



Lipides et maladie d'Alzheimer : influence du statut et de la signalisation lipidiques sur la neurodégénérescence induite par le peptide AB soluble

Sabrina Florent Bechard

► To cite this version:

Sabrina Florent Bechard. Lipides et maladie d'Alzheimer : influence du statut et de la signalisation lipidiques sur la neurodégénérescence induite par le peptide AB soluble. Médecine humaine et pathologie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006. Français. NNT : 2006INPL063N . tel-01752762

HAL Id: tel-01752762

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752762>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Dr. F. YEN-POTIN, DR2 INSERM, Président
Pr. J. CHAMBAZ, PUPH, Rapporteur
Dr. J. CHABRY, CR1 INSERM, Rapporteur
Pr. S. DESOBRY, PU, Examineur
Dr. T. PILLOT, DR2 INSERM, Examineur
Dr. T. OSTER, MCU, Membre invité

À mon père, À ma mère,

À Geoffroy

Ce travail a été réalisé
au sein de la jeune équipe **Lipidomix JE 2482** (*Directrice : Dr. Frances Yen-Potin*),
Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), Nancy
dans le **laboratoire de Médecine et Thérapeutique Moléculaire**
sous la direction du *Dr. Thierry Pillot*
grâce au soutien financier de la **société Genclis** (*Directeur : Bernard Bihain*).

Publications

Florent S., Malaplate-Armand, C., Youssef, I., Kriem, B., Koziel, V., Escanyé, M.-C., Fifre, A., Sponne, I., Leininger-Muller, B., Oliver, J.-L., Pillot, T. and Oster, T. (2006).

Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid- β oligomers.

J. Neurochem. **96**, 395-395.

Malaplate-Armand, C., Florent-Béchar, S., Youssef, I., Koziel, V., Sponne, I., Kriem, B., Leininger-Muller, B., Olivier, J.-L., Oster, T. and Pillot, T. (2006).

Soluble oligomers of amyloid- β peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA₂-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway.

Neurobiol.Dis. **23**, 178-189.

Youssef, I., Florent-Béchar, S., Malaplate-Armand, C., Koziel, V., Kriem, B., Olivier, J.-L., Oster, T., Leininger-Muller, B. and Pillot, T.

N-truncated amyloid- β oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis.

Soumis.

Poster

Florent-Béchar, S., Malaplate-Armand, C., Kriem, B., Koziel, V., Pillot, T. and Oster, T. (Nov. 2005).

Docosahexaenoic acid promotes neuronal survival pathways upon exposure to soluble amyloid- β oligomers. Colloque de la Société de Biologie Cellulaire de France, Paris.

Remerciements

A notre équipe de travail, à l'édifice qu'elle essaie de construire et auquel j'espère avoir apporté quelques pierres.

A M. T. Pillot, dont les fulgurantes démonstrations scientifiques me montrent chaque jour le chemin qu'il me reste à parcourir. Je le remercie en particulier pour l'étonnante dualité dont il sait faire preuve et qui permet à de nombreuses qualités de se côtoyer parmi lesquelles l'intransigeance et la tolérance, l'exigence et la patience, le sérieux et l'humour pour ne citer qu'elles.

A M. T. Oster, pour sa disponibilité et son encadrement sans faille. Pour l'ouverture d'esprit qui le caractérise et qui m'a permis tout au long de ma thèse de pouvoir m'exprimer de façon spontanée, un grand merci s'impose. Pour la patience dont il a eu besoin pour rester calme et compréhensif quelques soient mes doutes, mes questions ou mon entêtement, je le remercie encore.

A Mme V. Koziel, dont le temps, l'investissement, l'écoute et le soutien, bien que souvent sollicités ne sont jamais comptés.

A Mme C. Malaplate-Armand pour ses conseils avisés qui m'ont été d'une aide précieuse lors de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie également le Pr. J. -L. Olivier de m'avoir accueillie dans le service de biochimie de l'hôpital central de Nancy et ainsi de m'avoir permis de disposer des techniques de cytométrie en flux, de chromatographie en phase gazeuse et de chromatographie haute performance en phase inversée. A ce propos j'adresse ma gratitude à Mme M. -C. Escanyé et à Mme R. Verdun pour m'avoir permis d'appréhender ces techniques et pour avoir répondu avec compétence, patience et bonne humeur à mes questions.

De la même façon, je remercie le Pr. M. Parmentier, le Dr. M. Linder ainsi que le Dr. J. Fanny du Laboratoire de Science et Génie Alimentaire (ENSAIA, Nancy) pour les préparations

enrichies en phospholipides ainsi que pour la disponibilité et la compétence dont ils ont su faire preuve lors des analyses de statut lipidique par Iatroscan.

*Enfin, je remercie **Mme Céline Hoffmann**, du service de microscopie et d'imagerie du centre de recherche publique en Santé de Luxembourg dont l'accueil et les compétences ont permis l'obtention des clichés de microscopie confocale présentés dans ce travail.*

*Ces remerciements vont également à **M. Bernard Bihain**, représentant de la société Genclis qui a financé ce projet et m'a permis de travailler au sein de son entreprise. Pour son soutien financier, je remercie également l'association **Alzheimer 57 Nord**.*

*Je voudrais également remercier **M. J. Chambaz** et **Mme J. Chabry** pour avoir accepté la fonction de rapporteur ainsi que **M. S. Desobry** et **Mme. F. Yen-Potin**, pour avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury de thèse.*

***A mes parents**, qu'ils voient en ce travail le témoignage de ma reconnaissance pour leur soutien inconditionnel et de ma volonté de ne jamais les décevoir.*

A mon mari** qui, à mes côtés depuis le début, affronte sans broncher, examen après examen, les doutes, les répétitions, les coups de stress et les coups de déprime, pour son infinie patience, **MERCI!

SOMMAIRE

INDEX DES FIGURES.....	5
INDEX DES TABLEAUX.....	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	10
1. GENERALITES.....	10
1-1. Historique	10
1-2. La maladie d'Alzheimer, un problème de santé publique.....	11
1-3. Prévalence de la maladie d'Alzheimer	12
1-3-1. Répartition en fonction de l'âge	12
1-3-2. Répartition en fonction du genre.....	12
1-3-3. Niveau d'éducation et réseau social.....	12
1-3-4. Facteurs nutritionnels.....	13
1-4. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer.....	14
1-4-1. Éléments de diagnostic	14
1-4-1-1. Diagnostic clinique.....	15
1-4-1-2. Tests neuropsychologiques.....	15
1-4-1-3. Imagerie médicale	15
1-4-1-4. Marqueurs biologiques	17
1-4-2. Stratégies thérapeutiques.....	18
2. CARACTERISTIQUES PHYSIOPATHOLOGIQUES ET HYPOTHESES ATTENANTES	19
2-1. L'hypothèse tauiste	19
2-1-1. Histopathologie.....	19
2-1-2. La protéine <i>Tau</i>	21
2-1-2-1. Expression de la protéine <i>Tau</i>	21
2-1-2-2. Organisation génique.....	22
2-1-2-3. Structure primaire de la protéine <i>Tau</i>	23
2-1-2-4. Modifications post-traductionnelles	23
2-1-2-5. Formation et maturation des PHF.....	26
2-2. L'hypothèse myéloïste.....	28
2-2-1. Histopathologie.....	28
2-2-1-1. Les plaques diffuses	29
2-2-1-2. Les plaques séniles	29
2-2-1-3. Les dépôts amyloïdes cérébrovasculaires.....	30
2-2-2. Mécanismes moléculaires de la cascade amyloïde.....	31
2-2-2-1. La protéine APP	31
2-2-2-2. Clivage protéolytique de l'APP.....	34
2-2-3. Le peptide amyloïde β	37
2-2-3-1. Implication des formes solubles dans les phases précoces de la MA	38
2-2-3-2. Fibrillogenèse	42
2-2-3-3. Précipitation et formation des plaques.....	43
2-2-3-4. Mécanismes cytotoxiques associés aux peptides A β	44
2-3. La perte neuronale et synaptique.....	46
2-3-1. La nécrose.....	46
2-3-1-1. Caractéristiques morphologiques	46
2-3-1-2. Mécanismes moléculaires.....	47
2-3-2. L'apoptose	47
2-3-2-1. Caractéristiques morphologiques	48
2-3-2-2. Mécanismes moléculaires.....	49
2-3-3. Contribution relative des processus apoptotique et nécrotique dans la MA.....	58
2-4. Formes familiales et sporadiques de la MA, réconciliation des 2 hypothèses.....	60
2-4-1. Les formes familiales de la maladie d'Alzheimer.....	60
2-4-1-1. Le gène de l'APP.....	60
2-4-1-2. Les gènes PSEN	61
2-4-2. Les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer.....	63
2-4-2-1. L'apolipoprotéine E4, principal facteur de risque	63
2-4-2-2. L'insulysine	65
2-4-2-3. La néprilysine	66

3. LE METABOLISME LIPIDIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	66
3-1. Cholestérol et maladie d'Alzheimer	66
3-1-1. Métabolisme du cholestérol	66
3-1-1-1. Acquisition du cholestérol par le système nerveux central	66
3-1-1-2. Élimination du cholestérol	69
3-1-2. Le cholestérol, essentiel à l'intégrité neuronale et au développement cérébral	70
3-1-2-1. Le cholestérol dans les membranes neuronales	70
3-1-2-2. Le cholestérol, précurseur des stéroïdes	71
3-1-3. Implications dans la maladie d'Alzheimer	71
3-1-3-1. Études épidémiologiques	71
3-1-3-2. Métabolisme du cholestérol dans les modèles expérimentaux de MA	72
3-1-3-3. Les statines, un traitement préventif de la MA ?	73
3-2. Sphingolipides et maladie d'Alzheimer	74
3-2-1. Les glycosphingolipides	74
3-2-1-1. Les cérébrosides	74
3-2-1-2. Les sulfatides	74
3-2-1-3. Les gangliosides	75
3-2-2. Les sphingolipides	76
3-2-2-1. Cycle des sphingolipides	76
3-2-2-2. La sphingomyéline	77
3-2-2-3. Les céramides	79
3-2-2-4. Les sphingosines	81
3-2-2-5. Les autres métabolites	83
3-3. Les phospholipides	83
3-3-1. Métabolisme des phospholipides	83
3-3-2. Les acides gras	84
3-3-2-1. Métabolisme des acides gras	84
3-3-2-2. Les acides gras, molécules essentielles du système nerveux central	86
3-3-2-3. Les acides gras, précurseurs de composés bioactifs	89
3-3-2-4. Régulation de l'expression génique par les acides gras	92
3-4. Les microdomaines membranaires	94
3-4-1. La membrane plasmique, un concept en évolution	94
3-4-2. Caractéristiques des radeaux lipidiques	95
3-4-2-1. Caractéristiques physicochimiques	95
3-4-2-2. Diversité des radeaux lipidiques	96
3-4-3. Fonctions des radeaux lipidiques	98
3-4-3-1. Implication dans les processus d'endo- et d'exocytose	98
3-4-3-2. Radeaux lipidiques et homéostasie du cholestérol	101
3-4-3-3. Signalosomes et modulation des signaux de transduction	102
HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS	104
MATÉRIELS ET MÉTHODES	107
1. MODELES EXPERIMENTAUX	107
1-1. Cultures primaires de neurones corticaux de rat	107
1-1-1. Animaux	107
1-1-2. Mise en culture des neurones	107
1-1-3. Traitements	108
1-1-3-1. Traitements par le peptide A β soluble	108
1-1-3-2. Traitements par les acides gras et lipides	109
1-1-3-3. Traitements par les agents antioxydants	110
1-1-3-4. Traitements par les inhibiteurs	110
1-1-3-5. Stratégie antisens	111
1-2. Lignée cellulaire Neuro2A	111
1-2-1. Choix de la lignée	111
1-2-2. Entretien de la lignée	111
1-2-3. Congélation et décongélation des stocks	112
1-2-4. Conditions de culture	112
1-2-4-1. Différenciation en neurones	112
1-2-4-2. Traitements	112
1-3. Synaptosomes corticaux de rat	113
1-3-1. Préparation et purification des synaptosomes corticaux de rat	113
1-3-2. Dosage des protéines	113
1-3-3. Traitements	113
2. ÉTUDE DE LA VIABILITE CELLULAIRE ET DES MARQUEURS D'APOPTOSE	114
2-1. Test d'activité mitochondriale	114

2-1-1. Test au MTT	114
2-1-1-1. Principe	114
2-1-1-2. Protocole expérimental	114
2-1-2. Marquage par la sonde Mitotracker	114
2-1-2-1. Principe	114
2-1-2-2. Analyse quantitative par cytométrie en flux	114
2-2. Évaluation de l'intégrité membranaire	115
2-2-1. Marquage cellulaire par la calcéine	115
2-2-1-1. Principe	115
2-2-1-2. Protocole expérimental	116
2-2-2. Libération de la lactate déshydrogénase	116
2-2-2-1. Principe	116
2-2-2-2. Protocole expérimental	116
2-3. Étude du cycle cellulaire	117
2-3-1. Principe	117
2-3-2. Protocole expérimental	117
2-4. Marqueurs morphologiques de l'apoptose	117
2-4-1. Visualisation des corps apoptotiques	117
2-4-1-1. Principe	117
2-4-1-2. Protocole expérimental	118
2-4-2. Perte de l'intégrité du cytosquelette	118
2-4-2-1. Principe	118
2-4-2-2. Protocole expérimental	118
2-5. Voies de signalisation impliquées dans la mort neuronale	119
2-5-1. Marquage par immunofluorescence	119
2-5-2. Microscopie confocale	119
2-5-2-1. Principe	119
2-5-2-2. Protocole expérimental	120
2-5-3. Immunoblots	120
2-5-3-1. Préparation des extraits cellulaires	120
2-5-3-2. Électrophorèse	120
2-5-3-3. Électrotransfert	121
2-5-3-4. Immunorévélation des protéines	121
2-5-4. Tests fonctionnels	121
2-5-4-1. Mesure de l'activité de la phospholipase A ₂ cytosolique	121
2-5-4-2. Mesure de l'activation des caspases	122
2-5-4-3. Mesure de l'activation des sphingomyélinases	122
3. ÉVALUATION DU STRESS OXYDANT	122
3-1. Dosage du glutathion intracellulaire	122
3-1-1. Préparation des échantillons	122
3-1-2. Protocole expérimental	123
3-2. Immunodétection des adduits protéine-4-hydroxynonéol	124
4. ÉTUDE DU STATUT LIPIDIQUE ET DE L'ARCHITECTURE MEMBRANAIRE	124
4-1. Extraction et purification des microdomaines membranaires	124
4-1-1. Séparation des fractions membranaires	124
4-1-2. Analyse de la composition des fractions obtenues	125
4-1-2-1. Dosage du cholestérol	125
4-1-2-2. Immunodétection des marqueurs spécifiques	126
4-2. Analyse du profil lipidique par Iatroscan	126
4-2-1. Principe	126
4-2-2. Préparation des échantillons	126
4-3. Séparation des phospholipides	127
4-3-1. Principe	127
4-3-2. Préparation des échantillons	127
4-4. Dosage des acides gras	128
4-4-1. Principe	128
4-4-2. Protocole expérimental	128
5. MARQUAGE DES RAFTS <i>IN SITU</i>	128
6. ANALYSES STATISTIQUES	129
RÉSULTATS ET DISCUSSION	130
I. L'APOPTOSE NEURONALE INDUITE PAR LES OLIGOMERES SOLUBLES DE PEPTIDE AMYLOÏDE-B IMPLIQUE L'ACTIVATION DES SPHINGOMYELINASES EN CONSEQUENCE DE CELLE DE LA PHOSPHOLIPASE A ₂ CYTOSOLIQUE	130
1. INTRODUCTION	130

2. STRATEGIE EXPERIMENTALE	130
3. RESULTATS ET DISCUSSION	131
3-1. <i>L'acide arachidonique est un médiateur pro-apoptotique</i>	131
3-2. <i>Le peptide amyloïde-β soluble induit l'apoptose en activant les sphingomyélinases</i>	133
3-2-1. Activation des sphingomyélinases par le peptide amyloïde-β soluble	133
3-2-2. Implication de l'activation des sphingomyélinases dans l'apoptose induite par le peptide amyloïde-β soluble.....	135
3-2-3. La phospholipase A ₂ cytosolique, levier de la neurotoxicité des peptides amyloïdes-β solubles	137
3-2-3-1. La phospholipase A ₂ est une source de médiateurs neurotoxiques	137
3-2-3-2. L'activation de la phospholipase A ₂ cytosolique est nécessaire à celle des sphingomyélinases.....	138
3-2-4. Importance du stress oxydant dans l'activation des sphingomyélinases	139
3-2-5. Cibles cellulaires potentielles des céramides	140
3-2-5-1. La cathepsine D	140
3-2-5-2. Les caspases	140
3-2-5-3. Activation de la voie JNK/p38	140
3-3. <i>La sphingosine-1-phosphate possède un potentiel neuroprotecteur</i>	141
PUBLICATION # 1	145
II. L'ACIDE DOCOSAHEXAENOÏQUE PREVIENT L'APOPTOSE NEURONALE INDUITE PAR LES OLIGOMERES SOLUBLES DE PEPTIDE AMYLOÏDE-B	158
1. INTRODUCTION.....	158
2. DEMARCHE EXPERIMENTALE	159
3. RESULTATS ET DISCUSSION	160
3-1. <i>Effets neurotrophiques de l'acide docosahexaénoïque</i>	160
3-2. <i>Incorporation membranaire de l'acide docosahexaénoïque</i>	163
3-2-1. Incorporation dans les membranes neuronales.....	163
3-2-1-1. Statut lipidique des membranes neuronales embryonnaires	163
3-2-1-2. Une supplémentation en acide docosahexaénoïque induit une modification du statut lipidique des membranes neuronales	165
3-2-1-3. La supplémentation en acide eicosapentaénoïque ou en phospholipides de saumon mène à un enrichissement plus faible	169
3-2-2. Incorporation dans les membranes synaptiques	171
3-2-2-1. Validation du modèle expérimental des synaptosomes	172
3-2-2-2. Enrichissement des synaptosomes en acide docosahexaénoïque.....	175
3-3. <i>Effet neuroprotecteur des acides gras polyinsaturés de type ω3 contre l'apoptose induite par le peptide amyloïde-β soluble</i>	176
3-3-1. L'acide docosahexaénoïque protège les neurones de l'apoptose induite par le peptide amyloïde-β soluble <i>in vitro</i>	176
3-3-2. Le potentiel neuroprotecteur de l'acide eicosapentaénoïque vis-à-vis du peptide amyloïde-β est moindre que celui de l'acide docosahexaénoïque	178
3-3-3. L'acide docosahexaénoïque protège les neurones après incorporation dans les membranes	178
3-4. <i>Mécanismes moléculaires impliqués dans la neuroprotection par l'acide docosahexaénoïque</i>	181
3-4-1. L'acide docosahexaénoïque n'empêche pas l'activation de la phospholipase A ₂ cytosolique	181
3-4-2. L'acide docosahexaénoïque n'empêche pas l'apparition du stress oxydant.....	181
3-4-3. L'acide docosahexaénoïque prévient l'activation des sphingomyélinases	182
3-4-4. L'acide docosahexaénoïque prévient l'activation des caspases	183
3-4-5. L'acide docosahexaénoïque prévient les altérations du cytosquelette.....	183
3-4-6. L'acide docosahexaénoïque stimule des voies de survie cellulaire.....	184
3-4-7. L'acide docosahexaénoïque inhibe des voies de signalisation proapoptotiques.....	186
PUBLICATION # 2	189
III. L'ACIDE DOCOSAHEXAENOÏQUE INDUIT-IL UN REMODELAGE DES MICRODOMAINES MEMBRANAIRES A L'ORIGINE DE LA NEUROPROTECTION VIS-A-VIS DU PEPTIDE AMYLOÏDE-B SOLUBLE ?	201
1. INTRODUCTION.....	201
2. DEMARCHE EXPERIMENTALE	201
3. RESULTATS ET DISCUSSION	202
3-1. <i>Remodelages membranaires dans les neurones traités par le DHA</i>	202
3-2. <i>Étude structurale et fonctionnelle des microdomaines membranaires</i>	206
3-2-1. Extraction et purification des rafts	206
3-2-2. Perturbation des rafts par le peptide amyloïde-β soluble	208
3-2-3. Impact de l'incorporation de l'acide docosahexaénoïque sur les rafts	212
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	219
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	224

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Dessins originaux des dégénérescences neurofibrillaires.....	10
Figure 2. Tomographie cérébrale par émission de positons au FDG.....	16
Figure 3. Les régions cérébrales affectées lors d'une tauopathie	20
Figure 4. Les lésions cellulaires observées lors du développement de la MA	20
Figure 5. Les différents transcrits et isoformes de Tau.....	22
Figure 6. Degré de phosphorylation de la protéine Tau.....	25
Figure 7. Modèle de formation des PHF	26
Figure 8. Modifications post-traductionnelles nécessaires à l'obtention de PHF matures.....	27
Figure 9. Composition d'une plaque sénile	30
Figure 10. Les différents domaines de l'APP.....	32
Figure 11. Les deux voies de maturation de l'APP.....	34
Figure 12. Clivage protéolytique de l'APP in situ	36
Figure 13. Modélisation de la structure tridimensionnelle du peptide A β ₄₀	38
Figure 14. Composition d'un canal amyloïde.....	40
Figure 15. Modélisation des changements structuraux du peptide A β associés à la fibrillogenèse.....	43
Figure 16. Stabilisation du radical sulfuramyl par les résidus aminoacides environnants.....	43
Figure 17. Les étapes clefs de la nécrose.....	47
Figure 18. Les étapes clefs de l'apoptose	49
Figure 19. Phase de signalisation extrinsèque impliquant les récepteurs de mort cellulaire.....	50
Figure 20. Génération des espèces réactives et conséquences physiopathologiques	51
Figure 21. Implication de la voie PI3K/Akt dans le maintien de la survie cellulaire	53
Figure 22. Implication de la voie des MAP kinases dans la survie cellulaire	53
Figure 23. Phase mitochondriale de contrôle de l'apoptose	55
Figure 24. Activation des caspases.....	57
Figure 25. Mutations du gène codant l'APP entraînant des cas d'Alzheimer familiaux	60
Figure 26. Cascade hypothétique conduisant à la mort neuronale dans la MA.....	61
Figure 27. Rôle central de la protéine GSK-3 β dans la MA.....	62
Figure 28. Implication de l'ApoE4 dans les perturbations neuronales associées à la MA	65
Figure 29. Synthèse de novo du cholestérol.....	67
Figure 30. Transport et internalisation du cholestérol dans le SNC	68
Figure 31. Modèles structuraux du cholestérol	70
Figure 32. Formule développée d'un galactocérébroside	75
Figure 33. Formule développée d'un sulfatide	75
Figure 34. Formule développée d'un ganglioside, le GM ₃	75
Figure 35. Métabolisme des sphingolipides.....	76
Figure 36. Implication des sphingomyélinases et des céramides dans l'apoptose	78
Figure 37. Implication de S1P dans les principales voies de survie cellulaire.....	82
Figure 38. Site de clivage des différentes phospholipases.....	84
Figure 39. Synthèse de novo des acides gras.....	85
Figure 40. Synthèse des acides gras des séries ω 6 et ω 3	86
Figure 41. Modèle compact de la structure d'acides gras.....	87
Figure 42. Conformations tridimensionnelles adoptées par le DHA.....	88
Figure 43. Formation d'une phase inversée dans une membrane riche en AGPI-lc	89
Figure 44. Biosynthèse d'eicosanoïdes à partir de l'AA.....	90
Figure 45. Biosynthèse d'eicosanoïdes à partir de l'EPA	90
Figure 46. Voie de biosynthèse des docosanoïdes	91
Figure 47. Le modèle membranaire de mosaïque fluide.....	94
Figure 48. Composition d'un radeau lipidique.....	95
Figure 49. Constitution moléculaire d'une cavéole.....	96
Figure 50. Mécanisme d'endocytose dépendant de la cavéoline.....	99
Figure 51. Traitements des neurones corticaux de rat en culture primaire.....	109
Figure 52. Séquence réactionnelle du dosage enzymatique de la lactate déshydrogénase.....	116
Figure 53. Séquence réactionnelle du dosage enzymatique du cholestérol	125
Figure 54. Effets des inhibiteurs de SMases sur la toxicité neuronale de l'AA	132
Figure 55. Analyse de la composition des lipides polaires neuronaux	134
Figure 56. Implication des SMases dans la mort neuronale induite par le peptide A β soluble.....	135

Figure 57. Implication des lipoxygénases dans la neurotoxicité du peptide A β soluble.....	137
Figure 58. Implication des MAPK dans l'activation des SMases du peptide A β soluble.....	138
Figure 59. Effets protecteurs in vivo de la S1P sur la mémoire de travail	142
Figure 60. Schéma récapitulatif de la cascade pro-apoptotique activée par le peptide A β soluble	143
Figure 61. Effet neurotrophique du DHA sur les neurones embryonnaires en culture.....	160
Figure 62. Effet neurotrophique du DHA sur les cellules Neuro2A différenciées en culture	161
Figure 63. Effets neurotrophiques du DHA sur la prolifération des cellules Neuro2A.....	162
Figure 64. Effet neurotrophique des PL de saumon sur les neurones embryonnaires.....	163
Figure 65. Proportion des AG dans les membranes des neurones embryonnaires de rat	164
Figure 66. Proportion des AG dans les membranes des cellules corticales de rat adulte.....	164
Figure 67. Enrichissement des membranes neuronales après supplémentation en DHA.....	165
Figure 68. Proportion des AG dans les membranes des neurones embryonnaires de rat	166
Figure 69. Cinétique d'enrichissement membranaire en DHA dans les neurones traités par le DHA.....	167
Figure 70. Enrichissement en DHA des différentes classes de phospholipides	168
Figure 71. Enrichissement membranaire en DHA après supplémentation en EPA.....	169
Figure 72. Cinétique d'enrichissement membranaire en DHA dans les neurones traités par différents AGPI..	170
Figure 73. Enrichissement membranaire en DHA après supplémentation en PL de saumon	171
Figure 74. Représentation schématique de la formation des synaptosomes.....	172
Figure 75. Protocole mis au point pour l'extraction et la purification des synaptosomes	173
Figure 76. Évaluation de l'intégrité membranaire des vésicules purifiées.....	174
Figure 77. Évaluation de l'activité mitochondriale des vésicules purifiées.....	174
Figure 78. Étude de l'origine des synaptosomes purifiés	175
Figure 79. Enrichissement en DHA des synaptosomes.....	176
Figure 80. Absence de protection par le DHA des oligodendrocytes exposés au peptide A β soluble	178
Figure 81. Prétraitement par le DHA et neuroprotection vis-à-vis du peptide A β soluble.....	179
Figure 82. Enrichissement membranaire en DHA dans différents types cellulaires.....	180
Figure 83. Effets du DHA sur l'activation des SMases par les peptides A β solubles	182
Figure 84. Préservation de la protéine MAP1A par le DHA.....	184
Figure 85. Maintien par le DHA de la voie de survie cellulaire impliquant phospho-ERK5	185
Figure 86. Préservation par le DHA de la voie de survie cellulaire impliquant phospho-Akt	185
Figure 87. Inhibition par le DHA de la voie proapoptotique impliquant phospho-p38.....	186
Figure 88. Mécanismes de neuroprotection par le DHA vis-à-vis du peptide A β soluble	187
Figure 89. Immunodétection de la flotilline-1 dans les neurones	203
Figure 90. Immunodétection du ganglioside GM ₁ à la surface des neurones.....	205
Figure 91. Protocole mis au point pour la purification des microdomaines membranaires	207
Figure 92. Caractérisation des fractions membranaires des neurones témoins.....	208
Figure 93. Perturbation des microdomaines membranaires par le peptide A β soluble.....	209
Figure 94. Redistribution de la protéine Akt dans les neurones exposés au peptide A β soluble.....	210
Figure 95. Perturbations membranaires induites par le peptide A β soluble	212
Figure 96. Dosage du cholestérol dans les lysats cellulaires	213
Figure 97. Distribution du cholestérol dans les fractions membranaires.....	213
Figure 98. Distribution de la flotilline-1 dans les fractions membranaires.....	214
Figure 99. Distribution du rTf dans les fractions membranaires.....	215
Figure 100. Mécanismes de neuroprotection impliquant le DHA contre le peptide A β soluble	217

INDEX DES TABLEAUX

<i>Tableau 1. Prévalence de la maladie d'Alzheimer en fonction de l'âge en France.....</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 2. Dégénérescences neurofibrillaires lors de l'évolution des tauopathies.....</i>	<i>19</i>
<i>Tableau 3. Les différentes classes de tauopathies.....</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 4. Composition des différents milieux de culture primaire des neurones.....</i>	<i>107</i>
<i>Tableau 5. Les inhibiteurs pharmacologiques utilisés et leurs cibles cellulaires</i>	<i>110</i>
<i>Tableau 6. Séquences des oligonucléotides utilisés et cibles cellulaires associées</i>	<i>111</i>
<i>Tableau 7. Composition des différents milieux de culture des cellules Neuro2A.....</i>	<i>112</i>
<i>Tableau 8. Conditions d'utilisation des différents anticorps</i>	<i>119</i>

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

AA	Acide arachidonique	ALA	Acide α -linoléique
ABC	Cassette de liaison à l'ATP	Apaf 1	Facteur apoptotique 1 d'activation des protéases
Aβ	Peptide amyloïde- β	Apo	Apolipoprotéine
AG	Acide gras	APP	Protéine précurseur du peptide amyloïde
AGPI	Acide gras polyinsaturé	APP-s	Peptide soluble issu du clivage de la protéine APP
AICD	Domaine intracellulaire de la protéine APP	a-Smase	Sphingomyélinase acide
AL	Acide linoléique		

B

BACE	Enzyme clivant la protéine APP au site- β	BHE	Barrière hémato-encéphalique
BH	Domaine d'homologie à la protéine Bcl-2	BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

C

CaMK	Kinase dépendante du calcium et de la calmoduline	COX	Cycloxygénase
CARD	Domaine de recrutement des caspases	CPG	Chromatographie en phase gazeuse
Cav	Cavéoline	cPLA₂	Phospholipase A ₂ cytosolique
Cer	Céramide	CREB	Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc
Cer1P	Céramide-1-phosphate	Cyt-c	Cytochrome-c

D

DAG	Diacylglycérol	DIABLO	Protéine de faible pI liant directement les inhibiteurs de l'apoptose
DAPI	4,6-diamidino-2-phénylindole	DISC	Complexe de signalisation induisant la mort
DED	Domaine effecteur de mort	DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
$\Delta\Psi_m$	Potentiel membranaire	DMSO	Diméthylsulfoxyde
DES	Désipramine	DTT	Dithiothréitol
DHA	Acide docosahexaénoïque		

E

ECL	Électrochimiluminescence	EPA	Acide eicosapentaénoïque
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique	ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire
EGTA	Éthylène glycol bis(2-aminoéthyl)-N,N,N'-tétracétate	ERO	Espèces réactives oxygénées

F

FADD	Protéine associée à Fas et présentant un domaine de mort cellulaire	FUM	Fumosine
-------------	---	------------	----------

G

GFAP	Protéine fibrillaire acide des cellules gliales	GSH	Glutathion réduit
GFLD	Domaine semblable au facteur de croissance	GSSG	Glutathion oxydé
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol	GSK-3β	Glycogène synthase kinase-3 β

H

hAPP	Protéine humaine précurseur du peptide amyloïde	HMGR	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase
HDL	Lipoprotéine de haute densité	HNE	4-Hydroxynonénal
HEPE	Acide hydroxyeicosapentaénoïque		

I

IAP	Inhibiteurs de l'apoptose	IMI	Imipramine
IDE	Enzyme de dégradation de l'insuline	IRM	Imagerie par résonance magnétique

J

JNK	Jun kinase
------------	------------

K

KPI	Inhibiteur de protéase de type Kunitz
------------	---------------------------------------

L

LCR	Liquide céphalo-rachidien	LRP	Protéine apparentée au récepteur des lipoprotéines de faible densité
l_d	Phase liquide désordonnée	LT	Leucotriènes
LDL	Lipoprotéine de faible densité	LTP	Potentialisation à long terme
l_o	Phase liquide ordonnée		
LOX	Lipoxygénase		

M

MA	Maladie d'Alzheimer	MCI	Troubles cognitifs modérés
MAFP	Méthyl arachidonyl fluorophosphate	MEK	Protéine kinase régulée par un signal extracellulaire ou activée par un signal mitogène
MAP	Protéine associée aux microtubules	MEKK	Kinase des protéines kinases régulées par un signal extracellulaire ou activées par un signal mitogène
MAPK	Kinase des protéines associées aux microtubules	MMSE	Examen rapide de l'état mental
MAPK	Kinase des protéines activées par un signal mitogène	MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
MARK	Kinase régulant l'association des protéines aux microtubules		
MβCD	Méthyl-β-cyclodextrine		

N

NAC	N-acétylcystéine	NFT	Dégénérescence neurofibrillaire
Nct	Nicastrine	NMDA	N-méthyl-D-aspartate
Nep	Néprilysine	NSD	Domaine de liaison à la sphingomyélinase neutre
NGF	Facteur de croissance neurotrophique	n-SMase	Sphingomyélinase neutre

P

PAF	para-Formaldéhyde	PK	Protéine kinase
PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide	PL	Phospholipide
PBS	Tampon phosphate	PLC	Phospholipase C
PC	Phosphatidylcholine	PLD	Phospholipase D
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes	PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PDK	Kinase dépendante des phosphoinositides	PP	Phosphatase
PE	Phosphatidyléthanolamine	PS	Phosphatidylsérine
PEN	Facteur de stimulation de la préséniline	PSD-95	Protéine de la densité post-synaptique (95 kDa)
PG	Prostaglandine	PSEN	Gènes codant les présénilines
PHF	Paire hélicoïdale de filaments	PS1/2	Préséniline 1/2
PI	Phosphoinositol	PT	Pore transitoire
PI(4,5)P₂	Phosphoinositol-4,5-bisphosphate	PTEN	Protéine phosphatase homologue aux tensines
PI(3,4,5)P₃	Phosphoinositol-3,4,5-trisphosphate	PVDF	Difluorure de polyvinylidène
PI3K	Phosphoinositol-3-kinase		

R

RAR	Récepteur nucléaire de l'acide rétinol	RE	Réticulum endoplasmique
RARE	Élément de réponse aux RAR	RMN	Résonance magnétique nucléaire
Rb	Protéine du rétinoblastome	rTf	Récepteur de la transferrine
RBP	Protéine de fixation du rétinol	RXR	Récepteur nucléaire des rétinoïdes
		RXRE	Élément de réponse aux RXR

S

SAPK	Protéine kinase activée par le stress	SNAP	Protéine associée aux synaptosomes
SCD	Domaine d'assemblage	SNC	Système nerveux central
SDS	Dodécylsulfate de sodium	S1P	Sphingosine-1-phosphate
SM	Sphingomyéline	SRE	Élément de réponse aux stéroïdes
SMAC	Second activateur des caspases dérivé de la mitochondrie	SREBP	Protéine de liaison à SRE
SMase	Sphingomyélinase	SVF	Sérum de veau fœtal

T

TGF-β	Facteur de croissance transformant-β	TRAIL	Ligand induisant l'apoptose de façon comparable au TNF
Thy-1	Thymidylate synthase	TRAILR	Récepteur des ligands induisant l'apoptose de façon comparable au TNF
THX	Thromboxane	3OMeSM	3'-O-méthylsphingomyéline
TNF	Facteur de nécrose tumoral	Trolox	Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique
TRADD	Protéine associée au récepteur-1 du TNF et possédant un domaine de mort cellulaire		

V

VAMP	Protéine membranaire associée aux vésicules		
-------------	---	--	--



INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités

1-1. Historique

À la fin du XIX^{ème} siècle, la démence du sujet âgé était considérée par de nombreux psychiatres comme un phénomène normal, lié à « l'usure » du temps. Les travaux de l'école de Munich autour de Kraepelin, convaincu de l'intérêt de l'étude histologique du cerveau dans les maladies mentales, ont ensuite permis de mieux comprendre ces maladies. Plusieurs médecins rejoignent le groupe de Munich dont Aloïs Alzheimer qui s'était initié à l'étude microscopique du cerveau aux côtés de Franz Nissl. En 1906, lors d'une réunion de psychiatres allemands à Tübingen, Alzheimer rapporte l'observation d'une femme de 51 ans, Auguste D., souffrant « d'un délire de jalousie suivi d'une désintégration des fonctions intellectuelles ». L'examen au microscope du cortex cérébral de la patiente révèle la présence de lésions analogues à celles de la démence sénile, les plaques séniles, associées à des lésions jusqu'alors inconnues, les dégénérescences neurofibrillaires, caractérisées par des amas anormaux de fibrilles dans les neurones (figure 1).

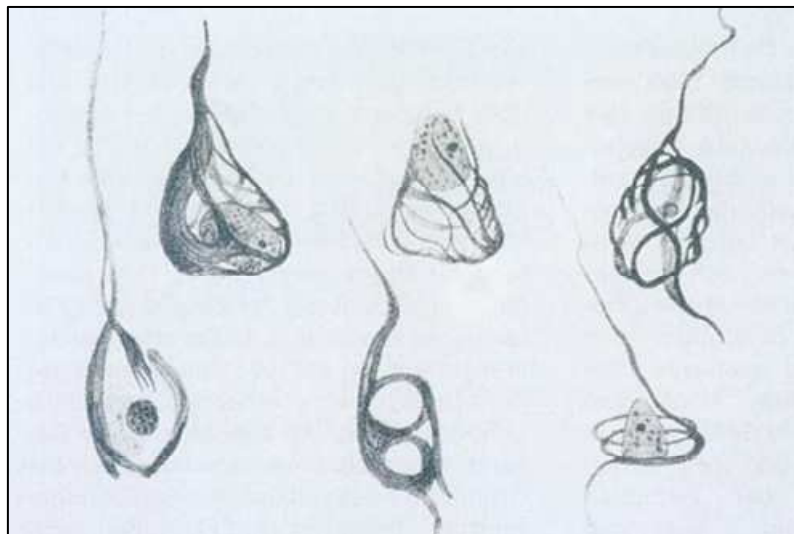


Figure 1. Dessins originaux des dégénérescences neurofibrillaires

Observations par A. Alzheimer (1907) lors de l'analyse post mortem du cerveau de la patiente Auguste D. Les coupes histologiques ont été observées après imprégnation argentique. Les lésions, principalement présentes dans la substance grise corticale, correspondent à l'accumulation de filaments pathologiques.

À la suite de cette première observation, c'est Kraepelin lui-même qui, dans son *Traité de Psychiatrie*, évoque pour la première fois en 1912 la « maladie d'Alzheimer » (MA), définie alors comme une démence, rare et dégénérative, du sujet jeune. Quinze ans plus tard, Divry montre que les plaques cérébrales de la MA peuvent, comme certaines substances amyloïdes, être colorées sélectivement par le rouge Congo et leur donne le nom de plaques amyloïdes. Les connaissances relatives à la dégénérescence neurofibrillaire ne connaîtront en revanche d'avancées significatives

qu'en 1963, lorsque Kidd (405) démontre grâce à la microscopie électronique qu'il s'agit en fait de paires hélicoïdales de filaments (PHF) de 10 nm de diamètre. L'histoire moléculaire de la MA s'ouvre en 1984, lorsque Glenner & Wong (283) caractérisent le peptide amyloïde β ($A\beta$), constituant principal des plaques amyloïdes. En 1986, Brion *et al.* (95) mettent en évidence la présence de protéine *Tau* dans les PHF, tandis que Grundke-Igbal *et al.* (311) en démontrent la phosphorylation anormale. En 1989, Flament *et al.* (247) proposent les protéines *Tau* comme marqueurs de la dégénérescence neurofibrillaire. Deux grandes hypothèses, que nous détaillerons plus loin, tentent alors d'expliquer les causes de la MA : l'hypothèse tauiste, postulant que le facteur déclenchant est la phosphorylation anormale de la protéine *Tau* et la formation des PHF, et l'hypothèse de la cascade amyloïde, centrée sur le peptide $A\beta$ et la formation des plaques séniles. Dès 1994 émerge un nouveau centre d'intérêt, le peptide $A\beta$ soluble, proposé comme marqueur cérébral de la MA par Tabaton (714) et dont la neurotoxicité a été rapportée pour la première fois par Oda *et al.* (571). L'origine du peptide $A\beta$ n'est élucidée qu'avec la caractérisation des β - (742) et γ -sécrétases (193) impliquées dans le clivage de son précurseur, la protéine APP (*amyloid precursor protein*). Parallèlement à l'envolée des connaissances sur les mécanismes physiopathologiques de la maladie, les critères diagnostiques ont été uniformisés et un consensus est adopté en 1997 : la MA est désormais considérée comme une démence neurodégénérative progressive touchant plus particulièrement les personnes âgées.

1-2. La maladie d'Alzheimer, un problème de santé publique

La MA est responsable d'environ 70% des troubles démentiels actuellement diagnostiqués en France, les autres démences étant le plus souvent des démences fronto-temporales, des démences à corps de Lewy ou encore des démences secondaires liées à l'apparition de la maladie de Parkinson. Une faible proportion des démences peut être traitées. C'est le cas des démences liées à une déficience en vitamine B₁₂ ou à une hypothyroïdie. La MA et les syndromes apparentés frappent 855.000 personnes en France, occasionnant un coût annuel de 10 milliards d'euros principalement à la charge de la Sécurité Sociale et des familles des patients (268). En estimant à environ 250.000 le nombre de nouveaux cas chaque année, la proportion de patients de plus de 65 ans atteints en France pourrait passer de 16,4% en 2004 à 21% en 2020, soit 1,3 million de personnes atteintes. La prévalence de cette maladie (25 millions de personnes dans le monde) et la charge économique et sociale qu'elle fait peser sur la société (70% des lits en hôpitaux de long séjour) en font un problème majeur de santé publique dans tous les pays industrialisés où la population est vieillissante, conséquence d'un allongement de la durée de vie. Depuis plusieurs années, différentes mesures gouvernementales ont donc vu le jour, visant à apporter un soutien aux familles des malades. Parmi ces mesures, citons le Plan Vieillesse et Solidarité mis en place en novembre 2003, la Caisse Nationale de Solidarité pour l'Autonomie (CNSA) créée en juin 2004 ou le projet « Alzheimer 2004-2007 ». Par ailleurs, l'Office Parlementaire d'Évaluation des Politiques de Santé (OPEPS) a publié en juillet 2005 un rapport officiel traitant des directives de santé publique à envisager pour définir au mieux la

prévalence de la maladie, les stratégies de dépistage et de diagnostic, les modalités de traitement, l'organisation des soins et des institutions, le financement des soins et de la recherche et les propositions pour l'action publique.

1-3. Prévalence de la maladie d'Alzheimer

1-3-1. Répartition en fonction de l'âge

L'âge est le premier facteur de risque de la MA. Des études réalisées *post mortem* ou par des techniques d'imagerie sur des patients à différents âges ont permis de montrer que les maladies neuro-dégénératives, en particulier la MA, commencent à se mettre en place relativement tôt, plusieurs dizaines d'années avant l'apparition des premiers symptômes cliniques. Ainsi, Braak *et al.* (88) ont montré par des images de résonance magnétique (IRM) que certains patients présentent de façon précoce (dès 40 ans) une hyperintensité de la matière blanche et une diminution de la matière grise, en particulier dans le cortex frontal. Par ailleurs, la plupart des facteurs de risque identifiés pour cette pathologie (hypertension artérielle, parkinsonisme, hypercholestérolémie) augmentent en fonction de l'âge (454). La répartition en fonction de l'âge des patients français atteints de la MA est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1. Prévalence de la maladie d'Alzheimer en fonction de l'âge en France
d'après Gallez (268)

	Hommes					Femmes				
Âge (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

1-3-2. Répartition en fonction du genre

En France, la prévalence estimée de la MA chez les sujets de plus de 85 ans est de 23,9% chez les hommes et de 38,4% chez les femmes (tableau 1). L'ensemble des études épidémiologiques réalisées à ce jour montre une inégalité homme-femme dans la prévalence des maladies neurodégénératives telles que la MA (97, 259), la maladie de Parkinson (775) ou la sclérose amyotrophique latérale (560), suggérant un impact des modifications hormonales liées au vieillissement dans ces pathologies (34). Ainsi, l'apparition de la MA serait corrélée à la diminution des taux d'estrogènes et d'androgènes respectivement associée à la ménopause et à l'andropause. En outre, une diminution de la prévalence de la maladie a pu être observée chez les femmes sous thérapie hormonale lors de la ménopause (34). L'effet neuroprotecteur potentiel des estrogènes a également été suggéré pour la maladie de Parkinson par une méta-analyse regroupant 7 études indépendantes suggérant une diminution du risque pour les femmes sous traitement hormonale (775).

1-3-3. Niveau d'éducation et réseau social

Les troubles cognitifs liés au vieillissement sont moins représentés dans les classes socio-

économiques élevées. Ainsi, House *et al.* (360) ont montré que les personnes développant peu de relations sociales présentent une morbidité 4 à 5 fois supérieure à la moyenne et plus particulièrement un risque élevé de développer une démence. Une méta-analyse a montré l'existence d'un lien entre le déclin des facultés cognitives et de faibles performances intellectuelles dans 5 études sur 7 (260), suggérant une influence directe des activités intellectuelles, sportives et sociales dans la protection contre les pathologies neurodégénératives. Berkman (58) avait déjà proposé que le contexte intellectuel fût lié à l'état de santé des patients à travers différents mécanismes reposant sur les aspects comportementaux et psychologiques. La conservation d'une activité sportive et/ou intellectuelle permettrait en particulier de limiter l'état dépressif qui constitue un facteur de risque important pour les pathologies neurodégénératives et de préserver les fonctions cognitives par une stimulation de ces dernières (23). Par ailleurs, des études *in vivo* sur la souris ont démontré que la stimulation par un environnement plus riche (mise à disposition de différents jouets) augmente le nombre de dendrites et de synapses par neurone (739), stimule l'apprentissage et les fonctions cognitives après l'apparition de différentes lésions cérébrales, et limite la formation des dépôts amyloïdes caractéristiques de la MA chez les animaux transgéniques modèles (457).

Ces données épidémiologiques associant de façon quasi unanime un niveau d'éducation élevé à un risque moindre de démence sont à rapprocher du concept de réserve cognitive. En comparant les scores du test MMSE (*mini-mental state examination*) de Folstein relatifs aux performances cognitives et les résultats d'analyse des flux sanguins cérébraux par imagerie fonctionnelle, Stern *et al.* (697) ont observé qu'à degré d'altération cognitive équivalent, la MA présente un stade plus avancé chez les patients de niveau d'éducation supérieur. Ces résultats, corroborés par beaucoup d'autres, suggèrent que le niveau d'éducation et les activités socioprofessionnelles confèrent au patient une réserve cognitive lui permettant de tolérer des dommages cérébraux plus sévères (649). Cette réserve pourrait aussi expliquer des profils de détérioration cognitive distincts, affectant surtout la mémoire et l'attention chez les patients de faible niveau d'éducation, tandis que les patients de niveau élevé subissent davantage une altération de la pensée abstraite (460), la persistance de stratégies mnémotechniques permettant à ces derniers de « détourner » les tests de mémoire. En conséquence, la MA est souvent diagnostiquée plus tardivement chez les patients de niveau éducatif élevé, expliquant alors le déclin plus rapide de leurs performances cognitives.

1-3-4. Facteurs nutritionnels

De nombreuses études épidémiologiques traitant de l'importance de la nutrition dans le développement des maladies neurodégénératives sont disponibles (397, 398, 686). Ces études ont permis de montrer que l'influence de l'alimentation est indépendante du sexe et de l'origine des individus. Ainsi, des Afro-américains (343) et des Japonais émigrés aux États-Unis (304) y présentent un risque plus élevé de développer la MA que dans leur pays d'origine. Ces études sont confortées par la constatation que les pathologies neurodégénératives ont une prévalence moindre chez certaines

populations dont le mode de vie et le régime alimentaire sont moins propices à leur développement. Ainsi, les personnes profitant du « régime méditerranéen » riche en huile d'olive, donc en acides gras mono-insaturés, présentent une plus faible propension à développer des troubles cognitifs liés au vieillissement (582, 686). Les mêmes observations ont pu être réalisées chez les Inuits dont l'alimentation riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) inclue la consommation d'huile de poisson ou de poisson gras (43, 152, 359, 397, 549). Par ailleurs, il a pu être montré que des rats ou des souris dont l'alimentation est supplémentée en acide docosahexaénoïque (DHA) ou en huile de poisson présentent une meilleure capacité d'apprentissage que les animaux dont l'alimentation est dépourvue d'AGPI de type $\omega 3$ (489, 709, 710, 720). L'intérêt nutritionnel des AGPI et notamment du DHA, proposé par Burr & Burr dès 1929 (105), est confirmé aujourd'hui par de multiples travaux réalisés sur diverses pathologies parmi lesquelles le cancer, les maladies neurodégénératives ou encore les troubles du comportement (ex. schizophrénie, dépression). Comme nous le verrons dans le paragraphe 3, les AGPI sont des constituants essentiels des membranes neuronales pour lesquels les patients atteints de la MA présentent souvent un déficit (336, 359, 685). Ainsi, il a été suggéré que de faibles niveaux sériques de DHA puissent accroître le risque de développement de la MA (159).

Bien qu'une corrélation nette n'ait pu encore être établie, la consommation excessive d'AG saturés et de cholestérol constituerait, en revanche, un facteur de risque pour ces pathologies (501, 522, 549, 585, 773). Il a en effet été montré que certaines maladies génétiques liées à un désordre du métabolisme lipidique telles que la maladie de Niemann-Pick ont pour conséquence l'apparition de lésions cérébrales comparables à celles observées dans la MA (568). L'ensemble de ces travaux suggère une influence déterminante de l'apport et du métabolisme lipidique dans le maintien des fonctions cognitives (503).

D'autres classes d'aliments, parmi lesquelles les fruits et légumes riches en composés antioxydants et/ou anti-inflammatoires tels que les polyphénols, les vitamines ou les flavonoïdes, pourraient jouer un rôle clef lors du vieillissement en prévenant les maladies neurodégénératives (388). En effet, ces dernières se traduisent souvent par une forte augmentation des marqueurs de stress oxydant (6, 388) et la survenue d'un processus inflammatoire dont l'ampleur peut être limitée par l'ingestion de tels composés. La présence dans l'alimentation de métaux comme l'aluminium a aussi été largement étudiée, mais l'association à un risque accru de maladie neurodégénérative reste controversée (686).

1-4. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer

1-4-1. Éléments de diagnostic

Il n'existe actuellement aucun marqueur satisfaisant permettant de diagnostiquer la MA de façon précoce. Seule la mise en évidence des lésions cérébrales typiques décrites précédemment permet le diagnostic de certitude par examen histopathologique *post mortem* du cerveau. Le diagnostic de la MA est établi sur la base de la symptomatologie clinique, de tests neuropsychologiques et le recours à des

techniques d'imagerie. La recherche de marqueurs biologiques précoces dans le liquide céphalo-rachidien ou LCR (peptide $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$, *Tau*, *Tau* phosphorylée) pourrait également offrir des perspectives d'intérêt diagnostique (187).

1-4-1-1. Diagnostic clinique

Le diagnostic de la MA est avant tout un diagnostic d'exclusion caractérisé par l'apparition et l'évolution de troubles mnésiques et cognitifs. Le déficit mnésique est principalement antérograde, associé à une désorientation spatio-temporelle fluctuante. Les troubles du comportement sont eux aussi d'apparition insidieuse et se traduisent par un repli sur soi, une perte d'initiative et de motivation et des troubles de l'humeur responsables de difficultés relationnelles avec l'entourage. La symptomatologie évolue vers un syndrome aphaso-apraxy-agnosique associé à une ataxie et à la perte de la conscience de soi et de son environnement conduisant à une diminution progressive de l'autonomie et finalement à la démence sévère.

1-4-1-2. Tests neuropsychologiques

L'utilisation de tests neuropsychologiques permet d'authentifier le déclin cognitif et de caractériser les troubles. Parmi ces tests basés sur des critères cliniques standardisés, le MMSE (251) permet d'évaluer la sévérité du déficit cognitif grâce au calcul d'un score sur 30 points dépendant de l'âge et du niveau d'instruction. Le test ADL (*activities daily living*) repose quant à lui sur une évaluation des capacités du patient à répondre à des problèmes quotidiens (189). Quelle que soit la méthode d'évaluation, les résultats sont confrontés à des sources d'information collatérales (famille, amis) afin d'étayer le diagnostic (108) et d'affecter au patient un état parmi une liste prédéfinie : AAMI (*age-associated memory impairment*), AACD (*age-associated cognitive decline*) ou MCI (*mild cognitive impairment*). Les suivis cliniques révèlent que 12% des patients MCI évoluent vers un état pré-démence caractéristique de la MA, au cours duquel le déclin cognitif est visible (141, 263). Quarante pour cent d'entre eux sont convertis en MA dans les 6 ans qui suivent la mise en évidence de l'état MCI (520). Ces résultats suggèrent que le stade MCI est un état précurseur de la MA (520). Mais ces critères restent insuffisants, puisque seuls 60% des patients effectivement atteints de la MA sont correctement diagnostiqués (537).

1-4-1-3. Imagerie médicale

1-4-1-3-1. Analyses morphologiques

La résolution limitée des techniques d'imagerie morphologique (IRM, scanner) ne permet pas de visualiser les lésions histopathologiques (plaques séniles et dégénérescences neurofibrillaires) (197). L'atrophie des structures hippocampiques et parahippocampiques, observable par IRM, constitue pour différents auteurs le paramètre le plus sensible et le plus spécifique pour détecter la MA à un stade

précoce (181, 520). L'apparition relativement tardive de ces perturbations, ainsi que l'absence de valeurs de normalité du volume de l'hippocampe et de consensus sur la procédure de mesure, constituent, à ce jour, des limites importantes à l'utilisation de ces techniques (541).

1-4-1-3-2. Analyses fonctionnelles

Les techniques d'imagerie fonctionnelle évaluent le niveau du métabolisme cérébral – reflet de l'activité cellulaire et synaptique – à travers divers paramètres comme le flux sanguin cérébral ou la consommation de glucose. Lors des phases précoces de la MA, les régions temporales médianes présentent une diminution du métabolisme cérébral (561), observable par tomographie par émission de positons (TEP) après injection de [^{18}F]-2-désoxy-2-fluoro-D-glucose ou FDG (233, 255, 262) ou de H_2^{15}O (47). À des stades plus tardifs, le cortex temporo-pariétal (figure 2), le gyrus cingulé et le cortex frontal sont progressivement atteints (520, 673).

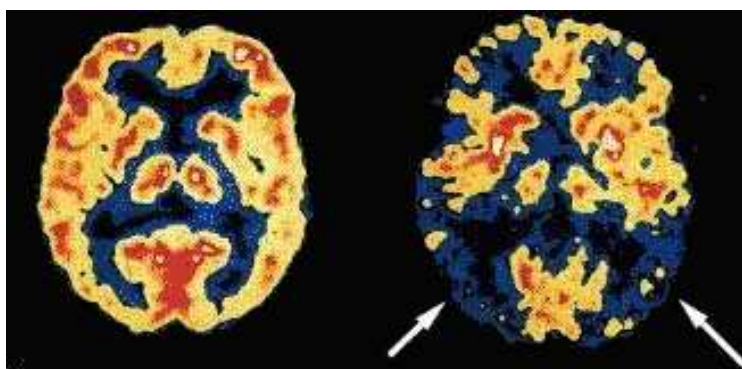


Figure 2. Tomographie cérébrale par émission de positons au FDG
À gauche, sujet sain ; à droite, patient atteint de MA, montrant une baisse du métabolisme du cortex associatif temporo-pariétal postérieur.

D'autres radiomarqueurs injectables, capables de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et plus spécifiques des lésions histopathologiques caractéristiques de la MA, ont été évalués lors d'études pilotes (520). À titre d'exemple, le [^{18}F]-fluoroéthyl(méthyl) amino-2-naphtyl éthylène malonitrile se lie aux fibrilles de peptides amyloïdes et aux dégénérescences neurofibrillaires (672), le PIB (composé de Pittsburgh B) dérivé de la thioflavine (422), le 2-(4'méthylaminophenyl)benzothiazole ou BTA-1, spécifique des fibrilles de peptides amyloïdes (422) ou le [^{11}C]-PK11195, ligand des récepteurs périphériques aux benzodiazépines dont le nombre augmente lors de l'activation microgliale observée lors de la MA (109). Par ailleurs, la recherche de marqueurs spécifiques des altérations du métabolisme des neurotransmetteurs et des perturbations synaptiques est en cours (520). L'IRM fonctionnelle, dont la résolution spatiale est supérieure à celle de la TEP, représente une solution alternative avantageuse car ne nécessitant pas d'exposer le patient à des radiations ionisantes (520). Enfin, la spectroscopie par résonance magnétique permet d'évaluer le taux de certaines molécules comme les métabolites phospholipidiques, dont la présence est indispensable au fonctionnement cérébral (713). Cette technique de haute sensibilité présente toutefois l'inconvénient d'être peu

spécifique (735). La perfusion cérébrale peut aussi être étudiée par tomographie par émission de photon unique ou par TEP (47, 520). Mais l'utilisation de cette technique ne permet pas encore de distinguer les malades atteints de la MA de ceux atteints d'une démence vasculaire (520).

1-4-1-4. Marqueurs biologiques

La recherche de marqueurs biologiques de la MA est envisageable dans les liquides périphériques, en particulier dans le LCR, et s'oriente vers le dosage immuno-chimique des peptides $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ ou celui des protéines *Tau* totale et phosphorylée (20, 76). À ce jour, sont disponibles 5 tests ELISA capables de détecter spécifiquement le peptide $A\beta_{42}$ présent dans le LCR, 3 tests ELISA destinés à détecter toutes les isoformes de protéines *Tau* indépendamment de leur état de phosphorylation et 5 tests ELISA ciblant différents épitopes phosphorylés de *Tau* (*P-Tau*₁₈₁₊₂₃₅, *P-Tau*₂₃₁₊₂₃₅, *P-Tau*₁₉₉, *P-Tau*₂₃₁, *P-Tau*₃₉₆₋₄₀₄) (20).

Les études *post mortem* réalisées sur des patients décédés de la MA ont permis de mettre en évidence que la diminution du taux de peptide $A\beta_{42}$ dans le LCR est bien corrélée avec l'accumulation des dépôts amyloïdes dans le néocortex et l'hippocampe. Cette diminution, probablement liée à une séquestration de ce peptide au sein des plaques séniles et/ou à une diminution de sa clairance, peut atteindre 50% (705). Ainsi, la quantification de ce marqueur permettrait de distinguer les patients souffrant de la MA de ceux atteints d'autres pathologies neurodégénératives – sclérose amyotrophique latérale (681), démences frontotemporales à corps de Lewy (18), démences vasculaires (681) – avec une sensibilité et une spécificité de plus de 80% (20). Parallèlement, plusieurs études ont montré que l'augmentation du taux de protéine *Tau* totale chez les patients atteints de MA est plus importante que celle observée lors du vieillissement normal (19, 583). La protéine *Tau* phosphorylée permettrait de mieux distinguer les patients atteints de la MA de ceux atteints de la maladie de Creutzfeld-Jakob, de démences frontotemporales ou à corps de Lewy (20, 583). Ainsi, une analyse reposant sur 11 études différentes incluant environ 350 contrôles et 700 patients atteints de la MA, a montré une augmentation du taux de protéine *Tau* phosphorylée chez les patients Alzheimer avec une spécificité estimée à 92% et une sensibilité moyenne de 80% (76).

Les moyens diagnostiques actuels reposent sur le dosage simultané de différents biomarqueurs, augmentant significativement la sensibilité et la spécificité du diagnostic de la MA et du pronostic de conversion de l'état MCI vers la maladie. Le rapport $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ présente une meilleure sensibilité que $A\beta_{42}$ seul, en particulier comme marqueur pronostique de conversion MCI/MA (20, 265). Le pronostic de conversion des MCI vers une démence de type Alzheimer pourrait être posé 2 ans avant l'apparition des premiers signes démentiels grâce à des marqueurs $A\beta_{42}$ ou du *ratio* $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ couplé à la détection de *Tau* totale, et ceci avec une sensibilité et une spécificité de 90% (20, 478).

D'autres marqueurs biologiques sont en cours d'évaluation. Parmi eux, certains marqueurs de stress oxydant tels que les isoprostanes, les isofuranes et les neuroprostanes présentent une stabilité chimique et métabolique compatible avec une démarche diagnostique. Les premières études

comparatives ont montré la présence de plus grandes quantités de ces marqueurs dans le LCR des patients atteints d'une pathologie neurodégénérative telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer et la démence à corps de Lewy, sans pouvoir toutefois discriminer ces différentes pathologies (543).

1-4-2. Stratégies thérapeutiques

La MA est caractérisée par une perte synaptique dont la sévérité est corrélée à la gravité de l'atteinte démentielle. Les premiers troubles de la fonction synaptique apparaissent de façon précoce, avant la perte neuronale (153, 407). Ces perturbations synaptiques se traduisent, entre autres, par une défaillance du système cholinergique et un métabolisme anormal de l'acétylcholine (ACh), une perte sélective des récepteurs nicotiniques dans l'hippocampe et le cortex (207), ainsi qu'une stimulation anormale des récepteurs glutamatergiques NMDA au *N*-méthyl-D-aspartate (207). La stimulation pathologique de ces derniers a pour effet d'éléver anormalement le taux de calcium intracellulaire, avec en conséquence *in vitro* la mort cellulaire.

Les lésions des neurones cholinergiques et le déficit en ACh qui en résulte ont orienté la thérapeutique de la MA vers la restauration du pool d'ACh. Les molécules disponibles aujourd'hui sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase qui agissent en empêchant la dégradation de ce neurotransmetteur. Trois molécules disposent actuellement d'une autorisation de mise sur le marché en France : le donépézil, la rivastigmine et la galantamine. Ces molécules, indiquées dans les formes légères à modérément sévères de la MA, constituent un traitement uniquement symptomatique permettant de retarder le déclin cognitif. Leur utilisation est actuellement remise en question en raison de nombreux effets indésirables difficiles à distinguer des symptômes de la maladie, ainsi que des interactions médicamenteuses graves pouvant survenir lors de l'association avec les neuroleptiques ou les médicaments diminuant le rythme et la fréquence cardiaques (70). Le donépézil reste majoritairement prescrit en raison de sa plus faible toxicité. Une autre approche thérapeutique consiste à limiter la stimulation anormale des récepteurs glutamatergiques grâce à la mémantine, un antagoniste non compétitif et de faible affinité des récepteurs NMDA. Cette molécule contribue à l'amélioration de la qualité de la vie des malades et est indiquée dans les formes modérément sévères à sévères de la MA (207).

Les principales perspectives thérapeutiques visent à inhiber la formation du peptide amyloïde ou à en empêcher la toxicité ou l'agrégation. Plusieurs études ont mis en évidence le potentiel thérapeutique d'inhibiteurs de β - et γ -sécrétases, d'activateurs de la voie non amyloïdogène, de l'immunothérapie anti-peptide A β et de chélateurs de métaux tels que le clioquinol (376). Malgré de nombreux travaux et des perspectives thérapeutiques intéressantes aucun traitement efficace ne fait actuellement l'objet d'une autorisation de mise sur le marché, les études cliniques étant limitées, entre autres, par l'absence d'un diagnostic de certitude pour cette pathologie.

2. Caractéristiques physiopathologiques et hypothèses attenantes

La MA est une maladie neurodégénérative à prédominance corticale, caractérisée par 2 types de lésions, les dégénérescences neurofibrillaires intraneuronales et les plaques amyloïdes extracellulaires. L'avancée des connaissances sur ces 2 types de lésions a conduit à 2 hypothèses :

- l'hypothèse tauiste, qui postule que le facteur déclenchant est la phosphorylation de la protéine *Tau* et la formation des PHF ;
- l'hypothèse amyloïdienne, qui évoque la cascade amyloïde avec le peptide A β pour élément central et conduisant à la formation des plaques séniles.

2-1. L'hypothèse tauiste

2-1-1. Histopathologie

Les lésions de dégénérescence neurofibrillaire sont des lésions intraneuronales, formées par l'accumulation de filaments anormaux dont le principal constituant est la protéine *Tau* et dont la répartition varie selon le stade clinique de la maladie (tableau 2 et figure 3).

Tableau 2. Dégénérescences neurofibrillaires lors de l'évolution des tauopathies

Stades cliniques	Progression des dégénérescences neurofibrillaires
0	-
1	Région trans-entorhinal
2	Cortex entorhinal
3	Hippocampe
4	Cortex temporal antérieur
5	Cortex temporal inférieur
6	Cortex temporal moyen
7	Régions corticales associatives ou polymodales Cortex frontal antérieur, temporal supérieur, temporal inférieur
8	Régions unimodales
9	Régions corticales primaires (visuelles/motrices)
10	Présence généralisée de PHF diffuses

Les premières lésions apparaissent dans les cortex périrhinal et entorhinal, région de la face interne du lobe temporal servant d'interface entre les aires associatives de l'isocortex, impliquées dans le traitement des informations, et celles de l'hippocampe, impliquées dans le traitement de la mémoire (191). Puis les lésions touchent l'amygdale (vie affective), les cortex associatifs temporal (mémoire, langage), pariétal (apraxie, abstraction) et frontal (figure 3).

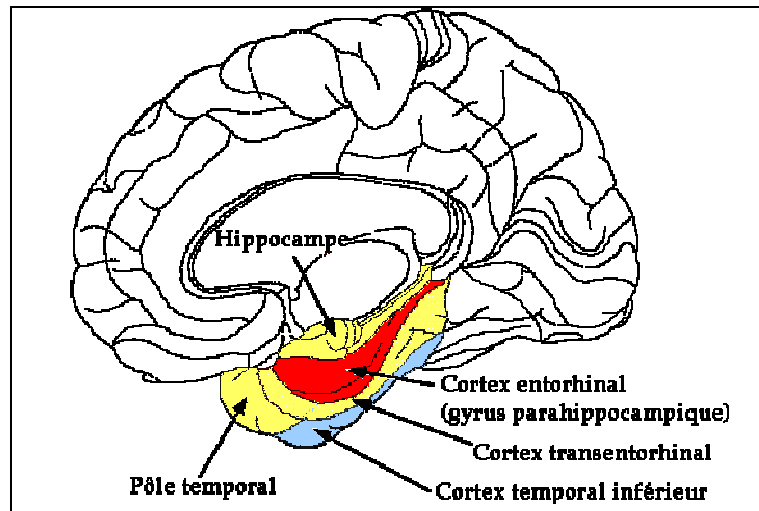


Figure 3. Les régions cérébrales affectées lors d'une tauopathie

À des stades plus tardifs de la maladie, elles affectent le noyau basal de Meynert et d'autres noyaux sous-corticaux projetant sur le cortex (*locus ceruleus*, noyau dorsal du raphé, partie interne de la substance noire). Des structures appelées « fantômes » témoignent de la disparition des neurones contenant ce matériel neurofibrillaire anormal, surtout dans les aires et les couches où la perte neuronale est abondante, ce qui suggère que ces lésions jouent un rôle dans la mort neuronale. Par ailleurs, la détérioration cognitive est nettement corrélée à la densité des dégénérescences neuro-fibrillaires dans l'isocortex cérébral et l'hippocampe (185).

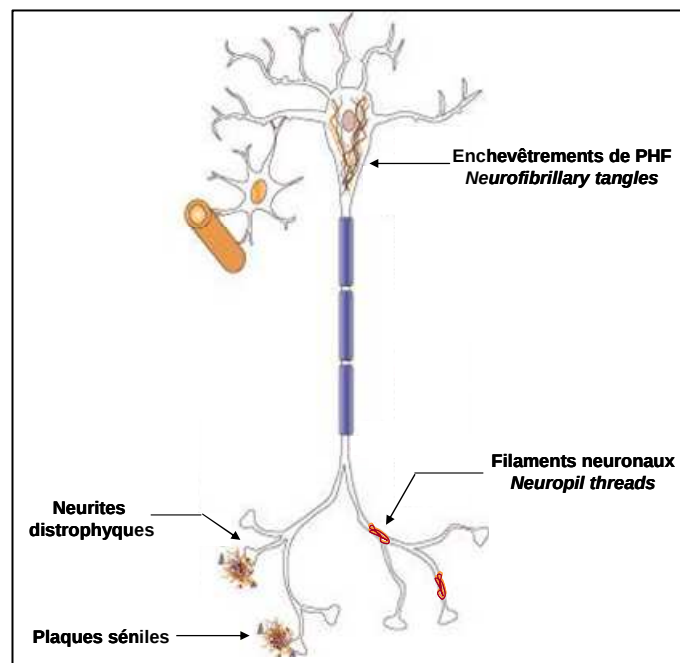


Figure 4. Les lésions cellulaires observées lors du développement de la MA

Au niveau cellulaire, 3 types de lésions sont distingués selon leur localisation (figure 4) :

- les enchevêtrements de neurofibrilles (NFT ou *neurofibrillary tangles*), dont les constituants majeurs, les PHF, se situent au niveau du corps cellulaire et des dendrites ;

- les filaments neuronaux, présents au niveau distal des dendrites;
- les plaques séniles, auxquelles sont associés les neurites dystrophiques (607).

La présence de ces lésions dans de multiples pathologies neurodégénératives a conduit au concept de tauopathie qui désigne l'ensemble des maladies ayant pour base, la présence dans les neurones d'agrégats de protéines *Tau* anormalement phosphorylées, ou une perturbation de l'expression de cette protéine. Au moins 14 mutations géniques ont été reconnues responsables de tauopathies, toutes conduisant à une hyperphosphorylation de la protéine *Tau* (184).

Les modifications post-traductionnelles de la protéine *Tau* et les isoformes diffèrent selon la pathologie neurodégénérative. Cinq classes de tauopathies différentes ont ainsi été répertoriées (tableau 3).

Tableau 3. Les différentes classes de tauopathies

d'après Sergeant *et al.* (661)

A, classification des tauopathies ; B, immunodétection des agrégats de protéines Tau dans les homogénats de tissus cérébraux de patients décédés de tauopathies.

A	Classes	Caractéristiques d'expression / d'agrégation de la protéine <i>Tau</i>	Pathologies associées
	0	perte de l'expression de la protéine <i>Tau</i>	dégénérescence du lobe frontal
	I	agrégation avec apparition de 3 bandes majoritaires (<i>M</i> _r 60, 64, 69 kDa) et 1 bande minoritaire (<i>M</i> _r 74 kDa)	MA, sclérose amyotrophique latérale, démence frontotemporale avec parkinsonisme liée au gène <i>tau</i> sur le chromosome 17 (FTPD-17), maladie de Parkinson, maladie de Niemann-Pick, syndrome de Down
	II	agrégation avec apparition de 2 bandes (<i>M</i> _r 64 et 69 kDa)	dégénérescence corticobasale, FTDP-17
	III	agrégation avec apparition de 2 bandes (<i>M</i> _r 60 et 64 kDa)	maladie de Pick, FTDP-17
	IV	agrégation avec apparition de 1 bande (<i>M</i> _r 60 kDa)	dystrophie myotonique de type I et II

B

τ 74

τ 69

τ 64

τ 60









Agrégats

Type I

Type II

Type III

Type IV

2-1-2. La protéine *Tau*

2-1-2-1. Expression de la protéine *Tau*

Tau est une protéine cytosolique thermostable de la famille des protéines associées aux microtubules, dont le rôle est de promouvoir et stabiliser l'assemblage des microtubules (148, 765). L'unité de bases des microtubules est un hétérodimère de 120 kDa composé des α - et β -tubulines. Ainsi, les cellules PC12 différenciées en neurones et surexprimant la protéine *Tau* présentent une croissance plus rapide des prolongements et une stabilité accrue des neurofilaments (230). *Tau* pourrait également interagir avec des protéines telles que la kinésine et ainsi moduler le transport des vésicules le long de l'axone (722).

La protéine *Tau* est présente chez de nombreux mammifères. Elle est exprimée dans de nombreux tissus périphériques, comme en témoigne la mise en évidence des ARNm et de la protéine dans le cœur, le rein, les poumons, les muscles, le pancréas, les testicules et les fibroblastes (312, 370). Chez l'homme, elle est principalement exprimée dans les neurones où elle intervient plus particulièrement sur la formation des microtubules nécessaires au transport de vésicules dans les neurites ou les axones (65, 204, 402). La protéine *Tau* pourrait en outre avoir un rôle clef dans la maturation neuronale (402), et plus particulièrement dans le processus de polarisation lors duquel se forment l'axone et le corps somato-dendritique (208). Lors d'un phénomène neurodégénératif, *Tau* subit de multiples altérations qui, entre autres, lui font perdre ses capacités de maintien et d'assemblage des microtubules.

2-1-2-2. Organisation génique

Chez l'homme, le gène codant la protéine *Tau* est unique. Situé sur le locus 17q21.1, il contient 16 exons s'étendant sur environ 100 kb (16, 17). Ce gène est à l'origine de 3 transcrits, l'un de 2 kb traduit au niveau des tissus périphériques et 2 transcrits de 6 et de 9 kb traduits uniquement dans la rétine et le système nerveux périphérique (284). Un mécanisme d'épissage alternatif conduit à la synthèse de 6 isoformes différentes de 352 à 441 résidus d'acides aminés (figure 5) et de 45 à 65 kDa de masse moléculaire apparente après électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) (661).

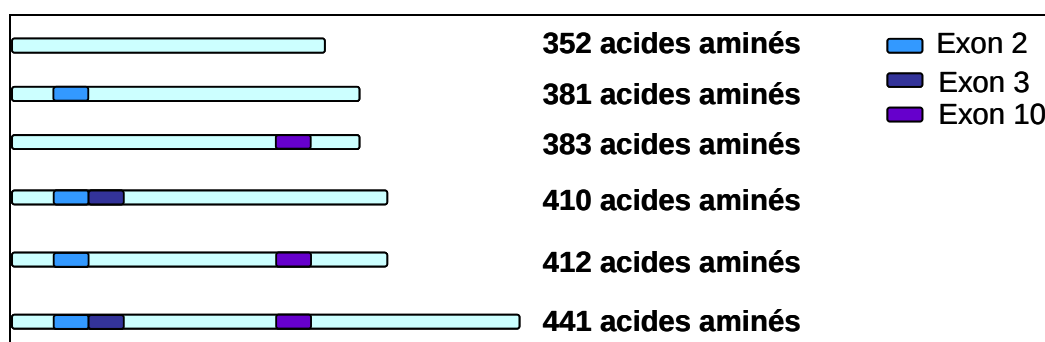


Figure 5. Les différents transcrits et isoformes de *Tau*
d'après Andreadis (17)

Ces 6 isoformes diffèrent entre elles par la présence d'1 ou 2 inserts (soit 29 ou 58 résidus d'acides aminés) à l'extrémité N-terminale et par le nombre de régions répétées à l'extrémité C-terminale. Le profil d'expression de ces isoformes peut aussi varier en fonction de l'âge et du type de neurone. Ainsi, alors que seule la protéine la plus courte est retrouvée au stade embryonnaire (284), les 6 isoformes générées par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 se retrouvent dans le cerveau humain adulte (285, 434), alors que les exons 4A, 6 et 8 ne sont jamais exprimés dans le système nerveux central (SNC). Par ailleurs, les ARNm contenant l'exon 10 ne sont pas présents dans les cellules granulaires du gyrus denté (285). Enfin, les isoformes se répartissent de façon différente au sein même du neurone, certaines étant associées au nucléole tandis que la majorité du pool de protéines *Tau* exprimées dans le neurone reste au niveau axonal (65, 437)

2-1-2-3. Structure primaire de la protéine Tau

Tau présente une structure en bâtonnet, longue d'environ 50 nm et comprenant 3 domaines.

- **Le domaine de projection** correspond aux exons 2 et 3 et compose l'extrémité *N*-terminale de certaines isoformes. Il est constitué d'une région acide suivie d'une région riche en prolines. Ce domaine permet à la protéine *Tau* associée aux microtubules d'interagir de façon directe ou indirecte avec d'autres composants du cytosquelette tels que les filaments d'actine, de spectrine et d' α -fodrine, avec la membrane plasmique ou encore avec certains organites comme les mitochondries et les vésicules d'exocytose (90, 352, 661). Dans les conditions physiologiques, le rapport molaire *Tau* vs. tubuline est d'environ 1 pour 5 (352).

- **Le domaine constant**, présent sur toutes les isoformes, contient des zones flexibles permettant à la protéine de se replier.

- **Le domaine de liaison aux microtubules** est constitué de 3 à 4 régions répétées imparfaites R1-R4 situées au niveau de l'extrémité *C*-terminale (317, 464). Ces séquences, longues de 31 à 32 résidus d'acides aminés et codées par les exons 9 à 12, sont à elles seules capables de promouvoir et stabiliser l'assemblage des microtubules *in vitro* (465). Alonso *et al.* (11) ont mis en évidence que l'isoforme contenant 3 régions répétées (3R) est plus facilement phosphorylée par les protéines kinases du cerveau que celle présentant 4 séquences répétées (4R), ce qui explique que les mutations du gène impliquant une augmentation du rapport 3R/4R sont à l'origine de processus neurodégénératifs.

2-1-2-4. Modifications post-traductionnelles

La protéine *Tau* fait l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles physiologiques, mais ces modifications ont surtout été étudiées dans le contexte des tauopathies. En effet, la protéine *Tau* des PHF présente un nombre anormalement élevé de modifications biochimiques dont les mieux décrites sont la glycosylation, l'hyperphosphorylation, l'ubiquitinylation, la polyamination, la nitration et éventuellement, la glutathionylation. La glycosylation et l'hyperphosphorylation sont nécessaires à la formation des PHF (293, 432), alors que les autres modifications semblent plutôt résulter de l'altération des fonctions de réparation et d'élimination des protéines altérées.

2-1-2-4-1. Glycosylation

La protéine *Tau* humaine présente 3 sites potentiels de *N*-glycosylation, Asn¹⁶⁷-Ala-Thr¹⁶⁹; Asn¹⁶⁹-Ile-Thr¹⁷¹; Asn⁴¹⁰-Val-Ser⁴¹² (numérotation effectuée sur l'isoforme la plus longue), non glycosylés dans les conditions physiologiques (758). Le caractère *N*-glycosylé de la protéine *Tau* impliquée dans les PHF a été rapporté par Wang *et al.* (758), puis confirmé par d'autres auteurs (496). Parallèlement, Arnold *et al.* (31) ont mis en évidence une *O*-glycosylation de la protéine *Tau* bovine.

Lors d'une tauopathie, l'ajout de groupements *N*-glycosylés permettrait de maintenir la structure hélicoïdale des PHF et de faciliter la phosphorylation de la protéine en favorisant la reconnaissance par certaines kinases, dont Cdc2 (308, 716). Ainsi, la protéine *Tau* déglycosylée est phosphorylée

moins rapidement par les protéines kinases GSK-3 β , Cdk5 et PKA que la protéine *Tau* glycosylée qui, à l'inverse, est déphosphorylée plus lentement (496). Ces résultats sont confortés par les travaux de Wang *et al.* (758) montrant que la déglycosylation puis la déphosphorylation de *Tau* associée aux PHF permettent de restaurer l'activité de polymérisation des microtubules, alors que la déglycosylation seule ne le permet pas. La présence de groupements O-glycosylée inhiberait en revanche l'hyperphosphorylation de *Tau* et la formation des PHF (31). L'effet induit par les N-glycosylations précéderait et faciliterait le processus d'hyperphosphorylation de façon site spécifique ainsi que l'agrégation de *Tau* dans le cadre des pathologies neurodégénératives (716).

La protéine *Tau* est également soumise à des glycations (notamment de résidus lysyls), intervenant plus particulièrement dans le domaine de liaison aux microtubules. Ce type de modification non enzymatique interviendrait comme un événement précoce capable de stabiliser la formation des PHF (461, 462, 784).

2-1-2-4-2. Phosphorylation

Plus de 80 sites potentiels de phosphorylation sont présents sur l'isoforme *Tau* la plus longue. Les protéines *Tau* associées aux PHF présentent un pI apparent plus acide que celles associées aux microtubules (661). L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des sites de phosphorylation a mis en évidence l'hyperphosphorylation des protéines *Tau* des PHF, présentant une stœchiométrie de phosphorylation de 6 à 8 mol phosphates/mole de protéine *Tau* contre 1,9 mol de phosphates/mole de protéine *Tau* extraites de cerveau sain (403). Une trentaine de sites faiblement phosphorylés dans les conditions physiologiques sont plus particulièrement phosphorylés dans des conditions pathologiques (102, 334, 499). Ces sites de phosphorylation sont localisés à l'extérieur du domaine de liaison aux microtubules à l'exception des résidus Ser²⁶², Ser²⁸⁵, Ser³⁰⁵, Ser³²⁴, Ser³⁵² et Ser³⁵⁶.

Tau est phosphorylée par différentes kinases parmi lesquelles les MAP (*mitogen activated protein*) kinases, les *Tau* tubuline kinases, les kinases dépendantes des cyclines telles que Cdc2 et Cdk5, les MARK (*microtubule affinity regulating kinase*), la CaMKII (*Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II*), la PKA (*cyclic-AMP-dependent kinase*), la GSK-3 β , les caséines kinases I et II (figure 6A), ainsi que les SAPK/JNK (*stress activated protein kinases*) (39, 103, 209). GSK-3 β jouent par ailleurs un rôle clef dans la régulation de l'activité de *Tau* en régulant l'épissage de cette dernière et en favorisant la production des variants comportant 3 régions répétées (3R). Ces derniers présentent une affinité pour les microtubules et une implication dans leur polymérisation moindre que celles d'autres variants tels que 4R. Ainsi une surexpression de la kinase GSK-3 β concourt à la destabilisation du cytosquelette par deux processus qui sont d'une part l'hyperphosphorylation de la protéine *Tau* et d'autre part la génération des isoformes 3R (39, 345). La déphosphorylation de *Tau* est le plus souvent assurée par les phosphatases endogènes du cerveau PP1, 2A, 2B ou calcineurine, 2C et PP5 (290, 291, 292, 416). Dans les neurones embryonnaires en culture primaire, *Tau* reste phosphorylée en des sites différents selon l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la PP2A ou de la PP2B, ce qui suggère une spécificité des sites cibles (639).

L'hyperphosphorylation de *Tau* constituerait un événement précoce dans la formation des PHF (87) résultant d'une augmentation de l'activité des kinases et/ou d'une diminution de l'activité des phosphatases. De nombreux auteurs (290, 292, 690) ont rapporté une diminution de l'expression et de l'activité de PP2A dans le cerveau de patients atteints de la MA (figure 6B), expliquant pourquoi d'autres protéines (β -tubuline, β -caténine) sont aussi hyperphosphorylées dans cette maladie. Des études *post mortem* réalisées sur des cerveaux de patients décédés de la MA, sur cultures organotypiques de tranches de cerveau de rat et sur souris transgéniques suggèrent en outre que la diminution de l'expression et de l'activité de PP2A conduirait à une hyperphosphorylation de *Tau* en raison non seulement de la perte de l'activité phosphatase, mais également de l'activation par PP2A de protéines kinases telles que la CaMKII, les MAPK et les SAPK (55, 417).

