, et al. (2000). "ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site." *Mol Cell Neurosci* 16(5): 609-19.

Hwang, D. Y., K. R. Chae, et al. (2002). "Alterations in behavior, amyloid beta-42, caspase-3, and Cox-2 in mutant PS2 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *FASEB J* 16(8): 805-13.

Ida, N., T. Hartmann, et al. (1996). "Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay." *J Biol Chem* 271(37): 22908-14.

Ihara, Y., N. Nukina, et al. (1986). "Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease." *J Biochem* 99(6): 1807-10.

Iqbal, K., C. Alonso Adel, et al. (2005). "Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies." *Biochim Biophys Acta* 1739(2-3): 198-210.

Irie, K., K. Murakami, et al. (2005). "Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *J Biosci Bioeng* 99(5): 437-47.

Itoh, A., T. Akaike, et al. (1999). "Impairments of long-term potentiation in hippocampal slices of beta-amyloid-infused rats." *Eur J Pharmacol* 382(3): 167-75.

Itoh, A., A. Nitta, et al. (1996). "Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in beta-amyloid protein--infused rats." *J Neurochem* 66(3): 1113-7.

Jacobsen, J. S., C. C. Wu, et al. (2006). "Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13): 5161-6.

James, G. and A. M. Butt (2002). "P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca²⁺ signalling in glial cell pathology in the central nervous system." *Eur J Pharmacol* 447(2-3): 247-60.

Jantaratnotai, N., J. K. Ryu, et al. (2003). "Amyloid beta peptide-induced corpus callosum damage and glial activation in vivo." *Neuroreport* 14(11): 1429-33.

Jeremic, A., W. J. Cho, et al. (2005). "Involvement of water channels in synaptic vesicle swelling." *Exp Biol Med (Maywood)* 230(9): 674-80.

Jhamandas, J. H., Z. Li, et al. (2011). "Actions of beta-amyloid protein on human neurons are expressed through the amylin receptor." *Am J Pathol* 178(1): 140-9.

- Jhoo, J. H., H. C. Kim, et al. (2004). "Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex." *Behav Brain Res* 155(2): 185-96.
- Ji, Y., Y. Gong, et al. (2003). "Apolipoprotein E isoform-specific regulation of dendritic spine morphology in apolipoprotein E transgenic mice and Alzheimer's disease patients." *Neuroscience* 122(2): 305-15.
- Ji, Y., B. Permanne, et al. (2001). "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* 3(1): 23-30.
- Jiang, L. H., Y. N. Zhang, et al. (2008). "Effect of insulin on the cognizing function and expression of hippocampal Abeta1-40 of rat with Alzheimer disease." *Chin Med J (Engl)* 121(9): 827-31.
- Jin, Y., Y. Fan, et al. (2006). "Effects of sodium ferulate on amyloid-beta-induced MKK3/MKK6-p38 MAPK-Hsp27 signal pathway and apoptosis in rat hippocampus." *Acta Pharmacol Sin* 27(10): 1309-16.
- Joachim, C. L., J. H. Morris, et al. (1989). "Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease." *Am J Pathol* 135(2): 309-19.
- Joseph, J. A., B. Shukitt-Hale, et al. (2005). "Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds." *Am J Clin Nutr* 81(1 Suppl): 313S-316S.
- Joslin, G., J. E. Krause, et al. (1991). "Amyloid-beta peptide, substance P, and bombesin bind to the serpin-enzyme complex receptor." *J Biol Chem* 266(32): 21897-902.
- Kagan, B. L., R. Azimov, et al. (2004). "Amyloid peptide channels." *J Membr Biol* 202(1): 1-10.
- Kagan, B. L., Y. Hirakura, et al. (2002). "The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status." *Peptides* 23(7): 1311-5.
- Kalmijn, S., L. J. Launer, et al. (1997). "Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study." *Ann Neurol* 42(5): 776-82.
- Kamal, A., A. Almenar-Queralt, et al. (2001). "Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP." *Nature* 414(6864): 643-8.
- Kamal, A., G. B. Stokin, et al. (2000). "Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I." *Neuron* 28(2): 449-59.
- Kanfer, J. N., I. N. Singh, et al. (1996). "Phospholipid metabolism in Alzheimer's disease and in a human cholinergic cell." *J Lipid Mediat Cell Signal* 14(1-3): 361-3.
- Kappos, L., J. Antel, et al. (2006). "Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis." *N Engl J Med* 355(11): 1124-40.
- Karasawa, K., A. Harada, et al. (2003). "Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH)." *Prog Lipid Res* 42(2): 93-114.
- Kawarabayashi, T., L. H. Younkin, et al. (2001). "Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* 21(2): 372-81.
- Keller, J. N., R. J. Mark, et al. (1997). "4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes." *Neuroscience* 80(3): 685-96.
- Kelly, P. H., L. Bondolfi, et al. (2003). "Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice." *Neurobiol Aging* 24(2): 365-78.

Khanna, S., N. L. Parinandi, et al. (2010). "Nanomolar vitamin E alpha-tocotrienol inhibits glutamate-induced activation of phospholipase A2 and causes neuroprotection." *J Neurochem* 112(5): 1249-60.

Kienlen-Campard, P., S. Miolet, et al. (2002). "Intracellular amyloid-beta 1-42, but not extracellular soluble amyloid-beta peptides, induces neuronal apoptosis." *J Biol Chem* 277(18): 15666-70.

Kienlen-Campard, P., B. Tasiaux, et al. (2008). "Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs." *J Biol Chem* 283(12): 7733-44.

Kilkus, J., R. Goswami, et al. (2003). "Ceramide in rafts (detergent-insoluble fraction) mediates cell death in neurotumor cell lines." *J Neurosci Res* 72(1): 65-75.

Kim, D. H., B. Fitzsimmons, et al. (2008a). "Inhibition of spinal cytosolic phospholipase A(2) expression by an antisense oligonucleotide attenuates tissue injury-induced hyperalgesia." *Neuroscience* 154(3): 1077-87.

Kim, D. H., S. Kim, et al. (2008b). "The effects of acute and repeated oroxylin A treatments on Abeta(25-35)-induced memory impairment in mice." *Neuropharmacology* 55(5): 639-47.

Kim, D. K., G. Rordorf, et al. (1995). "Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase A2 in brain cortical cultures." *Biochem J* 310 (Pt 1): 83-90.

Kim, H. J., S. C. Chae, et al. (2003). "Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein." *FASEB J* 17(1): 118-20.

Kim, H. S., J. Y. Cho, et al. (2004). "Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on microglial activation induced by intracerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1-42) in mice." *Biol Pharm Bull* 27(1): 120-1.

Kim, H. W., J. S. Rao, et al. (2011). "Dietary n-6 PUFA deprivation downregulates arachidonate but upregulates docosahexaenoate metabolizing enzymes in rat brain." *Biochim Biophys Acta* 1811(2): 111-7.

Kim, J. and R. Schekman (2004). "The ins and outs of presenilin 1 membrane topology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(4): 905-6.

Kim, S., J. Ko, et al. (2001). "Differential effects of annexins I, II, III, and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model." *FEBS Lett* 489(2-3): 243-8.

Kimberly, W. T., M. J. LaVoie, et al. (2003). "Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6382-7.

Kimberly, W. T., J. B. Zheng, et al. (2001). "The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner." *J Biol Chem* 276(43): 40288-92.

Kinoshita, A., H. Fukumoto, et al. (2003). "Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes." *J Cell Sci* 116(Pt 16): 3339-46.

Kinouchi, T., Y. Ono, et al. (1995). "Arachidonate metabolites affect the secretion of an N-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein." *Biochem Biophys Res Commun* 209(3): 841-9.

Kishida, E., M. Yano, et al. (1998). "Distinctive inhibitory activity of docosahexaenoic acid against sphingosine-induced apoptosis." *Biochim Biophys Acta* 1391(3): 401-8.

Kishimoto, K., K. Matsumura, et al. (1999). "Localization of cytosolic phospholipase A2 messenger RNA mainly in neurons in the rat brain." *Neuroscience* 92(3): 1061-77.

Klein, W. L., G. A. Krafft, et al. (2001). "Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?" *Trends Neurosci* 24(4): 219-24.

Klivenyi, P., M. F. Beal, et al. (1998). "Mice deficient in group IV cytosolic phospholipase A2 are resistant to MPTP neurotoxicity." *J Neurochem* 71(6): 2634-7.

Klyubin, I., D. M. Walsh, et al. (2004). "Soluble Arctic amyloid beta protein inhibits hippocampal long-term potentiation in vivo." *Eur J Neurosci* 19(10): 2839-46.

Klyubin, I., D. M. Walsh, et al. (2005). "Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo." *Nat Med* 11(5): 556-61.

Knobloch, M., U. Konietzko, et al. (2007). "Intracellular Abeta and cognitive deficits precede beta-amyloid deposition in transgenic arcAbeta mice." *Neurobiol Aging* 28(9): 1297-306.

Kobayashi, D. T. and K. S. Chen (2005). "Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease." *Genes Brain Behav* 4(3): 173-96.

Koistinaho, M., M. Ort, et al. (2001). "Specific spatial learning deficits become severe with age in beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta-amyloid deposits but do not form plaques." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14675-80.

Kokkinidis, L. and H. Anisman (1976). "Dissociation of the effects of scopolamine and d-amphetamine on a spontaneous alternation task." *Pharmacol Biochem Behav* 5(3): 293-7.

Kokotos, G., D. A. Six, et al. (2004). "Inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A2 by novel 2-oxoamides in vitro, in cells, and in vivo." *J Med Chem* 47(14): 3615-28.

Kolko, M., M. A. DeCoster, et al. (1996). "Synergy by secretory phospholipase A2 and glutamate on inducing cell death and sustained arachidonic acid metabolic changes in primary cortical neuronal cultures." *J Biol Chem* 271(51): 32722-8.

Kong, L. N., P. P. Zuo, et al. (2005). "Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease." *Acta Pharmacol Sin* 26(6): 666-72.

Kopke, E., Y. C. Tung, et al. (1993). "Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease." *J Biol Chem* 268(32): 24374-84.

Kosik, K. S., L. K. Duffy, et al. (1984). "Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(24): 7941-5.

Kosik, K. S., L. D. Orecchio, et al. (1989). "Developmentally regulated expression of specific tau sequences." *Neuron* 2(4): 1389-97.

Kowa, H., T. Sakakura, et al. (2004). "Mostly separate distributions of CLAC- versus Abeta40- or thioflavin S-reactivities in senile plaques reveal two distinct subpopulations of beta-amyloid deposits." *Am J Pathol* 165(1): 273-81.

Kowall, N. W., M. F. Beal, et al. (1991). "An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16): 7247-51.

Kramer, B. C., J. A. Yabut, et al. (2004). "Toxicity of glutathione depletion in mesencephalic cultures: a role for arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites." *Eur J Neurosci* 19(2): 280-6.

Kramer, R. M., C. Hession, et al. (1989). "Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2." *J Biol Chem* 264(10): 5768-75.

Kramer, R. M. and J. D. Sharp (1997). "Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)." *FEBS Lett* 410(1): 49-53.

Kriem, B., I. Sponne, et al. (2005). "Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide." *FASEB J* 19(1): 85-7.

Kuhn, P. H., H. Wang, et al. (2010). "ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons." *EMBO J* 29(17): 3020-32.

Lacor, P. N., M. C. Buniel, et al. (2004). "Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers." *J Neurosci* 24(45): 10191-200.

Lacor, P. N., M. C. Buniel, et al. (2007). "Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease." *J Neurosci* 27(4): 796-807.

LaFerla, F. M., K. N. Green, et al. (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* 8(7): 499-509.

Lambert, M. P., A. K. Barlow, et al. (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6448-53.

Lambert, M. P., K. L. Viola, et al. (2001). "Vaccination with soluble Abeta oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies." *J Neurochem* 79(3): 595-605.

Laras, Y., G. Quelever, et al. (2005). "Substituted thiazolamide coupled to a redox delivery system: a new gamma-secretase inhibitor with enhanced pharmacokinetic profile." *Org Biomol Chem* 3(4): 612-8.

Larson, M. E. and S. E. Lesne (2012). "Soluble Abeta oligomer production and toxicity." *J Neurochem* 120 Suppl 1: 125-39.

Larsson Forsell, P. K., B. P. Kennedy, et al. (1999). "The human calcium-independent phospholipase A2 gene multiple enzymes with distinct properties from a single gene." *Eur J Biochem* 262(2): 575-85.

Lashuel, H. A. and P. T. Lansbury, Jr. (2006). "Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins?" *Q Rev Biophys* 39(2): 167-201.

Latham, C. F., S. L. Osborne, et al. (2007). "Arachidonic acid potentiates exocytosis and allows neuronal SNARE complex to interact with Munc18a." *J Neurochem* 100(6): 1543-54.

Launer, L. J. (2005). "Diabetes and brain aging: epidemiologic evidence." *Curr Diab Rep* 5(1): 59-63.

Lauren, J., D. A. Gimbel, et al. (2009). "Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers." *Nature* 457(7233): 1128-32.

Lauritzen, I., C. Heurteaux, et al. (1994). "Expression of group II phospholipase A2 in rat brain after severe forebrain ischemia and in endotoxic shock." *Brain Res* 651(1-2): 353-6.

LaVoie, M. J., P. C. Fraering, et al. (2003). "Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin." *J Biol Chem* 278(39): 37213-22.

Lazarov, O., G. A. Morfini, et al. (2005). "Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited." *J Neurosci* 25(9): 2386-95.

Lee, C. L., T. F. Kuo, et al. (2007). "Red mold rice ameliorates impairment of memory and learning ability in intracerebroventricular amyloid beta-infused rat by repressing amyloid beta accumulation." *J Neurosci Res* 85(14): 3171-82.

Lee, C. W., I. T. Lee, et al. (2010). "Activation and induction of cytosolic phospholipase A2 by IL-1beta in human tracheal smooth muscle cells: role of MAPKs/p300 and NF-kappaB." *J Cell Biochem* 109(5): 1045-56.

Lee, C. W., C. C. Lin, et al. (2011). "Activation and induction of cytosolic phospholipase A2 by TNF-alpha mediated through Nox2, MAPKs, NF-kappaB, and p300 in human tracheal smooth muscle cells." *J Cell Physiol* 226(8): 2103-14.

Lee, E. B., B. Zhang, et al. (2005). "BACE overexpression alters the subcellular processing of APP and inhibits Abeta deposition in vivo." *J Cell Biol* 168(2): 291-302.

Lee, G., R. L. Neve, et al. (1989). "The microtubule binding domain of tau protein." *Neuron* 2(6): 1615-24.

- Lee, J. C., A. Simonyi, et al. (2011). "Phospholipases A2 and neural membrane dynamics: implications for Alzheimer's disease." *J Neurochem* 116(5): 813-9.
- Lee, J. Y., I. Mook-Jung, et al. (1999). "Histochemically reactive zinc in plaques of the Swedish mutant beta-amyloid precursor protein transgenic mice." *J Neurosci* 19(11): RC10.
- Lee, S. F., S. Shah, et al. (2004). "A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the gamma-secretase complex." *J Biol Chem* 279(6): 4144-52.
- Leem, J. Y., S. Vijayan, et al. (2002). "Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin." *J Biol Chem* 277(21): 19236-40.
- Lehr, M. and A. S. Elfringhoff (2000). "Comparison of the inhibition of the cytosolic phospholipase A2-mediated arachidonic acid release by several indole-2-carboxylic acids and 3-(pyrrol-2-yl)propionic acids in bovine and in human platelets." *Arch Pharm (Weinheim)* 333(9): 312-4.
- Leslie, C. C. (1991). "Kinetic properties of a high molecular mass arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 that exhibits lysophospholipase activity." *J Biol Chem* 266(17): 11366-71.
- Lesne, S., M. T. Koh, et al. (2006). "A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory." *Nature* 440(7082): 352-7.
- Leu, B., E. Koch, et al. (2010). "GAP43 phosphorylation is critical for growth and branching of retinotectal arbors in zebrafish." *Dev Neurobiol* 70(13): 897-911.
- Leu, B. H. and J. T. Schmidt (2008). "Arachidonic acid as a retrograde signal controlling growth and dynamics of retinotectal arbors." *Dev Neurobiol* 68(1): 18-30.
- Lewis, J., D. W. Dickson, et al. (2001). "Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP." *Science* 293(5534): 1487-91.
- Lewis, J., E. McGowan, et al. (2000). "Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein." *Nat Genet* 25(4): 402-5.
- Li, W., J. Xia, et al. (1999). "Cytokine induction of iNOS and sPLA2 in immortalized astrocytes (DITNC): response to genistein and pyrrolidine dithiocarbamate." *J Interferon Cytokine Res* 19(2): 121-7.
- Liang, Y. Q., X. T. Huang, et al. (2008). "Huperzine A reverses cholinergic and monoaminergic dysfunction induced by bilateral nucleus basalis magnocellularis injection of beta-amyloid peptide (1-40) in rats." *Cell Mol Neurobiol* 28(1): 87-101.
- Lin, L. L., M. Wartmann, et al. (1993). "cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase." *Cell* 72(2): 269-78.
- Lin, W. N., C. C. Lin, et al. (2011). "Regulation of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A2 gene expression by lipopolysaccharide through the RNA-binding protein HuR: involvement of NADPH oxidase, reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases." *Br J Pharmacol* 163(8): 1691-706.
- Lin, W. W., C. W. Wang, et al. (1997). "Effects of depolarization and NMDA antagonists on the role survival of cerebellar granule cells: a pivotal role for protein kinase C isoforms." *J Neurochem* 68(6): 2577-86.
- Lindwall, G. and R. D. Cole (1984). "Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly." *J Biol Chem* 259(8): 5301-5.
- Linkous, A. and E. Yazlovitskaya (2010). "Cytosolic phospholipase A2 as a mediator of disease pathogenesis." *Cell Microbiol* 12(10): 1369-77.
- Lio, Y. C., L. J. Reynolds, et al. (1996). "Irreversible inhibition of Ca(2+)-independent phospholipase A2 by methyl arachidonoyl fluorophosphonate." *Biochim Biophys Acta* 1302(1): 55-60.
- Liu, F., I. Grundke-Iqbal, et al. (2005). "Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation." *Eur J Neurosci* 22(8): 1942-50.

- Liu, F., K. Iqbal, et al. (2004). "O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29): 10804-9.
- Liu, F., B. Li, et al. (2007). "Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation." *Eur J Neurosci* 26(12): 3429-36.
- Liu, J. X., W. H. Cong, et al. (2004). "Effect of combination of extracts of ginseng and ginkgo biloba on acetylcholine in amyloid beta-protein-treated rats determined by an improved HPLC." *Acta Pharmacol Sin* 25(9): 1118-23.
- Liu, Y., Y. W. Zhang, et al. (2009). "Intracellular trafficking of presenilin 1 is regulated by beta-amyloid precursor protein and phospholipase D1." *J Biol Chem* 284(18): 12145-52.
- Lorenzo, A. and B. A. Yankner (1994). "Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25): 12243-7.
- Lorenzo, A., M. Yuan, et al. (2000). "Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease." *Nat Neurosci* 3(5): 460-4.
- Lott, I. T. and E. Head (2005). "Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis." *Neurobiol Aging* 26(3): 383-9.
- Lourenco, F. C., V. Galvan, et al. (2009). "Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production." *Cell Death Differ* 16(5): 655-63.
- Lu, D. C., S. Soriano, et al. (2003). "Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity." *J Neurochem* 87(3): 733-41.
- Luchsinger, J. A., M. X. Tang, et al. (2002). "Caloric intake and the risk of Alzheimer disease." *Arch Neurol* 59(8): 1258-63.
- Lukiw, W. J., J. G. Cui, et al. (2005). "A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease." *J Clin Invest* 115(10): 2774-83.
- Luo, Y., B. Bolon, et al. (2003). "BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time." *Neurobiol Dis* 14(1): 81-8.
- Luschen, S., S. Ussat, et al. (1998). "Cleavage of human cytosolic phospholipase A2 by caspase-1 (ICE) and caspase-8 (FLICE)." *Biochem Biophys Res Commun* 253(1): 92-8.
- Lynch, A. M., D. J. Loane, et al. (2007). "Eicosapentaenoic acid confers neuroprotection in the amyloid-beta challenged aged hippocampus." *Neurobiol Aging* 28(6): 845-55.
- Maat-Schieman, M. L., H. Yamaguchi, et al. (2004). "Glial reactions and the clearance of amyloid beta protein in the brains of patients with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type." *Acta Neuropathol* 107(5): 389-98.
- MacEwan, D. J. (1996). "Elevated cPLA2 levels as a mechanism by which the p70 TNF and p75 NGF receptors enhance apoptosis." *FEBS Lett* 379(1): 77-81.
- Magdesian, M. H., M. M. Carvalho, et al. (2008). "Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling." *J Biol Chem* 283(14): 9359-68.
- Malaplate-Armand, C., C. Desbene, et al. (2009). "[Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease: current update and future directions]." *Rev Neurol (Paris)* 165(6-7): 511-20.
- Malaplate-Armand, C., S. Florent-Bechard, et al. (2006). "Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway." *Neurobiol Dis* 23(1): 178-89.
- Maldonado-Baez, L. and B. Wendland (2006). "Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators." *Trends Cell Biol* 16(10): 505-13.

Malik, I., J. Turk, et al. (2008). "Disrupted membrane homeostasis and accumulation of ubiquitinated proteins in a mouse model of infantile neuroaxonal dystrophy caused by PLA2G6 mutations." *Am J Pathol* 172(2): 406-16.

Malin, D. H., M. K. Crothers, et al. (2001). "Hippocampal injections of amyloid beta-peptide 1-40 impair subsequent one-trial/day reward learning." *Neurobiol Learn Mem* 76(2): 125-37.

Malm, T., M. Ort, et al. (2006). "beta-Amyloid infusion results in delayed and age-dependent learning deficits without role of inflammation or beta-amyloid deposits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23): 8852-7.

Marchesi, V. T. (2005). "An alternative interpretation of the amyloid Abeta hypothesis with regard to the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26): 9093-8.

Martin, R. E. (1998). "Docosahexaenoic acid decreases phospholipase A2 activity in the neurites/nerve growth cones of PC12 cells." *J Neurosci Res* 54(6): 805-13.

Marusic, S., M. W. Leach, et al. (2005). "Cytosolic phospholipase A2 alpha-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Exp Med* 202(6): 841-51.

Marusic, S., P. Thakker, et al. (2008). "Blockade of cytosolic phospholipase A2 alpha prevents experimental autoimmune encephalomyelitis and diminishes development of Th1 and Th17 responses." *J Neuroimmunol* 204(1-2): 29-37.

Marza, E., T. Long, et al. (2008). "Polyunsaturated fatty acids influence synaptojanin localization to regulate synaptic vesicle recycling." *Mol Biol Cell* 19(3): 833-42.

Mashimo, M., T. Hirabayashi, et al. (2008). "Cytosolic PLA2(alpha) activation in Purkinje neurons and its role in AMPA-receptor trafficking." *J Cell Sci* 121(Pt 18): 3015-24.

Masliah, E., M. Mallory, et al. (1995). "Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice." *Exp Neurol* 136(2): 107-22.

Masliah, E., A. Sisk, et al. (2001). "Neurofibrillary pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein." *J Neuropathol Exp Neurol* 60(4): 357-68.

Massicotte, G. (2000). "Modification of glutamate receptors by phospholipase A2: its role in adaptive neural plasticity." *Cell Mol Life Sci* 57(11): 1542-50.

Matsuzawa, A., M. Murakami, et al. (1996). "Release of secretory phospholipase A2 from rat neuronal cells and its possible function in the regulation of catecholamine secretion." *Biochem J* 318 (Pt 2): 701-9.

Matter, M. L., Z. Zhang, et al. (1998). "The alpha5beta1 integrin mediates elimination of amyloid-beta peptide and protects against apoptosis." *J Cell Biol* 141(4): 1019-30.

Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." *Physiol Rev* 77(4): 1081-132.

Maurice, T., B. P. Lockhart, et al. (1996). "Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction." *Brain Res* 706(2): 181-93.

Maurice, T., T. P. Su, et al. (1998). "Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism." *Neuroscience* 83(2): 413-28.

Mawal-Dewan, M., M. L. Schmidt, et al. (1996). "Identification of phosphorylation sites in PHF-TAU from patients with Guam amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex." *J Neuropathol Exp Neurol* 55(10): 1051-9.

Mazanetz, M. P. and P. M. Fischer (2007). "Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases." *Nat Rev Drug Discov* 6(6): 464-79.

Mazzola, C., V. Micale, et al. (2003). "Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade." *Eur J Pharmacol* 477(3): 219-25.

Mc Donald, J. M., G. M. Savva, et al. (2010). "The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia." *Brain* 133(Pt 5): 1328-41.

McConlogue, L., F. Castellano, et al. (1996). "Differential effects of a Rab6 mutant on secretory versus amyloidogenic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein." *J Biol Chem* 271(3): 1343-8.

McDonald, M. P., E. E. Dahl, et al. (1994). "Effects of an exogenous beta-amyloid peptide on retention for spatial learning." *Behav Neural Biol* 62(1): 60-7.

McDonald, M. P. and J. B. Overmier (1998). "Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease." *Neurosci Biobehav Rev* 22(1): 99-120.

McDonald, M. P., J. B. Overmier, et al. (1996). "Reversal of beta-amyloid-induced retention deficit after exposure to training and state cues." *Neurobiol Learn Mem* 65(1): 35-47.

McGeer, P. L., M. Schulzer, et al. (1996). "Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies." *Neurology* 47(2): 425-32.

McKew, J. C., K. L. Lee, et al. (2008). "Indole cytosolic phospholipase A2 alpha inhibitors: discovery and in vitro and in vivo characterization of 4-{3-[5-chloro-2-(2-[[[3,4-dichlorobenzyl)sulfonyl]amino]ethyl)-1-(diphenylmethyl)-1H-indol-3-yl]propyl}benzoic acid, efipladib." *J Med Chem* 51(12): 3388-413.

McLean, C. A., R. A. Cherny, et al. (1999). "Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 46(6): 860-6.

McNicol, A. and T. S. Shibou (1998). "Translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in activated platelets." *Thromb Res* 92(1): 19-26.

Medeiros, R., R. D. Prediger, et al. (2007). "Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein." *J Neurosci* 27(20): 5394-404.

Menendez-Gonzalez, M., P. Perez-Pinera, et al. (2005). "APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade." *Neurodegener Dis* 2(6): 277-83.