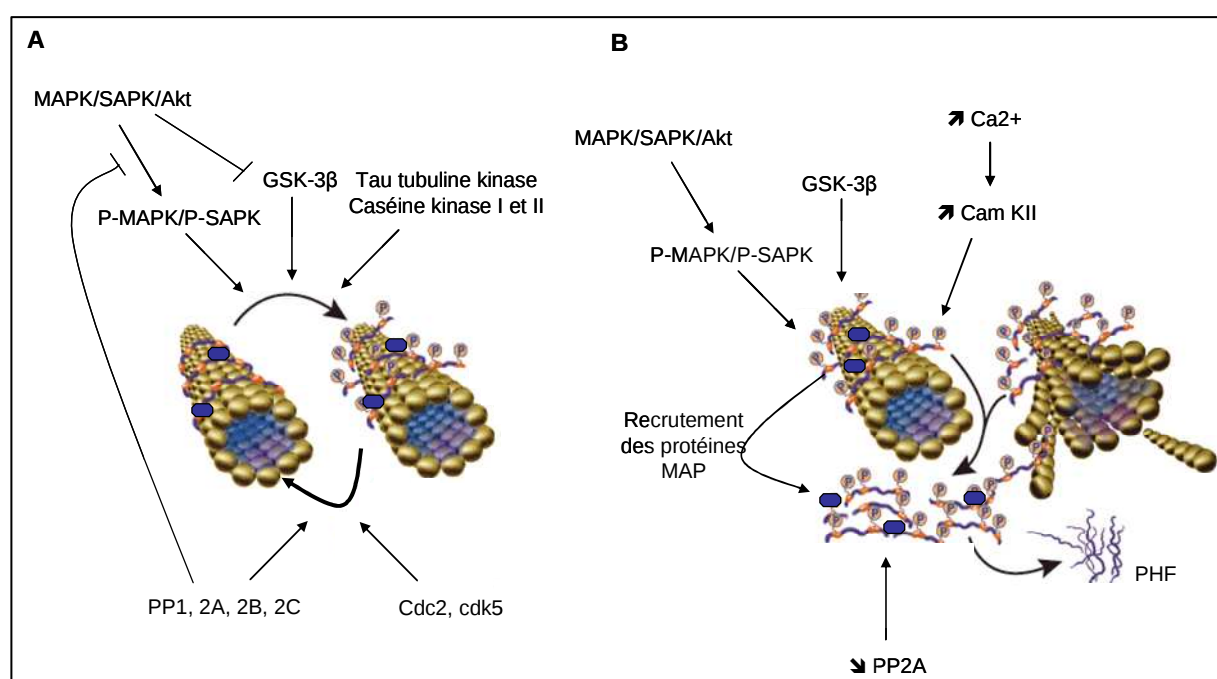


Figure 6. Degré de phosphorylation de la protéine *Tau*
A, conditions physiologiques ; B, tauopathies

2-1-2-4-3. Déstabilisation des microtubules

La conséquence physiopathologique de l'hyperphosphorylation de *Tau* est la réduction de son affinité pour les microtubules (492). Ainsi, le pool de protéines *Tau* capables de se lier aux microtubules et donc d'en promouvoir la polymérisation est significativement réduit chez les patients atteints de la MA (89, 492, 783), que le site de phosphorylation soit localisé dans ou hors du domaine de liaison aux microtubules. Par ailleurs, l'accumulation et l'agrégation des protéines *Tau* anormalement phosphorylées induisent le recrutement des protéines MAP1 et MAP2 (9, 10), amplifiant ainsi la déstabilisation des microtubules (figure 6B). La désorganisation des microtubules observée dans la MA présente d'importantes répercussions sur le transport axonal et contribue à l'altération de la plasticité synaptique et au processus neurodégénératif (25).

2-1-2-5. Formation et maturation des PHF

2-1-2-5-1. Formation des PHF

L'augmentation anormale du pool de *Tau* phosphorylées solubles constitue le point de départ de l'association des protéines *Tau* entre elles et de la formation d'un complexe insoluble résistant aux protéases (2, 40, 87, 432). La séparation par SDS-PAGE des PHF isolées à partir de tissus cérébraux de patients décédés de la MA conduit à identifier 3 sous-espèces majoritaires de masse moléculaire apparente 60, 64 et 68 kDa et une espèce minoritaire de 72 kDa (tableau 3). La forme de 60 kDa correspond à l'isoforme fœtale ($2^{-}3^{-}10^{-}$) phosphorylée, celle de 64 kDa aux isoformes ($2^{+}3^{-}10^{-}$) et ($2^{-}3^{-}10^{+}$) phosphorylées, et la forme de 68 kDa aux isoformes ($2^{+}3^{+}10^{-}$) et ($2^{+}3^{-}10^{+}$) phosphorylées. La phosphorylation de l'isoforme la plus longue ($2^{+}3^{+}10^{+}$) conduit à l'apparition de l'espèce minoritaire de 72 kDa. Ainsi, les PHF contiennent l'ensemble des 6 isoformes *Tau* hyperphosphorylées (91, 555).

Bien que la protéine *Tau* monomérique ne soit pas structurée en solution (657), différentes régions ont été récemment impliquées dans la formation d'éléments de structures secondaires lors de l'agrégation sous forme de PHF (750). Ainsi, un peptide synthétique identique à l'hexapeptide Val³⁰⁵-Lys³¹¹ présent au début de la 3^{ème} région répétée de *Tau* pourrait adopter lors de l'agrégation une conformation en feuillet β qui constituerait un noyau de nucléation facilitant la formation des PHF (figure 7).

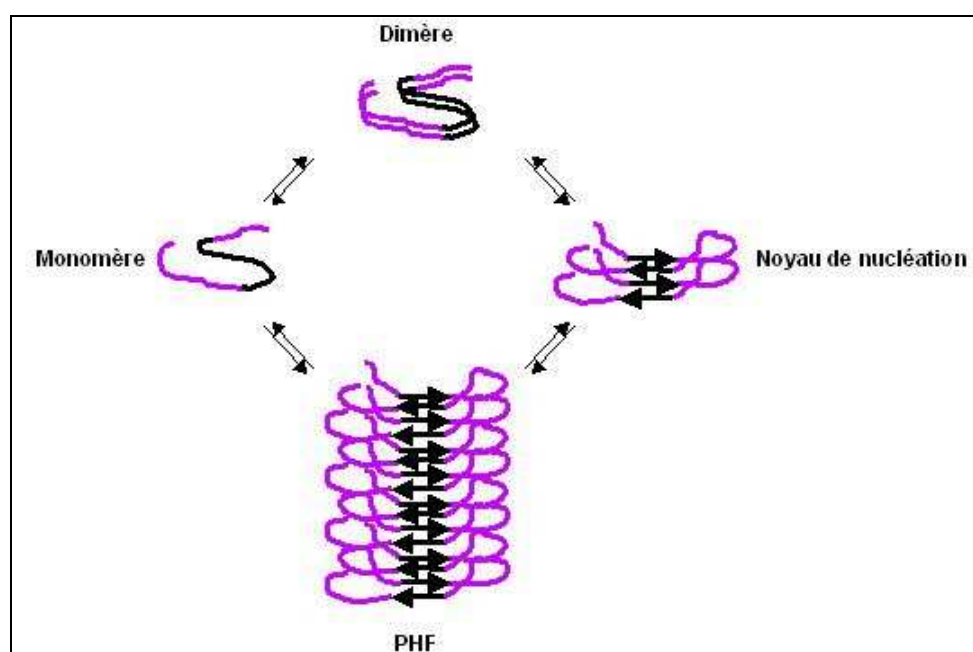


Figure 7. Modèle de formation des PHF

d'après von Bergen *et al.* (750)

Sous forme monomérique, Tau présente une conformation non repliée. Sa dimérisation n'implique pas nécessairement l'apparition de structures, mais la formation éventuelle de feuillets β (représentés par des flèches noires) constitue un noyau de nucléation pour la formation des PHF.

Ces travaux, ainsi que la démonstration par transfert de fluorescence que les résidus tyrosyls de l'extrémité N-terminale viennent au contact du domaine de liaison aux microtubules, suggèrent que *Tau*

adopte des structures secondaire, tertiaire et quaternaire lui conférant une capacité à l'agrégation. Cette hypothèse est confortée par le fait que la délétion de la zone intermédiaire séparant la partie *N*-terminale du domaine de liaison aux microtubules exacerbe le potentiel agrégant de la protéine. Parmi les régions capables d'adopter une structure secondaire, les séquences Val²⁷⁵Gln-Ile-Ile²⁷⁸ et Val³⁰⁶Gln-Ile-Val-Tyr³¹⁰ sont probablement les plus impliquées dans l'autoagrégation de *Tau* (269, 299).

2-1-2-5-2. Maturation des PHF

Les PHF subissent de nombreuses modifications conduisant à leur maturation (figure 8).

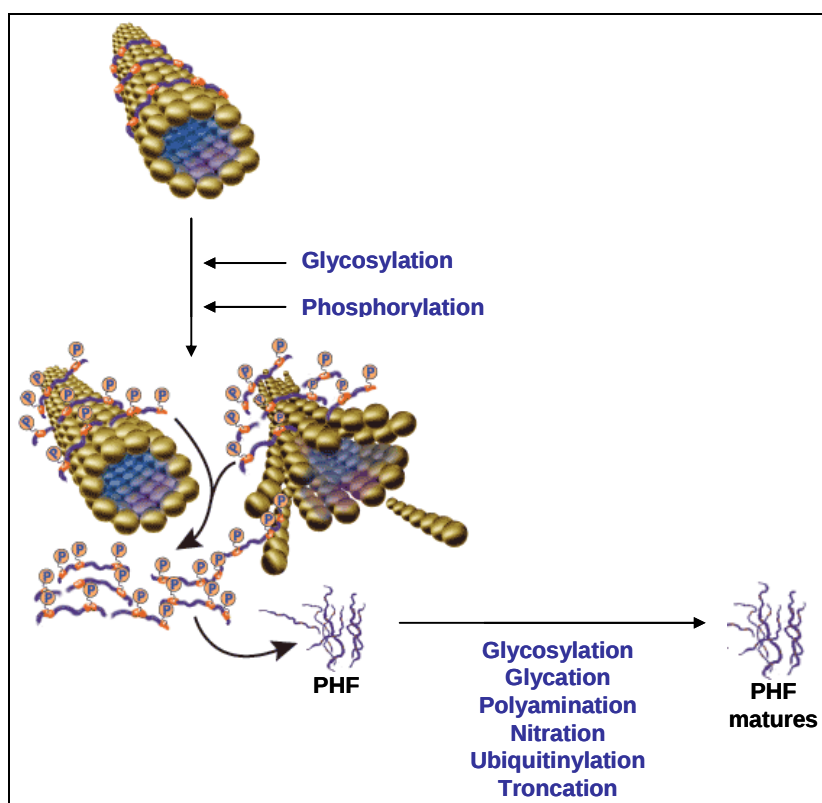


Figure 8. Modifications post-traductionnelles nécessaires à l'obtention de PHF matures

2-1-2-5-2-1. Polyamination

La transglutaminase responsable de la polyamination est surexprimée dans le cerveau des patients atteints de la MA et co-localisée avec la protéine *Tau* des PHF. La polyamination de *Tau* ne modifie pas la capacité de liaison aux microtubules, mais induit une résistance à la protéolyse, notamment celle dépendante de la calpaïne (556, 729).

La transglutaminase peut aussi catalyser des réactions de transamidation intra- ou intermoléculaires entre les résidus glutaminyls et les résidus lysyls (250) conduisant à la formation de complexes de haute masse moléculaire, insolubles et résistants aux protéases (556, 729). Huit résidus glutaminyls de la protéine *Tau* ont été identifiés comme des sites potentiels de transamidation, dont les 2 sites majeurs Gln³⁵¹ et Gln⁴²⁴ ; 10 résidus lysyls donneurs de groupement amine ont par ailleurs été localisés (556).

2-1-2-5-2-2. Nitration

La MA est caractérisée par la mise en place d'un stress oxydant générant entre autres des peroxynitrites (ONOO⁻) capables d'induire des peroxydations lipidiques (322), des réactions de nitration et d'oxydation, ainsi que des réactions de polymérisation par la formation de liaisons 3,3'-dityrosyls (623). La nitration de la protéine *Tau* de cerveau de patients atteints de différentes tauopathies dont la MA a été mise en évidence par Horiguchi *et al.* (357). Les conséquences physiologiques de cette modification sont encore mal connues, mais leurs effets pourraient dépendre des sites modifiés. Ainsi, alors que la nitration des résidus Tyr¹⁸ et Tyr³⁹⁴ semble inhiber l'agrégation de *Tau in vitro*, celles des résidus Tyr²⁹ et Tyr¹⁹⁷ conduit à l'obtention de filaments plus longs, suggérant une implication de la nitration dans la modulation du processus de formation et de maturation des PHF (623). La formation des liaisons 3,3'-dityrosyls permettrait en outre de stabiliser les filaments en cours de formation (623).

2-1-2-5-2-3. Ubiquitinylation

Le degré d'ubiquitinylation de la protéine *Tau* est augmenté de plusieurs fois dans le cortex de patients atteints de la MA et semble corrélé à l'amplitude de la neurodégénérescence fibrillaire puisqu'il est inchangé dans le cervelet, très peu concerné par ces lésions (757). La protéine *Tau* associée aux PHF est ubiquitinylée tardivement (41, 547) et le plus souvent en un seul site, ce qui ne constitue pas un signal suffisant pour l'adressage vers les voies de dégradation cellulaire (134). En outre, *Tau* est relativement résistante à la protéolyse en raison de son hyperphosphorylation (293) et de l'enfouissement des sites de clivage dans les filaments de PHF. L'association d'une forme aberrante d'ubiquitine aux différentes lésions caractéristiques de la MA et la présence de *Tau* ubiquitinylées dans d'autres tauopathies, notamment dans les FTDP-17 (195), suggèrent l'importance de cette modification dans les lésions observées. Par ailleurs, une partie du pool cérébral de *Tau* des patients décédés de la MA est polyubiquitinylée. Cette modification permettrait la reconnaissance et la dégradation *in vitro* de *Tau*, conduisant à une amélioration du taux de survie cellulaire (668).

2-2. L'hypothèse myéloïste

2-2-1. Histopathologie

Trois types de dépôts amyloïdes sont retrouvés de façon récurrente dans le cerveau des patients décédés de la MA : les plaques diffuses, les plaques séniles et les dépôts cérébrovasculaires amyloïdes (546). Contrairement à la neurodégénérescence fibrillaire dont l'apparition dans les différentes zones cérébrales est associée à l'avancée de l'état démentiel du patient, la présence des dépôts amyloïdes est relativement mal corrélée à la sévérité de l'atteinte. En effet, de nombreux dépôts diffus de peptides amyloïdes peuvent exister chez des patients dépourvus de détérioration intellectuelle et inversement. La simple présence de ces lésions ne permet donc pas d'asseoir le diagnostic de MA.

2-2-1-1. Les plaques diffuses

Généralement plus abondantes que les plaques séniles, les plaques diffuses sont des dépôts amorphes et peu denses de peptides A β non agrégés (659). Ces plaques, appelées dépôts préamyloïdes, ne contiennent pas de noyau amyloïde et ne fixent donc pas le rouge Congo ou la thioflavine S, les colorants spécifiques des dépôts de type amyloïde. La présence de plaques diffuses n'affecte pas de façon significative la structure et l'organisation des dendrites (199, 200). Ces plaques présentent majoritairement un peptide A β tronqué, le peptide A β_{17-42} (630), qui serait impliqué dans le recrutement des protéoglycanes, de l' α_1 -antichymotrypsine et de l'acétylcholinestérase. Ceci suggère un rôle de ce peptide dans la formation des plaques séniles (546). Les plaques diffuses représenteraient donc un stade précoce de la formation des plaques séniles, puisque ce sont les seules présentes dans les zones cérébrales dépourvues ou faiblement associées aux lésions classiques (plaques séniles et PHF) telles que le cervelet ou le thalamus (659). Par ailleurs, des plaques préamyloïdes peuvent aussi être présentes dans le cortex de sujets sains ne présentant aucun symptôme démentiel (198).

2-2-1-2. Les plaques séniles

Les plaques séniles, également appelées plaques focales ou plaques neuritiques, sont des structures sphériques de 50-200 μ m de diamètre et de densité variable (659). Elles sont composées d'un noyau central enrichi en peptide A β (375), entouré de neurites dystrophiques qui s'incurvent à proximité des plaques pour les rejoindre et y subir de multiples altérations morphologiques (199, 423, 606).

Contenant le plus souvent des PHF ainsi qu'un excès de lysosomes et de mitochondries (53), les neurites dystrophiques présentent une capacité moindre de transmettre l'influx nerveux (423). Certaines mutations retrouvées dans le gène codant l'APP ont pour effet de promouvoir la production du peptide neurotoxique A β_{42} , plus hydrophobe que le peptide A β_{40} et présentant des propriétés hautement insolubles et oligomérisantes (381, 382). Ainsi, bien que produit de façon minoritaire, le peptide A β_{42} est majoritaire au sein des plaques amyloïdes (375). Toutefois, ces structures renferment aussi du peptide A β_{40} , de moindre propension à l'agrégation. L'analyse (immuno)histochimique des plaques séniles a révélé la présence de nombreuses molécules associées (546), traduisant entre autres la survenue d'un processus inflammatoire et d'un stress oxydant, ainsi que l'apoptose des neurones environnants. Les protéines associées peuvent également avoir un rôle dans le dépôt ou la clairance du peptide A β . Ainsi, l'acétylcholinestérase intervient comme un facteur de nucléation permettant l'agrégation et la précipitation du peptide A β au sein d'éléments de type plaques séniles *in vitro* (369, 622). Les plaques séniles sont généralement situées à proximité de vaisseaux sanguins et associées aux cellules gliales participant à l'initiation d'un processus inflammatoire (514). Les astrocytes sont le plus souvent disposés en cercle hors de la plaque, alors que les cellules microgliales sont associées aux noyaux amyloïdes (figure 9).

Nagèle *et al.* (557) proposent que la fonction phagocytaire des astrocytes conduise à l'accumulation dans ces cellules du peptide A β , lequel serait libéré après la lyse de ces cellules, participant ainsi à la croissance des plaques. Cette hypothèse est étayée par la présence au sein de certaines plaques d'une forte concentration de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), une protéine marqueur des cellules gliales. Dans ce modèle, la microglie, incapable d'internaliser le peptide A β *in vitro*, permettrait de le concentrer et de diriger la fibrillogénèse.

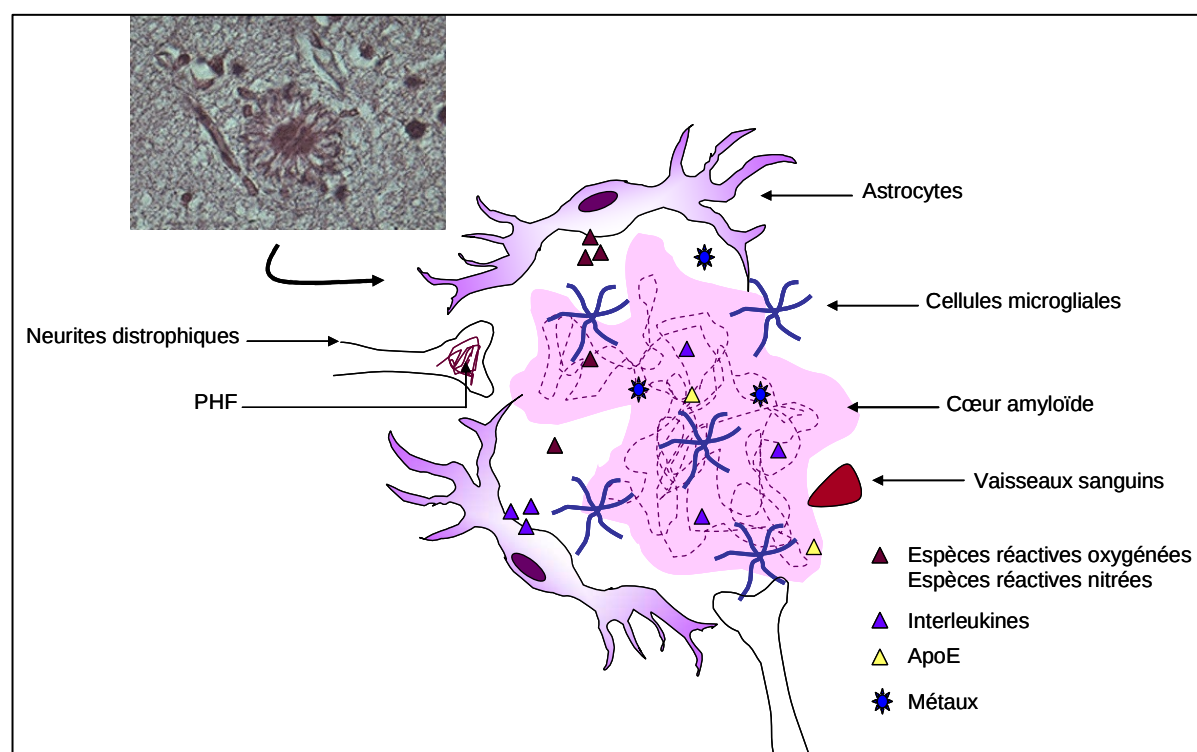


Figure 9. Composition d'une plaque sénile

Au contraire des plaques diffuses, les plaques séniles apparaissent tardivement dans l'évolution de la maladie. En effet, les peptides A β associés à ces plaques présentent des modifications biochimiques non enzymatiques, telles que l'isomérisation des résidus aspartyls (630) et la pyroglutamylation (443) absentes des plaques diffuses. De telles modifications exacerberaient le caractère insoluble du peptide.

2-2-1-3. Les dépôts amyloïdes cérébrovasculaires

L'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC), également appelée angiopathie congophile, présente une forte corrélation avec la MA, puisque 87% des patients atteints de la MA présentent une AAC, contre seulement 35% des patients âgés sains (282, 782). Cette corrélation peut en partie s'expliquer par des facteurs de risque communs aux deux pathologies, tels que l'expression de l'apolipoprotéine E4 (306, 782) ou celle de certaines isoformes de néprilysine (NEP), protéine impliquée dans la dégradation du peptide A β (782). L'AAC consiste en un dépôt de peptide A β dans et autour des vaisseaux sanguins associés aux plaques, c'est-à-dire les vaisseaux du cortex cérébral et des méninges (parenchymes et espaces sous-arachnoïdes, par exemple). Le processus d'amyloïdose est généré par les cellules

périvasculaires des capillaires, artérioles et vénules (770). La cascade conduisant au processus neurodégénératif serait liée à une perte d'efficacité dans le processus d'élimination du peptide A β par voie sanguine. La diminution de la vitesse de circulation du peptide favoriserait sa précipitation dans les petits vaisseaux, induisant ainsi leur obstruction, la dégénérescence des cellules vasculaires, une ischémie et des micro-hémorragies (747). Cette perte d'efficacité du mécanisme de clairance conduirait à l'augmentation globale du niveau de peptide A β dans le cerveau (565). Certains auteurs s'appuyant sur des modifications biochimiques suggèrent que ces dépôts pourraient être des formes précoces des futures plaques séniles du système parenchymateux (630). Ainsi, alors que 73% des peptides A β présents dans les plaques séniles comportent un résidu iso-aspartyl en position 7, seulement 25% des peptides A β présentent cette modification dans les dépôts cérébrovasculaires du parenchyme. Par ailleurs, les dépôts amyloïdes cérébrovasculaires et les plaques séniles sont associés à différentes protéines influant sur la réponse inflammatoire et la toxicité induites (124).

2-2-2. Mécanismes moléculaires de la cascade amyloïde

2-2-2-1. La protéine APP

2-2-2-1-1. Expression et structure génique de l'APP

Le gène de l'APP, exprimé de manière ubiquitaire, a été le premier associé à une forme familiale de la MA (286, 624). Situé sur le *locus* 21q21.3-q22.05, il contient 18 exons sur environ 170 kb. Sa présence sur le chromosome 21 explique la forte corrélation entre la MA et le syndrome de Down (575). L'épissage alternatif du transcrit du gène *app* génère après traduction des protéines se distinguant principalement par l'absence (APP⁶⁹⁵) ou la présence (APP⁷⁵⁰ et APP⁷⁷⁰) d'un domaine de liaison aux inhibiteurs de protéase Kunitz (KPI) à proximité de l'extrémité N-terminale de la protéine (190, 419). L'isoforme APP⁶⁹⁵ est majoritairement exprimée dans les neurones. Ainsi, Tanaka *et al.* (721) ont montré que le rapport des ARNm des isoformes APP⁷⁷⁰/APP⁷⁵⁰/APP⁶⁹⁵ dans le cortex est de 1/10/20, alors qu'il est de 2/4/1 dans les astrocytes en culture (305). Outre ces 3 isoformes, de multiples modifications post-traductionnelles dont les O- et N-glycosylations, la sulfatation ou la phosphorylation conduisent à une famille de protéines hétérogènes de masses moléculaires comprises entre 110 et 140 kDa (364). La région codant le peptide A β s'étend sur une partie des exons 16 et 17 et correspond à une séquence de 40 à 43 résidus d'acides aminés situés dans le domaine membranaire de la protéine.

Les protéines APP ont pour analogues structuraux la famille des protéines APLP (*amyloid precursor-like protein*), dont APLP1 et APLP2 exprimées chez les mammifères. Ces dernières possèdent le domaine KPI, mais sont dépourvues de la séquence correspondant au peptide A β (763). Les souris transgéniques APP^{-/-} sont viables, contrairement aux souris à la fois APP^{-/-} et APLP^{-/-} (340). Ces 2 classes de protéines auraient donc des fonctions proches et la perte de l'une d'elles pourrait être en partie compensée par la présence de ses homologues (751).

2-2-2-1-2. Structure protéique de l'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 dont il n'existe encore aucune structure cristalline (621). Elle est composée d'une importante région extracellulaire ou ectodomaine, d'un domaine transmembranaire unique et d'un court fragment intracellulaire (figure 10).

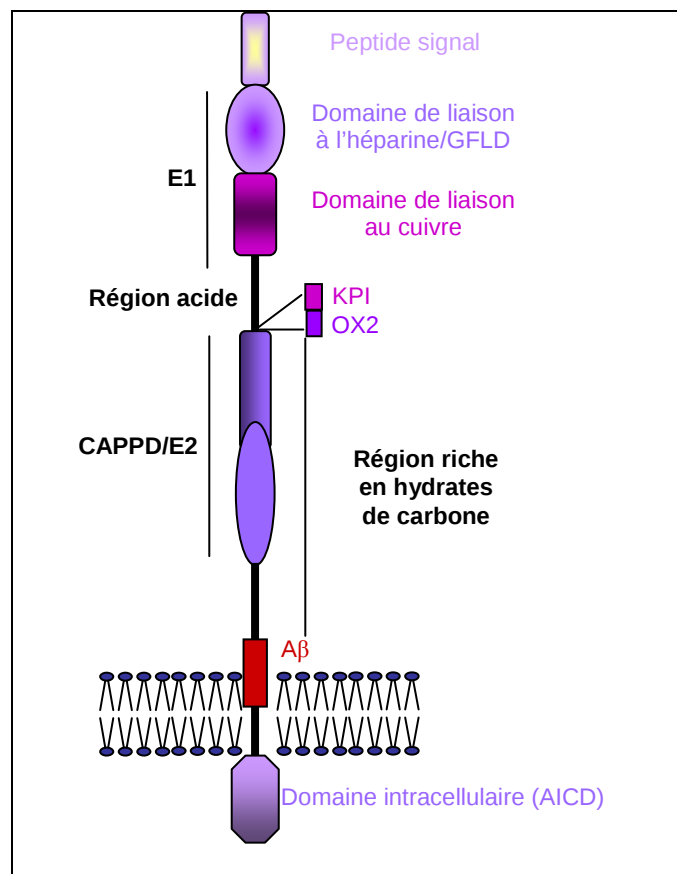


Figure 10. Les différents domaines de l'APP

d'après Dulubova *et al.* (12)

KPI, domaine de liaison aux inhibiteurs de protéases Kunitz ;
OX, domaine d'homologie OX2 ; *CAPPD*, domaine central de l'APP

- **L'ectodomaine** constitue une région riche en structures secondaires, avec environ 70% de sa séquence participant à la formation de feuillets β et d'hélices α (301). Les acides aminés ne participant pas à la formation de ces structures sont regroupés au sein de 2 régions flexibles permettant probablement à la protéine de se replier dans l'espace. La première séquence amorphe, Ala¹⁹⁰-Glu²⁶⁴, est une région acide comportant 56% de résidus glutamyls ou aspartyls ; la seconde, His⁵⁰⁷-Gly⁵⁸⁹, correspond à un domaine de liaison entre l'extrémité N-terminale de la protéine et la région qui porte le peptide A β (212).

La séquence Asp²³-Val¹²⁸ a été cristallisée par Rossjohn *et al.* (633) et correspond à un domaine GFLD (*growth factor like domain*). Ce domaine est suivi par un domaine de liaison au cuivre (CuBD) qui s'étend des résidus Ser¹²⁴ à Leu¹⁸⁹. L'ensemble de ces deux domaines constitue le domaine E1 (figure 10). Ce dernier est connecté à la région glycosylée par la région acide. La région glycosylée

peut être divisée en 2 sous régions, la région E2 également appelée CAPPD (*central APP domain*) et le domaine de liaison. Le caractère hautement glycosylé de l'APP (les résidus carbohydrates constituent environ 1/3 de la masse totale de cette protéine) suggère un rôle dans l'adhésion cellules–cellules et dans l'interaction avec la matrice extracellulaire.

- **Le domaine intracellulaire de l'APP** également appelé AICD n'adopte pas de conformation stable en solution, mais différents états de transition ont pu être observés parmi lesquels la formation d'un cluster hydrophobe, d'un coude β et d'une structure de type hélice α . Il est probable que les interactions avec les différents partenaires protéiques provoquent des changements de conformation de la protéine et augmentent sa stabilité (621).

2-2-2-1-3. Fonctions biologiques de l'APP

Bien que les souris APP^{-/-} soient viables, elles présentent de nombreux troubles – prolifération gliale, diminution du taux de synaptophysine aux niveaux néocortical et hippocampique, diminution de la longueur des dendrites des neurones hippocampiques et diminution de la survie des neurones en culture – suggérant un rôle clef de l'APP dans le maintien de l'intégrité neuronale (180, 591). Les études destinées à élucider les fonctions de l'APP ont conduit à la mise en évidence de multiples fonctions potentielles (621). La plupart de ces fonctions correspondent à de grands processus biologiques, tels l'endocytose, la croissance des dendrites, l'arborisation ou la synaptogenèse qui requièrent le plus souvent des interactions entre cellules ou avec la matrice extracellulaire, dans lesquelles l'ectodomaine pourrait jouer un rôle (94, 135, 638, 730). Ce dernier possède des domaines de liaison à l'héparine, au collagène et à la laminine (404, 730). En outre, l'APP est co-localisée avec certaines protéines d'adhésion telles que la β 1-intégrine (703).

Le domaine AICD semble être au centre d'un réseau d'interactions complexes avec des protéines adaptatrices (114, 115, 337). La région Tyr⁶⁸²-Glu-Asn-Pro-Thr-Tyr⁶⁸⁷ est considérée comme une séquence essentielle à la modulation de différentes voies de transduction, avec laquelle peuvent interagir de nombreux facteurs parmi lesquels les protéines X11 et Fe65 modulant la production de peptide A β (413, 638). Ces dernières interagissent avec l'APP indépendamment de l'état de phosphorylation de la séquence Tyr-Glu-Asn-Pro-Thr-Tyr. Au contraire, Shc et Grb2, 2 protéines adaptatrices impliquées dans les voies de survie cellulaire, n'interagissent avec la protéine que si la Tyr⁶⁸² est phosphorylée. La phosphorylation de la Thr⁶⁸⁶ semble impliquée dans la régulation de la formation des complexes et dans leur stabilité (15, 621). L'APP est associée par son domaine intracellulaire aux protéines G, capables de moduler la signalisation cellulaire en intervenant sur la phospholipase C, l'adénylate cyclase ou les canaux calciques dépendants du voltage (122, 348, 730). Ainsi, Okamoto *et al.* (572) ont montré que certaines mutations de l'APP conduisent à l'activation constitutive de la protéine G_i, avec pour conséquence l'inhibition de l'adénylate cyclase et la mise en place d'un processus apoptotique. Aucun ligand physiologique spécifique capable de se lier à l'APP et d'activer les protéines G n'a encore été mis en évidence.

Le domaine AICD pourrait aussi réguler la transcription de nombreux gènes dont ceux codant l'APP, la NEP, la GSK-3 β (171, 413, 752), soit après translocation nucléaire suite à un clivage par les sécrétases, soit en permettant le recrutement à la membrane et l'activation de protéines de régulation des gènes (337).

2-2-2-2. Clivage protéolytique de l'APP

L'APP est métabolisée *via* 2 voies : la voie non amyloïdogène et la voie amyloïdogène (231, 493, 569), se distinguant principalement par les protéases impliquées et les métabolites produits. La voie non amyloïdogène est caractérisée par 2 clivages endoprotéolytiques consécutifs catalysés par l' α - puis la γ -sécrétase, ayant pour résultat la production de 3 fragments distincts : la partie APP α soluble (APPs- α), le domaine AICD et le peptide P3 (figure 11). Dans les conditions physiologiques et dans la plupart des types cellulaires, 95% de la maturation protéolytique de l'APP fait intervenir le clivage au site α (228). Alternativement, l'APP peut être clivée par la β -sécrétase (suivi pareillement par la γ -sécrétase) pour produire les peptides amyloïdes et la partie APP β soluble (APPs- β). La plupart des mutations du gène de l'APP conduisant à la MA sont à proximité des sites de clivage de l'APP par les sécrétases et induisent une augmentation de la part relative des coupures par les β et γ -sécrétases.

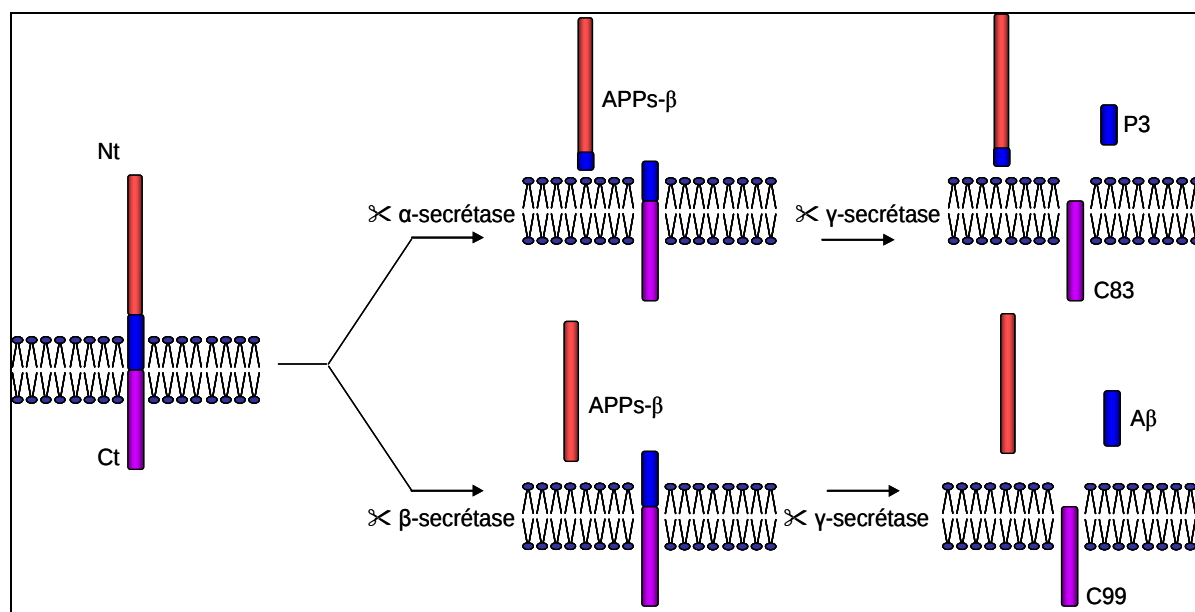


Figure 11. Les deux voies de maturation de l'APP

2-2-2-2-1. Les sécrétases

2-2-2-2-1-1. L'activité α -sécrétase

Le clivage par l' α -sécrétase intervient au sein de la région correspondant au peptide A β (figure 11), au niveau de la liaison Lys¹⁶-Leu¹⁷ (228). En conséquence, l'activation de cette voie par différents agents (estrogènes, testostérone, neurotransmetteurs, facteurs de croissance) conduit à une diminution significative de la production de peptide A β (106). Trois protéines de la famille des protéases ADAM

(*a disintegrin and metalloprotease*) sont susceptibles de porter l'activité protéolytique de type α -sécrétase (7, 107) : les protéines ADAM9, 10 et 17, aussi appelée TACE (*TNF- α converting enzyme*), dont la fonction première est de cliver le précurseur du TNF- α (74). Ces 3 protéines présentent des caractéristiques structurales communes. Elles sont situées au niveau de la membrane plasmique des cellules permettant ainsi la sécrétion du fragment APPs- α dans le milieu extracellulaire (746).

2-2-2-2-1-2. L'activité β -sécrétase

Deux protéases à acide aspartique, BACE (*β -site APP cleaving enzyme*) 1 et 2, ont été identifiées comme étant capables de porter l'activité β -sécrétase (203, 365, 366). Leur activité intervient dans les endomembranes et plus particulièrement au niveau du réticulum endoplasmique (RE), du réseau golgien et des endosomes (161, 307, 332, 429). Le pH optimal acide de la protéine BACE1 suggère qu'elle pourrait également intervenir au niveau des lysosomes (746). Ainsi, 70% de l'APP ayant atteint la membrane plasmique est internalisé dans la minute pour regagner certaines vésicules cytoplasmiques parmi lesquelles les endosomes. Les études réalisées sur souris transgénique suggèrent que la protéine BACE1 porte la majorité de l'activité β -sécrétase dans le cerveau et qu'elle constitue de ce fait une cible thérapeutique potentielle (110, 506). Ainsi, les lignées BACE54/4 et BACE54/11 de souris transgéniques exprimant la protéine BACE1 humaine présentent un taux élevé de peptide A β (78), alors que des souris dont le gène BACE1 a été inactivé ne présentent aucune altération phénotypique (506) et ne génèrent pas de peptide A β (110). Par ailleurs, les souris issues du croisement de souris transgéniques surproduisant le peptide A β avec des souris BACE1^{-/-} ne présentent pas de production de peptide amyloïde (110). BACE2 montre des spécificités de substrat similaires (236) mais est faiblement exprimée dans le cerveau (56). Pour cette raison, il n'existe pas de relation directe entre cette protéine et le développement de la MA.

2-2-2-2-1-3. L'activité γ -sécrétase

Les fragments C83 et C99, générés respectivement par les α - et β -sécrétases, sont des substrats de la γ -sécrétase dont l'activité catalytique est portée par un complexe protéique comprenant la nicastrine (Nct), la protéine APH-1, la protéine PEN2 (*presenilin enhancer 2*) et les présénilines PS1 et PS2 (193, 229, 415, 745, 746). L'activité enzymatique de ce complexe a été détectée dans la membrane plasmique, ainsi que dans certaines endomembranes parmi lesquelles celles du RE, de l'appareil de Golgi et du réseau trans-golgien, et des endosomes. En fait, l'activité γ -sécrétase associée à la membrane plasmique pourrait ne constituer qu'une part très minoritaire (6%) de l'activité γ -sécrétase totale, suggérant, comme pour l'activité β -sécrétase, que la maturation protéolytique de l'APP nécessite son internalisation (117, 145).

- **Les présénilines** – Exprimées de façon ubiquitaire, les PS sont impliquées dans de multiples fonctions cellulaires, parmi lesquelles la régulation de l'apoptose (748, 772), la régulation de la signalisation intracellulaire (409, 467), l'interaction avec la β -caténine et la maturation des protéines membranaires dont la protéine Notch et l'APP. Les PS sont principalement localisées dans les

endomembranes du RE et de l'appareil de Golgi (22, 161, 192). Malgré tout, de faibles quantités de PS ont été mises en évidence dans les membranes nucléaire (482) et plasmique (196). L'implication des PS dans le métabolisme de l'APP a été suggérée par le lien entre les mutations des gènes *PSEN1* et *PSEN2*, respectivement sur les *locus* 14q24.3 et 1q31-q42, et l'apparition des formes familiales de la MA caractérisées par une augmentation du rapport $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (628, 653, 667, 779). Par ailleurs, les PS immunoprécipitent conjointement avec les fragments C99 et C83, produits des α - et β -sécrétases (780).

Les analyses topologiques des protéines PS1 et PS2, longues de 463 et 448 acides aminés respectivement (477, 667), ont mené à des résultats contradictoires sur le repliement de ces protéines dans les membranes. De nombreux auteurs s'accordent toutefois sur le modèle présenté par la figure 12, dans lequel la protéine est constituée de 8 segments transmembranaires et dont les extrémités N- et C-terminales se projettent dans le cytoplasme (479, 480, 100). Dans de nombreux types cellulaires et dans le cerveau, les PS subissent une maturation protéolytique par clivage entre les domaines transmembranaires 6 et 7 (480). Le faible taux de PS sous forme holoprotéique, la rapide conversion de la protéine en fragments protéolytiques dans le RE et la stabilité de ces fragments dans les membranes de l'appareil golgien suggèrent que ces fragments portent l'activité enzymatique des PS (601). Leur formation est contrôlée par une dégradation dépendante du protéasome des protéines PS excédentaires (100). L'activité protéolytique des PS est portée par 2 résidus aspartyls conservés, situés au niveau des domaines transmembranaires 6 et 7 dont la mutation conduit à une diminution significative de la production de peptides $A\beta$ (100, 771). La protéine et son substrat interagissent probablement par les domaines transmembranaires (779).

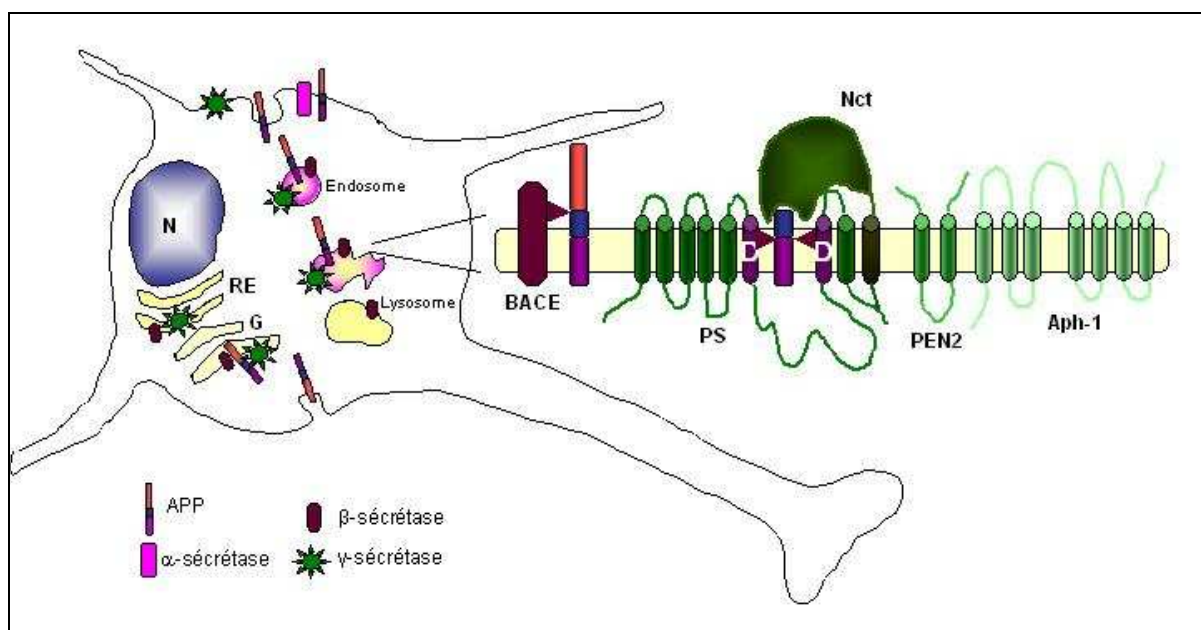


Figure 12. Clivage protéolytique de l'APP *in situ*

- **La nicastrine** – L'activité γ -sécrétase est portée par un complexe de haute masse moléculaire (figure 12) suggérant une interaction forte entre PS et protéines de régulation. Le premier facteur identifié fut la Nct ou Aph-2 (298, 392), une glycoprotéine transmembranaire de type 1 de 709 acides aminés, présente au niveau des endomembranes du RE et du réseau golgien (466). Le gène codant la Nct (*locus* 1q23) présente un polymorphisme associé à certaines formes sporadiques de MA. La mutation de certaines régions conservées induit une diminution du rapport $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, leur délétion, abolissant la synthèse des peptides amyloïdes, ce qui suggère un rôle de régulation de l'activité γ -sécrétase (136, 430, 493). L'association entre PS et Nct intervient dans le RE et induit un changement conformationnel de la Nct lui conférant une résistance à la trypsine (670). Cette association est nécessaire pour le passage de la Nct au niveau du réseau golgien où elle poursuivra sa maturation (217, 414). La Nct, nécessaire à la stabilité et à la maturation du complexe protéique γ -sécrétase, pourrait également permettre la reconnaissance et la présentation du substrat au site catalytique portant l'activité γ -sécrétase (433, 665). Ainsi, les extrémités *N*-terminales de différentes protéines transmembranaires, Notch et APP (fragments C99 et C83) par exemple (431), seraient reconnues par l'ectodomaine de la protéine Nct dont la masse moléculaire correspond à environ 45% de la masse moléculaire estimée du complexe γ -sécrétase (665).

- **APH-1** – Également nommée PEN1 pour *presenilin enhancer 1*, APH-1 est une protéine à 7 domaines transmembranaires dont l'extrémité *N*-terminale est située dans le domaine extracellulaire et l'extrémité *C*-terminale dans le cytosol (252, 298). Chez les mammifères, 2 protéines codées par les gènes *aph-1a* et *aph-1b* ont été mises en évidence (256). La protéine APH-1a, plus abondante et plus couramment exprimée, présente 2 isoformes issues d'un épissage alternatif et nommées APH-1aS et APH-1aL (313). La protéine APH-1 et la Nct interagissent pour former un sous-complexe, préalable à l'association sous forme de complexe γ -sécrétase (362, 456). Ces interactions interviendraient probablement au niveau du RE, très tôt après la synthèse de APH-1 dont elles induiraient la maturation protéolytique et l'obtention d'un fragment *C*-terminal associé à la Nct (252). La protéine APH-1 est nécessaire à l'activité protéolytique γ -sécrétase, son rôle exact dans la formation ou la régulation de ce complexe n'ayant toutefois pu encore être établi.

- **PEN-2** – PEN-2 (*presenilin enhancer 2*) est une protéine de 101 résidus d'acides aminés, avec 2 domaines transmembranaires et principalement localisée dans le RE (figure 12). Son extrémité *N*-terminale se projette dans le cytoplasme et l'extrémité *C*-terminale dans le milieu extracellulaire (170). Cette protéine essentielle à l'activité γ -sécrétase établit des interactions avec les protéines Nct et APH-1 et permet l'assemblage et la stabilisation du complexe γ -sécrétase (100, 194, 256).

2-2-3. Le peptide amyloïde β

La cascade amyloïde, proposée par Hardy & Higgins (330), postule que les troubles observés dans la MA résultent d'un métabolisme anormal de la protéine APP ayant pour conséquence une accumulation de peptides $A\beta$.

2-2-3-1. Implication des formes solubles dans les phases précoces de la MA

2-2-3-1-1. Formes monomérique et oligomériques du peptide amyloïde β

Bien que les dépôts de peptides amyloïdes constituent une caractéristique de la MA (470, 546, 659), le mécanisme par lequel le peptide A β induit la mort neuronale reste encore obscur. Depuis plusieurs années s'est développée l'hypothèse selon laquelle le peptide A β soluble, découvert par Tabaton (714), pourrait jouer un rôle déterminant dans la mort neuronale et la progression de la maladie (210, 421, 449, 571, 599). Les peptides amyloïdes solubles, définis comme les espèces restant dans le surnageant après ultracentrifugation d'1 h à 100.000 x g (442), respectent un équilibre entre formes monomérique et oligomériques de 2, 3 voire 4 unités (71, 756). Cet équilibre, également retrouvé pour les peptides synthétiques *in vitro*, est déplacé vers les formes oligomériques lorsque la concentration de peptides amyloïdes augmente. En raison d'interactions hydrophobes fortes, une fraction des oligomères formés est très stable et peut donc être sécrétée (756). La concentration de peptides A β sous forme soluble semble mieux corrélée avec la sévérité de la perte synaptique et de l'atteinte démentielle que la densité des plaques séniles (502, 530). De plus, différentes études menées sur des souris Tg2576, modèles transgéniques de la MA, ont mis en évidence un processus neurodégénératif accompagné de troubles de l'orientation en l'absence de plaques séniles (144, 361, 424).

2-2-3-1-2. Implication dans la perte synaptique et le déclin cognitif

Les travaux de Pillot *et al.* (598, 599) ont démontré que le peptide A β soluble présente des propriétés fusogènes lui permettant d'interagir avec les membranes et d'en altérer les propriétés et les activités associées. Ces propriétés fusogènes sont liées à une structure tridimensionnelle particulière en solution (698, 154, 546) pour laquelle différents modèles ont été proposés (figure 13).

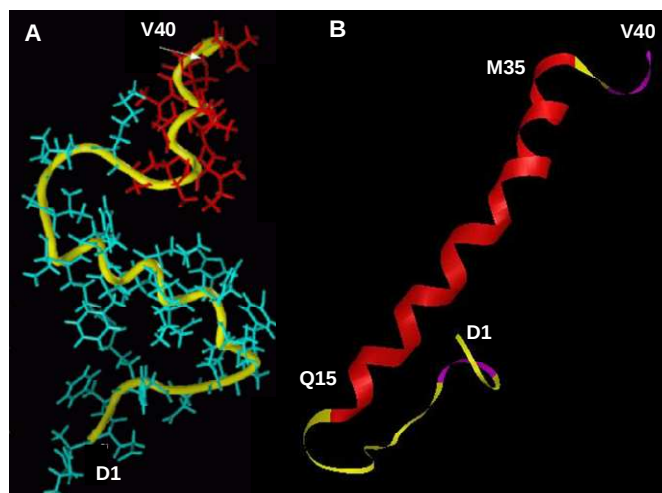


Figure 13. Modélisation de la structure tridimensionnelle du peptide A β_{40}
A, d'après Sticht *et al.* (698) ; B, d'après Coles *et al.* (154)

Le modèle le plus récent (figure 13B) a été proposé par spectroscopie RMN en solution aqueuse contenant des micelles de SDS reproduisant les conditions physicochimiques de l'interface milieu

extracellulaire/membrane plasmique. Ce modèle met en évidence une région non structurée entre les résidus 1 à 14, suivie d'une hélice α hydrophobe (154).

L'interaction du peptide A β avec la bicouche lipidique, principalement au niveau des membranes synaptiques (446), pourrait constituer la première étape d'une cascade d'événements dont la résultante serait la perte synaptique et éventuellement la mort cellulaire, entraînant les premiers troubles de l'apprentissage et de la mémorisation (346, 491). Ainsi, le processus LTP de potentialisation à long terme, utilisé comme modèle expérimental de mémoire et de plasticité synaptique, est inhibé après injection intraventriculaire de quantités sub-nanomolaires de peptides amyloïdes solubles dans l'hippocampe de rat (518, 635, 756). Un traitement du milieu dans lequel est solubilisé le peptide A β par la protéase IDE, capable de dégrader spécifiquement les monomères mais pas les oligomères de peptide A β , n'empêche pas l'inhibition de la LTP, suggérant que seules les formes oligomériques soient responsables des perturbations observées (449, 755, 756). En conséquence, certains auteurs proposent une hypothèse alternative à la cascade amyloïde dans laquelle les peptides A β solubles initient, par leurs interactions avec les membranes synaptiques, l'altération de la neurotransmission et du remodelage synaptique, et ce de façon précoce, *i.e.* avant l'apparition des premières plaques séniles. Cette hypothèse a été confortée par les analyses histologiques montrant une diminution de la densité synaptique préalable à la mort neuronale, par les études réalisées *post mortem* sur le cerveau de patients décédés de la MA et sur souris transgéniques modèles de la MA, suggérant que la perte de la fonction synaptique serait antérieure à la diminution de la densité synaptique (60, 183, 755).

L'exposition de neurones corticaux en culture primaire au peptide A β sous formes solubles a pour conséquence une perte neuronale importante. Bien que les mécanismes conduisant à la mort neuronale ne soient pas encore connus, il a pu être établi que les formes solubles du peptide A β induisent un processus apoptotique dépendant des caspases (598, 786), alors que la forme fibrillaire serait plutôt responsable d'une mort nécrotique (51, 708). Ceci suggère que le type de mort neuronale induit par le peptide A β dépend de sa conformation. La formation des oligomères solubles pourrait donc être déterminante dans la neurotoxicité observée dans la MA (147, 756).

2-2-3-1-3. Interactions avec les membranes cellulaires, première étape de la cascade neurodégénérative

Au vu de ces résultats, de nombreuses études ont cherché à déterminer les paramètres et les acteurs régissant les interactions du peptide A β sous forme oligomérique avec la membrane. Deux hypothèses controversées sont envisageables : (i) la création de pores membranaires capables de rompre l'homéostasie ionique de la cellule, (ii) l'interaction de ce peptide avec un récepteur membranaire ou une entité de type récepteur. Quelle que soit l'hypothèse, la composition et la structure de la membrane neuronale constituent vraisemblablement un élément clef de l'interaction et de la cytotoxicité du peptide. Ainsi, Arispe & Doh (27) puis Spöne *et al.* (695) ont montré que le contenu en cholestérol, qui détermine la fluidité membranaire, est un paramètre important dans la cytotoxicité du peptide A β , confirmant le caractère déterminant des interactions avec la membrane dans la mort neuronale associée à la MA.

2-2-3-1-3-1. Insertion dans la membrane plasmique

La formation de canaux amyloïdes a été décrite pour au moins 8 différentes classes de peptides amyloïdes impliquées dans différentes pathologies neurodégénératives parmi lesquelles les maladies de Parkinson, de Huntington, et de Creutzfeld-Jakob (394). Les peptides A β peuvent former des canaux ioniques dans les bicouches lipidiques planes, les liposomes, les neurones, les ovocytes et les fibroblastes (26, 258). Les canaux formés par les peptides A β_{40} et A β_{42} semblent présenter les mêmes caractéristiques en termes de taille et de sélectivité ionique (26). Ces canaux relativement larges ne présentent pas de spécificité de cations, sont perméables au Ca²⁺, bloqués en présence de Zn²⁺, sensibles au pH, à l'exposition aux solvants, à la concentration de peptide et à la présence d'agents de nucléation (28, 63, 172, 173, 219). Ces canaux pourraient être à la base des mécanismes neurotoxiques observés dans la MA. Leur formation pourrait en particulier induire une dépolarisation membranaire et un influx calcique responsables de la mise en place des cascades pro-apoptotiques. Les variants de peptide A β ne comptant pas plus de 10 résidus d'acides aminés ne forment pas de canaux, suggérant qu'une structure minimale soit nécessaire pour l'insertion dans la membrane (28). Malgré cela, Qi & Qiao (611) ont rapporté la formation d'oligomères de peptides A β_{31-35} capables de s'insérer *in vitro* dans les membranes sous forme de canaux. Les peptides A β_{40} et A β_{42} sont capables d'induire des mouvements ioniques dans les neurones corticaux de rat (266, 491) ainsi que dans d'autres types cellulaires (394). Différentes formes de canaux pourraient exister en raison de l'agrégation rapide et variable des peptides amyloïdes sous forme d'oligomères (394, 436). Différents modèles structuraux ont été proposés à ce jour (28, 214), dont celui présenté par la figure 14.

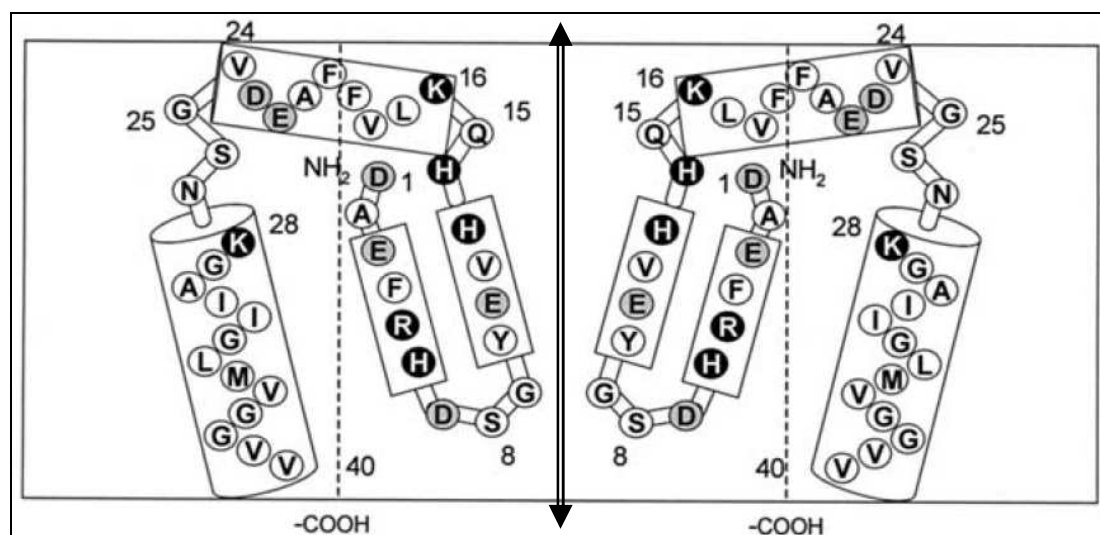


Figure 14. Composition d'un canal amyloïde
d'après Arispe (28)

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

L'hypothèse des canaux amyloïdes permet de proposer des mécanismes moléculaires de toxicité reposant notamment sur un influx massif de calcium et postule que les formes solubles seraient les principaux agents pathogènes de la MA (280, 394).

2-2-3-1-3-2. Accumulation intraneuronale de peptides amyloïde β

Les études *in vitro* sur neurones corticaux de rat en culture primaire suggèrent que les peptides A β solubles interagissent quasi-exclusivement avec les membranes synaptiques, puisque 90% des peptides A β seraient colocalisés avec la protéine post-synaptique PSD-95 (446). Mais plusieurs études ont aussi rapporté une accumulation intraneuronale de peptide amyloïde. Ainsi, des études *post mortem* ont mis en évidence la présence de peptides A β_{42} dans les lysosomes des cellules pyramidales des patients atteints de la MA, dans les endosomes des patients porteurs d'une forme familiale de la MA liée à une mutation dans le gène *PSEN1* ou du syndrome de Down (125, 126, 297, 452). Cet aspect a été conforté par la présence intraneuronale de peptides A β *in vivo* dans des souris transgéniques présentant une ou plusieurs mutations des gènes impliqués dans les formes familiales de la MA (75, 769). La présence de peptides A β dans les vésicules péricaryotiques pourrait être liée à leur site de production, les membranes de l'appareil golgien et des vésicules golgiennes pour le peptide A β_{40} (780) et, de façon plus précoce, dans les membranes du RE, des endosomes et de l'appareil golgien pour le peptide A β_{42} (161, 307, 332, 429). Des travaux menés *in vitro* sur culture cellulaire et sur culture organotypique de tranche de cerveau de rat suggèrent que l'accumulation de peptides A β au sein du neurone pourrait en partie résulter de leur internalisation par endocytose (37, 205). Les cellules dans lesquelles le peptide A β s'est accumulé présentent une morphologie synaptique altérée (769), avec en conséquence la perte synaptique et l'inhibition du processus LTP dans les phases précoces de la maladie (64). Par ailleurs, des auteurs suggèrent que la présence de peptides A β oligomériques dans les neurones pourrait perturber les endomembranes, conduisant à la rupture de l'homéostasie ionique et à l'initiation de la cascade pro-apoptotique par libération de divers agents apoptogènes décrits dans le paragraphe 2-3-2-2. (410). L'injection de peptide A β_{42} dans le milieu intracellulaire a confirmé le caractère neurotoxique de ces accumulations intraneuronales (794).

2-2-3-1-3-3. Interaction avec un partenaire membranaire neuronal ou glial

Bien que les mécanismes moléculaires d'adressage du peptide A β à la membrane, en particulier à la membrane synaptique, ne soient pas encore clairement établis, différentes études suggèrent que l'interaction peptide/bicouche lipidique pourrait impliquer un récepteur (446, 449). L'existence de partenaires protéiques privilégiés a été proposée par Lambert *et al.* (449) dont les travaux ont montré que le peptide A β interagit moins avec la membrane des cellules traitées par la trypsine. De nombreux partenaires protéiques neuronaux ont été proposés.

- **La protéine Fyn** est une tyrosine kinase non réceptrice surexprimée dans le cerveau des patients atteints de la MA. L'invalidation de son gène chez des souris transgéniques modèles permet une résistance à l'apoptose neuronale induite par le peptide A β (449). Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les interactions entre cette protéine et le peptide A β .

- **Le récepteur de l'insuline** peut interagir avec une séquence homologue commune au peptide A β et à l'insuline, ce qui expliquerait les perturbations du métabolisme du glucose observées dans la MA (743).

- **Le récepteur SEC-R** (*serpin complex receptor*) interagit avec la séquence A β ₂₅₋₃₁ (389). Les expériences de liaison réalisées *in vitro* ont montré que l'interaction des peptides A β solubles avec ce récepteur a pour conséquence leur internalisation par endocytose et leur dégradation et ne semble donc pas participer aux mécanismes neurotoxiques (82). D'autres médiateurs ont été impliqués dans la clairance du peptide par endocytose, notamment les intégrines et plus particulièrement l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (743).

- **Le récepteur $\alpha 7$ nAChR** (*$\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor*) interagit avec la séquence A β ₁₂₋₂₈ (761). Les résultats expérimentaux obtenus sur des lignées cellulaires surexprimant ce récepteur montrent que la liaison du peptide A β ₄₂ soluble à ce récepteur induit une phosphorylation rapide et réversible de *Tau*, suggérant un lien entre hypothèses tauiste et myéloïste (761).

- **Le récepteur de l'amyline**, un peptide associé aux dépôts amyloïdes des îlots de Langerhans pancréatiques de patients diabétiques, peut aussi lier le peptide A β et induire l'apoptose des neurones et des cellules pancréatiques des îlots β (524). La neurotoxicité de cette interaction a été confirmée *in vitro* par la protection de neurones cholinergiques de rat contre l'apoptose induite par le peptide A β constatée après traitement par un agoniste de ce récepteur (384).

Par ailleurs, la liaison du peptide A β avec les membranes des cellules gliales joue un rôle important dans la mise en place du processus inflammatoire observé dans la MA. La liaison aux récepteurs RAGE (*receptor for advanced glycation end product*) conduit en particulier à la production du facteur M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) responsable de l'activation et de la migration des cellules microgliales (495). Au niveau astrocytaire, la liaison au récepteur RAGE induit aussi l'internalisation et la dégradation du peptide A β (743). Par ailleurs, le récepteur FPRL1 (*formyl peptide receptor-like1*) exprimé dans des astrocytes, les cellules épithéliales et vasculaires, conduit à la libération de médiateurs neurotoxiques et pro-inflammatoires après fixation du peptide A β (724).

2-2-3-2. Fibrillogenèse

Depuis la découverte du peptide A β , la cinétique de formation des fibrilles a été étudiée en analysant le comportement de peptides synthétiques en suspension dans des tampons physiologiques par des techniques analytiques très diverses, telles que le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la microscope de force atomique, la RMN ou la diffraction aux rayons X. Ces études convergent vers le modèle présenté par la figure 15, confirmé *in silico*, au sein duquel la formation de fibrilles nécessite l'adoption par le peptide A β d'une structure en feuillets β antiparallèles (546, 551, 663).

Bien que les fibrilles de peptide A β ₄₀ contiennent des quantités significatives de feuillets β intermoléculaires (663), ce n'est pas la seule structure secondaire des fibrilles, car leur formation nécessite aussi l'apparition d'un coude, notamment au niveau des résidus 22 et 23 du peptide A β (350, 373, 698). Peu d'études ont été réalisées sur les fibrilles de peptide A β ₄₂, dont la forte hydrophobie et les résidus C-terminaux encombrants imposent des contraintes difficiles à exploiter par les techniques

de RMN. Afin de contourner cette difficulté, une batterie de mutants du peptide A β ₄₂ a été préparée par remplacement systématique des résidus par la proline. Cette analyse a démontré que le peptide A β ₄₂ adopte aussi une conformation incluant des feuillets β antiparallèles et un coude, disposant en outre d'un cluster hydrophobe des résidus 35 à 42.

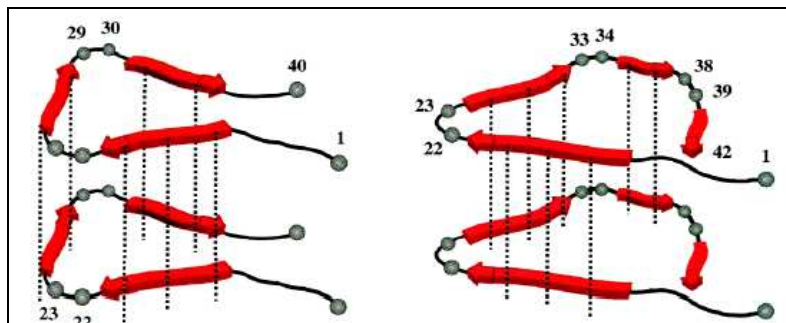


Figure 15. Modélisation des changements structuraux du peptide A β associés à la fibrillogenèse d'après Irie *et al.* (373)

Les formes stables de protofibrilles comprennent de 15 à 40 monomères et sont souvent associées à des cations qui stabilisent leur assemblage. Ces formes présentent une neurotoxicité *in vitro* et *in vivo* dont les mécanismes moléculaires n'ont pas été précisément déterminés à ce jour (127). L'analyse structurale des peptides A β a toutefois suggéré différentes hypothèses sur la neurotoxicité induite *in vitro* par ces peptides fibrillaires (498). À titre d'exemple, le repliement sous forme de feuillet β permettrait une exposition de la Met³⁵ et l'apparition d'un stress oxydant qui pourrait endommager les membranes neuronales et les activités associées (figure 16).

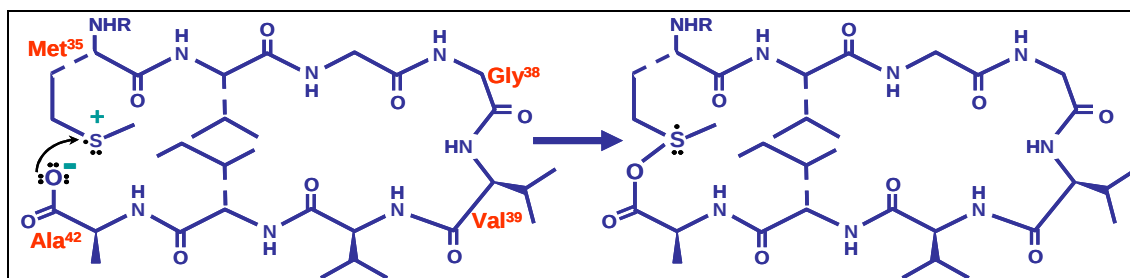


Figure 16. Stabilisation du radical sulfuramyl par les résidus aminoacides environnants d'après Irie *et al.* (373)

2-2-3-3. Précipitation et formation des plaques

De nombreuses études suggèrent que les fibrilles de peptides amyloïdes s'accumulent dans le milieu extracellulaire autour d'un noyau de nucléation dont la nature (gangliosides, métaux, protéines) est encore controversée (331, 338, 406, 785). La mise en évidence d'accumulation intraneuronale de peptides A β a conduit à une hypothèse alternative selon laquelle la formation des plaques serait initiée dans les neurones, menant à la perte des fonctions synaptiques, et poursuivrait leur croissance après la mort neuronale en induisant ainsi l'apoptose des neurones environnants (297). Les causes de l'arrêt de la croissance des plaques au profit d'une densification sont encore inconnues à ce jour.

2-2-3-4. Mécanismes cytotoxiques associés aux peptides A β

2-2-3-4-1. Stress oxydant

Les études *post mortem* réalisées sur le cortex et l'hippocampe de patients atteints de la MA et sur des individus témoins ont montré que les malades présentent des taux supérieurs d'acroléine, de malondialdéhyde, d'adduits protéines/hydroxynonéal, de protéines oxydées, de nitration, d'ARN oxydés (notamment la base 8-hydroxyguanosine) ainsi qu'une accumulation de métaux, sources de radicaux libres (6, 112, 508, 517). L'augmentation du stress oxydant chez les patients atteints de la MA pourrait être due au potentiel pro-oxydant des peptides A β (373), à la diminution de l'activité de certaines enzymes mitochondriales comme le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase (278) ou à un stockage accru du calcium dans les mitochondries et le RE (277). En outre, une réduction significative des agents antioxydants a été observée chez les patients atteints de la MA (6). Ces patients possèdent aussi une plus faible concentration d'acide urique, dont le rôle est de piéger les espèces réactives nitrées telles que le peroxy-nitrite ONOO⁻ généré par les cellules gliales. Le stress oxydant est un événement précoce dans la MA, préalable à la formation des plaques amyloïdes, éventuellement lié à la génération de peptides A β solubles (570, 784). Au niveau cellulaire, ces derniers pourraient perturber les membranes mitochondriales et les enzymes de la chaîne respiratoire et générer ainsi des espèces réactives oxygénées (ERO) de façon précoce (618), préalablement à l'activation des enzymes protéolytiques caspases et calpaïnes et à la désorganisation du cytosquelette (245, 694). La désorganisation du cytosquelette et la déformation dendritique pourraient également être dues à une dérégulation des enzymes associées au cytosquelette. La protéine GSK-3 β , par exemple, présente une activité induite par les ERO (86) ; la protéine Arc (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*), activée lors d'une exposition au peptide A β , a été impliquée dans des troubles de l'apprentissage et de la mémorisation (446). La génération d'ERO aurait aussi pour conséquence de perturber la membrane plasmique et les endomembranes, induisant une activation de la protéine BACE et donc une accumulation d'autant plus marquée de peptide A β , amplifiant le phénomène et initiant la formation de plaques amyloïdes (719).

L'utilisation d'antioxydants est aujourd'hui préconisée par de nombreux auteurs, tant à titre préventif que pour le traitement de la MA. Ainsi, la supplémentation alimentaire de souris TgT44, modèles transgéniques de la MA, a permis de mettre en évidence que l'administration chronique de vitamine E diminue la formation des PHF (558) et les taux de peptide A β présents dans le cerveau (160, 707). Chez ces souris, l'administration de curcumine, un agent antioxydant, diminue l'apparition des marqueurs du stress oxydant et la formation des plaques amyloïdes (487). Des études *in vitro* réalisées sur des cellules PC12 différenciées en neurones ont montré que les agents antioxydants comme la curcumine, les composés polyphénoliques ou le clioquinol peuvent intervenir à des stades précoces, en prévenant la toxicité induite par des oligomères solubles de peptide A β , et à des stades plus tardifs, en inhibant le processus de fibrillogénèse (137, 576, 577). Des études cliniques et épidémiologiques ont par ailleurs montré que l'administration de vitamine E et/ou de vitamine C

diminue la prévalence de la MA chez les sujets âgés (388, 793).

2-2-3-4-2. Processus inflammatoire

Les cellules microgliales constituent environ 10% des cellules cérébrales. Elles représentent la première ligne de défense contre les agents pathogènes et permettent l'élimination des débris cellulaires par leur fonction phagocytaire (242). Suite à leur activation, elles sécrètent des molécules chimiotactiques permettant le recrutement des astrocytes dont l'une des fonctions est l'apport et la sécrétion de facteurs nutritionnels et de médiateurs cellulaires. La stimulation et le recrutement excessifs de ces cellules lors d'une ischémie ou d'un processus neurodégénératif conduit à un processus inflammatoire résultant notamment en la génération d'oxyde nitrique par les enzymes iNOS (NO synthase inducible) et arginosuccinate synthétase et de différents médiateurs proinflammatoires et neurotoxiques (325).

L'accumulation de peptides A β , puissants activateurs (comme leur précurseur) des cellules gliales, et la présence dans les plaques de protéines du complément telles que C1q ou SAP (*serum amyloid P component*) induisent une réponse neuroinflammatoire (353, 646). Les astrocytes et les cellules microgliales recrutés au niveau des plaques séniles favorisent la clairance des peptides A β et forment une barrière protectrice entre les dépôts congophiles et les neurones (514, 646). Outre leur action dans la clairance des neurotoxines par phagocytose ou libération d'enzymes protéolytiques comme la NEP ou l'enzyme IDE de dégradation de l'insuline (612), les cellules gliales présentent un potentiel neurotrophe par la sécrétion d'agents neuroprotecteurs dont le GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*). La présence de ces cellules à proximité des plaques séniles (514, 646) se traduit par une augmentation de l'expression des protéines de phase aiguë, des cytokines, des chimiokines (IL-1 β , IL6, IL8) et d'autres médiateurs proinflammatoires tels que la protéine MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein*), le TNF- α ou le facteur TGF- β de croissance tumorale (646). La production de ces médiateurs résulte de mécanismes différents initiés par l'exposition au peptide A β , parmi lesquels l'activation des voies de transduction en amont du facteur nucléaire NF- κ B, l'induction d'un stress oxydant avec génération d'espèce réactives nitrées et oxygénées et la rupture de l'homéostasie ionique (353, 646). Ainsi, l'intensité de l'astrocytose et de l'activation microgiale dépend de la quantité de dépôts amyloïdes, la rupture des protofibrilles par des agents spécifiques (*β -sheet breakers*) permettant la réduction du processus inflammatoire (592).

Des travaux récents suggèrent toutefois que le mécanisme inflammatoire pourrait être initié de façon précoce dans la MA. En effet, la surexpression des protéines impliquées dans cette réponse, notamment la cycloxygénase COX2 est particulièrement importante lors des phases précoces de la maladie, suggérant un rôle clef des protofibrilles et éventuellement des formes solubles de peptides A β dans la neuroinflammation (157, 356). Cette hypothèse est confortée par les études réalisées *in vivo* sur des souris transgéniques APPVal⁷¹⁷Ile pour lesquelles la microglie est activée bien avant l'accumulation des dépôts amyloïdes, le déclin cognitif et l'inhibition de la LTP (325, 344).

Certaines études ont montré une surexpression de la β -sécrétase BACE1 dans les astrocytes soumis à un stress, suggérant que ces cellules pourraient générer les peptides A β (634). L'intervention des cellules microgliales et des astrocytes dans le métabolisme de l'APP passe aussi par une promotion de l'agrégation/dépôt de peptides A β (314, 557) et par une régulation transcriptionnelle de la BACE1 impliquée dans la production de ces peptides (646).

L'importance des mécanismes inflammatoires dans les pathologies neurodégénératives, dans la MA en particulier, a conduit à proposer les anti-inflammatoires non stéroïdiens, et notamment les inhibiteurs des cyclooxygénases COX1 et COX2 impliquées dans la production de certaines prostaglandines, comme des solutions préventives et/ou curatives des troubles observés dans ces pathologies. Des résultats épidémiologiques et expérimentaux encourageants ont été obtenus, parmi lesquels la diminution de microglie activée à proximité des plaques (514), le retard des premiers symptômes et la diminution des dépôts amyloïdes et des taux de peptide A β soluble *in vivo* dans les souris Tg2576 modèles de la MA traitées par des anti-inflammatoires (226, 707). Mais le potentiel thérapeutique de ces traitements reste à démontrer. En effet, l'absence de consensus sur la durée des traitements et le type d'inhibiteur (528), les résultats contradictoires obtenus *in vivo*, la difficulté du suivi diagnostique et le manque d'amélioration de la condition des patients atteints de la MA lors des essais cliniques ont conduit à reconsidérer cette hypothèse (356, 738). Des études complémentaires seront donc nécessaires afin d'établir le potentiel des traitements anti-inflammatoires dans la lutte contre la MA et d'en évaluer les éventuels effets secondaires.

2-3. La perte neuronale et synaptique

L'examen *post mortem* du cerveau de patients décédés de la MA révèle une atrophie corticale traduisant une perte massive de neurones, la plus importante se situant au niveau des zones associatives (50%) et dans les noyaux sous-corticaux (60%). Dans tout processus neurodégénératif, la mort cellulaire peut être nécrotique, apoptotique ou mixte (apoptonécrose), selon la sévérité du *stimulus* et le type cellulaire (33, 54, 84). Ces phénomènes se caractérisent par des circonstances, des modifications morphologiques et des mécanismes moléculaires distincts (104). Nicotera *et al.* (566) avancent l'hypothèse que la nécrose et l'apoptose seraient 2 phénomènes concomitants dont la part relative ne dépendrait que des circonstances et de l'environnement dans lesquels la cellule est soumise au stress. Ainsi, des neurones localisés à proximité d'une lésion ischémique subiront un processus nécrotique, alors que ceux situés en périphérie déclencheront un programme de mort apoptotique.

2-3-1. La nécrose

2-3-1-1. Caractéristiques morphologiques

En raison de la perte de régulation des mouvements ioniques, la nécrose est caractérisée morphologiquement par une dilatation du RE duquel se détachent les ribosomes, une augmentation du volume

mitochondrial et un gonflement cellulaire (figure 17). La rupture osmotique de la membrane sans formation de vésicules conduit à une libération du contenu cellulaire et à une inflammation locale (468). Le noyau se colore (pycnose) et subit une fragmentation aléatoire, tandis que le fantôme cellulaire rétrécit et que sa densité augmente. La nécrose intervient typiquement lors d'une ischémie, d'une hypoxie, ou d'un traumatisme mais elle a également été décrite dans des processus neurodégénératifs menant aux maladies d'Alzheimer, de Huntington, de Parkinson et à la sclérose amyotrophique latérale (33).

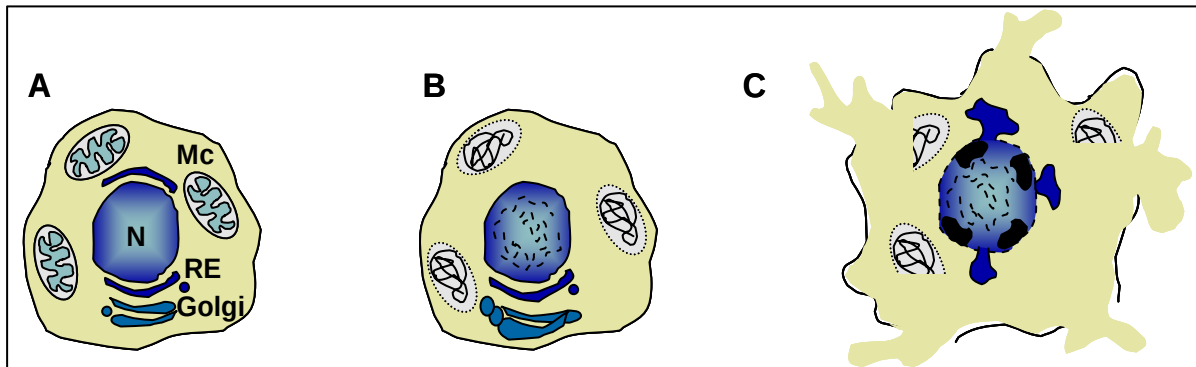


Figure 17. Les étapes clés de la nécrose

A, cellule saine ; B, fragmentation de l'ADN, dommages mitochondriaux, bourgeonnement des organites ; C, lyse cellulaire

2-3-1-2. Mécanismes moléculaires

Bien que les mécanismes moléculaires de la nécrose ne soient pas encore entièrement établis, des preuves expérimentales indiquent que sous l'influence d'un *stimulus* pro-nécrotique, l'activation des récepteurs NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate) et AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique) d'une part, et l'activation des canaux calciques dépendants du voltage d'autre part, induiraient une entrée massive de calcium et de sodium dans la cellule. Ceci permettrait l'activation de la calpaïne, la rupture des vésicules lysosomales et la libération des enzymes protéolytiques cathepsines. L'importance des caspases dans ce type de mort cellulaire reste à définir. L'activité de ces différentes protéases induirait la dégradation des protéines essentielles au maintien de l'intégrité cellulaire (33). Dans le SNC et particulièrement dans le cerveau, la lyse neuronale conduit à l'activation des astrocytes et de la microglie qui sécrètent des médiateurs neurotoxiques tels que le monoxyde d'azote, les interleukines et le facteur TNF- α (54).

2-3-2. L'apoptose

L'apoptose est considérée comme une forme « active » de mort cellulaire souvent qualifiée de mort cellulaire programmée ou de « suicide ». Cette notion repose essentiellement sur le fait que la mort par apoptose nécessite la synthèse *de novo* de protéines (778). Ainsi, l'apoptose induite dans de nombreux types cellulaires *in vitro* peut être bloquée par des inhibiteurs de la synthèse des ARN et des protéines (578). Cependant, des travaux démontrent que l'apoptose peut se produire en l'absence de synthèse

protéique *de novo*. Par exemple, de fortes doses de staurosporine, un inhibiteur des protéines kinases, provoquent l'apoptose de divers types cellulaires en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique (764). Jacobson *et al* (377) ont par ailleurs démontré que dans des lignées fibroblastiques et oligodendrocytaires, des modifications morphologiques de type apoptotique peuvent survenir en l'absence de noyau. Plus récemment, Mattson *et al.* (521) ont mis en évidence certaines caractéristiques de l'apoptose après exposition au peptide A β de synaptosomes (vésicules neuronales dépourvues de noyau).