Merlos-Suarez, A., S. Ruiz-Paz, et al. (2001). "Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." *J Biol Chem* 276(51): 48510-7.

Meunier, J., J. Ieni, et al. (2006). "The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma1 receptor." *Br J Pharmacol* 149(8): 998-1012.

Miguel-Hidalgo, J. J. and R. Cacabelos (1998). "Beta-amyloid(1-40)-induced neurodegeneration in the rat hippocampal neurons of the CA1 subfield." *Acta Neuropathol* 95(5): 455-65.

Min, J. H., M. K. Jain, et al. (1999). "Membrane-bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase." *Biochemistry* 38(39): 12935-42.

Minogue, A. M., A. M. Lynch, et al. (2007). "Modulation of amyloid-beta-induced and age-associated changes in rat hippocampus by eicosapentaenoic acid." *J Neurochem* 103(3): 914-26.

Minogue, A. M., A. W. Schmid, et al. (2003). "Activation of the c-Jun N-terminal kinase signaling cascade mediates the effect of amyloid-beta on long term potentiation and cell death in hippocampus: a role for interleukin-1beta?" *J Biol Chem* 278(30): 27971-80.

Misura, K. M., R. H. Scheller, et al. (2000). "Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex." *Nature* 404(6776): 355-62.

Miyashita, A., R. G. Crystal, et al. (1995). "Identification of a 27 bp 5'-flanking region element responsible for the low level constitutive expression of the human cytosolic phospholipase A2 gene." *Nucleic Acids Res* 23(2): 293-301.

Mogi, M., J. M. Li, et al. (2008). "Telmisartan prevented cognitive decline partly due to PPAR-gamma activation." *Biochem Biophys Res Commun* 375(3): 446-9.

Mohajeri, M. H., K. D. Saini, et al. (2004). "Transgenic BACE expression in mouse neurons accelerates amyloid plaque pathology." *J Neural Transm* 111(3): 413-25.

Molloy, G. Y., M. Rattray, et al. (1998). "Genes encoding multiple forms of phospholipase A2 are expressed in rat brain." *Neurosci Lett* 258(3): 139-42.

Moran, P. M., L. S. Higgins, et al. (1995). "Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12): 5341-5.

Morelli, L., L. Wei, et al. (1996). "Cerebrovascular amyloidosis in squirrel monkeys and rhesus monkeys: apolipoprotein E genotype." *FEBS Lett* 379(2): 132-4.

Morgan, C., M. Colombres, et al. (2004). "Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease." *Prog Neurobiol* 74(6): 323-49.

Morioka, N., K. Takeda, et al. (2002). "Interleukin-1beta-induced substance P release from rat cultured primary afferent neurons driven by two phospholipase A2 enzymes: secretory type IIA and cytosolic type IV." *J Neurochem* 80(6): 989-97.

Morri, H., M. Ozaki, et al. (1994). "5'-flanking region surrounding a human cytosolic phospholipase A2 gene." *Biochem Biophys Res Commun* 205(1): 6-11.

Morris, R. (1984). "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat." *J Neurosci Methods* 11(1): 47-60.

Mosior, M., D. A. Six, et al. (1998). "Group IV cytosolic phospholipase A2 binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity." *J Biol Chem* 273(4): 2184-91.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.

Mucke, L., E. Masliah, et al. (2000). "High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." *J Neurosci* 20(11): 4050-8.

Munoz, N. M., A. Y. Meliton, et al. (2007). "Deletion of secretory group V phospholipase A2 attenuates cell migration and airway hyperresponsiveness in immunosensitized mice." *J Immunol* 179(7): 4800-7.

Murakami, M. and I. Kudo (2002a). "Phospholipase A2." *J Biochem* 131(3): 285-92.

Murakami, M., Y. Nakatani, et al. (1996). "Type II secretory phospholipase A2 associated with cell surfaces via C-terminal heparin-binding lysine residues augments stimulus-initiated delayed prostaglandin generation." *J Biol Chem* 271(47): 30041-51.

Murakami, M., Y. Taketomi, et al. (2011). "Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans." *Prog Lipid Res* 50(2): 152-92.

Murakami, M., K. Yoshihara, et al. (2002b). "Cellular arachidonate-releasing function and inflammation-associated expression of group IIF secretory phospholipase A2." *J Biol Chem* 277(21): 19145-55.

- Nabeshima, T. and A. Nitta (1994). "Memory impairment and neuronal dysfunction induced by beta-amyloid protein in rats." *Tohoku J Exp Med* 174(3): 241-9.
- Nag, S. and F. Tang (2001). "The effect of age on the response of the rat brains to continuous beta-amyloid infusion." *Brain Res* 889(1-2): 303-7.
- Nag, S., B. K. Yee, et al. (1999a). "Chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1-40) results in a selective loss of neuropeptides in addition to a reduction in choline acetyltransferase activity in the cortical mantle and hippocampus in the rat." *Ann N Y Acad Sci* 897: 420-2.
- Nag, S., B. K. Yee, et al. (1999b). "Reduction in somatostatin and substance P levels and choline acetyltransferase activity in the cortex and hippocampus of the rat after chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1-40)." *Brain Res Bull* 50(4): 251-62.
- Nagele, R. G., J. Wegiel, et al. (2004). "Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 25(5): 663-74.
- Nakagawa, Y., T. Yuzuriha, et al. (2004). "Active clearance of human amyloid beta 1-42 peptide aggregates from the rat ventricular system." *Neuropathology* 24(3): 194-200.
- Nakamura, S., N. Murayama, et al. (2001). "Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide." *Brain Res* 912(2): 128-36.
- Nakamura, S., N. Murayama, et al. (2006). "Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid-beta and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801." *Eur J Pharmacol* 548(1-3): 115-22.
- Nakatani, Y., T. Tanioka, et al. (2000). "Identification of a cellular protein that functionally interacts with the C2 domain of cytosolic phospholipase A(2)alpha." *J Biol Chem* 275(2): 1161-8.
- Nalefski, E. A., L. A. Sultzman, et al. (1994). "Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain." *J Biol Chem* 269(27): 18239-49.
- Neco, P., O. Rossetto, et al. (2003). "Taipoxin induces F-actin fragmentation and enhances release of catecholamines in bovine chromaffin cells." *J Neurochem* 85(2): 329-37.
- Necula, M., R. Kaye, et al. (2007). "Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct." *J Biol Chem* 282(14): 10311-24.
- Neve, R. L., P. Harris, et al. (1986). "Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2." *Brain Res* 387(3): 271-80.
- Nguyen, P. T., T. Kimura, et al. (2007). "Ameliorative effects of a neuroprotective agent, T-817MA, on place learning deficits induced by continuous infusion of amyloid-beta peptide (1-40) in rats." *Hippocampus* 17(6): 443-55.
- Nicotra, A., G. Lupo, et al. (2005). "MAPKs mediate the activation of cytosolic phospholipase A2 by amyloid beta(25-35) peptide in bovine retina pericytes." *Biochim Biophys Acta* 1733(2-3): 172-86.
- Nigam, S. and T. Schewe (2000). "Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation." *Biochim Biophys Acta* 1488(1-2): 167-81.
- Nikolaev, A., T. McLaughlin, et al. (2009). "APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases." *Nature* 457(7232): 981-9.
- Nimmrich, V., C. Grimm, et al. (2008). "Amyloid beta oligomers (A beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents." *J Neurosci* 28(4): 788-97.

Nishimura, M., G. Yu, et al. (1999). "Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of beta-catenin, a component of the presenilin protein complex." *Nat Med* 5(2): 164-9.

Nitta, A., T. Fukuta, et al. (1997). "Continuous infusion of beta-amyloid protein into the rat cerebral ventricle induces learning impairment and neuronal and morphological degeneration." *Jpn J Pharmacol* 73(1): 51-7.

Nitta, A., A. Itoh, et al. (1994). "beta-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model." *Neurosci Lett* 170(1): 63-6.

Nixon, R. A. (2006). "Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat?" *Trends Neurosci* 29(9): 528-35.

Normandin, M., J. Gagne, et al. (1996). "Involvement of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in homosynaptic long-term depression of the rat hippocampus." *Brain Res* 730(1-2): 40-6.

Oakley, H., S. L. Cole, et al. (2006). "Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation." *J Neurosci* 26(40): 10129-40.

Oda, T., P. Wals, et al. (1995). "Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress." *Exp Neurol* 136(1): 22-31.

Oddo, S., L. Billings, et al. (2004). "Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome." *Neuron* 43(3): 321-32.

Oddo, S., A. Caccamo, et al. (2003). "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 24(8): 1063-70.

Oddo, S., A. Caccamo, et al. (2006a). "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* 281(3): 1599-604.

Oddo, S., V. Vasilevko, et al. (2006b). "Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles." *J Biol Chem* 281(51): 39413-23.

Oh, S., H. S. Hong, et al. (2005). "Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells." *Mech Ageing Dev* 126(12): 1292-9.

Ohno, M., E. A. Sametsky, et al. (2004). "BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease." *Neuron* 41(1): 27-33.

Oinuma, H., T. Takamura, et al. (1991). "Synthesis and biological evaluation of substituted benzenesulfonamides as novel potent membrane-bound phospholipase A2 inhibitors." *J Med Chem* 34(7): 2260-7.

Oka, J., E. Suzuki, et al. (2000). "Endogenous GLP-1 is involved in beta-amyloid protein-induced memory impairment and hippocampal neuronal death in rats." *Brain Res* 878(1-2): 194-8.

Okamoto, T., S. Takeda, et al. (1995). "Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor." *J Biol Chem* 270(9): 4205-8.

Olariu, A., M. H. Tran, et al. (2001). "Memory deficits and increased emotionality induced by beta-amyloid (25-35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus." *J Neural Transm* 108(8-9): 1065-79.

Olariu, A., K. Yamada, et al. (2002). "Memory impairment induced by chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1-40) involves downregulation of protein kinase C." *Brain Res* 957(2): 278-86.

O'Mahony, S., T. Harkany, et al. (1998). "Beta-amyloid-induced cholinergic denervation correlates with enhanced nitric oxide synthase activity in rat cerebral cortex: reversal by NMDA receptor blockade." *Brain Res Bull* 45(4): 405-11.

Ong, W. Y., S. F. Ling, et al. (2005). "Injury and recovery of pyramidal neurons in the rat hippocampus after a single episode of oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of ferrous ammonium citrate." *Reprod Nutr Dev* 45(5): 647-62.

Ong, W. Y., X. R. Lu, et al. (2003). "Quinacrine abolishes increases in cytoplasmic phospholipase A2 mRNA levels in the rat hippocampus after kainate-induced neuronal injury." *Exp Brain Res* 148(4): 521-4.

Ono, K., M. M. Condrón, et al. (2009). "Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(35): 14745-50.

Ono, T., K. Yamada, et al. (2002). "Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A2 α , pyrrophenone." *Biochem J* 363(Pt 3): 727-35.

Orlacchio, A., G. Bernardi, et al. (2007). "RNA interference as a tool for Alzheimer's disease therapy." *Mini Rev Med Chem* 7(11): 1166-76.

Palomba, L., M. Bianchi, et al. (2004). "Downregulation of nitric oxide formation by cytosolic phospholipase A2-released arachidonic acid." *Free Radic Biol Med* 36(3): 319-29.

Palomba, L., L. Cerioni, et al. (2009). "Arachidonic acid: a key molecule for astrocyte survival to peroxynitrite." *Glia* 57(15): 1672-9.

Palop, J. J., J. Chin, et al. (2006). "A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases." *Nature* 443(7113): 768-73.

Palop, J. J., J. Chin, et al. (2007). "Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease." *Neuron* 55(5): 697-711.

Palop, J. J., B. Jones, et al. (2003). "Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16): 9572-7.

Panini, S. R., L. Yang, et al. (2001). "Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol." *J Lipid Res* 42(10): 1678-86.

Panza, F., V. Solfrizzi, et al. (2004). "Mediterranean diet and cognitive decline." *Public Health Nutr* 7(7): 959-63.

Parameshwaran, K., M. Dhanasekaran, et al. (2008). "Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation." *Exp Neurol* 210(1): 7-13.

Pardue, S., S. I. Rapoport, et al. (2003). "Co-localization of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in Rhesus monkey cerebellum." *Brain Res Mol Brain Res* 116(1-2): 106-14.

Paris, D., T. Town, et al. (2000). "Novel strategies for opposing murine microglial activation." *Neurosci Lett* 278(1-2): 5-8.

Patel, M. I., J. Singh, et al. (2008). "Cytosolic phospholipase A2- α : a potential therapeutic target for prostate cancer." *Clin Cancer Res* 14(24): 8070-9.

Patrick, G. N., L. Zukerberg, et al. (1999). "Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration." *Nature* 402(6762): 615-22.

Pavia, J., J. Alberch, et al. (2000). "Repeated intracerebroventricular administration of beta-amyloid(25-35) to rats decreases muscarinic receptors in cerebral cortex." *Neurosci Lett* 278(1-2): 69-72.

Pena, L. A., C. W. Brecher, et al. (1995). "beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures." *Brain Res Mol Brain Res* 34(1): 118-26.

Pepicelli, O., E. Fedele, et al. (2002). "In vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the rat hippocampus increases prostaglandin E(2) extracellular levels and triggers lipid peroxidation through cyclooxygenase-mediated mechanisms." *J Neurochem* 81(5): 1028-34.

Peplow, P. V. (1999). "Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61(2): 65-82.

Perez-Severiano, F., R. Salvatierra-Sanchez, et al. (2004). "S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits." *Eur J Pharmacol* 489(3): 197-202.

Petit-Paitel, A. (2010). "[GSK-3beta: a central kinase for neurodegenerative diseases?]." *Med Sci (Paris)* 26(5): 516-21.

Phiel, C. J. and P. S. Klein (2001). "Molecular targets of lithium action." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 789-813.

Phillis, J. W. and M. H. O'Regan (2004). "A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders." *Brain Res Brain Res Rev* 44(1): 13-47.

Pickard, R. T., X. G. Chiou, et al. (1996). "Identification of essential residues for the catalytic function of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine, and arginine." *J Biol Chem* 271(32): 19225-31.

Pickard, R. T., B. A. Striffler, et al. (1999). "Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2." *J Biol Chem* 274(13): 8823-31.

Pike, C. J., A. J. Walencewicz, et al. (1991). "In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity." *Brain Res* 563(1-2): 311-4.

Pillot, T., B. Drouet, et al. (1999). "The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain." *J Neurochem* 73(4): 1626-34.

Pillot, T., M. Goethals, et al. (1996). "Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide." *J Biol Chem* 271(46): 28757-65.

Podlisny, M. B., B. L. Ostaszewski, et al. (1995). "Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture." *J Biol Chem* 270(16): 9564-70.

Podlisny, M. B., D. R. Tolan, et al. (1991). "Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease." *Am J Pathol* 138(6): 1423-35.

Prediger, R. D., J. L. Franco, et al. (2007). "Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response." *Behav Brain Res* 177(2): 205-13.

Prediger, R. D., R. Medeiros, et al. (2008). "Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." *Neuroscience* 151(3): 631-43.

Priller, C., T. Bauer, et al. (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein." *J Neurosci* 26(27): 7212-21.

Qi, J. S. and J. T. Qiao (2001). "Amyloid beta-protein fragment 31-35 forms ion channels in membrane patches excised from rat hippocampal neurons." *Neuroscience* 105(4): 845-52.

- Qiu, Z. H., M. A. Gijon, et al. (1998). "The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages." *J Biol Chem* 273(14): 8203-11.
- Quon, D., Y. Wang, et al. (1991). "Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice." *Nature* 352(6332): 239-41.
- Raber, J., D. Wong, et al. (2000). "Apolipoprotein E and cognitive performance." *Nature* 404(6776): 352-4.
- Ramanadham, S., F. F. Hsu, et al. (1999). "Studies of the role of group VI phospholipase A2 in fatty acid incorporation, phospholipid remodeling, lysophosphatidylcholine generation, and secretagogue-induced arachidonic acid release in pancreatic islets and insulinoma cells." *J Biol Chem* 274(20): 13915-27.
- Ramelot, T. A., L. N. Gentile, et al. (2000). "Transient structure of the amyloid precursor protein cytoplasmic tail indicates preordering of structure for binding to cytosolic factors." *Biochemistry* 39(10): 2714-25.
- Ramsden, M., L. Kotilinek, et al. (2005). "Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L)." *J Neurosci* 25(46): 10637-47.
- Rankin, C. A., Q. Sun, et al. (2008). "Pre-assembled tau filaments phosphorylated by GSK-3b form large tangle-like structures." *Neurobiol Dis* 31(3): 368-77.
- Rao, J. S., R. N. Ertley, et al. (2007a). "Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex." *Mol Psychiatry* 12(2): 151-7.
- Rao, J. S., R. N. Ertley, et al. (2007b). "Chronic NMDA administration to rats up-regulates frontal cortex cytosolic phospholipase A2 and its transcription factor, activator protein-2." *J Neurochem* 102(6): 1918-27.
- Rao, J. S. and S. I. Rapoport (2009). "Mood-stabilizers target the brain arachidonic acid cascade." *Curr Mol Pharmacol* 2(2): 207-14.
- Rapoport, S. I. (2008). "Arachidonic acid and the brain." *J Nutr* 138(12): 2515-20.
- Reddy, P. H. (2006). "Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease." *J Neurochem* 96(1): 1-13.
- Regan-Klapisz, E., V. Krouwer, et al. (2009). "Golgi-associated cPLA2alpha regulates endothelial cell-cell junction integrity by controlling the trafficking of transmembrane junction proteins." *Mol Biol Cell* 20(19): 4225-34.
- Reinhard, C., S. S. Hebert, et al. (2005). "The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function." *EMBO J* 24(23): 3996-4006.
- Renner, M., P. N. Lacor, et al. (2010). "Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5." *Neuron* 66(5): 739-54.
- Reynolds, L. J., L. L. Hughes, et al. (1993). "Metal ion and salt effects on the phospholipase A2, lysophospholipase, and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A2." *Biochim Biophys Acta* 1167(3): 272-80.
- Riendeau, D., J. Guay, et al. (1994). "Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A2, blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets." *J Biol Chem* 269(22): 15619-24.
- Ring, S., S. W. Weyer, et al. (2007). "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* 27(29): 7817-26.

Rizo, J. and T. C. Sudhof (2002). "Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion." *Nat Rev Neurosci* 3(8): 641-53.

Robakis, N. K., H. M. Wisniewski, et al. (1987). "Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome." *Lancet* 1(8529): 384-5.

Roberson, E. D., K. Scarce-Levie, et al. (2007). "Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model." *Science* 316(5825): 750-4.

Roberts, S. B., J. A. Ripellino, et al. (1994). "Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase." *J Biol Chem* 269(4): 3111-6.

Robertson, L. A., K. L. Moya, et al. (2004). "The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* 6(5): 489-95.

Roesler, R., T. Luft, et al. (2006). "Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus." *Neuropharmacology* 51(2): 350-7.

Rogaeva, E., Y. Meng, et al. (2007). "The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease." *Nat Genet* 39(2): 168-77.

Rohn, T. T. and E. Head (2008). "Caspase activation in Alzheimer's disease: early to rise and late to bed." *Rev Neurosci* 19(6): 383-93.

Rohrdanz, E. and R. Kahl (1998). "Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide." *Free Radic Biol Med* 24(1): 27-38.

Ronnback, A., S. Zhu, et al. (2011). "Progressive neuropathology and cognitive decline in a single Arctic APP transgenic mouse model." *Neurobiol Aging* 32(2): 280-92.

Rosales-Corral, S., D. X. Tan, et al. (2004). "Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid-beta onto the hippocampus in vivo." *J Neuroimmunol* 150(1-2): 20-8.

Rosenberger, T. A., N. E. Villacreses, et al. (2003). "Brain lipid metabolism in the cPLA2 knockout mouse." *J Lipid Res* 44(1): 109-17.

Rushworth, J. V. and N. M. Hooper (2010). "Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid-beta Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes." *Int J Alzheimers Dis* 2011: 603052.

Russ, W. P. and D. M. Engelman (2000). "The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association." *J Mol Biol* 296(3): 911-9.

Ryder, J., Y. Su, et al. (2004). "Akt/GSK3beta serine/threonine kinases: evidence for a signalling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations." *Cell Signal* 16(2): 187-200.

Ryu, J. K. and J. G. McLarnon (2006). "Minocycline or iNOS inhibition block 3-nitrotyrosine increases and blood-brain barrier leakiness in amyloid beta-peptide-injected rat hippocampus." *Exp Neurol* 198(2): 552-7.

Ryu, J. K. and J. G. McLarnon (2008). "Thalidomide inhibition of perturbed vasculature and glial-derived tumor necrosis factor-alpha in an animal model of inflamed Alzheimer's disease brain." *Neurobiol Dis* 29(2): 254-66.

Sabo, S. L., A. F. Ikin, et al. (2001). "The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement." *J Cell Biol* 153(7): 1403-14.

Saez-Valero, J., M. L. de Ceballos, et al. (2002). "Changes in molecular isoform distribution of acetylcholinesterase in rat cortex and cerebrospinal fluid after intracerebroventricular administration of amyloid beta-peptide." *Neurosci Lett* 325(3): 199-202.

Sakaguchi, M., H. Murata, et al. (2007). "Truncation of annexin A1 is a regulatory lever for linking epidermal growth factor signaling with cytosolic phospholipase A2 in normal and malignant squamous epithelial cells." *J Biol Chem* 282(49): 35679-86.

Salehi, A., J. D. Delcroix, et al. (2006). "Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration." *Neuron* 51(1): 29-42.

San Pietro, E., M. Capestrano, et al. (2009). "Group IV phospholipase A(2)alpha controls the formation of inter-cisternal continuities involved in intra-Golgi transport." *PLoS Biol* 7(9): e1000194.

Sanchez-Mejia, R. O. and L. Mucke (2010). "Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* 1801(8): 784-90.

Sanchez-Mejia, R. O., J. W. Newman, et al. (2008). "Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." *Nat Neurosci* 11(11): 1311-8.

Sandhya, T. L., W. Y. Ong, et al. (1998). "A light and electron microscopic study of cytoplasmic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in the hippocampus after kainate lesions." *Brain Res* 788(1-2): 223-31.

Sani, S., D. Traul, et al. (2003). "Distribution, progression and chemical composition of cortical amyloid-beta deposits in aged rhesus monkeys: similarities to the human." *Acta Neuropathol* 105(2): 145-56.

Santacruz, K., J. Lewis, et al. (2005). "Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function." *Science* 309(5733): 476-81.

Sarasa, M. and P. Pesini (2009). "Natural non-transgenic animal models for research in Alzheimer's disease." *Curr Alzheimer Res* 6(2): 171-8.

Sardi, S. P., J. Murtie, et al. (2006). "Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain." *Cell* 127(1): 185-97.

Saunders, A. M., W. J. Strittmatter, et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." *Neurology* 43(8): 1467-72.

Schaeffer, E. L. and W. F. Gattaz (2007). "Requirement of hippocampal phospholipase A2 activity for long-term memory retrieval in rats." *J Neural Transm* 114(3): 379-85.

Scheper, W., R. Zwart, et al. (2004). "Rab6 membrane association is dependent of Presenilin 1 and cellular phosphorylation events." *Brain Res Mol Brain Res* 122(1): 17-23.

Scherzer, C. R., K. Offe, et al. (2004). "Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease." *Arch Neurol* 61(8): 1200-5.

Scheuermann, S., B. Hamsch, et al. (2001). "Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease." *J Biol Chem* 276(36): 33923-9.

Schlessinger, J. (2002). "Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor." *Cell* 110(6): 669-72.

Schonknecht, P., D. Lutjohann, et al. (2002). "Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls." *Neurosci Lett* 324(1): 83-5.

Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger, et al. (1998). "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain." *Nature* 393(6683): 382-6.

Schwab, C., M. Hosokawa, et al. (2004). "Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease." *Exp Neurol* 188(1): 52-64.

Schwab, C., A. Klegeris, et al. (2010). "Inflammation in transgenic mouse models of neurodegenerative disorders." *Biochim Biophys Acta* 1802(10): 889-902.

Seiffert, D., T. Mitchell, et al. (2000). "Positive-negative epitope-tagging of beta amyloid precursor protein to identify inhibitors of A beta processing." *Brain Res Mol Brain Res* 84(1-2): 115-26.

Selkoe, D. J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." *Science* 298(5594): 789-91.

Selkoe, D. J. (2004). "Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies." *Ann Intern Med* 140(8): 627-38.

Sengupta, A., J. Kabat, et al. (1998). "Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules." *Arch Biochem Biophys* 357(2): 299-309.

Seno, K., T. Okuno, et al. (2000). "Pyrrolidine inhibitors of human cytosolic phospholipase A(2)." *J Med Chem* 43(6): 1041-4.

Serpell, L. C. (2000). "Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly." *Biochim Biophys Acta* 1502(1): 16-30.

Serrano-Pozo, A., M. P. Frosch, et al. (2011). "Neuropathological alterations in Alzheimer disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 1(1): a006189.

Shah, S., S. F. Lee, et al. (2005). "Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor." *Cell* 122(3): 435-47.

Shaked, G. M., S. Chauv, et al. (2009). "Interactions between the amyloid precursor protein C-terminal domain and G proteins mediate calcium dysregulation and amyloid beta toxicity in Alzheimer's disease." *FEBS J* 276(10): 2736-51.

Shaked, G. M., M. P. Kummer, et al. (2006). "Abeta induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624)." *FASEB J* 20(8): 1254-6.

Shalova, I. N., K. Cechalova, et al. (2007). "Decrease of dehydrogenase activity of cerebral glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in different animal models of Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* 1770(5): 826-32.

Shankar, G. M., B. L. Bloodgood, et al. (2007). "Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway." *J Neurosci* 27(11): 2866-75.

Shanker, G. and M. Aschner (2003). "Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants." *Brain Res Mol Brain Res* 110(1): 85-91.

Sharp, E. S. and M. Gatz (2011). "Relationship between education and dementia: an updated systematic review." *Alzheimer Dis Assoc Disord* 25(4): 289-304.

Sharp, J. D., D. L. White, et al. (1991). "Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2." *J Biol Chem* 266(23): 14850-3.

Sheinin, A., G. Talani, et al. (2008). "Endocannabinoid- and mGluR5-dependent short-term synaptic depression in an isolated neuron/bouton preparation from the hippocampal CA1 region." *J Neurophysiol* 100(2): 1041-52.