2-3-2-1. Caractéristiques morphologiques

Dans un premier temps, le cytoplasme se condense en conservant des organites de morphologie intacte (150) et la cellule perd ses contacts avec les cellules voisines. Des modifications membranaires sans traduction morphologique se produisent. La phosphatidylsérine (PS), normalement maintenue sur la face interne de la membrane plasmique par une translocase dont l'activité est régulée négativement au cours du processus apoptotique, est redistribuée et déplacée vers le feuillet externe de la bicouche phospholipidique par une scramblase (767). Cette phase d'externalisation précède la perte complète de l'asymétrie membranaire. Alors qu'une cellule normale présente un nombre élevé de phosphatidylcholines (PC) contenant des AG saturés au niveau de son feuillet externe et un nombre plus élevé de PS et de phosphatidyléthanolamines (PE) contenant les AG insaturés et polyinsaturés au niveau de son feuillet interne, la perte d'asymétrie induit le passage d'AGPI sur le feuillet exofacial entraînant une désorganisation des phospholipides et la rupture de l'homéostasie ionique. Lors de la réduction du volume cellulaire, les transglutaminases sont activées et entraînent la formation de liaisons croisées entre les protéines, responsables d'une rigidification des complexes et structures protéiques dans le cytoplasme (241). La chromatine se condense puis se fragmente en lobes entourés par la membrane nucléaire (799). Ces modifications nucléaires appelées caryorrhexis s'accompagnent d'une activation des endonucléases dépendante du calcium et donc du clivage de l'ADN au niveau des régions internucléosomiques (512). La fragmentation de l'ADN n'a pas de traduction morphologique, mais confère un profil de migration électrophorétique caractéristique en échelle, dont les bandes correspondent à des fragments multiples de 180 à 200 paires de bases liés aux nucléosomes. À l'inverse, la migration électrophorétique de l'ADN d'une cellule en nécrose présente un profil diffus. Après condensation cytoplasmique et nucléaire, la cellule forme des protubérances entourées par la membrane plasmique. Ce sont les futurs corps apoptotiques, rapidement phagocytés *in vivo* après reconnaissance par les cellules phagocytaires de la PS externalisée (497, 799). La conservation de l'intégrité membranaire des corps apoptotiques et leur élimination par phagocytose permettent d'éviter la fuite du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire et la réaction inflammatoire (497). L'élimination des corps apoptotiques par phagocytose est limitée dans les modèles d'apoptose *in vitro* où l'absence d'un nombre suffisant de cellules phagocytaires conduit à une cytolysse qualifiée de

nécrose secondaire. Les modifications morphologiques liées au processus apoptotique sont présentées par la figure 18.

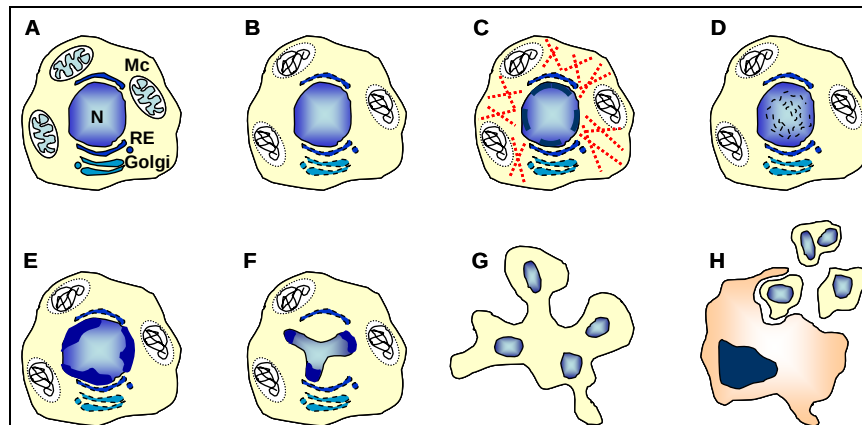


Figure 18. Les étapes clés de l'apoptose

A, cellule saine ; B, dommages mitochondriaux, bourgeonnement des organites ; C, perturbation du cytosquelette ; D, E, F, caryorrhexis ; G, formation des corps apoptotiques ; H, phagocytose

2-3-2-2. Mécanismes moléculaires

La mort neuronale par apoptose implique l'activation de protéases particulières, les caspases. Quatorze caspases sont identifiées à ce jour et peuvent être activées par 2 cascades : la voie intrinsèque ou indirecte nécessitant des dommages mitochondriaux, et la voie extrinsèque ou directe qui implique l'activation de récepteurs membranaires de mort cellulaire. La voie intrinsèque semble être la voie majeure lors du développement (132), alors que les 2 voies sont impliquées dans les processus neurodégénératifs. Quelle que soit la voie empruntée, l'apoptose se déroule selon 3 grandes phases de signalisation (extra- et/ou intracellulaire), de contrôle et effectrice.

2-3-2-2-1. La phase de signalisation extracellulaire

Cette phase implique la réception au niveau de la membrane d'un signal pro-apoptotique (par exemple stress oxydant, premier messager ou choc osmotique) de nature, intensité et durée variables. Ce signal détermine le devenir de la cellule qui peut s'engager vers un processus d'apoptose extrinsèque si la signalisation extracellulaire implique la stimulation des récepteurs de mort cellulaire tels que le récepteur T, la protéine Fas (également appelée APO-1 ou CD95), les récepteurs du TGF- β (*transforming growth factor- β*), du TNF ou du facteur apoptotique TRAILR1 relié au TNF (figure 19).

Au niveau moléculaire, l'activation de ces récepteurs conduit à la formation d'un complexe DISC (*death-inducing signaling complex*) composé des molécules adaptatrices FADD (*Fas-associated protein with death domain*) ou TRADD (*TNF receptor-1 associated protein with death domain*) (138), qui comprennent un domaine de mort cellulaire DED (*death effector domain*) capable d'interagir avec le domaine DED de la procaspase-8/FLICE ou de la procaspase-10/Mch4. La constitution du DISC est suivie de l'activation protéolytique de la procaspase-8, étape initiant la phase de signalisation intracellulaire et la cascade d'activation des caspases-1, -2, -4, -5, 9 et -13 recrutées via 2 domaines CARD (*caspase*

recruitment domains) (169). La voie extrinsèque est responsable d'une partie de la mort neuronale liée aux maladies neurodégénératives d'Alzheimer (459), de Huntington et de Parkinson (240).

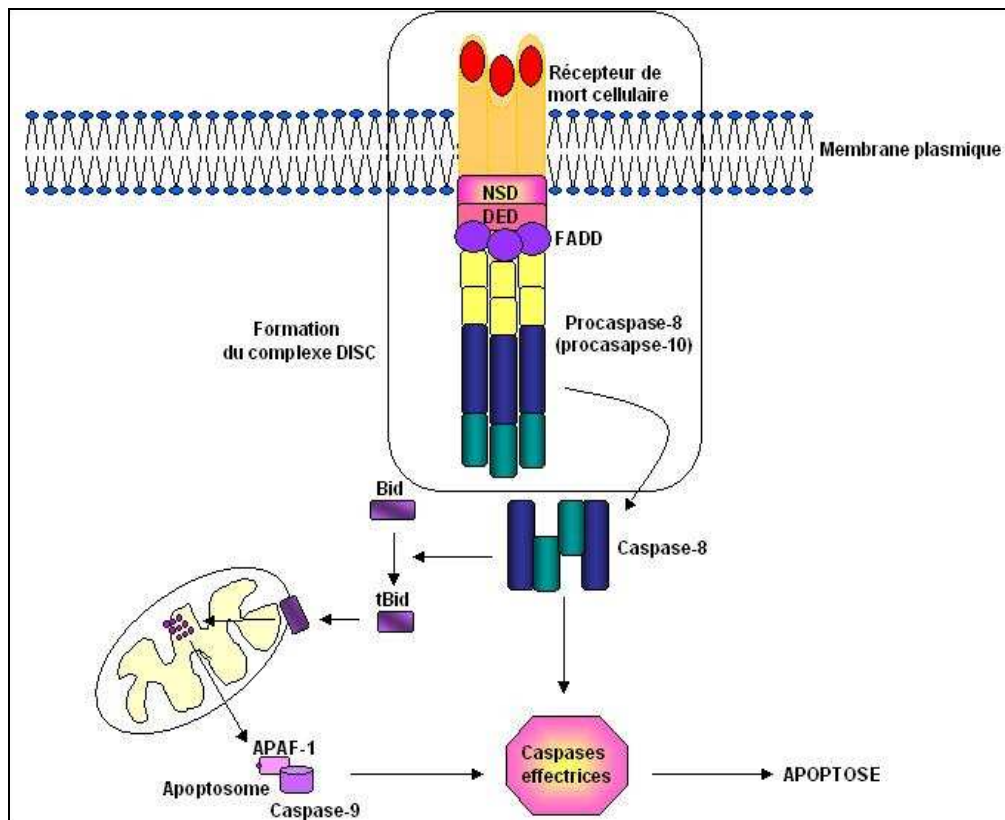


Figure 19. Phase de signalisation extrinsèque impliquant les récepteurs de mort cellulaire

2-3-2-2-2. La phase de signalisation intracellulaire

2-3-2-2-2-1. Seconds messagers

- **Augmentation du calcium intracellulaire** – L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium peut être liée à l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage, à l'activation de récepteurs membranaires (glutamate) ou à la libération du calcium par le RE. Cette dernière est régulée par les protéines Bcl-2 et Bax (93). Quelle qu'en soit la cause, cette augmentation constitue un événement critique pour l'induction de facteurs de transcription, de transglutaminases, de kinases, d'endonucléases et de certaines protéases telles que les calpaïnes directement impliquées dans l'apoptose (778).

- **AMPc** – L'AMPc (AMP cyclique) est le produit de l'adénylate cyclase qui hydrolyse l'ATP en formant une liaison ester interne entre le phosphate lié au carbone en 5' et la fonction alcool secondaire du carbone en 3'. L'AMPc, généré en réponse à divers *stimulus* comme l'activation des récepteurs couplés aux protéines G_s, est impliqué dans les voies de survie cellulaire, dans la différenciation neuronale et dans le processus mnésique. La génération d'AMPc influe sur l'activité cellulaire par la régulation des kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) et l'activation des facteurs de transcription CREB (*cAMP-response element binding*) et ATF1 (*activating transcription factor 1*) qui induisent l'expression de gènes impliqués dans le maintien de la survie cellulaire (182).

2-3-2-2-2. Le stress oxydant

La production physiologique de radicaux libres est inévitable et conduit à la formation de médiateurs cellulaires et tissulaires tels que le monoxyde d'azote. Cette production trouve son origine dans le métabolisme de l'oxygène (figure 20).

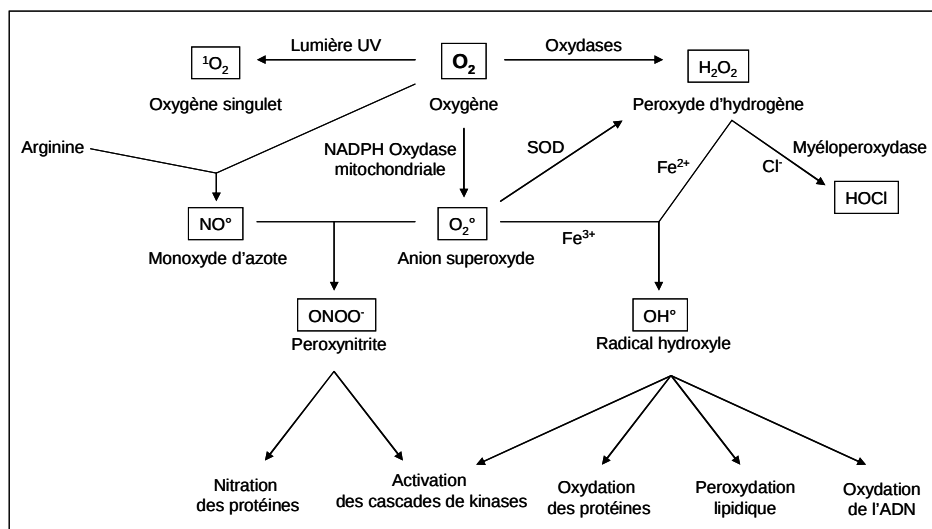


Figure 20. Génération des espèces réactives et conséquences physiopathologiques

Les taux de radicaux libres sont contrôlés par de nombreux agents et systèmes enzymatiques antioxydants (glutathion, vitamines E et C, quinones, superoxyde dismutases, catalase, glutathion peroxydases, glutathion réductase, méthionine sulfoxyde réductase), la synthèse ou l'expression de certains étant modulable par les taux de radicaux libres. Lorsque l'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants est rompu, par exemple dans le cas d'une production excessive de radicaux libres, la cellule peut subir de nombreux dommages parmi lesquels l'oxydation ou la nitration des protéines, la peroxydation des lipides membranaires, l'oxydation de certains précurseurs lipidiques essentiels à la signalisation cellulaire comme l'acide arachidonique, et la modification des bases (hydroxylation de la guanosine) des acides nucléiques. Lorsque les cellules s'engagent dans un processus nécrotique ou apoptotique, elles produisent un nombre anormalement élevé de radicaux libres (espèces réactives oxygénées, nitrées ou mixtes). Cette surproduction est à l'origine de perturbations des endomembranes conduisant à la libération d'enzymes protéolytiques par les lysosomes, de calcium par le RE et de cytochrome c (cyt-c) par les mitochondries. Kushnareva *et al.* (445) ont montré que la libération de cyt-c par les mitochondries provoque un blocage des complexes I et III de la chaîne respiratoire, augmentant en conséquence la quantité de radicaux libres et amplifiant ainsi le phénomène.

2-3-2-2-3. Les voies de transduction

- Inhibition des voies de survie cellulaire

- **Inhibition de la voie PI3K/Akt** – Les phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) constituent une famille d'enzymes dont l'activité consiste en la phosphorylation en 3' du cycle inositol des phosphoinositides (PI) membranaires pour produire des seconds messagers. Les PI3K activées

phosphorylent préférentiellement le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate [PI(4,5)P₂] pour former le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate ou PI(3,4,5)P₃ dont la déphosphorylation est catalysée par la phosphatase PTEN (474). L'interaction de protéines de transduction avec ces seconds messagers lipidiques *via* des domaines de liaison aux lipides facilite leur recrutement à la membrane plasmique.

Chez les mammifères, la protéine Akt ou PKB (149) présente 3 isoformes, Akt-1, -2, -3 ou PKB α , - β , ou - γ , de distribution tissulaire large. Ces 3 isoformes comportent 3 domaines fonctionnels : un domaine N-terminal de liaison aux lipides, un domaine catalytique central et une région C-terminale hydrophobe. Dans le SNC, Akt-1 et Akt-2 sont fortement exprimées au cours de l'ontogenèse, leur expression diminuant progressivement dès la période post-natale pour devenir inductible chez l'adulte (580). La liaison d'Akt aux PI(3,4,5)P₃ conduit à son recrutement à la membrane et à un changement conformationnel permettant son activation par phosphorylation par les kinases dépendantes de PI, PDK-1 pour la Thr³⁰⁸ dans le domaine catalytique et PDK-2 pour la Ser⁴⁷³ dans la région hydrophobe (651). La phosphorylation par la PDK1, également recrutée par interaction avec les PI, conduit à l'activation partielle d'Akt (688), la phosphorylation des 2 sites étant nécessaire pour l'activation maximale de l'enzyme. Des études récentes suggèrent que l'activation d'Akt pourrait nécessiter la phosphorylation secondaire de différents résidus tyrosyls (Tyr³¹⁵, Tyr³²⁶, Tyr³¹⁴) par la PKA et/ou d'autres kinases telles que Ca²⁺/calmoduline kinases (246, 651). Activée, Akt transduit un signal anti-apoptotique (figure 21) en phosphorylant/inactivant de nombreux substrats (140, 688), parmi lesquels Bad, la caspase-9 et GSK-3 β , 3 protéines impliquées dans la cascade apoptotique (162). L'inhibition de cette voie de survie contribue à rompre l'équilibre entre agents pro- et anti-apoptotiques et induit la mort cellulaire par apoptose.

- **Inhibition de la voie des MAPK** – L'interaction de facteurs de croissance tels que NGF (*nerve growth factor*) ou EGF (*epidermal growth factor*) avec les récepteurs tyrosine kinase entraîne la dimérisation et la phosphorylation de ces récepteurs. Le recrutement à proximité de la membrane plasmique de protéines adaptatrices (Grb2, Sos) suite à l'activation de ces récepteurs permet la translocation à la membrane de protéines impliquées dans l'initiation de la voie des MAPK comme la petite protéine G Ras. La translocation de Ras induit le recrutement et l'activation par des protéines kinases non réceptrices telles que Src, PKC ou des protéines MAP (*mitogen activated protein*) kinase kinases, dont les protéines Raf et MEK. Les MAP kinase kinases phosphorylent les MAP kinases telles que ERK1/2 (*extracellular signal regulated kinase*), aussi appelées p42/p44 (587, 349), et ERK5 (587). La phosphorylation des protéines ERK1/2 entraîne leur dimérisation et la phosphorylation de nombreux substrats cytoplasmiques dont la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂) ou la protéine P90RSK (587) qui pénètre alors dans le noyau pour y activer divers facteurs transcriptionnels (figure 22).

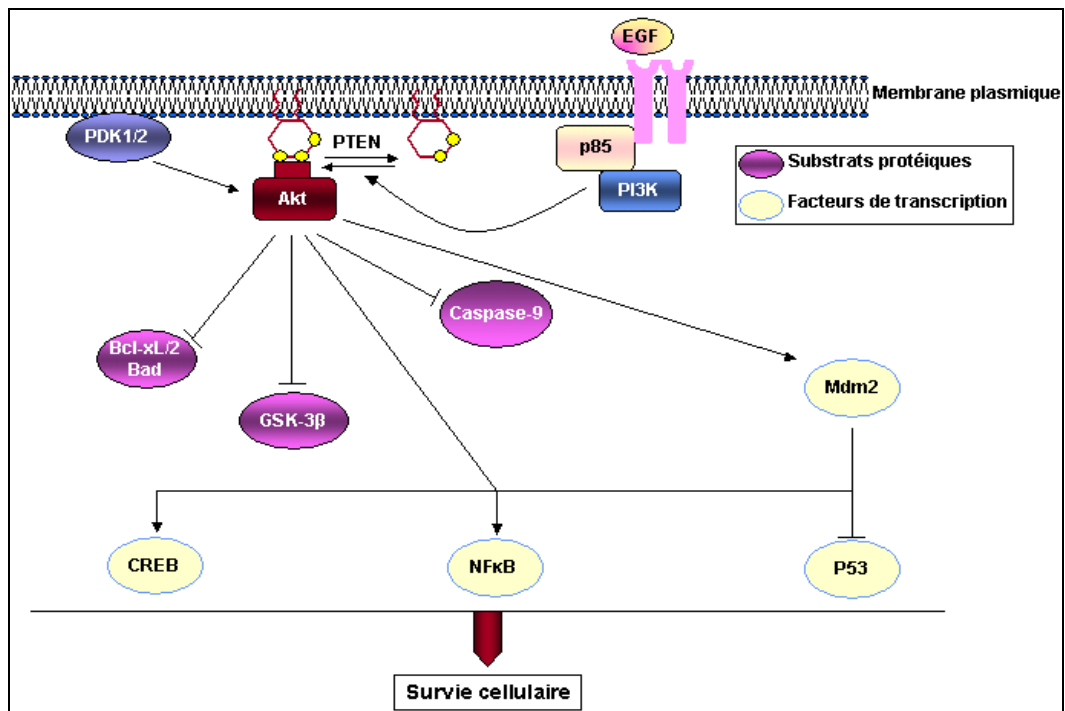


Figure 21. Implication de la voie PI3K/Akt dans le maintien de la survie cellulaire

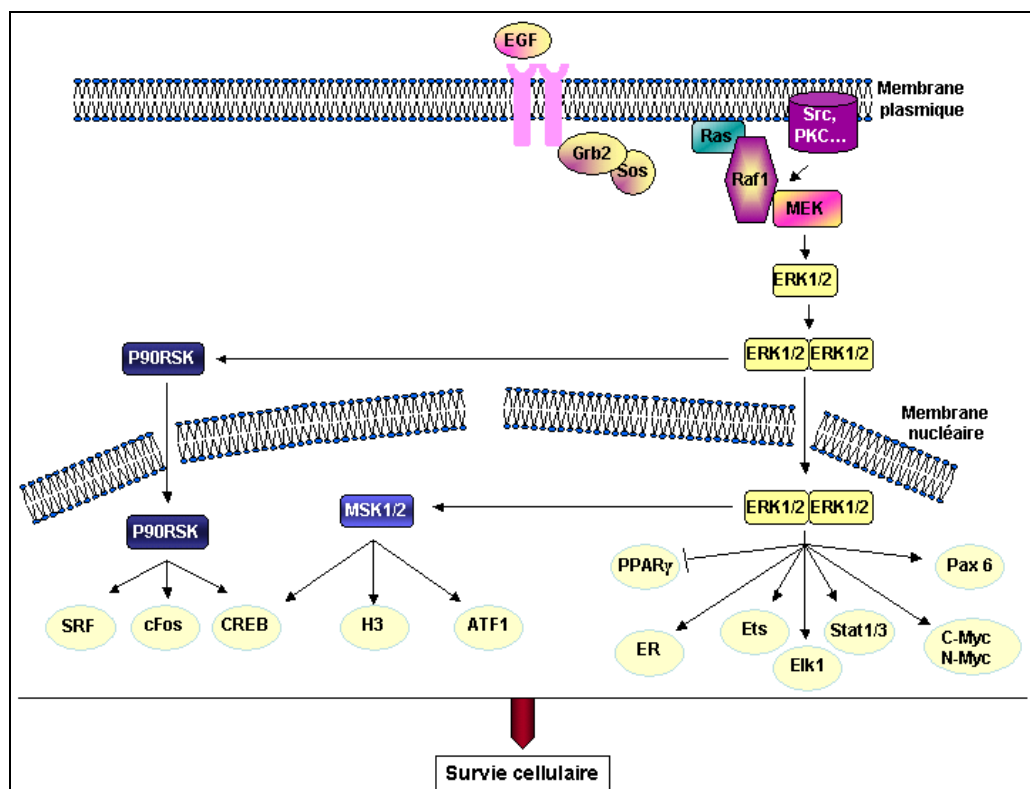


Figure 22. Implication de la voie des MAP kinases dans la survie cellulaire

Dans le noyau, l'homodimère ERK1/2 permet aussi l'activation de facteurs transcriptionnels induisant l'expression de protéines impliquées dans les voies de survie et diminuant celle de protéines de mort cellulaire (349). De même, la phosphorylation de ERK5 permet l'activation directe ou indirecte de nombreux facteurs de transcription impliqués dans les voies de survie

dont cFos et cJun (128). Bien que la modulation de la survie cellulaire par ces protéines soit essentiellement liée à un contrôle de l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques, l'activation des protéines ERK1/2 peut aussi activer par phosphorylation la protéine anti-apoptotique Bcl-xL tout en inhibant les agents pro-apoptotiques Bim40 et GSK-3 β (85). ERK1/2 régulent aussi certains processus cellulaires par interactions protéine-protéine (587). Les MAPK ont notamment été impliquées dans les mécanismes anti-apoptotiques, la prolifération cellulaire et la transformation néoplasique de nombreux types cellulaires (349, 587), ainsi que dans la différenciation neuronale et la plasticité synaptique (349, 587). Mais une expression anormale des protéines ERK1/2 phosphorylées a été rapportée dans le cerveau de patients décédés de la MA et de la maladie de Parkinson, dans les tauopathies et lors de l'ischémie cérébrale (143, 797). La localisation subcellulaire de ces protéines ainsi que la nature et l'intensité du signal pro-apoptotique pourraient moduler l'impact de la voie de signalisation correspondante.

2-3-2-2-4. Les facteurs de transcription

L'apoptose nécessite la synthèse *de novo* de protéines spécifiques. Les taux de procaspases sont variables d'un type cellulaire à l'autre, bien que leurs ARNm soient détectables dans la plupart des types cellulaires. La caspase-3, par exemple, est fortement exprimée dans de nombreuses cellules lymphoïdes et myéloïdes matures, mais ne l'est que faiblement dans l'épithélium mammaire et dans les neurones (439). Dans des conditions pro-apoptotiques, les neurones expriment *in vitro* et *in vivo* des niveaux d'ARNm de caspase-3 plus élevés. Cette synthèse est liée à l'activation de plusieurs facteurs de transcription régulant l'expression de protéines impliquées dans des voies anti- ou pro-apoptotiques. Par exemple, le facteur de transcription FoxO active l'expression des gènes codant les ligands extracellulaires Fas, TRAIL et TRADD et pour certains membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bim, alors que les facteurs NF- κ B ou CREB induisent l'expression de gènes de survie dont ceux codant Bcl-xL et des inhibiteurs de caspases (45).

2-3-2-2-3. La phase d'exécution

La mitochondrie joue un rôle critique dans la médiation du signal apoptotique, en intervenant dans la phase de contrôle et la phase effectrice (figure 23). Les changements biochimiques et structuraux de la mitochondrie au cours de l'apoptose comprennent le gonflement de l'organite, la perte du potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$) et la libération de molécules apoptogènes sous le contrôle de membres de la famille Bcl-2 (792). Le gène *bcl-2* est l'homologue chez les vertébrés du gène *ced-9* qui empêche la mort cellulaire programmée chez le nématode *C. elegans*. La surexpression de *bcl-2* bloque l'apoptose induite par différents *stimuli* tels que la privation de facteurs de croissance, l'irradiation ou l'exposition au facteur de transcription c-Myc (519). Parmi les analogues structuraux de Bcl-2, certains ont des fonctions anti-apoptotiques, comme Bcl-xL, Bcl-w, Bag-1, Mcl-1, Boo et A1 (81, 792). D'autres au contraire s'opposent à l'effet protecteur de Bcl-2, comme Bax, Bak, Bad, Bik, Bid,

Bim, Hrk, Blk, BNIP3, Bcl-xS et Bok (81, 139, 792). L'analogie de structure existant entre ces protéines réside dans 2 domaines C-terminaux conservés, BH1 et BH2, nécessaires à la formation d'homo- ou d'hétérodimères (619). Un domaine de liaison BH3 a également été identifié et intervient dans la liaison de Bak et Bad à Bcl-2 et Bcl-xL, ainsi que dans les fonctions pro-apoptotiques des protéines Bik et Bid dépourvues des domaines BH1 et BH2 (139, 619). Toutes les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 possèdent un domaine N-terminal BH4 qui leur est propre, auquel peuvent se lier diverses protéines telles que Raf-1. À l'exception de Bad, Bid et Bik, toutes ces protéines possèdent dans leur région C-terminale une séquence d'acides aminés hydrophobes qui leur permet de s'ancrer dans les endomembranes (441, 619). Les molécules anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2 et la protéine pro-apoptotique Bax, dont la structure tridimensionnelle est similaire à celle de certaines toxines bactériennes telles que la toxine diphtérique et les colicines, forment des canaux ioniques, de conductance et de sélectivité propre (536). L'équilibre entre la vie et la mort cellulaire est influencé par le type et la proportion de dimères anti- ou pro-apoptotiques formés (792), les niveaux d'expression respectifs de chaque membre et leur modification post-traductionnelle. Ainsi, la phosphorylation de Bad par Akt permet sa séquestration par la protéine cytosolique 14-3-3 (411, 604).

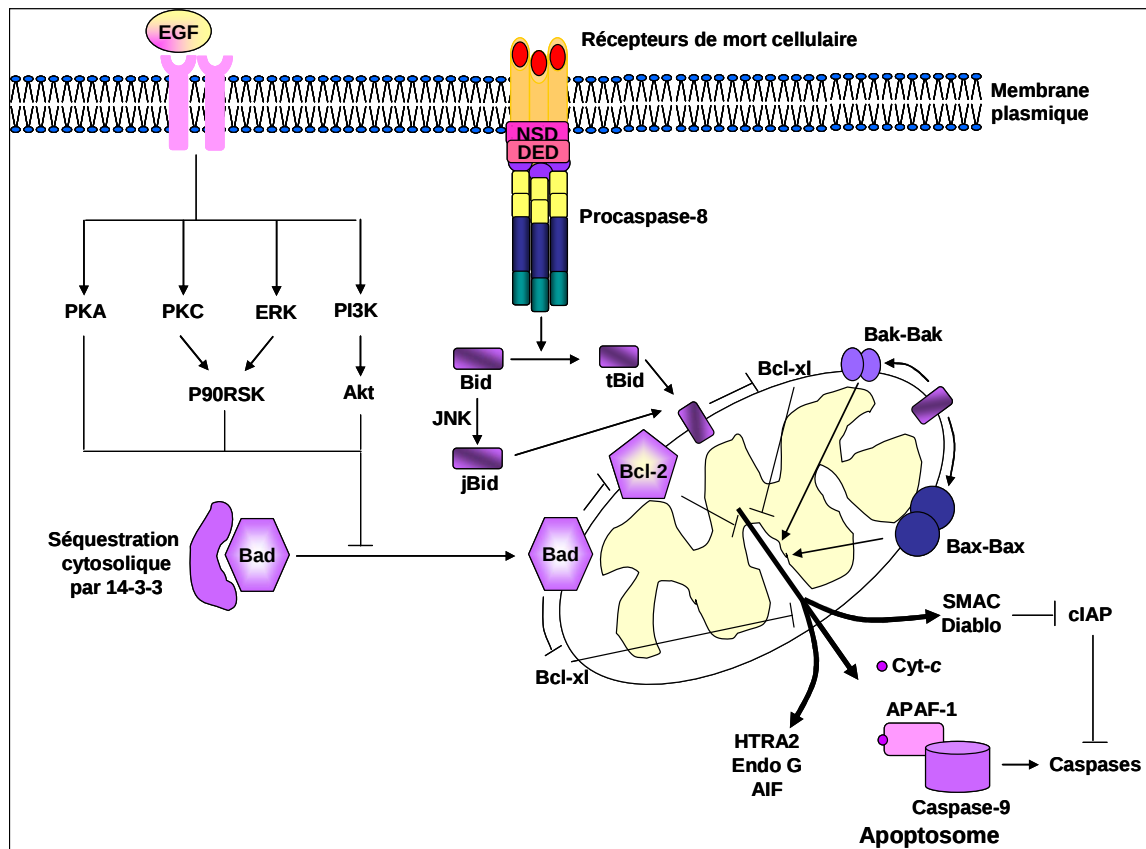


Figure 23. Phase mitochondriale de contrôle de l'apoptose

L'activation de la voie extrinsèque permet également de libérer des molécules apoptogènes (figure 23). Ainsi, la conversion des protéines pro-apoptotiques Bid par la caspase 8 (tBid) ou par la voie des kinases JNK (jBid) permet la libération du cyt-c par formation de pores mitochondriaux (54).

2-3-2-2-4. La phase effectrice

2-3-2-2-4-1. Rôle de la mitochondrie

Dans les conditions physiologiques, la membrane mitochondriale interne est quasiment imperméable, permettant ainsi, la création d'un gradient électrochimique $\Delta\psi_m$. La création de mégapores membranaires transitoires (PT) ou de canaux anioniques dépendants du voltage (VDAC) initiée par les protéines Bax et Bak a pour conséquence la perte du potentiel membranaire $\Delta\psi_m$ et des fonctions associées (792). Les mégapores mitochondriaux sont constitués au niveau de la membrane externe par la porine, au niveau de la membrane interne par l'ANT (*adenine nucleotide translocator*) et au niveau matriciel par la cyclophiline D (274, 441). Les dimères formés par les protéines Bax et Bak pourraient induire un changement de conformation des canaux VDAC et ainsi agrandir le mégapore (441). Ceci favoriserait le passage de l'espace intermembranaire vers le cytosol de molécules apoptogènes dont le cyt-c, la protéine SMAC/DIABLO (*direct inhibitor of apoptosis binding protein*) dont le rôle est de séquestrer l'inhibiteur IAP des caspases, le facteur IAF d'induction de l'apoptose, l'endonucléase G (411) et le facteur HTRA2 (*high temperature requirement serine protease 2*). La libération de ces molécules est amplifiée par l'apparition d'un stress oxydant qui a pour conséquence d'endommager les membranes (411). La libération du cyt-c conduit à la formation du complexe apoptosome, composé de cyt-c, du facteur Apaf 1 et de dATP, qui permet l'activation protéolytique de la procaspase-9 (792) nécessaire à la cascade apoptotique. Ainsi, les cellules cyt-c^{-/-} sont résistantes à l'apoptose induite par de nombreux stress (483). Le facteur AIF induit l'apoptose de façon indépendante de l'activation des caspases, par translocation dans le noyau où il initie la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine (165).

2-3-2-2-4-2. L'activation des caspases

Les caspases sont des protéases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage après un résidu acide aspartyl. Toutes les caspases existent sous la forme de proenzymes activées par maturation protéolytique. Toutes ont une structure conservée comprenant un prodomaine N-terminal de taille et de séquence variables, un domaine portant le site catalytique et donnant après clivage la grande sous-unité (17-21 kDa), et un domaine correspondant à la petite sous-unité (10-14 kDa) après clivage. L'activation des caspases nécessite donc au moins 2 clivages séquentiels au niveau de liaisons Asp-X, l'un entre la grande et la petite sous-unité, puis l'autre pour libérer le prodomaine (figure 24). La caspase s'assemble alors sous sa forme active (232, 274, 792). Une fois les caspases initiateurs activées, les autres caspases sont activées en cascade, régulant et amplifiant ainsi le signal (333).

D'autres protéases sont capables *in vitro* d'activer les procaspases par clivage au niveau de sites alternatifs situés dans le segment de liaison entre la grande sous-unité et la petite. L'inactivation de gènes de caspases ne permet pas d'inhiber complètement l'apoptose et conduit à des effets dépendants du type cellulaire et du *stimulus* utilisés. Les caspases pourraient être régulées par phosphorylation/déphosphorylation *in vitro* et *in vivo* (118), ainsi que par le statut redox de la cellule. En effet, l'activité des caspases peut être inhibée par oxydation du résidu cystéinyl catalytique (323) et requiert

de ce fait la présence de glutathion réduit, le composé réducteur le plus abondant dans la cellule, en quantité suffisante pour conserver son activité (167).

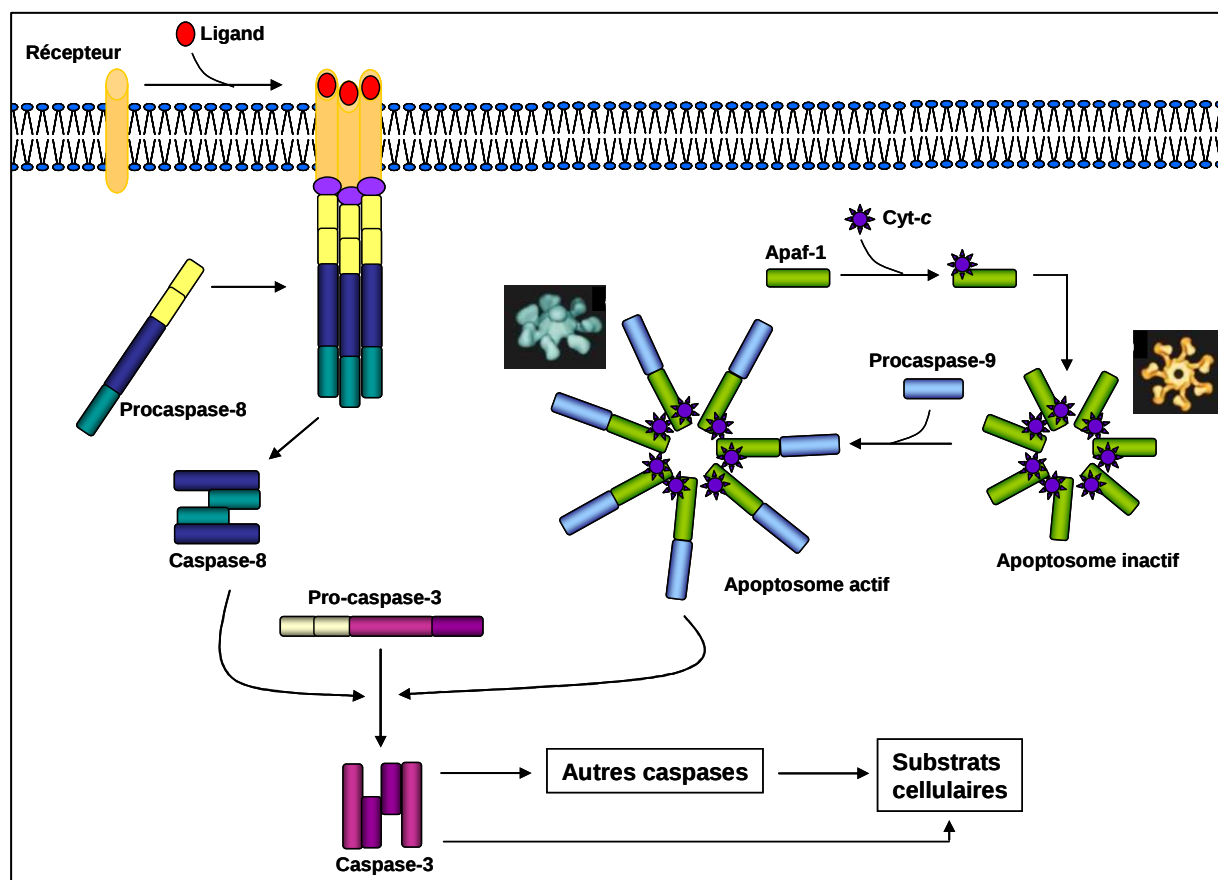


Figure 24. Activation des caspases

2-3-2-2-4-3. Les substrats des caspases

- **Caspases et modulation des voies de transduction** – La plupart des substrats des caspases sont clivés dans leurs domaines régulateurs, produisant des formes tronquées constitutivement actives dont l'apparition induit une apoptose massive des cellules. Ce type de régulation concerne certaines kinases parmi lesquelles MEKK1, PAK2 (*p21-activated kinase 2*), différentes isoformes de PKC (276) et PRK2 (168, 766).

- Caspases et intégrité nucléaire

- **La PARP** – La PARP (polyadénosylribose polymérase) est une enzyme participant à la réparation de l'ADN par excision des bases. Cette enzyme est dégradée par la caspase-3 au cours du processus apoptotique pour donner 2 fragments de 85 et 24 kDa. Le fragment de 85 kDa est considéré comme un marqueur précoce de l'apoptose (675).

- **La CAD** – La caspase-3 clive et inactive ICAD, un inhibiteur endogène de l'endonucléase CAD activée par les caspases ; ainsi libérée, CAD passe dans le noyau et peut aller cliver l'ADN chromosomique durant l'apoptose (380).

- **Le facteur de réplication C** – Le facteur de réplication C de l'ADN est une sous-unité multimérique du complexe ADN polymérase qui partage des séquences homologues avec la

PARP. La grande sous-unité de ce facteur est dégradée par la caspase-3 au cours de l'apoptose induite par la voie Fas (732).

- **Les lamines** – Les lamines sont des filaments intermédiaires participant à l'intégrité de l'enveloppe nucléaire et à l'organisation de la chromatine en interphase. La lamine A est clivée par la caspase-6 et la lamine B par la caspase-1 (458), endommageant les liaisons lamine–lamine et lamine–composants nucléaires.

La dégradation par les caspases des protéines citées ci-dessus et de la ribonucléoprotéine U1, de la topo-isomérase I et d'une protéine kinase dépendante de l'ADN (123), permet la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, la désorganisation nucléaire et enfin la dispersion sous forme de corps apoptotiques.

- **Caspases et composants du cytosquelette** – Les caspases ont pour substrats des protéines essentielles au maintien de l'intégrité du cytosquelette. Ainsi, la fodrine qui se lie à l'actine et aux microtubules est clivée par la caspase-3, de même que les spectrines α II et β II, la gelsoline et les calpaïnes. Ces clivages entraînent une dissolution rapide du complexe spectrine–actine (759) et contribue à la désorganisation et au détachement cellulaire, facilitant la phagocytose de la cellule apoptotique par les macrophages. Les caspases peuvent interagir directement avec des protéines aux fonctions anti-apoptotiques comme Bcl-2 clivée au niveau du domaine BH4 par la caspase-1 (302) ou la protéine Rb clivée par la caspase-3 au cours de l'apoptose induite par la voie du TNF (380). Les caspases sont en outre responsables de l'inactivation des kinases Raf-1 et Akt qui inactivent Bad et activent Bcl-2 (766).

2-3-2-2-4. Les calpaïnes

L'activation des enzymes protéolytiques calpaïnes entraîne le clivage en des sites comportant un résidu leucine ou valine. Ces protéases à cystéine sont présentes sous forme inactive dans le cytoplasme et sont activées massivement lors de l'augmentation des taux intracellulaires de calcium qui font suite à un signal pro-apoptotique (333). Il existe 2 formes majeures de calpaïne, la μ - et la m-calpaïne, différant par la concentration de calcium nécessaire à leur activation (529). L'utilisation d'inhibiteurs de ces protéases permet de bloquer l'apoptose dans certains types cellulaires, suggérant un rôle majeur de ces enzymes (333). La calpaïne clive une douzaine de substrats dont certains en coopération avec les caspases, comme l' α -spectrine et la protéine kinase CaMK IV (protéines dépendantes du calcium et de la calmoduline) clivées par la caspase-3 (333, 529). Surtout présente dans le cerveau, elle est impliquée dans la régulation de la transcription dépendante du calcium et liée à CREB, ATF-1 et AP-1 (529).

2-3-3. Contribution relative des processus apoptotique et nécrotique dans la MA

Bien que l'analyse *post mortem* de cerveaux de patients décédés de la MA révèle une sévère atrophie corticale, la recherche de caractéristiques morphologiques de l'apoptose a souvent conduit à une impasse. Ainsi, bien que les neurones présentent des prolongements perturbés, la chromatine est

souvent non condensée, la morphologie des organites intacte et les noyaux non picnotiques (459). L'élimination rapide des neurones présentant des caractéristiques apoptotiques par les cellules phagocytaires et le caractère tardif des études sont probablement à l'origine de ces difficultés. Malgré cela, Broe *et al.* (96) ont rapporté la présence de chromatine condensée dans des noyaux neuronaux, apportant une preuve morphologique de la mort neuronale dans le cerveau des patients atteints de la MA. Mais cette observation ne permet pas de discriminer le type de mort impliqué puisque nécrose et apoptose sont toutes 2 caractérisées par une fragmentation et une condensation de la chromatine (459). La contribution respective de ces 2 mécanismes reste donc à évaluer, d'autant que certains auteurs avancent l'hypothèse d'un scénario aponécrotique dans lequel la cellule subirait les 2 processus de manière séquentielle (52). La présence des caspases-3 et -6 sous forme active et l'accumulation de produits issus de leur activation protéolytique dans le cerveau des patients (315, 718), tout comme les résultats obtenus à partir de cultures cellulaires *in vitro*, suggèrent que la mort neuronale induite lors de la MA implique un mécanisme de type apoptotique dépendant des caspases. Certains auteurs se basant sur ces études proposent l'hypothèse selon laquelle le déficit cognitif serait lié aux dommages cellulaires dus à l'activation de ces enzymes protéolytiques sous l'effet de l'accumulation des peptides A β et/ou de la dégénérescence neurofibrillaire et ne nécessiterait pas de perte neuronale (459). Afin de déterminer plus précisément la contribution de la mort cellulaire programmée dans la MA, certains auteurs se sont focalisés sur l'étude des neurones cholinergiques du télencéphale basal, dont la dégénérescence est corrélée à la perte des fonctions cognitives. Ces neurones sont constitués d'un corps cellulaire situé dans les aires cérébrales où le peptide A β ne s'accumule pas et d'un axone au contact des dépôts amyloïdes. Les résultats obtenus à partir de cultures compartimentées de ces neurones suggèrent que la dégénérescence axonale induite par le peptide A β est un événement précoce préalable à l'apoptose nucléaire (689). Cette dernière serait en fait la conséquence de la désorganisation axonale et de la perte du transport rétrograde, consécutivement à l'activation des calpaïnes. À l'inverse, l'apoptose du noyau cellulaire intervenant donc en second lieu nécessite l'action conjointe de ces 2 familles de protéases (689).

Malgré la multiplicité des études sur la MA, le rôle de la mort cellulaire dans cette pathologie neurodégénérative reste encore très controversé, certains proposant qu'elle participe de la perturbation des capacités cognitives, d'autres suggérant qu'il s'agisse plutôt d'un phénomène secondaire, tardif (200, 459). Le type de processus impliqué reste également au centre des débats et l'hypothèse de la survenue d'un phénomène complexe, mêlant dégénérescence axonale, apoptose et éventuellement nécrose, est aujourd'hui envisagée. Bien que la place de la mort neuronale dans les troubles mnésiques ne soit pas encore clairement établie, les conséquences de l'initiation des phénomènes apoptotiques ou nécrotiques (stress oxydant, neuroinflammation, dégénérescence axonale) semblent toutefois déterminantes dans la MA comme sans doute dans d'autres pathologies neurodégénératives.

2-4. Formes familiales et sporadiques de la MA, réconciliation des 2 hypothèses

2-4-1. Les formes familiales de la maladie d'Alzheimer

Cinq pour cent des patients souffrant de la MA sont atteints d'une forme familiale dont la transmission suit un mode autosomique dominant (660). Ces formes sévères se déclarent avant 65 ans et sont dues à des mutations des gènes codant l'APP, la PS1 ou la PS2 (438). La plupart de ces mutations conduisent à augmenter le rapport $A\beta_{42}/A\beta_{40}$.

2-4-1-1. Le gène de l'APP

Une vingtaine de mutations responsables de l'apparition d'une forme familiale de la MA ont été répertoriées dans le gène codant la protéine APP (146, 438). La plupart des mutations interviennent entre les résidus 714 à 717 (figure 25), i.e. à proximité du site de clivage par la γ -sécrétase (373), et conduisent à une augmentation du rapport $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ soit en favorisant la production du peptide $A\beta_{42}$ soit en diminuant celle du peptide $A\beta_{40}$ (13, 653). L'augmentation de ce rapport pourrait induire le processus de fibrillogénèse et la formation des plaques caractéristiques de la MA (653, 660).

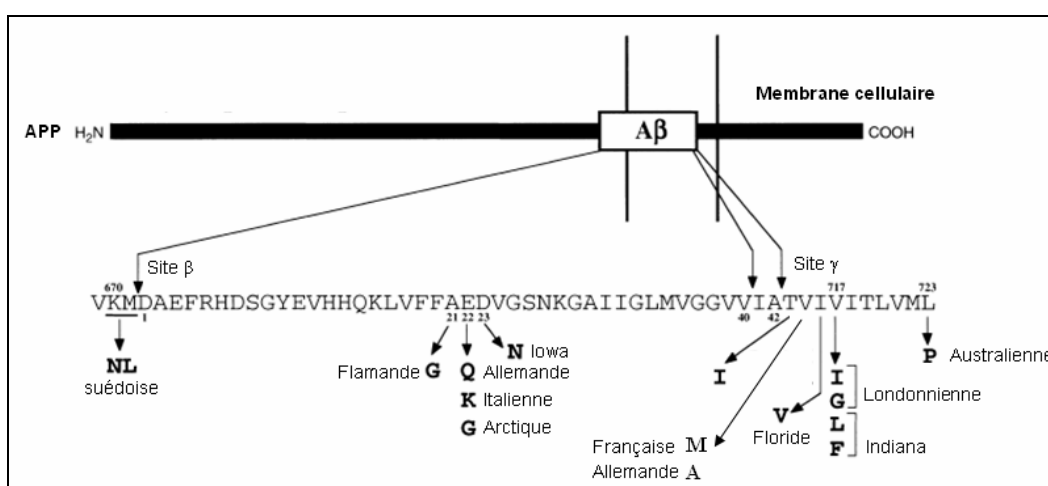


Figure 25. Mutations du gène codant l'APP entraînant des cas d'Alzheimer familiaux d'après Irie *et al.* (373)

Les mutations situées à proximité du site de clivage par la β -sécrétase induisent plutôt une augmentation de la production totale de peptide A β (146). Les conséquences des mutations au sein de la séquence codant le peptide A β ne sont pas encore clairement définies. Certains suggèrent que ces mutations diminuent l'efficacité de l'activité α -sécrétase, favorisant ainsi la voie amyloïdogène (319), alors que d'autres proposent que ces mutations augmentent la capacité d'oligomérisation du peptide A β (538, 567).

Les mutations du gène de l'APP conduisant à des formes familiales de MA ont donné de puissants arguments à l'hypothèse myéloïste dont la séquence pourrait se résumer de la façon suivante : accumulation de peptide amyloïde sous forme oligomérique puis fibrillogénèse et enfin formation des plaques, l'ensemble concourant à de graves atteintes synaptiques, à la destabilisation des membranes,

à un stress oxydant et à une réponse inflammatoire, avec pour résultante la mort neuronale et le déclin des fonctions cognitives. Toutefois, certains auteurs ayant utilisé des modèles cellulaires déplétés en *Tau* rapportent aujourd'hui que *Tau* est nécessaire à la toxicité induite par le peptide A β fibrillaire (616). Ainsi, les peptides A β fibrillaires pourraient induire l'activation de certaines kinases comme Cdk5, MAPK et GSK-3 β , capables d'hyperphosphoryler *Tau* et de mener à la désorganisation du cytosquelette et à l'apparition des neurites dystrophiques caractéristiques de la MA (12, 616, 717).

La synthèse bibliographique présentée ci-dessus permet donc d'envisager la MA comme une suite impliquant l'accumulation des peptides A β dès les phases précoces et l'altération de *Tau* non comme un phénomène causatif, mais comme une conséquence. Ce scénario, conforté par l'absence de mutation du gène *tau* dans les formes familiales de la maladie, est illustré par la figure 26.

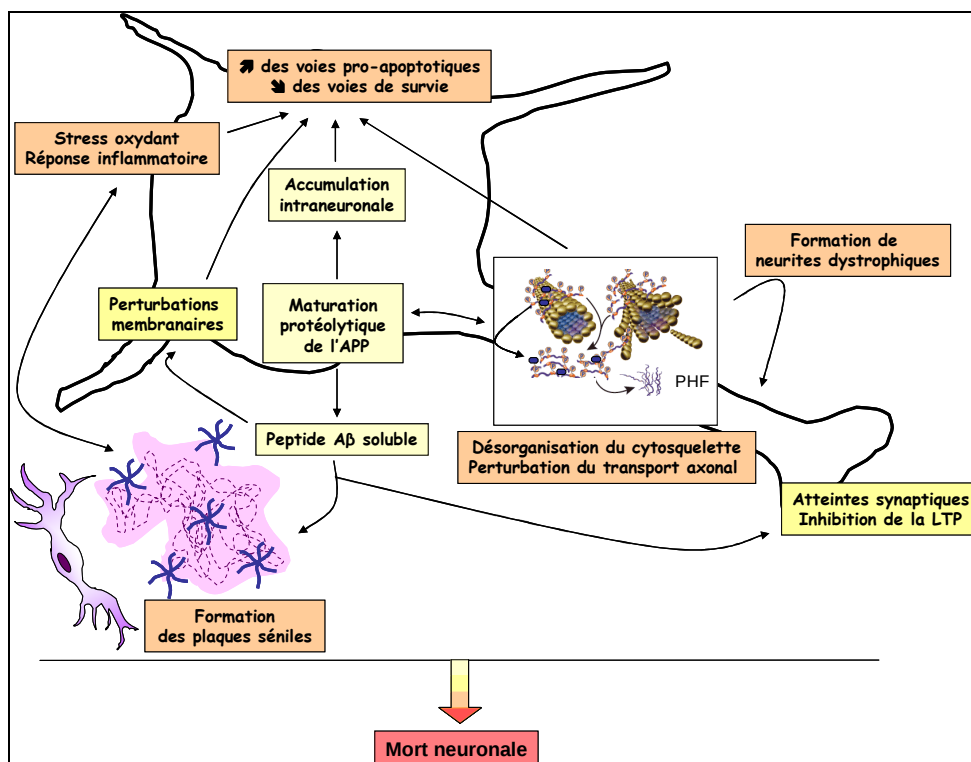


Figure 26. Cascade hypothétique conduisant à la mort neuronale dans la MA

2-4-1-2. Les gènes PSEN

2-4-1-2-1. Les mutations des gènes PSEN, conséquence sur le métabolisme de l'APP

En 1992, 4 équipes indépendantes (275, 554, 652, 736) rapportent un lien entre le *locus* 14q24 et certaines formes familiales de la MA. En 1995, Sherrington *et al.* (667) montrent que le gène *PSEN1* présent sur ce *locus* code pour la protéine PS1. À ce jour, 142 mutations du gène *PSEN1* responsables d'environ 50% des formes familiales de la MA ont été répertoriées, la plupart conduisant à des formes agressives, parfois déclarées chez des sujets de moins de 30 ans (62, 438, 746).

Situé sur le *locus* 1q31-42, le gène *PSEN2* codant la protéine PS2 (477, 628) n'intervient que dans des formes familiales minoritaires de MA. Seules 10 mutations responsables d'une transmission de la

maladie selon un mode autosomique dominant ont été identifiées à ce jour (62, 438).

En 1995, Sherrington *et al.* (667) et Levy-Lahad *et al.* (477) montrent que des mutations des gènes *PSEN1* et *PSEN2* conduisent à une augmentation relative de la voie amyloïdogène. Les dosages des peptides $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ dans des échantillons plasmatiques et dans des fibroblastes de patients présentant de telles mutations ont révélé une augmentation sélective du taux de peptide $A\beta_{42}$ (653). Ces observations ont par la suite été confirmées par des études *in vitro* et *in vivo* (146, 211). Par ailleurs, les analyses *post mortem* réalisées sur ces patients ont mis en évidence une augmentation de 1,5 à 3 fois du nombre de plaques séniles $A\beta_{42}^+$ par rapport aux patients décédés d'une forme non familiale de la MA (469).

2-4-1-2-2. Interaction des PS avec GSK-3 β

Il a été suggéré que la protéine GSK-3 β interagisse avec la protéine PS1 et que cette interaction soit favorisée par la présence de certaines mutations du gène *PSEN1* conduisant à l'apparition de formes familiales de la MA. La liaison de la protéine GSK-3 β à la protéine PS1 lui permet de se rapprocher de l'un de ses substrats, la protéine *Tau*, qui dispose également d'un site de liaison à la PS1 (717). Outre son rôle dans le métabolisme de *Tau*, de nombreux travaux suggèrent d'étroites relations entre maturation protéolytique de l'APP et GSK-3 β . Ainsi, le domaine AICD et les fragments C-terminaux C83 et C99 libérés lors du clivage de l'APP induisent une augmentation de l'activité GSK-3 β , probablement par régulation transcriptionnelle, la phosphorylation de *Tau* et l'apoptose des cellules neuronales en culture (637). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle *Tau* serait impliquée dans la neurotoxicité induite par le peptide $A\beta$ (616).

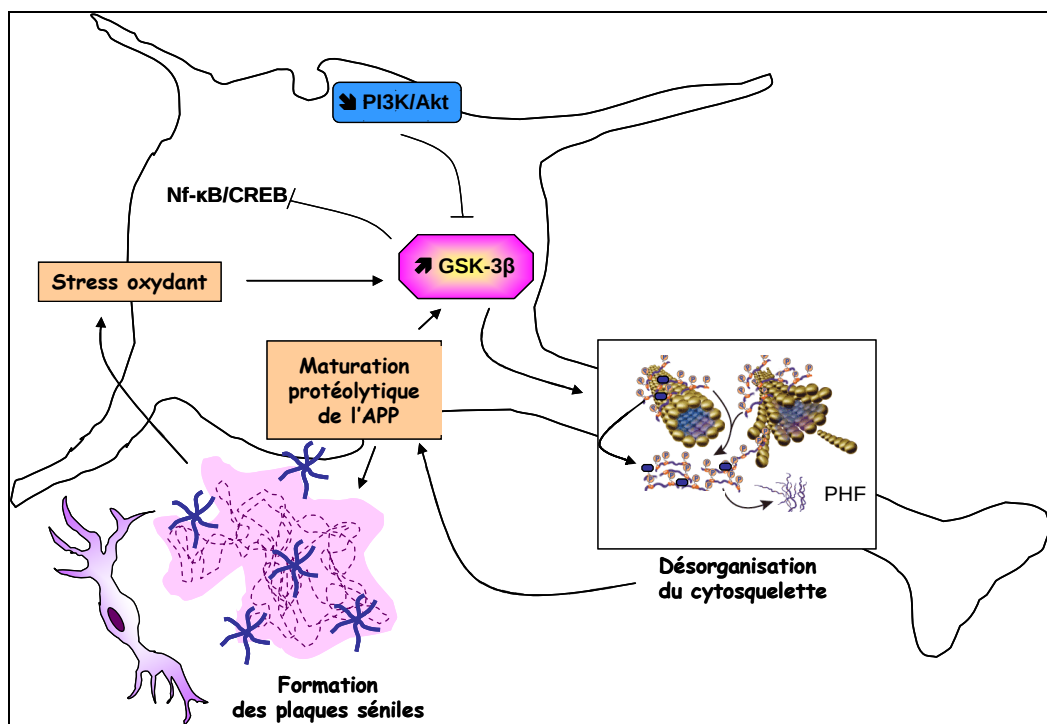


Figure 27. Rôle central de la protéine GSK-3 β dans la MA

L'augmentation de l'activité GSK-3 β pourrait en particulier être à l'origine d'un transport axonal perturbé affectant non seulement le transport de l'APP, mais aussi son internalisation et sa maturation (717). Ces travaux confortent l'hypothèse énoncée précédemment selon laquelle les troubles observés dans la MA naîtraient d'altérations du métabolisme de l'APP et de celui de la protéine *Tau* (figure 27). Outre son implication dans la désorganisation du cytosquelette et la perturbation du transport axonal, l'activité exacerbée de la GSK-3 β conduit à l'inhibition de certaines voies de survie cellulaire en intervenant par exemple sur les facteurs de transcription CREB et NF- κ B (206, 309).

Bien que différents groupes aient montré une augmentation du taux de protéine GSK-3 β dans le cerveau des patients atteints de la MA, aucune preuve d'une activité accrue de cette enzyme n'a été apportée (588). Ces résultats restent controversés par d'autres équipes dont les travaux suggèrent une diminution de l'activité et un taux inchangé de la protéine GSK-3 β dans le cerveau des patients décédés de la MA (712). Ainsi, bien que de nombreux travaux *in vitro* et *in vivo* suggèrent un rôle central de GSK-3 β dans le développement de la MA, des études complémentaires sont nécessaires pour démontrer son rôle physiopathologique.

2-4-2. Les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer

Dans les formes sporadiques de la MA, les mécanismes moléculaires les plus souvent mis en cause impliquent une diminution des mécanismes de clairance du peptide A β , alors que les formes familiales reposent plutôt sur une production accrue des peptides amyloïdes (741).

2-4-2-1. L'apolipoprotéine E4, principal facteur de risque

2-4-2-1-1. Les différentes isoformes

L'apolipoprotéine E (ApoE), transporteur majeur des lipides, du cholestérol et du peptide A β dans le cerveau (608), est impliquée dans de multiples fonctions dont la distribution des lipides aux différentes cellules cérébrales, l'homéostasie lipidique, la réparation des neurones endommagés, la croissance dendritique et le maintien des connections somatodendritiques (511). Dans le cerveau, l'ApoE est principalement synthétisée par les astrocytes et secondairement par les neurones (600). Des études récentes suggèrent toutefois que son expression neuronale pourrait être induite en réponse à des dommages ou à un *stimulus* pro-apoptotique (511).

Le gène codant cette protéine, situé en 19q (704), permet la biosynthèse de 3 isoformes, *i.e.* ApoE2, ApoE3 et ApoE4, respectivement à partir des allèles ϵ 2, ϵ 3, et ϵ 4 (734), l'isoforme la plus répandue étant l'ApoE3. Cette isoforme diffère des ApoE2 et ApoE4 par la substitution de 2 résidus : Cys¹¹² et Cys¹⁵⁸ dans ApoE2, Cys¹¹² et Arg¹⁵⁸ dans ApoE3, Arg¹¹² et Arg¹⁵⁸ dans ApoE4. Quelle que soit l'isoforme générée l'ApoE présente 2 domaines fonctionnels, un domaine N-terminal de 22 kDa correspondant au site de liaison aux récepteurs LRP et un domaine C-terminal de 10 kDa correspondant au site de liaison aux lipides (511). La présence de résidus arginyls en positions 112 et 158 de l'isoforme ApoE4 induit un changement de conformation de la protéine acquérant une structure

de type globule fondu et donc moins stable et une interaction des 2 domaines fonctionnels (386, 511). Cette dernière expliquerait en partie l'efficacité moindre de cette isoforme à assumer ses fonctions de redistribution lipidique et de réparation neuronale (511). Outre l'impact sur le statut lipidique des cellules cérébrales, l'ApoE4 est aussi associée à des perturbations du métabolisme du glucose, suggérant qu'elle puisse influencer sur les fonctions mitochondriales (363).

2-4-2-1-2. L'ApoE4, facteur de risque de la MA

L'ApoE4, identifiée comme l'un des principaux facteurs de risque des cas sporadiques de la MA, est associée aux plaques séniles et aux dégénérescences neurofibrillaires (704). Les individus $\epsilon 4$ homozygotes présentent un risque 5 à 10 fois plus élevé de développer la MA, alors qu'il augmente de 2 à 5 fois chez les $\epsilon 4$ hétérozygotes (62, 163). Inversement, la présence d'au moins un allèle $\epsilon 2$ semble conférer une protection contre cette pathologie (163). Le génotype des patients est fortement corrélé à la densité des dépôts amyloïdes, en particulier au niveau hippocampique et cortical, plus importante pour $\epsilon 4/\epsilon 4$ que pour $\epsilon 3/\epsilon 4$ et $\epsilon 3/\epsilon 3$ (49). Les études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que l'expression de l'isoforme ApoE4, et dans une moindre mesure celle de l'ApoE3, induit la production de peptides A β , inhibe sa clairance et/ou favorise sa précipitation conduisant à la formation des lésions caractéristiques de cette pathologie (49, 363, 788). La production accrue de peptides A β observée en présence de l'ApoE4, et dans une moindre mesure de l'ApoE3, serait principalement liée à une augmentation de la ré-internalisation de l'APP, conduisant à favoriser sa maturation par la voie endosomale. Des études réalisées sur la lignée B103 de neuroblastome de rat exprimant l'isoforme APP⁶⁹⁵ humaine (hAPP⁶⁹⁵) suggèrent que cette ré-internalisation pourrait impliquer une interaction entre les domaines cytoplasmiques des protéines LRP et hAPP, cette dernière pouvant éventuellement engager des protéines adaptatrices telles que Fe65 (788). Parallèlement aux différences structurales entre les isoformes d'ApoE, les individus homozygotes $\epsilon 4/\epsilon 4$ présentent des quantités moindres d'ApoE dans le sérum et les tissus cérébraux, affectant ainsi l'homéostasie lipidique et les capacités d'élimination du peptide A β comme chez les souris déficientes en apoE (602). En outre, les sujets porteurs de l'isoforme ApoE4 présentent une faible capacité de remodelage et de plasticité synaptiques (24, 49), une progression plus rapide de la maladie, une perte neuronale accrue, une diminution du nombre de terminaisons présynaptiques et de l'activité cholinergique. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle l'activité de réparation de l'ApoE4 serait moins efficace que celle des ApoE2 et E3 (511). Les études réalisées sur des souris exprimant l'hAPP suggèrent par ailleurs que l'expression de l'ApoE4 conduirait à une perte du processus d'apprentissage et de mémorisation associée à une inhibition de la LTP (728).

Même si tous les mécanismes moléculaires déterminant l'implication de l'ApoE4 dans l'étiologie de la MA n'ont pu être élucidés à ce jour, il est toutefois établi que la génération et le clivage protéolytique de cette isoforme au sein des neurones conduisent à des fragments cytotoxiques capables d'induire des perturbations mitochondriales et des altérations du cytosquelette (92). L'importance de ces fragments est accentuée par l'absence d'interaction entre ApoE4 et *Tau*, à l'inverse des autres

isoformes qui interagissent avec *Tau* et préviennent ainsi son hyperphosphorylation ainsi que la dépolymérisation des microtubules en conséquence (figure 28). En outre, des études réalisées *in vitro* sur la lignée SH-SY5Y de neuroblastome humain rapportent une augmentation de l'activité de la protéine GSK-3 β après traitement des cellules par l'ApoE4 (511). Enfin, l'internalisation de l'ApoE4 conduirait à endommager les lysosomes et à en libérer des enzymes protéolytiques (386). L'expression de l'isoforme ApoE4 pourrait aussi influencer la progression d'autres pathologies neurodégénératives comme la sclérose amyotrophique latérale ou la maladie de Parkinson (49).

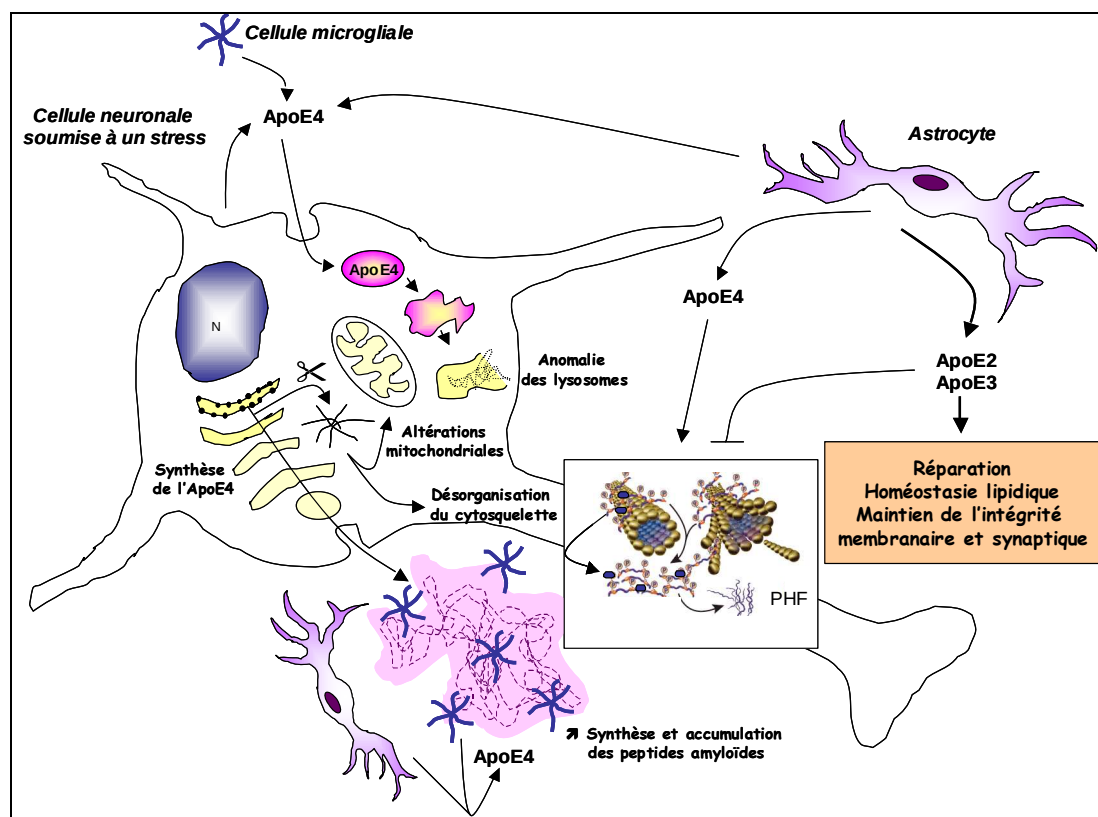


Figure 28. Implication de l'ApoE4 dans les perturbations neuronales associées à la MA

2-4-2-2. L'insulysine

L'insulysine (IDE, enzyme de dégradation de l'insuline) est une métalloprotéase de 110 kDa capable de dégrader l'insuline et différents peptides présentant une structure en feuillet β (444). À ce titre, le peptide A β interagit avec, et est dégradé par, l'IDE *in vitro*. En effet, l'IDE purifiée à partir d'un milieu de culture de lignées microgliales est capable de dégrader les peptides A β d'origine synthétique ou endogène (444). Par ailleurs, l'IDE est présente au sein des plaques séniles (59). Ces études suggèrent que l'IDE pourrait être une protéase responsable de la clairance du peptide A β (217). Le polymorphisme du gène de l'IDE situé sur le *locus* 10q23-25 pourrait constituer un facteur de risque de la MA (61, 227).

D'autres gènes agissent probablement comme des facteurs de risques polymorphes, parmi lesquels ceux codant les récepteurs LRP, la cholestérol 24S-hydroxylase (*cyp46*) et le TNF- α (493, 660).

2-4-2-3. La néprilysine

La NEP est une endopeptidase transmembranaire de la famille des métalloprotéases à zinc. De masse moléculaire comprise entre 90 et 110 kDa, elle se présente le plus souvent sous forme d'homodimère. Elle est principalement exprimée au niveau du rein, mais elle est également présente à faibles taux dans le cerveau. La NEP clive du côté *N*-terminal des résidus hydrophobes, inactivant de nombreux substrats comme le glucagon, les enképhalines, l'endothéline, la neurotensine, l'ocytocine, la bradykinine, l'insuline et le peptide A β sur lequel 13 sites de clivage potentiels ont été identifiés (121). L'injection intracérébrale de peptide A β synthétique en présence ou non d'inhibiteurs de protéases a permis de mettre en évidence l'importance de la NEP dans la dégradation du peptide A β (374). En conséquence, la diminution de l'activité de cette enzyme pourrait contribuer au développement de la MA en favorisant l'accumulation de peptide A β (121). De même, une accumulation de peptide amyloïde a été constatée dans le cerveau de souris dont le gène *Nep* a été inactivé (374). Par ailleurs, la déficience en NEP est corrélée à la diminution de la dégradation du peptide A β . Malgré ces arguments, aucune différence significative en terme de fréquence allélique n'a été observée chez les patients atteints de la MA (121). Le développement de la MA pourrait donc être favorisé aussi par une perturbation du métabolisme d'autres enzymes, probablement impliquées dans les mécanismes de clairance des peptides A β , parmi lesquelles l'enzyme ACE de conversion de l'angiotensine et la plasmine (121).

3. Le métabolisme lipidique dans le système nerveux central

Le cerveau est, après le tissu adipeux, l'organe contenant la plus grande proportion de lipides, soit plus de la moitié du poids sec de l'organe. Ceci suggère une implication importante du statut et du métabolisme lipidique dans la structure tissulaire, le fonctionnement cérébral et le maintien des fonctions cognitives.

3-1. Cholestérol et maladie d'Alzheimer

3-1-1. Métabolisme du cholestérol

3-1-1-1. Acquisition du cholestérol par le système nerveux central

Alors qu'il ne représente que 3% de la masse totale du corps, le SNC concentre 25% du cholestérol (202). Tous les organes, exception faite du cerveau, assurent leur besoin en cholestérol par deux mécanismes : la synthèse *de novo* et la capture du cholestérol circulant. Dans le cerveau, la BHE limite le passage du cholestérol circulant vers le cerveau. La quasi totalité du cholestérol requis est donc synthétisée *de novo* (201, 202). Dans le SNC, le cholestérol est majoritairement présent sous forme libre puisque plus de 99,5% du cholestérol est non estérifié. Il se distribue principalement au sein de deux compartiments, d'une part les membranes cellulaires des cellules neuronales et gliales, et d'autre

part les cellules oligodendrocytaires constituant la gaine de myéline des axones (202, 279). Cette dernière contiendrait à elle seule 70% du cholestérol total du cerveau.

3-1-1-1.1. Synthèse *de novo* du cholestérol dans le cerveau

La maturation du cerveau se produit principalement au cours de la période périnatale qui permet la myélinisation des neurones et secondairement lors de la croissance. Après la naissance, le cerveau humain doit multiplier d'un facteur 4 son taux de cholestérol (202), cette incorporation massive étant principalement obtenue par synthèse *de novo* (201). Cette dernière diminue au cours de la vie adulte au profit d'un recyclage efficace du cholestérol, la demi-vie du cholestérol dans le cerveau adulte étant estimée à 5 ans (72). Réalisée dans le RE (201), la synthèse du cholestérol implique la mise en place d'une vingtaine de réactions enzymatiques, dont l'étape limitante est celle catalysée par la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMGR) qui produit le mévalonate, précurseur du cholestérol (figure 29). Cette synthèse complexe nécessite 18 molécules d'acétyl-CoA, 18 d'ATP et 29 de NADPH par molécule de cholestérol formée (671). Aussi, de nombreux auteurs suggèrent aujourd'hui que les neurones adultes pourraient perdre leur capacité à synthétiser le cholestérol au profit d'une spécialisation vers la transmission de l'influx nerveux (73, 594). En contrepartie, les neurones acquièrent le cholestérol dont ils ont besoin par les astrocytes et les oligodendrocytes dont la capacité de synthèse est au moins 3 fois supérieure (73). De plus, grâce à leur fonction phagocytaire, les cellules gliales peuvent recycler le cholestérol des cellules dégénérantes (391).

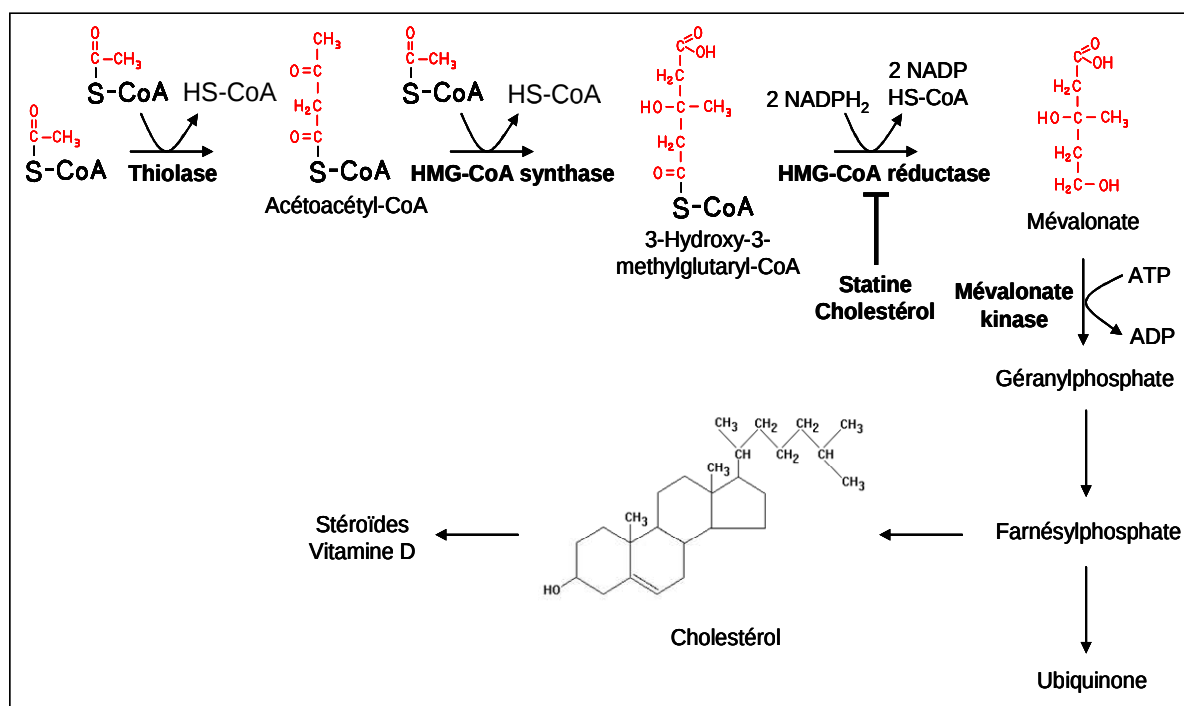


Figure 29. Synthèse *de novo* du cholestérol

Dans les conditions physiologiques, la synthèse du cholestérol par les neurones par la voie de l'HMGR n'est requise que lorsque l'internalisation du cholestérol synthétisé par les cellules gliales est

insuffisante (92). Afin d'assurer l'homéostasie du cholestérol, l'activité et l'expression de l'HMGR sont soumises à un rétrocontrôle permettant de diminuer la synthèse du cholestérol en réponse à une forte internalisation de stérols extracellulaires (594, 671). Des études controversées suggèrent que le traitement par certains agents hypocholestérolémiants de type statines permettrait de diminuer le risque de certaines pathologies neurodégénératives (773). Cette famille de composés réduit l'assemblage et le transport des lipoprotéines et augmente l'activité des récepteurs hépatocytaires afin de capturer le cholestérol dans le foie et diminuer la concentration de cholestérol et de triglycérides circulants.

3-1-1-1-2. Transport et internalisation du cholestérol dans le cerveau

Dans les neurones, le cholestérol est incorporé et redistribué au sein des membranes lors des remodelages synaptiques sous forme libre ou estérifiée, liée aux lipoprotéines (511, 602). L'ApoE est l'apolipoprotéine majoritaire dans le cerveau, bien que les ApoJ, A-1 et D soit aussi exprimées dans cet organe (201). L'ApoE est majoritairement synthétisée par les cellules gliales, en particulier par les astrocytes. Ceux-ci libèrent dans le milieu des particules sphériques ou discoïdales complexes ApoE-cholestérol-phospholipides, comparables en taille aux lipoprotéines de haute densité (HDL) et internalisables par les neurones (600). Les HDL sont assemblées dans le fluide cérébrospinal avant d'atteindre les cellules nerveuses où elles se lient à des récepteurs membranaires appartenant à la famille des LRP pour être endocytosées et libérer le cholestérol au niveau luminal (178). Ce dernier est alors stocké après estérification par une acyl-CoA cholestérol acyltransférase, ou dirigé vers les membranes (602, 671). L'ensemble de ces étapes est illustré par la figure 30.

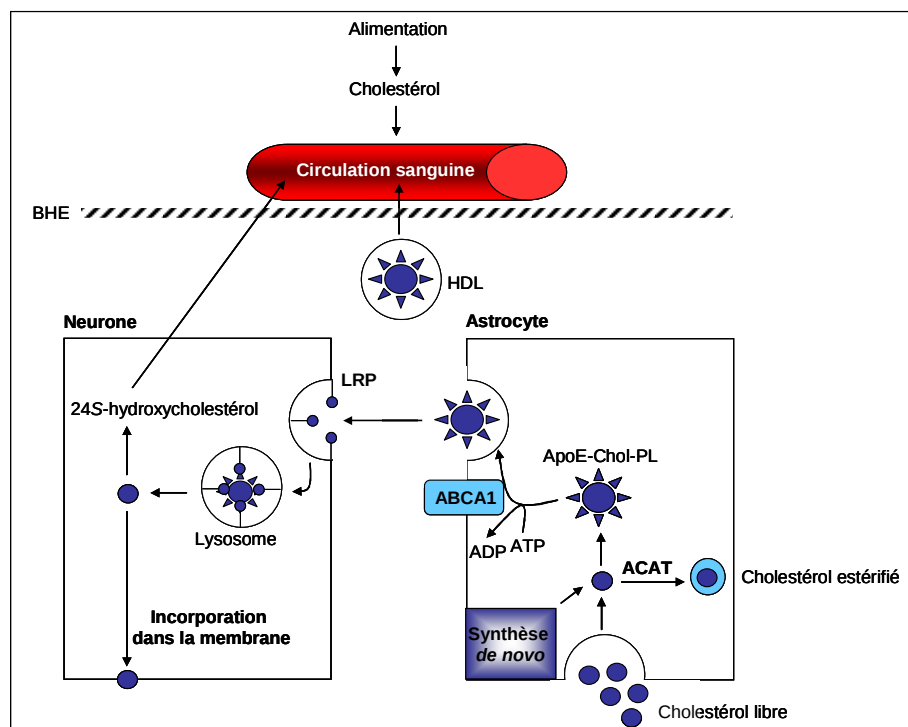


Figure 30. Transport et internalisation du cholestérol dans le SNC
d'après Shobab *et al.* (671)

Les lipoprotéines contenant l'ApoE peuvent être incorporées par les cellules de Schwann et par les neurones ganglionnaires de la racine dorsale (602, 671). D'autres récepteurs sont exprimés dans le cerveau parmi lesquels un récepteur aux lipoprotéines de très faible densité, un ApoE récepteur 2 (347) et les récepteurs ABC (*ATP binding cassette*) dépendants de l'ATP qui jouent un rôle essentiel dans le transport du cholestérol des cellules gliales et des cellules épithéliales de la BHE vers les neurones (602, 753). Ainsi, le transporteur ABCA1 est exprimé dans les astrocytes et le transporteur ABCA2 dans les tissus neuronaux (655). L'expression spatio-temporelle de ce dernier coïncide avec la myélinisation. L'importance relative de chaque récepteur est encore inconnue, mais il est probable qu'ils agissent de manière redondante, puisque l'invalidation génétique d'un des récepteurs ne conduit pas à des troubles chez l'animal (602).

3-1-1-2. Élimination du cholestérol

De 50 à 90% du cholestérol libre présent dans les cellules est localisé dans la membrane plasmique. Bien que présent en faible proportion, le cholestérol non estérifié, stocké dans les structures intracellulaires telles que le RE, l'appareil de Golgi ou le noyau, joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans la cellule (202). L'hydroxylation du cholestérol permet d'accélérer son passage à travers la membrane plasmique et constitue la voie majeure pour le transport du cholestérol, son élimination et son homéostasie au niveau cérébral (72, 80, 503). La conversion du cholestérol en 24S-hydroxycholestérol capable de traverser la BHE est effectuée par 24S-hydroxylase (CYP46), une enzyme de la famille des cytochromes P-450 (80, 156, 504). L'expression de cette enzyme est restreinte à certains types cellulaires dont les cellules pyramidales du cortex et les cellules de Purkinje du cervelet (504, 505, 507). Elle est augmentée lors de la période de myélination qui nécessite l'incorporation de quantités importantes de cholestérol (737). Bien que des traces de 27-S-hydroxystérol, un autre métabolite capable de traverser la BHE et issu de la conversion du cholestérol par une 27-S-hydroxylase, soient détectables dans le cerveau, la voie Cyp46 constitue la voie majoritaire d'élimination du cholestérol (505).

Le 24S-hydroxycholestérol pourrait constituer un marqueur précoce des perturbations du métabolisme cérébral du cholestérol associées à la MA. En effet, lors des stades précoces de celle-ci, la concentration de 24S-hydroxycholestérol dans le LCR et dans la circulation sanguine est plus élevée, reflétant une diminution de la demi-vie du cholestérol dans le SNC (428). À des stades plus tardifs, la concentration de 24S-hydroxycholestérol circulant dans le sang et le LCR chute, ce qui suggère une diminution du métabolisme du cholestérol (428).

Le cholestérol peut également être éliminé sous forme complexée aux lipoprotéines par les récepteurs ABCA1 (347, 753). Toutefois, les souris dont les gènes du récepteur aux lipoprotéines ou de l'ApoE ont été invalidés ne montrent aucune perturbation de la synthèse cérébrale du cholestérol, suggérant que cette voie n'assure pas une part significative de l'élimination du cholestérol. Les mécanismes moléculaires de l'efflux de cholestérol dépendant de l'ApoE sont encore mal connus, l'homéostasie du cholestérol impliquant probablement d'autres enzymes et protéines (505).

3-1-2. Le cholestérol, essentiel à l'intégrité neuronale et au développement cérébral

3-1-2-1. Le cholestérol dans les membranes neuronales

Le cholestérol adopte dans l'espace une structure plane et rigide imposée par son noyau cyclopentano-perhydrophénanthrène (figure 31).

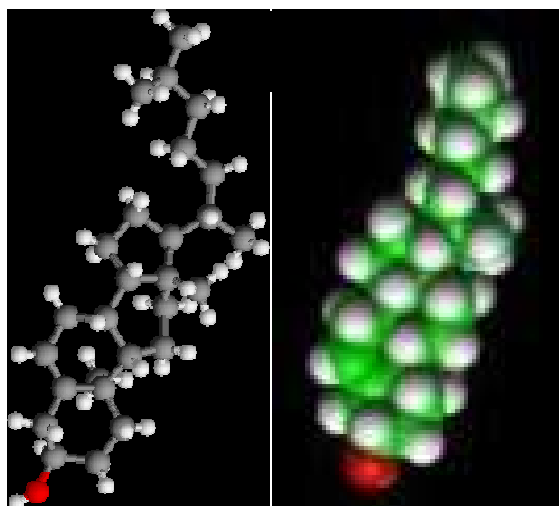


Figure 31. Modèles structuraux du cholestérol

Dans une membrane modèle constituée uniquement de phospholipides et de sphingolipides, les phospholipides contenant des chaînes hydrocarbonées saturées et insaturées de différentes longueurs s'organisent en phase liquide cristalline caractérisée par un état désordonné et fluide. À l'inverse, les sphingolipides, généralement estérifiés avec des AG saturés, forment une phase en gel compact (98). L'addition de cholestérol ou de l'un de ces énantiomères conduit à la formation de régions organisées en phase liquide ordonnée (l_o) dans laquelle les chaînes d'AG saturés sont compactées comme dans une phase en gel mais conservent une mobilité latérale comparable à celle observée dans une phase cristalline liquide (98, 674). Le cholestérol est donc un élément constitutif de l'architecture des membranes modèles.

Au sein des membranes biologiques, la distribution du cholestérol est asymétrique (279). Ainsi, dans les membranes neuronales, 85% du cholestérol est présent dans le feuillet interne de la membrane plasmique. La rupture de cette asymétrie membranaire entraîne une perte des fonctions associées à la membrane, en particulier celle de la capacité d'endo- et d'exocytose, et une perturbation des voies de signalisation cellulaire, suggérant une implication du cholestérol non seulement dans la structure, mais également dans les fonctions membranaires. Le fait que la déplétion du cholestérol par différents agents chimiques tels que la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) induise la mort cellulaire confirme le rôle prépondérant du cholestérol dans le maintien de l'intégrité cellulaire (597). Cette implication forte du cholestérol dans les fonctions associées à la membrane est liée à sa capacité à induire et à stabiliser l'assemblage de microdomaines membranaires fonctionnels riches en sphingolipides et en cholestérol. Ces microdomaines seront décrits en détail dans le paragraphe 3-4.

3-1-2-2. Le cholestérol, précurseur des stéroïdes

Les hormones stéroïdes sont principalement synthétisées dans les tissus stéroïdogènes tels que les ovaires, les glandes surrénales ou le placenta. Impliquées dans le contrôle des fonctions reproductives et la régulation de nombreuses voies métaboliques, ces hormones présentent également un fort impact sur les fonctions neuronales et cérébrales au cours du développement et de la vie adulte. Ainsi, la progestérone et ses dérivés stimulent la myélinisation et la remyélinisation des nerfs périphériques ayant subi des lésions (531). La neurotransmission, la plasticité synaptique, la neurogenèse et la formation des prolongements neuronaux sont également influencées par la présence de molécules telles que la déhydroépiandrostérone (DHEA), la progestérone ou l'estradiol (158, 658). Certaines hormones stéroïdiennes présentent en outre un effet neuroprotecteur *in vivo* et *in vitro* contre la toxicité induite par différents *stimuli* (273). L'action des stéroïdes est principalement liée à une régulation de l'expression des gènes par liaison aux SRE (*steroid response element*).

Le SNC n'apparaît plus seulement comme une cible pour les hormones stéroïdiennes, mais constitue lui aussi un tissu stéroïdogène capable de synthétiser ses propres hormones (46, 531). Cette constatation a initié le concept de neurostéroïdes caractérisant les stéroïdes synthétisés par et pour le cerveau (46).

3-1-3. Implications dans la maladie d'Alzheimer

3-1-3-1. Études épidémiologiques

Les premières hypothèses d'un lien entre le métabolisme du cholestérol et les pathologies neuro-dégénératives se sont basées sur la corrélation entre la présence de l'allèle $\epsilon 4$ de l'ApoE et un risque accru de MA (163). Différentes études épidémiologiques ont été réalisées en prenant en compte différents paramètres dont l'âge, le cholestérol des HDL, le cholestérol total et le cholestérol estérifié. Les résultats de 7 études ont été confrontés de façon à établir une relation entre cholestérol total et développement de la MA (682). Deux de ces études montrent une corrélation positive entre le taux de cholestérol et le risque à long terme de MA. À l'inverse, 2 autres études ont suivi des patients sur 25 ans et n'ont montré aucune association entre ces 2 paramètres. Les 3 dernières réalisées sur des patients plus âgés n'ont pas non plus établi de relation entre le taux de cholestérol et le risque de MA dans les 2 ans ou dans les 7 ans (682). L'une d'entre elles, confirmée par d'autres auteurs (534), rapporte même un risque plus élevé de développer la MA chez les patients présentant les plus faibles taux de cholestérol (631). La relation existant entre MA et cholestérol évolue probablement en fonction de l'âge. Ainsi, alors que des taux élevés de cholestérol à l'âge adulte semblent augmenter la prévalence de la MA à long terme, il semble au contraire protéger les populations plus âgées (682). Cette analyse est confortée par le fait que les patients atteints d'une forme sporadique de la MA présentent souvent une diminution de l'activité HMGR associée à une diminution du taux de cholestérol dans les cortex temporaux et frontaux (682). Cette diminution pourrait être liée à une régulation du métabolisme du cholestérol par les peptides amyloïdes (310). En effet, le peptide A β_{40} est capable *in vitro* d'inhiber l'HMGR sans que les

mécanismes moléculaires mis en cause ne soient établis pour le moment (310). De récentes études suggèrent que la production de peptide A β serait mieux corrélée avec le taux de cholestérylesters (608), suggérant une implication de ces derniers dans le clivage de l'APP par la voie amyloïdogène.

D'autres auteurs ont étudié la prévalence de la MA chez les personnes souffrant d'une surcharge pondérale. À partir d'une étude longitudinale sur 392 patients, une relation entre l'index de masse corporelle et la MA a été observée chez les femmes de plus de 70 ans (316). Les paramètres de l'obésité (index de masse corporelle et pourcentage de matière grasse élevés) ont été associés à un taux élevé de peptide A β_{42} circulant, indépendamment du sexe, de l'âge et de la présence de l'allèle $\epsilon 4$ (38). Dans la mesure où de nombreux auteurs considèrent que l'augmentation du rapport A β_{42} /A β_{40} est un facteur déclenchant de la MA (744), cette étude suggère qu'une augmentation du taux de cholestérol et d'AG saturés augmenterait la prévalence de la MA. Mais la question reste de savoir si le lien entre l'augmentation du cholestérol et la MA est direct ou s'il s'agit d'une causalité indirecte due aux états comorbides engendrés par la surcharge pondérale tels que le diabète de type II (38). L'augmentation du taux de peptide A β_{42} pourrait en particulier être due à une diminution de sa clairance par l'IDE lors d'une augmentation du taux d'insuline associée à ce type de diabète (38, 444).

3-1-3-2. Métabolisme du cholestérol dans les modèles expérimentaux de MA

Les premiers liens entre une alimentation riche en cholestérol et la présence de dépôts amyloïdes ont été rapportés par Sparks *et al.* (691). Cette étude a montré une augmentation de l'intensité des dépôts intracellulaires de peptides amyloïdes dans les neurones d'hippocampe de lapins nourris avec une alimentation riche en cholestérol. Des analyses *in vivo* réalisées sur des souris Tg2576 et PSAPP, modèles transgéniques de la MA (620) ont par la suite confirmé ces travaux et montré le caractère réversible de cette accumulation après traitement par des statines (692), inhibiteurs compétitifs pharmacologiques de la HMGR (471). Différentes études *in vitro* suggèrent que l'origine de la diminution de l'accumulation des plaques en présence de statines serait liée à une modulation du métabolisme de l'APP par le cholestérol. Ainsi, alors que des taux élevés de cholestérol dans le milieu de culture des cellules entraînent une diminution du clivage par l' α -sécrétase (79, 676) une diminution de niveau de cholestérol membranaire favorise la voie non amyloïdogène et conduit à une diminution de l'activité β -sécrétase (425). Une telle hypothèse est supportée par le fait que certaines protéines transmembranaires, en particulier la β -sécrétase, présentent une activité optimisée dans un environnement riche en cholestérol (220, 773). Outre son impact sur les enzymes impliquées dans les clivages protéolytiques de l'APP, la présence de cholestérol au sein des plaques séniles suggère qu'il pourrait promouvoir l'agrégation et la précipitation des peptides amyloïdes (503). L'ensemble de ces travaux semble indiquer qu'une augmentation du taux de cholestérol membranaire pourrait être à l'origine d'une augmentation de la production et de l'accumulation des peptides amyloïdes. D'autres auteurs proposent qu'une déplétion trop importante du cholestérol membranaire pourrait induire une fragilisation des neurones et en particulier une sensibilité accrue des neurones à la toxicité du peptide A β . Sponne *et al.*

(695) ont mis en évidence une diminution de la toxicité et de l'apoptose induite par le peptide A β soluble après traitement de neurones corticaux de rat en culture primaire par le cholestérol et une potentialisation de l'effet neurotoxique après traitement par la M β CD. Cet effet neuroprotecteur pourrait être lié à des modifications structurales et ou fonctionnelles de la membrane neuronale permettant de prévenir ou de modifier l'interaction du peptide avec cette dernière et donc l'initiation de la cascade pro-apoptotique (695). Les auteurs montrent que le cholestérol ne protège pas les neurones de la toxicité du peptide A β fibrillaire, à l'inverse des cellules PC12 différenciées en neurones (27, 796). Cette divergence pourrait être liée aux modèles employés, le statut et le métabolisme lipidique pouvant varier selon le type cellulaire (694). Par ailleurs, la déplétion en cholestérol de cultures organotypiques de tranches d'hippocampe induit des dommages comparables à ceux intervenant dans la MA (435).

L'ensemble des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* montre l'importance de l'homéostasie membranaire du cholestérol et suggèrent un rôle clef de la composition et des caractéristiques membranaires dans la production, l'agrégation et la neurotoxicité du peptide A β .

3-1-3-3. Les statines, un traitement préventif de la MA ?

3-1-3-3-1. Études épidémiologiques

Les études cliniques visant à étudier le caractère préventif et/ou curatif de la prise de statines dans le cadre de la MA ont conduit à des résultats contradictoires, certains suggérant une diminution de la prévalence de la maladie après traitement par les statines, d'autres ne montrant aucune corrélation entre la prise de statines et les pathologies neurodégénératives (671, 773). Ainsi, alors que deux études rétrospectives suggèrent que la prise de statines est associée à une diminution de près de 70% de la prévalence la MA (773), d'autres suggèrent que la prise de statines et autres hypocholestérolémiants ne diminuent le risque de développer une pathologie neurodégénérative que chez les sujets de moins de 80 ans (627). Enfin, 3 études épidémiologiques ne mettent en évidence aucune diminution de la prévalence de la MA parmi les patients traités par des statines (339, 484, 696).

3-1-3-3-2. Études cliniques

Trois études cliniques ont été réalisées à ce jour. La première étude, réalisée en double aveugle sur 60 patients atteints de la MA pendant 12 semaines, n'a montré aucune amélioration significative des paramètres cognitifs et biochimiques des patients traités par les statines (677). Une analyse *a posteriori* a toutefois montré une diminution légère, mais significative, du taux de peptide A β dans le LCR des patients présentant une démence peu sévère (677). Dans une seconde étude reposant sur le traitement de 19 patients atteints de la MA par la simvastatine pendant 12 semaines, une diminution significative du taux du sAPP- α et du sAPP- β a été observée. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle un environnement riche en cholestérol favoriserait l'activité de la β -sécrétase. En revanche les résultats obtenus pour le fragment sAPP- α semblent plus difficiles à interpréter (682). Une dernière étude, réalisée en double aveugle avec des patients présentant une atteinte faible ou modérée, montre une stabilisation

de l'atteinte démentielle après la prise pendant 12 mois de simvastatine ou de probucol, un autre agent hypocholestérolémiant (682). D'autres études cliniques sont nécessaires pour confirmer ou infirmer l'effet des statines sur la production des peptides A β et/ou le développement du syndrome démentiel.

3-1-3-3. Effets pléiotropiques des statines

La lovastatine et la pravastatine présentent le même effet sur la prévalence de la MA, alors que la lovastatine traverserait la BHE 50 fois plus rapidement que la parvastatine (471, 773), ce qui suggère une action périphérique des statines. Cette hypothèse est confortée par l'impact nul ou faible des traitements par les statines sur la synthèse et le métabolisme du cholestérol *in vivo*. Ainsi, les études réalisées avec la simvastatine, un analogue du mévalonate particulièrement lipophile donc capable de passer la BHE, rapportent l'absence d'effet notable sur le métabolisme du cholestérol malgré une diminution de près de 30% de la synthèse cérébrale du cholestérol, ceci après administration d'une dose correspondant à 75 fois celle recommandée chez l'homme (723). Ces auteurs montrent en outre l'absence de modification de la synthèse et du métabolisme lipidique après administration *in vivo* d'une dose de pravastatine 300 fois supérieure à celle recommandée chez l'homme, confortant l'hypothèse d'effets pléiotropiques des statines.

Ces effets peuvent être multiples. Ainsi, la lovastatine semble impliquée dans la réduction du taux de peptides amyloïdes dans la circulation sanguine, suggérant une stimulation des mécanismes de clairance du peptide (444). Un traitement par les statines pourrait aussi conduire à une baisse du taux d'ApoE dans le cerveau et donc à un ralentissement de la formation des dépôts amyloïdes (682). Enfin, les statines présentent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et anti-apoptotiques qui pourraient en partie expliquer les effets rapportés par certaines études (179).

3-2. Sphingolipides et maladie d'Alzheimer

3-2-1. Les glycosphingolipides

3-2-1-1. Les cérébrosides

Les cérébrosides sont des glycolipides neutres formés d'une base sphingoïde (sphingosine ou sphinganine), d'un AG à très longue chaîne (22:0 ; 24:0 ; 24:1) et d'un ose lié par une liaison osidique avec la fonction alcool primaire de la sphingosine (figure 32). Les cérébrosides cérébraux contiennent un β -galactose (galactocérébrosides), alors que ceux des autres organes portent un β -glucose (gluco-cérébrosides). Les cérébrosides sont synthétisés à partir de sucres activés par des glucosyltransférases. Leur catabolisme dépend d'une β -galactosidase ou d'une β -glucosidase dont les déficits respectifs conduisent aux maladies de Krabbe et de Gaucher.

3-2-1-2. Les sulfatides

Les sulfatides sont des glycolipides dont l'un des résidus glucidiques est estérifié par une molécule d'acide sulfurique (figure 33). Présents dans les membranes des cellules du SNC et des reins, les

sulfatides sont synthétisés à partir d'un cérébroside neutre par une sulfotransférase et catabolisé par une arylsulfatase. Le déficit en arylsulfatase est responsable de la leucodystrophie métachromique ou maladie de Scholz.

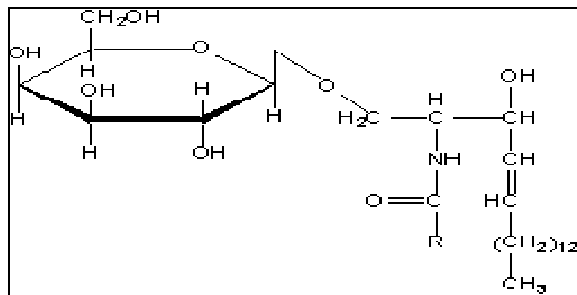


Figure 32. Formule développée d'un galactocérébroside

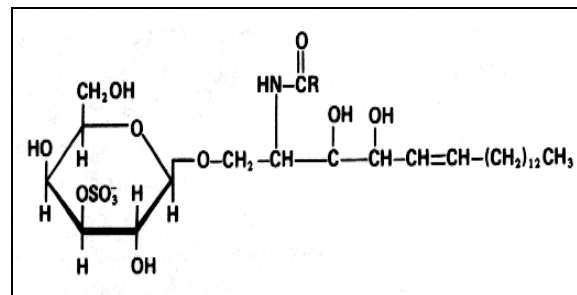


Figure 33. Formule développée d'un sulfatide

3-2-1-3. Les gangliosides

Les gangliosides constituent une famille hétérogène de glycosphingolipides acides. Particulièrement abondants dans le cerveau, ils représentent jusqu'à 10% du contenu lipidique des neurones (540, 711), ce qui suggère un rôle clef de ces lipides dans le métabolisme neuronal. Les gangliosides (figure 34) sont constitués d'un acide sialique lié à des résidus glucidiques de nature variable (glucose, galactose, *N*-acétyl-glucosamine ou -galactosamine) attachés à une base céramide (711).

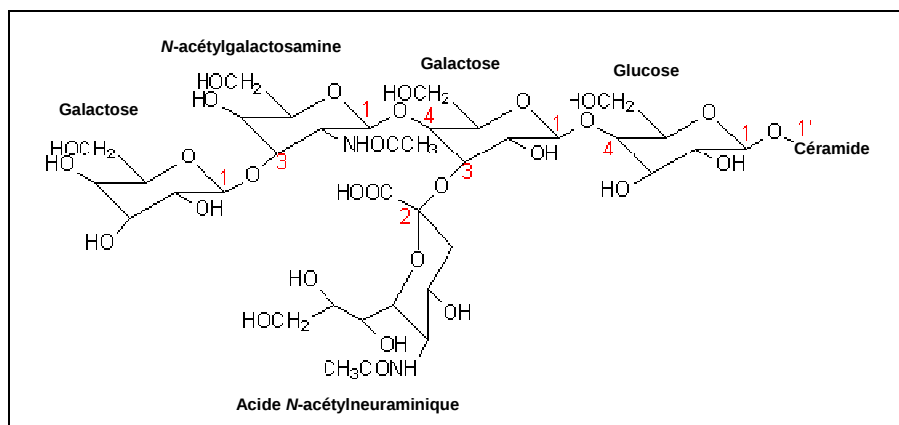


Figure 34. Formule développée d'un ganglioside, le GM₃

Après leur synthèse, les gangliosides sont transportés et incorporés dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Cette localisation est quasi exclusive et leur présence dans les endomembranes est très réduite. Au niveau de la membrane plasmique, ils se projettent dans le milieu extracellulaire (540, 711) où ils peuvent constituer des points d'ancrage pour d'autres molécules ou des analogues de récepteurs de nombreux ligands (hormones, facteurs de croissance, cytokines, toxines). Ils interviennent dans différents processus tels que les interactions intercellulaires, la différenciation et l'adhésion. Différentes études proposent aujourd'hui que ces molécules présentent des propriétés thérapeutiques, en particulier neuroprotectrices (540). Elles seraient en effet capables de moduler la

plasticité synaptique des neurones et de conduire à une régénération des cellules neuronales soumises à différentes neurotoxines (129, 540). Les mécanismes neuroprotecteurs observés après l'ajout de gangliosides exogènes n'ont pas encore été élucidés. Enfin, en raison d'un déficit d'enzymes lysosomales, l'accumulation des gangliosides peut entraîner diverses pathologies dont la maladie de Tay-Sachs.

3-2-2. Les sphingolipides

3-2-2-1. Cycle des sphingolipides

Les sphingolipides sont synthétisés et modifiés comme le décrit la figure 35 (155, 267). Les enzymes impliquées dans ces voies (sphingomyélinases, céramidases, sphingosine kinases) sont régulées par des *stimuli* physiologiques tels que les facteurs de croissance ou le stress oxydant (155). Les différentes molécules issues du métabolisme des sphingolipides régulent nombre de voies de signalisation et de processus biologiques dont la libération des neurotransmetteurs, la prolifération cellulaire ou l'apoptose (155). La production des différents sphingolipides est également impliquée dans la définition de l'architecture membranaire et dans la formation des différents microdomaines qui la composent (166).

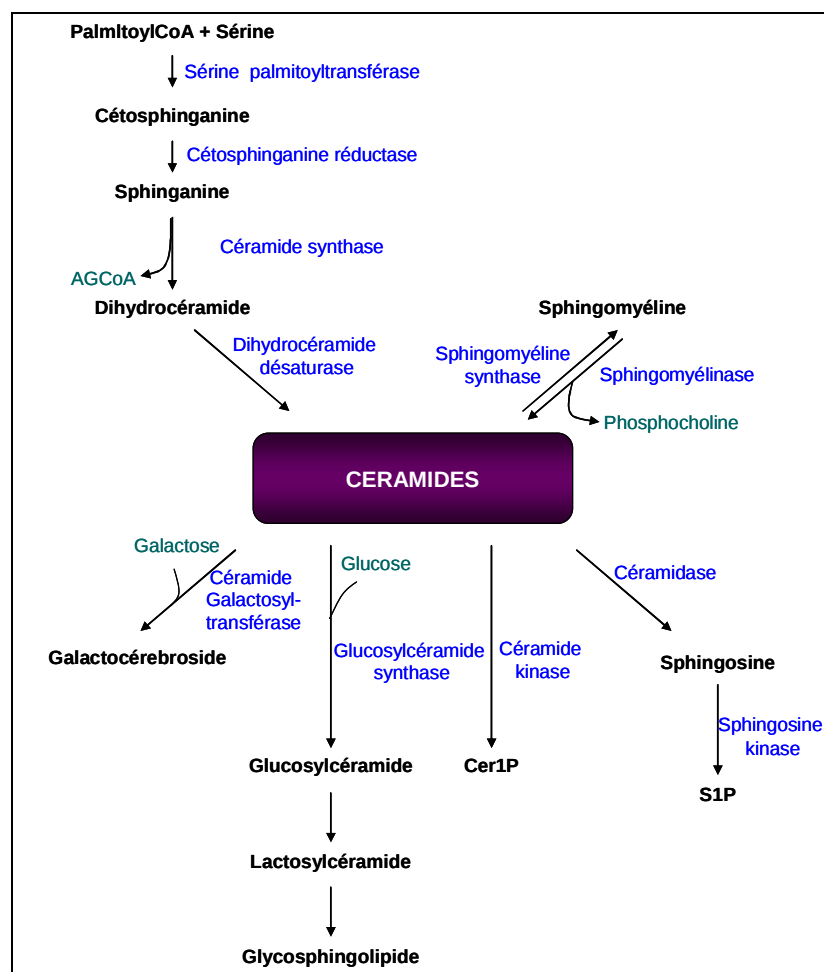


Figure 35. Métabolisme des sphingolipides
d'après Colombaioni & Garcia-Gil (155)

3-2-2-2. La sphingomyéline

La sphingomyéline (SM) est un sphingophospholipide membranaire particulièrement présent dans le SNC, puisqu'elle est le premier constituant de la gaine de myéline des axones. La SM peut être synthétisée selon 2 voies, la voie de Kennedy, associant un céramide avec la CDP-choline, et celle de Brady, dans laquelle la sphingophosphocholine est liée par une liaison amide à un AG à longue chaîne.

L'hydrolyse de la SM en céramide et phosphocholine est catalysée par les 5 formes de sphingomyélinases : la sphingomyélinase acide (a-SMase), ubiquitaire et dont le déficit entraîne la maladie de Niemann-Pick (155), la a-SMase dépendante du Zn^{2+} , présente principalement dans le sérum, la sphingomyélinase neutre (n-SMase) liée à la membrane et dépendante du Mg^{2+}/Mn^{2+} , la n-SMase indépendante du Mg^{2+}/Mn^{2+} et une SMase alcaline, exclusivement exprimée dans les cellules intestinales et activées par les sels biliaires (294, 516). Les rôles respectifs de ces différentes enzymes dans le métabolisme de la SM et dans la réponse au stress n'ont pas encore été clairement définis (155, 516). L'activation des SMases et l'accumulation des céramides fait le plus souvent suite à un stress ou à un signal pro-apoptotique (516, 680). L'accumulation des céramides pouvant également résulter de l'activation de leur voie de biosynthèse ou d'une diminution de l'activité des enzymes SM synthase, glucosylcéramide synthase ou céramidase (66, 67).

L'examen *post mortem* du cerveau de patients décédés de la MA a mis en évidence un taux bas de SM et un taux élevé de céramides, suggérant une implication de la conversion de la SM dans cette pathologie neurodégénérative (685).

3-2-2-2-1. L'activité sphingomyélinase acide

L'enzyme portant l'activité a-SMase a été purifiée à partir de différentes sources parmi lesquelles le cerveau et le placenta humains et le foie de rat (516). Elle est principalement localisée dans les lysosomes et présente un pH optimal compris entre 4,5 et 5,0 (701). Cette enzyme semble régulée *in vitro* et *in vivo* par différents paramètres physicochimiques (pH, force ionique), par divers partenaires protéiques et lipidiques (288, 701), ainsi que par les espèces réactives oxygénées et nitrées (516). L'activation des récepteurs de mort cellulaire (TNF, CD95) et en particulier les interactions entre le DED et les molécules adaptatrices FADD et TRADD semblent aussi jouer un rôle important dans l'activation des a-SMases en provoquant sa translocation à la membrane plasmique (4). Une fois transloquée, l'action de la a-SMase provoque la clusterisation des récepteurs de mort cellulaire et contribue à initier le processus apoptotique (303).

3-2-2-2-2. L'activité sphingomyélinase neutre

Décrite pour la première fois en 1967, la n-SMase dépendante du Mg^{2+} présente une expression et une activité indépendante de la a-SMase (701). L'activité n-SMase est fortement exprimée dans le cerveau et augmente au cours du développement du SNC (516). Différentes formes de n-SMase ont été identifiées. La n-SMase-1 présente une activité SMase *in vitro* qui pourrait être marginale voire

inexistante *in vivo* (648). Cette enzyme porterait, en effet, une activité 1-O-alkyl-lysophospholipide (ou Lyso-PAF, *platelet activating factor*) PLC (648). La n-SMase-2 dépendante du Mg^{2+} a récemment été identifiée à partir de tissus cérébraux de mammifères (516). Cette n-SMase est principalement localisée dans l'appareil de Golgi, mais peut aussi être associée à la membrane plasmique comme à celles du RE et du noyau (67, 133, 516).

Comme pour les a-SMases, l'activation des n-SMases a été rapportée après stimulation des récepteurs de mort cellulaire (133, 475). L'utilisation de récepteurs du TNF mutés a permis la mise en évidence de l'existence d'un domaine d'activation des n-SMases (NSD) à proximité du DED. L'interaction entre le NSD et la n-SMase est indirecte et nécessite le recrutement d'une protéine adaptatrice, le facteur associé à l'activation des n-SMases, nommé FAN (4). De nombreux rapports placent l'hydrolyse de la SM en aval de l'activation de la caspase-8 consécutive à l'activation des récepteurs de mort cellulaire, mais en amont de l'activation des caspases effectrices comme la caspase-3 (177, 475). Les céramides activeraient la caspase-3 de façon indirecte par l'activation de la cathepsine D et la formation du complexe apoptosome (figure 36). Cette activité semble modulée par différents acteurs parmi lesquels l'environnement lipidique, le stress oxydant, certaines kinases et protéases (494, 516).

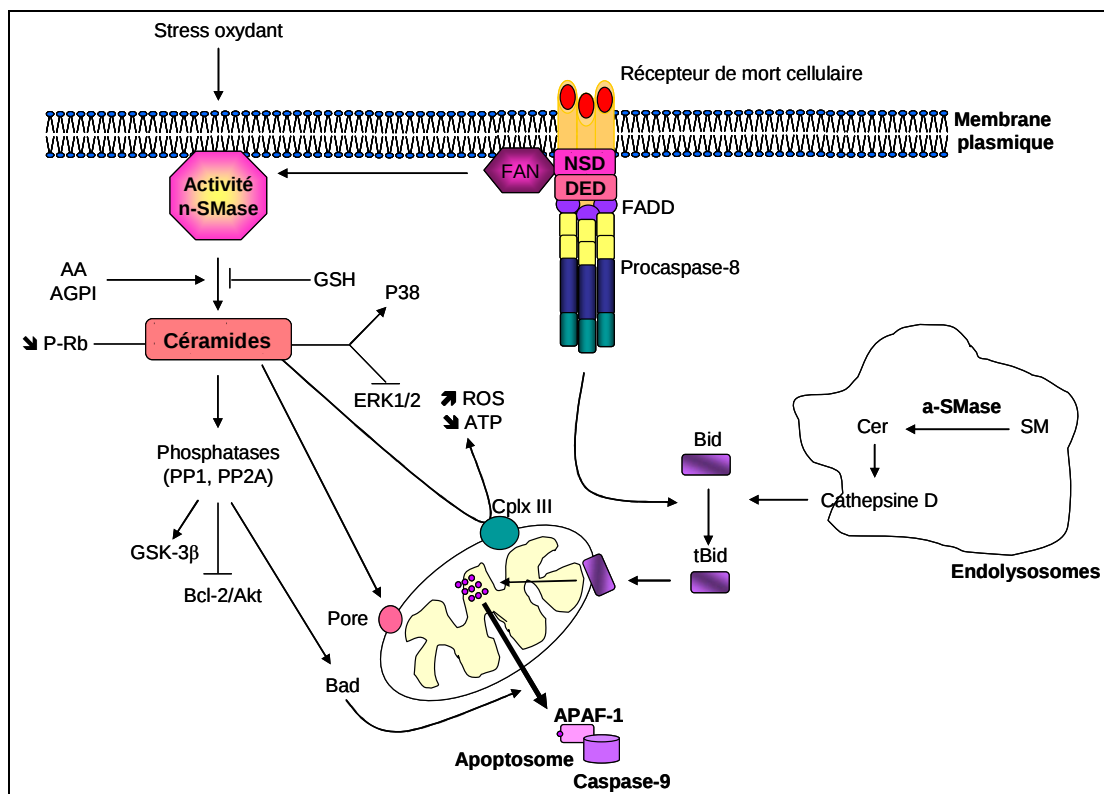


Figure 36. Implication des sphingomyélinases et des céramides dans l'apoptose

Ainsi, l'activité des n-SMases-1 et -2 est stimulée indirectement par la présence d'AA et d'AGPI *in vitro* et *in vivo* (516). Les phospholipides anioniques tels que la PS, les cardiolipines et les phosphatidylglycérols induisent l'activation de la n-SMase-2, ce qui suggère la présence d'un domaine de liaison spécifique de ces phospholipides (516). Enfin, la présence de céramides exogènes est

également capable d'induire l'activation des n-SMases *in vivo* (378). De nombreux rapports font en outre état d'un lien étroit entre l'activation des n-SMases et le stress oxydant, en particulier au niveau membranaire (522). Ainsi, le niveau de glutathion réduit semble influencer l'activité des n-SMases *in vitro* et *in vivo* (494). La surexpression de l'enzyme antioxydante glutathion peroxydase, de même que l'ajout d'ubiquinone ou de coenzyme Q10, induisent une diminution de l'hydrolyse de la SM en céramide en inhibant la formation des ERO (21). À l'inverse, le traitement des cellules par des donneurs d'oxyde nitrique conduisent à une augmentation de l'activité n-SMase (21).

3-2-2-3. Les céramides

Les céramides sont principalement issues du catabolisme de la SM, mais ils peuvent aussi être synthétisés *de novo* dans le RE et la mitochondrie (figure 36) (66). Après synthèse, les céramides peuvent rejoindre l'appareil de Golgi et être glycosylés pour former les glycosphingolipides complexes, phosphorylés pour générer les céramides-1-phosphate (Cer1P) ou être métabolisés en SM par la SM synthase. Leur catabolisme par les céramidases donne naissance aux sphingosines qui interviennent également comme des médiateurs cellulaires. Trois types de céramidases ont été identifiés chez les mammifères : les céramidases acides, principalement présentes dans les lysosomes, les céramidases neutres/alcalines, situées dans les mitochondries, la membrane nucléaire et le RE, et enfin les céramidases alcalines de l'appareil de Golgi et du RE (66, 222). Les céramidases neutres/alcalines sont aussi capables de catalyser la formation de céramides à partir de sphingosine et d'AG libres (66, 222).

3-2-2-3-1. Effet pro-apoptotique et antimittotique des céramides

L'effet des céramides dépend du type de la cellule, de son stade de développement et de la dose de céramides auxquels elle a été exposée. En général, une faible dose de céramide induit une protection des cellules, alors que de fortes doses constituent un signal pro-apoptotique *in vitro* (295, 372). Les céramides induisent l'apoptose des neurones hippocampiques, des neurones du mésencéphale, des cellules sensorielles, des cellules PC12 différenciées en neurones et des oligodendrocytes (155). Aucun effet n'a été rapporté sur la différenciation ou la survie d'autres types cellulaires telles que les neurones du système sympathique, les motoneurones, les cellules de Purkinje et les cellules de neuroblastomes (155, 372).

Les céramides interviennent sur les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose en régulant l'activité de nombreux partenaires protéiques (155, 225). Ils peuvent notamment se lier et modifier l'activité de la cathepsine D, une protéase à acide aspartique d'origine endolysosomale ayant entre autres pour substrat la protéine Bid (341). Le clivage de Bid conduit à sa translocation vers la membrane mitochondriale et à l'induction d'une cascade résultant en la libération du cyt-c et la formation de l'apoptosome (figure 36). Ainsi, différents auteurs ont rapporté une activation de la caspase-3 suite à une augmentation intracellulaire du taux de céramides (341, 475). Par ailleurs, la production des céramides influence l'activité de diverses kinases, dont cRaf, ERK1/2, p38, PKC (225, 341, 702), et phosphatases,

dont PP1 et PP2A reconnaissant comme substrats les protéines Bcl-2, Akt, Rb, PKC α , c-Jun et des protéines riches en résidus arginyle et sérile (593, 702). La déphosphorylation de Bcl-2 et Akt par la phosphatase PP2A conduit à la perte de la fonction anti-apoptotique alors que celle de la protéine du rétinoblastome (Rb) induit l'arrêt de la croissance cellulaire (702). La production des céramides régule également la protéine cPLA₂, impliquée dans la mise en place des processus inflammatoires.

Outre les interactions avec les différents partenaires protéiques, la production de céramides induite lors d'un signal pro-apoptotique, en particulier celle des céramides issus de la synthèse *de novo* mitochondriale et endoplasmique, conduit à de nombreuses perturbations de ces organites (66, 67). Parmi ces perturbations, citons la rupture de l'homéostasie calcique de la mitochondrie et du RE, la perturbation des protéines impliquées dans la chaîne respiratoire, avec en particulier l'inhibition du complexe III responsable d'une augmentation de la génération des espèces réactives et d'une diminution du niveau d'ATP (32, 66, 67, 272).

L'induction des SMases a pour conséquence leur translocation dans les microdomaines membranaires et donc la perturbation de l'architecture de la membrane plasmique et des endomembranes liée à la modification des microdomaines membranaires riches en sphingolipides (83). En effet, la conversion de la SM en céramide modifie les microdomaines riches en céramides hautement fusogènes et capables de se clusteriser pour former de grandes plateformes de signalisation cellulaire riches en céramides (427). Ces dernières, stabilisées par une forte compaction des chaînes hydrocarbonées et une exclusion des molécules de cholestérol, permettent le regroupement sélectif de partenaires protéiques et l'induction en conséquence de voies de transduction (303). Par ailleurs, les céramides forment des mégapores dans la membrane mitochondriale externe par lesquels sont libérés des composants apoptogènes (66, 67, 680) impliqués dans la cascade pro-apoptotique.

Les céramides modulent l'expression de gènes impliquées dans la différenciation, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou les mécanismes inflammatoires tels que les gènes codant la COX2, le facteur de croissance neurotrophique NGF, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau BDNF, la proenkephaline et certaines interleukines telles que IL-6 (225, 516, 593). La régulation de l'expression de ces gènes repose sur l'activation de facteurs de transcription tels que AP1, CREB, NF- κ B ou la protéine Rb (45, 182). La diminution de la phosphorylation de Rb induite par l'augmentation des céramides entraîne le passage des cellules en phase quiescente (609).

3-2-2-3-2. Effets anti-apoptotiques des céramides-1-phosphate

L'action de la céramide kinase convertit les céramides, molécules pro-apoptotiques, en Cer1P, molécules bioactives capables de promouvoir la prolifération cellulaire, de bloquer l'apoptose et de réguler les processus inflammatoires (130, 289, 593). L'effet anti-apoptotique des Cer1P est principalement lié à leur capacité à inhiber la α -SMase et à promouvoir les voies de survie cellulaire, en particulier la voie PI3K/Akt (289). Chalfant & Spiegel (130) suggèrent par ailleurs que la génération de Cer1P conduise à une inhibition des phosphatases PP1/PP2A impliquées dans la toxicité

induite par les céramides (figure 36). L'action anti-inflammatoire de ce composé serait quant à elle liée à un mécanisme de recrutement et d'inhibition de la cPLA₂, responsable de la libération de l'AA, première étape de la formation des eicosanoïdes (130, 593).

3-2-2-3. Céramides et maladie d'Alzheimer

Les études réalisées sur des membranes neuronales isolées ont mis en évidence que les régions présentant les différentes lésions caractéristiques de la MA ou ayant subi une ischémie sont également associées à une diminution du taux de SM au profit d'une augmentation du taux de céramides (175, 324). De récentes études proposent que l'interaction des peptides amyloïdes avec la membrane neuronale induise un stress oxydant à la membrane et active la PLA₂, concourant à l'activation des SMases et la production de céramides (310, 513). Cette production a pour conséquences d'une part la mort neuronale et la perte synaptique caractéristiques de la MA (175, 310, 522), et d'autre part la stabilisation et l'activation de la protéine BACE (608).

3-2-2-4. Les sphingosines

3-2-2-4-1. La sphingosine

La sphingosine est uniquement issue du métabolisme de la SM et ne peut être synthétisée *de novo*. Cette molécule qui présente des propriétés pro-apoptotiques, principalement liées à l'inhibition de la PKC (130), est située à un carrefour entre la voie des céramides à partir desquels elle est générée et la voie anti-apoptotique de la sphingosine-1-phosphate (S1P). La régulation des enzymes situées en amont (céramidases) et en aval (sphingosine kinase) de ce composé détermine donc pour une grande part le devenir de la cellule (101, 509, 586).

3-2-2-4-2. La sphingosine-1-phosphate

La sphingosine issue du catabolisme des céramides peut être phosphorylée par la sphingosine kinase présente dans le cytosol et le RE (574) pour générer la S1P, un agent présentant des propriétés anti-apoptotiques (176, 586, 693). Le niveau de S1P est étroitement contrôlé au sein de la cellule et dépend de l'équilibre entre la synthèse par la sphingosine kinase et la dégradation par une pyridoxalphosphatase endoplasmique ou une phosphohydrolase. La surexpression des enzymes capables de dégrader S1P diminue le taux de S1P au profit d'une augmentation du niveau de céramides favorisant ainsi les cascades pro-apoptotiques (176, 586, 693). S1P peut intervenir en tant que premier ou second messager (586).

3-2-2-4-2-1. Fonction de premier messager

S1P est le ligand d'une famille de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), nommés respectivement EDG₁/S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄, S1P₅, différemment exprimés dans les tissus, couplés à diverses protéines G et dont l'activation a pour conséquence la régulation de voies de survie cellulaires

présentées par la figure 37 conduisant, entre autres, à une activation de la prolifération et de la migration cellulaires et à une inhibition de l'apoptose (176, 725).

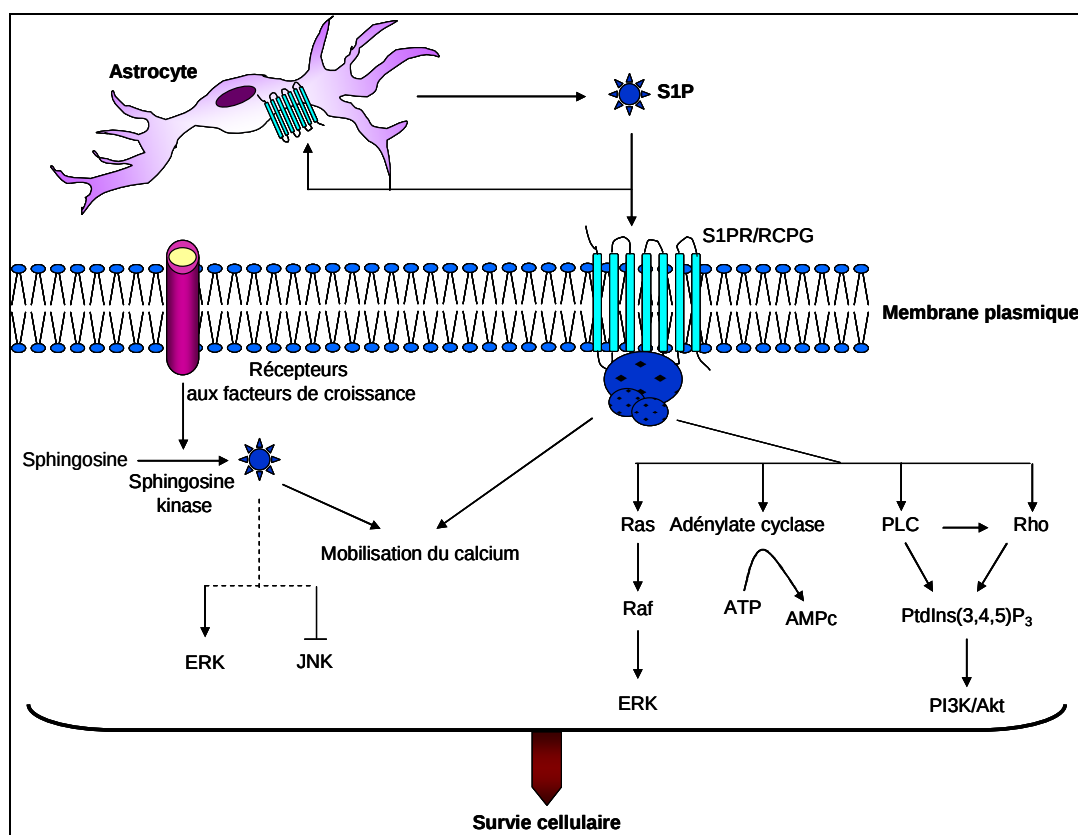


Figure 37. Implication de S1P dans les principales voies de survie cellulaire

À ce jour, peu d'études relatent l'importance du facteur S1P dans le SNC. Toutefois, il a pu être établi que les neurones et les cellules gliales expriment 2 récepteurs, S1P₂ et S1P₅, sur lesquels la fixation du ligand a pour conséquence l'activation des voies de survie cellulaire menant à la neurogenèse et à l'inhibition de l'apoptose (328).

3-2-2-4-2-2. Fonction de second messenger

Divers facteurs de croissance et cytokines dont le facteur PDGF de croissance dérivé des plaquettes, le NGF, le facteur EGF de croissance épidermique et le TNF- α connus pour leur impact sur la différenciation et la survie cellulaire, induisent une augmentation de l'activité sphingosine kinase (573, 693). Les cibles et les mécanismes moléculaires impliqués sont encore mal connus. Toutefois, la micro-injection de S1P dans des fibroblastes induit une mobilisation du calcium intracellulaire et une augmentation de la synthèse d'ADN (595). Par ailleurs, la génération de S1P conduit à une stimulation de la voie des MAP kinases et à une inhibition de la voie pro-apoptotique des Jun kinases, soit un effet opposé à celui des céramides (176). L'équilibre céramide/sphingosine serait donc déterminant pour la cellule (586). Enfin, la S1P inhibe l'action de la α -SMase et donc la production de céramides dans les macrophages, favorisant la survie cellulaire et protégeant contre l'apoptose (288).

3-2-2-5. Les autres métabolites

De nombreux auteurs suggèrent aujourd'hui l'existence de cibles intracellulaires pour les autres molécules issues du métabolisme des sphingolipides. Ainsi, la sphinganine, la sphingosylphosphorylcholine et les glucosylcéramides seraient également capables d'intervenir sur les différentes voies de signalisation cellulaire (101, 326).

L'ensemble des travaux réalisés à ce jour sur le métabolisme des sphingolipides montrent que la SM est le précurseur d'une famille de molécules bioactives en équilibre les unes avec les autres et dont les proportions respectives régissent la signalisation cellulaire et le devenir de la cellule.

3-3. Les phospholipides

3-3-1. Métabolisme des phospholipides

Les phospholipides sont les constituants majeurs des membranes. Ils constituent 20 à 25% du poids sec du cerveau adulte où ils sont majoritairement représentés par les 1,2-diacylglycérophospholipides, les plasmalogènes, les 1-alkyl,2-acylglycérophospholipides, les acides phosphatidiques et la SM. La composition en phospholipides des différentes zones du cerveau est variable. Les phospholipides neuronaux sont principalement synthétisés dans le RE, bien que les PC et PI soient également synthétisés dans l'appareil de Golgi (234). La mitochondrie, elle, synthétise son propre pool d'acide phosphatidique, lequel sert de précurseur à la synthèse des phospholipides mitochondriaux et en particulier de la carnitine (235). Les phospholipides synthétisés sont alors transportés vers la membrane par une protéine d'échange des phospholipides (749). Les phospholipides sont dégradés par les phospholipases, les lysophospholipases et les lipases (234, 235) intervenant lors du transport des phospholipides et après incorporation dans la membrane plasmique. La phospholipase A₁ catalyse l'hydrolyse de la liaison ester située en position *sn-1* et conduit à la formation d'un AG libre et d'un 2-acyl-lysophospholipide. La PLA₂ clive la liaison ester en *sn-2* et libère un AG, le plus souvent l'AA, et un 1-acyl-lysophospholipide qui peut être acylé de nouveau par un acyl-CoA en présence d'une acyltransférase. Alternativement, le lysophospholipide formé peut être clivé par une lysophospholipase pour libérer un AG libre et le squelette glycérol phosphorylé. La PLC hydrolyse la liaison phosphodiester en *sn-3* conduisant à la formation de diacylglycérol (DAG) et d'un AG phosphorylé. Enfin, la PLD clive les phospholipides après l'acide phosphatidique (figure 38). Ces 4 enzymes ont pu être purifiées et caractérisées dans les tissus cérébraux. *In situ*, ces enzymes interviennent sous différentes formes et de façon non interchangeable (234, 235). L'activation de ces enzymes conduit à la formation de seconds messagers lipidiques. Ainsi, la formation de DAG par la PLC permet l'activation de la PKC. De même, l'activation de la PLA₂ libère de l'AA, précurseur d'une famille de facteurs autocrines, les eicosanoïdes, et un lysophospholipide (234).

Les phospholipides peuvent subir des processus rapides de déacylation et de réacylation, impliquant la présence de PLA₂ et d'acyltransférases assurant les échanges permanents d'AG entre les

différentes classes de phospholipides (234). Ces cycles constituent un mécanisme de préservation de la membrane neuronale et contrôlent l'équilibre entre AG libres et estérifiés. En effet, des niveaux élevés d'AG insaturés libres induisent une déstabilisation de la membrane cellulaire, un stress oxydant et éventuellement la mort cellulaire, alors que la réacylation de ces AG dans les phospholipides membranaires restaure l'intégrité membranaire et assure la survie de la cellule (235). Les perturbations du métabolisme phospholipidique jouent un rôle clef lors des phénomènes apoptotiques en conduisant d'une part à des dommages membranaires et d'autre part à la génération de molécules bioactives issues notamment du métabolisme des AG libérés.

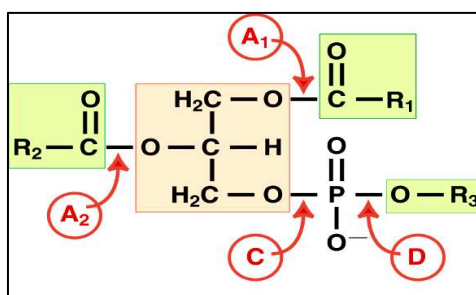


Figure 38. Site de clivage des différentes phospholipases

3-3-2. Les acides gras

Les AG sont de longues chaînes hydrocarbonées comportant une fonction acide. Rarement libres, ils sont le plus souvent sous forme estérifiée comme constituants majeurs des lipides complexes tels que les triglycérides et les phospholipides. Les glycérides sont des esters de glycérol peu présents au niveau de la membrane plasmique. Ils se concentrent dans des vacuoles de réserve à l'intérieur du cytoplasme. Leur hydrolyse au niveau de la membrane plasmique par la PLC conduit à la formation de DAG. Les AG peuvent être classés en 2 catégories selon leur propriétés physicochimiques : les AG saturés, le plus souvent solides à température ambiante, et les AG insaturés, liquides à température ambiante, eux-mêmes répartis en 2 sous groupes, les AG mono-insaturés présents notamment dans l'huile d'olive et les AGPI, retrouvés dans les huiles de maïs, de colza, de noix et de poissons. Les AGPI sont distingués selon la position des doubles liaisons sur la chaîne hydrocarbonée. La notation ω ou n indique le numéro du carbone qui porte la première insaturation. Ainsi, la famille des AGPI $\omega 3$ ou $n-3$ regroupe tous les AG qui présentent une première liaison insaturée au niveau du carbone 3.

3-3-2-1. Métabolisme des acides gras

Parmi les AG apportés par l'alimentation, 85% sont absorbés au niveau de l'intestin grêle et assemblés pour former des chylomicrons, une classe de lipoprotéines circulantes de grande taille, ainsi que des LDL et VLDL stockés au niveau du foie. La présence d'apolipoprotéines à la surface de ces particules facilite leur reconnaissance par les lipases dont l'action libère les AG. À ce jour, le mécanisme précis d'incorporation des AG au niveau cellulaire est encore indéterminé. Deux hypothèses non exclusives ont été avancées : (i) la diffusion passive des AG libres à travers la bicouche phospho-

lipidique, (ii) un mécanisme impliquant un transporteur membranaire. Certains auteurs ont suggéré l'existence d'un transporteur saturable pour les AGPI à longue chaîne (AGPI-lc). Différentes protéines candidates ont été proposées pour ce rôle, dont la protéine CD36 ou la cavéoline (396). Outre leur incorporation dans la cellule, les AG peuvent être libérés par des phospholipases ou synthétisés *de novo* (figure 39).

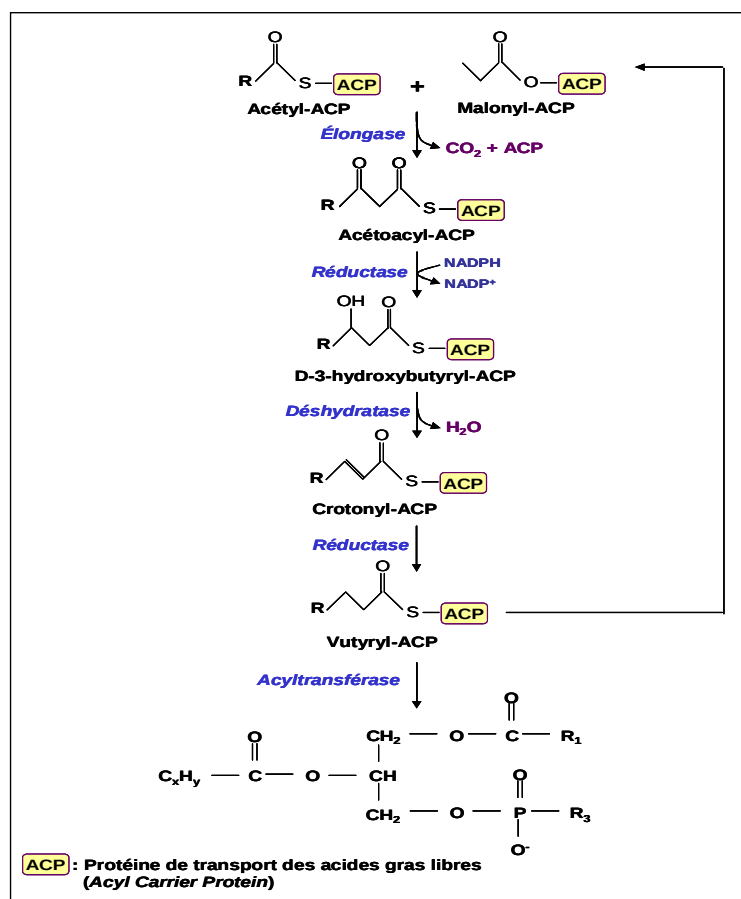


Figure 39. Synthèse *de novo* des acides gras

La machinerie enzymatique présente dans les cellules de mammifères ne peut pas introduire de double liaison en *n*-6 et *n*-3. En conséquence, l'acide linoléique (AL ; C18:2 *n*-6) et l'acide linoléique (ALA ; C18:3 *n*-3) sont dit essentiels car leur présence dépend directement de l'apport alimentaire. Une fois incorporé dans les cellules, AL est converti en acide γ -linoléique, lui-même métabolisé en AA (C20:4*n*-6), précurseurs des eicosanoïdes. ALA est lui converti en acide eicosapentaénoïque (EPA ; C22:5 *n*-3), puis en DHA (C22:6 *n*-3) après élongation, désaturation et β -oxydation (figure 40).

Les neurones sont incapables de réaliser la synthèse du DHA *de novo* et doivent donc utiliser le DHA apporté par l'alimentation ou synthétisé à partir des précurseurs par le foie, l'endothélium cérébral, ou les astrocytes (768). La proportion de DHA issue de la synthèse astrocytaire est très minoritaire par rapport à celle provenant du plasma. Le turnover du DHA implique un cycle de désacétylation – réacétylation relativement long dans le cerveau. Ainsi, de 2 et 8% du DHA des phospholipides cérébraux de rat sont renouvelés chaque jour à partir du pool de DHA libre (615). Les

neurones incorporent le DHA libéré dans le milieu extracellulaire par les capillaires et les cellules gliales.

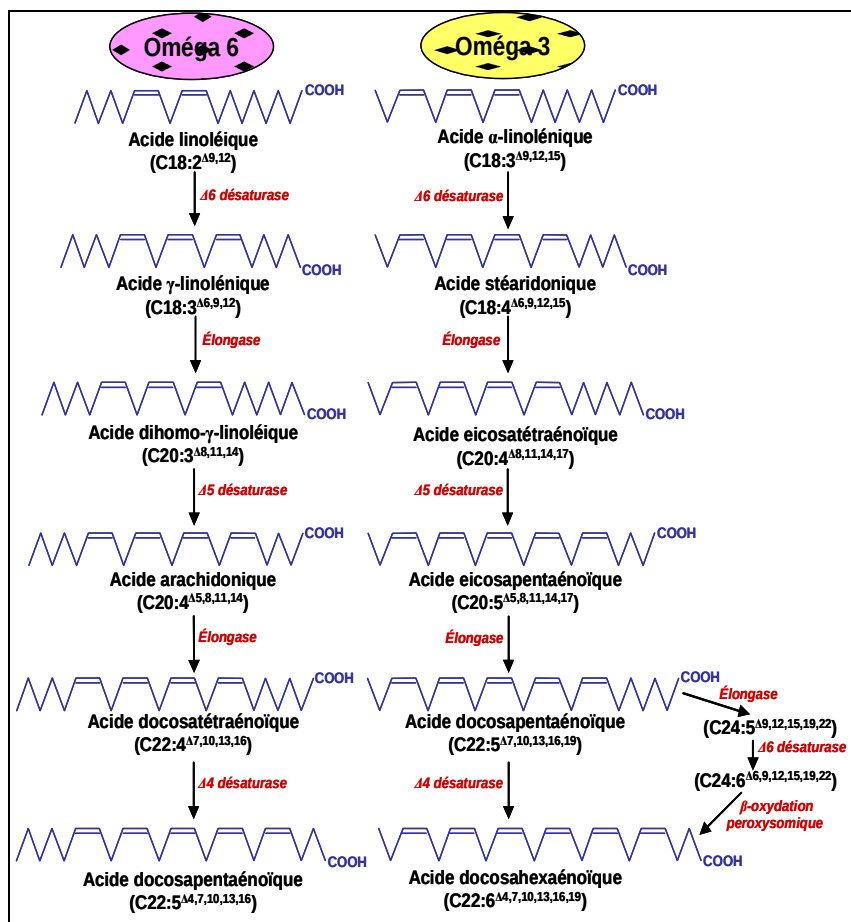


Figure 40. Synthèse des acides gras des séries ω6 et ω3

Les AG libres sont convertis en thioesters d'acylCoA par une acylCoA synthétase. Ils peuvent alors soit être séquestrés par une protéine ACP de fixation de l'acyl-CoA (296), soit participer à différentes voies métaboliques comme la formation de dérivés bioactifs tels que les eicosanoïdes, la modulation de la transcription des gènes ou l'incorporation sous forme de lipides complexes (641).

3-3-2-2. Les acides gras, molécules essentielles du système nerveux central

3-3-2-2-1. Développement du système nerveux central et des fonctions cognitives

Au cours du dernier trimestre de la vie embryonnaire et des 2 premières années de l'enfance, le cerveau subit une croissance rapide nécessitant l'apport ou la synthèse de nombreux nutriments parmi lesquels les AGPI-lc et en particulier le DHA. Les AGPI représentent environ 35% du contenu lipidique du cerveau et sont concentrés dans les membranes des neurones et des cellules de la rétine où ils assurent le maintien de l'intégrité et de la structure membranaires (359, 476, 789). Bien que les systèmes enzymatiques permettent au fœtus et au nourrisson de convertir l'ALA en DHA (119, 647), le SNC acquiert prioritairement le DHA par transfert de la mère à l'enfant à travers le placenta ou par

allaitement (215, 320). L'apport minimal nécessaire est de 2 à 4% des AG totaux pour l'AL et de moins de 1% des AG pour l'ALA (371), un besoin très largement couvert par le lait maternel (383). Une alimentation inadéquate du nourrisson pourrait induire des troubles neurologiques, visuels et cognitifs (68, 342, 455). Une diminution de l'acuité visuelle a été observée *in vivo* chez des rats et des primates dont l'alimentation est appauvrie en DHA (57, 563). Il en est de même chez les nourrissons, en particulier chez les enfants prématurés carencés en $\omega 3$ (68), les symptômes observés étant réversibles par supplémentation nutritionnelle (120, 270, 367, 731). Les travaux de Birch *et al.* (68, 69) et ceux de différentes méta-analyses (731) suggèrent qu'une supplémentation en AGPI durant l'enfance permettrait l'acquisition d'une acuité visuelle et de capacités cognitives supérieures (527, 629). La supplémentation des laits infantiles en DHA est aujourd'hui pratiquée dans une quarantaine de pays (527). Toutefois, les premiers essais de supplémentation des nourrissons présentent des résultats contradictoires, probablement liés aux tests visuels et cognitifs utilisés et en raison d'une variabilité individuelle (342). Néanmoins, la structure cérébrale analysée par imagerie RMN n'a montré aucune différence entre les nourrissons supplémentés en DHA et en AA et ceux nourris avec une alimentation classique (740).

La supplémentation en AGPI a aussi été proposée pour prévenir les troubles de comportement et les pertes cognitives associées à certaines maladies neurodégénératives. En effet, le déficit en AGPI-lc et plus particulièrement en DHA, est impliqué dans des troubles tels que la schizophrénie, l'hyperactivité ou la dépression, ainsi que dans la MA (398). Le maintien d'un niveau optimal d'AGPI dans les membranes pourrait donc présenter un intérêt préventif.

3-3-2-2. Importance des acides gras dans le maintien de l'intégrité membranaire

3-3-2-2-1. Impact de l'organisation moléculaire des acides gras sur la membrane

En raison de la compaction des chaînes hydrocarbonées les unes sur les autres selon une configuration *trans*, les AG saturés adoptent une conformation linéaire dans l'espace (figure 41A). De ce fait, les membranes riches en AG saturés présentent un caractère organisé, comparable à une phase liquide ordonnée l_o . En revanche, les AG insaturés adoptent des conformations spatiales complexes imposées par les insaturations (figure 41B).

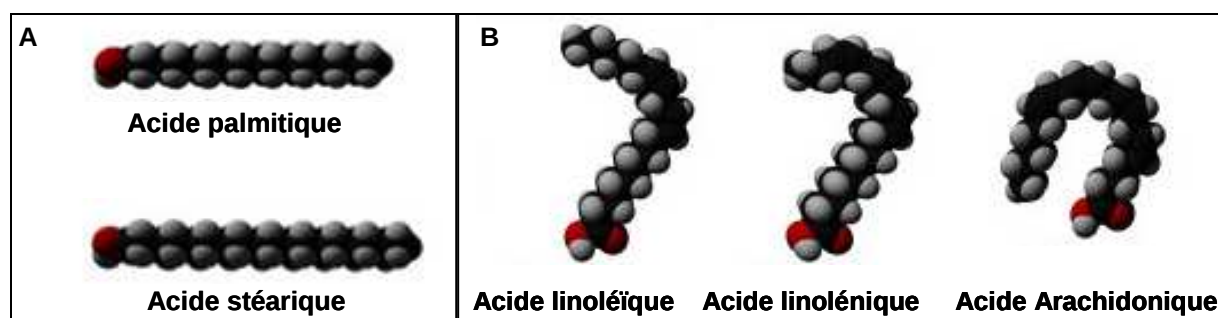


Figure 41. Modèle compact de la structure d'acides gras
A, saturés ; B, insaturés

Le DHA (C22:6) est l'AG le plus long et le plus insaturé des systèmes biologiques communs. De nombreuses études de modélisation moléculaire ont été réalisées afin de connaître la conformation du DHA dans l'espace et donc son influence sur la structure membranaire. Le modèle le plus réaliste, basé sur des simulations en minimisation d'énergie est présenté par la figure 42. Il fait apparaître une structure dynamique adoptant alternativement 4 conformations dans l'espace (237).

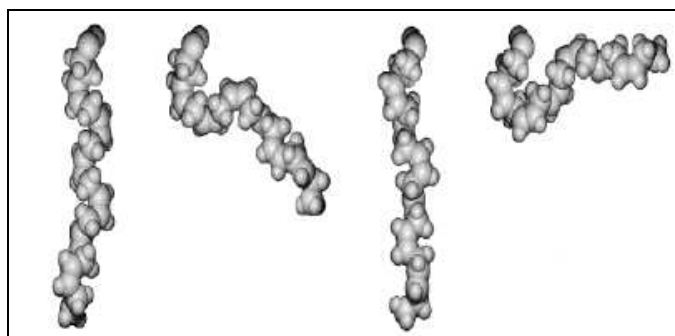


Figure 42. Conformations tridimensionnelles adoptées par le DHA
d'après Feller *et al.* (237)

Ainsi, à l'inverse des membranes riches en AG saturés, les membranes modèles contenant des AGPI-*lc* se distordent en raison de l'encombrement stérique et de la réorientation rapide des chaînes hydrocarbonées (539). Cette distorsion conduit à une transition vers une phase liquide désordonnée (l_d) et une légère augmentation de l'épaisseur de la membrane (699, 700). Les résultats obtenus sur membranes biologiques sont plus controversés, probablement en raison de leur complexité et de leur variabilité (539, 699). Toutefois, nombre de travaux réalisés sur bicouches lipidiques *in vitro* ou *in vivo* indiquent qu'un enrichissement en AGPI, en particulier en DHA, induirait une augmentation de la perméabilité membranaire due à une diminution du caractère compact de la membrane (539, 699). Le « desserrement » de certaines régions membranaires faciliterait ainsi le passage par diffusion facilitée de solutés de faible masse moléculaire. La perte de compacité de la membrane pourrait également résulter d'une augmentation de l'hydratation de la bicouche lipidique membranaire liée à l'augmentation du nombre d'insaturations après incorporation du DHA (539).

Les membranes naturellement enrichies en DHA (neurones, synaptosomes, spermatozoïdes) sont caractérisées par leur capacité à former des vésicules ou à fusionner. En effet, les distorsions membranaires imposées par les AGPI ainsi que la formation de segments de membrane en phase inverse (figure 43) augmentent le caractère déformable de la membrane (224, 699). Ainsi, l'ajout de DHA sous forme libre ou sous forme de PC (18:0 ; 22:6) augmente le caractère fusogène des petites vésicules unilamellaires alors que l'ajout d'acide stéarique ou d'ALA n'affecte pas ce paramètre (221). Enfin, Armstrong *et al.* (30) ont démontré qu'en augmentant la fluidité membranaire, les AGPI facilitent les mouvements des PL.

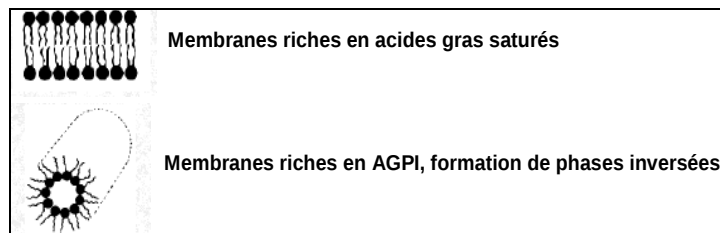


Figure 43. Formation d'une phase inversée dans une membrane riche en AGPI-lc

3-3-2-2-2. Impact de la composition membranaire sur l'activité des protéines associées

La composition en AG des phospholipides membranaires dicte les propriétés physicochimiques de la membrane et, en conséquence, l'environnement dans lequel évoluent les protéines associées (539). Ainsi, le DHA interagit avec les canaux ioniques K^+ et Zn^{2+} (603), tandis que la composition en AGPI module la liaison de certains ligands à leurs récepteurs (400). D'autres études ont décrit que les AGPI peuvent moduler les ATPases Na^+/K^+ , les ATPases Ca^{2+}/Mg^{2+} , certains canaux calciques, l'activité de la cholestérol acyltransférase, de l'ubiquinone cyt-c réductase mitochondriale, du récepteur à l'insuline, de la phosphocholine cytidyltransférase, des PLA_2 , des récepteurs GABA, de la PLC, ainsi que la libération des neurotransmetteurs ou encore le transport des acides aminés (699).

3-3-2-3. Impact d'une supplémentation en DHA

Dans les membranes riches en DHA telles que les membranes synaptiques, celles des spermatozoïdes, et des cellules rétinienne, l'enrichissement par une supplémentation est un objectif difficile à atteindre, le taux de DHA étant déjà de 30 à 35% des AG totaux (699). La supplémentation alimentaire à base d'huile de poisson accroît de 2 à 10 fois les teneurs en DHA d'autres tissus (625). Le DHA est incorporé rapidement en priorité au niveau des phospholipides de la membrane plasmique et des membranes mitochondriales (699). Cet enrichissement n'est pas uniforme dans toutes les classes de PL. À titre d'exemple, l'addition de DHA dans le milieu de culture de cellules tumorales conduit à une incorporation préférentielle du DHA dans la PE, dans une moindre mesure dans la PC et enfin minoritairement dans les autres classes de phospholipides (625, 699). Dans de nombreuses cellules, la PE, concentrée dans le feuillet interne de la membrane plasmique, semble être le premier « récepteur » du DHA (699). Malgré tout, dans certaines membranes et en particulier les membranes synaptiques, le DHA est préférentiellement incorporé dans la PS.

3-3-2-3. Les acides gras, précurseurs de composés bioactifs

De nombreuses études ont rapporté un effet potentiellement bénéfique des AGPI-lc sur le développement et la prévention des cancers, ainsi que dans différentes pathologies caractérisées par une réponse inflammatoire dont les pathologies cardiovasculaires, l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, le lupus, les pathologies respiratoires, le psoriasis et la MA (359, 699). L'impact des AGPI sur ces pathologies s'explique en partie par le fait que certains d'entre eux sont capables de générer des familles de

molécules bioactives impliquées dans la mise en place et/ou la régulation du processus inflammatoire (354, 662).

3-3-2-3-1. L'acide arachidonique

L'AA (C20:4, *n*-6) est le précurseur d'une famille de molécules régulatrices, les eicosanoïdes, qui exercent leurs effets localement de façon autocrine, sur la cellule sécrétrice, ou paracrine, sur les cellules adjacentes (642). Les eicosanoïdes comprennent les thromboxanes (THX), les prostaglandines (PG) et les leucotriènes (LT). Toutes les cellules de mammifères, à l'exception des érythrocytes, produisent ces facteurs à partir de l'AA et minoritairement à partir de son précurseur l'acide dihomog- γ -linoléique. Les eicosanoïdes sont synthétisés selon 2 cascades enzymatiques : la voie cyclique, qui donne naissance aux THX et aux PG, et la voie linéaire, qui conduit aux LT (figure 44). Les enzymes qui interviennent dans la libération ou la réacylation de l'AA sont étroitement régulées (234, 642). Une dérégulation de la libération de l'AA et de la synthèse des eicosanoïdes, en particulier des PG2 et LT4, a été impliquée dans différentes pathologies dont l'athérosclérose, les pathologies cardiovasculaires, le cancer et la MA.

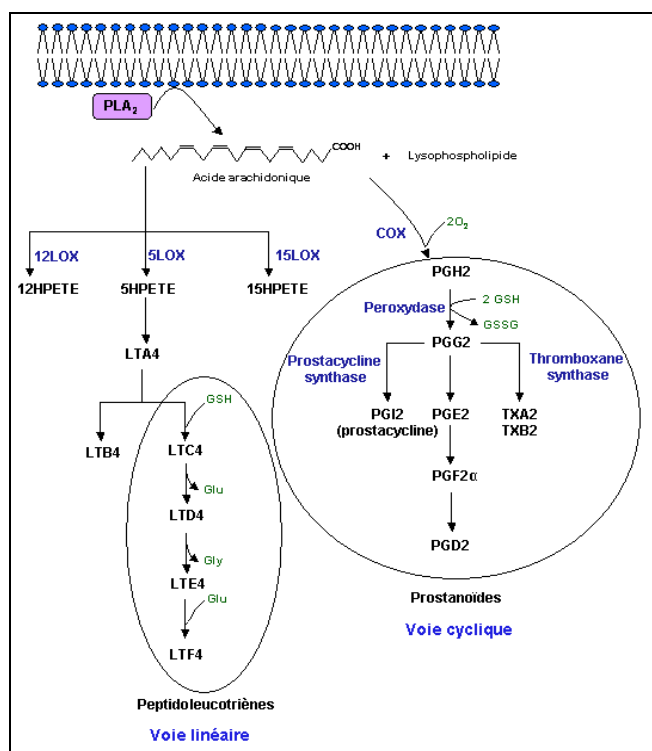


Figure 44. Biosynthèse d'eicosanoïdes à partir de l'AA

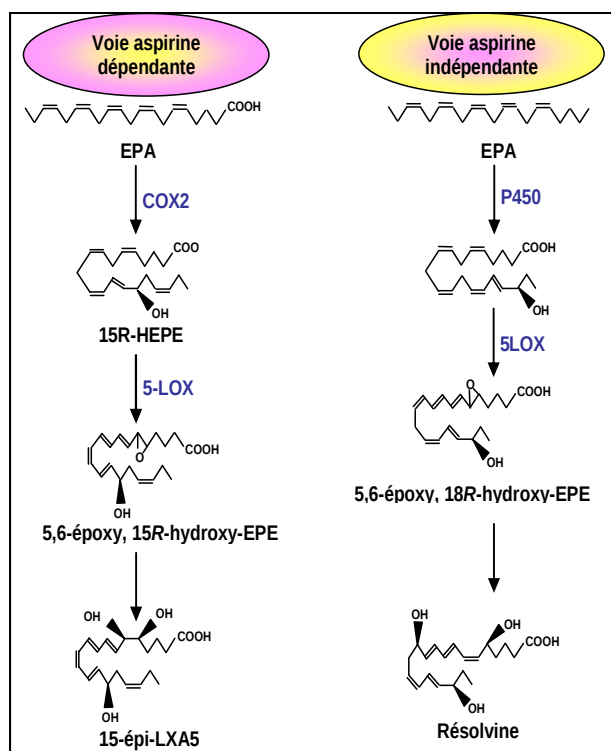


Figure 45. Biosynthèse d'eicosanoïdes à partir de l'EPA

3-3-2-3-2. L'acide eicosapentaénoïque

Bien que de nombreuses études épidémiologiques soulignent le potentiel protecteur de l'EPA dans les maladies inflammatoires (662), les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas encore été clairement définis. Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène : d'une part, la diminution de la conversion de l'AA en eicosanoïdes par un mécanisme d'inhibition compétitive (164)

et, d'autre part, la génération de molécules antagonistes aux prostanoïdes et LT (662). L'EPA n'est pas un compétiteur fort de l'AA et n'est qu'un précurseur mineur de certains eicosanoïdes parmi lesquels les PG3 et les LT5 qui présentent un rôle de régulation du processus inflammatoire. En revanche, de récentes analyses ont montré que cet AG est à l'origine d'une famille de molécules bioactives capables d'intervenir dans la résolution des processus inflammatoires, les résolvines (354, 515, 662). Les résolvines (*resolution phase interaction products*) sont générées par 2 voies métaboliques présentées par la figure 45. La première voie dépend de l'administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien tel que l'aspirine, capable de bloquer l'activité de la COX1 et donc de favoriser la formation d'eicosanoïdes par la COX2 (29). La seconde voie fait intervenir une monooxygénase dépendante d'un cytochrome P450, présente dans la flore bactérienne ou dans les tissus. Une fois formées, les résolvines sont capables de limiter l'infiltration par les polymorphonucléaires et de bloquer la production de cytokines pro-inflammatoires (354, 662).

3-3-2-3-3. L'acide docosahexaénoïque, précurseur des docosatriènes

Une nouvelle famille de molécules bioactives dérivés du DHA, les docosatriènes, a été mise en évidence dans différents types cellulaires (354). Parmi ces dérivés, les membres présentant le potentiel bioactif le plus fort sont le 10,17S-docosatriène ou neuroprotectine et les 17S-résolvines.

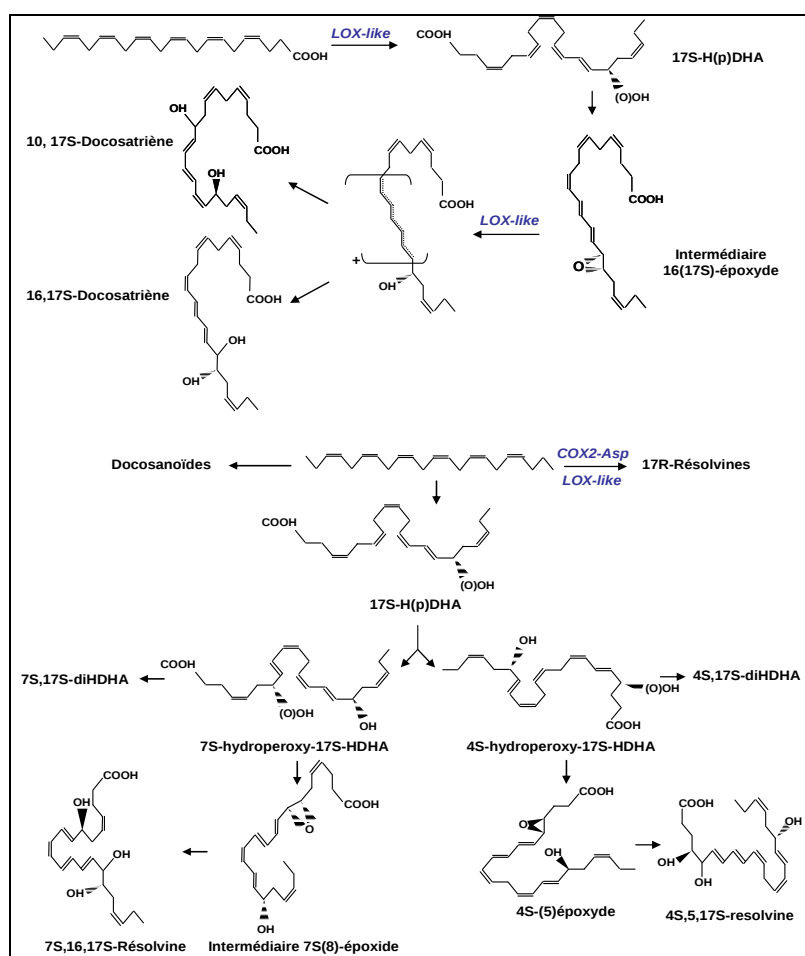


Figure 46. Voies de biosynthèse des docosanoïdes

Ces composés sont synthétisés selon des voies métaboliques distinctes de celles qui convertissent l'EPA en molécules bioactives et impliquent la conversion enzymatique du DHA en un intermédiaire *trans* 16,17-époxyde selon une réaction de type lipoxygénase ou LOX (figure 46). Elles présentent un potentiel anti-inflammatoire et immunorégulateur à des teneurs de l'ordre du pico- au nanomolaire *in vitro* et *in vivo* (354, 515, 552, 662). Elles permettent en particulier de réguler les leucocytes, diminuer l'infiltration des cellules immunitaires dans les tissus *in vivo*, diminuer l'activité COX2, bloquer la production des cytokines par les cellules gliales et l'activation de NF-κB induite par l'IL-1β. Ces métabolites bioactifs seraient à l'origine de l'effet bénéfique sur la santé observé dans les études ayant inclus une supplémentation nutritionnelle des patients en ω3 (354).

3-3-2-4. Régulation de l'expression génique par les acides gras

Les premiers rapports évoquant l'implication des AG libres dans le contrôle de la transcription des gènes sont apparus dans les années 1960 et se focalisaient sur l'étude de l'impact des AG sur les gènes de la lipogenèse, en particulier dans les cellules hépatiques et adipocytaires (8). En effet, après l'ingestion d'un taux élevé d'AGPI, différents gènes sont rapidement activés parmi lesquels ceux codant des protéines impliquées dans le processus d'oxydation lipidique telles que l'acylCoA oxydase, certaines apolipoprotéines et protéines de liaison aux AG (532). En revanche, d'autres gènes impliqués dans la synthèse lipidique sont reprimés dont ceux codant les désaturases ou encore l'acylCoA carboxylase (664).

Depuis, plusieurs études ont rapporté une régulation transcriptionnelle par les AG libres dans d'autres organes dont l'intestin grêle ou le cerveau, et dans le système immunitaire (453, 641). L'utilisation de micropuces d'ADNc a permis de montrer qu'une courte supplémentation en AGPI ω3 affecte peu la transcription des gènes chez le rat (0,75% des gènes étudiés montrent une expression modifiée après une supplémentation d'1 mois). Ainsi, la transcription est induite pour 11 gènes et réprimée pour 12 gènes dans l'hippocampe de rat supplémenté sur une courte durée (44, 420, 610). En revanche, une supplémentation de plus de 2 mois affecterait 8 fois plus de gènes. Parmi les gènes affectés, la transthyrétine, une protéine impliquée dans le transport des hormones thyroïdiennes et du peptide Aβ (727), présente un niveau d'expression décuplé après traitement par les AGPI. Cette régulation transcriptionnelle, qui expliquerait au moins en partie la diminution de la prévalence de la MA dans la population dont l'alimentation est riche en AGPI, implique l'interaction des AG avec des récepteurs nucléaires (664) et des facteurs de transcription dont l'abondance et l'activité peuvent être régulées de multiples façons par les AGPI ou leurs métabolites (390, 641).

3-3-2-4-1. Récepteurs RAR et RXR des rétinoïdes

Les dérivés de la vitamine A (acide rétinoïque et rétinoïdes) interviennent sur la croissance, la différenciation et la survie cellulaires par la régulation de l'expression des gènes. La vitamine A est stockée dans le foie sous forme de rétinol et peut être transférée vers d'autres organes après complexation à la

protéine RBP de fixation du rétinol. Pris en charge par la cellule cible, le rétinol est stocké dans la cellule ou métabolisé sous forme de rétinoïde ou d'acide rétinoïque. La conversion en acide rétinoïque implique 2 enzymes : la rétinol déshydrogénase cytosolique qui conduit au rétinol, et la rétinol déshydrogénase qui génère l'acide rétinoïque (450). Ces enzymes ne seraient présentes qu'en des régions du cerveau et qu'à des périodes précises du développement, suggérant un rôle clef de cette voie métabolique dans le développement et la maturation du SNC (450). Dans la cellule, le rétinol et l'acide rétinoïque sont pris en charge par des protéines de transport dont les profils d'expression varient aussi en fonction du temps et des régions cérébrales considérées (450). Les rétinoïdes et l'acide rétinoïque se lient dans le noyau aux récepteurs RAR et RXR, membres de la famille des récepteurs des stéroïdes dont la dimérisation permet l'association aux éléments de réponse RXRE ou RARE en amont de certains gènes, dont ceux codant la norepinéphrine, des enzymes telles que la choline acétyltransférase, des GPCR tels que les récepteurs opioïdes μ , δ et κ , des récepteurs ionotropes comme le récepteur NMDA, des canaux ioniques, des protéines du cytosquelette dont les intégrines ou des protéines de signalisation cellulaire (48, 235).

3-3-2-4-2. Récepteur hépatique nucléaire LXR

Les récepteurs LXR interviennent sur la transcription des gènes après dimérisation avec les RXR et liaison à l'élément de réponse LXRE situé dans les régions promotrices des gènes cibles. La liaison des oxystérols, ligands endogènes de cette famille de récepteurs, régule les gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol et des AG. Les AGPI inhibent l'action prolipogène des LXR, notamment comme inhibiteurs compétitifs des oxystérols (790).

3-3-2-4-3. Récepteurs PPAR activateurs de la prolifération des peroxysomes

Les PPAR appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes et se déclinent selon 3 isoformes PPAR α , β/δ et γ . Ces récepteurs interviennent sur la transcription des gènes après dimérisation avec un récepteur de type RXR (533). Tous les AG ($\omega 3$ ou $\omega 6$) peuvent se lier aux 3 isoformes PPAR selon des affinités différentes (641). Plus récemment, Hontecillas *et al.* (355) ont montré que les acides linoléiques conjugués sont également capables d'induire l'activation des PPAR γ . L'interaction des AGPI avec ces récepteurs entraîne la modulation de nombreux gènes parmi lesquels l'acylCoA synthétase ou encore les gènes codant des protéines impliquées dans la β -oxydation des AG (641).

3-3-2-4-4. Protéine SREBP de fixation à l'élément de réponse aux stéroïdes

Les SREBP appartiennent à une famille de facteurs de transcription à motif hélice-boucle-hélice identifiés comme des régulateurs des éléments de réponse aux stéroïdes (SRE) impliqué dans la modulation des gènes de la cholestérogenèse (579). Les SREBP existent sous 3 isoformes, SREBP-1a/-1c et SREBP-2, dont le rôle est respectivement la régulation des gènes impliquées dans la synthèse des lipides et dans l'homéostasie du cholestérol. Diverses études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les AGPI répriment l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse en empêchant la

maturation des facteurs SREBP (776).

3-3-2-4-5. Facteurs NF- κ B et I- κ B

NF- κ B et I- κ B sont présents dans le cytoplasme des cellules sous la forme d'un hétérodimère inactif. Après sa phosphorylation, l'inhibiteur I- κ B est libéré, ce qui active NF- κ B qui est alors transloqué dans le noyau où il régule, entre autres, des gènes impliqués dans les mécanismes inflammatoires dont ceux codant les COX et certaines interleukines (641). La translocation du facteur NF- κ B peut être affectée de différentes façons par les AGPI. Ainsi, alors que l'AA stimule la translocation de ce facteur, l'EPA l'inhibe (113, 795). La supplémentation alimentaire en huile de poisson chez l'homme conduit en conséquence à une diminution de l'expression des gènes cibles du facteur NF- κ B dont par exemple le TNF (641, 795).