Shelat, P. B., M. Chalimoniuk, et al. (2008). "Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons." *J Neurochem* 106(1): 45-55.

Shen, M. Y., G. Hsiao, et al. (2008). "Amyloid beta peptide-activated signal pathways in human platelets." *Eur J Pharmacol* 588(2-3): 259-66.

Sheng, J. G., K. Ito, et al. (1996). "In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis." *Neurobiol Aging* 17(5): 761-6.

Sherrington, R., E. I. Rogaeve, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* 375(6534): 754-60.

- Shi, Q., M. Prior, et al. (2009). "Reduced amyloid deposition in mice overexpressing RTN3 is adversely affected by preformed dystrophic neurites." *J Neurosci* 29(29): 9163-73.
- Shibata, M., S. Yamada, et al. (2000). "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* 106(12): 1489-99.
- Shin, E. J., J. H. Jhoo, et al. (2004). "Protection against kainate neurotoxicity by pyrrolidine dithiocarbamate." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31(5-6): 320-6.
- Shineman, D. W., A. S. Dain, et al. (2009). "Constitutively active Akt inhibits trafficking of amyloid precursor protein and amyloid precursor protein metabolites through feedback inhibition of phosphoinositide 3-kinase." *Biochemistry* 48(17): 3787-94.
- Shinzawa, K., H. Sumi, et al. (2008). "Neuroaxonal dystrophy caused by group VIA phospholipase A2 deficiency in mice: a model of human neurodegenerative disease." *J Neurosci* 28(9): 2212-20.
- Shirai, Y. and M. Ito (2004). "Specific differential expression of phospholipase A2 subtypes in rat cerebellum." *J Neurocytol* 33(3): 297-307.
- Sigurdsson, E. M., J. M. Lee, et al. (1997). "Bilateral injections of amyloid-beta 25-35 into the amygdala of young Fischer rats: behavioral, neurochemical, and time dependent histopathological effects." *Neurobiol Aging* 18(6): 591-608.
- Simonyi, A., Y. He, et al. (2010). "Targeting NADPH oxidase and phospholipases A2 in Alzheimer's disease." *Mol Neurobiol* 41(2-3): 73-86.
- Sinha, S., J. P. Anderson, et al. (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." *Nature* 402(6761): 537-40.
- Sipos, E., A. Kurunczi, et al. (2007). "Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease." *Neuroscience* 147(1): 28-36.
- Sisodia, S. S. (1992). "Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 6075-9.
- Six, D. A. and E. A. Dennis (2000). "The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization." *Biochim Biophys Acta* 1488(1-2): 1-19.
- Sizova, D., E. Charbaut, et al. (2007). "Proteomic analysis of brain tissue from an Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis." *Neurobiol Aging* 28(3): 357-70.
- Sloane, J. A., M. F. Pietropaolo, et al. (1997). "Lack of correlation between plaque burden and cognition in the aged monkey." *Acta Neuropathol* 94(5): 471-8.
- Slunt, H. H., G. Thinakaran, et al. (1994). "Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP)." *J Biol Chem* 269(4): 2637-44.
- Smalheiser, N. R., S. Dissanayake, et al. (1996). "Rapid regulation of neurite outgrowth and retraction by phospholipase A2-derived arachidonic acid and its metabolites." *Brain Res* 721(1-2): 39-48.
- Snyder, E. M., Y. Nong, et al. (2005). "Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta." *Nat Neurosci* 8(8): 1051-8.
- Soba, P., S. Eggert, et al. (2005). "Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion." *EMBO J* 24(20): 3624-34.
- Soderberg, M., C. Edlund, et al. (1991). "Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease." *Lipids* 26(6): 421-5.
- Sokolowska, M., M. Borowiec, et al. (2007). "85-kDa cytosolic phospholipase A2 group IVA gene promoter polymorphisms in patients with severe asthma: a gene expression and case-control study." *Clin Exp Immunol* 150(1): 124-31.

Solans, A., X. Estivill, et al. (2000). "A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase." *Cytogenet Cell Genet* 89(3-4): 177-84.

Song, C., X. J. Chang, et al. (1999). "Molecular characterization of cytosolic phospholipase A2-beta." *J Biol Chem* 274(24): 17063-7.

Sontag, E., A. Luangpirom, et al. (2004). "Altered expression levels of the protein phosphatase 2A ABalphaC enzyme are associated with Alzheimer disease pathology." *J Neuropathol Exp Neurol* 63(4): 287-301.

Soriano, S., D. C. Lu, et al. (2001). "The amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein (APP) is independent of its cleavage by caspases." *J Biol Chem* 276(31): 29045-50.

Sotthibundhu, A., A. M. Sykes, et al. (2008). "Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor." *J Neurosci* 28(15): 3941-6.

Spires, T. L., J. D. Orne, et al. (2006). "Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy." *Am J Pathol* 168(5): 1598-607.

Sponne, I., A. Fife, et al. (2004). "Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide." *FASEB J* 18(7): 836-8.

Stein-Behrens, B., K. Adams, et al. (1992). "Failure of beta-amyloid protein fragment 25-35 to cause hippocampal damage in the rat." *Neurobiol Aging* 13(5): 577-9.

Stella, N., L. Pellerin, et al. (1995). "Modulation of the glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse cortical neurons: involvement of a pH-sensitive membrane phospholipase A2." *J Neurosci* 15(5 Pt 1): 3307-17.

Stepanichev, M., N. A. Lazareva, et al. (1998). "Effects of doses of fragment (25-35) of beta-amyloid peptide on behavior in rats." *Neurosci Behav Physiol* 28(5): 564-6.

Stepanichev, M. Y., Y. V. Moiseeva, et al. (2005). "Studies of the effects of fragment (25-35) of beta-amyloid peptide on the behavior of rats in a radial maze." *Neurosci Behav Physiol* 35(5): 511-8.

Stepanichev, M. Y., Y. V. Moiseeva, et al. (2003a). "Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25-35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats." *Brain Res Bull* 61(2): 197-205.

Stepanichev, M. Y., I. M. Zdobnova, et al. (2003b). "Effects of tumor necrosis factor-alpha central administration on hippocampal damage in rat induced by amyloid beta-peptide (25-35)." *J Neurosci Res* 71(1): 110-20.

Stepanichev, M. Y., I. M. Zdobnova, et al. (2006). "Studies of the effects of central administration of beta-amyloid peptide (25-35): pathomorphological changes in the Hippocampus and impairment of spatial memory." *Neurosci Behav Physiol* 36(1): 101-6.

Stepanichev, M. Y., I. M. Zdobnova, et al. (2004). "Amyloid-beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus." *Physiol Behav* 80(5): 647-55.

Stepanov, I., N. N. Kuznetsova, et al. (2007). "Effects of intracerebroventricular administration of beta-amyloid on the dynamics of learning in purebred and mongrel rats." *Neurosci Behav Physiol* 37(6): 583-90.

Stephan, A., S. Laroche, et al. (2001). "Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits." *J Neurosci* 21(15): 5703-14.

Stephan, A. and A. G. Phillips (2005). "A case for a non-transgenic animal model of Alzheimer's disease." *Genes Brain Behav* 4(3): 157-72.

Stephenson, D., K. Rash, et al. (1999). "Cytosolic phospholipase A2 is induced in reactive glia following different forms of neurodegeneration." *Glia* 27(2): 110-28.

- Stephenson, D. T., C. A. Lemere, et al. (1996). "Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) immunoreactivity is elevated in Alzheimer's disease brain." *Neurobiol Dis* 3(1): 51-63.
- Sticht, H., P. Bayer, et al. (1995). "Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease." *Eur J Biochem* 233(1): 293-8.
- Stine, W. B., Jr., K. N. Dahlgren, et al. (2003). "In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis." *J Biol Chem* 278(13): 11612-22.
- Strokin, M., M. Sergeeva, et al. (2003). "Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca²⁺." *Br J Pharmacol* 139(5): 1014-22.
- Sturchler-Pierrat, C., D. Abramowski, et al. (1997). "Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 13287-92.
- Su, Y., J. Ryder, et al. (2004). "Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing." *Biochemistry* 43(22): 6899-908.
- Sultana, R., W. A. Banks, et al. (2010). "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 Aβ, and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease." *J Neurosci Res* 88(3): 469-77.
- Sun, G. Y., J. Xu, et al. (2004). "Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases." *J Lipid Res* 45(2): 205-13.
- Suzuki, A. (1997). "Amyloid beta-protein induces necrotic cell death mediated by ICE cascade in PC12 cells." *Exp Cell Res* 234(2): 507-11.
- Suzuki, Y. J., H. J. Forman, et al. (1997). "Oxidants as stimulators of signal transduction." *Free Radic Biol Med* 22(1-2): 269-85.
- Sweeney, W. A., J. Luedtke, et al. (1997). "Intrahippocampal injections of exogenous beta-amyloid induce postdelay errors in an eight-arm radial maze." *Neurobiol Learn Mem* 68(1): 97-101.
- Tabuchi, S., N. Uozumi, et al. (2003). "Mice deficient in cytosolic phospholipase A2 are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury." *Acta Neurochir Suppl* 86: 169-72.
- Tai, N., K. Kuwabara, et al. (2010). "Cytosolic phospholipase A2 alpha inhibitor, pyrroxyphene, displays anti-arthritic and anti-bone destructive action in a murine arthritis model." *Inflamm Res* 59(1): 53-62.
- Tajima, H., M. Kawasumi, et al. (2005). "A humanin derivative, S14G-HN, prevents amyloid-beta-induced memory impairment in mice." *J Neurosci Res* 79(5): 714-23.
- Tamayev, R., D. Zhou, et al. (2009). "The interactome of the amyloid beta precursor protein family members is shaped by phosphorylation of their intracellular domains." *Mol Neurodegener* 4: 28.
- Tanaka, S., S. Shiojiri, et al. (1989). "Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain." *Biochem Biophys Res Commun* 165(3): 1406-14.
- Tanaka, T., K. Yamada, et al. (1998). "NC-1900, an active fragment analog of arginine vasopressin, improves learning and memory deficits induced by beta-amyloid protein in rats." *Eur J Pharmacol* 352(2-3): 135-42.
- Tandon, A., H. Yu, et al. (2003). "Brain levels of CDK5 activator p25 are not increased in Alzheimer's or other neurodegenerative diseases with neurofibrillary tangles." *J Neurochem* 86(3): 572-81.
- Tang, J., R. W. Kriz, et al. (1997). "A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs." *J Biol Chem* 272(13): 8567-75.

Tang, Y., K. Yamada, et al. (2000). "Spatiotemporal expression of BDNF in the hippocampus induced by the continuous intracerebroventricular infusion of beta-amyloid in rats." *Brain Res Mol Brain Res* 80(2): 188-97.

Tanzi, R. E., R. D. Moir, et al. (2004). "Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition." *Neuron* 43(5): 605-8.

Tarassishin, L., Y. I. Yin, et al. (2004). "Processing of Notch and amyloid precursor protein by gamma-secretase is spatially distinct." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49): 17050-5.

Tariq, M., H. A. Khan, et al. (2001). "Protective effect of quinacrine on striatal dopamine levels in 6-OHDA and MPTP models of Parkinsonism in rodents." *Brain Res Bull* 54(1): 77-82.

Tay, A., P. Maxwell, et al. (1994). "Cytosolic phospholipase A2 gene expression in rat mesangial cells is regulated post-transcriptionally." *Biochem J* 304 (Pt 2): 417-22.

Tay, A., J. S. Simon, et al. (1995). "Cytosolic phospholipase A2 gene in human and rat: chromosomal localization and polymorphic markers." *Genomics* 26(1): 138-41.

Terranova, J. P., J. P. Kan, et al. (1996). "Administration of amyloid beta-peptides in the rat medial septum causes memory deficits: reversal by SR 57746A, a non-peptide neurotrophic compound." *Neurosci Lett* 213(2): 79-82.

Terry, R. D., E. Masliah, et al. (1991). "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." *Ann Neurol* 30(4): 572-80.

Terwel, D., D. Muijlaert, et al. (2008). "Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice." *Am J Pathol* 172(3): 786-98.

Tesco, G., Y. H. Koh, et al. (2007). "Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity." *Neuron* 54(5): 721-37.

Thinakaran, G., D. R. Borchelt, et al. (1996). "Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo." *Neuron* 17(1): 181-90.

Thinakaran, G. and E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." *J Biol Chem* 283(44): 29615-9.

Thomas, G., F. Bertrand, et al. (2000). "The differential regulation of group II(A) and group V low molecular weight phospholipases A(2) in cultured rat astrocytes." *J Biol Chem* 275(15): 10876-86.

Tohda, C., N. Matsumoto, et al. (2004). "Abeta(25-35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, A metabolite of protopanaxadiol-type saponins." *Neuropsychopharmacology* 29(5): 860-8.

Tohda, C., T. Tamura, et al. (2003). "Repair of amyloid beta(25-35)-induced memory impairment and synaptic loss by a Kampo formula, Zokumei-to." *Brain Res* 990(1-2): 141-7.

Tohda, C., T. Tamura, et al. (2006). "Promotion of axonal maturation and prevention of memory loss in mice by extracts of *Astragalus mongholicus*." *Br J Pharmacol* 149(5): 532-41.

Tomita, T., K. Maruyama, et al. (1997). "The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5): 2025-30.

Tomiya, T., S. Matsuyama, et al. (2010). "A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo." *J Neurosci* 30(14): 4845-56.