3-4. Les microdomaines membranaires

3-4-1. La membrane plasmique, un concept en évolution

C'est en 1855 que Von Nägeli & Cramer créent le concept de membrane comme barrière pour expliquer l'existence des flux osmotiques. Overton suggère 40 ans plus tard que la membrane plasmique soit de nature lipidique. En 1935, Davson & Danielli proposent le modèle en sandwich, dans lequel la membrane plasmique se compose d'une bicouche de phospholipides à laquelle sont associées des protéines. En 1972, Singer & Nicholson (679) proposent le modèle de la mosaïque fluide représenté par la figure 47.

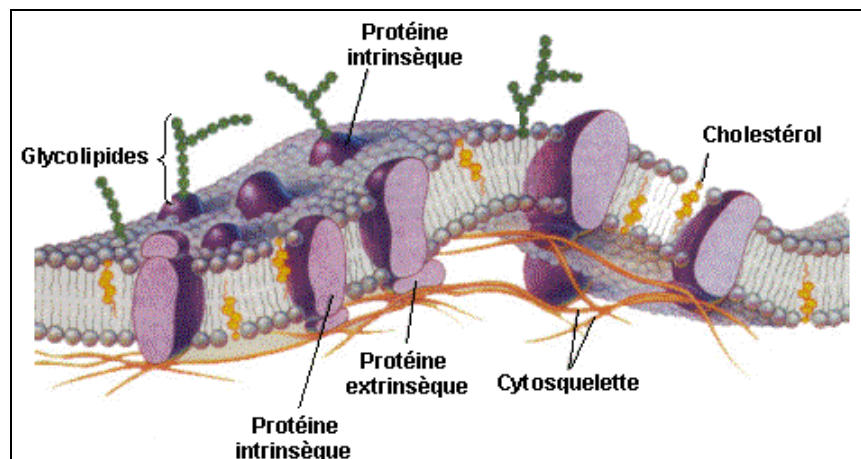


Figure 47. Le modèle membranaire de mosaïque fluide

Selon ce modèle, la membrane plasmique serait constituée d'un double feuillet phospholipidique de 7 nm d'épaisseur dans lequel seraient intégrées des protéines membranaires de structure globulaire se déplaçant selon des mouvements browniens. Les têtes polaires des phospholipides sont exposées vers le milieu extracellulaire ou le cytoplasme, alors que les chaînes hydrocarbonées des AG forment une matrice qui structure le cœur de la membrane plasmique. Les espaces disponibles dans cette matrice

sont comblés par d'autres lipides dont le cholestérol, le plus représenté (643, 678). La matrice lipidique des membranes modèles peut exister selon 3 phases – le gel, la phase l_o et la phase l_d – de fluidité croissante (98). Une bibliographie fournie décrit la membrane plasmique comme un milieu hétérogène, composé de régions fluides et de régions denses, les microdomaines membranaires. Ces derniers, organisés en phase l_o , portent le nom de radeaux lipidiques, « capables de se déplacer sur un océan de phospholipides » (597).

3-4-2. Caractéristiques des radeaux lipidiques

3-4-2-1. Caractéristiques physicochimiques

Les radeaux lipidiques, ou rafts, sont des microdomaines membranaires asymétriques contenant 30 à 50% de cholestérol, soit 3 à 5 fois plus que les autres régions membranaires (99, 597, 605). Leur feuillet externe est particulièrement riche en sphingolipides et en glycosphingolipides. Ainsi, 10 à 15% des sphingolipides membranaires et 10 à 20% des glycolipides membranaires sont concentrés dans les rafts. Leur feuillet cytoplasmique est riche en glycérolipides (99, 597, 605, 678). Contrairement à la membrane plasmique qui contient près de 60% de phospholipides dont majoritairement PE et PC, moins de 30% des lipides des rafts sont des phospholipides (99, 596, 597). Dans les membranes modèles, le partage entre les différentes classes de lipides constitue un moteur pour la formation de rafts riches en cholestérol et en sphingolipides. Toutefois, les microdomaines ainsi formés sont instables, dynamiques et soumis à d'incessants phénomènes de scission ou de clusterisation. Au sein des membranes biologiques, la présence de protéines stabilisatrices est nécessaire pour préserver une architecture stable (666).

Au sein des rafts, les chaînes hydrocarbonées des AG sont majoritairement saturées et en conformation étirée de façon à former une phase l_o , comme présenté par la figure 48 (98, 261). L'enrichissement en AG saturés est particulièrement important pour la PE et pour les phospholipides anioniques du feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique (261, 596) et permet probablement de compenser la faible proportion de sphingolipides dans ce feuillet (597).

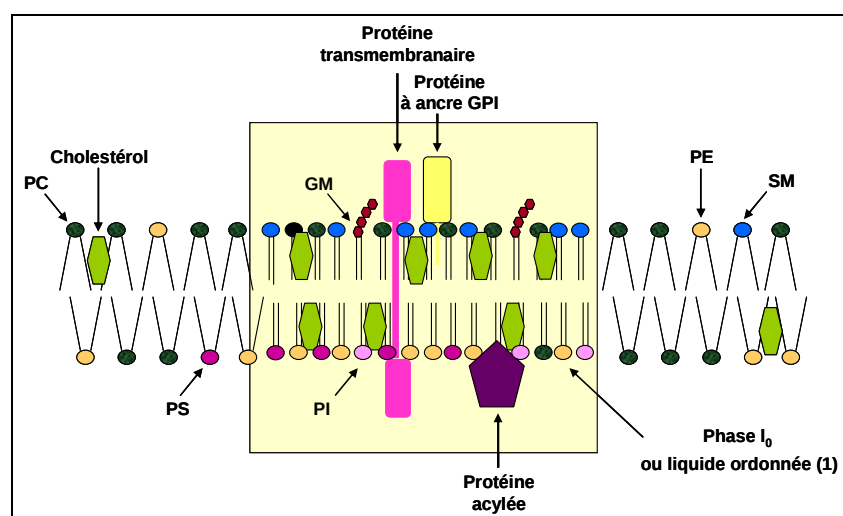


Figure 48. Composition d'un radeau lipidique

Différents termes ont été proposés pour ces microdomaines, parmi lesquelles membrane enrichie en cholestérol (CEM), membrane enrichie en gangliosides (GEM), membrane enrichie en glycosphingolipides et résistante aux détergents (DIG), fraction insoluble dans le Triton X-100 et surnageant dans un gradient de flottaison (TIFF) ou membrane résistante aux détergents (DRM). Les termes DIG et DRM reflètent la résistance des microdomaines à la solubilisation dans les détergents en raison de leur caractère compact et ordonné, le terme TIFF fait lui référence à leur faible densité.

3-4-2-2. Diversité des radeaux lipidiques

3-4-2-2-1. Les cavéoles

Les premiers microdomaines membranaires mis en évidence et les seuls identifiables par leur morphologie sont les cavéoles (figure 49). Ce sont des invaginations membranaires présentant un diamètre de 25 à 150 nm, visibles en microscopie électronique (14) au niveau du réseau trans-golgien, des vésicules d'exocytose, du RE et de la membrane plasmique (264).

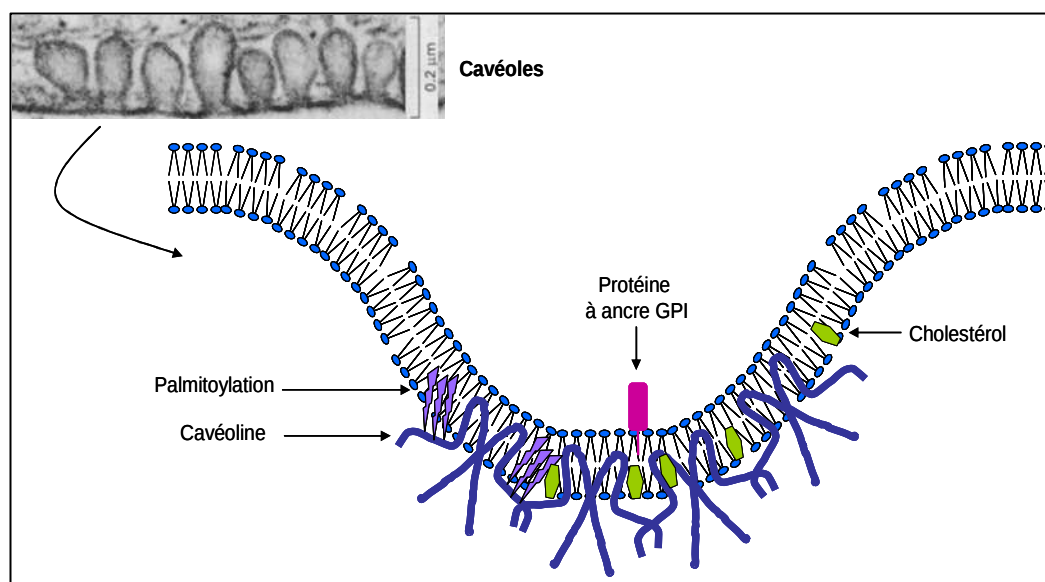


Figure 49. Constitution moléculaire d'une cavéole

Les cavéoles sont des structures induites et stabilisées par une concentration locale élevée en cholestérol (596, 597) ainsi que par les cavéolines, protéines abondantes au sein des cavéoles (254, 542, 644). Les cavéolines sont synthétisées et recrutées à la membrane au niveau du RE avant de s'associer, dans le réseau trans-golgien, aux molécules de cholestérol (542), dans un rapport cholestérol/cavéoline de 1 à 2 (368). Les cavéolines existent sous 3 isoformes : Cav-1 et Cav-3, partageant un haut degré d'identité, et Cav-2 qui présente une structure primaire plus singulière (617). Toutes 3 contiennent toutefois une signature, de séquence Phe-Glu-Asp-Val-Ile-Ala-Glu-Pro, dont le rôle fonctionnel n'est pas déterminé. D'autres domaines fonctionnellement importants ont été identifiés à partir de ces structures primaires, notamment un domaine hydrophobe d'insertion dans la membrane, un domaine nécessaire à l'oligomérisation des protéines et un domaine d'assemblage (644). Cav-1 et Cav-2 sont exprimées dans la plupart des cellules, y compris les neurones qui forment

pourtant peu de cavéoles (329).

Les analyses topologiques ont montré que ces protéines présentent une structure en épingle à cheveux avec les extrémités C- et N-terminales orientées dans le cytoplasme (542). Leur domaine hydrophobe court (32 résidus aminoacides) leur permet de s'insérer dans la membrane sans la traverser (644). Elles sont par ailleurs ancrées dans la bicouche phospholipidique par 3 palmitoylations dans leur domaine C-terminal (654). Les cavéolines peuvent s'assembler *in vitro* et *in vivo* en homo- ou hétéro-oligomères de grande taille (jusqu'à 400 kDa, 16 unités), constituant ainsi un élément moteur à l'invagination des cavéoles (542, 644). Une fois formées, les cavéoles peuvent être indépendantes ou groupées en clusters.

Les cavéoles sont donc riches en cavéoline (632), mais aussi en protéines à ancre GPI ou glycosylphosphatidylinositol (632) et en protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire (253). Leur extraction nécessite la solubilisation des membranes dans une solution tampon en présence de Triton X-100 (1%) et un fractionnement en gradient de saccharose (99). Les cavéoles peuvent être séparées d'une fraction correspondant à des microdomaines membranaires enrichis en protéines à ancre GPI, en protéines de signalisation et en cholestérol, mais dépourvus de cavéoline (656). Cette découverte a montré que la fraction résistante aux détergents est hétérogène et contient au moins 2 sous-fractions selon la présence de cavéoline. Par souci de clarté, nous désignons ici les radeaux avec cavéoline sous le nom de cavéoles, tandis que ceux dépourvus de cavéoline sont nommés rafts.

3-4-2-2-2. Les rafts

Les rafts sont des structures dynamiques de 100 nm de large (597) caractérisées par la présence de protéines flotilline qui s'y insèrent principalement au niveau de la membrane plasmique, éventuellement dans les endomembranes par l'ajout de modifications de type palmytoylation ou myristoylation selon les isoformes (562). Les rafts sont assemblés dans l'appareil de Golgi avant d'être transportés vers la membrane plasmique (98). Une fois intégrés à la membrane, les rafts subissent perpétuellement des phénomènes d'endo- et d'exocytose selon certains *stimuli* et paramètres parmi lesquels le taux de cholestérol (553). Ce dernier joue en effet un rôle déterminant dans la formation et le renouvellement des rafts. De nombreuses études ont ainsi montré que la déplétion des cellules en cholestérol conduit à la rupture des rafts et à la diffusion de leurs constituants le long de la membrane plasmique (597). Cependant, les rafts ne semblent pas tous sensibles à la déplétion en cholestérol, suggérant là encore l'existence de sous-populations. Ainsi, la déplétion en cholestérol par traitement d'entérocytes par la M β CD réduit de 70% le cholestérol membranaire, mais n'affecte pas la capacité de la galectine-4, protéine classiquement associée aux rafts, à se localiser dans les TIF (327). Certaines populations de rafts semblent donc se maintenir sans taux de cholestérol élevé. Comme dans les cavéoles, les rafts sont structurés par la formation d'homo- et d'hétéro-oligomères de flotillines stables (426, 706), dispersés ponctuellement le long de la membrane plasmique (706) et pouvant se clusteriser pour former de grandes plateformes de signalisation (329, 596, 706). Les rafts présentent des caractéristiques et des distributions différentes selon le type cellulaire et le stade de développement

(678). Dans les neurones matures, les rafts sont principalement accumulés dans les membranes au niveau du corps cellulaire, de l'axone post-synaptique et, de façon moindre, somatodendritique (218).

3-4-2-2-3. Hétérogénéité fonctionnelle

De nombreuses méthodes de préparation des rafts existent, employant un détergent particulier (Triton X-100, Lubrol WX, Lubrol PX, Brij 58, Brij 96, Brij 98, Nonidet P40 ou *n*-octylglucoside) ou s'en affranchissant grâce à des techniques de solubilisation de membranes par sonication (683, 687) ou lyse mécanique en milieu hypotonique (597). Ces différentes méthodes d'extraction ont permis d'obtenir des fractions de compositions lipidiques et protéiques différentes, suggérant l'existence de plusieurs sous-populations de rafts (595, 596). Mais cette hétérogénéité apparente pourrait n'être liée qu'aux différents modes de préparation des rafts. Ainsi, certaines études proposent que la solubilisation des membranes pourrait entraîner des fusions de microdomaines, ainsi que des échanges protéiques et lipidiques entre microdomaines, remodelant des régions très différentes de celles réellement présentes *in vivo* (218, 510, 526). L'hypothèse de fusions artéfactuelles induites par les procédures d'extraction a été étayée par l'observation de phénomènes de clusterisation après traitements par les détergents (526).

L'identification de protéines impliquées dans la transduction des signaux a conduit de nombreux auteurs à proposer que les rafts et les cavéoles constitueraient des signalosomes, plateformes de signalisation cellulaire capables de relayer et de réguler les informations (678). Les rafts seraient par ailleurs impliqués dans les processus d'endocytose (3, 584) ainsi que dans le transport du cholestérol (368). Cette diversité fonctionnelle reflète probablement une diversité des rafts en termes de compositions lipidique et protéique et de localisation dans la membrane plasmique (597). Le fractionnement des rafts issus de membranes neuronales de rat par chromatographie d'affinité a montré l'existence de rafts enrichis en protéine du prion mais ne contenant que 10% de protéine Thy-1 (un marqueur des rafts), et de rafts enrichies en protéine Thy-1 et dépourvus de prion (510). Par ailleurs, la protéine Thy-1 présente une distribution diffuse le long de la membrane plasmique, alors que certaines protéines à ancre GPI comme le récepteur aux folates ont une distribution ponctuelle (525). Tout ceci suggère l'existence de sous-populations distinctes de rafts.

3-4-3. Fonctions des radeaux lipidiques

3-4-3-1. Implication dans les processus d'endo- et d'exocytose

Alors que la majorité des virus et agents pathogènes infectent les cellules hôtes par un mécanisme dépendant de la clathrine, un nombre croissant de ces agents peuvent infecter leurs hôtes par une endocytose dépendante des radeaux lipidiques (589, 791).

3-4-3-1-1. Endocytose dépendante des cavéoles

3-4-3-1-1-1. Clusterisation des cavéoles

Lors de la clusterisation des gangliosides induites par certains agents pathogènes tels que les virus,

les oligomères de Cav-1 subissent aussi une clusterisation, formant ainsi de grands polymères capables de modifier l'architecture membranaire (584). Le cholestérol, par ses interactions avec la cavéoline, se concentre dans ces structures. Le squelette protéique et lipidique ainsi assemblés peut alors former une invagination semblable à celle observée lors d'une endocytose dépendante de la clathrine. La clusterisation des cavéoles pourrait intervenir de façon précoce, dès son transit dans l'appareil de Golgi (589, 590).

3-4-3-1-2. Formation de cavéosomes

Pelkmans (589) a montré que l'internalisation des cavéoles est inhibée par la génistéine, un inhibiteur des tyrosines kinases, suggérant l'implication de phosphorylations dans ce mécanisme d'endocytose. La phosphorylation de la Tyr¹⁴ de la cavéoline pourrait en particulier être un événement clef dans ce phénomène, mais les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas clairement établis (188). L'équilibre entre cavéoles isolées et « grappe de cavéoles » est respecté lors de l'internalisation, puisque les images de microscopie électronique montrent des vésicules simples à cavéoline et des structures plus complexes, les cavéosomes issues de la fusion de ces vésicules (figure 50). Les mécanismes moléculaires de fusion de ces vésicules avec les endomembranes n'ont pas encore été définis (589).

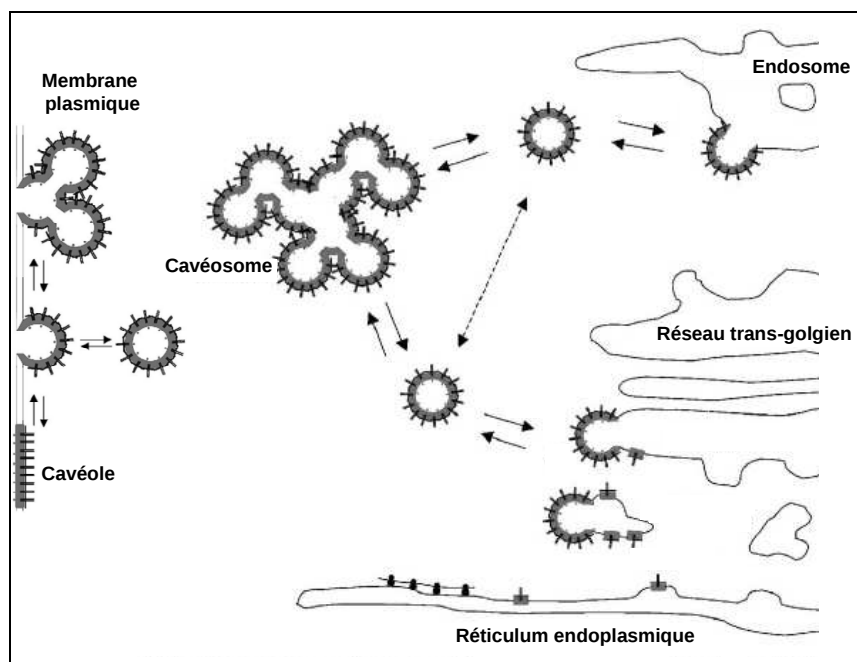


Figure 50. Mécanisme d'endocytose dépendant de la cavéoline
d'après Pelkmans (589)

3-4-3-1-2. Endocytose dépendante des rafts

L'existence d'un processus d'endocytose indépendant de la clathrine et de la cavéoline a été mis en évidence chez des souris transgéniques *cav*^{-/-} (418) et confirmé par la détection de la flotilline, un marqueur des rafts à la surface de certaines vésicules d'endocytose. Ce mécanisme, impliqué dans

l'internalisation de toxines, virus et autres agents pathogènes comme *Shigella flexneri* repose sur la formation de vésicules endocytotiques non « tapissées » de protéines à partir des rafts (3, 448, 669).

Comme dans le cas de l'endocytose dépendante de la cavéoline, la première étape du processus endocytotique lié aux rafts est la réception de l'élément à internaliser par les gangliosides GM₁ (580). La clusterisation et l'invagination des rafts nécessaires à la formation de vésicules flotilline⁺ (281) et à l'endocytose pourrait être induite par une augmentation locale de la concentration de cholestérol (36, 580). Les vésicules flotilline⁺ semblent être principalement destinées à fusionner avec les endomembranes des organites ou à subir un processus de type transcytose (98, 564). La fusion avec les lysosomes semble en revanche être un phénomène relativement rare, contrairement à ce qui est observé pour les mécanismes dépendants de la clathrine (669).

Certains auteurs ont par ailleurs rapporté une implication possible des rafts dans les phénomènes d'exocytose. Cette hypothèse est basée en particulier sur la présence de protéines impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques et la libération des neurotransmetteurs (syntaxine, SNAP-25, SNAP-23, VAMP-2) au sein de microdomaines membranaires flotilline⁺ (131). Toutefois, l'impact de la présence de ces protéines au sein des rafts est encore controversé. En effet, certains auteurs, s'appuyant sur des expériences d'inhibition de l'exocytose après traitement par la M β CD, suggèrent que la présence des protéines au sein des rafts est nécessaire à l'exocytose (131). D'autres auteurs proposent au contraire que la séquestration de ces protéines dans les rafts inhiberait la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, posant l'hypothèse d'une régulation des phénomènes d'exocytose par les rafts (640).

3-4-3-1-3. Plateformes réceptrices de molécules exogènes et implication dans la MA

L'endocytose dépendante des rafts/cavéoles nécessite la réception de molécules exogènes par des récepteurs concentrés dans les microdomaines ou par les gangliosides notamment, GM₁. La conversion du peptide A β soluble en un peptide A β fibrillaire riche en feuillet β est considéré par de nombreux auteurs comme une étape clef dans le développement de la MA (331, 659). Yanagisawa (785) ont mis en évidence l'existence d'un adduit A β -GM₁ à la surface des neurones des patients atteints de la MA. Ces mêmes auteurs ont alors proposé que la formation du complexe A β -GM₁ constituerait un noyau de nucléation permettant l'aggrégation et la formation des fibrilles amyloïdes. À ce titre, les gangliosides sont des lipides abondants des microdomaines membranaires. Morishima-Kawashima & Ihara (548) ont ainsi pu montrer que dans des cellules SH-SY5Y de neuroblastome humain, près de la moitié des peptides amyloïdes insolubles est localisée à proximité des rafts. Par ailleurs, le peptide A β est présent en grande quantité dans les rafts de cerveau de souris transgéniques Tg2576, souris modèles de la MA (401). Enfin, la présence des gangliosides semblent conduire à une accélération de la fibrillation du peptide A β (142, 338, 395). En se basant sur ces différents travaux et sur des analyses immunocytochimiques, Wakabayashi *et al.* (754) ont proposé un modèle selon lequel le peptide A β reconnaît spécifiquement un cluster de gangliosides, grâce notamment à la

concentration locale élevée de cholestérol. Lors de la formation du complexe A β –GM₁, un changement conformationnel permettrait la transition d'un état riche en hélices α vers un état riche en feuillets β qui servirait de noyau de nucléation pour la formation de fibrilles amyloïdes. Le niveau d'agrégation du peptide dépendrait alors du nombre de domaines riches en gangliosides et en cholestérol, c'est-à-dire du nombre de radeaux lipidiques. Cette hypothèse est confortée par les travaux de Hayashi *et al.* (338) qui suggèrent que le peptide A β deviendrait neurotoxique après incubation avec des liposomes constitués de gangliosides GM₁, de cholestérol et de sphingolipides. Dans le même ordre d'idées, Wang *et al.* (760) ont mis en évidence qu'une réduction de cholestérol et d'acide sialique protège les cellules PC12 différenciées en neurones contre la toxicité induite par le peptide A β . Au contraire, la déplétion du cholestérol de neurones corticaux en culture primaire potentialise l'effet neurotoxique des oligomères de peptide A β (694).

3-4-3-2. Radeaux lipidiques et homéostasie du cholestérol

3-4-3-2-1. Incorporation du cholestérol

La synthèse *de novo* du cholestérol est réalisée dans le RE. En utilisant un précurseur radiomarqué, Smart *et al.* (684) ont montré que le cholestérol nouvellement synthétisé n'est distribué le long de la membrane plasmique ou des endomembranes qu'après avoir été soumis à un transport dépendant de la cavéoline. L'importance de la cavéoline dans l'incorporation du cholestérol au sein de la membrane a été démontrée après transfection de lignées lymphocytaires dépourvues de cavéoles par des ADNc *cav-1*. Des structures invaginées de type cavéole se sont formées, tandis que le cholestérol est recruté à la membrane (254, 684). Ce type de transport dépendant de la cavéoline ne semble pas impliqué dans la formation de vésicules, mais plutôt dans la prise en charge du complexe cavéoline–cholestérol par des molécules chaperones selon un mécanisme dépendant des microtubules (733). Le cholestérol est pris en charge par la cavéoline, probablement par la formation d'une poche hydrophobe constituée d'une trentaine de résidus hydrophobes et des 3 résidus cystéinyles palmitoylés à l'extrémité C-terminale de la cavéoline (733). Cette hypothèse est toutefois controversée par le fait que certaines cellules capables de synthétiser le cholestérol sont dépourvues de cavéoles, suggérant l'existence de différents mécanismes de transport concomitants dans la cellule (368, 617).

3-4-3-2-2. Import et export du cholestérol

Les mécanismes d'efflux du cholestérol sont situés en divers sites de la membrane plasmique selon le type d'accepteur de cholestérol impliqué (368). Ainsi, le transporteur ABCA1, l'un des transporteurs clefs du cholestérol, est distribué au sein de domaines membranaires distincts des rafts et cavéoles. À l'inverse, seul le récepteur des HDL SR-BI (*scavenger receptor class B, type I*) est présent dans les cavéoles, suggérant leur implication dans le métabolisme stéroïdien (35, 300). En effet, ce récepteur intervient à la fois dans le transfert du cholestérol libre présent dans la membrane plasmique vers les HDL (186, 385) et dans la capture et l'internalisation des esters de cholestérol présents dans les HDL

(257, 523). Par ailleurs, les particules pré- β -HDL, appartenant à la famille des HDL, partagent la même localisation que la Cav-1, confortant ainsi la possibilité d'interactions entre HDL et cavéoles (244). L'hypothèse selon laquelle les cavéoles interviendraient dans les mouvements du cholestérol est étayée par le fait qu'en présence d'un excès de cholestérol intracellulaire, une partie du cholestérol est séquestrée par les cavéoles. Ceci suggère un rôle des cavéoles dans l'efflux du cholestérol excédentaire (244). Inversement, une baisse de l'expression de *cav-1* entraîne une diminution de l'efflux du cholestérol (243).

3-4-3-3. Signalosomes et modulation des signaux de transduction

La signalisation cellulaire au sein des radeaux lipidiques est régulée par différents mécanismes affectant à la fois la qualité, l'intensité et la durée du signal transmis (287).

3-4-3-3-1. Impact de la cavéoline sur la transduction des signaux

Les cavéolines possèdent un domaine d'assemblage ou SCD (*scaffolding domain*) situé entre les résidus aminoacides 79 à 96, essentiel à la structuration des cavéoles puisqu'il permet le recrutement de nombreux partenaires protéiques (239). Ce domaine intervient également comme un régulateur négatif de nombreuses protéines parmi lesquelles c-Src (481), Raf (636) et eNOS (NO synthase endothéliale). La protéine eNOS est ciblée vers les rafts et les cavéoles de la membrane plasmique et de celle de l'appareil de Golgi par une acylation (271). Dans les cavéoles, son activité est inhibée par l'interaction d'une région proche du site actif avec le SCD des cavéolines. Sous l'influence de certains *stimuli*, notamment une augmentation du calcium intracellulaire, l'interaction entre les 2 protéines est rompue, permettant l'activation de la protéine et la synthèse du médiateur cellulaire NO.

3-4-3-3-2. Impact de la flotilline sur la transduction des signaux

La flotilline, protéine stabilisatrice des rafts, est également capable de jouer comme la cavéoline un rôle significatif dans la régulation de la transduction des signaux. Son implication dans la signalisation cellulaire met en jeu des interactions avec des protéines adaptatrices du cytosquelette d'actine et un domaine de recrutement reconnu par des protéines de signalisation cellulaire (83). Des complexes protéiques centrés autour de la flotilline se forment notamment lors de la neurogenèse de cellules PC12, suggérant un rôle des flotillines dans les remaniements du cytosquelette associés à la croissance dendritique et à la différenciation neuronale (321). La flotilline joue également un rôle prépondérant dans l'activation des récepteurs tels que ceux des cellules T (TCR), en contrôlant l'assemblage des complexes de signalisation cellulaire nécessaires à la transduction du signal (706).

3-4-3-3-3. Les radeaux lipidiques, plateformes de signalisation cellulaire

Par leur clusterisation, les microdomaines membranaires favorisent le rapprochement dans l'espace d'acteurs protéiques et lipidiques, permettant ainsi l'optimisation de la transduction des signaux. Ce

mécanisme a notamment été mis en évidence par Hiltbold *et al.* (351) lors de l'activation des lymphocytes T où la clusterisation des rafts entraîne une concentration locale des protéines impliquées dans la formation des complexes majeurs d'histocompatibilité.

Le rapprochement dans l'espace de différents acteurs protéiques permet de proposer des modèles quant aux rôles du cholestérol dans la maturation protéolytique de l'APP. Certains auteurs suggèrent que la déplétion de cholestérol dans les neurones en culture induit par des traitements par la lovastatine ou par la M β CD a pour conséquence une diminution de la production de peptide A β (425). D'autres, au contraire rapportent que la réduction partielle de cholestérol dans les membranes des cellules neuronales conduit à une augmentation de l'amyloïdogénèse (1). Bien que de nature contradictoire, l'abondance des travaux relatifs à l'implication de l'homéostasie membranaire du cholestérol dans la génération du peptide A β a conduit de nombreux auteurs à étudier la localisation éventuelle des sécrétases au sein des rafts. Ainsi, Ehehalt *et al.* (220) ont rapporté que les protéines BACE et APP sont colocalisées dans les microdomaines des membranes golgiennes et des endosomes. La présence du complexe portant l'activité γ -sécrétase au sein de ces mêmes microdomaines suggère que les rafts pourraient être des plateformes dans lesquelles les différents acteurs de la voie amyloïdogène (BACE1, PS1, PS2, Nct et Aph1) sont colocalisés et actifs (174, 220, 393, 745). Au contraire, les protéines responsables de l'activité α -sécrétase ainsi que la majorité des protéines APP sont localisées hors des rafts (220). Ces auteurs suggèrent que la ségrégation des partenaires impliqués dans les voies amyloïdogène et non amyloïdogène constitue un mécanisme de régulation de l'activité des enzymes impliquées.

La clusterisation des rafts et l'incorporation d'enzymes et de protéines dans de telles structures permettent également de moduler l'intensité du signal en influençant l'activité des protéines associées. Cette régulation peut être induite par les protéines associées de façon constitutive aux microdomaines. Ainsi, après recrutement de certains canaux potassiques dans les rafts synaptiques suite à une stimulation par la protéine PSD-95, ces canaux subissent une régulation par les kinases constitutivement associées à ces microdomaines (774). L'activité enzymatique est aussi modulée par l'environnement lipidique des rafts, comme par exemple l'activité de la protéine BACE favorisée *in vitro* par un environnement lipidique riche en cholestérol et en gangliosides (399). Ceci suggère une stabilisation possible par les rafts *in vivo*.

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

La MA est une pathologie neurodégénérative évolutive à l'étiologie complexe qui se traduit par une symptomatologie lourde pour laquelle aucun diagnostic *ante mortem* et aucun traitement satisfaisant n'est encore disponible. Les hypothèses myéloïste et tauïste, confrontées depuis près de 20 ans, tendent désormais à admettre leur complémentarité. Ces hypothèses, avancées pour expliquer les mécanismes moléculaires conduisant à la mort neuronale et à la perte des fonctions cognitives inhérentes de cette pathologie, sont basées sur les critères histopathologiques de la MA et concernent donc les phases tardives de la pathogenèse. Or, la perte d'autonomie des patients et le poids socioéconomique imposés par la MA condamne la recherche à l'obligation d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la dégénérescence neuronale et des altérations cognitives associées pour pouvoir identifier des marqueurs biologiques des phases précoces de cette pathologie. Cette approche stratégique est la seule démarche raisonnable pouvant – et devant, à terme – conduire à des traitements préventifs ou thérapeutiques destinés à empêcher ou retarder l'apparition et l'évolution de la maladie. Les études relatives au peptide A β soluble indiquent que cet agent neurotoxique induit, *in vitro* comme *in vivo*, des atteintes synaptiques et une inhibition du processus mnésique de potentialisation à long terme, rendant presque évidente l'implication de ces formes oligomériques dans les phases précoces de la MA. Les propriétés fusogènes du peptide A β suggèrent que la cascade moléculaire responsable des troubles observés puisse trouver son origine dans les interactions contractées par le peptide au niveau de la membrane plasmique. La nature de ces interactions dépendrait en particulier du statut lipidique et de l'architecture de la membrane plasmique. L'influence du statut lipidique sur la MA, suggérée par de nombreuses études épidémiologiques focalisées sur l'ApoE, le cholestérol ou les lipides et leurs dérivés, pourrait en conséquence trouver une base moléculaire dans les interactions entre le peptide A β et la membrane plasmique.

Les informations détaillées dans le chapitre Introduction Bibliographique, et en particulier les résultats obtenus par notre groupe, nous permettent de proposer une hypothèse selon laquelle l'architecture, les propriétés physicochimiques et le statut lipidique de la membrane plasmique seraient des paramètres déterminants des interactions avec le peptide A β oligomérique, capables d'influer directement sur sa neurotoxicité en contrôlant les conditions d'initiation des cascades pro-apoptotiques. Ces cascades reposent très largement en effet sur des médiateurs lipidiques et des voies de signalisation trouvant leur origine au sein de la membrane plasmique ou des endomembranes neuronales. L'objectif général de ce travail de thèse est de déterminer l'impact des modifications du statut et de la signalisation lipidique sur la neurotoxicité du peptide A β soluble. Il se focalisera en particulier sur différents acteurs lipidiques comme les AGPI et les céramides et sur leur contribution au contrôle respectif des voies de signalisation de survie ou pro-apoptotique activées dans le neurone exposé au peptide A β soluble.

Objectifs spécifiques

De récentes études, dont celles menées par notre groupe, proposent que l'interaction du peptide A β avec la membrane conduit à l'induction d'un stress oxydant (6, 694) et à l'activation de la cPLA₂ (440), 2 événements capables d'activer les SMases (516). En se basant sur ces données, nous proposons un scénario permettant d'expliquer la neurotoxicité du peptide A β soluble : l'interaction de ce peptide avec la membrane entraîne la mort apoptotique neuronale en activant les SMases, ce qui conduit à :

- la production de céramides par conversion de la SM,
- l'induction des cascades pro-apoptotiques dépendantes des céramides,
- la déstabilisation de l'architecture membranaire.

Afin de valider ce scénario sur des neurones corticaux de rat *in vitro*, nous nous proposons :

- de déterminer le rôle central de l'activité SMase dans la neurotoxicité induite par le peptide A β à l'aide de marqueurs d'apoptose morphologiques et fonctionnels et de dosages biochimiques des activités catalytiques SMases ;
- de valider l'implication des SMases dans l'apoptose induite par le peptide A β grâce à une stratégie antisens reposant sur l'utilisation d'oligonucléotides spécifiques dirigés contre les ARNm codant la cPLA₂, les α -SMases et n-SMases ;
- de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués par l'utilisation de tests fonctionnels dirigés contre les voies en amont de l'activation des SMases (antioxydants, inhibiteurs spécifiques de la cPLA₂), et par l'utilisation directe d'inhibiteurs spécifiques des α - et n-SMases ;
- d'évaluer le potentiel neuroprotecteur contre l'apoptose induite par le peptide A β de la S1P, molécule issue du métabolisme des sphingolipides et décrite comme un inhibiteur des SMases.

La composition de la membrane neuronale présentant un caractère déterminant dans les interactions avec le peptide A β et la susceptibilité cellulaire aux effets neurotoxiques induits en conséquence, nous nous attacherons en parallèle à évaluer l'impact neuroprotecteur d'un enrichissement membranaire en DHA, un AGPI essentiel au développement neuronal et au maintien de l'architecture membranaire. Les effets induits *in vitro* sur des cellules Neuro2A différenciées en neurones ou sur des neurones corticaux prétraités par des AGPI-lc avant exposition au peptide A β soluble seront évalués à l'aide de tests biochimiques et immunochimiques ainsi qu'avec des marqueurs fonctionnels et morphologiques de la mort cellulaire. Pour ce faire, nous nous proposons :

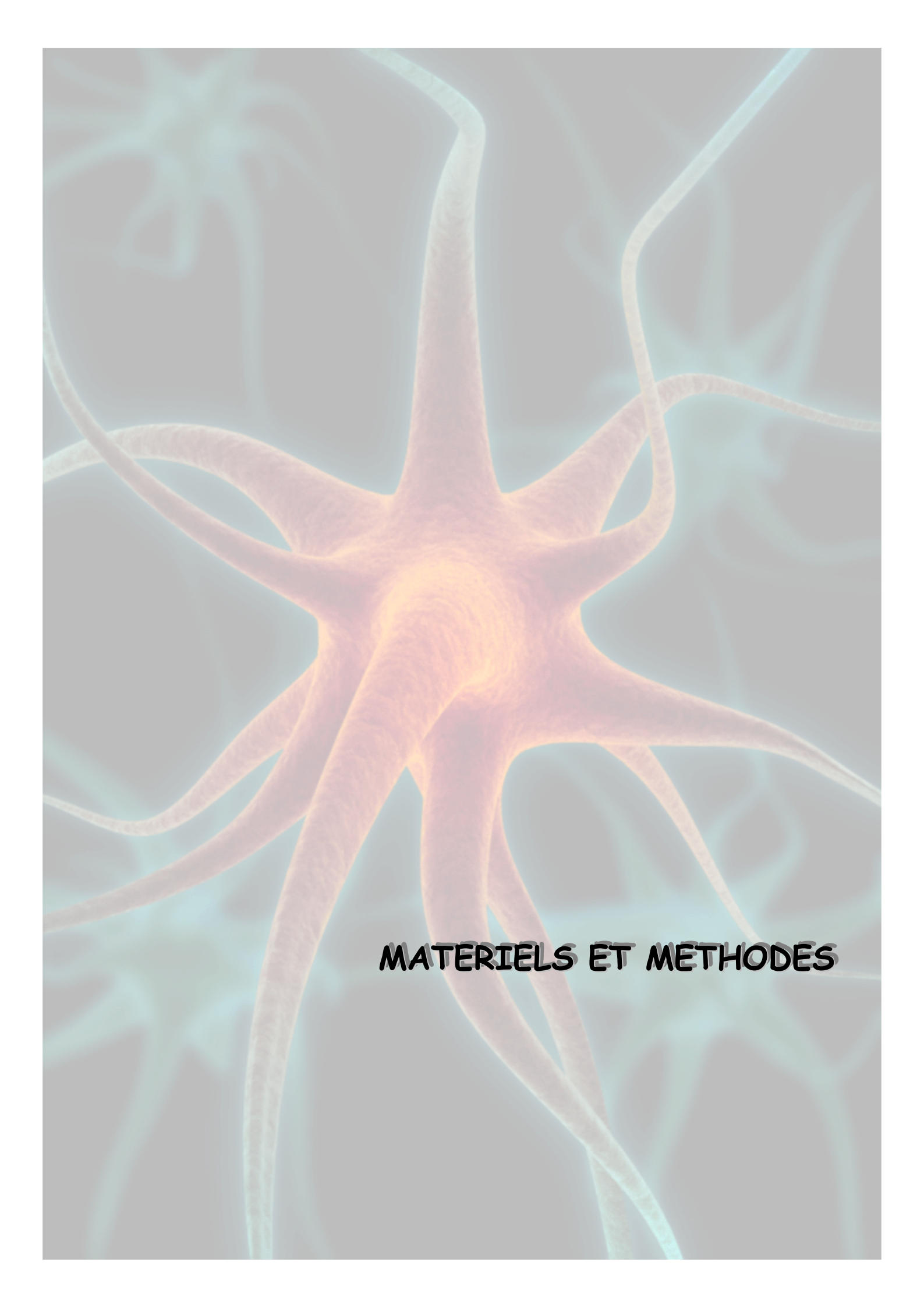
- de tester l'effet des prétraitements par le DHA sur la morphologie et la viabilité cellulaires, ainsi que les conséquences de l'enrichissement constaté sur la composition en acides gras et phospholipides membranaires ;
- d'évaluer les conditions dans lesquelles les AGPI-lc exercent leurs effets neuroprotecteurs contre l'apoptose induite par le peptide A β ;

- d'explorer si, et comment, le DHA influe sur les différentes voies de transduction identifiées comme impliquées dans la neurotoxicité induite par le peptide A β (stress oxydant, activation de la cPLA₂ et des caspases), mais aussi s'il active ou préserve des voies de survie neuronale.

Dans le dernier volet de notre étude, nous nous attacherons enfin à valider l'hypothèse selon laquelle les perturbations de l'architecture membranaire par le peptide A β soluble sont à l'origine de l'initiation des cascades apoptotiques, tandis que celles induites par le DHA sont la base de l'effet neuroprotecteur de l'AGPI. À cette fin, nous nous proposons :

- de faire la preuve que le peptide A β induit d'importants remaniements membranaires dont l'éventuelle association avec les voies de signalisation cellulaire devra permettre de définir l'importance de l'architecture et du statut lipidique neuronal dans la neurodégénérescence caractéristique de la MA ;
- d'élucider l'impact du DHA en recherchant des explications moléculaires des effets neuroprotecteurs constatés en prenant en compte un éventuel remodelage des microdomaines membranaires, avec pour conséquence une modification des mécanismes de signalisation, notamment pro-apoptotiques, induits par le peptide A β soluble.

Cette étude vise donc à explorer *in vitro* de nouvelles pistes mécanistiques à même de faire progresser les connaissances fondamentales sur la mort neuronale associée aux étapes précoces du développement de la MA et de proposer les bases moléculaires capables de souligner la pertinence de nouvelles approches thérapeutiques potentielles.



MATERIELS ET METHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Modèles expérimentaux

1-1. Cultures primaires de neurones corticaux de rat

1-1-1. Animaux

Les cultures primaires de neurones corticaux sont réalisées à partir d'embryons de rat de la souche Wistar provenant du centre d'élevage R. Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Les animaux sont maintenus dans une animalerie à une température de 22 à 23°C et soumis à un cycle lumière/obscurité de 12 h, avec nourriture et eau de boisson *ad libitum*.

1-1-2. Mise en culture des neurones

Toutes les manipulations sont effectuées en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire et à l'aide de matériel stérilisé ou à usage unique.

La composition des milieux de culture est présentée dans le tableau 4.

Tableau 4. Composition des différents milieux de culture primaire des neurones

Milieux	Composition		Fournisseurs
Milieu de base (pH 7,4)	DMEM (<i>Dulbecco-modified Eagle's medium</i> , Réf. 31600-083)		Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
	Ham's F-12 (Réf. 32500-035)		Invitrogen
	L-Glutamine	200 mM	Invitrogen
	D-Glucose	35 mM	Sigma (St Quentin Fallavier, France)
	NaHCO ₃	800 mM	Sigma
	HEPES	100 mM	Invitrogen
	Pénicilline/Streptomycine	10 UI/mL	Invitrogen
Milieu complet (pH 7,4)	Milieu de base +		
	Apotransferrine	1,25 µM	Sigma
	Insuline	4,5 µM	Sigma
	Progestérone	20 µM	Sigma
	Putrescine	60 µM	Sigma
Milieu de croissance (pH 7,4)	Sélénium	30 µM	Sigma
	Milieu complet +		
	Ovalbumine	20 µM	Sigma

La veille de la mise en culture des neurones, les puits des plaques de culture cellulaire sont traités à l'aide d'une solution aqueuse et stérile de poly-DL-ornithine (Sigma) à la concentration de 15 µg/mL pour les supports plastiques (Falcon, Becton-Dickinson & Co, Oxnard, CA, USA) et de 150 µg/mL pour les lamelles de verre disposées en plaques de 4 puits et utilisées comme supports en vue d'analyses au microscope. Les plaques et les boîtes de Pétri sont alors placées dans un incubateur à

37°C en atmosphère humide saturée en eau et avec 5% CO₂. En quelques heures, la poly-DL-ornithine forme un réseau polymérique homogène auquel les cellules neuronales dissociées adhèrent en monocouche et demeurent accrochées tout au long de la culture (787).

Avant la dissection, le jour de la culture, la solution de poly-DL-ornithine est éliminée et les boîtes sont rincées 2 fois à l'eau ultrapure, puis replacées dans l'incubateur avec les puits contenant une solution PBS de tampon phosphate sans calcium ni magnésium (Invitrogen, Réf. 14200-091) contenant 330 µM de glucose (PBS/glucose).

Au 17^{ème} jour de gestation, la rate est anesthésiée sous une dose létale d'halothane (Mundipharma, Boulogne-Billancourt, France) ; son abdomen est incisé et l'utérus gravide est prélevé. Après libération de leur sac vitellin, les embryons sont immergés dans du PBS/glucose et décapités. Une incision transversale est alors pratiquée dans la boîte crânienne de façon à dégager le cerveau. Une fois prélevé, ce dernier est immergé dans du milieu de base. Les hémisphères cérébraux sont séparés puis débarrassés des méninges et des bulbes olfactifs. Les cortex des différents embryons sont alors prélevés, rassemblés et incubés 5 min à température ambiante, sous agitation lente et douce, dans 20 mL d'une solution commerciale Trypsine/EDTA 1X (Invitrogen, Réf. 15400-054) de PBS contenant 18,8 µM de trypsine et 6,8 µM d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique). Après décantation, les tissus sont incubés pendant 10 min à 37°C dans 8 mL de milieu de base contenant 2,5% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen) et 0,06 mg (24 à 48 unités Kunitz) de DNase. Les amas cellulaires sont ensuite dissociés mécaniquement avant d'être centrifugés 5 min à 700 x g. La suspension cellulaire obtenue est lavée 2 fois avec du PBS/glucose (centrifugation de 5 min à 700 x g) avant de remettre le culot en suspension dans le milieu de base.

Après homogénéisation de la suspension cellulaire, la densité cellulaire est estimée par comptage en cellule de Thoma. Les plaques sontensemencées à une densité cellulaire de $0,3 \times 10^6$ par puits de 1,9 cm² de surface (plaques de 4 ou 24 puits), $1,5 \times 10^6$ par puits de 9,5 cm² de surface (plaques de 6 puits) et 15×10^6 par boîtes de Pétri de 55 cm² de surface. Après 3 jours, plus de 95% des cellules adhérentes sont de type neuronal.

1-1-3. Traitements

Tous les traitements sont réalisés dans du milieu complet. La chronologie des différentes phases du protocole de traitement des neurones corticaux a été schématisée sur la figure 51.

1-1-3-1. Traitements par le peptide Aβ soluble

Les peptides synthétiques Aβ₄₀, Aβ₄₂ et Aβ₍₄₀₋₁₎ utilisés (Bachem, Voisins-le-Bretonneux, France) sont solubilisés dans l'eau ultrapure pour obtenir une solution mère à 1 mM et immédiatement congelés en fractions aliquotes à -20°C afin d'éviter leur agrégation (599). Les traitements par les peptides amyloïdes sont réalisés 5 jours après la mise en culture. Des dilutions appropriées de peptide Aβ sont réalisées extemporanément dans du milieu complet frais. Le milieu précédent est éliminé des

puits/boîtes et le milieu frais contenant le peptide A β soluble lui est substitué. Habituellement, la toxicité cellulaire du peptide est évaluée après 24 h de traitement, mais des temps plus courts, précisés dans le chapitre Résultats et Discussion, ont parfois été utilisés.

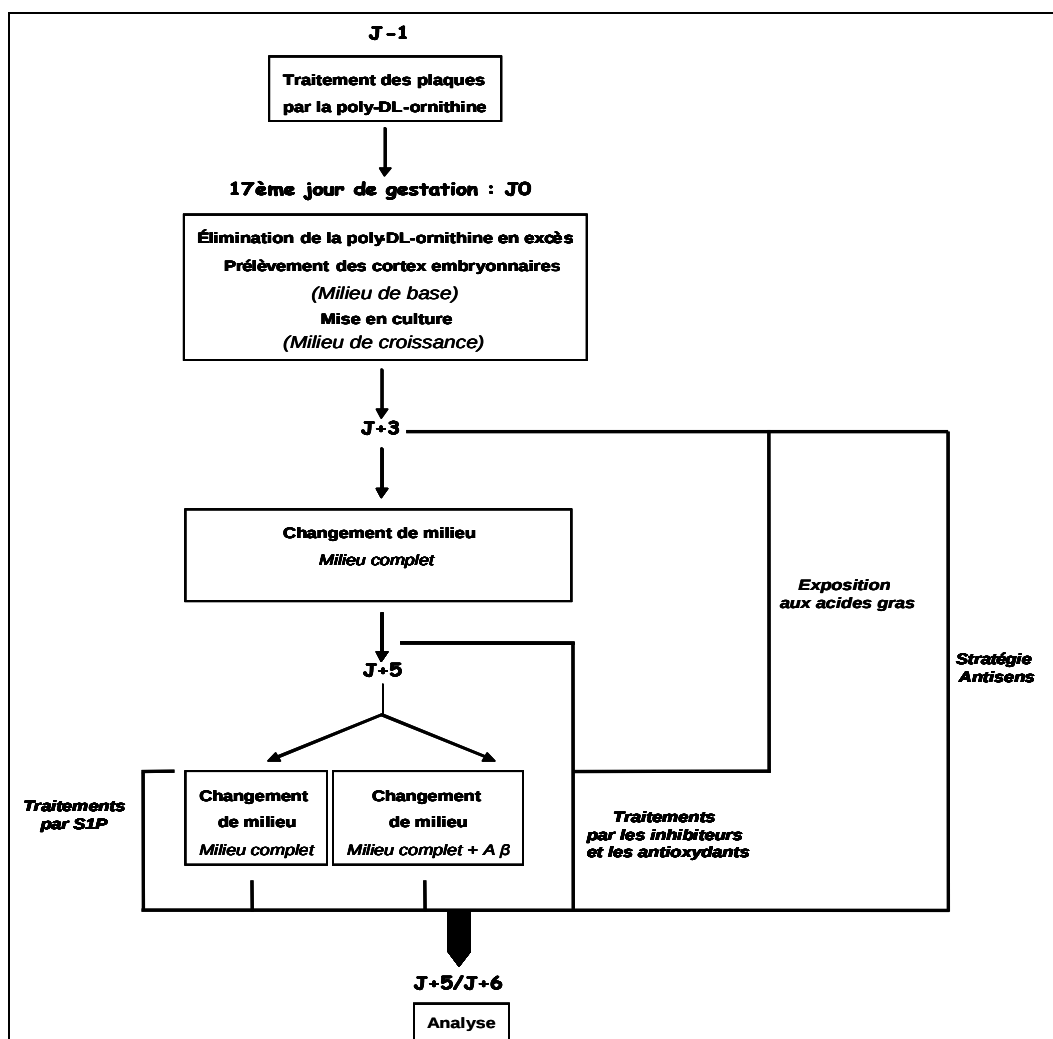


Figure 51. Traitements des neurones corticaux de rat en culture primaire

1-1-3-2. Traitements par les acides gras et lipides

Les traitements par les AG sont réalisés 3 jours après la mise en culture. L'acide stéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique, l'AA, l'EPA et le DHA (Sigma) sont repris dans l'isopropanol et conservés à -20°C, à l'obscurité et sous azote, afin de limiter les réactions d'oxydation. Les cellules sont cultivées pendant 48 h dans du milieu complet enrichi en AG à des concentrations de 5 nM à 10 μ M. Tous les témoins et les traitements ont été réalisés dans un milieu contenant 0,1% (v/v) d'albumine délipidée, avec une concentration d'isopropanol fixée à 0,5% (v/v). Après traitement, le milieu est remplacé par du milieu complet frais contenant ou non le peptide A β_{40} ou A β_{42} sous forme soluble.

Les traitements par les phospholipides ont été réalisés à l'aide d'une préparation de phospholipides (PL) extraits à partir de têtes de saumons recueillies et conservées à cette fin comme tout produit de la pêche. Le protocole original d'extraction n'emploie aucun solvant et a été optimisé par le Pr. Michel

Parmentier, le Pr. Jacques Fanni et le Dr Michel Linder, du Laboratoire de Science et Génie Alimentaires (LSGA) de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA, Institut National Polytechnique de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy). Différentes dilutions extemporanées de 0,1 à 2 μ M de phospholipides dans l'isopropanol ont été testées en absence d'albumine délipidée, à partir de préparations purifiées dont la concentration estimée est basée sur une masse moléculaire moyenne de 700 g/mol de PL.

Les traitements par la sphingosine-1-phosphate (S1P) sont réalisés simultanément au peptide A β , 5 jours après la mise en culture. La solution mère de S1P est préparée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma). Les dilutions appropriées comprises entre 0,5 et 2,5 μ M sont préparées extemporanément dans du milieu frais contenant ou non le peptide A β . Les cellules en culture sont alors traitées comme décrit précédemment dans le paragraphe 1-1-3-1.

1-1-3-3. Traitements par les agents antioxydants

Deux antioxydants ont été utilisés : le Trolox[®] (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), analogue de vitamine E, et la N-acétylcystéine (NAC), précurseur de glutathion et capable de réduire les radicaux libres par sa fonction thiol. Les traitements sont réalisés en présence de Trolox[®] à 1 mM et de NAC à 0,5 mM, 2 h avant et pendant le traitement par le peptide A β .

1-1-3-4. Traitements par les inhibiteurs

Afin de mieux appréhender les mécanismes de toxicité du peptide A β et l'implication du statut lipidique membranaire et des médiateurs lipidiques dans l'apoptose induite par ce peptide, différents inhibiteurs pharmacologiques ont été employés (tableau 5).

Les traitements par les inhibiteurs sont réalisés 2 h avant et pendant l'exposition au peptide A β . Leurs conditions respectives d'utilisation sont détaillées dans la partie Résultats et Discussion.

Tableau 5. Les inhibiteurs pharmacologiques utilisés et leurs cibles cellulaires

Cibles	Inhibiteurs	Fournisseurs
cPLA ₂	MAFP (méthyl arachidonoyl fluorophosphonate)	Calbiochem
Caspases	z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorométhylcétone N-acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-fluorométhylcétone N-acétyl-Leu-Glu-His-Asp-chlorométhylcétone	Bachem
N-SMase	3-O-méthyl-sphingomyéline (3OMeSM)	Invitrogen
A-SMase	désipramine (DES), imipramine (IMI)	Invitrogen
Sérine palmitoyl transférase	myriosine	Invitrogen
Céramide synthase	fumosine B1 (FUM)	Invitrogen
MEK1	PD98059	Invitrogen
Cathepsine D	H-Gly-Glu-Gly-Phe-Leu-Gly-D-Phe-Leu-OH	Bachem

1-1-3-5. Stratégie antisens

Afin de valider les résultats obtenus après utilisation de différents inhibiteurs, une stratégie antisens a été développée afin de bloquer sélectivement la traduction des ARNm cibles auxquels ils s'apparient. Les oligonucléotides utilisés, présentés dans le tableau 6, ont été synthétisés au service de Biologie Moléculaire du CHU de Nancy.

Les neurones corticaux de rat en culture primaire ont été préincubés pendant 48 h en présence de milieu complet contenant individuellement 4 μ M d'un oligonucléotide, avant de les exposer au peptide A β , toujours en présence de l'oligonucléotide.

Tableau 6. Séquences des oligonucléotides utilisés et cibles cellulaires associées

Cibles	Oligonucléotides	Orientation
cPLA₂	5'-CAC CAA AGT AAC CAA GGG GA ^{-3'}	Sens
	5'-TCC CCT TGG TTA CTT TGG TG ^{-3'}	Antisens
N-SMase	5'-CGA CCA GCC GGT CCA CCA GCC ^{-3'}	Antisens
	5'-AGC TGC AAT GGT TTT GTA CAC ^{-3'}	Antisens
	5'-GGC TGG TGG ACC GGC TGG TCG ^{-3'}	Sens
	5'-GTG TAC AAA ACC ATT GCA GCT ^{-3'}	Sens
A-SMase	5'-CGT TGG TGG GGC ATT GCC AGG ^{-3'}	Antisens
	5'-CCT GGC AAT GCC CCA CCA GAG ^{-3'}	Sens

1-2. Lignée cellulaire Neuro2A

1-2-1. Choix de la lignée

Issues d'une lignée de neuroblastome de souris, les cellules Neuro2A peuvent être différenciées aisément afin d'acquérir des caractéristiques neuronales.

1-2-2. Entretien de la lignée

Au stade de sub-confluence, le milieu est soigneusement aspiré et les éventuelles cellules mortes sont éliminées après rinçage du tapis cellulaire avec du milieu de croissance dont la composition est présentée dans le tableau 7.

Les cellules sont ensuite détachées du fond de la boîte à l'aide de la solution Trypsine/EDTA 1X. Après dislocation complète du tapis cellulaire, la trypsine est inhibée par addition du même volume de milieu de croissance. La suspension ainsi obtenue est soumise à une centrifugation de 5 min à 700 x g et le culot résultant est remis en suspension dans du milieu de croissance frais. Une fraction aliquote de la suspension cellulaire est prélevée, éventuellement diluée dans du milieu pour la numération cellulaire en cellule de Thoma. De nouvelles cultures sont alorsensemencées par 10⁵ cellules par puits de plaque de 6 puits.

Tableau 7. Composition des différents milieux de culture des cellules Neuro2A

Milieu	Composition	Concentration	Fournisseur
Milieu de croissance	DMEM (Réf. 41965-039) +		Gibco
	SVF	10%	Invitrogen
	Pénicilline/streptomycine	10 UI/mL	Invitrogen
Milieux de différenciation D1^a et D2^b	DMEM +		Gibco
	SVF	1%	Invitrogen
	Acide rétinoïque	5 ^a ou 10 ^b µM	Sigma
	Pénicilline/streptomycine	10 UI/mL	Invitrogen
Milieu de cryopréservation	DMEM +		Gibco
	SVF	20%	Invitrogen
	DMSO	10%	Sigma

1-2-3. Congélation et décongélation des stocks

Après amplification suffisante pour assurer le stock, les cellules Neuro2A sont décollées et la suspension obtenue est centrifugée (5 min, 700 x *g*). Le culot obtenu est ensuite remis en suspension dans un milieu de cryopréservation froid, puis conditionné en cryotubes (1 mL). La température des cryotubes est alors lentement descendue à -70°C à l'aide d'un bain d'isopropanol (Sigma). Une fois cette température atteinte, les cryotubes sont plongés dans l'azote liquide pour conservation longue.

1-2-4. Conditions de culture

De même qu'avec les neurones, toutes les manipulations sont effectuées en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire et à l'aide de matériel stérilisé ou à usage unique.

1-2-4-1. Différenciation en neurones

Vingt-quatre heures après ensemencement, le milieu de croissance des cellules Neuro2A est remplacé par le milieu de différenciation D1 contenant l'acide rétinoïque à 10 µM. Après 24 h, le milieu D1 est remplacé par le milieu de différenciation D2, contenant cette fois 5 µM d'acide rétinoïque et laissé au contact des cellules pendant 48 h. Ce traitement permet aux cellules Neuro2A d'acquérir des caractéristiques neuronales comme en témoignent les changements morphologiques et l'expression de protéines associées au cytosquelette et spécifiques des neurones.

1-2-4-2. Traitements

Après 2 jours en présence du milieu D2, les cellules sont exposées au milieu D2 supplémenté par une concentration de DHA comprise entre 50 nM et 10 µM, en présence d'albumine délipidée (0,1%, v/v). Après 48 h de prétraitement, le milieu [D2+DHA] est remplacé par du milieu D2 frais contenant ou non le peptide Aβ₄₀ comme décrit précédemment.

1-3. Synaptosomes corticaux de rat

1-3-1. Préparation et purification des synaptosomes corticaux de rat

La méthode de préparation utilisée a été optimisée à partir de celle décrite par Fleck *et al.* (248).

Les synaptosomes sont préparés à partir de tissus corticaux de rat adulte. L'animal est décapité après anesthésie sous une dose létale d'halothane. La boîte crânienne est incisée transversalement de façon à dégager le cerveau. Une fois le cerveau prélevé, le cervelet est retiré, puis les hémisphères cérébraux sont séparés. Après avoir enlevé l'hippocampe, les méninges et la substance blanche, les cortex sont prélevés et placés dans 10 volumes d'un tampon d'homogénéisation isotonique [Tris 10 mM (pH 7,4), saccharose 0,32 M, EDTA 2 mM]. Les tissus sont soumis à une homogénéisation mécanique douce par 8 allers-retours dans un potter. Les homogénats sont alors centrifugés 10 min à 750 x *g* et à 4°C (Multifuge 3 S-R ; Heraeus ; Buckinghamshire, Angleterre) afin d'éliminer les débris cellulaires qui constituent le culot P1. Le surnageant est ensuite centrifugé 20 min à 12.000 x *g* et à 4°C. Le culot P2 obtenu contenant les synaptosomes et d'autres entités subcellulaires telles que les mitochondries est repris dans 2 mL du tampon d'homogénéisation avant d'être déposé sur 3 mL de tampon [Tris 10 mM (pH 7,4), saccharose 1,2 M] dans un tube Ultraclear (Beckman Coulter ; Roissy, France). Après fractionnement par ultracentrifugation à 87.000 x *g* dans un rotor MLS-50 (Beckman-Coulter), le culot P3 contenant les mitochondries est éliminé. Par contre, la bande translucide visible à l'interface 0,32 M/1,2 M est prélevée, reprise dans le même tampon d'homogénéisation pour obtenir un volume final de 2 mL, puis déposée sur 3 mL de tampon [Tris 10 mM (pH 7,4), saccharose 0,8 M] pour une nouvelle ultracentrifugation. Le culot P4 correspondant à la fraction de synaptosomes purifiés est alors repris dans 1 mL de tampon de Locke [HEPES 5 mM (pH 7,4), NaCl 154 mM, KCl 5,6 mM, CaCl₂ 2,3 mM, NaHCO₃ 3,6 mM, glucose 5 mM] et conservé à 4°C. Ce protocole ainsi mis au point est illustré de façon synthétique par la figure 75.

1-3-2. Dosage des protéines

Le réactif utilisé est constitué d'acide bicinchoninique et d'ions cuivriques en milieu alcalin (kit BCA, Interchim, Montluçon, France). Les ions cuivreux générés par réduction par les liaisons peptidiques forment avec le BCA un complexe stable et intensément coloré. Le dosage est réalisé en microplaque et l'intensité de la coloration est mesurée à 570 nm. La concentration protéique des échantillons est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage entre 25 et 1.500 µg/mL d'albumine sérique bovine (BSA) .

1-3-3. Traitements

Les synaptosomes sont traités par les AG après 24 h d'équilibration dans l'incubateur à 37°C, à raison d'une fraction aliquote correspondant à 20 µg de protéines par puits en microplaques de 96 puits. Les conditions de traitement par le DHA et par les PL de saumon sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe 1-1-3-2.

2. Étude de la viabilité cellulaire et des marqueurs d'apoptose

2-1. Test d'activité mitochondriale

2-1-1. Test au MTT

2-1-1-1. Principe

Les sels de tétrazolium sont des composés organiques hétérocycliques qui, après réduction dans les cellules métaboliquement actives, forment des cristaux de formazan insolubles et colorés. Ces composés sont utilisés comme indicateur de viabilité, de prolifération cellulaire ou de cytotoxicité (550). Le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, Sigma) est un substrat dont le cycle tétrazolium est clivé dans les mitochondries actives par la succinate déshydrogénase pour former un précipité violet détectable par spectrophotométrie après solubilisation.

2-1-1-2. Protocole expérimental

À la fin de la période de traitement, un volume d'une solution tampon PBS/glucose contenant 12 mM de MTT correspondant au 10^{ème} du volume de milieu de culture contenu dans le puits est ajouté. Les cellules sont ensuite incubées 1 à 2 h à 37°C jusqu'à l'apparition des cristaux de formazan. Le surnageant est alors remplacé par 150 µL de DMSO de façon à lyser les cellules et dissoudre les grains de formazan. Après 10 min d'agitation, 100 µL de chaque solution de DMSO sont transférés en plaques de 96 puits et l'intensité de la coloration est mesurée à 550 nm au moyen d'un lecteur de microplaque (Fluostar, BMG LabTechnologies, Champigny-sur-Marne).

2-1-2. Marquage par la sonde Mitotracker

2-1-2-1. Principe

Les marqueurs fluorescents classiques de l'activité mitochondriale tels que la rhodamine 123 sont séquestrés dans la mitochondrie fonctionnelle et rapidement éliminés lors de l'étape de fixation qui conduit à une perte du potentiel $\Delta\psi_m$ mitochondrial. La sonde Mitotracker (Molecular Probes) utilisée traverse la membrane par diffusion passive pour s'accumuler dans les mitochondries métaboliquement actives. La présence d'un groupement chlorométhyl réactif lui permet de rester dans la membrane malgré la perte du potentiel $\Delta\psi_m$, permettant ainsi une fixation des cellules ou vésicules à analyser.

2-1-2-2. Analyse quantitative par cytométrie en flux

2-1-2-2-1. Principe

La cytométrie en flux est définie comme l'étude de cellules en suspension, isolées par un flux liquide ou système fluidique. Elle consiste en l'analyse des signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Ce procédé d'analyse cellule par cellule est multiparamétrique, qualitatif, quantitatif et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs

milliers d'événements par seconde. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés intrinsèques des particules. Ils correspondent dans ce cas aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule (diffusion aux petits angles ou *forward scatter*, FSC), à sa structure interne ou granulométrie (diffusion aux grands angles ou *side scatter*, SSC) ou à la fluorescence intrinsèque de certaines cellules, notamment les cellules végétales et le phytoplancton. Les propriétés optiques induites par des sondes fluorescentes peuvent également servir à marquer des cellules et être exploitées en cytométrie en flux par analyse de la fluorescence ainsi acquise. L'ensemble des signaux séparés par des filtres optiques est collecté, amplifié par des photomultiplicateurs et numérisé.

2-1-2-2-2. Protocole expérimental

Toutes les analyses de cytométrie ont été réalisées au CHRU de Nancy, dans le service de Biochimie de l'Hôpital Central, dirigé par le Pr. Jean-Luc Olivier.

Une fraction aliquote de synaptosomes correspondant à 50 µg de protéine est incubée 30 min à 37°C dans 1 mL de solution tampon PBS contenant la sonde fluorescente Mitotracker (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) à une concentration finale de 200 nM. Après incubation, les synaptosomes sont centrifugés 5 min à 6.000 x *g* et le surnageant contenant la sonde en excès est éliminé. Les synaptosomes sont ensuite fixés 1 h à 37°C à l'aide d'une solution tampon de PBS contenant 0,25% (m/v) de *para*-formaldéhyde (PAF). À l'issue de la période de fixation, les synaptosomes sont lavés 2 fois avec du PBS/glucose et repris dans 1 mL de PBS avant d'être monodispersés dans la gaine liquidienne du cytomètre. L'excitation est réalisée à une longueur d'onde de 488 nm et l'émission est détectée à 530 nm. La sensibilité des photomultiplicateurs FL₁ et FL₂ est réglée à 594 V et 603 V, respectivement. L'analyse est poursuivie jusqu'à l'acquisition de 30.000 événements. Des cytogrammes en 2 dimensions sont alors établis, représentant la fluorescence des vésicules en fonction de FSC directement proportionnel à leur taille.

L'analyse des échantillons se décompose obligatoirement en 2 étapes. La première étape mesure l'autofluorescence des cellules incubées dans les conditions indiquées ci-dessus, mais sans ajout de la sonde fluorescente, évaluant donc la proportion de « faux positifs ». La seconde étape fait suite à l'incubation en présence du marqueur et détermine la proportion des cellules fluorescentes recherchées.

2-2. Évaluation de l'intégrité membranaire

2-2-1. Marquage cellulaire par la calcéine

2-2-1-1. Principe

La méthode utilisée repose sur l'utilisation d'un marqueur fluorescent, la calcéine, modifiée par un groupement neutre acétoxyméthylester (AM) permettant la diffusion à travers la membrane plasmique. Après internalisation de la sonde, la liaison ester est clivée par des estérases cellulaires aspécifiques,

généralisant ainsi un composé fluorescent qui, hydrophile, reste piégé dans la cellule. Ce marqueur permet d'évaluer l'activité métabolique de la cellule par la présence d'estérases actives, et l'intégrité membranaire.

2-2-1-2. Protocole expérimental

Le marquage est réalisé sur une fraction aliquote de synaptosomes équivalant à 5 µg de protéines. Les synaptosomes sont incubés 20 min à 4°C et à l'obscurité dans une solution de PBS contenant 4 µM de calcéine, avant d'être introduits dans le cytomètre comme décrit dans le paragraphe 2-1-2-2.

2-2-2. Libération de la lactate déshydrogénase

2-2-2-1. Principe

La rupture de la membrane plasmique est un événement précoce de la nécrose, mais elle peut aussi survenir secondairement à la mort apoptotique. En effet, l'absence de macrophages dans les modèles *in vitro* conduit à une cytolysse qualifiée de nécrose secondaire lors des phases tardives de l'apoptose. La rupture de la membrane plasmique reflète donc la mortalité cellulaire d'une culture. Elle entraîne la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire. En conséquence, la lactate déshydrogénase (LDH) cytosolique est libérée et la mesure de son activité dans le milieu permet d'évaluer la mort cellulaire et la cytotoxicité d'un traitement. L'activité LDH dans le milieu de culture est mesurée à l'aide du kit LDH (Boehringer-Mannheim, Allemagne), selon le principe décrit par la figure 52.

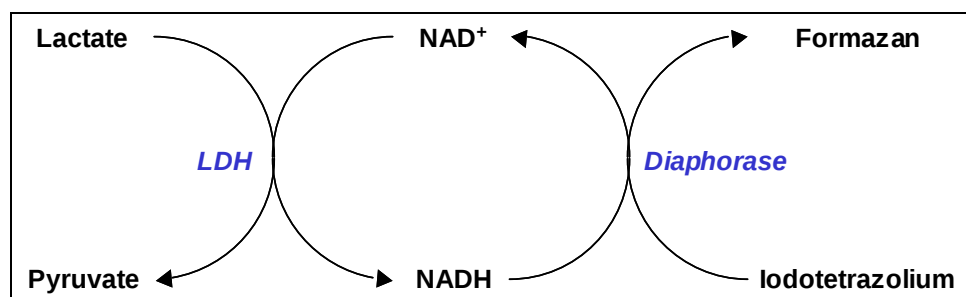


Figure 52. Séquence réactionnelle du dosage enzymatique de la lactate déshydrogénase

2-2-2-2. Protocole expérimental

À partir de chaque puits de plaque de culture cellulaire, 60 µL de milieu sont prélevés et centrifugés à 1.000 x g pour éliminer d'éventuelles cellules ; puis, 50 µL de surnageant sont transférés dans un puits de microplaque. Un même volume de réactif est alors ajouté contenant le substrat lactate, l'iodotétrazolium (le colorant), la diaphorase et le coenzyme NAD⁺. Après incubation de 90 min à température ambiante et à l'obscurité, le formazan formé est dosé par spectrophotométrie à 490 nm au moyen d'un lecteur de microplaque (Fluostar, BMG LabTechnologies). L'absorbance mesurée pour le milieu des cellules témoins, fixée à 100%, est utilisée comme référence pour exprimer en pourcentage celle pour les milieux des cellules traitées.

2-3. Étude du cycle cellulaire

2-3-1. Principe

Le cycle cellulaire est étudié par cytométrie en flux grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes capables de s'insérer de façon stoechiométrique entre les bases azotées de la double hélice d'ADN, produisant ainsi une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ADN dans la cellule. Les différentes phases du cycle peuvent ainsi être distinguées selon la fluorescence émise, sachant que les cellules en phases G_0 et G_1 sont diploïdes, celles en phases G_2 et M sont tétraploïdes et celles en phase S présentent une fluorescence intermédiaire liée à une quantité d'ADN comprise entre 2 et $4n$.

La mise en œuvre de cette technique doit tenir compte de la présence d'ARN double brin capable d'interférer avec le marquage de l'ADN, justifiant l'application d'un traitement préalable par les RNases. En outre, il faut également éliminer la possibilité d'un passage concomitant de 2 cellules diploïdes dans la gaine du cytomètre, pouvant conduire artificiellement à l'enregistrement d'un signal fluorescent dont l'intensité est équivalente à celle d'une cellule tétraploïde. Pour l'éviter, l'analyse doit prendre en compte le temps de passage des cellules devant le laser et distinguer celles en phases G_2/M qui, du fait de leur taille moins importante qu'un doublet de cellules, passent plus vite devant le laser et présentent de ce fait un signal moins étalé.

2-3-2. Protocole expérimental

À la fin de la période de traitement, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS froid, puis fixées 15 min à 4°C dans une solution de PBS contenant 1% de PAF. Les cellules sont ensuite récupérées par grattage avant d'être centrifugées 5 min à 700 x g . Les culots cellulaires obtenus sont alors remis en suspension dans 1 mL de PBS, puis traités pendant 30 min par 100 μ L d'une solution aqueuse contenant 150 U/mL de RNase (Boehringer Mannheim). Les cellules sont ensuite marquées par ajout d'une solution tampon de PBS contenant 0,05% (m/v) d'iodure de propidium ($\lambda_e = 536$ nm ; $\lambda_m = 623$ nm), 0,15% (m/v) de BSA et 0,05% (m/v) d'azoture de sodium. Les cellules sont laissées au contact du colorant 10 min à température ambiante, filtrées sur une membrane de nylon avant d'être injectées dans la gaine liquidienne du cytomètre de flux.

2-4. Marqueurs morphologiques de l'apoptose

2-4-1. Visualisation des corps apoptotiques

2-4-1-1. Principe

L'apoptose s'accompagne au niveau nucléaire d'une condensation suivie d'une fragmentation de la chromatine. Ces modifications peuvent être visualisées à l'aide de DAPI (4,6-diamidino-2-phényl-indole, Sigma), molécule fluorescente capable de se fixer sur des séquences nucléotidiques constituées

d'une succession de paires de bases A-T. Alors que les cellules saines sont peu fluorescentes, la condensation de la chromatine dans les cellules en apoptose induit une augmentation de l'intensité de fluorescence. À un stade plus tardif du processus apoptotique, l'utilisation de ce marqueur permet de mettre en évidence la fragmentation de l'ADN et la formation des corps apoptotiques.

2-4-1-2. Protocole expérimental

La méthode utilisée a été décrite par Pillot *et al.* (599). À l'issue du traitement, les cellules, cultivées sur lamelle de verre, sont lavées avec du PBS, incubées 10 min en solution de PBS contenant 0,1 µg/mL de DAPI, puis lavées à l'aide de PBS. La lamelle de verre est alors déposée sur une lame préalablement traitée par une colle Fluoprep™ (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France). L'examen par microscopie en épifluorescence est réalisé à la longueur d'onde de 365 nm, à l'aide d'un microscope à objectif à immersion à huile (Nikon, Melville, NY, USA) équipé d'une caméra numérique (Nikon DXM1200). Les noyaux apoptotiques ont été comptés sur 10 champs par puits. Les résultats obtenus correspondent aux moyennes $\pm$ écarts types, calculés sur 2 cultures indépendantes comprenant 2 puits par traitement.

2-4-2. Perte de l'intégrité du cytosquelette

2-4-2-1. Principe

L'apoptose s'accompagne de nombreuses modifications morphologiques, parmi lesquelles une perte de l'intégrité du cytosquelette qui peut être suivie par immunodétection des protéines le composant (actine, tubuline), puis observation en microscopie en fluorescence. La méthode utilisée a été préalablement décrite par Kriem *et al.* (440). Elle repose sur l'utilisation d'un anticorps anti- β -tubuline.

2-4-2-2. Protocole expérimental

À la fin de la période de traitement, les cellules, cultivées sur lamelle de verre, sont lavées 2 fois avec du PBS froid, puis fixées 15 min à 4°C dans une solution de PBS contenant 4% de PAF. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS, puis perméabilisées 30 min à température ambiante à l'aide d'une solution de PBS contenant 3% (m/v) de BSA et 0,1% (v/v) de Triton X-100. Après plusieurs lavages avec la solution [PBS, BSA 3%], les cellules sont incubées 1 h à température ambiante dans une solution [PBS, BSA 3%] contenant un anticorps monoclonal anti- β -tubuline (1:250). Les cellules sont alors lavées, puis mises en présence d'un anticorps d'âne anti-IgG de souris (1:1.000) couplé au fluorochrome FITC (isothiocyanate de fluorescéine) pendant 1 h. Après lavages, la lamelle de verre est montée sur lame pour l'examen en microscopie en fluorescence à 490 nm réalisé comme décrit dans le paragraphe 2-4-1-2. Les cellules présentant un cytosquelette altéré ont été dénombrées selon la procédure décrite pour les noyaux apoptotiques (paragraphe 2-4-1).

2-5. Voies de signalisation impliquées dans la mort neuronale

2-5-1. Marquage par immunofluorescence

Le protocole utilisé est le même que celui décrit précédemment pour le marquage tubuline. Les différents anticorps ont été utilisés après dilutions dans les conditions décrites dans le tableau 8.

Tableau 8. Conditions d'utilisation des différents anticorps

Utilisation	Protéines recherchées	Anticorps primaires		Anticorps secondaires	
		Source	Dilution	Source	Dilution
Immunofluorescence et analyses en microscopie	Akt totale	Souris	1 : 1.000	Chèvre	1 : 2.000
	Akt phosphorylée	Lapin	1 : 1.000	Chèvre	1 : 2.000
	flotilline-1	Souris	1 : 1.000	Chèvre	1 : 2.000
Immunoblots	ERK1/2 totales	Lapin	1 : 1.000	Chèvre	1 : 2.000
	ERK1/2 phosphorylées	Souris	1 : 1.000	Chèvre	1 : 2.000
	adduits de Michael protéine/HNE	Lapin	1 : 1.000	Chèvre	1 : 2.000
	APP	Souris	1 : 500	Chèvre	1 : 2.000
	flotilline-1	Souris	1 : 1.000	Chèvre	1 : 2.000
	SNAP-25	Souris	1 : 1.000	Chèvre	1 : 2.000
	récepteur de la transferrine (rTf)	Souris	1 : 1.000	Chèvre	1 : 2.000

2-5-2. Microscopie confocale

2-5-2-1. Principe

Le microscope confocal est un tomographe optique capable de réaliser des sections virtuelles d'édifices tridimensionnels complexes tels que les cellules. Le microscope à fluorescence classique capte simultanément la fluorescence émise en tout point et sur toute l'épaisseur de l'objet, donnant de ce fait des images dont la résolution peut être altérée par l'excitation des fluorochromes situés hors du plan focal qui peut générer un bruit de fond. La microscopie confocale à balayage laser utilise elle une configuration optique dans laquelle la source est fortement focalisée sur un point qui peut être balayé, éliminant ainsi la lumière provenant des plans défocalisés. La microscopie confocale utilise le rayon laser excitateur comme une source lumineuse monochromatique dont le faisceau, de quelques 10^{èmes} de millimètres de diamètre, pénètre dans une préparation marquée par des fluorochromes. L'ensemble du dispositif permet alors d'acquérir des images de meilleure résolution, de plus grand contraste et d'une profondeur de champ plus faible et plus précise qu'un microscope conventionnel, permettant donc littéralement d'obtenir des coupes optiques virtuelles de 0,6 µm. Le signal lumineux, émis par l'échantillon uniquement par le point illuminé, est « sélectionné » par un diaphragme, détecté et récupéré par des photomultiplicateurs, amplifié et traité afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, puis numérisé. L'image de la préparation est construite par balayage du champ par le laser, point par

point, selon l'axe des X et l'axe des Y grâce à des miroirs dichroïques. La saisie des différentes sections optiques dans l'épaisseur de l'échantillon est réalisée en se déplaçant dans la préparation suivant l'axe Z. Le microscope confocal est donc un système de visualisation qui, en permettant la localisation *in situ* très précise de multiples marqueurs moléculaires dans différents plans, s'avère indispensable à l'étude tridimensionnelle de l'organisation fonctionnelle des cellules en culture, fixées ou vivantes.

2-5-2-2. Protocole expérimental

Les analyses ont été réalisées avec la contribution du Dr Céline Hoffmann, responsable du service de Microscopie et d'Imagerie du Centre de Recherche Public en Santé (CRP-Santé) de Luxembourg, utilisant un microscope inversé Axiovert 200 associé au système d'acquisition et d'analyse d'images confocales LSM 510 Meta (Carl Zeiss AG, Allemagne). La stratégie analytique de la microscopie confocale a été choisie afin de visualiser et d'analyser la distribution spatiale, dans des neurones cultivés sur lamelles, de protéines marquées sélectivement par immunofluorescence selon le protocole décrit dans le paragraphe 2-5-1. Après fixation, marquage et montage, les lames sont positionnées sous un objectif à immersion à huile Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil DIC. Les protéines Akt sont ciblées par 2 anticorps distincts, l'un spécifique de la forme phosphorylée, l'autre de toutes les protéines Akt, quel que soit leur degré de phosphorylation. L'anticorps secondaire étant marqué par l'AlexaFluor® 555, la fluorescence émise est détectée à 543 nm. Pour chaque préparation, 2 enregistrements sont effectués, d'une part les images obtenues en balayant l'axe Z, et d'autre part l'image compilée.

2-5-3. Immunoblots

2-5-3-1. Préparation des extraits cellulaires

Les neurones sont lavés 2 fois à l'aide de PBS froid avant d'être incubés sur glace pendant 20 min en présence d'une solution de lyse HEPES 25 mM (pH 7,5) contenant 1% Triton X-100, 5 mM d'EDTA, 1 mM d'EGTA (éthylène glycol bis(2-aminoéthyl éther)-N,N,N'-tétracétate), 5 mM de MgCl₂, 5 mM de DTT (dithiothréitol), 1 mM de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl), 1 mM d'*ortho*-vanadate de sodium, 10 µg/mL de leupeptine, 10 µg/mL de pepstatine et 5 µg/mL d'aprotinine. La suspension est homogénéisée par aspirations et refoulements en pointe jaune avant d'être soumise à 3 cycles rapides de congélation/décongélation. Les cellules sont ensuite centrifugées 30 min à 4°C et 10.000 x *g*. Le surnageant protéique est conservé à -20°C et les protéines sont dosées comme décrit précédemment dans le paragraphe 1-3-2.

2-5-3-2. Électrophorèse

La migration est réalisée en conditions dénaturantes par SDS-PAGE selon la méthode en tampons discontinus décrite par Laemmli & Favre (447). Les échantillons sont préalablement dénaturés pendant 5 min à 95°C en présence du tampon échantillon de Laemmli [Tris-HCl 125 mM (pH 8,0), 4% (m/v) SDS, 10% (v/v) β-mercaptoéthanol, 0,004% (m/v) bleu de bromophénol]. Le gel (système

de migration verticale, Bio-Rad ; Hercules, CA, États-Unis), d'1 mm d'épaisseur, est formé d'un gel de concentration à 5% de polyacrylamide en tampon [Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 0,1% SDS] et d'un gel de séparation à 8-12% de polyacrylamide (selon la masse moléculaire des protéines d'intérêt) en tampon [Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 0,1% SDS]. La migration électrophorétique est réalisée en tampon [Tris 1,5 mM (pH 8,3), glycine 19,2 mM, 0,01% SDS], à voltage constant de 80 V pendant 15 min (dans le gel de concentration) et de 150 V pendant 90 min environ (dans le gel de séparation).

2-5-3-3. Électrotransfert

La technique utilisée est dérivée de celle décrite par Towbin *et al.* (726). Une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) est immergée 30 s dans le méthanol, puis équilibrée 10 min dans le tampon de transfert [Tris 48 mM (pH 9,2), glycine 39 mM, SDS 1,3 mM, 20% (v/v) méthanol]. À l'issue de la migration électrophorétique, le gel est équilibré 10 min dans le tampon de transfert avant d'être placé au contact de la membrane entre 2 feuilles de papier Whatmann® imbibées de tampon de transfert. L'ensemble est disposé dans une cellule de transfert horizontal semi-sec (Trans-Blot SD ; Bio-Rad). Les protéines migrent du gel vers la membrane sous un voltage constant de 10 V pendant 30 min.

2-5-3-4. Immunorévélation des protéines

Après électrotransfert, la membrane de PVDF est immergée dans la solution bloquante [Tris 2 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, 0,1% (v/v) Tween-20, 5% (m/v) lait écrémé en poudre]. Après saturation des sites de fixation aspécifique, la membrane est incubée la nuit à 4°C sous agitation orbitale en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution bloquante comme décrit dans le tableau 8.

Après lavages dans un tampon [Tris 2 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, 0,1% Tween-20], la membrane est incubée 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase. La membrane est lavée et la protéine d'intérêt est détectée par chimioluminescence et autoradiographie (kit ECL et Hyperfilm, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Angleterre). L'intensité des signaux révélés est mesurée par analyse densitométrique après numérisation des films (Versa-Doc, Bio-Rad). Pour établir la distribution des protéines d'intérêt dans les fractions membranaires purifiées (paragraphe 5), l'intensité relative de chaque signal détecté a été calculée en rapportant son intensité à la somme de celle de toutes les bandes.

2-5-4. Tests fonctionnels

2-5-4-1. Mesure de l'activité de la phospholipase A₂ cytosolique

La libération d'AA par la cPLA₂ des neurones a été mesurée comme décrit par Kriem *et al.* (440). Les cellules sont préincubées en présence de 1 µCi/mL de [³H]-AA (Amersham Biosciences) dans le milieu pendant 24 h. Le milieu de culture contenant le peptide Aβ est alors mis au contact des cellules,

puis prélevé après 10 min d'incubation, délai correspondant au plateau de libération de l'AA due au peptide A β ₄₀ (440). Le tapis cellulaire est ensuite lavé avec du PBS contenant 0,2% (m/v) d'albumine délipidée, puis avec du PBS. Puis, les neurones sont lysés avec une solution à 0,5 M de NaOH. Une solution de scintillation (PicoFluor[®] 40, Packard Instrument Company, Rungis, France) est ajoutée au milieu de culture et au lysat cellulaire et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un scintillateur (Packard Instrument Company). Les résultats expriment la quantité de [³H]-AA libérée dans le milieu rapportée à la quantité totale de [³H]-AA incorporée dans les neurones.

2-5-4-2. Mesure de l'activation des caspases

L'activité protéolytique des caspases-3 et -9 a été évaluée en suivant le clivage des substrats fluorophores *N*-acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminométhylcoumarine (Ac-DEVD-AMC) et *N*-acétyl-Leu-Glu-His-Asp-aminométhylcoumarine (Ac-LEHD-AMC) comme décrit par Sponne *et al.* (694). Les extraits cellulaires sont préparés et la concentration protéique évaluée comme le décrit le paragraphe 2-5-3-1. Les substrats fluorophores sont incubés en concentration finale de 0,1 mM pendant 2 h à 37°C avec 50 µg de protéines. Leur clivage protéolytique est ensuite évalué par mesure de la fluorescence émise à 460 nm après excitation à 360 nm.

2-5-4-3. Mesure de l'activation des sphingomyélinases

À la fin de la période de traitement, les cellules (2 x 10⁶ par puits de plaques de 6 puits) sont lavées avec du PBS et disposées sur un lit de glace, avant d'être lysées dans une solution de PBS contenant 0,1% (v/v) de Triton X-100 pendant 10 min. Les débris cellulaires sont alors dispersés par sonication à 0°C et les concentrations de protéines sont mesurées comme décrit ci-dessus.

L'activité catalytique des sphingomyélinases (SMases) est évaluée en suivant le clivage du substrat fluorogène HMU-P-Chol (6-hexadécanoylamino-4-méthyl-ombelliféryl phosphocholine, Moscerdam Substrates, Rotterdam, Pays-Bas) comme décrit par Kilkus *et al.* (408). Elle est mesurée en microplaque, après incubation pendant 10 h de 25 µg de protéines en présence de 0,6 mM de substrat, 0,1% (v/v) de Triton X-100 et 0,2% (m/v) de CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate), respectivement dans un tampon [acétate de sodium 150 mM (pH 4,5)] ou [PBS (pH 7,4), MgCl₂ 0,5 mM] pour l'activité SMase acide ou neutre. La fluorescence émise est mesurée à 460 nm après excitation à 370 nm.

3. Évaluation du stress oxydant

3-1. Dosage du glutathion intracellulaire

3-1-1. Préparation des échantillons

À l'issue de la culture, le tapis cellulaire est rapidement lavé 2 fois avec du PBS froid. La boîte ou

la plaque est placée sur un lit de glace et les cellules sont aussitôt recouvertes d'une solution de PAE froide [HClO_4 3,3% (v/v), EDTA 0,6 mM] comme décrit par Begni *et al.* (50), afin de préserver au plus tôt le glutathion des enzymes de dégradation et d'éviter le risque d'oxydation susceptible de réduire artificiellement la proportion de GSH. Les extraits cellulaires sont aussitôt récupérés par grattage. La suspension obtenue est centrifugée 10 min à 4°C et à 13.000 x *g* pour séparer les protéines et le glutathion libre, respectivement précipitées dans le culot et soluble dans le surnageant acide. Les 2 fractions sont aussitôt individualisées et congelées séparément à -70°C pour être analysées par HPLC au sein du service de Biochimie du Pr. J.-L. Olivier (Hôpital Central, CHRU de Nancy), avec le concours du Dr. Catherine Malaplate-Armand et du Dr. Marie-Christine Escanyé.

3-1-2. Protocole expérimental

La méthode utilisée consiste en une chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en système de partage à polarité de phases inversée (colonne analytique Spherisorb 80-5 ; Waters, St-Quentin-en-Yvelines, France), couplée à un dispositif de réaction post-colonne entre le glutathion réduit (GSH) et l'*ortho*-phtaldéhyde ou OPA et détection de l'adduit fluorescent (473).

Le surnageant acide issu de la déprotéinisation de l'un des échantillons cellulaires est rapidement décongelé dans un bain-marie à 37°C avant injection dans le chromatographe. L'adduit résultant est détecté (Modèle Waters 470) par la fluorescence émise à 440 nm après excitation à 340 nm et quantifié grâce à un dispositif informatique de traitement et d'acquisition de données (Millenium, Waters) pour intégrer les chromatogrammes obtenus.

Le glutathion oxydé sous forme de disulfure (GSSG) est dosé dans les mêmes conditions, mais après réduction préalable obtenue en incubant le surnageant en présence de 7 mM de DTT en conditions alcalines 20 min à température ambiante et à l'obscurité avant réacidification par dilution au 10^{ème} dans la solution [HCl 0,1 M, EDTA 2 mM]. Le signal obtenu après oxydation correspond alors au glutathion libre total et la concentration de GSSG est déduite en lui soustrayant celle de GSH.

Les concentrations de GSH sont calculées par comparaison de l'aire des pics intégrés pour les échantillons d'une gamme d'étalonnage entre 0,05 et 2 µg/mL, puis normalisées avec les concentrations de protéines des culots correspondants mesurées par une méthode modifiée à partir de la méthode de Lowry *et al.* (500). Après précipitation dans la solution PAE, les culots protéiques obtenus après centrifugation 5 min à 13.000 x *g* et à 4°C sont solubilisés dans 25 µL d'une solution aqueuse de soude à 1 M. La solution est alors incubée 10 min à température ambiante dans 1 mL de réactif de Biuret [carbonate de sodium 190 mM, tartrate de sodium 10 mM, sulfate de cuivre 5H₂O 1,6 mM, SDS 8 mM, NaOH 0,1 M]. Puis, 100 µL de réactif de Folin-Ciocalteu sont ajoutés et la préparation est incubée 1 h à 37°C. L'absorbance est alors mesurée à 750 nm. La gamme d'étalonnage utilisée pour déduire la concentration de protéines s'étend de 2,5 à 25 µg de BSA par réaction.

3-2. Immunodétection des adduits protéine–4-hydroxynonénal

Dans les cellules soumises à des conditions pro-oxydantes, le 4-hydroxynonénal (HNE) s'accumule comme produit terminal de la peroxydation lipidique. Il peut aussi former des adduits avec les protéines par interaction de la fonction aldéhydique très réactive avec les groupements SH et NH₂ libres des acides aminés.

Les extraits cellulaires sont préparés et leur concentration protéique évaluée comme décrit dans le paragraphe 1-3-2. Une fraction aliquote correspondant à 10 µg de protéines de chaque échantillon est déposée sur une membrane de nitrocellulose grâce au dispositif de Slot-Blot (Bio-Rad). La membrane est ensuite soumise à l'immunorévélation des adduits de Michael protéine–HNE dans les conditions décrites dans le paragraphe 2-5-3-4 et le tableau 8.

4. Étude du statut lipidique et de l'architecture membranaire

4-1. Extraction et purification des microdomaines membranaires

La méthode utilisée a été optimisée à partir de celle décrite par Ledesma *et al.* (463) et repose sur les propriétés physicochimiques des microdomaines membranaires, en particulier leur résistance aux détergents et leur faible densité.

4-1-1. Séparation des fractions membranaires

La procédure entière se déroule sur glace ou à 4°C. Après traitements, les neurones corticaux sont lavés 2 fois avec du PBS froid, avant d'être incubés 10 min en présence d'une solution [Tris 5 mM (pH 7,5), EDTA 2 mM]. Après incubation, les constituants cellulaires sont récupérés par grattage, homogénéisés par 10 aspirations/refoulements dans une aiguille 23G x 1¼'' de 0,6 mm de diamètre interne (Becton-Dickinson), puis centrifugés 30 min à 100.000 x *g* et à 4°C dans un rotor MLS-50 (Beckman-Coulter, Roissy, France). Le surnageant obtenu contenant les protéines solubles est stocké à –20°C, alors que la fraction membranaire est reprise dans 500 µL d'une solution [MES 25 mM (pH 7,4), DTT 5 mM, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM, leupeptine 10 µg/mL, pepstatine 10 µg/mL, aprotinine 5 µg/mL, *ortho*-vanadate de sodium 1 mM, 1% Triton X-100]. Après 1 h d'incubation sur glace, le lysat cellulaire obtenu est homogénéisé par 20 aspirations/refoulements dans une aiguille 23G x 1¼''. La concentration de saccharose dans le lysat est alors ajustée à 45% par ajout d'un volume d'une solution [Tris 20 mM (pH 7,4), 90% (m/v) saccharose]. Le mélange obtenu est déposé au fond d'un tube Ultraclear™ de 5 mL (Beckman-Coulter). Un gradient discontinu est ensuite formé par l'ajout successif de 3 mL de solution [Tris 20 mM (pH 7,4), 35% saccharose] puis d'1 mL d'une solution [Tris 20 mM, 5% de saccharose]. Les tubes sont centrifugés 18 h, à 150.000 x *g* dans un rotor MLS-50 (Beckman-Coulter), à 4°C.

Après centrifugation, 10 fractions de 500 μL sont prélevées une à une avec précaution, à la pipette et par le haut à partir de chaque tube. Toutes les fractions sont homogénéisées 1 à 2 min au vortex, à l'exception de la fraction 10 qui est soumise à une sonication à 0°C. Ce protocole ainsi mis au point est illustré de façon synthétique par la figure 91.

4-1-2. Analyse de la composition des fractions obtenues

4-1-2-1. Dosage du cholestérol

Le cholestérol est une molécule particulièrement importante dans la structure des microdomaines membranaires. Il a donc été dosé dans le but d'identifier les fractions contenant ces microdomaines.

4-1-2-1-1. Principe

La présence de cholestérol dans les différentes fractions obtenues lors de la préparation des microdomaines membranaires a été mise en évidence à l'aide d'un kit de dosage du cholestérol (Cholestérol RTU[®] ; BioMérieux). Ce dosage repose sur la séquence des réactions catalysées par les cholestérol estérase, cholestérol oxydase et peroxydase, séquence résumée par la figure 53.

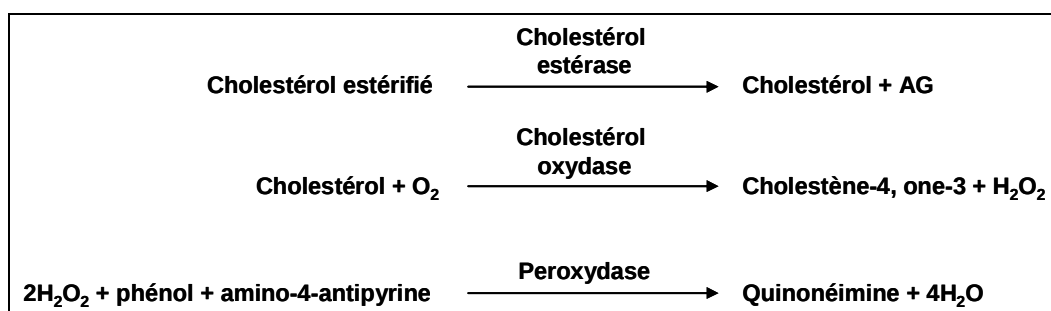


Figure 53. Séquence réactionnelle du dosage enzymatique du cholestérol

4-1-2-1-2. Protocole expérimental

Une fraction aliquote de 10 μL de chaque fraction est prélevée et déposée en microplaque de 96 puits (Falcon). Un volume de 200 μL du réactif RTU [MOPS 20 mM (pH 7,0), phénol 15 mM, cholate de sodium 3,74 mM, cholate de magnésium 20 mM, $\geq 0,1\%$ agent tensioactif, amino-4-antipyrine 0,5 mM, ≥ 1 U/mL peroxydase, $\geq 0,2$ U/mL cholestérol oxydase, $\geq 0,125$ U/mL cholestérol estérase] est ajouté. Après 10 min d'incubation à température ambiante, la concentration du chromophore, la quinonéimine, est évaluée à partir de l'absorbance mesurée à 500 nm.

Le dosage est réalisé en parallèle sur un échantillon standard (Unitrol[®]) de concentration de cholestérol connue (servant à valider le dosage) et sur un calibre multiparamétrique (Calimat[®]) dont le titre est 5,17 mM (2 g/L). La concentration de l'échantillon est calculée à l'aide de la formule $[Chol]e = (Ae/Ac) \times n$, dans laquelle $[Chol]e$ correspond à la concentration de cholestérol de la fraction, Ae et Ac à l'absorbance de l'échantillon et du Calimat, et n à la concentration du Calimat.

4-1-2-2. Immunodétection des marqueurs spécifiques

Des protéines marqueurs, spécifiques des microdomaines membranaires et des régions fluides de la membrane plasmique, respectivement la flotilline et le récepteur de la transferrine (rTf), ont été recherchées par immunodétection selon la procédure décrite dans le paragraphe 2-5-3 et le tableau 8. Les protéines sont alors détectées par microscopie en fluorescence, éventuellement de type confocale.

4-2. Analyse du profil lipidique par Iatroscan

4-2-1. Principe

La chromatographie est une méthode physique permettant de séparer différents composés d'un mélange selon leurs propriétés physicochimiques. Elle est basée sur les différences d'affinité des composés à l'égard de 2 phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Lors d'une chromatographie sur couche mince ou sur plaque (CCM), la phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, la phase mobile liquide, l'éluant, est un solvant ou un mélange de solvants. Après dépôt des échantillons sur la phase fixe, les 2 phases sont mises en contact en trempant le bas de la plaque dans la phase mobile qui migre alors verticalement, par capillarité, le long de la phase fixe, entraînant les constituants du mélange à une vitesse dépendant de leur affinité relative pour les 2 phases. C'est l'élution, séparant ainsi les constituants du mélange à analyser. La technique Iatroscan est basée sur une séparation par CCM sur baguettes de quartz d'un diamètre de 1 mm et enrobées de silice microgranulométrique (3-5 µm). Après séparation, la baguette est soumise à une combustion progressive libérant progressivement chaque lipide qui est alors détecté par ionisation de flamme. Les pics résultants sont identifiés en comparant le temps de détection de composés témoins (PE, PC, PI, PS, SM ; Sigma).

4-2-2. Préparation des échantillons

Le protocole utilisé a été mis en œuvre au sein du Laboratoire de Science et Génie Alimentaires (LSGA) sous la responsabilité du Pr. J. Fanni et du Dr M. Linder (ENSAIA, INPL).

Les lipides totaux sont extraits de chaque échantillon cellulaire après l'ajout de 5 volumes d'un mélange chloroforme:méthanol (2:1) selon la méthode de Bligh & Dyer (77). Après une homogénéisation vigoureuse, 3 µL de chaque extrait lipidique sont déposés sur les chromarods SIII (Iatron Lab. Inc. Tokyo, Japon) à l'aide d'un capillaire. Les lipides neutres sont alors élués dans un mélange *n*-hexane:éther diéthylique:acide formique (80:20:0,2). Dès que le front de migration atteint 10 cm, les chromarods sont retirés de la cuve de migration et séchés à 100°C dans un four approprié (Iatron Lab. Inc). Les chromarods sont ensuite analysés dans un dispositif Iatroscan MK-5 couplé à un logiciel d'acquisition et d'exploitation de données Chromstar® (Iatron). Pendant l'analyse, le débit d'hydrogène est fixé à 160 mL/min, celui de l'air à 2.000 mL/min, tandis que la vitesse de combustion est de 20 cm/min. Chaque échantillon est analysé à 4 reprises : une par une méthode « *normal scan* » correspondant à l'analyse intégrale du chromarod, et 3 par une méthode « *PPS scan* » permettant une

combustion partielle du chromarod et laissant intact le dépôt. Après la première analyse, les chromarods sont soumis à une deuxième élution, permettant de séparer les lipides polaires demeurés dans le dépôt, dans un mélange chloroforme:méthanol:ammoniac (65:35:5). Après élution, les chromarods sont à nouveau séchés et soumis à une analyse selon le mode « *normal scan* ». Les données sont alors exploitées à l'aide du logiciel Chromstar (Iatron), exprimant l'intensité du signal détecté en fonction du temps auquel il est détecté.

4-3. Séparation des phospholipides

4-3-1. Principe

Après extraction, les phospholipides cellulaires ont été séparés par CCM. Après élution, la distance de migration caractéristique de chaque constituant est utilisée pour calculer le rapport frontal ou la rétention frontale (R_f) en la rapportant à la distance de migration du front du solvant. Les constituants d'un mélange peuvent donc être identifiés en comparant leur R_f avec ceux de composés témoins.

4-3-2. Préparation des échantillons

Le protocole utilisé a été optimisé et mis en œuvre par le Dr. C. Malaplate-Armand au sein du service de Biochimie du Pr. J.-L. Olivier (Hôpital Central, CHRU de Nancy).

Les lipides totaux sont extraits de chaque échantillon après l'ajout de 5 mL d'un mélange éthanol:chloroforme (1:2). Après homogénéisation vigoureuse, les échantillons sont centrifugés 10 min à $1.200 \times g$. Après centrifugation, la phase supérieure est éliminée, tandis que la phase inférieure qui contient les lipides est évaporée sous azote. Le résidu sec est alors congelé à -20°C jusqu'à l'analyse.

Le résidu sec est repris dans 100 μL d'un mélange méthanol:chloroforme (1:2) avant d'être déposé en totalité sur une plaque de silice (20x20 cm, Merck). Les lipides neutres (esters de stérol, triglycérides, acides gras libres) sont élués dans du di-isopropyléther (Prolabo). Après avoir séché la plaque de silice, les phospholipides sont séparés en utilisant comme phase mobile un mélange chloroforme:méthanol:acide acétique:eau (50:37,5:3:2). À l'issue de l'élution, les phospholipides séparés sont détectés et apparaissent sous la forme de taches visibles sous illumination UV après pulvérisation d'une solution de 2',7'-dichlorofluorescéine (Sigma) préparée à 0,1% (m/v) dans un mélange éthanol:eau (95:5). Le phospholipide composant chaque tache est identifié par comparaison avec le R_f de standards déposés et élués en parallèle sur la plaque.

Les différents phospholipides séparés à partir d'un échantillon sont recueillis dans des tubes individuels après grattage de la silice au niveau des taches. Les phospholipides sont alors extraits de la silice par 2 lavages successifs avec 500 μL d'une solution de méthanol:chloroforme (1:1) et agitation vigoureuse, selon la méthode de Owens (581). Après centrifugation de 10 min à $3.500 \times g$ et à 4°C , le surnageant contenant les phospholipides est récupéré pour le dosage des AG libres.

4-4. Dosage des acides gras

4-4-1. Principe

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse basée sur le partage de substance entre 2 phases. La phase mobile ou gaz vecteur (argon, hélium, azote ou hydrogène) balaie en permanence une colonne contenant la phase stationnaire. Si la phase stationnaire est un liquide peu ou pas volatil ayant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, il s'agit d'une chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide adsorbant (silice, alumine, zéolites), on parle de chromatographie gaz-solide ou chromatographie d'adsorption.

4-4-2. Protocole expérimental

Les acides gras ont été dosés par CPG au sein du service de Biochimie du Pr. J.-L. Olivier (Hôpital Central, CHRU de Nancy), avec le concours du Dr. C. Malaplate-Armand et du Dr. M.-C. Escanyé.

Les échantillons cellulaires sont préparés par transestérification selon Lepage & Roy (472). Les culots cellulaires sont remis en suspension dans 100 µL d'un mélange méthanol:chloroforme (2:1), puis dilués dans 2 mL d'un mélange méthanol:dichlorométhane (3:1). Deux cents microlitres de chlorure d'acétyle sont ajoutés à chaque échantillon et les tubes sont chauffés pendant 1 h à 100°C. La réaction de transestérification est arrêtée par l'ajout de carbonate de potassium. Après avoir ajouté de l'hexane et homogénéisé vigoureusement chaque échantillon, la phase organique surnageant est prélevée et évaporée sous azote. Le résidu sec obtenu est solubilisé dans 25 µL d'hexane. Après injection dans le chromatographe (CP 9001 ; Chromopack, Middelbourg, Pays-Bas) à l'aide d'une seringue Hamilton, les acides gras estérifiés sont séparés sur une colonne DB23 ((50%-cyanopropyl-phényl)-méthylpolysiloxane) de dimensions 30 m x 0,32 mm x 0,25 mm (Agilent Technology ; Massy, France) et analysés après détection par ionisation de flamme.

Lors de l'analyse, la température du détecteur est fixée à 270°C et celle de l'injecteur à 230°C, tandis que celle de la colonne, initialement à 180°C, augmente progressivement de 5°C/min pour atteindre 260°C et le rester 10 min. La phase mobile est constituée d'un mélange air/H₂ dont le débit est réglé à 30 mL/min. Les différents pics obtenus sont intégrés à l'aide d'un système d'exploitation de données (Millénium, Waters). Les pics sont quantifiés par comparaison avec des gammes d'étalonnage entre 0 et 5 µg/mL des divers acides gras recherchés (acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique, linolénique, arachidonique, docosatétraénoïque, docosahexaénoïque ; Sigma).

5. Marquage des rafts *in situ*

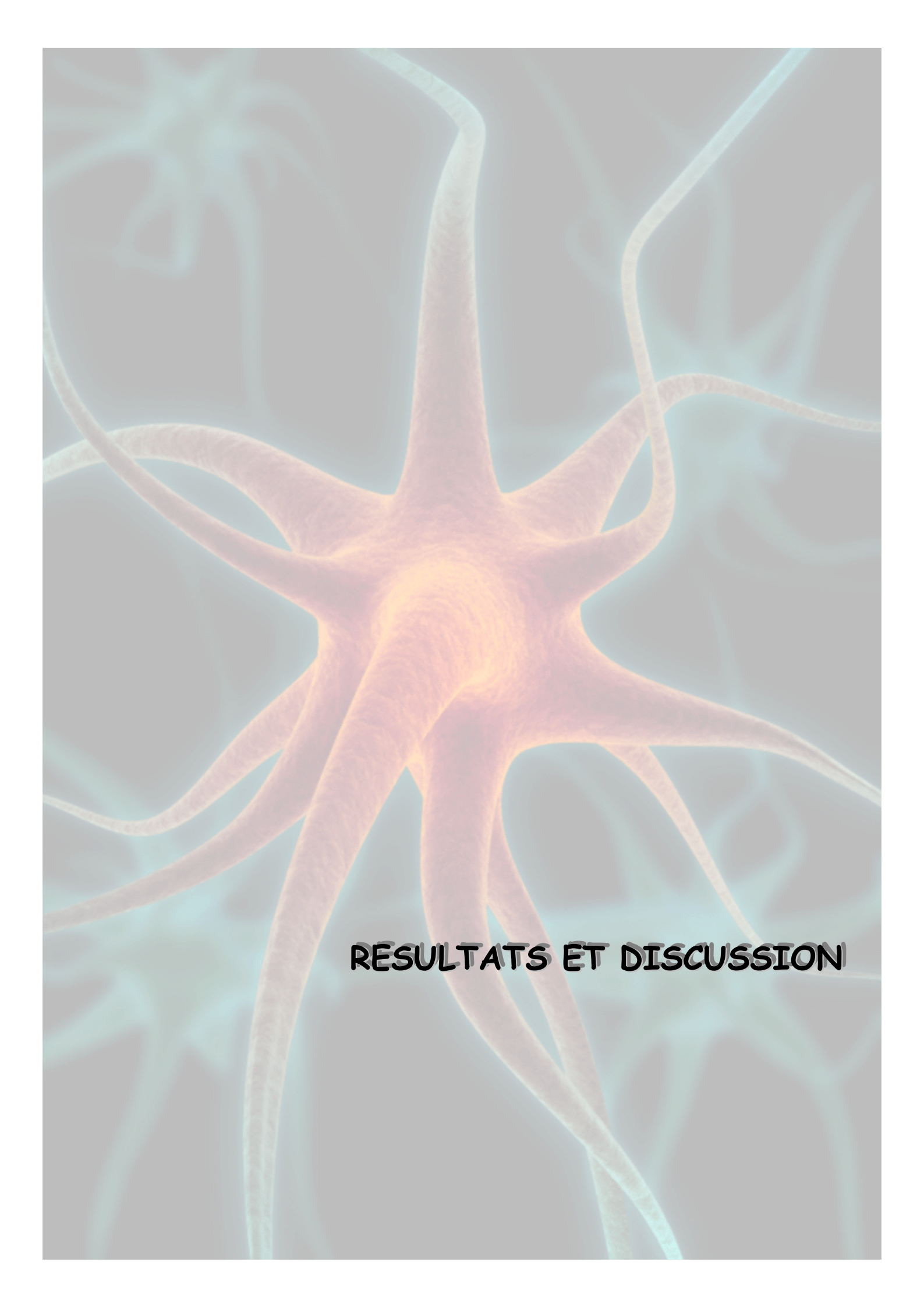
Les rafts sont mis en évidence à l'aide d'un kit de marquage fluorescent (V-34403 Vybrant[®] Alexa Fluor[®] 488 ; Molecular Probe ; Eugene, OR, USA) reposant sur l'affinité de la toxine cholérique pour

les résidus gangliosides GM₁ présents dans les rafts.

À l'issue du traitement, les neurones, cultivés sur lamelle de verre, sont lavés à l'aide de PBS froid, puis fixés pendant 15 min à 4°C avec une solution [PBS, 4% (m/v) PAF]. Après fixation, ils sont lavés 2 fois avec du tampon PBS froid, puis incubés 10 min à 4°C avec 500 µL de milieu contenant la toxine cholérique marquée au fluorochrome AlexaFluor488 (1:1.000). Les neurones sont ensuite lavés 2 fois avec le tampon PBS froid et incubés 15 min à 4°C avec un anticorps de lapin dirigé contre la toxine cholérique (1:1.000). Après lavages, la lamelle de verre est montée sur une lame pour l'examen en microscopie en fluorescence à 490 nm, réalisé comme décrit dans le paragraphe 2-4-1-2.

6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques nécessaires à l'interprétation des études détaillées dans ce mémoire ont été réalisées à l'aide du logiciel STAT VIEW, en accordant classiquement une significativité lorsque le risque d'erreur calculé p est égal ou inférieur à 0,05. Le test t de Fisher, permettant de tester l'hypothèse nulle selon laquelle toutes les moyennes des populations sont égales a été utilisé pour comparer les moyennes des groupes contrôles et des groupes testés. La comparaison deux à deux des moyennes a ensuite été réalisée à l'aide d'une analyse ANOVA suivie d'un test de Scheffé *a posteriori* ou *post hoc*. Ce test permet de comparer la différence entre 2 moyennes par rapport à une valeur seuil, la plus petite différence significative (PPDS). L'écart séparant les deux échantillons est significatif ou hautement significatif suivant le risque choisi, lorsque la différence entre les 2 moyennes comparées est plus grande que la PPDS. Cette méthode de comparaison de moyenne présente l'avantage d'être peu sensible à la non normalité et à l'inégalité des variances comparées et est applicable sur des échantillons dont les effectifs ne sont pas égaux (650). Le degré de significativité atteint est indiqué lors de la description des résultats, présentés par la moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues sur N expériences indépendantes reproduites avec chacune n échantillons répétés.



RESULTATS ET DISCUSSION

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. L'apoptose neuronale induite par les oligomères solubles de peptide amyloïde- β implique l'activation des sphingomyélinases en conséquence de celle de la phospholipase A_2 cytosolique

1. Introduction

Les sphingolipides constituent une famille hétérogène de lipides impliqués dans la détermination des propriétés physicochimiques et de l'architecture des membranes, ainsi que dans la génération de médiateurs lipidiques intervenant dans l'initiation et la régulation des cascades de signalisation cellulaire. Parmi les métabolites issus du cycle des sphingolipides, certains comme les céramides et la sphingosine présentent des effets pro-apoptotiques, alors que d'autres, comme les Cer1P et la S1P, sont eux anti-apoptotiques. En conséquence, la destinée de la cellule est en partie déterminée par l'équilibre entre ces différents médiateurs. L'activité catalytique des SMases, responsable de la production de céramides à partir de la SM, constitue une étape décisive du cycle des sphingolipides. Les analyses réalisées *post mortem* sur le cerveau de patients décédés de la MA ont mis en évidence une diminution du taux cérébral de SM au profit d'une augmentation du taux de céramides, suggérant que l'activité de ces enzymes puisse intervenir dans la pathogenèse neurodégénérative (324). Les SMases sont activées par différents *stimuli*, parmi lesquels la présence d'AA libre et le stress oxydant. Or, les travaux menés par notre équipe ont notamment montré que dans les neurones *in vitro*, les oligomères solubles de peptide A β induisent précisément une activation de la cPLA $_2$ conduisant à une libération d'AA, accompagnée d'un stress oxydant lors des phases précoces de l'apoptose. Nous nous sommes donc appuyés sur ces informations pour proposer et vérifier l'hypothèse selon laquelle ces 2 événements pourraient avoir comme conséquence commune d'activer les SMases. La production de céramides résultant de cette activation concourrait alors avec les autres perturbations identifiées au déclenchement du programme de mort apoptotique en réponse à l'exposition aux oligomères d'A β .

2. Stratégie expérimentale

Nous avons démontré précédemment qu'une exposition des neurones corticaux de rat à des oligomères solubles de peptide A β induit l'activation et la relocalisation précoces – dans les 10 min – de la cPLA $_2$ avec pour conséquence la libération d'AA (440). Nous voulons à présent vérifier si la cascade apoptotique induite par ce phénomène peut, au moins en partie, trouver son origine dans la libération de l'AG connu comme médiateur lipidique de l'inflammation. Les neurones ont donc été

exposés à de l'AA libre ajouté dans le milieu de culture afin d'en mesurer l'impact sur la viabilité cellulaire et sur l'activation des SMases. En utilisant notamment des inhibiteurs pharmacologiques et des oligonucléotides antisens, nous nous sommes ensuite attachés à démontrer l'implication des α - et n -SMases dans la neurotoxicité et l'apoptose induites par le peptide A β soluble.

Cette partie de notre étude s'inscrit dans la continuité des travaux de notre équipe, visant à identifier les acteurs moléculaires responsables de la cascade d'événements conduisant à la mort neuronale en réponse à l'exposition au peptide A β soluble. Mais nous voulions aussi apporter une contribution supplémentaire en évaluant l'intérêt des SMases comme cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de la MA.

3. Résultats et discussion

3-1. L'acide arachidonique est un médiateur pro-apoptotique

L'AA est un médiateur lipidique dont la libération après hydrolyse par la cPLA₂ est étroitement contrôlée. L'augmentation de sa libération conduit à la formation de médiateurs pro-inflammatoires dont certains présentent des propriétés pro-apoptotiques. À l'aide du test au MTT évaluant l'activité mitochondriale en reflet de la viabilité cellulaire, nous avons tout d'abord testé la toxicité propre de l'AA, médiateur libéré en conséquence de l'activation précoce de la cPLA₂ induite par le peptide A β soluble. Après 24 h de traitement par l'AG libre dans le milieu de culture, la viabilité des neurones corticaux de rat en culture primaire décroît significativement selon la concentration d'AA, de 86% à 1 μ M ($p < 0,01$) et 71% à 5 μ M ($p < 0,001$) jusque 31% à 20 μ M ($p < 0,001$), mais aussi avec le temps, de 71% à 24 h à 55% à 48 h ($p < 0,001$) avec 5 μ M d'AA (publication #1, figure 1A). Il est à noter que dans des conditions similaires, les acides stéarique (C18:0), oléique (C18:1, ω 9) et linoléique (C18:2, ω 6), n'affectent pas la viabilité des neurones, même aux concentrations les plus élevées (publication #1, figure 1C). Les résultats obtenus montrent donc clairement un effet apoptogène spécifique de l'AA. Un tel effet pourrait en partie être dû à la conversion de cet AG en eicosanoïdes par les enzymes COX et LOX dont l'activité catalytique génère la production d'anions superoxydes et de radicaux libres contribuant à l'apparition d'un stress oxydant. Les eicosanoïdes eux-mêmes pourraient être impliqués dans l'effet apoptogène observé. En effet, bien que leurs mécanismes d'action ne soient clairement établis, différents travaux suggèrent que certains d'entre eux, notamment PGE₂ et PGD₂, pourraient participer à l'activation des caspases (159). Enfin, des travaux récents suggèrent que l'AA lui-même pourrait induire l'activation des SMases et la production de céramides en conséquence (516).

Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié les conséquences du traitement des neurones par l'AA (à la concentration de 5 μ M) sur l'activité des SMases responsables de la production des céramides pro-apoptotiques. Les résultats obtenus montrent une augmentation simultanée ($p < 0,001$) des activités

SMases acide et neutre dès 1 h de traitement par l'AA et avec un maximum à 6 h (publication #1, figure 1B). L'AA a déjà été décrit comme un facteur d'activation des n-SMases (516), mais les résultats de notre étude sont à notre connaissance les premiers à mettre en évidence une augmentation de l'activité SMase acide dépendant de la libération de l'AA après activation de la cPLA₂.

Les conséquences de cette activation sur la viabilité cellulaire ont ensuite été évaluées à l'aide d'inhibiteurs de SMases. En effet, le prétraitement des neurones par la désipramine (DES) ou la 3-O-méthyl-sphingomyéline (3OMeSM), respectivement inhibiteurs de l'a- et des n-SMases, permet de réduire très nettement non seulement l'activité SMase correspondante, mais aussi la mort neuronale induite par l'AA (figure 54). Par ailleurs, l'absence d'effets de la fumosine B1 (FUM), un inhibiteur de la céramide synthase, suggère que la neurotoxicité induite par l'AA soit liée à la conversion de la SM en céramides, mais ne dépende pas d'une synthèse *de novo* de céramides. L'implication des SMases dans la neurotoxicité induite par l'AA a été confirmée par l'observation d'un effet protecteur de la NAC, un antioxydant décrit dans la littérature comme un inhibiteur des SMases neutres qui sont particulièrement sensibles au niveau redox dans la cellule.

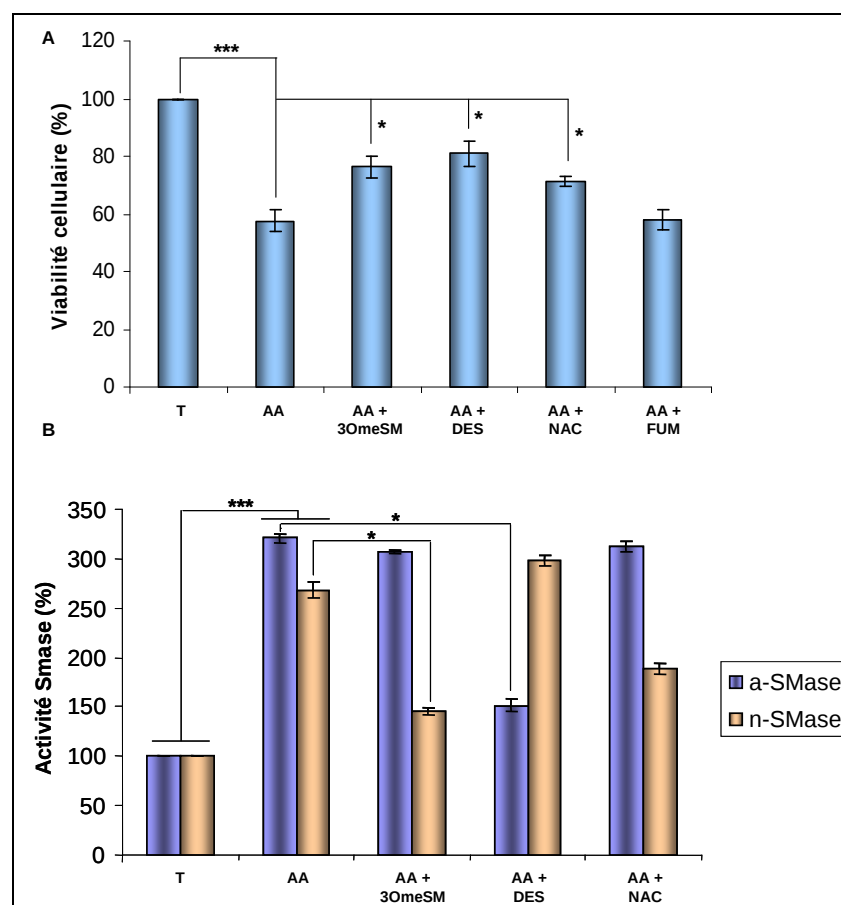


Figure 54. Effets des inhibiteurs de SMases sur la toxicité neuronale de l'AA

A, viabilité cellulaire évaluée par le test au MTT, B, activation des SMases

Les neurones ont été préincubés pendant 2 h dans le milieu complet, éventuellement supplémenté en 3OMeSM (10 μ M), DES (10 μ M), NAC (0,5 mM) ou FUM (50 μ M), puis exposés 24 h à 10 μ M d'AA. Les données correspondent aux moyennes normalisées sur le témoin ($m \pm \sigma$; N=3, n=4). Les différences significatives ont été identifiées à l'aide d'un test de Scheffé a posteriori (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$).

Les résultats obtenus indiquent que le potentiel neurotoxique de l'AA repose au moins en partie sur la production de céramides après hydrolyse de la SM par les a- et n-SMases. Les mécanismes moléculaires responsables de l'activation de ces enzymes restent à définir.

La relation entre la présence d'AA libre et la production de céramides permet de préciser les hypothèses déduites des résultats préalables publiés par notre équipe, parmi lesquels une activation précoce de la cPLA₂ dans les neurones corticaux de rat exposés au peptide Aβ₄₀ soluble. Ainsi, nous pouvons proposer que le peptide Aβ soluble active une nouvelle voie pro-apoptotique identifiée grâce à cette étude. Cette voie repose sur l'activation précoce de la cPLA₂, libérant de l'AA qui joue alors son rôle de médiateur et initie une cascade d'événements conduisant à l'activation des SMases, à la production de céramides et à la mort neuronale par apoptose.

3-2. Le peptide amyloïde-β soluble induit l'apoptose en activant les sphingomyélinases

3-2-1. Activation des sphingomyélinases par le peptide amyloïde-β soluble

Afin de valider le scénario proposé précédemment, les activités SMases ont été mesurées dans les neurones après traitement au peptide Aβ₄₀ soluble *in vitro*. Les concentrations micromolaires choisies pour ces traitements induisent un stress aigu compatible avec les conditions physiopathologiques. En effet, bien que la teneur de peptide Aβ dans les conditions physiologiques ait été estimée à 2 ng/g de tissu, un contenu de 1,5 µg de peptide Aβ/g de tissu a pu être détecté localement dans le cortex de patients décédés de la MA (715). La concentration nécessaire pour reproduire *in vitro* des conditions pathologiques n'est pas déterminée, mais le choix de concentrations micromolaires d'oligomères pour exposer les neurones corticaux *in vitro* permet sans doute de s'approcher de la situation régnant notamment au niveau des synapses et des prolongements dendritiques où le peptide Aβ s'accumule dès les phases précoces de la maladie (446).

Les activités SMases ont donc été mesurées dans les neurones corticaux de rat en culture primaire exposés à 1 µM de peptide Aβ₄₀. Les résultats, présentés sur la figure 2A de la publication #1, montrent une augmentation de l'activité de ces enzymes après 1 h de traitement, respectivement d'un facteur 3 et 4 pour les a- et n-SMases. Les activités enzymatiques sont maximales après 3 h de traitement pour l'a-SMase et après 6 h pour les n-SMases, et commencent à décroître pour des temps d'exposition plus longs. Nous avons aussi observé qu'un traitement témoin par le peptide inverse Aβ₍₄₀₋₁₎ ne modifie pas les activités SMases, ce qui permet de conclure que les conditions de traitement des neurones n'induisent aucune augmentation artéfactuelle de ces activités. L'hypothèse d'une activation des SMases suite à l'exposition des neurones corticaux de rat au peptide Aβ₄₀ soluble a déjà été suggérée par des analyses préliminaires de la composition lipidique des membranes neuronales par

Iatroscan. Les chromatogrammes obtenus, présentés par la figure 55, montrent que la SM est présente dans les neurones corticaux embryonnaires témoins, mais semble avoir disparu du profil des neurones traités par le peptide A β . La diminution du pic de SM est corrélée avec une légère augmentation de la proportion de céramides dans les neurones traités par le peptide A β_{40} . Celle-ci passe en effet de 7,47% dans les neurones témoins à 9,66% dans les neurones traités. Malgré la cohérence entre ces 2 observations, il est difficile de corréler cet effet à la neurotoxicité du peptide A β , d'autant que les céramides élués avec le solvant polaire correspondent probablement en grande partie au Cer1P, dont les effets sont anti-apoptotiques, ou aux céramides à courtes chaînes. En outre, la significativité de ces résultats est limitée par la faible quantité de SM, proche de la limite de détection de la méthode. Toutes les tentatives pour résoudre ce problème en affinant le protocole se sont révélées insuffisantes, notamment en raison du fait que la SM et la PS présentent des R_f très voisins.

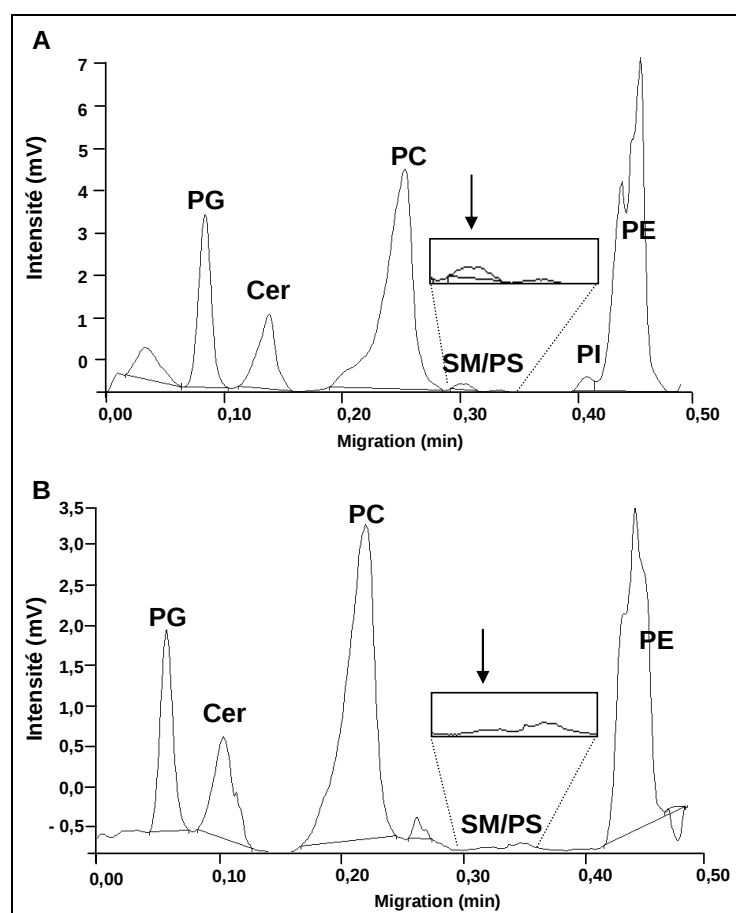


Figure 55. Analyse de la composition des lipides polaires neuronaux

A, neurones témoins; B, neurones exposés durant 24 h à 1 μ M de peptide A β_{40}

Les phospholipides membranaires des différents lysats cellulaires ont été séparés par CCM, avant d'être détectés par ionisation de flamme à l'aide d'un système Iatroscan.

La mesure des activités SMases suite à une exposition des neurones au peptide A β_{42} conduisant à des résultats tout à fait comparables, nous pouvons supposer que la mort neuronale induite par les peptides A β solubles implique une cascade pro-apoptotique commune reposant sur une activation des SMases. L'importance des céramides générées par ces enzymes dans le processus apoptotique a fait l'objet de

nombreuses études. Leur production favorise le déclenchement du programme de mort cellulaire par la modulation des cascades de signalisation cellulaires d'une part, et par les dommages membranaires qu'ils induisent d'autre part (155, 516).

3-2-2. Implication de l'activation des sphingomyélinases dans l'apoptose induite par le peptide amyloïde- β soluble

Nous avons ensuite voulu évaluer l'implication de l'activation des SMases dans la neurotoxicité des peptides $A\beta$ solubles *in vitro*. Pour cela, la viabilité des cellules exposées à différents traitements a été suivie par le test au MTT et par le comptage des noyaux apoptotiques après coloration par le DAPI (publication #1, figures 2B, 3A, 3B), ainsi que par la mesure de l'activité LDH libérée dans le milieu de culture par les cellules lors de la nécrose (figure 56). Tous ces résultats démontrent la toxicité du peptide $A\beta_{40}$ vis-à-vis des neurones de rat en culture primaire, avec une diminution de 40 à 50% de la viabilité après un traitement par 1 μ M durant 24 h, ce qui est tout à fait en accord avec ce que notre équipe avait précédemment rapporté dans la littérature (440, 599, 694, 695).

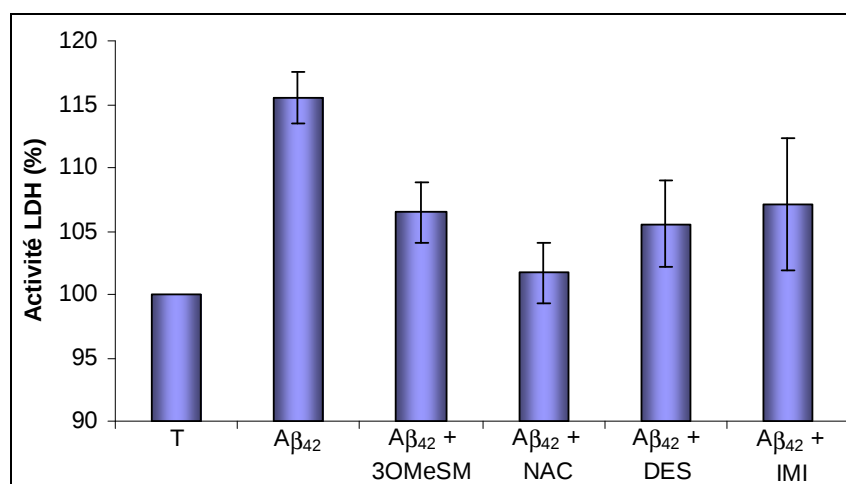


Figure 56. Implication des SMases dans la mort neuronale induite par le peptide $A\beta$ soluble

Les neurones ont été exposés durant 48 h au peptide $A\beta_{42}$ soluble (1 μ M).

L'activité LDH a été mesurée dans le milieu de culture débarrassé de toute cellule (N=1 ; n=4).

L'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques, 3OMeSM, DES ou imipramine (IMI), conduit à une diminution spécifique de l'activation ciblée (publication #1, figure 4), associée à une protection des neurones contre la toxicité des oligomères d' $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ (publication #1, figures 2B, 3A, 3C et 56).

Remarque. La libération de LDH (figure 56) a été mesurée sur 4 points expérimentaux, mais sur une seule expérience. Nous avons néanmoins considéré les résultats qu'elle apporte dans une réflexion globale intégrant les résultats d'autres études que nous avons obtenus eux de façon reproductible et donc avérés.

Le co-traitement par des inhibiteurs des a- et n-SMases conduit de surcroît à une protection plus élevée des neurones, permettant la conservation de 85% de l'activité mitochondriale mesurée par le test au MTT par rapport aux neurones contrôles ($p < 0,05$). Ceci indique que ces 2 types de SMases sont activés simultanément en réponse à un traitement par les oligomères d' $A\beta$, suggérant qu'ils participent tous 2 à une cascade de signalisation pro-apoptotique commune activée par les peptides

A β_{40} et A β_{42} solubles. Ce scénario diverge de celui décrit pour le peptide A β fibrillaire, rapporté comme n'augmentant que l'activité n-SMase (379). L'implication de mécanismes moléculaires particuliers avait déjà été proposée par différents auteurs pour expliquer les particularités qui distinguent la neurotoxicité des formes solubles et fibrillaires, certains suggérant même que le type de mort (nécrose, apoptose, aponécrose) induite par les peptides A β dépende de leur conformation (51, 709, 710).

Afin de valider ces résultats, une stratégie antisens a été adoptée. Le traitement des cellules par les oligonucléotides antisens A-AS ou N-AS permet une diminution significative ($p < 0,05$) et spécifique des activités a- et n-SMases augmentées par les peptides A β_{40} et A β_{42} (publication #1, figure 5A). Cette diminution d'activité s'accompagne d'un effet protecteur contre la mort apoptotique induite par ces peptides *in vitro*, comme le montrent les résultats du test au MTT et du comptage des corps apoptotiques après marquage par le DAPI (publication #1, figures 5B et 5C). En revanche et de façon prévisible, les oligonucléotides sens correspondants, utilisés comme témoins négatifs, n'ont produit aucune modification de l'activation induite par les peptides A β . L'ensemble de ces résultats indique donc un rôle clef des SMases et de la production de céramides dans la neurotoxicité *in vitro* induite par les peptides A β solubles, à l'instar de ce que nous avons observé après traitement par l'AA.

Des inhibiteurs spécifiques de la synthèse *de novo* des céramides (FUM et myriosine ou MYR) ont été utilisés afin de déterminer si les céramides produites consécutivement au traitement par les peptides A β solubles proviennent uniquement de la dégradation de la SM ou s'ils résultent également d'une biosynthèse. Les résultats obtenus ne montrent aucune modification de la neurotoxicité du peptide A β_{40} par ces inhibiteurs, indiquant donc que seul le catabolisme de la SM semble impliqué dans la génération des céramides (publication #1, figures 2B, 3A et 3B). Ainsi, l'exposition des neurones corticaux de rat en culture primaire au peptide A β soluble conduirait à une production de céramides essentiellement liée à l'hydrolyse de la SM par les SMases. Il faut rappeler que nous avons pu faire les mêmes observations après traitements des neurones corticaux par l'AA libre (paragraphe 3-1). Ceci souligne donc de façon indiscutable que l'AA libéré est un médiateur lipidique dont le rôle est déterminant dans l'apoptose des neurones exposés au peptide A β oligomérique.

L'hypothèse impliquant la génération de céramides dans la mort neuronale induite par les oligomères solubles d'A β est cohérente avec la littérature qui rapporte une augmentation précoce du taux de céramides dans le cerveau des patients atteints de la MA (175). L'effet délétère sur le SNC de l'accumulation de céramides a aussi été impliqué dans certaines pathologies comme la maladie de Farber, caractérisée par des retards mentaux et des anomalies motrices (42). Malgré l'importance du métabolisme des sphingolipides dans la production de médiateurs lipidiques régulant la survie et la mort neuronale, peu d'études se sont focalisées sur un éventuel rôle des céramides dans la MA. Les résultats présentés ici confortent l'idée de l'implication de ces médiateurs dès les phases précoces de la pathogenèse neurodégénérative.

3-2-3. La phospholipase A₂ cytosolique, levier de la neurotoxicité des peptides amyloïdes-β solubles

3-2-3-1. La phospholipase A₂ est une source de médiateurs neurotoxiques

Les résultats publiés précédemment par notre équipe indiquent que l'utilisation de MAFP, un inhibiteur compétitif de la cPLA₂, empêche l'apoptose neuronale induite par les peptides Aβ *in vitro*, confirmant l'implication déterminante de l'AA dans les mécanismes moléculaires activés (440). L'effet protecteur constaté peut résulter de l'inhibition de la production d'AA dont la neurotoxicité ne fait aucun doute. Cet effet peut aussi s'expliquer par la moindre génération d'autres médiateurs neurotoxiques produits en aval de l'AA tels que les éicosanoïdes. Cette hypothèse a été suggérée par Kriem *et al.* (440), dont les travaux ont montré qu'un prétraitement de 2 h par le NS398 ou l'indométhacine, 2 inhibiteurs spécifiques de la COX2, résulte en une protection partielle permettant de sauvegarder de l'apoptose 30 à 35% des neurones traités par le peptide Aβ oligomérique. Ceci suggère donc que la neurotoxicité de ce dernier, tout comme celle de l'AA, repose aussi sur la génération de médiateurs neurotoxiques de l'inflammation en aval de l'AA, tels que les PG ou les LT. Dans ce même ordre d'idée, des travaux encore non publiés (Kriem *et al.*) ont aussi montré une protection équivalente vis-à-vis des oligomères solubles d'Aβ après prétraitement des neurones par l'AA-861, un inhibiteur de la LOX5, par le MK-886, un inhibiteur de la protéine FLAP activatrice de la LOX5, ou par la baïcaléine, un inhibiteur de la LOX12 (figure 57). Tous ces résultats soulignent clairement le rôle essentiel de l'activation de la cPLA₂ dans l'apoptose induite par le peptide Aβ.

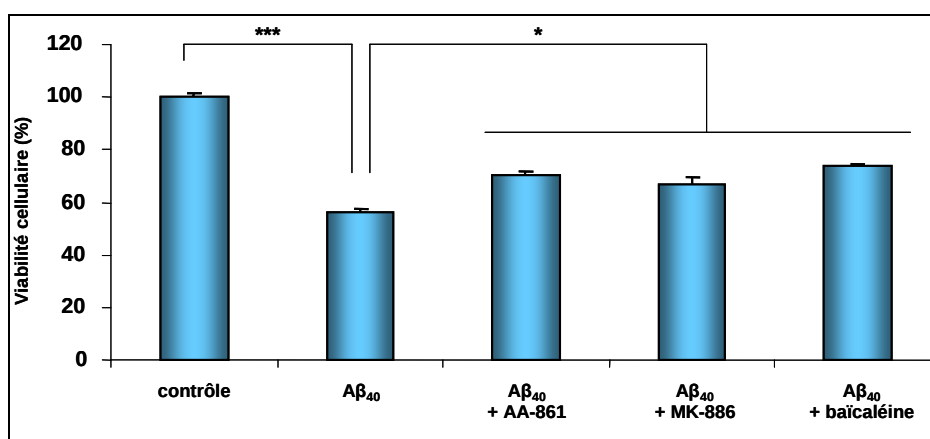


Figure 57. Implication des lipoxygénases dans la neurotoxicité du peptide Aβ soluble

Les neurones ont été préincubés pendant 2 h dans le milieu complet, éventuellement supplémenté en AA-861, MK-886, ou baïcaléine (0,1 μM) avant d'être exposés pendant 24 h au peptide Aβ₄₀ (1 μM). Les différences significatives ont été identifiées à l'aide d'un test de Scheffé a posteriori (N=3 ; n=4).

La neuroprotection offerte par les inhibiteurs de COX et de LOX indique que la toxicité induite par le peptide Aβ soluble nécessite non seulement la libération d'AA, mais aussi sa conversion en éicosanoïdes. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer l'importance de cette étape et de la voie pro-inflammatoire des éicosanoïdes dans la neurotoxicité *in vitro* du peptide

A β . Toutefois, le caractère partiel de la neuroprotection observée suggère l'implication d'autres voies de signalisation pro-apoptotiques restant à identifier.

3-2-3-2. L'activation de la phospholipase A₂ cytosolique est nécessaire à celle des sphingomyélinases

En accord avec les données de la littérature, les résultats présentés dans le paragraphe 3-1 suggèrent que la libération d'AA participe à l'activation des SMases. Afin de vérifier l'implication de l'activité cPLA₂ induite par une exposition au peptide A β soluble sur l'activation des SMases, l'activité de ces enzymes a été mesurée après prétraitement des neurones corticaux par le MAFP, un inhibiteur de la cPLA₂ (publication #1, figure 7B). Nous avons ainsi démontré que l'effet neuroprotecteur du MAFP s'accompagne d'une diminution de l'activation des SMases qu'induisent les peptides A β_{40} et A β_{42} oligomériques solubles. L'activation de la cPLA₂ semble donc être une étape essentielle de la cascade de signalisation pro-apoptotique dépendante des SMases. Pour le vérifier, nous avons soumis les neurones à un prétraitement par le PD98059, un inhibiteur spécifique de la kinase MEK1 décrite précédemment par notre équipe comme nécessaire à l'activation de la cPLA₂ consécutive au traitement par le peptide A β_{42} (440). Les résultats obtenus, illustrés par la figure 58, montrent que cet inhibiteur réduit de manière significative l'activation des SMases dans les cellules exposées aux peptides A β solubles. Ils confirment ainsi que l'activation de la cPLA₂ et la libération d'AA sont nécessaires à l'activation des SMases et à la neurotoxicité des peptides A β solubles.

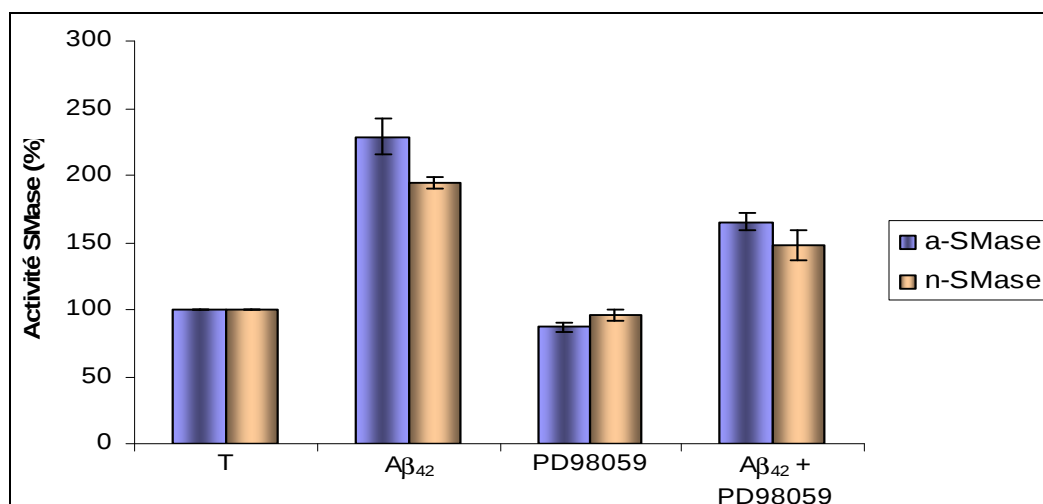


Figure 58. Implication des MAPK dans l'activation des SMases du peptide A β soluble
Les neurones ont été préincubés pendant 2 h dans le milieu complet, éventuellement supplémenté en PD98059 (1 μ M) avant d'être exposés durant 3 h au peptide A β_{40} (1 μ M) pour le dosage de l'activité α -SMase et durant 6 h pour le dosage de l'activité n-SMase (N=2 ; n=2).

Comme précédemment, une stratégie antisens a été conçue afin de confirmer les résultats obtenus à l'aide des inhibiteurs pharmacologiques. Après avoir vérifié que l'oligonucléotide sens correspondant ne modifie pas les activités cPLA₂ et SMases, nous avons évalué l'impact d'un prétraitement par l'oligonucléotide antisens cPLA₂-AS en suivant la viabilité cellulaire (test au MTT, comptage des

noyaux apoptotiques) et en mesurant les activités SMases (publication #1, figure 5). Les résultats indiquent que la baisse de l'expression de la cPLA₂ diminue significativement et spécifiquement l'activation des SMases, et protège les neurones de l'apoptose induite par les peptides Aβ₄₀ et Aβ₄₂ solubles. La cascade de signalisation pro-apoptotique induite par le peptide Aβ soluble est donc au moins en partie la conséquence de la libération d'AA consécutive à l'activation de la cPLA₂. Des expériences complémentaires seront nécessaires afin de comprendre l'implication de la cPLA₂ dans la modulation des cascades de signalisation cellulaire pro- ou anti-apoptotiques. Dans ce cadre, les premiers résultats acquis récemment sur des cultures primaires de neurones corticaux préparées à partir d'embryons de souris d'une lignée transgénique cPLA₂^{-/-} montrent une plus grande tolérance des neurones vis-à-vis des peptides Aβ solubles. Des études *in vivo* sont en cours afin d'évaluer les performances de mémorisation des souris de cette lignée et leurs réactions métaboliques et comportementales en réponse à une injection intracérébroventriculaire de peptide Aβ₄₀ soluble. Ces études devraient permettre de mieux comprendre l'importance du métabolisme de l'AA dans la susceptibilité des souris aux altérations cognitives liées au peptide Aβ soluble.

Tous les résultats obtenus convergent vers une cascade moléculaire initiée par interaction du peptide Aβ soluble avec la membrane neuronale. Cette cascade implique la séquence réactionnelle - activation de la cPLA₂, libération d'AA, activation des SMases, génération de céramides - conduisant au processus apoptotique. À ce stade du travail, il est difficile d'exclure l'éventualité d'une influence des différents eicosanoïdes issus de l'AA sur l'activation des SMases. Des expériences complémentaires permettront de préciser les acteurs et les mécanismes moléculaires participant et contrôlant cette cascade d'activation des SMases initiée par le peptide Aβ soluble.

3-2-4. Importance du stress oxydant dans l'activation des sphingomyélinases

Les travaux réalisés par notre groupe ont montré l'induction d'un stress oxydant, en particulier la génération d'ERO et la diminution du taux intracellulaire de GSH, dans les neurones traités par le peptide Aβ soluble (249, 694, 695). De façon intéressante, l'utilisation des antioxydants Trolox[®] et NAC permet de protéger les neurones contre la toxicité du peptide Aβ soluble et d'améliorer leur viabilité, comme nous l'avons évalué par le test d'activité mitochondriale au MTT (publication #1, figure 7A) et l'analyse de la libération de LDH (figure 56). Dans les neurones prétraités par le Trolox[®], nous avons par ailleurs mis en évidence une diminution de l'activation des SMases qu'induit le peptide Aβ soluble (publication #1, figure 7A). Ces résultats sont en accord avec la littérature qui rapporte un effet activateur du stress oxydant et un effet inhibiteur des antioxydants sur les activités SMases *in vitro*, *in vivo* et *in situ*, par exemple lors de l'apoptose neuronale associée à l'ischémie cérébrale et à la maladie de Parkinson (21, 516, 522).

3-2-5. Cibles cellulaires potentielles des céramides

3-2-5-1. La cathepsine D

Les céramides sont des médiateurs lipidiques aux multiples cibles cellulaires. De récentes études suggèrent que les céramides produits par la α -SMase lysosomale pourraient avoir pour cible, entre autres, la protéase lysosomale cathepsine D impliquée dans les dégradations protéolytiques nécessaires au processus apoptotique (341). Afin de définir l'éventuelle implication de cette protéase dans la mort induite par les peptides A β solubles, les neurones ont été prétraités par un octapeptide inhibiteur spécifique de la cathepsine D, avant d'évaluer la viabilité cellulaire par le test d'activité mitochondriale au MTT et par comptage des noyaux apoptotiques après coloration par le DAPI. Les résultats obtenus (publication #1, figure 6) montrent une diminution de la mort cellulaire induite par les peptides A β solubles en présence de cet inhibiteur, ce qui suggère que la cathepsine D joue un rôle clef en aval de la cascade de signalisation pro-apoptotique dépendante des SMases. L'importance de la cathepsine D dans le mécanisme de mort cellulaire programmée est très largement décrite dans la littérature. Elle intervient notamment dans le clivage de la protéine Bid impliquée dans la déstabilisation de la membrane mitochondriale, la libération des molécules apoptogènes et la formation de l'apoptosome permettant l'activation des enzymes protéolytiques caspases (494, 516).

3-2-5-2. Les caspases

Afin d'évaluer l'importance de la production de céramides dans l'activation des caspases, l'activité de ces dernières a été mesurée à l'aide de substrats fluorogènes spécifiques dans des lysats cellulaires éventuellement prétraités par différents inhibiteurs de SMases (publication #1, figure 3C). Nous avons ainsi pu montrer que l'utilisation de 3OMeSM, de DES ou d'IMI permet d'empêcher l'activation des caspases-3 et -9, suggérant effectivement que ces protéases puissent être activées en conséquence de la production de céramides par les α - et n-SMases. Cette séquence réactionnelle a été rapportée par plusieurs auteurs (177, 475). Elle pourrait s'intégrer dans le scénario moléculaire permettant d'expliquer les résultats d'études *post mortem* montrant une activation des caspases-3 et -6, une accumulation de fragments protéolytiques issus de l'action catalytique des caspases, ainsi qu'une augmentation du taux de céramides dans le cerveau des patients décédés de la MA (459). Souvent suggérée, l'implication de la cathepsine D dans l'activation des caspases reste encore à définir.

3-2-5-3. Activation de la voie JNK/p38

Les travaux antérieurs réalisés au sein de notre équipe avaient permis de mettre en évidence le potentiel neuroprotecteur de l'inhibiteur SB202190, un inhibiteur de la protéine p38 impliquée dans différentes cascades de signalisation pro-apoptotiques (440). Différentes études ayant suggéré l'implication des céramides dans la modulation de la voie JNK/p38 (516), l'induction de cascades pro-

apoptotiques dépendantes de cette voie par le peptide A β soluble et impliquant l'induction des SMases peut donc être envisagée.

L'importance du mécanisme apoptotique dans la perte neuronale observée dans la MA n'est pas encore définitivement établie (459). Toutefois, différentes études *post mortem* suggèrent la présence de caspases et de fragments protéolytiques issus de l'activité catalytique de ces enzymes dans le cerveau des patients décédés de la MA (315, 718). Les résultats obtenus par notre équipe et par d'autres ont permis de démontrer très clairement que la neurotoxicité du peptide A β soluble repose sur un phénomène apoptotique impliquant, entre autres, l'activation d'enzymes protéolytiques telles que les caspases, la cathepsine D et la calpaïne dont l'action catalytique participe à la désorganisation du cytosquelette et à la neurodégénérescence (245, 689).

Les résultats que nous présentons dans ce mémoire de thèse permettent de conforter l'importance des caspases dans la mort cellulaire induite par le peptide A β soluble. Des expériences complémentaires seront toutefois nécessaires afin de déterminer les acteurs moléculaires intervenant en aval de la production des médiateurs lipidiques pro-apoptotiques dans les neurones exposés aux oligomères d'A β . L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la neurotoxicité du peptide devra prendre en compte les modifications du statut lipidique et de l'architecture membranaires que peuvent aussi induire les médiateurs lipidiques produits.

3-3. La sphingosine-1-phosphate possède un potentiel neuroprotecteur

Malgré l'expression de 2 récepteurs spécifiques (S1P₂ et S1P₅) dans les cellules neuronales et gliales, peu d'études relatent à ce jour le rôle de la S1P dans le SNC. Le potentiel anti-apoptotique de cette molécule décrit dans différents types cellulaires repose sur la stimulation de voies de survie et sur l'inhibition de voies pro-apoptotiques, avec en particulier une modulation des effets pro-apoptotiques induits par les céramides et une inhibition de l'action de l' α -SMase (288). Sur la base de ces données bibliographiques, nous avons testé le potentiel neuroprotecteur de la S1P vis-à-vis des oligomères solubles d'A β . Les résultats du test au MTT et du comptage des noyaux apoptotiques mettent clairement en évidence que la S1P protège les neurones de l'apoptose induite par les peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ *in vitro* (publication #1, figures 8A et 8B). Afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro* sur les neurones corticaux en culture primaire, un modèle animal approprié a été développé au laboratoire. Il consiste en l'injection intracérébroventriculaire unique de peptide A β ₄₂ soluble, générant un stress tissulaire aigu ayant pour conséquence de diminuer les capacités de mémorisation des souris traitées.

Parmi les tests utilisés, le test du labyrinthe en Y (*Y-maze*) permet d'évaluer la mémoire de travail (ou à court terme) en comptant l'alternance d'entrées successives dans les 3 bras du Y. Les premiers résultats comportementaux obtenus sur ce modèle montrent une altération de la mémoire des souris traitées par le peptide A β soluble se traduisant par la diminution du pourcentage d'alternance (figure 59A) sans modification notable du comportement exploratoire et de l'activité motrice de l'animal (figure 59B). Par contre, la pré-injection de S1P restaure en partie les capacités de mémoire des souris, suggérant un effet neuroprotecteur de la S1P contre la toxicité *in vivo* du peptide A β soluble (Youssef *et al.*) en complément de celui démontré *in vitro*.

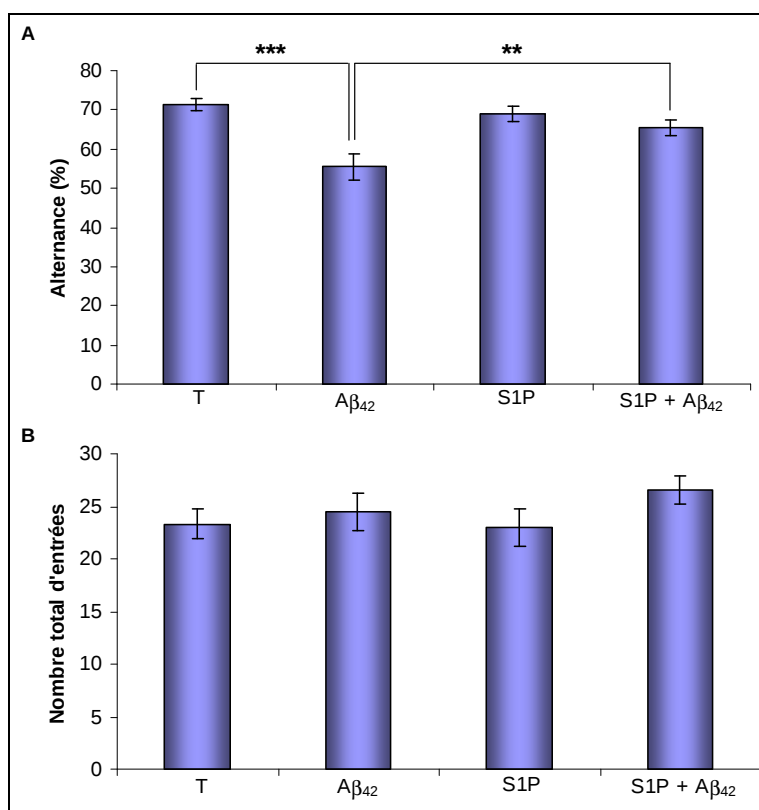


Figure 59. Effets protecteurs *in vivo* de la S1P sur la mémoire de travail

Le test en Y a été réalisé 4 j après l'injection intracérébroventriculaire de S1P (1 nmol), suivie 5 min plus tard de celle de peptide A β_{42} soluble (0,5 nmol). Les souris témoins ont reçu une injection avec une solution de PBS. Le pourcentage d'alternance spontanée (A) et le nombre total d'entrées dans les bras (B) ont été déterminés pendant une période de 5 min. Les résultats sont présentés comme la moyenne $\pm$ SEM (n=12)

De façon intéressante, la diminution du taux de mortalité, observée lors des analyses de l'effet neuroprotecteur de S1P *in vitro* est corrélée à une diminution de l'activation de l' α -Smase (publication #1, figure 8C). Ce résultat est en accord avec ceux de Gomez-Munoz *et al.* (288) qui rapportent une inhibition de l' α -SMase par la S1P lors de l'apoptose de cellules macrophagiques. Il souligne l'importance des céramides dans la mort neuronale induite par le peptide A β soluble. Même si les mécanismes moléculaires sur lesquels repose le potentiel neuroprotecteur de la S1P restent à élucider, il est raisonnable de proposer l'hypothèse d'une implication de la S1P en tant que premier messager, ligand des récepteurs S1P exprimés à la surface des cellules neuronales (725). Le potentiel

neuroprotecteur constaté de la S1P pourrait alors reposer sur la transduction d'un signal se chargeant d'une part de promouvoir des voies de survie telles que celle de ERK1/2, et d'autre part d'inhiber des voies pro-apoptotiques telles que celle de JNK/p38.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude permet de construire un scénario impliquant une nouvelle cascade de signalisation pro-apoptotique dans laquelle les peptides A β solubles induisent la survenue d'un stress oxydant et l'activation de la cPLA₂, avec en conséquence l'activation des SMases, la production de céramides et l'activation de protéases apoptotiques dont les caspases et la cathepsine D. Le scénario proposé, schématisé sur la figure 60, pourrait être impliqué lors des phases précoces de la maladie, définissant donc les SMases comme des cibles potentielles pour le développement de molécules et de stratégies thérapeutiques dans le traitement de la MA.

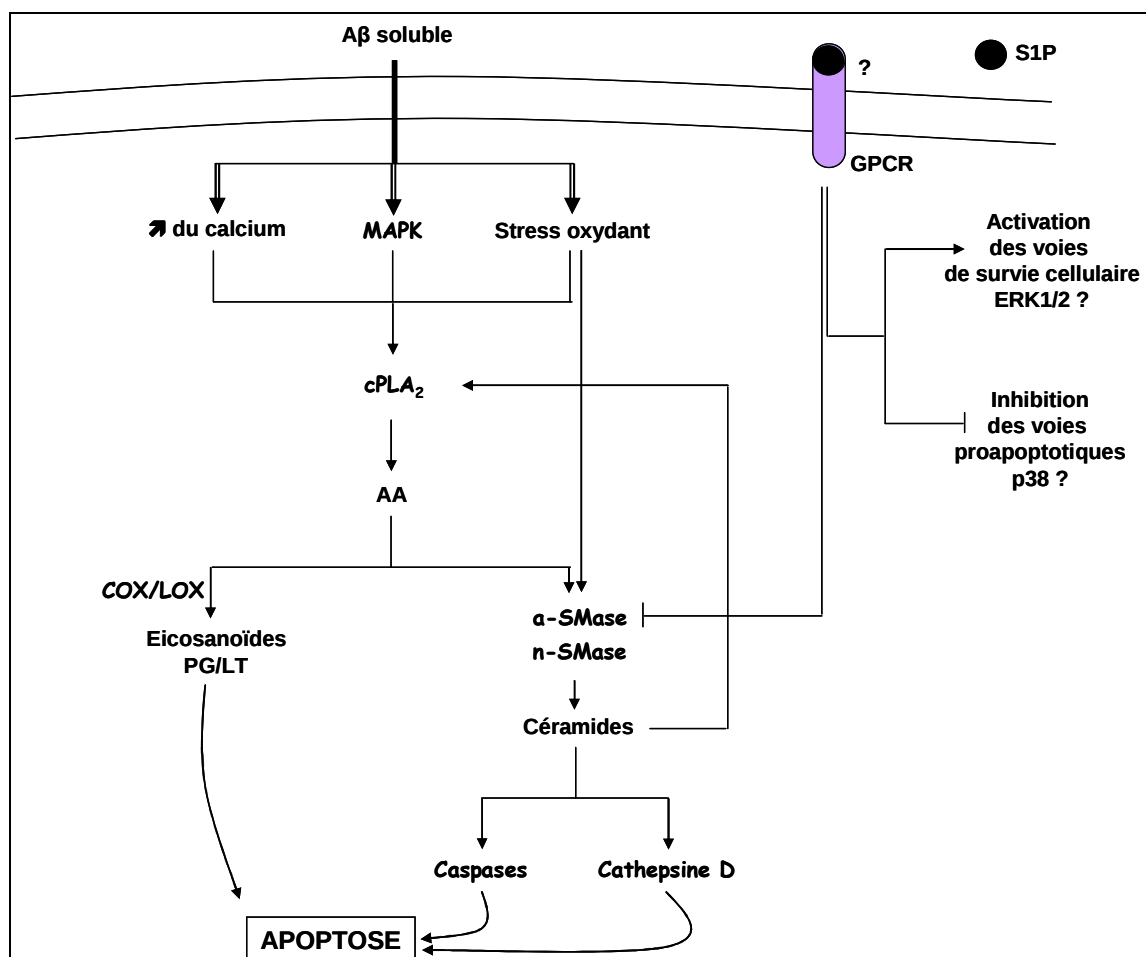


Figure 60. Schéma récapitulatif de la cascade pro-apoptotique activée par le peptide A β soluble

L'activation de la cPLA₂ tout d'abord, des SMases ensuite, apparaît donc comme un mécanisme déterminant dans l'apoptose induite par les peptides Aβ solubles *in vitro*. Ces résultats ont permis de valider le potentiel neuroprotecteur de la S1P, médiateur lipidique capable notamment de réprimer l'activation de la α-SMase induite par le peptide Aβ soluble et de moduler les effets anti-apoptotiques des céramides. Les mécanismes moléculaires sur lesquels repose l'effet neuroprotecteur de la S1P devront être élucidés, en visant tout particulièrement à définir la (les) cible(s) de ce médiateur, vraisemblablement de type récepteur couplé à une protéine G, ainsi que les conditions dans lesquelles la S1P reconnaît et interagit avec ce(s) récepteur(s) spécifique(s) au niveau de la membrane plasmique neuronale.

L'ensemble de ces résultats a été publié en 2006 dans *Neurobiology of Disease* (Publication # 1).

Publication # 1

Soluble oligomers of amyloid- β peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA₂-dependent sphingomyelinase–ceramide pathway

Malaplate-Armand C, **Florent-Béchar** S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier JL, Oster T & Pillot T

Neurobiol Dis (2006) **23**, 178-189

Soluble oligomers of amyloid- β peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA₂-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway

Catherine Malaplate-Armand, Sabrina Florent-Béchar, Ihsen Youssef, Violette Koziel, Isabelle Sponne, Badreddine Kriem, Brigitte Leininger-Muller, Jean-Luc Olivier, Thierry Oster, and Thierry Pillot*

JE 2482 Lipidomix, INPL, Laboratoire de Médecine et Thérapeutique Moléculaire, 15 rue du Bois de la Champelle, F54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Received 10 November 2005; revised 10 February 2006; accepted 27 February 2006
Available online 19 April 2006

Recent data have revealed that soluble oligomeric amyloid- β peptide (A β) may be the proximate effectors of neuronal injuries and death in Alzheimer's disease (AD) by unknown mechanisms. Consistently, we recently demonstrated the critical role of a redox-sensitive cytosolic calcium-dependent phospholipase A₂ (cPLA₂)-arachidonic acid (AA) pathway in A β oligomer-induced cell death. According to the involvement of oxidative stress and polyunsaturated fatty acids like AA in the regulation of sphingomyelinase (SMase) activity, the present study underlines the role of SMases in soluble A β -induced apoptosis. Soluble A β oligomers induced the activation of both neutral and acidic SMases, as demonstrated by the direct measurement of their enzymatic activities, by the inhibitory effects of both specific neutral and acidic SMase inhibitors, and by gene knockdown using antisense oligonucleotides. Furthermore, soluble A β -mediated activation of SMases and subsequent cell death were found to be inhibited by antioxidant molecules and a cPLA₂-specific inhibitor or antisense oligonucleotide. We also demonstrate that sphingosine-1-phosphate is a potent neuroprotective factor against soluble A β oligomer-induced cell death and apoptosis by inhibiting soluble A β -induced activation of acidic sphingomyelinase. These results suggest that A β oligomers induce neuronal death by activating neutral and acidic SMases in a redox-sensitive cPLA₂-AA pathway.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Alzheimer's disease; Soluble amyloid- β oligomers; Cytosolic phospholipase A₂; Sphingomyelinases and apoptosis

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive dementia that manifests in early stages primarily as a profound inability to form new memories. Mounting evidence suggests that this syndrome begins with subtle alterations of hippocampal synaptic dysfunction associated with neuronal cell death involving apoptosis (Selkoe, 2002). The molecular basis for this specificity is unknown, but evidence favors the involvement of neurotoxins derived from the amyloid- β peptide (A β) (Selkoe, 2004; Drouet et al., 2000). The original amyloid cascade hypothesis causally links AD clinicopathological process and neuronal cell death to the aggregation and deposition of A β (Hardy and Higgins, 1992; Anderson et al., 1996; Estus et al., 1997). Despite its intuitive appeal and strong experimental support, this hypothesis has proven inconsistent with key clinical observations, including the poor correlation between dementia and amyloid plaque burden (Katzman et al., 1988). Tailing with these observations, the amyloid cascade hypothesis has been recently challenged by our studies and others strongly suggesting a close association between neuronal loss and a proapoptotic effect of soluble oligomers of the A β peptide (Pillot et al., 1999; Sponne et al., 2003; Kriem et al., 2005; Walsh et al., 2002; Wang et al., 2002). Accordingly, it has been recently demonstrated using mouse cerebral slices that soluble oligomers of A β are responsible for regiospecific toxicity to hippocampal CA1 neurons, a division involved in cognitive functions (Kim et al., 2003). Moreover, the synaptic loss in AD brain has been correlated with the pool of soluble A β peptide rather than that of fibrillar A β (Wang et al., 1999; McLean et al., 1999; Lue et al., 1999). Both neurodegeneration and specific spatial learning deficits associated with early A β oligomer accumulation occur without amyloid plaque formation in AD transgenic models (Hsia et al., 1999; Koistinaho et al., 2001; Koistinaho et al., 2002; Chang et al., 2003). These observations have been further corroborated by a recent elegant study showing the targeting of synaptic terminals by A β oligomers in AD brain (Lacor et al., 2004). Taken together, these results give the "soluble A β " hypothesis substantial clinical

Abbreviations: A β , amyloid- β peptide; AD, Alzheimer's disease; AA, arachidonic acid; A-SMase, acidic sphingomyelinase; cPLA₂, cytosolic calcium-dependent phospholipase A₂; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; MAFF, methyl arachidonyl fluorophosphonate; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NAC, N-acetyl-cysteine; N-SMase, neutral sphingomyelinase; ODN, oligodeoxynucleotide; PBS, phosphate-buffered saline; S1P, sphingosine-1-phosphate; 3OMeSM, 3-O-methyl-sphingomyelin.