Townsend, M., G. M. Shankar, et al. (2006). "Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers." *J Physiol* 572(Pt 2): 477-92.

Tran, M. H., K. Yamada, et al. (2003). "Tyrosine nitration of a synaptic protein synaptophysin contributes to amyloid beta-peptide-induced cholinergic dysfunction." *Mol Psychiatry* 8(4): 407-12.

Trimble, L. A., I. P. Street, et al. (1993). "NMR structural studies of the tight complex between a trifluoromethyl ketone inhibitor and the 85-kDa human phospholipase A2." *Biochemistry* 32(47): 12560-5.

Trommer, B. L., C. Shah, et al. (2004). "ApoE isoform affects LTP in human targeted replacement mice." *Neuroreport* 15(17): 2655-8.

Trommsdorff, M., J. P. Borg, et al. (1998). "Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein." *J Biol Chem* 273(50): 33556-60.

Tsuji, I., T. Zaidi, et al. (2005). "Inhibitors of protein phosphatase-2A from human brain structures, immunocytochemical localization and activities towards dephosphorylation of the Alzheimer type hyperphosphorylated tau." *FEBS Lett* 579(2): 363-72.

Tsunekawa, H., Y. Noda, et al. (2008). "Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25-35)." *Behav Brain Res* 190(2): 224-32.

Tu, B. and N. G. Bazan (2003). "Hippocampal kindling epileptogenesis upregulates neuronal cyclooxygenase-2 expression in neocortex." *Exp Neurol* 179(2): 167-75.

Tucker, D. E., M. Ghosh, et al. (2009). "Role of phosphorylation and basic residues in the catalytic domain of cytosolic phospholipase A2alpha in regulating interfacial kinetics and binding and cellular function." *J Biol Chem* 284(14): 9596-611.

Tyagi, E., R. Agrawal, et al. (2008). "Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain." *J Neuroimmunol* 205(1-2): 51-6.

Tyler, S. J., D. Dawbarn, et al. (2002). "alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease." *Biochem Biophys Res Commun* 299(3): 373-6.

Ulloa, L., E. Montejó de Garcini, et al. (1994). "Microtubule-associated protein MAP1B showing a fetal phosphorylation pattern is present in sites of neurofibrillary degeneration in brains of Alzheimer's disease patients." *Brain Res Mol Brain Res* 26(1-2): 113-22.

Um, M. Y., J. Y. Ahn, et al. (2009). "Sesaminol glucosides protect beta-amyloid peptide-induced cognitive deficits in mice." *Biol Pharm Bull* 32(9): 1516-20.

van der Stelt, M., C. Mazzola, et al. (2006). "Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels." *Cell Mol Life Sci* 63(12): 1410-24.

Van Putten, V., Z. Refaat, et al. (2001). "Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras is mediated through the JNK and ERK pathways in rat epithelial cells." *J Biol Chem* 276(2): 1226-32.

van Rossum, G. S., J. J. Bijvelt, et al. (2002). "Cytosolic phospholipase A2 and lipoxygenase are involved in cell cycle progression in neuroblastoma cells." *Cell Mol Life Sci* 59(1): 181-8.

VanGuilder, H. D., H. Yan, et al. (2010). "Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptome." *J Neurochem* 113(6): 1577-88.

Vassar, R., B. D. Bennett, et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* 286(5440): 735-41.

Verdier, Y. and B. Penke (2004a). "Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease." *Curr Protein Pept Sci* 5(1): 19-31.

Verdier, Y., M. Zarandi, et al. (2004b). "Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease." *J Pept Sci* 10(5): 229-48.

Vermersch, P., J. P. David, et al. (1995). "Cortical mapping of Alzheimer pathology in brains of aged non-demented subjects." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19(6): 1035-47.

Vetrivel, K. S. and G. Thinakaran (2006a). "Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments." *Neurology* 66(2 Suppl 1): S69-73.

- Vetrivel, K. S., Y. W. Zhang, et al. (2006b). "Pathological and physiological functions of presenilins." *Mol Neurodegener* 1: 4.
- Viel, T. A., A. Lima Caetano, et al. (2008). "Increases of kinin B1 and B2 receptors binding sites after brain infusion of amyloid-beta 1-40 peptide in rats." *Neurobiol Aging* 29(12): 1805-14.
- Vigo-Pelfrey, C., D. Lee, et al. (1993). "Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid." *J Neurochem* 61(5): 1965-8.
- Vijayan, S., E. El-Akkad, et al. (2001). "A pool of beta-tubulin is hyperphosphorylated at serine residues in Alzheimer disease brain." *FEBS Lett* 509(3): 375-81.
- von Koch, C. S., H. Zheng, et al. (1997). "Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice." *Neurobiol Aging* 18(6): 661-9.
- von Linstow Roloff, E., B. Platt, et al. (2002). "No spatial working memory deficit in beta-amyloid-exposed rats. A longitudinal study." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26(5): 955-70.
- Vonsattel, J. P., R. H. Myers, et al. (1991). "Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study." *Ann Neurol* 30(5): 637-49.
- Walker, D. G., S. U. Kim, et al. (1995). "Complement and cytokine gene expression in cultured microglial derived from postmortem human brains." *J Neurosci Res* 40(4): 478-93.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* 416(6880): 535-9.
- Walsh, D. M. and D. J. Selkoe (2004). "Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease." *Neuron* 44(1): 181-93.
- Walsh, D. M., M. Townsend, et al. (2005). "Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (A β) fibrillogenesis block oligomerization of natural A β and thereby rescue long-term potentiation." *J Neurosci* 25(10): 2455-62.
- Wang, B., L. Yang, et al. (2007). "Amyloid precursor protein mediates presynaptic localization and activity of the high-affinity choline transporter." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(35): 14140-5.
- Wang, D., Y. Noda, et al. (2007). "The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid₂₅₋₃₅ i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems." *Neuropsychopharmacology* 32(6): 1261-71.
- Wang, F., Z. Liang, et al. (2007). "Nogo-A is involved in secondary axonal degeneration of thalamus in hypertensive rats with focal cortical infarction." *Neurosci Lett* 417(3): 255-60.
- Wang, H. Y., D. H. Lee, et al. (2000). "beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology." *J Biol Chem* 275(8): 5626-32.
- Wang, H. Y., W. Li, et al. (2003). "Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation." *J Biol Chem* 278(34): 31547-53.
- Wang, Q., J. Wu, et al. (2005). "Beta-amyloid inhibition of long-term potentiation is mediated via tumor necrosis factor." *Eur J Neurosci* 22(11): 2827-32.
- Wang, R., H. Y. Zhang, et al. (2001). "Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by beta-amyloid protein-(1-40) in rat." *Eur J Pharmacol* 421(3): 149-56.
- Wang, Y. and Y. Ha (2004). "The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain." *Mol Cell* 15(3): 343-53.
- Weerasinghe, G. R., S. I. Rapoport, et al. (2004). "The effect of chronic lithium on arachidonic acid release and metabolism in rat brain does not involve secretory phospholipase A2 or lipoxygenase/cytochrome P450 pathways." *Brain Res Bull* 63(6): 485-9.

Weerasinghe, G. R., R. Seemann, et al. (2003). "Lithium chloride, administered chronically to rats, does not affect the fractional phosphorylation of brain cytosolic phospholipase A2, while reducing its net protein level." *Brain Res Bull* 59(4): 303-6.

Weidemann, A., S. Eggert, et al. (2002). "A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing." *Biochemistry* 41(8): 2825-35.

Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, et al. (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(5): 1858-62.

Weisman, G. A., R. C. Garrad, et al. (1999). "P2Y receptors in the nervous system: molecular studies of a P2Y2 receptor subtype from NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells." *Prog Brain Res* 120: 33-43.

Weldon, D. T., S. D. Rogers, et al. (1998). "Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo." *J Neurosci* 18(6): 2161-73.

Wells, K., A. A. Farooqui, et al. (1995). "Neural membrane phospholipids in Alzheimer disease." *Neurochem Res* 20(11): 1329-33.

Wen, Y., E. Planel, et al. (2008). "Interplay between cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 beta mediated by neuregulin signaling leads to differential effects on tau phosphorylation and amyloid precursor protein processing." *J Neurosci* 28(10): 2624-32.

Westerman, M. A., D. Cooper-Blacketer, et al. (2002). "The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* 22(5): 1858-67.

White, A. R., F. Maher, et al. (2003). "Diverse fibrillar peptides directly bind the Alzheimer's amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 resulting in cellular accumulation." *Brain Res* 966(2): 231-44.

White, A. R., H. Zheng, et al. (1998). "Survival of cultured neurons from amyloid precursor protein knock-out mice against Alzheimer's amyloid-beta toxicity and oxidative stress." *J Neurosci* 18(16): 6207-17.

Whitson, J. S., C. G. Glabe, et al. (1990). "Beta-amyloid protein promotes neuritic branching in hippocampal cultures." *Neurosci Lett* 110(3): 319-24.

Wick, M. J., S. Blaine, et al. (2005). "Lung Kruppel-like factor (LKLf) is a transcriptional activator of the cytosolic phospholipase A2 alpha promoter." *Biochem J* 387(Pt 1): 239-46.

Willem, M., I. Dewachter, et al. (2004). "beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] double-transgenic mice." *Am J Pathol* 165(5): 1621-31.

Williams, J. H., M. L. Errington, et al. (1989). "Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus." *Nature* 341(6244): 739-42.

Winkler, J., D. J. Connor, et al. (1994). "Lack of long-term effects after beta-amyloid protein injections in rat brain." *Neurobiol Aging* 15(5): 601-7.

Wirths, O., G. Multhaup, et al. (2002). "Intraneuronal APP/A beta trafficking and plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenic mice." *Brain Pathol* 12(3): 275-86.

Wolfe, M. S., W. Xia, et al. (1999). "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." *Nature* 398(6727): 513-7.

Wolozin, B., K. Iwasaki, et al. (1996). "Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation." *Science* 274(5293): 1710-3.

- Wu, C. C., F. Chawla, et al. (2004). "Selective vulnerability of dentate granule cells prior to amyloid deposition in PDAPP mice: digital morphometric analyses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(18): 7141-6.
- Wu, M. N., Y. X. He, et al. (2008). "Alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors are required for the amyloid beta protein-induced suppression of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region in vivo." *Brain Res Bull* 77(2-3): 84-90.
- Wu, T., C. W. Angus, et al. (1997). "P11, a unique member of the S100 family of calcium-binding proteins, interacts with and inhibits the activity of the 85-kDa cytosolic phospholipase A2." *J Biol Chem* 272(27): 17145-53.
- Wu, T., T. Ikezono, et al. (1994). "Characterization of the promoter for the human 85 kDa cytosolic phospholipase A2 gene." *Nucleic Acids Res* 22(23): 5093-8.
- Wu, T., T. Ikezono, et al. (1996). "Tumor necrosis factor-alpha induces the 85-kDa cytosolic phospholipase A2 gene expression in human bronchial epithelial cells." *Biochim Biophys Acta* 1310(2): 175-84.
- Wu, Y. L., X. R. Jiang, et al. (1998). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 protects human leukemic cells from tumor necrosis factor-induced apoptosis via inactivation of cytosolic phospholipase A2." *Cancer Res* 58(4): 633-40.
- Xia, W., J. Zhang, et al. (1997). "Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins." *J Biol Chem* 272(12): 7977-82.
- Xie, L., E. Helmerhorst, et al. (2002). "Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor." *J Neurosci* 22(10): RC221.
- Xu, H., D. Sweeney, et al. (1997). "Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3748-52.
- Xu, J., M. Chalimoniuk, et al. (2003a). "Prostaglandin E2 production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69(6): 437-48.
- Xu, J., Y. I. Weng, et al. (2002). "Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA2 phosphorylation and arachadonic acid release in primary murine astrocytes." *J Neurochem* 83(2): 259-70.
- Xu, J., S. Yu, et al. (2003b). "Oxidant-mediated AA release from astrocytes involves cPLA(2) and iPLA(2)." *Free Radic Biol Med* 34(12): 1531-43.
- Yagami, T., Y. Takahara, et al. (2004). "Amyloid beta protein impairs motor function via thromboxane A2 in the rat striatum." *Neurobiol Dis* 16(3): 481-9.
- Yagami, T., K. Ueda, et al. (2002). "Group IB secretory phospholipase A2 induces neuronal cell death via apoptosis." *J Neurochem* 81(3): 449-61.
- Yagi, K., Y. Shirai, et al. (2004). "Phospholipase A2 products retain a neuron specific gamma isoform of PKC on the plasma membrane through the C1 domain--a molecular mechanism for sustained enzyme activity." *Neurochem Int* 45(1): 39-47.
- Yamada, K., T. Tanaka, et al. (1999a). "Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo." *Eur J Neurosci* 11(1): 83-90.
- Yamada, K., T. Tanaka, et al. (1999b). "Improvement by nefiracetam of beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory impairments in rats." *Br J Pharmacol* 126(1): 235-44.
- Yamada, K., T. Tanaka, et al. (1998). "Propentofylline improves learning and memory deficits in rats induced by beta-amyloid protein-(1-40)." *Eur J Pharmacol* 349(1): 15-22.

- Yamada, M., T. Chiba, et al. (2005). "Implanted cannula-mediated repetitive administration of Abeta25-35 into the mouse cerebral ventricle effectively impairs spatial working memory." *Behav Brain Res* 164(2): 139-46.
- Yamaguchi, Y., H. Miyashita, et al. (2006). "Effects of a novel cognitive enhancer, spiro[imidazo-[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one (ZSET1446), on learning impairments induced by amyloid-beta1-40 in the rat." *J Pharmacol Exp Ther* 317(3): 1079-87.
- Yamazaki, H., H. Bujo, et al. (1996). "Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member." *J Biol Chem* 271(40): 24761-8.
- Yan, J. J., J. Y. Cho, et al. (2001). "Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid." *Br J Pharmacol* 133(1): 89-96.
- Yan, J. J., D. H. Kim, et al. (2004). "Protection against beta-amyloid peptide-induced memory impairment with long-term administration of extract of *Angelica gigas* or decursinol in mice." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28(1): 25-30.
- Yan, R., J. B. Munzner, et al. (2001). "BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells." *J Biol Chem* 276(36): 34019-27.
- Yan, S. D., X. Chen, et al. (1996). "RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease." *Nature* 382(6593): 685-91.
- Yan, S. D., J. Fu, et al. (1997). "An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease." *Nature* 389(6652): 689-95.
- Yang, A. J., D. Chandswangbhuvana, et al. (1998). "Loss of endosomal/lysosomal membrane impermeability is an early event in amyloid Abeta1-42 pathogenesis." *J Neurosci Res* 52(6): 691-8.
- Yang, H. C., M. Mosior, et al. (1999a). "Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A2." *Anal Biochem* 269(2): 278-88.
- Yang, H. C., M. Mosior, et al. (1999b). "Regional distribution, ontogeny, purification, and characterization of the Ca²⁺-independent phospholipase A2 from rat brain." *J Neurochem* 73(3): 1278-87.
- Yang, L. B., K. Lindholm, et al. (2003). "Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease." *Nat Med* 9(1): 3-4.
- Yang, Z. Q., S. F. Yang, et al. (2007). "Protective effects and mechanism of total coptis alkaloids on a beta 25-35 induced learning and memory dysfunction in rats." *Chin J Integr Med* 13(1): 50-4.
- Yankner, B. A., L. R. Dawes, et al. (1989). "Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease." *Science* 245(4916): 417-20.
- Yankner, B. A., L. K. Duffy, et al. (1990). "Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides." *Science* 250(4978): 279-82.
- Yoo, M. H., C. H. Woo, et al. (2001). "Role of the cytosolic phospholipase A2-linked cascade in signaling by an oncogenic, constitutively active Ha-Ras isoform." *J Biol Chem* 276(27): 24645-53.
- Yoshimura, N., S. Seki, et al. (2001). "The involvement of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.8 (PN3/SNS) in a rat model of visceral pain." *J Neurosci* 21(21): 8690-6.
- Young-Pearse, T. L., J. Bai, et al. (2007). "A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference." *J Neurosci* 27(52): 14459-69.
- Youssef, I., S. Florent-Bechard, et al. (2008). "N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis." *Neurobiol Aging* 29(9): 1319-33.

- Yu, H. G., J. A. Huang, et al. (2003). "Inhibition of cytosolic phospholipase A2 mRNA expression: a novel mechanism for acetylsalicylic acid-mediated growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells." *Regul Pept* 114(2-3): 101-7.
- Zaheer, A., S. Zaheer, et al. (2008). "Glia maturation factor modulates beta-amyloid-induced glial activation, inflammatory cytokine/chemokine production and neuronal damage." *Brain Res* 1208: 192-203.
- Zerbinatti, C. V., D. F. Wozniak, et al. (2004). "Increased soluble amyloid-beta peptide and memory deficits in amyloid model mice overexpressing the low-density lipoprotein receptor-related protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(4): 1075-80.
- Zetzsche, T., D. Rujescu, et al. (2010). "Advances and perspectives from genetic research: development of biological markers in Alzheimer's disease." *Expert Rev Mol Diagn* 10(5): 667-90.
- Zhang, Y. W., R. Thompson, et al. (2011). "APP processing in Alzheimer's disease." *Mol Brain* 4: 3.
- Zhao, G., G. Mao, et al. (2004). "Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein." *J Biol Chem* 279(49): 50647-50.
- Zhao, W. Q., F. Santini, et al. (2010). "Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption." *J Biol Chem* 285(10): 7619-32.
- Zheng, H. and E. H. Koo (2006). "The amyloid precursor protein: beyond amyloid." *Mol Neurodegener* 1: 5.
- Zhu, D., Y. Lai, et al. (2006). "Phospholipases A2 mediate amyloid-beta peptide-induced mitochondrial dysfunction." *J Neurosci* 26(43): 11111-9.
- Zou, K., D. Kim, et al. (2003). "Amyloid beta-protein (Abeta)1-40 protects neurons from damage induced by Abeta1-42 in culture and in rat brain." *J Neurochem* 87(3): 609-19.

PUBLICATIONS

Articles

[Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease.](#)

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 Escanyé, Marine Hanse, Ahmad Allouche, Cédric Desbène, Frances T. Yen, Rolf Bjerkvig, Thierry Oster, Simone P. Niclou, and Thierry Pillot.

Journal of Neuroscience. 2010 Juin 2 ; 30 (22) : 7516-27.

[Critical role of cPLA₂ in A \$\beta\$ oligomer-induced neurodegeneration and memory deficit.](#)

Cédric Desbène, Catherine Malaplate-Armand, Ihsen Youssef, Pierre Garcia, Christophe Stenger, Mathilde Sauvée, Nicolas Fischer, Dorine Rimet, Violette Koziel, Marie-Christine Escanyé, Thierry Oster, Badreddine Kriem, Frances T. Yen, Thierry Pillot, Jean-Luc Olivier.

Neurobiol Aging. 2012 Jun;33(6):1123.e17-29.

Revues

[Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease : current update and future directions.](#)

Catherine Malaplate-Armand, Cédric Desbène, Thierry Pillot, Jean-Luc Olivier.

Revue Neurologique (Paris). 2009 Juin-Juil ;165 (6-7) : 511-20.

[The essential role of lipids in Alzheimer's disease.](#)

Sabrina Florent-Béchar, Cédric Desbène, Pierre Garcia, Ahmad Allouche, Ihsen Youssef, Marie-Christine Escanyé, Violette Koziel, Marine Hanse, Catherine Malaplate-Armand, Christophe Stenger, Badreddine Kriem, Frances T. Yen-Potin, Jean-Luc Olivier, Thierry Pillot, Thierry Oster.

Biochimie. 2009 Juin ; 91 (6) : 804-9.

Article 1

[Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease.](#)

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.

[Journal of Neuroscience. 2010 Juin 2 ; 30 \(22\) : 7516-27.](#)

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-beta (A β) 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 β 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 β -related memory deficits. Our data also encourage additional exploration of ex vivo gene transfer for the prevention and/or treatment of AD.

Article 2

[Critical role of cPLA₂ in A \$\beta\$ oligomer-induced neurodegeneration and memory deficit.](#)

Cédric Desbène, Catherine Malaplate-Armand, Ihsen Youssef, Pierre Garcia, Christophe Stenger, Mathilde Sauvée, Nicolas Fischer, Dorine Rimet, Violette Koziel, Marie-Christine Escanyé, Thierry Oster, Badreddine Kriem, Frances T. Yen, Thierry Pillot, Jean-Luc Olivier.

[Neurobiology of Aging. 2012 Juin ; 33 \(6\) : 1123. e17-29.](#)

Soluble beta-amyloid (A β) oligomers are considered to putatively play a critical role in the early synapse loss and cognitive impairment observed in Alzheimer's disease. We previously demonstrated that A β oligomers activate cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂), which specifically releases arachidonic acid from membrane phospholipids. We here observed that cPLA₂ gene inactivation prevented the alterations of cognitive abilities and the reduction of hippocampal synaptic markers levels noticed upon a single intracerebroventricular injection of A β oligomers in wild type mice. We further demonstrated that the A β oligomer-induced sphingomyelinase activation was suppressed and that phosphorylation of Akt/protein kinase B (PKB) was preserved in neuronal cells isolated from cPLA₂^{-/-} mice. Interestingly, expression of the A β precursor protein (APP) was reduced in hippocampus homogenates and neuronal cells from cPLA₂^{-/-} mice, but the relationship with the resistance of these mice to the A β oligomer toxicity requires further investigation. These results therefore show that cPLA₂ plays a key role in the A β oligomer-associated neurodegeneration, and as such represents a potential therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease.

Revue 1

[Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease : current update and future directions.](#)

Catherine Malaplate-Armand, Cédric Desbène, Thierry Pillot, Jean-Luc Olivier.

[Revue Neurologique \(Paris\). 2009 Juin-Juil ;165 \(6-7\) : 511-20.](#)

INTRODUCTION: The increased prevalence of the sporadic form of Alzheimer's disease (AD) has become a significant health issue in the elderly population. The need for early diagnosis is imperative because this, along with the development of novel therapeutic treatments, would permit the rapid and perhaps more efficient treatment of these debilitating disorders early on.

BACKGROUND: Over the last decade, the potential use of certain biomarkers in the cerebrospinal fluid (CSF), and more recently, in the plasma has been investigated. Among the candidates studied includes the neurotoxic amyloid beta peptide and the Tau protein. However, although these two proteins have been clearly shown to be directly related to the pathophysiology of this disorder, it has proven difficult to establish a clear relationship between plasma or CSF levels of Abeta and Tau and the incidence and severity of AD in patients. This is due in part to differences in methodologies related to the detection sensitivity, as well as the variations in the biological data and consequent interpretation of the biochemical and biological data. Peripheral cells, in particular platelets and skin fibroblasts, could be an alternative solution as peripheral biological markers for the early diagnosis of AD. These cells are easily accessible from patients. Furthermore, they would provide a means not only to validate potential therapeutic strategies, but also to study the mechanisms involved in the development of AD, including APP processing.

PERSPECTIVES: A combined strategy using both a fundamental mechanistic and an analytical approach of patient peripheral cells will allow the identification of new biological markers for AD, and hence permit immediate therapeutic strategies to be implemented.

Revue 2

[The essential role of lipids in Alzheimer's disease.](#)

Sabrina Florent-Béchar, Cédric Desbène, Pierre Garcia, Ahmad Allouche, Ihsen Youssef, Marie-Christine Escanyé, Violette Koziel, Marine Hanse, Catherine Malaplate-Armand, Christophe Stenger, Badreddine Kriem, Frances T. Yen-Potin, Jean-Luc Olivier, Thierry Pillot, Thierry Oster.

[Biochimie. 2009 Juin ; 91 \(6\) : 804-9.](#)

In the absence of efficient diagnostic and therapeutic tools, Alzheimer's disease (AD) is a major public health concern due to longer life expectancy in the Western countries. Although the precise cause of AD is still unknown, soluble beta-amyloid (Abeta) oligomers are considered the proximate effectors of the synaptic injury and neuronal death occurring in the early stages of AD. Abeta oligomers may directly interact with the synaptic membrane, leading to impairment of synaptic functions and subsequent signalling pathways triggering neurodegeneration. Therefore, membrane structure and lipid status should be considered determinant factors in Abeta-oligomer-induced synaptic and cell injuries, and therefore AD progression. Numerous epidemiological studies have highlighted close relationships between AD incidence and dietary patterns. Among the nutritional factors involved, lipids significantly influence AD pathogenesis. It is likely that maintenance of adequate membrane lipid content could prevent the production of Abeta peptide as well as its deleterious effects upon its interaction with synaptic membrane, thereby protecting neurons from Abeta-induced neurodegeneration. As major constituents of neuronal lipids, n-3 polyunsaturated fatty acids are of particular interest in the prevention of AD valuable diet ingredients whose neuroprotective properties could be essential for designing preventive nutrition-based strategies. In this review, we discuss the functional relevance of neuronal membrane features with respect to susceptibility to Abeta oligomers and AD pathogenesis, as well as the prospective capacities of lipids to prevent or to delay the disease.