* Corresponding author. Fax: +33 3 83 67 89 99.

E-mail address: Thierry.Pillot@mtm.nancy.inserm.fr (T. Pillot).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

0969-9961/\$ - see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.nbd.2006.02.010

support. However, it remains to understand the molecular mechanisms triggering soluble A β -mediated cell death.

Accumulative evidence highlights the critical role of sphingolipids and its metabolites in a ubiquitous and evolutionary conserved signaling system linking specific cell surface receptors and environmental stresses with cell differentiation as well as apoptosis (Pettus et al., 2002). Ceramide is produced either from the degradation of sphingomyelin by neutral sphingomyelinase (N-SMase) and acidic sphingomyelinase (A-SMase) or from de novo synthesis by ceramide synthase (Hannun, 1996). Indeed, cellular ceramide levels increase in response to various stresses and are directly involved in apoptotic signaling in various cell types including neurons (Verheij et al., 1996; Kolesnick and Kronke, 1998; Brann et al., 2002; Numakawa et al., 2003). It is noteworthy that lower sphingomyelin levels and higher ceramide levels in AD brains have been reported (Soderberg et al., 1992), raising the possibility that sphingomyelin degradation and subsequent ceramide accumulation contribute to AD pathogenesis.

We have recently demonstrated that soluble A β oligomers triggered neuronal apoptosis by early activation of a cPLA₂-dependent pathway leading to production of arachidonic acid (AA) (Kriem et al., 2005). Increasing evidence suggests that oxidative damage is associated with the development of AD, including oxidative damage to protein, lipids, and nuclear and mitochondrial DNA (Perry et al., 2002; Smith et al., 1996; Montine and Morrow, 2005; Aksenov and Markesbery, 2001). Additionally, it has been clearly demonstrated that the generation of reactive oxygen species is involved in fibrillar as well as soluble A β peptide-induced neurotoxicity (Butterfield, 2003; Butterfield and Boyd-Kimball, 2005; Sponne et al., 2003; Florent et al., 2006). In view of the well-established involvement of oxidative stress and polyunsaturated fatty acids in the regulation of SMase activity (for review, Marchesini and Hannun, 2004), we decided to investigate the hypothesis that SMase activation might be involved in soluble A β oligomer-mediated neuronal apoptosis. In the present study, we report that soluble A β 1–40 and 1–42 oligomers induce the activation of both N-SMase and A-SMase resulting in apoptotic cell death through a redox-sensitive cPLA₂-AA-dependent pathway. Interestingly, sphingosine-1-phosphate significantly inhibited A β -induced A-SMase activation and subsequent neuronal apoptosis.

Materials and methods

Materials

The caspase substrates (Ac-DEVD-AMC and Ac-LEHD-AMC) and inhibitor peptides (ZVAD-fmk, Ac-DEVD-fmk, Ac-LEHD-fmk, and H-GEGFLGDFL-OH) were purchased from Bachem. A β 1–40, A β 40–1 and A β 1–42 were also obtained from Bachem, and soluble oligomers of A β were prepared as previously described (Pillot et al., 1999; Sponne et al., 2003; Kriem et al., 2005). Briefly, to overcome problems of peptide solubility at high concentrations, fresh peptide stock solutions were prepared at 5 mg/ml in hexafluoro-2-propanol (Sigma). For the incubation of the peptides with neurons, aliquots of peptide stock solution were quickly dried under nitrogen, directly solubilized at the experimental concentrations into the culture medium and incubated for 1 h at room temperature. The presence of oligomers of A β was detected by SDS-PAGE and immunoblot analysis. Oligomeric preparations of A β resolve to trimers and tetramers (10 to 15 kDa)

after SDS-PAGE, as previously described (Pillot et al., 1999; Dahlgren et al., 2002). Peptide solutions were then applied onto the cells. The specific cPLA₂ inhibitor, methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP), was obtained from Calbiochem. All other chemicals were purchased from Sigma. Unless otherwise indicated, materials used for cell culture were obtained from Life Technologies (Invitrogen).

Cell cultures and treatments

Rat cortical neurons were cultured as described and kept at 35°C in a humidified 6% CO₂ atmosphere (Kriem et al., 2005). After 6–7 days in vitro (DIV), cortical population was determined to be at least 96% neuronal by immunostaining. All experiments were performed on 6–7 DIV neurons. Cells were treated with 1 μ M soluble oligomers of A β 1–40 or A β 1–42 for the indicated times. Alternatively, cells were preincubated for 2 h with the indicated concentrations of inhibitors before addition of A β . Fatty acids were dissolved in isopropanol and stored at –20°C as 1-mM nitrogen-saturated stock fractions. Fatty acids were then diluted at the indicated concentrations in culture medium containing fatty-acid free bovine albumin (0.1%, wt/vol), as previously described (Florent et al., 2006).

Neuronal viability and monitoring of apoptosis

Cell viability was assessed using the release of lactate dehydrogenase (LDH) and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays as previously described (Pillot et al., 1999; Sponne et al., 2004). Cell nuclei were visualized using 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sponne et al., 2003). To evaluate the percentage of apoptotic cells, 10 independent fields of microscope were counted (approximately 400 cells) in 3 separate experiments with 3 determinations each.

Measurement of caspase-like proteolytic activities

The caspase activities were measured by means of the cleavage of the substrates, Ac-DEVD-AMC and Ac-LEHD-AMC using previously described procedures (Sponne et al., 2003). Briefly, at the indicated time points after A β treatment, the cells were washed 3 times with ice-cold PBS and incubated for 20 min on ice in a buffer of 25 mM HEPES, pH 7.5, containing 1% (v/v) Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml each of pepstatin and leupeptin, and 5 μ g/ml aprotinin. After homogenization, collected cells were then lysed using three cycles of freezing and thawing and centrifuged at 4°C for 10 min at 12,000 $\times$ g, and the protein concentration was assayed by the BCA Protein Assay Kit (Pierce). Fifty micrograms of cellular protein was incubated for 2 h with 100 μ M of substrates initially dissolved at 10 mM in DMSO. The cleavage of the caspase substrates was monitored by fluorescence emission at 460 nm after exciting at 360 nm, using a Fluostar microplate reader (BMG-Labtechnologies, France).

Measurement of sphingomyelinase activities

Cells (2×10^6) were washed twice with PBS, pH 7.4, and lysed in 0.1% Triton X-100 for 10 min at 4°C. The lysates were sonicated for 30 s in ice-cold bath, and protein concentrations were determined by BCA Protein Assay Kit (Pierce). Sphingomyelinase

activities were measured fluorimetrically with the substrate 6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl phosphocholine (HMU-P-Chol; Moscerdam Substrates) as previously described (Kilkus et al., 2003). Twenty-five-microgram proteins, buffered either in 150 mM sodium acetate, containing 0.1% Triton X-100, 0.2% CHAPS (pH 4.5), or in PBS, 0.1% Triton X-100, 0.2% CHAPS, 0.5 mM $MgCl_2$ (pH 7.4), were incubated for up to 10 h with 0.6 mM HMU-P-Chol. The fluorescence was monitored at 370-nm excitation and 460-nm emission using a Fluostar microplate reader (BMG-Labtechnologies, France). SMase activity was calculated from the slope of the intrinsic fluorescence versus time graph, standardized per microgram of protein and expressed as a percentage of control values.

Antisense oligonucleotide strategy

cPLA₂ sense and antisense ODNs were designed and used as previously described (Kriem et al., 2005). Their sequences were 5'-CAC CAA AGT AAC CAA GGG GA-3' (S, sense) and 5'-TCC CCT TGG TTA CTT TGG TG-3' (AS, antisense). Two different antisense ODNs targeting N-SMase (N-AS), one antisense ODN targeting A-SMase (A-AS) and their corresponding sense (N-S and A-S) ODNs have been selected and tested for their capacity to inhibit soluble A β -mediated cell death. Their sequences were 5'-CGA CCA GCC GGT CCA CCA GCC-3' (N-AS1), 5'-AGC TGC AAT GGT TTT GTA CAC-3' (N-AS2), 5'-CTG TGG TGG GGC ATT GCC AGG-3' (A-AS), 5'-GGC TGG TGG ACC GGC TGG TCG-3' (N-S1), 5'-GTG TAC AAA ACC ATT GCA GCT-3' (N-S2) and 5'-CCT GGC AAT GCC CCA CCA CAG-3' (A-S). Cortical neurons were incubated with 4 μ M of the various sense or antisense ODNs for 48 h prior to and during A β treatment.

Statistical analysis

STAT VIEW computer software was used for the statistical analysis. Data were obtained from three to four separate experiments with 4 determinations each and expressed as means $\pm$ SEM. Differences between control and treated groups were analyzed using Student's *t* test (***P* < 0.05, ****P* < 0.001). Multiple pairwise comparisons among the groups of data were performed using ANOVA followed by a Scheffé's post hoc test. Statistical differences were determined as *P* < 0.05.

Results

Arachidonic acid is toxic to cortical neurons and induces sphingomyelinase activation

We first tested whether treatment of cortical neurons with AA might result in cell death. The incubation of cells with increasing AA concentrations resulted in a dose-dependent decrease in cell viability, as monitored using the MTT assay (Fig. 1A). Upon a 24-h exposure to 1 and 10 μ M AA, the MTT reduction level decreased significantly to 86.5% (*P* < 0.01) and 52.4% (*P* < 0.001), respectively, as compared to that of the control (Fig. 1A). AA-induced cell death is also time-dependent. Indeed, cell viability decreased significantly to 29.1% (*P* < 0.001) and 45.2% (*P* < 0.001) as compared to controls in neurons exposed to 5 μ M AA for 24 h and 48 h, respectively (data not shown). We next investigated whether AA exposure might result in SMase activation. The

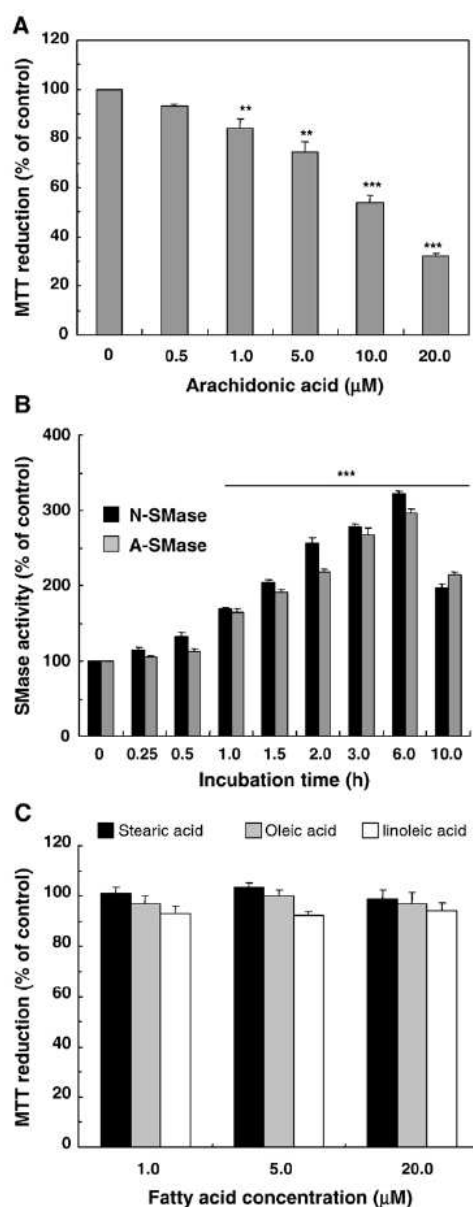


Fig. 1. Arachidonic acid-induced neuronal cell death and activation of both acidic and neutral sphingomyelinases. (A and C) Cortical neurons were treated for 24 h with increasing concentrations of indicated fatty acids, and cell survival was monitored by the MTT assay. (B) N-SMase and A-SMase activities in cortical neurons treated for 1 to 10 h with 5 μ M arachidonic acid. Data are means ($\pm$ SEM) of three different experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle, designated as 100%. Differences between control and treated groups were analyzed using Student's *t* test (***P* < 0.01 and ****P* < 0.001).

treatment of neurons with 5 μ M AA induced a time-dependent increase in both A- and N-SMase activities as early as 1 h after exposure and reached maximum levels at 6 h (Fig. 1B). It is noteworthy that the presence of widely used inhibitors of A-SMase and N-SMase, desipramine and 3-*O*-methyl-sphingomyelin

(3OMeSM), respectively, strongly inhibited both AA-induced cell death and SMase activation (data not shown). Specificity of AA in inducing cell death and SMase activation was investigated using a variety of fatty acids. Under similar experimental conditions, stearic acid, oleic acid, and linoleic acid were not able to induce neuronal death (Fig. 1C) and SMase activation (data not shown). This is in agreement with our recent data showing that docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids did not exhibit any neuronal toxicity under similar experimental conditions (Florent et al., 2006). Altogether, our data suggest that early AA generation upon soluble A β oligomer exposure might result in SMase activation, ceramide production, and subsequent cell death.

Soluble A β oligomers induce the activation of SMases in cortical neurons

We next investigated whether soluble A β oligomers might induce the activation of A-SMase and N-SMase. A marked elevation of both A-SMase and N-SMase activities (~3- and 4-fold, respectively) was observed as early as 1 h of treatment with 1 μ M A β (1–40) and reached maximal levels at 3 and 6 h for A-SMase and N-SMase, respectively (Fig. 2A). However, the induction of SMase activation decreased afterward. By contrast, non-toxic A β (40–1) reverse peptide used as a negative control was unable to induce the activation of SMases at different time points of stimulation (data not shown). Furthermore, the N-SMase inhibitors 3OMeSM and *N*-acetyl-cysteine (NAC) significantly protected cortical neurons against soluble A β induced neurotoxicity as measured by the MTT assay (Fig. 2B) and quantification of apoptotic nuclei after DAPI staining (Figs. 3A and B). The presence of the specific A-SMase inhibitors, desipramine or imipramine, also rescued neurons from A β -induced cell death (Figs. 2B and 3A and B). Similar results were obtained using LDH release to monitor soluble A β -mediated cell death (data not shown). Interestingly, 3OMeSM and desipramine acted synergistically to modulate A β neurotoxicity (Fig. 2B). In contrast, inhibition of ceramide de novo synthesis by fumosin B1 or inhibition of serine-palmitoyl transferase, the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of sphingolipids, by myriocin had no effect on A β mediated cell death (Figs. 2B and 3). We therefore were able to demonstrate that SMase inhibitors, but not the ceramide synthase inhibitor, significantly reduced the activation of both caspase-3 and -9 induced by soluble A β oligomers (Fig. 3C). We have previously shown that soluble A β (1–42) oligomers also induced a cPLA $_2$ -arachidonic acid pathway (Kriem et al., 2005). Similarly, soluble A β (1–42) oligomers induced the activation of both N-SMase and A-SMase. Soluble A β (1–42) oligomers induced a 51% ($P < 0.001$) decrease in neuronal viability upon 24-h exposure at 1 μ M, while 3OMeSM and desipramine reduced soluble A β (1–42) neurotoxicity to 75 and 81% ($P < 0.001$), respectively (data not shown). Confirming the effects of SMase inhibitors on soluble A β oligomer-mediated cell death, an almost complete reduction in N-SMase and A-SMase activation was observed in neurons treated with 1 μ M A β (1–40) in the presence of 3OMeSM and desipramine, respectively (Fig. 4).

We next adopted the antisense knockdown technique to confirm the contribution of SMases in soluble A β -mediated cell death. Sense (S) and antisense (AS) oligonucleotides specific for N-SMase (N-AS) and A-SMase (A-AS) were generated. The presence of N-AS and A-AS markedly reduced the activation of N-SMase and A-SMase induced by 1 μ M A β (1–40), respectively (Fig. 5A).

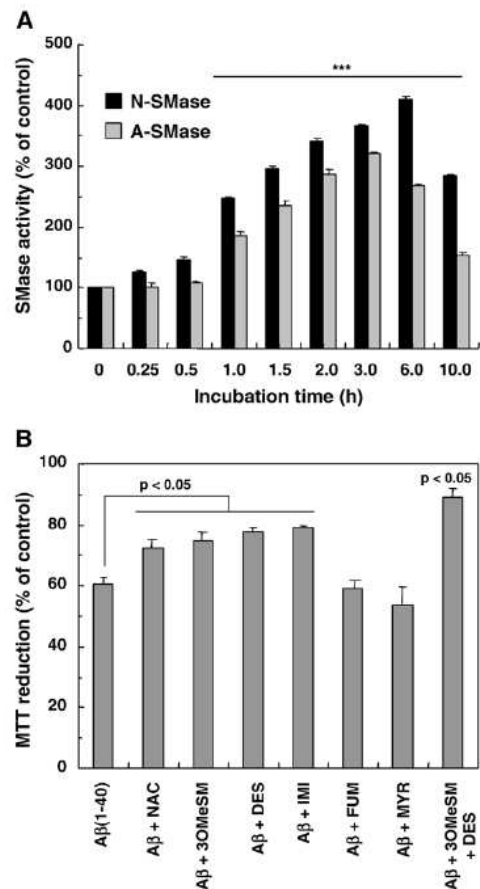


Fig. 2. Sphingomyelinase in soluble A β oligomer-induced cell death. (A) Cortical neurons were incubated for the indicated incubation times with 1 μ M soluble A β (1–40), followed by determination of N-SMase or A-SMase activities. (B) Alternatively, cells were preincubated for 2 h in the presence or absence of 0.5 mM NAC, 10 μ M 3OMeSM, 10 μ M desipramine (DES), 50 μ M imipramine (IMI), 50 μ M fumosin B1 (FUM) or 1 μ M myriocin (MYR), and then treated with 1 μ M soluble A β (1–40). Neurotoxic effects of soluble oligomers of A β were monitored after 24 h using the MTT assay. Data are means ($\pm$ SEM) of three different experiments with four determinations each and are normalized to the effect of vehicle, designated as 100% ($***P < 0.001$). Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffé's post hoc test ($^{\#}P < 0.05$). No significant differences were found between inhibitor-treated and control cells.

Under the same experimental conditions, the corresponding sense oligonucleotides failed to reduce SMase activation. The specificity of the designed AS oligonucleotides has been verified by observing the absence of cross-effect by N-AS on A-SMase activation and by A-AS on A-SMase activation (data not shown). Interestingly, both N-AS and A-AS significantly prevented soluble A β (1–40)-induced cell death (Fig. 5B) as well as neuronal apoptosis (Fig. 5C). Similar results have been obtained using soluble A β (1–42) peptide (data not shown). Recent studies have identified cathepsin-D as a putative downstream target of ceramide generated by lysosomal A-SMase (Heinrich et al., 1999). Interestingly, the presence of the selective cell-permeable cathepsin-D inhibitor octapeptide partly inhibited the neurotoxic effects of soluble A β

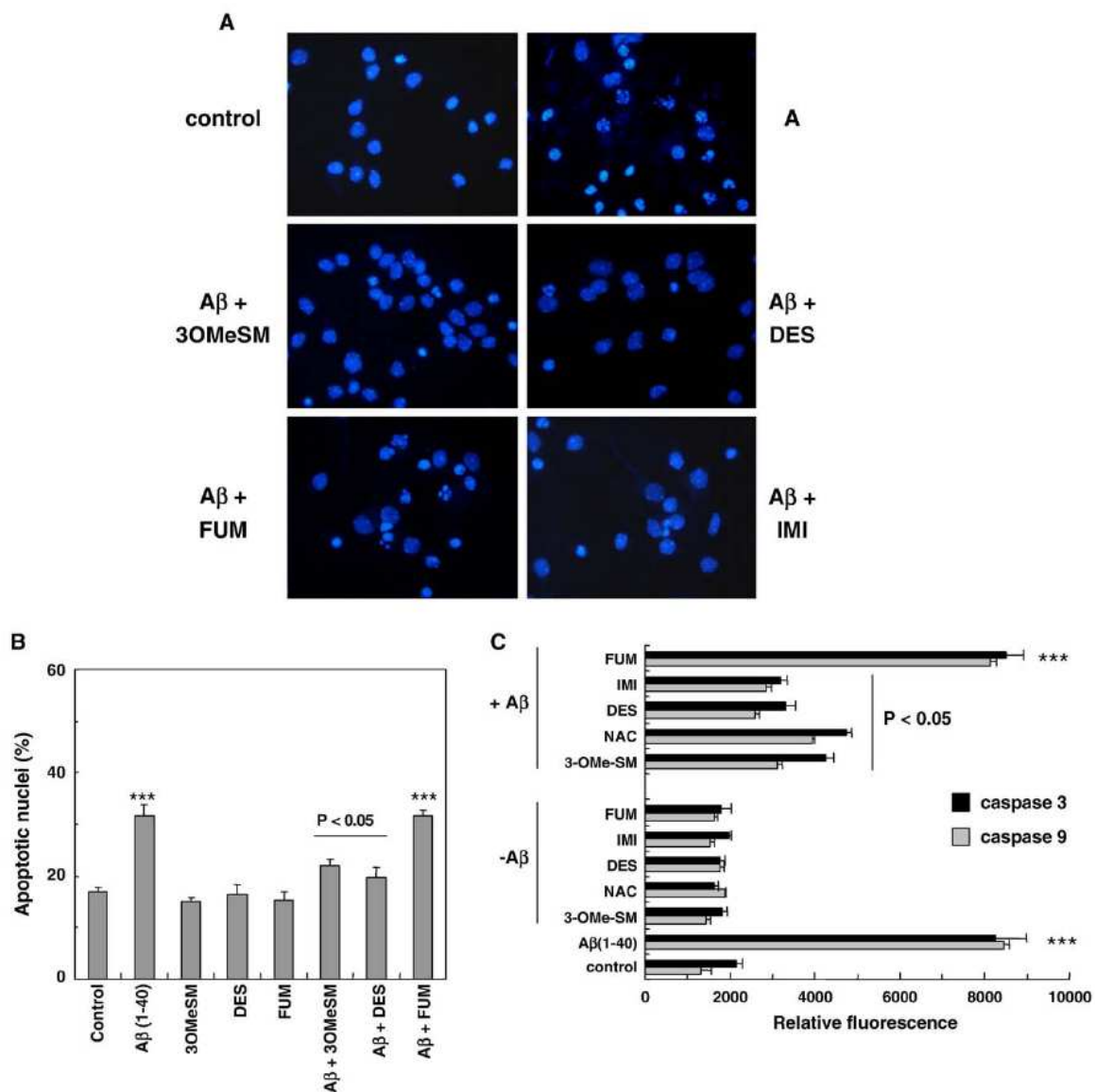


Fig. 3. Sphingomyelinase in soluble A β oligomer-induced neuronal apoptosis. Cortical neurons were treated as described in Fig. 2B. Apoptotic nuclei were visualized after DAPI staining (A) and quantified as described in the Materials and methods (B). Additionally, the measurement of caspase-3 and caspase-9 activation was performed after 6 h of incubation of cells with soluble A β oligomers (C).

oligomer-induced cell death (Fig. 6A) and apoptosis (Fig. 6B). These results highlight the key role played by both A-SMase and N-SMase activation in soluble A β oligomer-mediated neuronal apoptosis and cell death.

Involvement of reactive oxygen species and cPLA₂ pathway in soluble A β -induced activation of SMases

We next investigated the mechanisms by which soluble A β oligomers induced the activation of SMases and subsequent neuronal death. By using the MTT assay in order to monitor A β neurotoxicity, a 2-h preincubation of neurons with 1 mM Trolox, an antioxidant

molecule, significantly reduced soluble A β (1–40)-induced viability decrease to 15.5% ($P < 0.05$, as compared to A β (1–40) alone) (Fig. 7A). Interestingly, these neuroprotective effects of Trolox were associated with its inhibitory effects on soluble A β -mediated activation of both N-SMase and A-SMase (Fig. 7A). A similar antioxidant effect could also be involved in the protection from A β (1–40) neurotoxicity by NAC as depicted by Fig. 2B.

We previously demonstrated that both cPLA₂ antisense oligonucleotides and MAFP, a specific cPLA₂ inhibitor, rescued cortical neurons from soluble A β -mediated apoptosis by preventing soluble A β -mediated cPLA₂ activation and subsequent production of arachidonic acid (Kriem et al., 2005). Fig. 7B

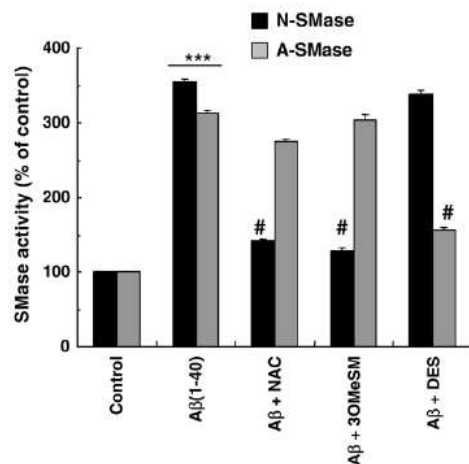


Fig. 4. Effects of SMase inhibitors on soluble Aβ-induced SMase activation. Cortical neurons were incubated for 2 h in the presence or absence of 0.5 mM NAC, 10 μM 3OMeSM, or 10 μM DES and then treated with 1 μM soluble Aβ(1–40). A-SMase and N-SMase activities were measured after 3 and 6 h of incubation with Aβ, respectively. Data are means (±SEM) of three different experiments with four determinations each and are normalized to the effect of vehicle, designated as 100% (***) $P < 0.001$. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffé's post hoc test ($^{\#}P < 0.05$).

shows that cPLA₂ antisense oligonucleotides as well as MAFP significantly inhibited soluble Aβ-induced activation of N-SMase and A-SMase, in agreement with our data on arachidonic acid-induced neuronal cell death and activation of SMases (Fig. 1). The activation of the cPLA₂-arachidonic acid pathway induced by soluble Aβ oligomers in neurons is dependent on MAPK pathway (Kriem et al., 2005). It is noteworthy that the presence of PD98059, a MEK1 inhibitor, also reduced the soluble Aβ-induced SMase activation (data not shown). Altogether, these data support the hypothesis that a redox-sensitive activation of cPLA₂ and arachidonic acid production are primarily involved in soluble Aβ-induced SMase activation and subsequent cell death.

Is sphingosine-1-phosphate a neuroprotective factor against soluble Aβ-mediated cell death?

Evidence in the literature supports the hypothesis that sphingosine-1-phosphate (S1P) and its associated signaling pathways might be involved in regulatory mechanisms of SMase activation (Marchesini and Hannun, 2004). We thus investigated whether exogenous S1P may modulate soluble Aβ-induced SMase activa-

tion and subsequent cell death. Interestingly, S1P significantly protected cortical neurons from soluble Aβ-mediated cell death monitored by the MTT assay (Fig. 8A), as well as from apoptosis as quantified after DAPI staining (Fig. 8B). Similar results have been obtained using soluble Aβ(1–42) oligomers (data not shown). Furthermore, we observed that S1P also markedly reduced the activation of A-SMase, but not N-SMase, induced by soluble Aβ(1–40) peptide (Fig. 8C). Although the exact molecular

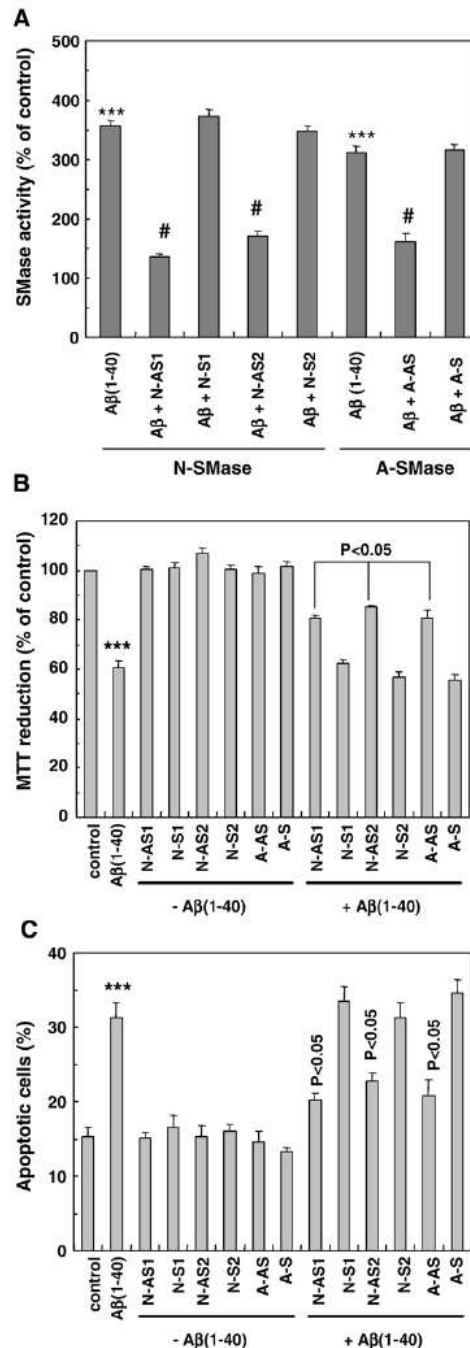


Fig. 5. Effects of SMase antisense oligonucleotides on soluble Aβ-treated cells. Cortical neurons were preincubated for 48 h in the absence or in the presence of 4 μM sense (S) or antisense (AS) oligonucleotides specific for N- or A-SMase. Two different sense or antisense oligonucleotides were used for N-SMase. A-SMase and N-SMase activities were measured after 3 and 6 h of incubation with Aβ, respectively (A). Soluble Aβ-induced neurotoxicity was estimated after a 24-h incubation using the MTT assay (B) or the measurement of apoptotic nuclei after DAPI staining (C). Data are means (±SEM) of three different experiments with three determinations each and are normalized to the effect of vehicle, designated as 100% (***) $P < 0.001$. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffé's post hoc test ($^{\#}P < 0.05$).

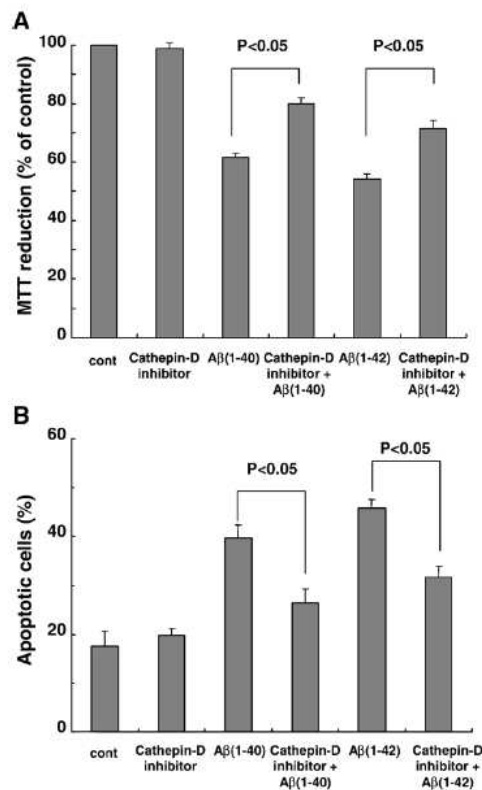


Fig. 6. A selective cathepsin-D inhibitor protects cortical neurons from soluble A β oligomer-mediated cell death and apoptosis. Cortical neurons were preincubated for 2 h with 10 μ M cathepsin-D inhibitor octapeptide and then exposed to 1 μ M soluble A β (1–40) or (1–42). Soluble A β -induced neurotoxicity was estimated after a 24-h incubation using the MTT assay (A) or the measurement of apoptotic nuclei after DAPI staining (B). Data are means ($\pm$ SEM) of three different experiments with three determinations each and are normalized to the effect of vehicle, designated as 100%. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffé's post hoc test ($^{\#}P < 0.05$).

mechanisms responsible for the rescuing effects of SIP remain to be clarified, our data strongly suggest that it occurs in part by inhibiting soluble A β -activation of A-SMase.

Discussion

Despite extensive studies aiming to characterize the ubiquitous acid lysosomal SMase (A-SMase) and the neutral Mg²⁺-dependent and -independent SMases (N-SMase), their specific roles in sphingomyelin turnover in neurons, especially in regards to the stress response, remain unclear (for review, see Marchesini and Hannun, 2004). The results presented in this study clearly suggest that soluble oligomers of A β (1–40) and A β (1–42), but not A β (40–1) induce neuronal apoptosis mainly through the activation of both N-SMase and A-SMase. First, soluble oligomers of A β markedly induce the enzymatic activities of both N-SMase and A-SMase. Second, specific inhibitors and antisense knockdown of N-SMase and A-SMase protect neurons from soluble A β -induced apoptosis and cell death. Third, a pharmacological inhibition of

ceramide synthase has no effect on soluble A β -mediated cell death. This supports the notion that soluble A β -mediated cell death proceeds mainly through ceramide production after SMase activation rather than through de novo synthesis of ceramide. These results emphasize a critical role of N-SMase and A-SMase in soluble A β oligomer-induced neuronal damage. In keeping with this hypothesis is the recent demonstration of an early accumulation of long chain ceramides during normal brain aging and in the brains of AD affected subjects (Cutler et al., 2004).

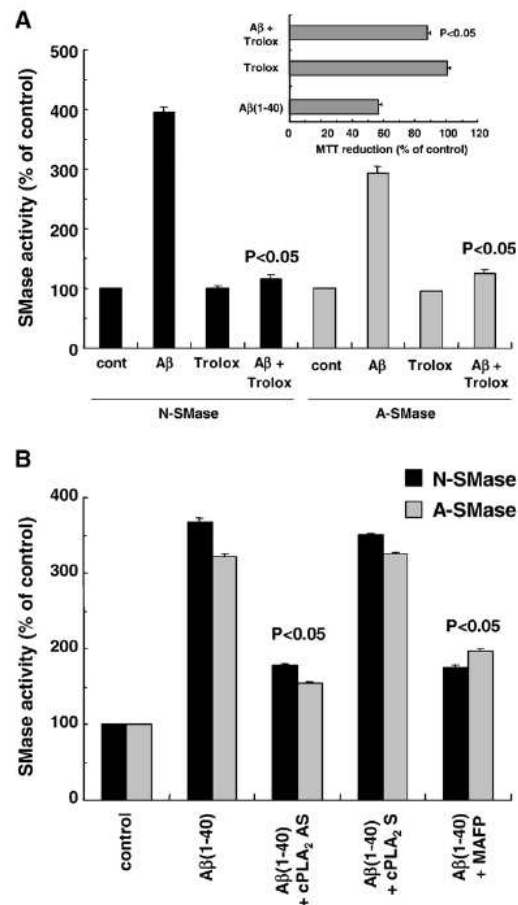


Fig. 7. cPLA₂ inhibitor and antisense oligonucleotide effects on soluble A β -induced SMase activation. (A) Cortical neurons were preincubated for 2 h with 1 mM Trolox and then exposed to 1 μ M soluble A β (1–40). Cell viability was monitored after 24-h incubation with A β using the MTT assay. A-SMase and N-SMase activities were measured after 3 and 6 h of incubation with 1 μ M A β , respectively. (B) Alternatively, cells were preincubated for 48 h in the presence or absence of 4 μ M cPLA₂ sense or antisense oligonucleotide as previously described (Kriem et al., 2005). Another set of cells were pretreated for 2 h with 1 μ M MAFF. Then all cells were incubated with 1 μ M soluble oligomers of A β (1–40). A-SMase and N-SMase activities were measured after 3 and 6 h of incubation with A β , respectively. Data are means ($\pm$ SEM) of three different experiments with three determinations each and are normalized to the effect of vehicle, designated as 100%. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffé's post hoc test ($^{\#}P < 0.05$).

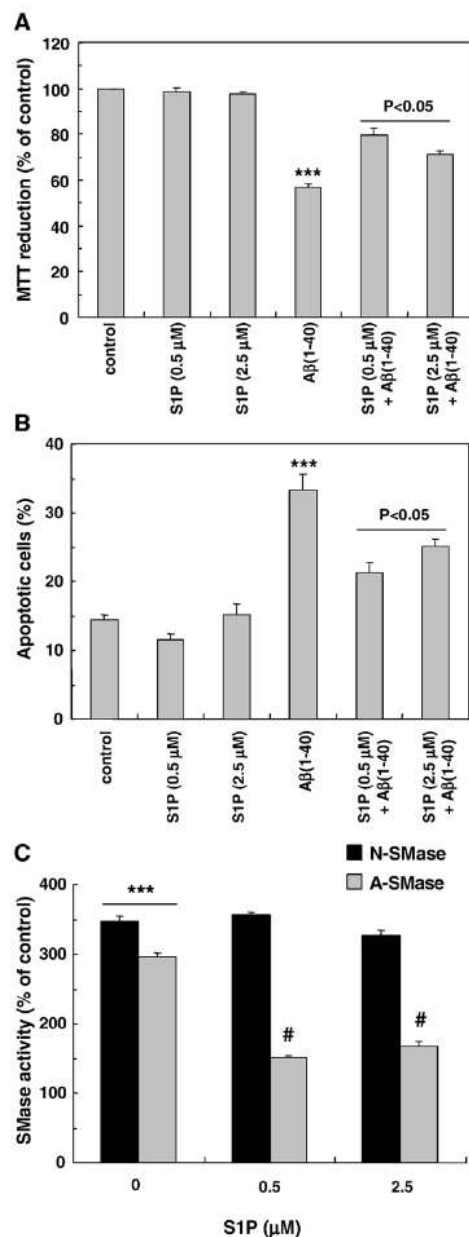


Fig. 8. Neuroprotective effects of sphingosine-1-phosphate. Cortical neurons were treated in the absence or presence of indicated concentrations of S1P added concomitantly to 1 μM soluble Aβ(1–40). The neurotoxicity of Aβ was monitored after 24 h by the MTT assay (A) and the quantification of apoptotic nuclei after DAPI staining (B). A-SMase and N-SMase activities were measured after 3 and 6 h of incubation with Aβ, respectively (C). Data are means (±SEM) of three different experiments with three determinations each and are normalized to the effect of vehicle, designated as 100% (****P* < 0.001). Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffé's post hoc test (#*P* < 0.05).

The importance of apoptosis in AD pathogenesis has been strongly supported by evidence describing increased TUNEL staining and caspase activation in AD brain (Games et al., 1995; Smale et al., 1995; Holcomb et al., 1998; Gervais et al., 1999). Alteration of synaptic activity, modifications of the neuronal cytoskeleton network, axonal transport, and thus subsequent neuronal loss (essentially by an apoptotic-like pathway) represent major cellular insults occurring at early stages of the disease (Vila and Przedborski, 2003). This has been confirmed by a recent study showing a continuum of apoptotic-related gene expression as the brain ages and as the disease progresses (Lukiw, 2004). Increasing evidence suggests that the selective neuronal cell death in AD involves activation of caspases, which critically participates in apoptosis through the initiation of intracellular pathways and the proteolytic cleavage of several target proteins (Dickson, 2004; Cribbs et al., 2004). Indeed, some experimental studies report the presence of activated forms of caspases and the accumulation of caspase-derived products in postmortem AD brain tissue, similarly to what was observed in *in vitro* models of Aβ neurotoxicity (Rohn et al., 2001; Su et al., 2001).

Efforts to elucidate the molecular mechanisms of the Aβ-induced neurodegeneration have been mainly conducted using either monomers or fibrillar Aβ peptides. Extensive precedents from studies using fibrillar preparations suggest a possible involvement of oxidative stress and calcium dysfunction in fibrillar Aβ-induced neuronal injury and cell death (Butterfield, 2003; Mattson, 2004). By contrast, Aβ monomers failed to induce neuronal cell death (Pike et al., 1991, 1995; Lorenzo and Yankner, 1994; Kim et al., 2004). Although the physiological functions of Aβ are a matter of some conjecture (Kamenetz et al., 2003), soluble oligomers of Aβ have been identified as one of the potential actors for neuronal apoptosis in AD brain (reviewed by Selkoe, 2004). However, the molecular mechanisms by which soluble Aβ oligomers trigger neuronal injuries remain poorly understood. Soluble Aβ oligomers are neurologically harmful molecules that accumulate early in AD brain (Gong et al., 2003). They appear to be determinant in Aβ's disruption of neuronal physiology and causing cell death (Pillot et al., 1999; Klein et al., 2001; Walsh et al., 2002; Wang et al., 2002; Sponne et al., 2003). We and others have clearly demonstrated that soluble Aβ oligomers mediate cell death via an early and rapid induction of neurite degeneration (Fifre et al., 2006; Whalen et al., 2005). Moreover, accumulative evidence suggests that soluble Aβ oligomers are involved in alteration of synaptic plasticity and subsequent neuronal death. Low doses of soluble Aβ inhibit glutamate-stimulated cAMP-response element-binding protein phosphorylation, a signaling pathway associated with synaptic plasticity (Tong et al., 2001). Accordingly, the inhibition of long-term potentiation by Aβ oligomers in hippocampal slice cultures is mediated by the activation of several classes of kinases (Wang et al., 2004; Kim et al., 2004).

Mimicking the chronic *in vivo* accumulation of soluble Aβ oligomers and the cellular pathogenesis of AD in a controlled environment has proven challenging. One of the main critics regarding the neurotoxicity of soluble Aβ oligomers in this disease process centers on the relatively high concentrations of Aβ generally used *in vitro* to injure neurons. However, several arguments help to support the use of synthetic Aβ at micromolar concentrations to understand its role in AD pathophysiology. Aβ oligomers are elevated in AD brain as compared to controls (Kuo et al., 1996; Kaye et al., 2003). Quantitative analysis of soluble

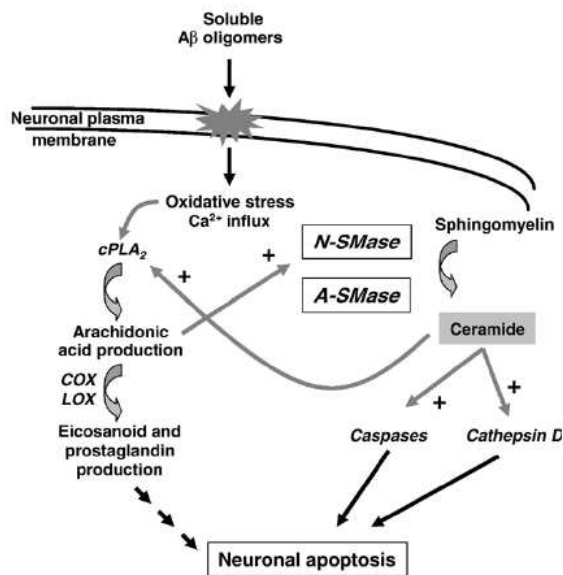


Fig. 9. Proposed mechanism of soluble A β oligomers induced SMase activation and subsequent cell death. After interaction with the plasma membrane of neurons (Sponne et al., 2003), soluble A β oligomers induce a rapid calcium- and ROS-sensitive activation of cPLA $_2$, resulting in the production of arachidonic acid (Kriem et al., 2005). Produced arachidonic acid might be used by cyclooxygenases (COX) and lipoxygenases (LOX) leading to arachidonic acid-derived metabolites involved in neuronal death and apoptosis. Additionally, arachidonic acid might activate both acidic and neutral sphingomyelinases. This activation is responsible for the increase in intracellular levels of ceramides, lipid second messengers well known to be involved in apoptotic cascades.

A β demonstrated the presence of an average amount of 1.5 $\mu\text{g/g}$ of tissue in frontal cortex of AD cases, while only 2 ng/g of tissue is detectable in normal brain (Tabaton and Piccini, 2005). One hypothesis may be that soluble A β oligomers can reach local micromolar concentration via biological processes that confine A β oligomers to discrete areas. Accordingly, in AD brain sections, oligomer-specific antibodies have identified antigens at locations distinct from neuritic plaques (Kayed et al., 2003), establishing the *in situ* presence of oligomers independent of fibrils. Indeed, it has been clearly demonstrated the selective accumulation of A β oligomers within dendritic arbors, targeting synapses (Gong et al., 2003; Lacor et al., 2004). Finally, A β oligomers extracted from AD brain were found indistinguishable from synthetic oligomer preparations with respect to isoelectric point, recognition by conformation-sensitive antibody, and selective dendritic binding (Gong et al., 2003; Lacor et al., 2004). These will be important areas of investigation to fully understand the concentration of soluble A β oligomers needed to induce pathologic changes, which is to date unknown. It is therefore crucial to mimic this process in order to better characterize the signaling apoptotic pathway(s) involved in soluble A β -mediated cell death.

Accumulating evidence highlights the role of the sphingomyelin cycle, e.g., sphingomyelinase-dependent production of ceramide, as a stress-activating signaling pathway. This pathway has been implicated in the regulation of growth suppression and apoptosis in various cell types, including glial cells and neurons from different brain areas (Hannun, 1996; Goodman and Mattson,

1996; Willaime et al., 2001). Indeed, a redox-sensitive activation of sphingomyelinases has been implicated in neuronal apoptosis associated with ischemic stroke and Parkinson's disease (Yu et al., 2000; Brugg et al., 1996). Moreover, an increase in ceramide levels is sufficient to cause neurological disease in humans as demonstrated by mental retardation and motor dysfunction in Farber's disease, a disorder associated with ceramidase deficiency (Bar et al., 2001). Whether the sphingomyelin cycle might be involved early in the pathological death of neurons in AD is poorly investigated yet.

The exact molecular mechanisms underlying soluble A β -mediated activation of SMases remain to be elucidated. While this manuscript was in preparation, it was recently reported by Jana and Pahan (2004) that fibrillar A β induces the death of primary neurons by activating an apoptotic pathway involving the activation of N-SMase only. These results emphasize our previous observations that different molecular mechanisms and cellular targets are involved in the cell death induced by soluble oligomeric and fibrillar A β peptide (Pillot et al., 1999; Sponne et al., 2003; Sponne et al., 2004). These data have recently been corroborated by a study underlying differential effects of soluble oligomeric and fibrillar A β on astrocyte-mediated inflammation (White et al., 2005). Here, we show that soluble A β oligomers induce the activation of both N-SMase and A-SMase through a cPLA $_2$ -arachidonic acid pathway. Accordingly, we recently demonstrated the critical role of a redox-sensitive cPLA $_2$ -arachidonic acid pathway in A β oligomer-induced cell death (Kriem et al., 2005). The results from the present study strongly support the contention that soluble A β -mediated activation of SMases results from both the generation of reactive oxygen species and arachidonic acid in neurons exposed to soluble A β oligomers. First, the presence of an antioxidant molecule such as Trolox inhibited soluble A β -mediated SMase activation and subsequent cell death. This is consistent with previous studies showing that oxidative stress increases, while antioxidants decrease, sphingomyelinase activities (Billis et al., 1998; Dbaibo et al., 1998; Goldkorn et al., 1998; Yoshimura et al., 1999). Accordingly, we recently observed that soluble A β oligomers induce the production of reactive oxygen species (Sponne et al., 2003, 2004) and glutathione (GSH) depletion (Florent et al., 2006) in cortical neurons. It is interesting to note that in the present study, NAC, a GSH precursor and an antioxidant molecule, protected cells against soluble A β -mediated apoptosis in part by inhibiting N-SMase activation. Second, the inhibition of the cPLA $_2$ -arachidonic acid pathway by a pharmacological or a knockdown approach significantly reduced both N-SMase and A-SMase activation and neuronal apoptosis induced by soluble A β oligomers. Third, incubation of cortical neurons with exogenous arachidonic acid induced cell death as well as activation of both N-SMase and A-SMase. Fourth, the presence of specific N-SMase and A-SMase inhibitors significantly reduced arachidonic acid-mediated cell death. Indeed, arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids had been shown previously to activate N-SMase (Hayter et al., 2001; Hofmann et al., 2000). However, to our knowledge, our study is the first to describe a direct activation of A-SMase and subsequent neuronal death by the cPLA $_2$ -arachidonic acid pathway.

In our experimental paradigm, activation of cPLA $_2$ and production of arachidonic acid by soluble A β may trigger both N-SMase and A-SMase activation. However, the subsequent neuronal cell death might result from at least two different pathways involving N-SMase and A-SMase independently, downstream of cPLA $_2$ activation. Indeed, specific inhibitors or antisense

oligonucleotides did not completely protect cortical neurons from soluble A β neurotoxicity, whereas the incubation of cells with both inhibitors of N-SMase and A-SMase simultaneously induced synergistic effects (see Fig. 2B). SMase activation and ceramide production may trigger apoptosis in both physiological and pathological situations (reviewed by Hannun and Luberto, 2000). In agreement with our present data (Fig. 3C), it has been shown that N-SMase and A-SMase activation might occur upstream of caspase-3 activation and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage (Smyth et al., 1996). Moreover, increasing evidence suggests that several molecular actors of the proapoptotic signaling function downstream of SMase activation (Marchesini and Hannun, 2004). It remains to be determined the nature of the downstream cellular targets of SMase metabolites produced in neurons upon soluble A β exposure. Interestingly, our results suggest that caspases act downstream of SMases in the soluble A β -mediated apoptotic pathway. Indeed, we demonstrate that the pharmacological or antisense inhibition of the SMase pathway results in an almost complete inhibition of the activation of caspase-3 and -9 induced by soluble A β oligomers. Recent studies have identified cathepsin D as a putative downstream target of ceramide generated by lysosomal A-SMase (Heinrich et al., 1999). Activated cathepsin D may thus trigger apoptosis by directly activating caspase-3 and caspase-9. Moreover, it has been recently suggested that cathepsin D might be one of the molecular actors involved in neurodegeneration in AD (reviewed by Nakanishi, 2003). This is in agreement with our present data (Fig. 6) showing that a peptidic cathepsin D inhibitor partially protects cortical neurons from soluble A β neurotoxicity.

Finally, we demonstrate here for the first time that sphingosine-1-phosphate is a potent neuroprotective factor against soluble A β oligomer-induced cell death and apoptosis. Interestingly, our data strongly suggest that this neuroprotective effect of SIP might occur in part through the inhibition of A-SMase activation induced by soluble A β oligomers. In agreement with our results is a study showing that SIP is able to inhibit A-SMase activation during apoptosis of macrophages (Gomez-Munoz et al., 2003). The exact molecular mechanism responsible for SIP neuroprotective effects remains, however, to be clarified. SIP and its cellular receptors are involved in several G protein-dependent signaling pathways regulating cell proliferation and survival (reviewed by Maceyka et al., 2002). One hypothesis currently being tested in our group is that SIP signaling might counteract the inhibition of ERK phosphorylation and caspase-3 activation primarily resulting from soluble A β oligomer-induced SMase activation. Indeed, several studies have described that ceramide, if anything, inhibits ERK phosphorylation and activates JNK/p38 proapoptotic pathway (Marchesini and Hannun, 2004). Interestingly, we recently provided evidence that SB202190, a p38 inhibitor, rescued cortical neurons from soluble A β -mediated cell death (Kriem et al., 2005). In contrast, it has been proposed that the pro-survival mechanisms of SIP are mediated via a SIP receptor/G α /ERK pathway (Lee et al., 1999; An et al., 2000).

In conclusion, this work identifies a novel mechanism for soluble A β oligomer-induced neuronal apoptosis. Regardless of the molecular pathways involved, our results reveal a causal relationship between soluble A β exposure and the activation of both A-SMase and N-SMase, which is likely to result from soluble A β oligomer-induced oxidative stress and arachidonic acid production (Fig. 9). Taken together, these results support the model in which soluble A β oligomers induce neuronal apoptosis

and cell death in part via the cPLA $_2$ -AA-SMase pathway. Although the local concentration of soluble A β oligomers present in the brain microenvironment of AD patients may differ from the concentration we used in primary neurons and though the *in vitro* situation of cortical neurons in culture may not closely resemble the *in vivo* situation of neurons in the brain of AD patients, our results clearly point out SMase as a possible therapeutic target to halt neuronal damage in AD.

Acknowledgments

This work was supported in part by Inserm, a grant from the *Région Lorraine* and from the *Communauté Urbaine du Grand Nancy*.

References

- An, S., Zheng, Y., Bleu, T., 2000. Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J. Biol. Chem.* 275, 288–296.
- Anderson, A.J., Su, J.H., Cotman, C.W., 1996. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *J. Neurosci.* 16, 1710–1719.
- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 302, 141–145.
- Bar, J., Linke, T., Ferlinz, K., Neumann, U., Schuchman, E.H., Sandhoff, K., 2001. Molecular analysis of acid ceramidase deficiency in patients with Farber disease. *Hum. Mutat.* 17, 199–209.
- Billis, W., Fuks, Z., Kolesnick, R., 1998. Signaling in and regulation of ionizing radiation-induced apoptosis in endothelial cells. *Recent Prog. Horm. Res.* 53, 85–92.
- Brann, A.B., Tcherpakov, M., Williams, I.M., Futerman, A.H., Fainzilber, M., 2002. Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 277, 9812–9818.
- Brugg, B., Michel, P.P., Agid, Y., Ruberg, M., 1996. Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *J. Neurochem.* 66, 733–739.
- Butterfield, D.A., 2003. Amyloid beta-peptide (1–42)-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences. *Curr. Med. Chem.* 10, 2651–2659.
- Butterfield, D.A., Boyd-Kimball, D., 2005. The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid β -peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 149–156.
- Chang, L., Bakhos, L., Wang, Z., Venton, D.L., Klein, W.L., 2003. Femtomole immunodetection of synthetic and endogenous amyloid-beta oligomers and its application to Alzheimer's disease drug candidate screening. *J. Mol. Neurosci.* 20, 305–313.
- Cribbs, D.H., Poon, W.W., Rissman, R.A., Blurton-Jones, M., 2004. Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 165, 353–355.
- Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., Mattson, M.P., 2004. Involvement of oxidative stress abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2070–2075.
- Dahlgren, K.N., Manelli, A.M., Stine, W.B., Baker, L.K., Krafft, G.A., LaDu, M.J., 2002. Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β

- peptides differentially affect neuronal viability. *J. Biol. Chem.* 277, 32046–32053.
- Dbalbo, G.S., Perry, D.K., Gamard, C.J., Platt, R., Poirier, G.G., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., 1998. p53-dependent ceramide response to genotoxic stress. *J. Clin. Invest.* 102, 329–339.
- Dickson, D.W., 2004. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J. Clin. Invest.* 114, 23–27.
- Drouot, B., Pinçon-Raymond, M., Chambaz, J., Pillot, T., 2000. Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 705–715.
- Estus, S., Tucker, H.M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E.F., Wogulis, M., Rydel, R.E., 1997. Aggregated amyloid- β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J. Neurosci.* 17, 7736–7745.
- Fifre, A., Spone, I., Koziel, V., Kriem, B., Yen Potin, F.T., Bihain, B.E., Olivier, J.-L., Oster, T., Pillot, T., 2006. Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. *J. Biol. Chem.* 281, 229–240.
- Florent, S., Malaplate-Armand, C., Youssef, I., 2006. Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid- β oligomers. *J. Neurochem.* 96, 385–395.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., et al., 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523–527.
- Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., et al., 1999. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97, 395–406.
- Goldkom, T., Balaban, N., Shannon, M., Chea, V., Matsukuma, K., Gilchrist, D., Wang, H., Chan, C., 1998. H_2O_2 acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiates apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J. Cell Sci.* 111, 3209–3220.
- Gomez-Munoz, A., Kong, J., Sahl, B., Steinbrecher, U.P., 2003. Sphingosine-1-phosphate inhibits acid sphingomyelinase and blocks apoptosis in macrophages. *FEBS Lett.* 539, 56–60.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 2003. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10417–10422.
- Goodman, Y., Mattson, M.P., 1996. Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults, and amyloid beta-peptide toxicity. *J. Neurochem.* 6, 869–872.
- Hannun, Y.A., 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274, 1855–1859.
- Hannun, Y.A., Luberto, C., 2000. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* 10, 73–80.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Hayter, H.L., Pettus, B.J., Ito, F., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., 2001. TNF α -induced glutathione depletion lies downstream of cPLA2 in L929 cells. *FEBS Lett.* 507, 151–156.
- Heinrich, M., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., et al., 1999. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J.* 18, 5252–5263.
- Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., Stoffel, W., 2000. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5895–5900.
- Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., et al., 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med.* 4, 97–100.
- Hsia, A.Y., Masliah, E., McConlogue, L., et al., 1999. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3228–3233.
- Jana, A., Pahan, K., 2004. Fibrillar amyloid- β peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 279, 51451–51459.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R., 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925–937.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X., Peck, A., 1988. Clinical, pathological and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol.* 23, 138–144.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., Glabe, C.G., 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486–489.
- Kilkus, J., Goswami, R., Testai, F.D., Dawson, G., 2003. Ceramide in rafts (detergent-insoluble fraction) mediates cell death in neurotumor cell lines. *J. Neurosci. Res.* 72, 65–75.
- Kim, H.J., Chae, S.C., Lee, D.K., Chromy, B., Lee, S.C., Park, Y.C., Klein, W.L., Krafft, G.A., Hong, S.T., 2003. Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta-protein. *FASEB J.* 17, 118–120.
- Kim, H.J., Kim, J.H., Chae, S.C., Park, Y.C., Kwon, K.S., Hong, S.T., 2004. Soluble oligomeric A β disrupts the protein kinase C signaling pathway. *NeuroReport* 15, 503–507.
- Klein, W.L., Krafft, G.A., Finch, C.E., 2001. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* 24, 219–224.
- Koistinaho, M., Ort, M., Cimaidevilla, J.M., Vondrou, R., Cordell, B., Koistinaho, J., Bures, J., Higgins, L.S., 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, 14675–14680.
- Koistinaho, M., Kettunen, M.I., Goldsteins, G., Keinänen, R., Salminen, A., Ort, M., Bures, J., Liu, D., Kauppinen, R.A., Higgins, L.S., Koistinaho, J., 2002. Beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse A beta deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1610–1615.
- Kolesnick, R.N., Kronke, M., 1998. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 643–665.
- Kriem, B., Spone, I., Fifre, A., et al., 2005. Cytosolic phospholipase A₂ mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid- β peptide. *FASEB J.* 19, 85–87.
- Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J., Roher, A.E., 1996. Water-soluble A β (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* 271, 4077–4081.
- Lacor, P.N., Buiel, M.C., Chang, L., et al., 2004. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid β oligomers. *J. Neurosci.* 24, 10191–10200.
- Lee, M.J., Thangada, S., Claffey, K.P., Ancellin, N., Liu, C.H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R.I., Hla, H., 1999. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99, 301–312.
- Lorenzo, A., Yankner, B., 1994. β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6448–6453.
- Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., et al., 1999. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 155, 853–862.
- Lukiw, W.J., 2004. Gene expression profiling in fetal, aged, and Alzheimer hippocampus: a continuum of stress-related signaling. *Neurochem. Res.* 29, 1287–1297.
- Maceyka, M., Payne, S.G., Milstien, S., Spiegel, S., 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1582, 193–201.
- Marchesini, N., Hannun, Y.A., 2004. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* 82, 27–44.

- Mattson, M.P., 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631–639.
- McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., Masters, C.L., 1999. Soluble pool of beta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46, 860–866.
- Montine, T.J., Morrow, J.D., 2005. Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 166, 1283–1289.
- Nakanishi, H., 2003. Neuronal and microglial cathepsins in aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 2, 367–381.
- Numakawa, T., Nakayama, H., Suzuki, S., et al., 2003. Nerve growth factor-induced glutamate release is via p75 receptor, ceramide and Ca^{2+} from ryanodine receptor in developing cerebellar neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 41259–41269.
- Perry, G., Nunomura, A., Hirai, K., Zhu, X., Perez, M., Avila, J., Castellani, R.J., Atwood, C.S., Aliev, X., Sayre, L.M., Takeda, A., Smith, M.A., 2002. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radical Biol. Med.* 33, 1475–1479.
- Pettus, B., Chalfant, C., Hannun, Y.A., 2002. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 114–125.
- Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., Cotman, C.W., 1991. In vitro aging of β -amyloid protein causes peptidic aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* 563, 311–314.
- Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., Cotman, C.W., 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptide: contributions of the beta25–35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* 64, 253–265.
- Pillot, T., Drouet, B., Queillé, S., Labeur, C., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., Pinçon-Raymond, M., Chambaz, J., 1999. The non-fibrillar amyloid β -peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J. Neurochem.* 73, 1626–1634.
- Rohn, T.T., Head, E., Su, J.H., Anderson, A.J., Bahr, B.A., Cotman, C.W., Cribbs, D.H., 2001. Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 158, 189–198.
- Selkoe, D.J., 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789–791.
- Selkoe, D.J., 2004. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* 140, 627–638.
- Smale, G., Nichols, N.R., Brady, D.R., Finch, C.E., Horton, W.E., 1995. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 133, 225–230.
- Smith, M.A., Perry, G., Richey, P.L., Sayre, L.M., Anderson, V.E., Beal, M.F., Kowall, N., 1996. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382, 120–121.
- Smyth, M.J., Perry, D.K., Zhang, J., Poirier, G.G., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 1996. pRICE: a downstream target for ceramide-induced apoptosis and for the inhibitory action of Bcl-2. *Biochem. J.* 316, 25–28.
- Soderberg, M., Edlund, C., Alafuzoff, I., Kristensson, K., Dallner, G., 1992. Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J. Neurochem.* 59, 1646–1653.
- Sponne, I., Fife, A., Drouet, B., Klein, C., Koziel, V., Pinçon-Raymond, M., Olivier, J.-L., Chambaz, J., Pillot, T., 2003. Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid- β peptide proceeds through an early ROS-dependent cytoskeleton perturbation. *J. Biol. Chem.* 278, 3437–3445.
- Sponne, I., Fife, A., Koziel, V., Oster, T., Olivier, J.-L., Pillot, T., 2004. Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide. *FASEB J.* 18, 836–838.
- Su, J.H., Zhao, M., Anderson, A.J., Srinivasan, A., Cotman, C.W., 2001. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. *Brain Res.* 898, 350–357.
- Tabaton, M., Piccini, A., 2005. Role of water-soluble amyloid- β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Path.* 86, 139–145.
- Tong, L., Thornton, P.L., Balazs, R., Cotman, C.W., 2001. Beta-amyloid-(1–42) impairs activity-dependent cAMP-response element-binding protein signaling in neurons at concentrations in which cell survival is not compromised. *J. Biol. Chem.* 276, 17301–17306.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., et al., 1996. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75–79.
- Vila, M., Przedborski, S., 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 365–375.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibited hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.
- Wang, J., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 1999. The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp. Neurol.* 158, 328–337.
- Wang, H.W., Pasternak, J.F., Kuo, H., Ristic, H., Lambert, M.P., Chromy, B., Viola, K.L., Klein, W.L., Stine, W.B., Krafft, G.A., Trommer, B.L., 2002. Soluble oligomers of beta amyloid (1–42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res.* 924, 133–140.
- Wang, Q., Walsh, D.M., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., Anwyl, R., 2004. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid- β peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J. Neurosci.* 24, 3370–3378.
- Whalen, B.M., Selkoe, D.J., Hartley, D.M., 2005. Small non-fibrillar assemblies of amyloid β -protein bearing the Arctic mutation induce rapid neuritic degeneration. *Neurobiol. Dis.* 20, 254–266.
- White, J.A., Manelli, A.M., Holmberg, K.H., Van Eldik, L.J., LaDu, M.J., 2005. Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β 1–42 on astrocytes-mediated inflammation. *Neurobiol. Dis.* 18, 459–465.
- Willaime, S., Vanhoutte, P., Caboche, J., Lemaigre-Dubreuil, Y., Mariani, J., Brugg, B., 2001. Ceramide-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by an increase in p38 phosphorylation and not by the decrease in ERK phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2037–2046.
- Yoshimura, S., Banno, Y., Nakashima, S., Hayashi, K., Yamakawa, H., Sawada, M., Sakai, N., Nozawa, Y., 1999. Inhibition of neutral sphingomyelinase activation and ceramide formation by glutathione in hypoxic PC12 cell death. *J. Neurochem.* 73, 675–683.
- Yu, Z.F., Nikolova-Karakashian, M., Zhou, D., Cheng, G., Schuchman, E.H., Mattson, M.P., 2000. Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis. *J. Mol. Neurosci.* 15, 85–97.

II. L'acide docosahexaénoïque prévient l'apoptose neuronale induite par les oligomères solubles de peptide amyloïde- β

1. Introduction

Comme le suggèrent la partie I du chapitre Résultats et Discussion et les données disponibles dans la littérature, l'interaction directe du peptide A β soluble avec la membrane neuronale, notamment grâce à ses propriétés fusogènes, représente l'étape initiatrice nécessaire à la neurotoxicité du peptide. Elle précéderait l'activation de diverses cascades de signalisation pro-apoptotique convergeant vers le déclenchement du programme de mort cellulaire (440, 513, 599). L'identification des facteurs biologiques capables de moduler cette interaction, que ce soit au niveau de l'affinité entre le peptide et la membrane ou de la signalisation intracellulaire et des mécanismes neurotoxiques en résultant, présente donc un intérêt évident dans le but de définir des stratégies efficaces pour le traitement préventif ou thérapeutique de la MA.

Nous avons déjà détaillé dans le chapitre Introduction les nombreuses influences connues des lipides sur la MA, qu'il s'agisse des taux de cholestérol ou du génotype lié à l'ApoE, considéré comme le facteur de risque majeur de la maladie. Nous avons aussi clairement démontré dans la partie I du chapitre Résultats et Discussion l'importance cruciale de l'AA libéré par la cPLA₂ à partir des phospholipides membranaires dans la neurotoxicité du peptide A β soluble, avec la production de divers médiateurs lipidiques toxiques comme les céramides. Le statut et le métabolisme lipidiques sont donc des éléments qui définissent de façon essentielle la susceptibilité des neurones à la mort induite par les oligomères d'A β dès leur interaction avec la membrane plasmique. Parmi les paramètres pouvant moduler cette interaction entre le peptide A β soluble et la membrane neuronale, la composition lipidique de la bicouche membranaire paraît jouer un rôle déterminant. C'est en particulier le cas des AGPI qui représentent approximativement 35% du contenu lipidique du cerveau (359, 789) et sont concentrés dans les membranes des neurones, plus spécialement au niveau synaptique, et dans celles des cellules rétinienne. Les données de la littérature suggèrent que le maintien d'un niveau suffisant d'AGPI dans les membranes cérébrales soit nécessaire au bon fonctionnement du SNC (398). De ce fait, il n'est guère surprenant que le déficit en AGPI, notamment celui en DHA, puisse être associé à des troubles du comportement ou cognitifs, et même favoriser la survenue de maladies neurodégénératives comme la MA. Plusieurs études épidémiologiques rapportent en effet une prévalence moindre de la MA dans les populations dont le régime alimentaire est riche en AGPI de type ω 3. Cette corrélation est étayée par plusieurs expérimentations *in vivo* ayant mis en évidence une amélioration de l'apprentissage après supplémentation nutritionnelle par des huiles de poisson ou certains AGPI dont le DHA, confirmant l'influence déterminante de l'apport et du statut lipidiques dans la survenue des troubles cognitifs (335, 336, 488).

Les AGPI estérifiés et incorporés dans les phospholipides membranaires présentent des propriétés physicochimiques particulières et exercent à ce titre des effets décisifs, tant sur l'architecture que sur les fonctionnalités de la membrane neuronale. La nature de ces AGPI ainsi que leurs teneurs peuvent en particulier affecter l'environnement lipidique et les partenaires protéiques associés à la membrane, influant donc sur les conditions d'interaction du peptide A β soluble et la transduction du signal à l'origine de son potentiel neurotoxique. En effet, l'incorporation d'AGPI de type ω 3 dans des modèles de membranes biologiques modifie les propriétés de la bicouche, en termes de fluidité et d'épaisseur notamment, et entraîne un remodelage des microdomaines membranaires (358, 486, 699), qui pourrait définir de nouvelles plateformes de signalisation cellulaire. Les modifications de la composition lipidique et protéique pourraient alors avoir pour effets de moduler l'interaction du peptide A β soluble avec la membrane neuronale, d'inhiber les cascades pro-apoptotiques et de restaurer ou préserver les voies de survie cellulaire induites par cette interaction. Ces hypothèses pourraient, les unes comme les autres, apporter une explication moléculaire au potentiel neuroprotecteur des AGPI.

2. Démarche expérimentale

Nous avons débuté cette partie de notre étude en vérifiant l'effet neurotrophique du DHA sur notre modèle *in vitro*, les neurones corticaux embryonnaires de rat en culture primaire. Nous nous sommes ensuite proposé de déterminer si l'enrichissement du milieu par cet AG a des répercussions sur la composition lipidique des membranes neuronales et synaptiques. Ces expérimentations ont été réalisées en parallèle avec du DHA ajouté sous forme libre ou estérifiée dans des phospholipides pour compléter le milieu de neurones en culture *in vitro* ou celui de synaptosomes, modèle subcellulaire *ex vivo* dont le protocole de purification a dû être préalablement mis au point. Plusieurs études sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la neurotoxicité du peptide A β soluble ont démontré l'influence déterminante du statut lipidique et des propriétés physicochimiques des membranes neuronales sur l'initiation des cascades pro-apoptotiques (27, 173). Nous avons donc recherché si la supplémentation en DHA affecte la toxicité du peptide A β soluble *in vitro*.

Après avoir établi le potentiel neuroprotecteur de cet AG contre l'apoptose induite par les oligomères d'A β , nous avons focalisé nos efforts sur la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués. Pour ce faire, nous avons étudié si la supplémentation en DHA peut avoir un impact sur les différentes voies neurotoxiques identifiées comme des éléments clefs du processus apoptotique induit par les peptides A β non fibrillaires. Nous nous sommes en particulier attachés à déterminer l'effet du DHA sur l'activation de la cPLA $_2$ et la cascade de signalisation pro-apoptotique impliquant les SMases (440, 513). Nous avons aussi vérifié si le prétraitement des neurones par le DHA avant exposition au peptide A β soluble peut éviter le stress oxydant induit par ce dernier (694, 695), certains auteurs ayant rapporté que cet AG possède des propriétés antioxydantes (335, 645, 762). Nous avons également étudié si le DHA peut prévenir la détérioration du cytosquelette, reflet de la dégénérescence

axonale (245, 694), et s'il peut empêcher la mort neuronale en agissant sur les étapes du processus apoptotique dont l'inhibition des voies de survie cellulaire et l'activation des caspases.

3. Résultats et discussion

3-1. Effets neurotrophiques de l'acide docosahexaénoïque

Nous avons donc débuté cette étude en évaluant les propriétés neurotrophiques du DHA. Pour ce faire, le milieu de culture des neurones corticaux a été supplémenté en ajoutant du DHA sous forme libre. Des dilutions extemporanées ont été préparées dans l'isopropanol, puis dans le milieu de culture contenant aussi de l'albumine délipidée dont le rôle est de prendre en charge les AG libres, évitant ainsi la formation de micelles potentiellement neurotoxiques.

Les résultats obtenus en microscopie en contraste de phase sous lumière blanche mettent en évidence non seulement l'absence d'effet cytotoxique par le DHA, mais surtout un effet neurotrophique bien illustré par la figure 61. Comparativement aux témoins dont le milieu n'a été additionné que du véhicule [isopropanol + albumine délipidée], les neurones cultivés en présence de 500 nM de DHA présentent dès 24 h après le début du traitement une morphologie particulière, paraissant plus nets, avec des prolongements, semble-t-il, plus nombreux et assurément plus épais.

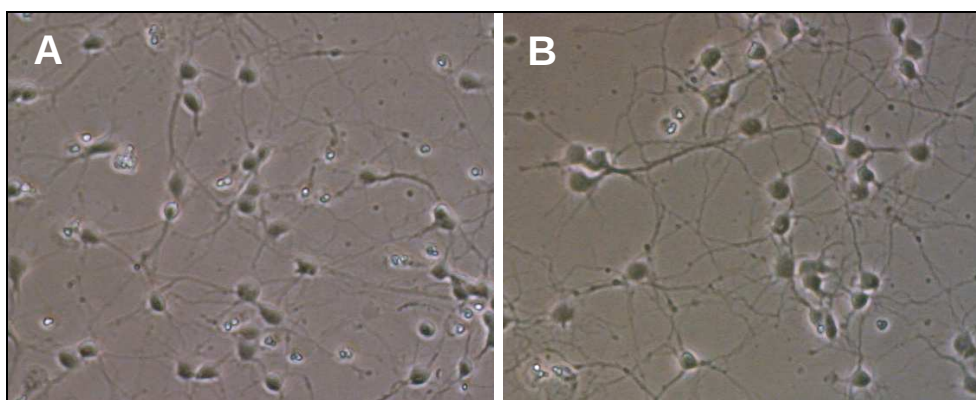


Figure 61. Effet neurotrophique du DHA sur les neurones embryonnaires en culture

A, témoin ; B, DHA 500 nM

Les neurones corticaux ont été cultivés durant 48 h dans un milieu supplémenté en DHA libre, avant d'être observés en microscopie en contraste de phase, $\times 40$. Les champs illustrés ici sont représentatifs de ceux observés dans au moins 4 cultures indépendantes.

Nous aurons l'occasion de revenir sur l'aspect morphologique particulier des cellules traitées par le DHA dans la suite de ce travail. En effet, les différents tests de marquage réalisés ont tous conduit aux mêmes résultats, confirmant ainsi l'observation déjà rapportée à propos de neurones hippocampiques traités par le DHA (111). Nos résultats sont surtout en accord avec l'augmentation significative de la longueur et du nombre des prolongements rapportée après l'analyse morphométrique des neurones corticaux embryonnaires de rat en culture primaire supplémentés par du DHA (116).

Il nous a paru intéressant alors d'étudier si le DHA peut exercer ces mêmes effets neurotrophiques sur les cellules de la lignée de neuroblastome de souris Neuro2A, avant ou après différenciation en neurones. À l'inverse des neurones corticaux embryonnaires en culture qui, rappelons le, sont des cellules post-mitotiques, les cellules Neuro2A conservent la possibilité de proliférer durant une grande partie de la phase de différenciation à laquelle elles sont soumises. Nous pouvions donc nous attendre à ce qu'un éventuel effet neurotrophique puisse s'exprimer aussi par une stimulation de la prolifération cellulaire.

Les cellules Neuro2A différenciées en neurones ont donc été traitées par du DHA pendant 48 h, plus précisément lors de la dernière phase (J2 et J3) du processus de différenciation, l'AG étant ajouté au milieu D2 contenant 5 μ M d'acide rétinoïque. La figure 62 montre clairement le même effet neurotrophique du DHA sur les cellules Neuro2A, sans influence du degré de différenciation. Mais nous avons aussi observé une augmentation de la densité cellulaire dans les cultures en présence de doses croissantes de DHA, nous incitant à quantifier l'impact de l'AG sur la croissance des cellules.

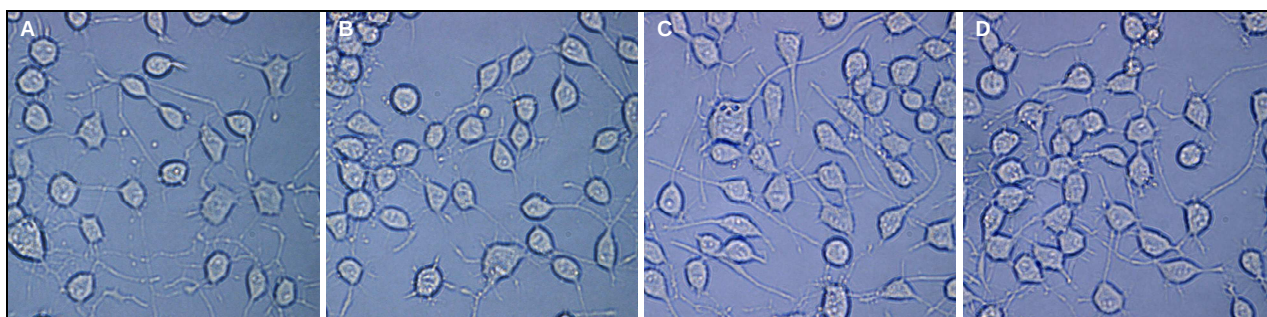


Figure 62. Effet neurotrophique du DHA sur les cellules Neuro2A différenciées en culture
A, témoin ; B, DHA 50 nM ; C, DHA 500 nM ; D, DHA 5 μ M

Les cellules Neuro2A ont été cultivées durant 48 h dans le milieu D2 supplémenté en DHA, avant d'être observées en microscopie en contraste de phase, 6×60 .

L'effet neurotrophique a été constaté sur au moins 2 cultures indépendantes, sans influence visible du degré de différenciation des cellules Neuro2A.

Les mesures de viabilité par le test au MTT montrent clairement que l'AG favorise la prolifération cellulaire proportionnellement à sa concentration et ce dès 5 nM, la dose la plus faible testée (figure 63). Cette constatation est confirmée par l'étude du cycle cellulaire, réalisée après marquage de l'ADN des cellules par l'iodure de propidium et analyse en cytométrie en flux, dont les résultats sont consignés dans le tableau en encart sur la figure 63. Ils indiquent que le traitement par 5 μ M de DHA induit une diminution de la proportion des cellules Neuro2A en phases G_0/G_1 , corrélée à une augmentation de celle des cellules en phases S et G_2/M . Ces résultats convergent donc bien vers l'idée que le DHA possède des propriétés neurotrophiques *in vitro* en accord avec les données de la littérature sur l'importance de l'apport des AGPI-lc de type $\omega 3$ et en particulier du DHA dans le développement et la maturation du SNC ainsi que dans le maintien de l'intégrité neuronale (527, 789).

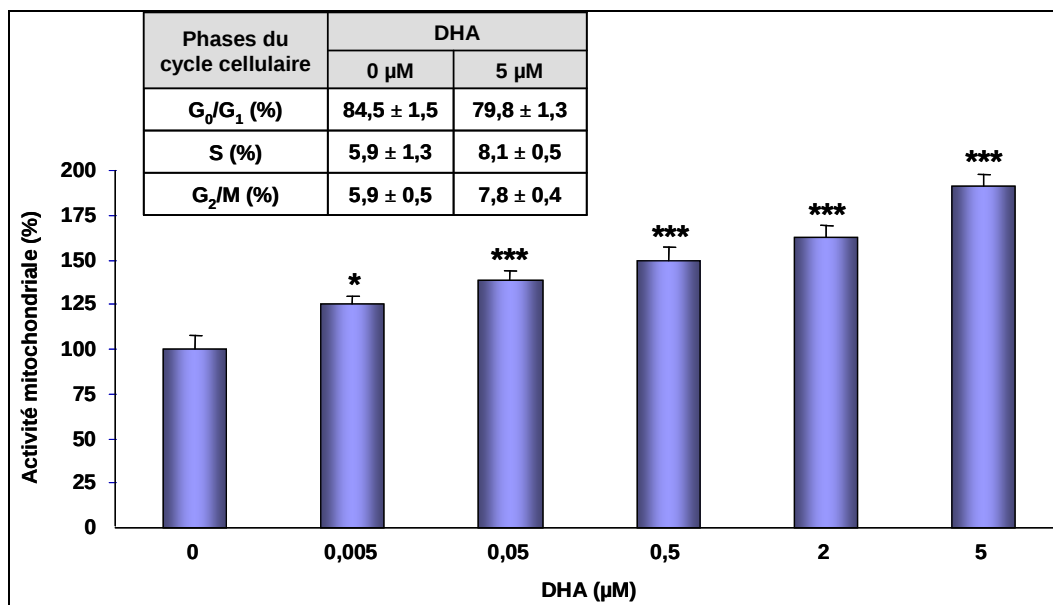


Figure 63. Effets neurotrophiques du DHA sur la prolifération des cellules Neuro2A

Les cellules Neuro2A ont été cultivées durant 48 h dans le milieu D2 supplémenté en DHA, puis soumises au test au MTT pour la mesure de l'activité mitochondriale, ou marquées par l'iodure de propidium pour l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont indépendants du degré de différenciation des cellules testées. L'activité mitochondriale des cellules traitées a été comparée à celle des cellules témoins à laquelle la valeur de 100% a été attribuée.

(, $p < 0,05$; *** , $p < 0,001$; $N=3$; $n=4$)*

Conscients des problèmes de stabilité et de biodisponibilité que peut poser la supplémentation en AG libre, *a fortiori* un polyinsaturé, nous avons voulu évaluer les propriétés neurotrophiques du DHA en apportant cette fois l'AG estérifié, sous la forme de phospholipides extraits à partir de tête de saumon (PL). Le protocole ayant permis d'obtenir cette préparation a fait l'objet d'un brevet déposé par le Laboratoire des Science et Génie Alimentaires (LSGA) de l'ENSAIA. Avant les tests sur nos modèles *in vitro*, la qualité et la composition de la préparation de PL sont analysées par Iatroscan, un système analytique composé d'une CCM couplée à une détection par ionisation de flamme, et par CPG. C'est ainsi que le taux de PL a été évalué à 95%, tandis que celui de DHA est de 30%. Sachant que le DHA estérifié occupe habituellement la position *sn-2* sur les PL, ces taux permettent de considérer que plus de 60% des PL de la préparation portent naturellement un DHA. Précisons aussi que la préparation de PL que nous avons utilisée pour cette étude présente des caractéristiques équivalentes de celles qui ont permis la fabrication des comprimés commercialisés récemment pour une supplémentation nutritionnelle en AG de type $\omega 3$ sous le nom de Vectomega[®] par la société Le Stum (Lorient).