COMMUNICATIONS

[Suppression of cytosolic PLA₂ expression confers resistance to the synaptic dysfunctions and memory alterations induced by \$\beta\$ - amyloid-peptide.](#)

5^{ème} Congrès de Lipidomique

21 au 23 Octobre 2008 - UTC Compiègne, France

[Cytosolic PLA₂ is involved in the early synaptic alterations induced by the amyloid-beta oligomers.](#)

Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease

11 au 16 Juillet 2009 – Vienne, Autriche

[Implication de la phospholipase A₂ cytosolique dans la neurotoxicité des oligomères solubles du peptide \$\beta\$ -amyloïde.](#)

Réunion Nationale d'Automne de l'ANPMCB

10 au 12 Septembre 2009 – Rennes, France

[Implication de la phospholipase A₂ cytosolique dans les processus neurodégénératifs et les altérations mnésiques induites par le peptide A \$\beta\$ oligomérique.](#)

11^{ème} Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés

22 au 24 mai 2012 – Toulouse, France

Communication orale 1

5^{ème} Congrès de Lipidomique

Groupe d'Etude et de Recherche en Lipidomique (GERLI)

21 au 23 Octobre 2008 - UTC Compiègne, France

Suppression of cytosolic PLA₂ expression confers resistance to the synaptic dysfunctions and memory alterations induced by β - amyloid-peptide

Cédric Desbène, Catherine Armand, Badreddine Kriem, Ihsen Yousef, Pierre Garcia, Violette Koziel, Thierry Oster, Jean Luc Olivier, Thierry Pillot

Arachidonic acid is considered as a retrograde synaptic messenger molecule and is involved in memory formation, besides its use as a precursor in eicosanoids synthesis and its role in intracellular transduction pathways. Cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) could be involved in the regulation of synaptic activity through its role in the release of arachidonic acid from post synaptic neuronal membranes. We previously demonstrated that the β -amyloid peptide oligomers (A β), which are the main agents of Alzheimer's disease (AD), stimulates cPLA₂ activity and arachidonic acid release in primary cultured neuronal cells and inhibition of cPLA₂ decreases the neurotoxicity of A β on these cells. Accordingly, treatments with A β oligomers did not induce apoptosis in primary cultured neuronal cells from cPLA₂^{-/-} mice, while A β -treated cells from WT Balb/c mice display decreased survival activities. Then, we investigated the sensitivity of cPLA₂^{-/-} Balb/c mice to the neurotoxicity of A β injected intracerebroventricularly (ICV). WT animals displayed short-term and long-term memory alterations, assessed using Y-maze and Morris water maze tests, while the cognitive performances of cPLA₂^{-/-} were preserved. In parallel, we also examined the synaptic impact of A β in various brain regions. Drastic reductions of the expression levels of post synaptic markers such as synaptophysin, synaptotagmin and PSD95 were observed in hippocampal synaptosomes from WT Balb/c mice after ICV injections of A β oligomers while presynaptic markers (SNAP25) were preserved. On the contrary, no modification of the expression levels of these synaptic markers was found in brain synaptosomes of cPLA₂^{-/-} mice submitted to A β ICV injections. Glial proliferation was evidenced neither in WT Balb/c nor in cPLA₂^{-/-} mice after A β ICV injection. Therefore, sensitivity to A β does not appear associated to a neuroinflammatory reaction in this model. Although the molecular mechanisms of the resistance to A β neurotoxicity of cPLA₂^{-/-} mice are still to be elucidated, these results underline the role of arachidonic acid in synaptic functions and the interest of cPLA₂ as a putative therapeutic target in AD.

Communication orale 2

[Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease](#)

Alzheimer's Association

11 au 16 Juillet 2009 – Vienne, Autriche

Cytosolic PLA₂ is involved in the early synaptic alterations induced by the amyloid-beta oligomers

Jean-Luc Olivier, Cédric Desbène, Catherine Armand, Ihssen Youssef, Pierre Garcia, Badreddine Kriem, Violette Koziel, Sabrina Florent-Bechard, Thierry Oster, Thierry Pillot

Référence Congrès : O4-02-07

Background: Alzheimer's disease involves synaptic dysfunctions in the early steps before neuronal death, lead to the first alterations of cognitive abilities. We previously demonstrate that cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) activation by A β oligomers leads to cell apoptosis in primary cultured neuronal cell [Kriem et al, FASEB J, 2005, 19:85-7]. We also show that ICV injections of low amounts of A β [1-42] oligomers induce rapidly short term and long term memory deficits [Youssef et al, Neurobiol Aging, 2008, 29: 1319-33], which can be found in the prodromal step of Alzheimer disease. We used this model to investigate the role of cPLA₂ in the first cognitive defects and synaptic alterations induced by A β oligomers. Methods: Neuronal primary cultures were prepared from cPLA₂^{-/-} and WT Balb/c embryos. cPLA₂^{-/-} and WT Balb/c mice received an intracerebroventricular (ICV) injection of A β or vehicle. Learning and memory capacities were assessed using Y-maze and Morris water maze tests. Synaptosomes were prepared and expressions of synaptic markers and AMPA receptors were measured by western-blotting. Results: The wild type animals displayed short-term and long-term memory alterations while the cognitive performances of cPLA₂^{-/-} mice were preserved. Treatments by A β oligomers did not induce apoptosis in primary cultured neuronal cells from cPLA₂^{-/-} mice on the contrary to those from WT Balb/c mice which also exhibited reduced levels of PSD95 expression. Drastic reductions of the expression levels of the pre synaptic synaptophysin and synaptotagmin as well as the post synaptic PSD95 were observed in hippocampal synaptosomes from WT Balb/c mice after ICV injections of A β while the expressions of these synaptic markers were maintained in brain synaptosomes of cPLA₂^{-/-} mice. The expression of presynaptic SNAP25 was preserved in both mouse types. Expression of the NR2/3 subunit of AMPA receptor was almost abolished in WT Balb/c mice after ICV injections of A β while cPLA₂^{-/-} mice displayed normal levels of NR2/3 expression. No intense neuroinflammatory reaction was observed in these experiments. Conclusions: These results underline the role of arachidonic acid in synaptic functions and the interest of cPLA₂ as a putative therapeutic target in the early steps of Alzheimer's disease.

Communication orale 3

[Réunion Nationale d'Automne de l'ANPMCB](#)

Association Nationale des Professeurs et Maîtres de Conférences Biochimistes des UFR Médicales (ANPMCB)

10 au 12 Septembre 2009 – Rennes, France

Implication de la phospholipase A₂ cytosolique dans la neurotoxicité des oligomères solubles du peptide β -amyloïde

Cédric Desbène, Catherine Malaplate-Armand, Thierry Pillot, Jean-Luc Olivier

Contexte : Plusieurs études expérimentales, épidémiologiques et/ou cliniques ont montré que le statut lipidique constitue un déterminant majeur du vieillissement normal et pathologique du système nerveux. Diverses altérations ont été rapportées au cours de la maladie d'Alzheimer (MA), notamment dans le métabolisme des phospholipides. Dans des cultures neurones primaires, nous avons précédemment démontré que l'inhibition de la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂) par diverses approches, conférait une protection partielle contre l'apoptose induite par les oligomères solubles de peptide β -amyloïde (sA β), acteur majeur de la MA. De plus, des neurones obtenus à partir de souris cPLA₂^{-/-} présentent une résistance totale à l'apoptose induite par sA β .

Objectif : Afin d'explorer l'origine de cette protection et les mécanismes moléculaires sous-jacents, nous avons cherché à établir si les effets neuroprotecteurs de l'inactivation constitutive de la cPLA₂ observée *in vitro* se vérifiaient *in vivo*. Grâce à un modèle d'exposition aiguë à sA β développé au laboratoire, nous avons comparé les effets comportementaux et moléculaires de sA β observés chez les souris sauvages et cPLA₂ KO.

Méthode : L'administration intra-cérébroventriculaire de sA β (1-42) ou de sérum physiologique (contrôles) est suivie de deux tests comportementaux, destinés à apprécier d'une la mémoire à court terme (labyrinthe en Y) et d'autre part les capacités d'apprentissage et de mémorisation à long terme (piscine de Morris). Les animaux sont ensuite sacrifiés afin d'évaluer l'expression hippocampique de différentes protéines synaptiques, dans le but de corrélérer une éventuelle protection contre les troubles cognitifs au maintien de l'intégrité synaptique.

Résultats : L'exposition aiguë à sA β entraîne une altération importante des capacités de mémorisation chez les souris sauvages ($p < 0,001$), tandis que les performances des souris cPLA₂^{-/-} demeurent identiques aux souris ayant reçu le véhicule, quel que soit le test considéré. L'étude par immunoblot révèle que l'injection de sA β est responsable, chez les souris sauvages, d'une diminution sélective de certaines protéines pré- et post-synaptiques indispensables à la fonctionnalité synaptique, (synaptophysine, la synaptotagmine, PSD95 ou la sous-unité 2/3 du récepteur AMPA au glutamate). A l'inverse, l'expression de ces marqueurs est maintenue chez les animaux cPLA₂^{-/-} ayant reçu sA β .

Conclusion : La souris cPLA₂^{-/-} présente une résistance totale contre la neurotoxicité de sA β , à la fois *in vitro* et *in vivo*, tant sur le plan moléculaire que comportemental. Les résultats présentés ici et ceux précédemment obtenus montrent que la cPLA₂ est un acteur clé dans la dégénérescence neuronale et les altérations synaptiques induites par sA β . Bien que les mécanismes et les partenaires impliqués restent à déterminer, ces données confirment que la cPLA₂ représente une cible thérapeutique d'intérêt dans les stades précoces de la maladie d'Alzheimer.

Communication orale 4

11^{ème} Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés

Société Française de Gériatrie et Gérontologie
Société de Neuropsychologie de Langue Française
Fédération Nationale des CMRR
Société Française de Neuropathologie
22 au 24 mai 2012 – Toulouse

Implication de la phospholipase A₂ cytosolique dans les processus neurodégénératifs et les altérations mnésiques induites par le peptide A β oligomérique

Catherine Malaplate-Armand, Cédric Desbène, Mathilde Sauvée, Frances Yen-Potin, Thierry Oster, Jean-Luc Olivier
Référence Congrès : O3-6

Les oligomères solubles de peptide Bêta-amyloïde (A β) apparaissent comme les acteurs majeurs de la perte synaptique précoce observée au cours de la maladie d'Alzheimer. Notre équipe a précédemment montré que ces oligomères de peptide A β activaient la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂), qui entraîne la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. En utilisant un modèle d'injection intra cérébro ventriculaire unique d'une faible quantité de peptide A β , nous avons pu observer que l'inactivation constitutive du gène de la cPLA₂ protégeait les souris KO contre les perturbations mnésiques et empêchait la réduction de l'expression de protéines synaptiques au sein de l'hippocampe, ces deux effets délétères étant constatés chez les animaux wild-type. Par la suite, nous avons montré que l'activation des sphingomyélinases, consécutive à l'exposition aux oligomères A β , était indétectable dans des neurones en culture issus de souris KO. Dans ces mêmes neurones KO, nous avons constaté que la phosphorylation de Akt/PKB n'était pas altérée suite à l'exposition des cellules aux oligomères A β . Enfin, nous avons pu mettre en évidence une diminution de l'expression de la protéine précurseur du peptide A β (protéine APP), tant au niveau d'homogénats hippocampiques que de neurones en cultures, issus de souris KO. Néanmoins, des travaux supplémentaires sont requis pour établir le lien exact entre cette réduction de l'expression d'APP et la résistance aux oligomères A β , tant in vitro qu'in vivo. Toutefois, ces résultats soulignent l'implication de la cPLA₂ dans la neuro dégénérescence entraînée par les oligomères A β , et font apparaitre cette enzyme comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Implication de la phospholipase A₂ cytoplasmique (cPLA₂) dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer

RESUME

Les oligomères solubles de peptide Bêta-amyloïde (A β) apparaissent comme les acteurs majeurs de la perte synaptique précoce observée au cours de la maladie d'Alzheimer. Notre équipe a précédemment montré que ces oligomères de peptide A β activaient la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂), qui entraîne la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. En utilisant un modèle d'injection intra cérébro ventriculaire unique d'une faible quantité de peptide A β , nous avons pu observer que l'inactivation constitutive du gène de la cPLA₂ protégeait les souris KO contre les perturbations mnésiques et empêchait la réduction de l'expression de protéines synaptiques au sein de l'hippocampe, ces deux effets délétères étant constatés chez les animaux *wild-type*. Par la suite, nous avons montré que l'activation des sphingomyélinases, consécutive à l'exposition aux oligomères A β , était indétectable dans des neurones en culture issus de souris KO. Dans ces mêmes neurones KO, nous avons constaté que la phosphorylation d'Akt/PKB n'était pas altérée suite à l'exposition des cellules aux oligomères A β . Enfin, nous avons pu mettre en évidence une diminution de l'expression de la protéine précurseur du peptide A β (protéine APP), tant au niveau d'homogénats hippocampiques que de neurones en cultures, issus de souris KO. Néanmoins, des travaux supplémentaires sont requis pour établir le lien exact entre cette réduction de l'expression d'APP et la résistance aux oligomères A β , tant *in vitro* qu'*in vivo*. Toutefois, ces résultats soulignent l'implication de la cPLA₂ dans la neuro dégénérescence entraînée par les oligomères A β , et font apparaître cette enzyme comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

MOTS CLES : Maladie d'Alzheimer, Phospholipase A₂ cytosolique, Oligomères solubles de peptide Bêta-amyloïde, Synaptotoxicité, Protéine précurseur du peptide Bêta-amyloïde

Involvement of cytosolic phospholipase A₂ in Alzheimer's disease pathogenesis

SUMMARY

Soluble beta-amyloid (A β) oligomers putatively play a critical role in the early synapse loss and cognitive impairment observed in Alzheimer's disease. We previously demonstrated that A β oligomers activate cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) which specifically releases arachidonic acid from membrane phospholipids. By using a single A β oligomers intra cerebro ventricular injection, we observed that cPLA₂ gene suppression prevented both the alterations of cognitive abilities and the reduction of hippocampal synaptic markers levels which were observed in wild type mice. We further demonstrated that the A β oligomers-induced sphingomyelinase activation was suppressed and that the phosphorylation of Akt/PKB was preserved in neuronal cells isolated from KO mice. Interestingly, expression of the A β precursor protein (APP) was reduced in hippocampus homogenates and neuronal cells from KO mice, but the relationship with the resistance of these mice to the A β oligomers toxicity requires further investigation. These results therefore show that cPLA₂ plays a key role in the A β oligomers-associated neurodegenerative effects, and as such represents a potential therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease.

KEYWORDS : Alzheimer's disease, Cytosolic phospholipase A₂, Beta-amyloid oligomers, Synaptotoxicity, Amyloid precursor protein