Les neurones corticaux ont donc été cultivés pendant 48 h en présence de différentes dilutions, dans l'isopropanol, de la préparation de PL de saumon riches en DHA estérifié, dans un milieu cette fois dépourvu d'albumine délipidée. L'examen microscopique des cultures a permis de constater la même morphologie des neurones et de leurs prolongements que celle observée après traitement par le DHA libre, nous conduisant à conclure à un effet neurotrophique similaire par les PL (figure 64).

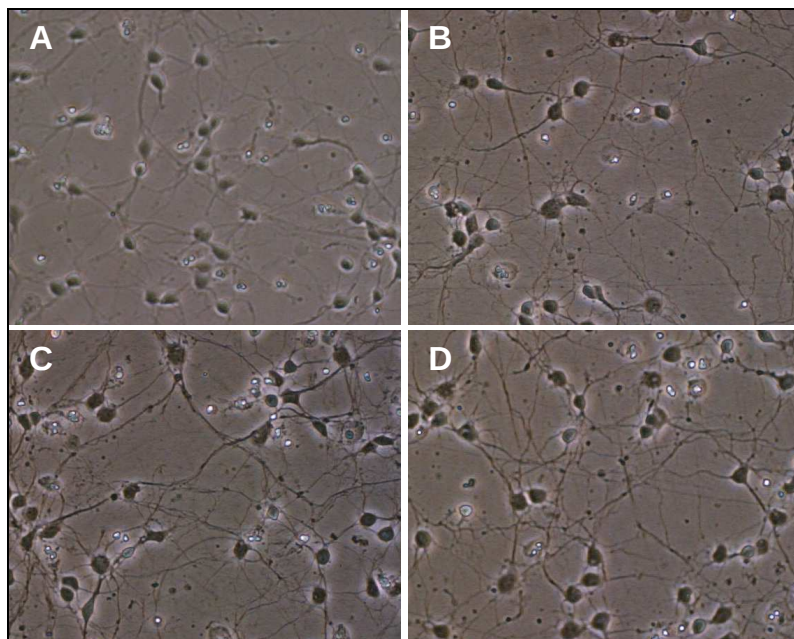


Figure 64. Effet neurotrophique des PL de saumon sur les neurones embryonnaires

A, témoin ; B, PL 50 nM ; C, PL 500 nM ; D, PL 5 μ M

Les neurones corticaux ont été cultivés durant 48 h dans un milieu supplémenté en PL de saumon, avant d'être observés en microscopie en contraste de phase, 6 x 40.

Les champs sont représentatifs de ceux observés dans 2 cultures indépendantes.

Il est tentant d'attribuer l'effet neurotrophique des PL et les changements morphologiques constatés à leur richesse en DHA estérifié. Toutefois, cette hypothèse doit être vérifiée, notamment en comparant les effets des traitements par le DHA et par les PL sur la composition lipidique des membranes neuronales.

3-2. Incorporation membranaire de l'acide docosahexaénoïque

3-2-1. Incorporation dans les membranes neuronales

Nous venons de voir que la supplémentation en DHA produit des effets neurotrophiques sur les neurones corticaux embryonnaires de rat en culture primaire et sur des cellules de la lignée Neuro2A. Les modifications morphologiques constatées alors suggèrent que le DHA ait été incorporé parmi les lipides de la membrane plasmique des cellules traitées. Aussi avons-nous voulu étudier la composition lipidique des membranes neuronales afin d'établir s'il existe une corrélation entre les effets observés et un enrichissement membranaire en DHA.

3-2-1-1. Statut lipidique des membranes neuronales embryonnaires

Le modèle expérimental choisi pour nos études *in vitro* consiste en des neurones en culture primaire, obtenus à partir de cortex cérébraux prélevés sur des fœtus de rat après 17 jours de gestation. À ce stade de la vie embryonnaire, le statut lipidique neuronal se constitue principalement par transfert des lipides de la mère au fœtus par l'intermédiaire du placenta et dépend donc en partie du régime alimentaire de la mère (215, 320). Nous avons donc dans un premier temps analysé la composition en AG des neurones corticaux de rat en culture primaire. Les résultats obtenus par CPG et présentés par

la figure 65 montrent que plus de 60% des AG présents dans les membranes des neurones embryonnaires sont des AG saturés et qu'une faible proportion, environ 10% des AG totaux, correspond aux AGPI, i.e. à l'AA surtout, à l'acide docosatétraénoïque et au DHA.

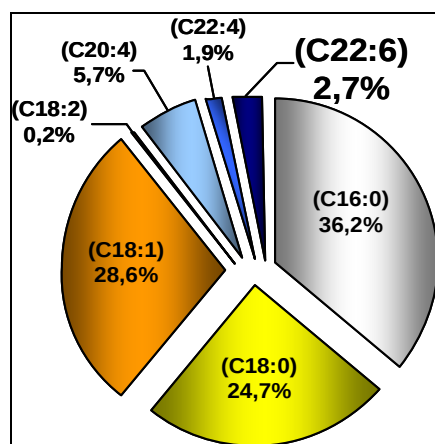


Figure 65. Proportion des AG dans les membranes des neurones embryonnaires de rat
Les neurones corticaux ont été cultivés dans les conditions standard, avant l'analyse des AG par CPG.

Ces résultats ne traduisent pas la richesse habituellement admise des membranes neuronales en AGPI. Pour pouvoir les interpréter, nous avons réalisé les mêmes dosages d'AG à partir d'un homogénat de tissu cortical prélevé chez la mère. Les résultats de la figure 66 mettent en évidence à la fois la prédominance du DHA et la richesse attendue des cellules cérébrales en AGPI-Ic, représentant plus de 40% des AG totaux. Nous avons donc pu exclure l'hypothèse selon laquelle la faible teneur en AGPI-Ic des neurones embryonnaires pouvait résulter d'une carence lipidique maternelle.

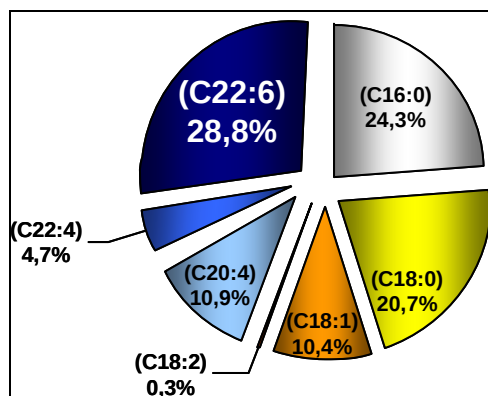


Figure 66. Proportion des AG dans les membranes des cellules corticales de rat adulte
Les tissus corticaux ont été prélevés, homogénéisés en tampon isotonique, avant l'analyse des AG par CPG.

Ainsi, même si les données bibliographiques s'accordent à proposer qu'une partie du pool de DHA s'acquière au cours de la période anténatale, les résultats obtenus sur notre modèle expérimental suggèrent le rôle essentiel de l'apport nutritionnel post-natal dans la constitution et la maturation des membranes neuronales. L'importance de l'allaitement dans l'approvisionnement en DHA par le SNC a par ailleurs été soulignée par différentes études (215, 320). La pauvreté des membranes neuronales embryonnaires en DHA pourrait *a priori* indiquer une limite de notre modèle *in vitro*, dont l'objectif est

précisément d'être représentatif de la situation *in vivo* pour étudier les mécanismes moléculaires expliquant la susceptibilité des neurones au peptide A β soluble et définir des stratégies impliquant notamment des suppléments nutritionnelles dans le cadre de la prévention contre la MA. En réalité, ce modèle s'avère particulièrement pertinent, puisqu'il coïncide avec l'état de carence en AGPI-lc ω 3 constaté dans le SNC des patients atteints de la MA. La survenue de cette carence, pour des raisons qui restent à élucider, chez certains individus âgés pourrait alors définir une plus grande susceptibilité neuronale à la présence de peptide A β soluble lors des phases précliniques de la MA et favoriser le développement et la progression du syndrome démentiel. Ceci légitime donc à la fois le modèle et l'approche expérimentale choisis (359, 789).

3-2-1-2. Une supplémentation en acide docosahexaénoïque induit une modification du statut lipidique des membranes neuronales

3-2-1-2-1. Dosage du DHA parmi les AG totaux

Afin de définir une éventuelle corrélation entre l'effet neurotrophique observé dans la figure 61 avec un enrichissement des membranes neuronales embryonnaires en DHA, les AG ont été dosés dans les lysats préparés à partir des cellules traitées par des concentrations croissantes de DHA.

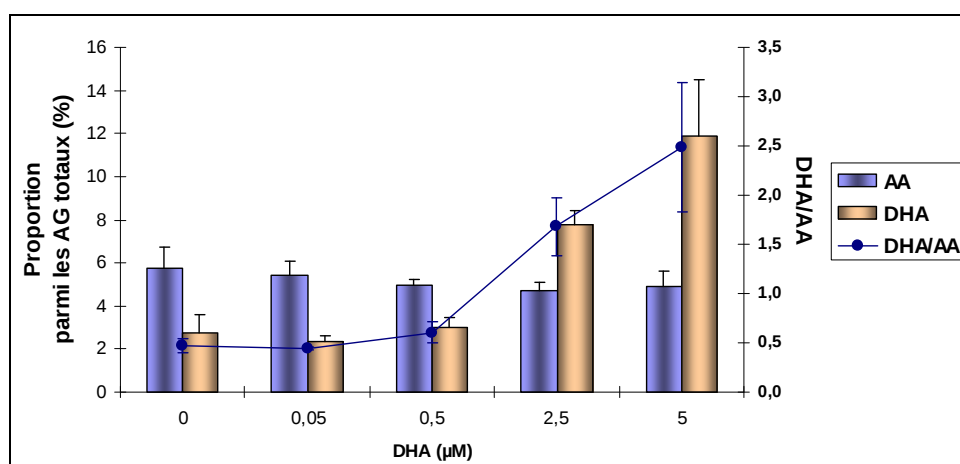


Figure 67. Enrichissement des membranes neuronales après supplémentation en DHA

Les neurones corticaux ont été cultivés 48 h en présence de DHA, avant l'analyse des AG par CPG.

Les données correspondent aux moyennes $\pm$ σ calculées sur 4 cultures indépendantes.

Les résultats montrent clairement une incorporation du DHA dans les membranes neuronales se traduisant par une augmentation significative du rapport DHA/AA pour des concentrations en DHA supérieures à 0,5 μ M (figure 67). Il est intéressant de noter que cet enrichissement ne se produit pas au dépend des teneurs en AA, comme nous pouvions nous y attendre en conséquence d'une compétition entre le DHA et l'AA ou d'autres AGPI-lc pour l'incorporation en position *sn*-2 des phospholipides. Ceci suggère que l'enrichissement membranaire en DHA pourrait n'avoir aucun effet sur le métabolisme de l'AA.

De façon plutôt inattendue, aucun enrichissement membranaire significatif n'a été mesuré en con-

séquence de la supplémentation par 0,5 μM de DHA, concentration ayant pourtant permis d'observer clairement les effets neurotrophiques exercés par l'AGPI sur les neurones embryonnaires comme sur les cellules Neuro2A. Sous réserve d'une sensibilité suffisante de la méthode analytique utilisée pour le dosage de teneurs aussi faibles en AG minoritaires, les membranes neuronales semblent s'enrichir très modestement en DHA et de manière non significative, suggérant que des modifications membranaires discrètes puissent contribuer aux effets neurotrophiques observés. Mais d'autres mécanismes pourraient alors être impliqués en parallèle, comme la génération de neuroprotectines appartenant à la famille des docosatriènes, une nouvelle classe de médiateurs lipidiques au potentiel neuroprotecteur et anti-inflammatoire (354, 662), ou une action au niveau transcriptionnel, comme l'ont démontré d'autres études (420, 610). La comparaison de la composition en AG des neurones corticaux contrôles (figure 65) avec celle des neurones corticaux traités par 5 μM de DHA pendant 48 h révèle que la proportion de DHA est plus que quadruplée (figure 68).

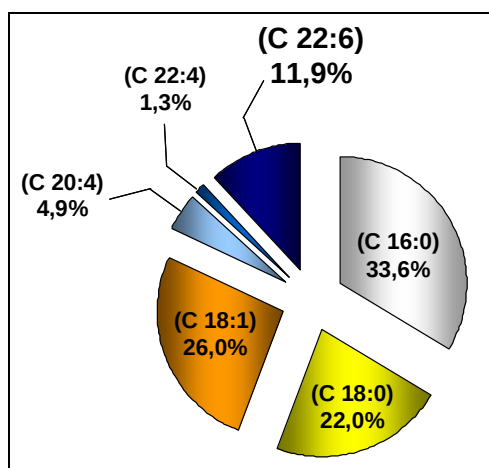


Figure 68. Proportion des AG dans les membranes des neurones embryonnaires de rat
Les neurones corticaux ont été cultivés dans un milieu supplémenté en DHA (5 μM) pendant 48 h, avant l'analyse des AG par CPG.

Cet enrichissement significatif en DHA entraîne par opposition une diminution des proportions des AG saturés et monoinsaturés, passant respectivement de 61 et 29% à 56 et 26%. Ces chiffres suggèrent une modification des propriétés physicochimiques de la membrane plasmique, les AGPI et les AG saturés étant distribués préférentiellement dans des portions membranaires présentant des caractéristiques physicochimiques différentes. En effet, en raison du compactage des chaînes hydrocarbonées les unes sur les autres selon une configuration *trans*, les AG saturés adoptent essentiellement une conformation linéaire compatible avec la formation de microdomaines membranaires, alors que les AGPI adoptent des conformations spatiales encombrantes imposées par les insaturations et les cantonnent ainsi dans les portions fluides de la membrane (699). De telles modifications de la composition membranaire pourraient donc suggérer des remaniements architecturaux complexes.

Nous avons précédemment mentionné que les effets neurotrophiques étudiés après 48 h de traitement par le DHA sont déjà visibles après 24 h. La cinétique d'enrichissement des membranes neuronales en DHA a donc été étudiée en dosant les AG des cellules cultivées durant différents temps dans un milieu supplémenté par 0,5 et 5 μM de DHA, sans renouveler le milieu au cours de l'expérience. Les résultats présentés par la figure 69 confortent l'hypothèse énoncée ci-dessus, puisque l'enrichissement induit par une exposition à 0,5 μM de DHA reste modeste, même si le rapport DHA/AA tend à augmenter entre 24 et 48 h, témoignant de modifications discrètes de la composition membranaire. En revanche, la supplémentation du milieu par 5 μM de DHA conduit à un enrichissement très significatif, près de 5 fois, avec un maximum après 48 h de traitement, au terme duquel les processus biochimiques d'incorporation du DHA dans les lipides membranaires doivent vraisemblablement être totalement accomplis. C'est cette durée de 48 h que nous avons considérée comme optimale pour les traitements à suivre.

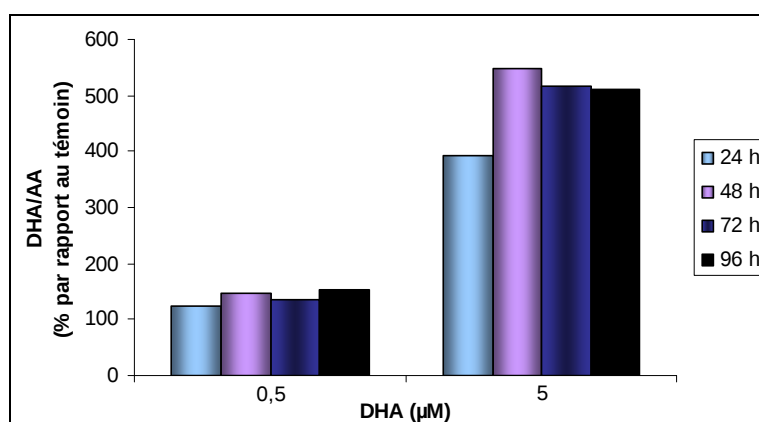


Figure 69. Cinétique d'enrichissement membranaire en DHA dans les neurones traités par le DHA
Les neurones corticaux ont été prétraités par le DHA durant différents temps, avant l'analyse par CPG.

3-2-1-2-2. Dosage du DHA dans les phospholipides

L'exposition de cultures de neurones corticaux embryonnaires au DHA induit donc une modification de la composition membranaire en AG. Ceci suggère que le DHA soit incorporé dans les phospholipides, peut-être plus spécifiquement dans certaines classes, ce que nous nous sommes proposé d'étudier. Pour ce faire, les phospholipides ont été séparés par CCM avant que leurs AG ne soient dosés par CPG.

Les résultats illustrés par la figure 70 indiquent un enrichissement significatif en DHA de la PE ($p < 0,001$) et de la PS ($p < 0,01$) se traduisant par une élévation respective du rapport DHA/AA de 3 et 4. Inférieur à 1 dans la PC, ce rapport augmente non significativement et s'inverse après supplémentation du milieu par 5 μM de DHA, suggérant peut-être des effets non négligeables, bien que la PC ne renferme qu'une proportion très faible du DHA (environ 5 fois moins que la PE). Décrite comme une espèce riche en AG saturés et principalement localisée dans les microdomaines membranaires (597), la PC ne présente qu'un très faible pourcentage en AGPI et ne constitue visiblement pas une molécule hôte pour incorporer du DHA supplémentaire.

Les résultats que nous avons obtenus sont cohérents avec ceux décrits dans la littérature. En effet,

dans de nombreuses cellules, la PE est le principal phospholipides « récepteur » du DHA, alors que dans certaines membranes et en particulier les membranes synaptiques, le DHA peut être incorporé dans la PS (699). Comme nous, Cao *et al.* (16) ont mis en évidence une augmentation du taux de DHA dans les PE et les PS des neurones corticaux de rat traités par le DHA. Ils ont en outre mis en évidence une augmentation de la proportion des PS et des PE au détriment de la PC, suggérant que le traitement par le DHA puisse avoir un impact sur la synthèse et/ou l'incorporation des différentes classes de phospholipides dans la membrane plasmique.

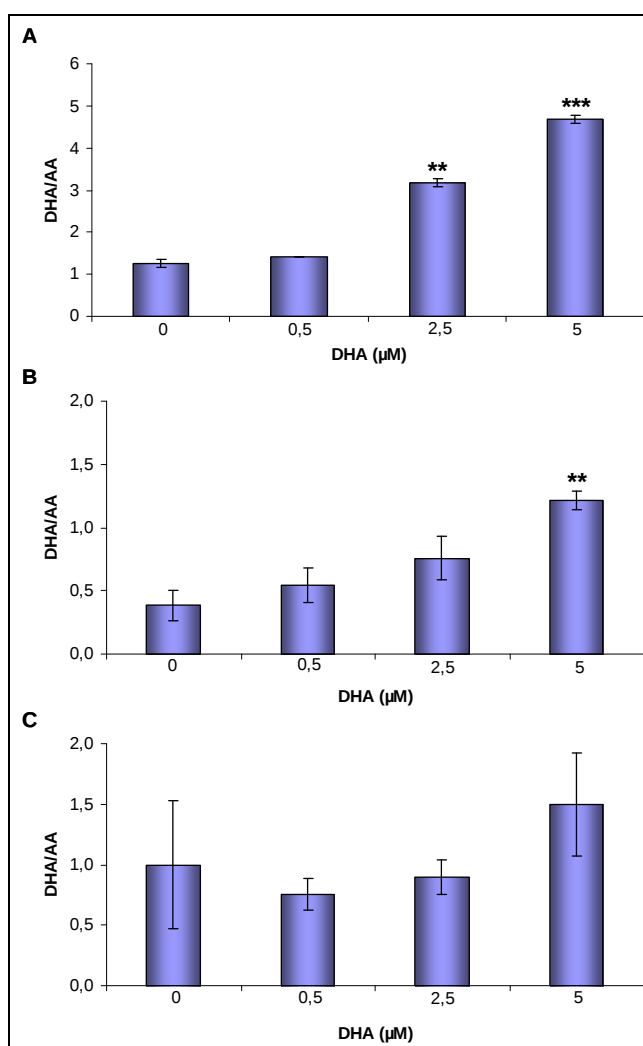


Figure 70. Enrichissement en DHA des différentes classes de phospholipides

A, PE (N=2 ; n=1) ; B, PS (N=3 ; n=1) ; C, PC (N=2 ; n=1)

*Les neurones corticaux ont été exposés à des doses croissantes de DHA pendant 48 h.
Les AG ont été analysés par CPG sur les phospholipides membranaires après séparation par CCM.
Le rapport DHA/AA après traitement a été comparé à celui des témoins.
(*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$)*

Les résultats de la figure 70 indiquent par ailleurs qu'aucune variation notable de la teneur en DHA ne semble pouvoir être observée dans les phospholipides des neurones cultivés en présence de 0,5 μM de DHA, confirmant ainsi les résultats obtenus par dosages des AG totaux (figure 67). Ceci est probablement lié à la reproductibilité insuffisante des dosages sans doute due aux faibles concentrations de DHA, proches de la limite de détection de la méthode employée et au faible

nombre d'échantillons testés en raison de la nécessité de disposer de neurones en quantités élevées. Ces résultats devront donc être affinés, notamment en utilisant des moyens analytiques plus performants et plus sensibles comme la spectrométrie de masse.

3-2-1-3. La supplémentation en acide eicosapentaénoïque ou en phospholipides de saumon mène à un enrichissement plus faible

Comme nous l'avons vu, la littérature évoque largement l'importance des AGPI-lc de type $\omega 3$ pour la maturation du SNC, suggérant des effets neurotrophiques basés sur des mécanismes communs. Nous avons donc voulu étudier si les traitements par d'autres formes d'AGPI conduisaient eux aussi à un enrichissement membranaire en DHA.

Nous avons donc traité les neurones en culture par de l'EPA ou par un mélange équimolaire [DHA+EPA], puis comparé leur composition en AG à celle des neurones traités par la même concentration de DHA. Cette démarche permet, en particulier, d'évaluer l'efficacité de la conversion de l'EPA comme précurseur du DHA. Les résultats obtenus montrent clairement que les neurones traités par l'EPA ou par le mélange [DHA+EPA] présentent un enrichissement en DHA plus faible que ceux traités par le DHA (figure 71).

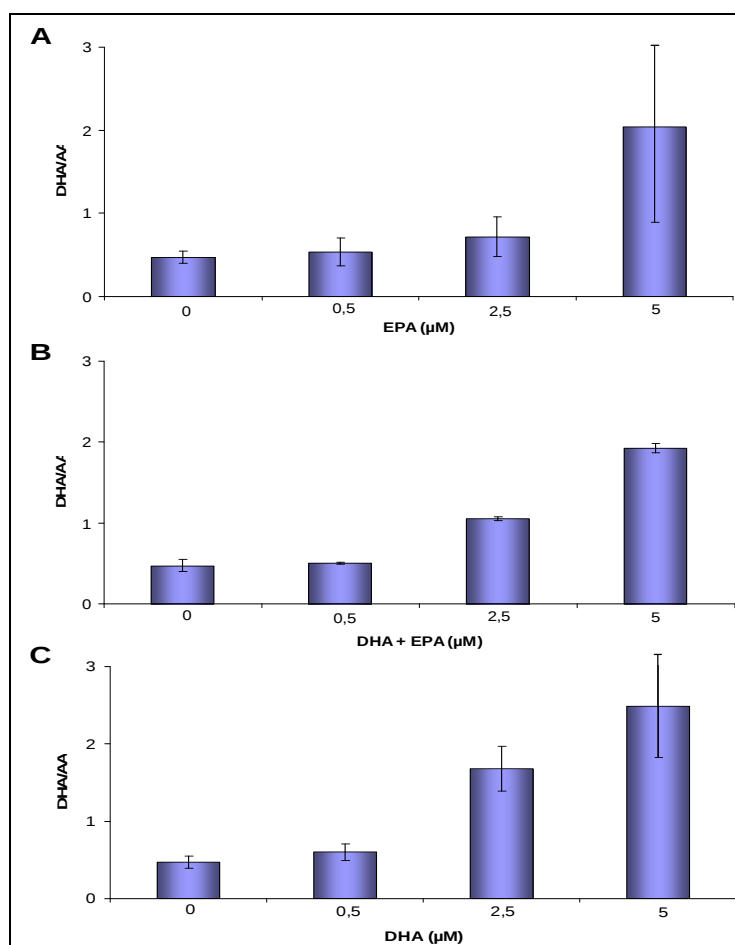


Figure 71. Enrichissement membranaire en DHA après supplémentation en EPA

Les neurones corticaux ont été exposés à des doses croissantes d'EPA (A), d'un mélange [DHA+EPA] (B) ou de DHA (C) pendant 48 h, avant l'analyse des AG par CPG (N=4 ; n=1).

Mais ces résultats indiquent aussi que les neurones corticaux embryonnaires disposent déjà de mécanismes fonctionnels, notamment ceux impliquant l'élongase et la $\Delta 6$ - ou $\Delta 4$ -désaturase, assurant la conversion de l'EPA en DHA. Cette information est en accord avec les données de la littérature qui rapportent la présence de systèmes enzymatiques fonctionnels capables de synthétiser le DHA lors de la période anténatale, en parallèle à l'apport de DHA par la mère (119, 647). Néanmoins, nos résultats suggèrent que la conversion de l'EPA en DHA et/ou son incorporation dans les phospholipides membranaires nécessite peut-être plus de temps, les systèmes enzymatiques nécessaires pouvant ne pas fonctionner de manière optimale à ce stade de la vie embryonnaire. C'est pourquoi nous avons ensuite étudié la cinétique d'enrichissement en DHA des neurones cultivés en présence d'EPA. Les résultats présentés par la figure 72 confortent l'hypothèse selon laquelle l'EPA ne serait pas totalement converti en DHA. En effet, à concentration égale, une supplémentation en EPA mène à un enrichissement en DHA approximativement 2 fois moindre qu'une supplémentation par le DHA, tandis que celle par le mélange équimolaire DHA+EPA conduit à des résultats intermédiaires. Une nouvelle fois, 48 h semblent être le délai nécessaire pour une supplémentation maximale.

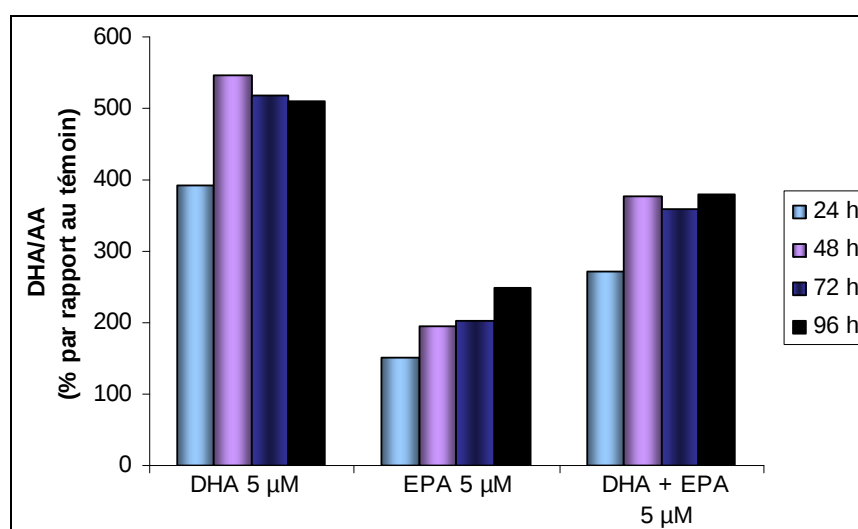


Figure 72. Cinétique d'enrichissement membranaire en DHA dans les neurones traités par différents AGPI

Les neurones corticaux ont été exposés à des doses croissantes d'AGPI, avant l'analyse des AG par CPG (N=4; n=1).

Parallèlement aux enrichissements réalisés à l'aide d'une supplémentation du milieu de culture par les AGPI- $\omega 3$ libres, les neurones corticaux en culture primaire ont été traités par la préparation de PL de saumon optimisée par le LSGA. Les résultats obtenus montrent un faible enrichissement des neurones en DHA (figure 73), pouvant s'expliquer par une teneur inférieure en DHA, la préparation de PL ne contenant que 30% de DHA estérifié. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'incorporation du DHA libre (diffusion passive à travers la bicouche phospholipidique, transporteur membranaire saturable) et dans celle des PL étant encore très mal connus, il est difficile de définir lesquels des AG libres ou estérifiés sont incorporés avec la meilleure efficacité dans les membranes neuronales (396).

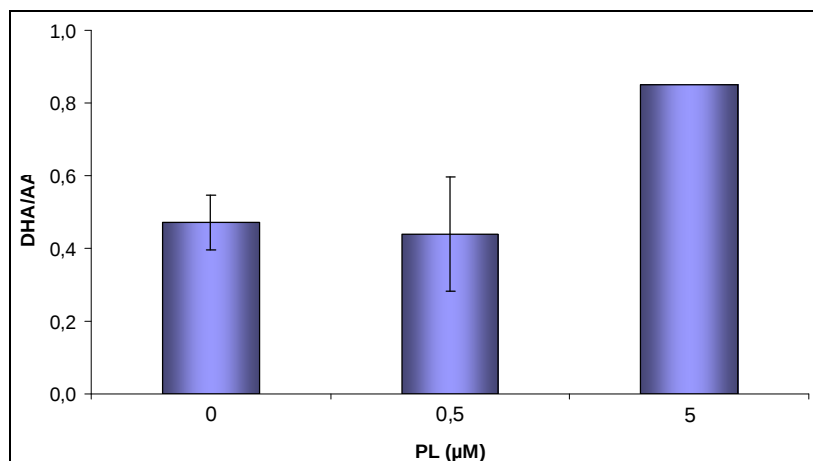


Figure 73. Enrichissement membranaire en DHA après supplémentation en PL de saumon
 Les neurones corticaux ont été traités par différentes doses de PL de saumon durant 48 h, avant l'analyse des AG par CPG (N=3 ; n=1).

L'ensemble des résultats obtenus indique que le DHA présente des propriétés neuro-trophiques sur les neurones corticaux en culture primaire et sur les cellules de la lignée Neuro2A. Les effets neurotrophiques observés semblent optimaux en réponse à une supplémentation du milieu par une concentration de DHA libre de 0,5 μM et un traitement d'une durée de 48 h. Ces effets ne sont donc pas corrélés à un enrichissement significatif des membranes en DHA. En revanche, une étude plus approfondie a permis de déterminer que l'enrichissement résultant d'une exposition à de fortes doses de DHA cible la PE et la PS. Ces résultats suggèrent donc que le potentiel neurotrophique du DHA observé à la concentration de traitement de 0,5 μM puisse impliquer des modifications discrètes, sans doute localisées dans certaines régions particulières de la membrane neuronale telles que les synapses et/ou dans certains microdomaines membranaires. De façon inattendue, un enrichissement des rafts en AGPI a en effet été mis en évidence *in vitro* après supplémentation en DHA et en EPA de cellules T appartenant à la lignée Jurkat E6-1 (485, 486). Dans la suite de l'étude, nous tenterons de déterminer les conséquences du traitement des neurones par 0,5 μM de DHA sur des régions ou des domaines particuliers des membranes plasmiques.

3-2-2. Incorporation dans les membranes synaptiques

Plusieurs études ont montré que les AGPI- $\omega 3$ s'incorporent de façon préférentielle au sein des membranes synaptiques (709, 710). Nous avons donc entrepris de vérifier cette spécificité en étudiant les conséquences d'une supplémentation en DHA sur le statut lipidique des membranes synaptiques. Pour cela, nous avons mis en place un protocole permettant de purifier des synaptosomes, structures vésiculaires utilisées comme modèle *ex vivo* des membranes synaptiques.

3-2-2-1. Validation du modèle expérimental des synaptosomes

Les synaptosomes sont des vésicules de taille comprise entre 0,5 et 2-3 μm , obtenues par homogénéisation d'un tissu cérébral (cortex, hippocampe ou cervelet à titre d'exemple) dans un milieu isotonique. Ils contiennent la majorité de l'équipement enzymatique du neurone, ainsi que des mitochondries, lysosomes et vésicules synaptiques, mais sont dépourvus de noyaux, excluant de fait tout effet transcriptionnel (318). Au cours de l'homogénéisation, les membranes des vésicules synaptosomales peuvent se former exclusivement à partir des membranes neuronales ou provenir complètement ou en partie des cellules gliales environnantes, astrocytaires ou oligodendrocytaires (figure 74).

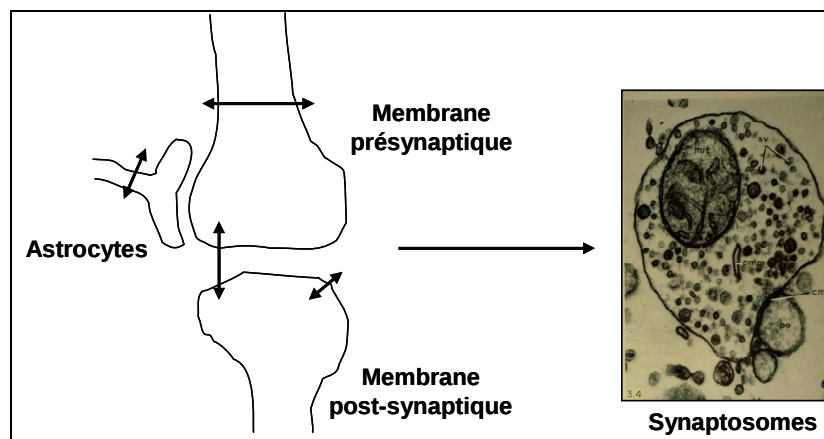


Figure 74. Représentation schématique de la formation des synaptosomes
d'après Gyllys *et al.* (318)

3-2-2-1-1. Préparation et purification des synaptosomes

Le protocole de purification des synaptosomes a été développé et optimisé à partir de celui décrit par Fleck *et al.* (248). Il conduit à la préparation rapide d'une grande quantité de matériel à partir de tissus adultes et repose sur un fractionnement subcellulaire permettant de se débarrasser des mitochondries, les principaux contaminants des préparations synaptosomales (318).

3-2-2-1-2. Validation de la qualité des synaptosomes

Afin d'être validé comme modèle d'étude, chaque lot de synaptosomes préparé selon le protocole présenté par la figure 75 subit un contrôle de qualité basé sur l'étude des caractéristiques morphologiques, de l'intégrité membranaire, de l'activité mitochondriale et du degré de pureté des synaptosomes. Tous ces tests sont réalisés par cytométrie en flux, dans le service de biochimie de l'hôpital central du CHRU de Nancy.

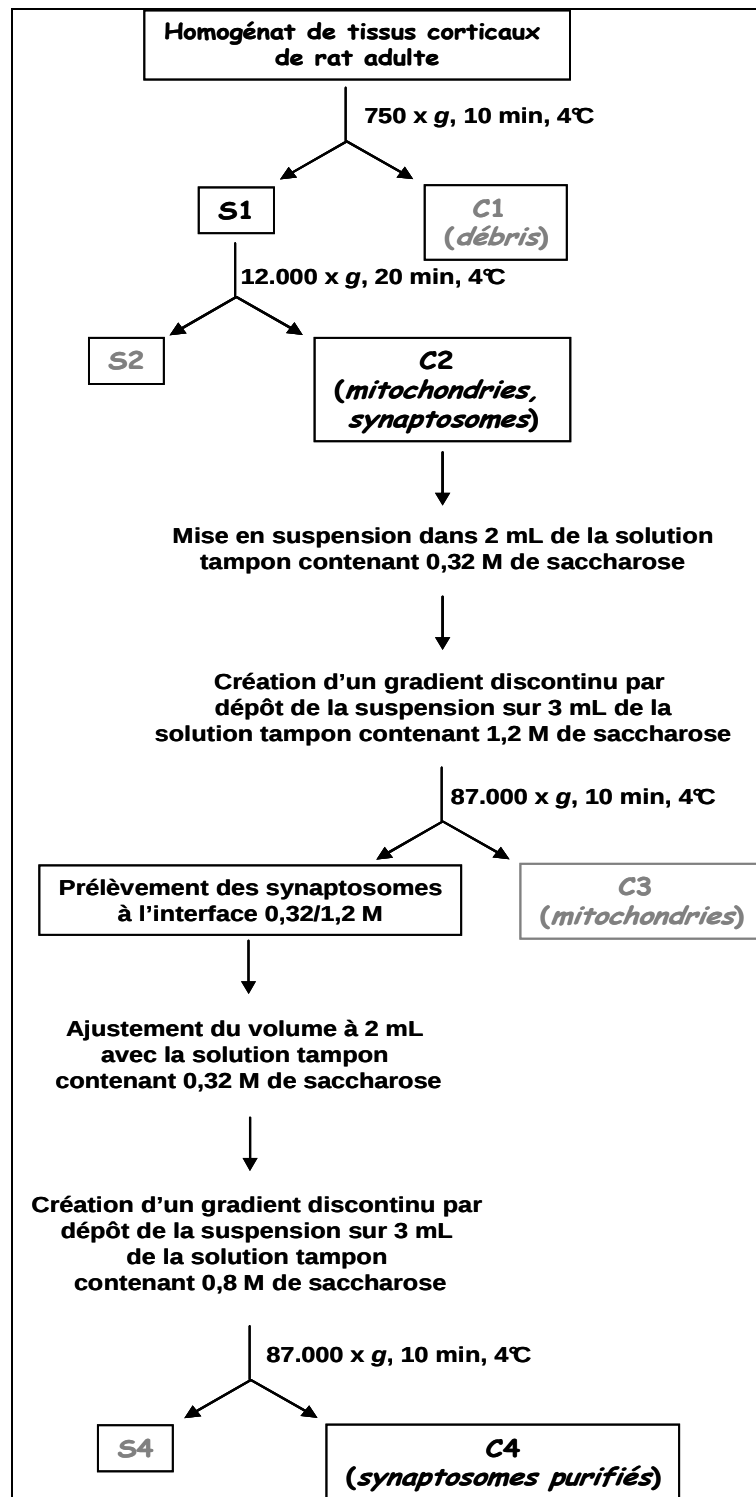


Figure 75. Protocole mis au point pour l'extraction et la purification des synaptosomes

3-2-2-1-2-1. Intégrité membranaire et activité métabolique des vésicules obtenues

Après avoir réalisé une étude morphologique par cytométrie en flux confirmant l'obtention de vésicules de tailles comprises entre 0,5 et 3 μm , l'intégrité des vésicules obtenues a été évaluée par marquage à la calcéïne (figure 76).

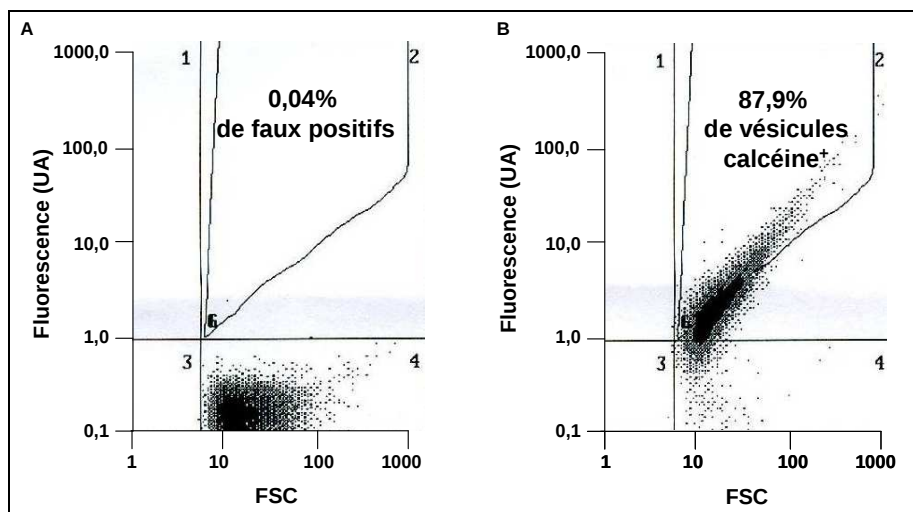


Figure 76. Évaluation de l'intégrité membranaire des vésicules purifiées
A, mesure de l'autofluorescence ; B, mesure de la fluorescence de la calcéine
Des résultats comparables ont été obtenus sur 4 préparations de synaptosomes indépendantes.

Les résultats indiquent que plus de 85% des vésicules synaptosomales purifiées retiennent la calcéine. Elles disposent donc pour la plupart de membranes intègres et renferment une activité estérasique qui suggère la présence de voies métaboliques fonctionnelles. Pour conforter cette conclusion, nous avons évalué l'activité mitochondriale à l'aide d'une sonde métabolique fluorescente spécifique Mitotracker®. Les résultats présentés par les cytogrammes de la figure 77 mettent en évidence 2 populations de synaptosomes, l'une majoritaire (80,1%) présentant une activité mitochondriale élevée, et l'autre dont l'activité mitochondriale se traduit par une fluorescence d'intensité plus faible bien que supérieure à celle du bruit de fond. L'existence de ces 2 populations s'explique par l'hétérogénéité des vésicules, certaines renfermant sans doute des mitochondries en moindre nombre et donc une activité métabolique plus faible.

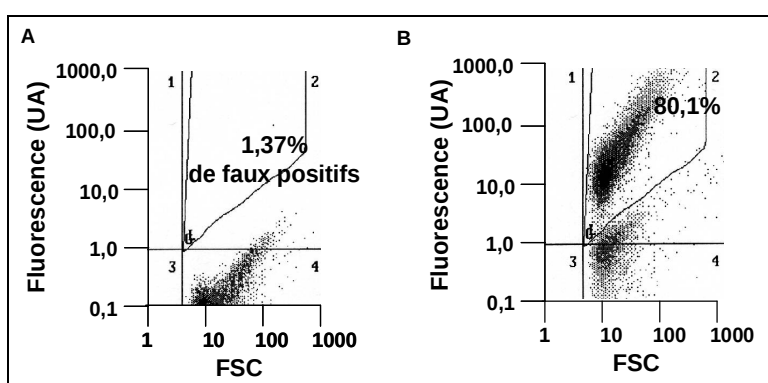


Figure 77. Évaluation de l'activité mitochondriale des vésicules purifiées
A, mesure de l'autofluorescence ; B, mesure de la fluorescence de la sonde Mitotracker
Des résultats comparables ont été obtenus sur 3 préparations de synaptosomes indépendantes.

3-2-2-1-2-2. Origine des synaptosomes obtenus

Avant de définir si les vésicules métaboliquement actives peuvent être utilisées comme modèles des synapses neuronales, nous avons étudié leur origine en recherchant la présence de 2 protéines

marqueurs, la protéine neuronale SNAP-25, appartenant au complexe SNARE impliqué dans la libération des neurotransmetteur dans la fente synaptique, et la protéine GFAP, associée au cytosquelette des cellules gliales (figure 78).

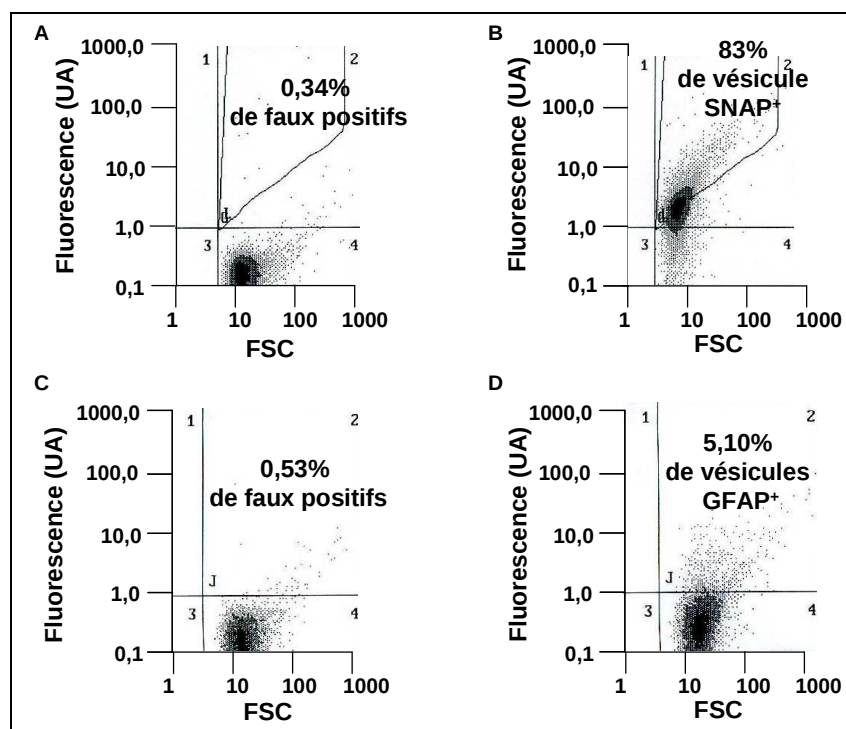


Figure 78. Étude de l'origine des synaptosomes purifiés

A et C: mesure de l'autofluorescence ; B, immunofluorescence due à la protéine SNAP-25 et D, due à la protéine GFAP.

Des résultats comparables ont été obtenus sur 3 préparations de synaptosomes indépendantes.

Le protocole développé permet donc de purifier de façon reproductible des vésicules pouvant être considérées à plus de 80% comme étant d'origine neuronale. Ce degré de pureté équivaut à celui obtenu habituellement dans la littérature (318) et permet donc d'utiliser les synaptosomes ainsi préparés pour l'étude des mécanismes d'enrichissement des membranes en DHA.

3-2-2-2. Enrichissement des synaptosomes en acide docosahexaénoïque

Les synaptosomes purifiés ont été exposés à des doses croissantes de DHA ou de PL de saumon et l'enrichissement en DHA a été évalué comme précédemment après analyse des AG par CPG.

Les résultats préliminaires présentés par la figure 79 décrivent que le rapport DHA/AA tend à augmenter légèrement, suggérant un enrichissement très faible en DHA des synaptosomes traités par le DHA ou les PL de saumon. Cet enrichissement serait maximal dès 0,5 μ M de DHA. Le faible enrichissement obtenu est cohérent avec les données bibliographiques et les résultats présentés par la figure 66, indiquant que les membranes synaptiques adultes comptent parmi les plus riches en DHA et seraient donc difficiles à enrichir par supplémentation (699). Pour le confirmer, il nous faudra donc comparer l'enrichissement induit par le DHA sous forme libre et estérifiée dans les membranes synaptiques adultes

et embryonnaires. Les résultats de ces expérimentations nous permettront de vérifier si les synaptosomes sont des structures compétentes pour incorporer le DHA et en exprimer les effets ou s'ils manquent de certains mécanismes plus complexes, par exemple une régulation impliquant des transports rétro- ou antérogrades. Des moyens analytiques plus performants seront toutefois nécessaires pour palier aux difficultés imposées par les faibles quantités de DHA présentes dans les membranes embryonnaires.

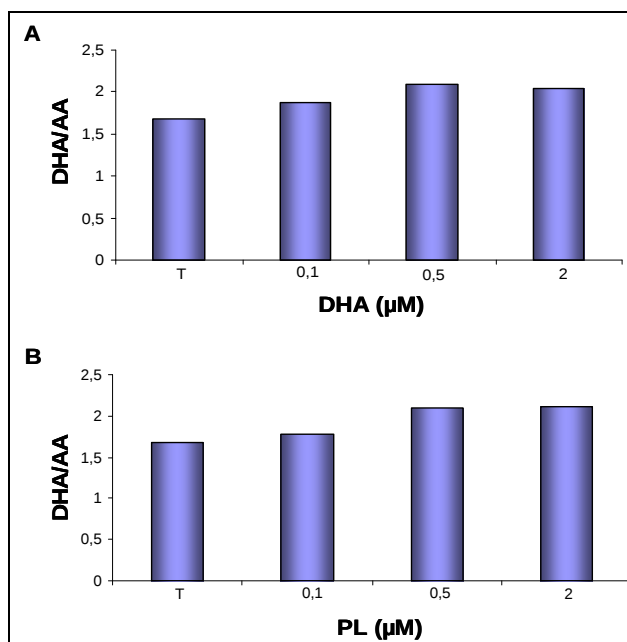


Figure 79. Enrichissement en DHA des synaptosomes

Les synaptosomes ont été incubés 48h en présence de DHA libre (A) ou des PL de saumon (B). Les phospholipides des synaptosomes ont été extraits par CCM et les AG ont été dosés par CPG.

Le protocole de préparation de synaptosomes à partir de tissus corticaux adultes que nous avons développé est une méthode performante permettant de purifier rapidement de grandes quantités de vésicules actives d'origine essentiellement neuronale. Les résultats préliminaires d'enrichissement des membranes synaptiques ont conduit, comme nous nous y attendions, à une faible augmentation du rapport DHA/AA. L'adaptation de ce protocole à la préparation de synaptosomes d'origine embryonnaire devrait offrir la perspective de vérifier si les membranes synaptiques embryonnaires peuvent être enrichies en DHA.

3-3. Effet neuroprotecteur des acides gras polyinsaturés de type $\omega 3$ contre l'apoptose induite par le peptide amyloïde- β soluble

3-3-1. L'acide docosahexaénoïque protège les neurones de l'apoptose induite par le peptide amyloïde- β soluble *in vitro*

Nous avons déjà indiqué qu'un enrichissement en DHA pourrait modifier les caractéristiques physicochimiques et architecturales membranaires (699). L'interaction du peptide A β avec la membrane, première étape de la cascade neurotoxique, pourrait donc être modulée par un tel

enrichissement. Nous avons donc cherché à évaluer le potentiel neuroprotecteur du DHA contre la neurotoxicité du peptide A β soluble *in vitro*, première approche mécanistique de l'intérêt nutritionnel du DHA et des AGPI-lc de type ω 3 suggéré par différentes études épidémiologiques et expérimentales dans la prévention contre la MA.

Des expériences de neuroprotection ont donc été menées, consistant à exposer des neurones en culture au peptide A β soluble après traitement par des doses croissantes de DHA. Les résultats obtenus pour le test au MTT mesurant l'activité mitochondriale (publication #2, figure 1A) indiquent un effet neuroprotecteur très marqué du DHA vis-à-vis du peptide A β_{40} soluble. Cet effet est hautement significatif ($p < 0,001$) dès le prétraitement par 5 nM de DHA, alors que la neuroprotection maximale est conférée par la concentration de 0,5 μ M pour laquelle nous avons observé l'effet neurotrophique le plus marqué. À ce stade, nos résultats ne permettent pas d'écarter l'éventualité d'un enrichissement en DHA sélectif de certaines classes de lipides membranaires particulièrement déterminantes pour l'interaction du peptide A β soluble avec la membrane neuronale ou pour les mécanismes neurotoxiques initiés en conséquence. Mais il paraît évident, en juxtaposant les résultats de la figure 1A (publication #2) à ceux de la figure 69, que le potentiel neuroprotecteur du DHA vis-à-vis du peptide A β soluble ne repose pas sur un enrichissement membranaire important en cet AGPI. Ceci est confirmé par le comptage des corps apoptotiques après marquage par le DAPI, démontrant que les neurones prétraités par 0,5 μ M de DHA sont protégés de la toxicité à 24 h du peptide A β_{40} à 1 et 5 μ M (publication #2, figure 3). Comparativement aux résultats rapportés dans la littérature, nous avons remarqué que la concentration neuroprotectrice de DHA, bien en dessous du micromolaire, est très nettement inférieure à celles protégeant *in vitro* les neurones hippocampiques du glutamate (15 μ M ; 762), les cellules épithéliales rétinienne humaines de la lignée ARPE-19 du stress oxydant (6,7 μ M ; 552) ou les cellules Neuro2A de la staurosporine (25 μ M ; 5). De nombreuses hypothèses peuvent être avancées pour justifier l'efficacité élevée de la neuroprotection par le DHA dans notre modèle cellulaire comparativement à la littérature, parmi lesquelles l'influence du statut lipidique de la membrane neuronale sur son interaction avec le peptide A β soluble et/ou sur les cascades de signalisation en résultant. Il est peu surprenant alors que nous ayons observé un effet neuroprotecteur comparable du DHA vis-à-vis de la neurotoxicité du peptide A β_{42} soluble (publication #2, figure 2), suggérant ainsi que A β_{40} et A β_{42} puissent activer des mécanismes moléculaires communs de neurotoxicité, comme l'ont proposé diverses études (440, 513, 599) ainsi que la partie I du chapitre Résultats et Discussion.

La neuroprotection vis-à-vis du peptide A β soluble a aussi été étudiée sur les cellules Neuro2A différenciées ou non en neurones (publication #2, figure 8) et sur les oligodendrocytes de rat en culture primaire (figure 80). Chaque type cellulaire présente, après exposition au peptide A β_{40} soluble, une viabilité diminuée, comparable à celle mesurée sur les neurones corticaux de rat en culture primaire. Pourtant, seule la viabilité des cellules Neuro2A est maintenue par le DHA, de façon analogue à celle des neurones, avec une protection maximale après prétraitement par 0,5 μ M de DHA. Aucune protection mesurable par le test de viabilité cellulaire au MTT n'est en effet constatée sur les

oligodendrocytes de rat exposés au peptide $A\beta_{40}$ soluble. Ces résultats suggèrent que le DHA puisse activer des mécanismes protecteurs spécifiques à certains types cellulaires, même si les cellules de type neuronal ne sont pas les seules à être sensibles au DHA (699).

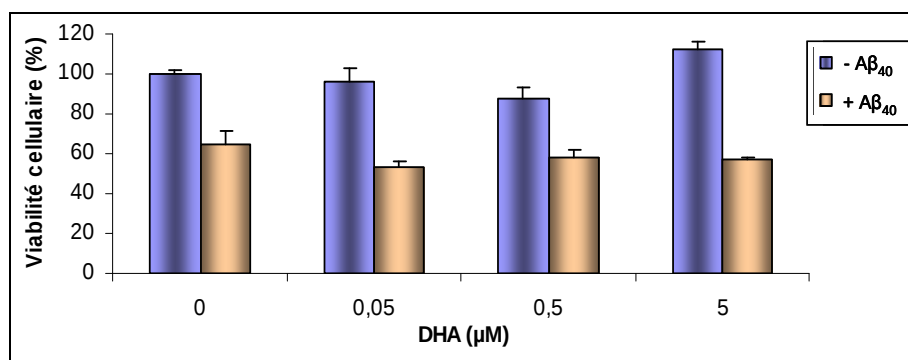


Figure 80. Absence de protection par le DHA des oligodendrocytes exposés au peptide $A\beta$ soluble

Les oligodendrocytes ont été préincubés pendant 48 h dans un milieu supplémenté par le DHA, avant d'être exposés 24 h à 1 μ M d' $A\beta_{40}$. La viabilité cellulaire a été évaluée par le test au MTT. Les données correspondent aux moyennes normalisées sur le témoin ($m \pm \sigma$; N=2, n=3).

3-3-2. Le potentiel neuroprotecteur de l'acide eicosapentaénoïque vis-à-vis du peptide amyloïde- β est moindre que celui de l'acide docosahexaénoïque

Nous avons préalablement mis en évidence que la supplémentation en EPA, un AGPI-lc de type $\omega 3$ présents dans les huiles de poissons, induit un enrichissement en DHA dans les membranes neuronales. Nous avons donc voulu vérifier si l'EPA peut lui aussi protéger les neurones de la toxicité du peptide $A\beta$ soluble. Cette propriété a effectivement été constatée, comme l'illustrent les résultats présentés par la figure 1B de la publication #2. Le potentiel neuroprotecteur de l'EPA est significatif dès 5 nM ($p < 0,01$), maximal à 0,5 μ M et, comme pour le DHA, moindre à 5 μ M. Le prétraitement par 0,5 μ M d'EPA permet de préserver la survie de 44% des neurones exposés au peptide $A\beta_{40}$, ce qui reflète une efficacité moindre que celle du DHA qui préserve la survie de 63% d'entre eux. Il est peu probable que l'effet neuroprotecteur observé soit uniquement dû à la conversion, incomplète, de l'EPA en DHA. Par contre, il faut envisager un effet neuroprotecteur propre de l'EPA, dont les caractéristiques proches de celles du DHA suggèrent qu'il puisse entraîner les mêmes effets – modification des caractéristiques physicochimiques et architecturales de la membrane plasmique, génération de médiateurs lipidiques tels que les résolvines (662) ou effet transcriptionnel. Une autre hypothèse pourrait être la diminution de la production des eicosanoïdes à partir de l'AA par inhibition compétitive (164). La suite de notre étude a été consacrée au seul DHA, dont le potentiel neuroprotecteur *in vitro* vis-à-vis du peptide $A\beta_{40}$ soluble est supérieur à celui de l'EPA.

3-3-3. L'acide docosahexaénoïque protège les neurones après incorporation dans les membranes

Les premières expériences de protection ont été conduites en exposant les neurones au peptide $A\beta_{40}$

soluble après 48 h de prétraitement par le DHA, délai permettant l'enrichissement membranaire maximal en DHA. Nous avons voulu vérifier si ce délai peut être réduit sans altérer le potentiel neuroprotecteur de l'AGPI. Les résultats présentés par la figure 81 indiquent clairement l'absence de protection vis-à-vis du peptide A β_{42} (ou A β_{40}) soluble lorsque les neurones sont exposées à ce dernier simultanément ou après 2 h seulement de prétraitement par le DHA.

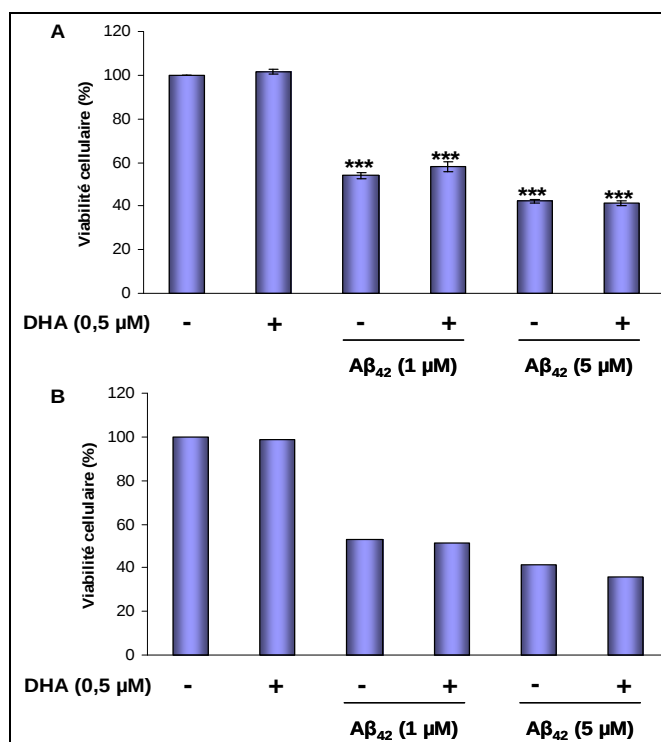


Figure 81. Prétraitement par le DHA et neuroprotection vis-à-vis du peptide A β soluble
A, DHA 2 h, puis A β_{42} (N=2 ; n=4); **B**, DHA et A β_{42} simultanément (N=1 ; n=4)

Les neurones ont été exposés au peptide A β durant 24 h, avant de mesurer la viabilité cellulaire par le test au MTT.

Ces résultats démontrent que le DHA n'interagit pas directement avec les oligomères d'A β , suggérant plutôt que le DHA doive être préalablement incorporé dans les lipides des membranes neuronales pour exprimer son potentiel neuroprotecteur. Il nous faut rappeler là qu'aucun enrichissement en DHA significatif n'a pourtant pu être mesuré dans les différents phospholipides membranaires (PC, PE et PS) des neurones cultivés dans un milieu supplémenté par 0,5 μ M de l'AGPI. Ceci renforce l'hypothèse, sans toutefois la prouver, selon laquelle dans ces conditions, l'incorporation du DHA, non mesurable car négligeable par rapport à la totalité des AG et des phospholipides, puisse néanmoins être significative dans certains domaines précis de la membrane neuronale. Il doit toutefois exister un lien entre la capacité d'une cellule à incorporer du DHA et le pouvoir protecteur de l'AGPI vis-à-vis de la toxicité du peptide A β soluble. Nous avons en effet constaté qu'après traitement par le DHA à 5 μ M, les cellules Neuro2A présentent un rapport DHA/AA accru de façon comparable aux neurones, comme le montre la figure 82, sans variation notable de la proportion d'AA. En revanche, cette augmentation est beaucoup plus faible dans les oligodendrocytes

pour lesquels le traitement par le DHA ne protège pas du peptide A β oligomérique. Ceci renforce l'idée que les propriétés structurales et fonctionnelles de la membrane cellulaire exercent une influence déterminante sur la toxicité de ce dernier.

Il est donc raisonnable de penser à ce stade que l'incorporation du DHA, fût-elle discrète et localisée au niveau de microdomaines membranaires particuliers, puisse modifier la membrane plasmique des neurones au point de défavoriser l'interaction avec le peptide A β soluble. La suite de ce travail infirmera cette hypothèse...

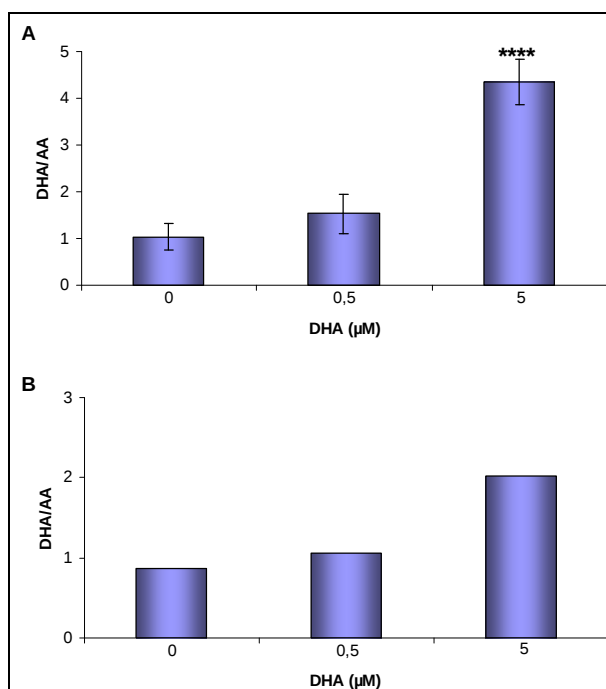


Figure 82. Enrichissement membranaire en DHA dans différents types cellulaires

A, cellules Neuro2A (N=4 ; n=1) ; B, oligodendrocytes (N=1 ; n=2)

Les cellules ont été exposées à des doses croissantes de DHA durant 48 h, avant l'analyse des AG par CPG.

*(****, $p < 0,0001$)*

L'effet neuroprotecteur du DHA vis-à-vis du peptide A β soluble semble donc reposer sur l'incorporation préalable du DHA dans la membrane plasmique. Cet enrichissement semble être plus spécifique de certaines classes de phospholipides. Il pourrait également concerner davantage les membranes synaptiques, au niveau desquelles les oligomères d'A β semblent s'accumuler (363) et initier la perte synaptique et la dégénérescence neuronale associées aux phases précoces de la MA. Le ciblage du DHA vers des microdomaines particuliers pourrait alors protéger les synapses du peptide A β soluble et prévenir ainsi la mort neuronale. Il nous faut à présent définir de façon plus précise les mécanismes moléculaires sur lesquels repose le potentiel neuroprotecteur du DHA et évaluer l'impact préventif de l'AGPI sur les voies pro-apoptotiques et les acteurs moléculaires impliqués dans la toxicité du peptide A β soluble.

3-4. Mécanismes moléculaires impliqués dans la neuroprotection par l'acide docosahexaénoïque

3-4-1. L'acide docosahexaénoïque n'empêche pas l'activation de la phospholipase A₂ cytosolique

Les résultats publiés par Kriem *et al.* (440) et Malaplate-Armand *et al.* (513), ainsi que ceux décrits dans la partie I du chapitre Résultats et Discussion, ont montré que la cascade pro-apoptotique induite par les peptides A β solubles nécessite, entre autres, une activation de la cPLA₂ et une libération d'AA en conséquence. Nous avons donc tout d'abord étudié si le DHA peut empêcher que cette voie pro-apoptotique et pro-inflammatoire ne soit initiée par les oligomères d'A β . Pour cela, nous avons prétraité les neurones durant 48 h par 0,5 μ M de DHA, puis 2 h par le MAFP, l'inhibiteur de la cPLA₂, avant de les exposer au peptide A β ₄₀ soluble. Le niveau de protection résultant a permis de préserver la survie de 100% des neurones ainsi traités (publication #2, figure 4B), témoignant d'un effet additif des mécanismes d'action du DHA et du MAFP, respectivement capables de protéger 51 et 76% des neurones ($p < 0,001$ et $p < 0,01$ en comparaison à DHA+MAFP) lorsqu'ils sont utilisés individuellement. L'effet neuroprotecteur du DHA ne repose donc pas sur une inhibition de la cPLA₂. La proportion inchangée d'AA parmi les AG totaux ou dans les phospholipides membranaires lors des mesures d'enrichissement en DHA (figure 70) nous a déjà permis de prédire que celui-ci ne modifierait pas le métabolisme de l'AA. Ceci est confirmé par les résultats du dosage de l'AA libéré en réponse à l'exposition des neurones au peptide A β ₄₀ (publication #2, figure 4A). Les résultats obtenus, en accord avec ceux décrits précédemment (440), révèlent bien une augmentation de la libération d'AA dans le milieu de culture après 10 min d'incubation avec le peptide A β ₄₀ soluble. Mais l'augmentation induite par ce dernier n'est en rien affectée après le traitement par le DHA, confortant ainsi l'hypothèse selon laquelle la neuroprotection par le DHA ne résulte pas de la modulation de la voie dépendante de l'AA.

3-4-2. L'acide docosahexaénoïque n'empêche pas l'apparition du stress oxydant

L'impact d'un prétraitement par le DHA sur le statut redox des neurones corticaux a ensuite été évalué afin de déterminer si la neuroprotection observée repose sur un effet antioxydant, comme cela a pu être montré après supplémentation nutritionnelle de rat en DHA ou en huile de poisson (335, 645). Le taux de GSH intracellulaire constitue un indicateur sensible du statut redox, notamment celui des neurones exposés au peptide A β soluble. La littérature rapporte que le métabolisme du GSH est altéré par les oligomères d'A β (694) et chez les patients atteints de la MA (6). Conformément aux résultats décrits dans la littérature, l'exposition à 5 μ M de peptide A β ₄₀ soluble induit un stress oxydant se traduisant par une diminution significative du taux de GSH par rapport aux cellules témoins (publication #2, figure 5A), mais aucune amélioration n'est observée dans les cellules prétraitées par le DHA. Ces résultats ont été confirmés à l'aide d'un second marqueur de stress oxydant, les adduits entre les protéines et le 4-hydroxynonénal (protéine-HNE), dont le dosage montre que l'exposition des

neurones aux formes oligomériques de peptide $A\beta_{40}$ conduit à une augmentation du taux d'adduits protéine–HNE que le prétraitement par le DHA ne permet pas de limiter (publication #2, figure 5B). Le DHA n'exprime donc aucun potentiel antioxydant dans notre modèle d'étude. Au contraire, il faut noter que le traitement par le DHA à concentration élevée tend lui-même légèrement à diminuer le taux de GSH et à augmenter le taux d'adduits protéine–HNE, sans doute en raison de la formation de dérivés oxydés favorisée par les nombreuses insaturations de l'AG (544). Toutefois, ce phénomène est certainement peu important à la concentration de 0,5 μ M de DHA qui n'affecte pas la survie cellulaire. Quoi qu'il en soit, le DHA n'empêche pas le stress oxydant induit par le peptide $A\beta$ soluble.

3-4-3. L'acide docosahexaénoïque prévient l'activation des sphingomyélinases

Les travaux réalisés dans la partie I du chapitre Résultats et Discussion ont mis en évidence l'activation essentielle des SMases dans le processus pro-apoptotique induit par le peptide $A\beta$ soluble. Ces résultats associés aux données bibliographiques indiquent que l'activation des SMases résulte de la libération d'AA et de la survenue d'un stress oxydant. Or, nous venons de montrer ci-dessus que la neuroprotection par le DHA ne peut s'expliquer ni par le blocage de l'activation de la $cPLA_2$, ni par un effet antioxydant. Il était donc intéressant de mesurer l'activité des SMases dans les neurones traités par le DHA avant l'exposition au peptide $A\beta$ soluble.

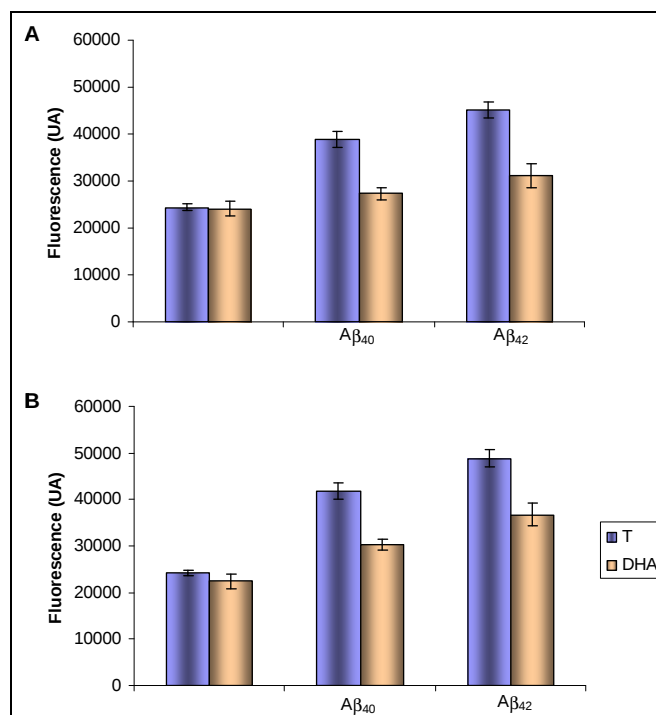


Figure 83. Effets du DHA sur l'activation des SMases par les peptides $A\beta$ solubles

A, activité n-SMase après 3 h de traitement, B, activité a-SMase après 6 h

Les neurones corticaux ont été prétraités 48 h en présence de DHA, puis exposés aux peptides $A\beta$ ($N = 2$; $n = 4$).

Les résultats illustrés par la figure 83 indiquent un effet préventif partiel du DHA sur l'activation des SMases. Le prétraitement par le DHA s'étant avéré inefficace pour empêcher l'activation de la

cPLA₂ et le stress oxydant, ces résultats suggèrent la possibilité d'une 3^{ème} voie d'activation des SMases. Le caractère partiel de l'inhibition de l'activation des SMases suggère toutefois que l'effet neuroprotecteur du DHA implique la modulation d'autres voies de signalisation pro-apoptotiques que celles décrites dans la partie I du chapitre Résultats et Discussion.

À notre connaissance, aucune donnée bibliographique n'a suggéré un effet inhibiteur du DHA ou des AGPI-*lc* sur les SMases, certains auteurs ayant même rapporté un effet activateur des AGPI, en particulier du DHA et de l'EPA sur l'activité n-SMase (516, 626). Dans ce sens, une étude récente a mis en évidence une stimulation de l'activité n-SMase des cellules de la lignée cellulaire MDA-MB-231 injectée de façon sous-cutanée à des souris préalablement supplémentées en huile de poisson (777). Même partiel, l'effet préventif du DHA sur l'activation des SMases pourrait toutefois limiter la production de céramides apoptogènes et ainsi contribuer à protéger les neurones de la mort induite par les oligomères d'Aβ.

3-4-4. L'acide docosahexaénoïque prévient l'activation des caspases

L'ensemble des résultats présentés dans la littérature suggère un rôle important des caspases dans la mort neuronale induite par les peptides Aβ solubles *in vitro* et *in vivo* (245, 599, 689). Les travaux présentés dans la partie I du chapitre Résultats et Discussion ont permis de mettre en évidence que l'activation des caspases dépend au moins en partie de la voie apoptotique impliquant les SMases. Le prétraitement par le DHA prévenant partiellement l'activation de ces dernières, nous avons souhaité mesurer l'activité des caspases-3 et -9. Les résultats obtenus, présentés dans la publication #2 par la figure 7A, indiquent qu'un prétraitement par le DHA inhibe presque complètement l'activation des caspases induite par le peptide Aβ₄₀ soluble, malgré l'existence d'une activité SMase résiduelle. Ceci suggère que le blocage de la voie des SMases n'est sans doute pas le seul mécanisme mis en jeu par le DHA pour empêcher l'apoptose neuronale induite par les oligomères d'Aβ. Il est alors vraisemblable que l'effet neuroprotecteur du DHA vis-à-vis de ces derniers implique à la fois l'inhibition de voies pro-apoptotiques comme celles que nous venons d'explorer et l'activation ou le maintien de voies de signalisation de survie cellulaire convergeant pour réguler négativement les effecteurs d'apoptose.

3-4-5. L'acide docosahexaénoïque prévient les altérations du cytosquelette

L'activation d'enzymes protéolytiques telles que les caspases ou la calpaïne constitue l'un des éléments clefs de la désorganisation du cytosquelette, caractéristique de l'apoptose et plus particulièrement de la dégénérescence axonale observée dans la MA (245, 694, 695). Les données disponibles dans la littérature suggèrent que la dégénérescence axonale induite par les formes solubles du peptide Aβ interviendrait dans les phases précoces de la maladie et serait un élément préalable et nécessaire au déclenchement de la mort cellulaire programmée *in vivo* (689). Ainsi, de nombreux travaux convergent vers l'hypothèse selon laquelle la stabilisation du cytosquelette pourrait présenter un intérêt

dans la prévention de la mort neuronale induite par les peptides A β solubles. Ainsi en témoignent les travaux de Sponne *et al.* (694) rapportant une diminution de la neurotoxicité du peptide A β soluble après prétraitement des cellules par le Taxol[®], un agent stabilisateur des microtubules du cytosquelette. Après avoir établi la preuve qu'un prétraitement par le DHA protège les neurones de l'activation des caspases, nous avons étudié son impact sur les perturbations des microtubules induites par le peptide A β soluble. Pour ce faire, le cytosquelette a été étudié par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre la tubuline- β . Les résultats obtenus montrent que les neurones exposés au peptide A β présentent, comme attendu, des perturbations du cytosquelette d'autant plus importantes que la concentration de peptide A β est élevée (publication #2, figure 6). Par contre, un prétraitement par le DHA protège significativement ($p < 0,05$) les neurones de ces altérations et préserve l'organisation des neurotubules.

Ces résultats ont été confortés par l'étude par immunoblot de la protéine MAP1A associée aux microtubules et substrat des caspases (245). Ils montrent clairement une diminution des niveaux de MAP1A dans les neurones exposés au peptide A β_{40} soluble, et ce d'autant plus marquée que le peptide est en concentration élevée (figure 84). Bien que les fragments protéolytiques n'aient pu être mis en évidence, il est probable que la diminution d'intensité du signal correspondant à MAP1A soit due à l'activation d'enzymes protéolytiques comme les caspases et les calpaïnes, comme notre groupe a pu le démontrer par ailleurs (245). Les prétraitements par le DHA permettent de maintenir tout ou partie du pool de MAP1A menacé par l'exposition des cellules au peptide A β_{40} , probablement en conséquence de l'inhibition des caspases démontrée ci-dessus (publication #2, figure 7A).

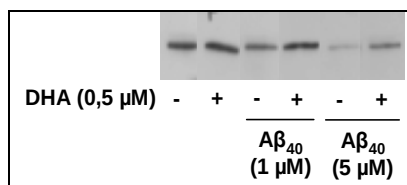


Figure 84. Préservation de la protéine MAP1A par le DHA

Les neurones ont été préincubés pendant 48 h dans un milieu supplémenté par le DHA, avant d'être exposés durant 24 h à 1 ou 5 μM d'Aβ₄₀.

Il est intéressant de rappeler que nous avons conclu à un effet neurotrophique du DHA (figure 61) après avoir observé en particulier que les neurones cultivés en présence de l'AGPI présentent des neurites plus épais. Il est probable qu'une relation puisse exister entre cette observation et la préservation de l'intégrité du cytosquelette. L'effet neurotrophique constaté pourrait alors avoir pour corollaire une plus grande résistance des neurones à diverses agressions dont celle par le peptide A β soluble.

3-4-6. L'acide docosahexaénoïque stimule des voies de survie cellulaire

Nous avons proposé ci-dessus que l'inhibition par le DHA de l'apoptose neuronale induite par le peptide A β oligomérique puisse impliquer aussi le maintien et l'activation de voies de survie cellulaire. L'impact d'un prétraitement par le DHA a donc été évalué sur différentes cascades de signalisation cellulaire en suivant la phosphorylation des protéines ERK1/2 (publication #2, figure 7B), ERK5 (Figure 85) et Akt (Figure 86), appartenant respectivement à la voie des MAPK et à la voie PI3K/Akt.

Les propriétés anti-apoptotiques de ces protéines requièrent leur phosphorylation par MEK pour ERK1/2 et ERK5 (587) et par PDK1 et PDK2 pour Akt (651).

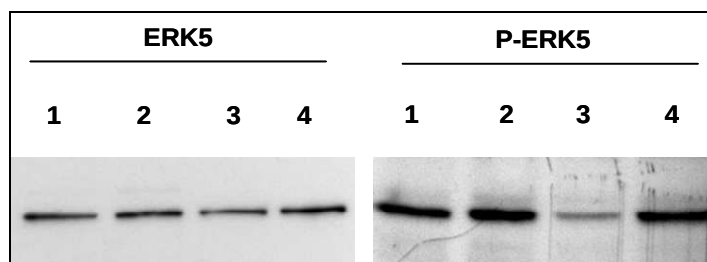


Figure 85. Maintien par le DHA de la voie de survie cellulaire impliquant phospho-ERK5

1, témoin ; 2, DHA (0,5 μ M) ; 3, $A\beta_{40}$ (1 μ M) ; 4, DHA, puis $A\beta_{40}$

Les neurones ont été traités par le DHA durant 48 h, puis par le peptide $A\beta_{40}$ durant 12 h.

Les lysats cellulaires ont été analysés par immunoblot après dépôt d'une même quantité de protéines.

Les résultats montrent une diminution significative des formes phosphorylées de ERK1/2, ERK5 et Akt après exposition des neurones au peptide $A\beta_{40}$ soluble sans modification du pool total de protéines ERK1/2, ERK5 et Akt. Dans les neurones prétraités par le DHA, la phosphorylation de ces protéines est préservée, permettant le maintien des voies de signalisation de survie cellulaire impliquant ces protéines phosphorylées actives.

Le maintien du pool d'Akt phosphorylée, observé par l'image compilée en microscopie confocale (figure 86), permet d'apporter une explication moléculaire possible à l'effet inhibiteur exercé par le DHA sur l'activation des caspases dans les neurones exposés au peptide $A\beta$ oligomérique. En effet, Akt transduit un signal anti-apoptotique en phosphorylant/inactivant de nombreux substrats, dont la caspase-9 et la protéine Bad, impliquée dans la libération des molécules apoptogènes par la mitochondrie (162).

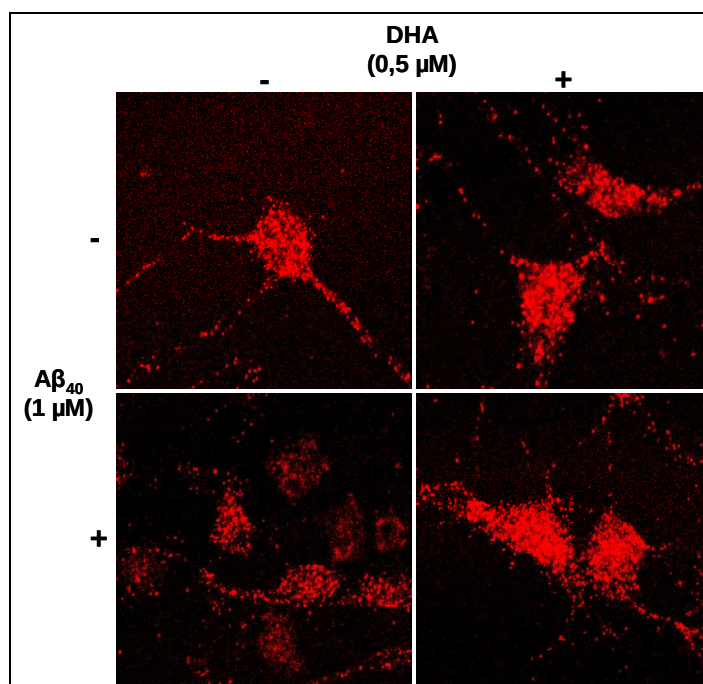


Figure 86. Préservation par le DHA de la voie de survie cellulaire impliquant phospho-Akt

Les neurones corticaux ont été prétraités par le DHA pendant 48 h

avant d'être exposés pendant 3 h au peptide $A\beta_{40}$ ($G \times 40$).

3-4-7. L'acide docosahexaénoïque inhibe des voies de signalisation proapoptotiques

Les travaux antérieurs réalisés au sein de notre équipe ont permis de mettre en évidence le potentiel neuroprotecteur de l'inhibiteur SB202190, un inhibiteur de la protéine p38 impliquée dans différentes cascades de signalisation pro-apoptotiques dont l'activation de la cPLA₂ (440, 490). Nous avons donc étudié l'impact d'un prétraitement par le DHA sur la phosphorylation/activation de p38 (figure 87).

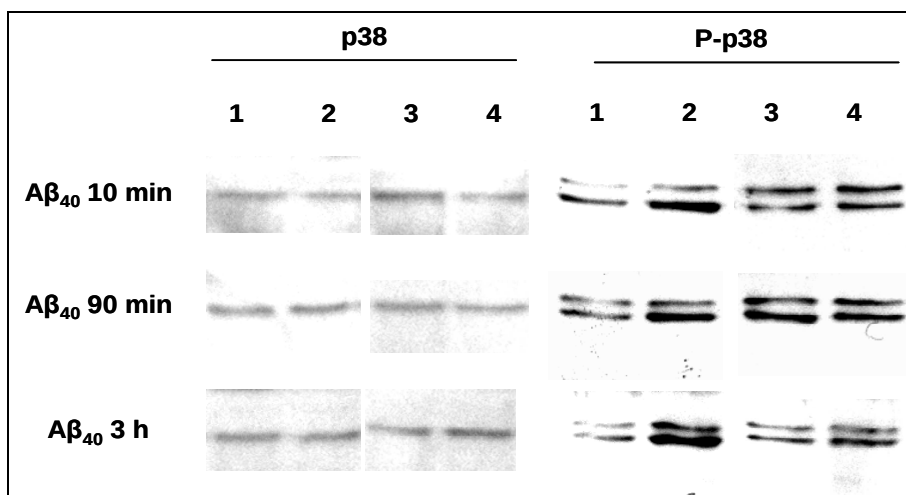


Figure 87. Inhibition par le DHA de la voie proapoptotique impliquant phospho-p38

1, témoin ; 2, Aβ₄₀ (1 μM) ; 3, DHA (0,5 μM) ; 4, DHA, puis Aβ₄₀

Les neurones ont été traités par le DHA durant 48 h, puis par le peptide Aβ₄₀.

Les lysats cellulaires ont été analysés par immunoblot après dépôt d'une même quantité de protéines.

Les résultats obtenus montrent clairement que le peptide Aβ₄₀ induit une activation de p38 qui est empêchée dans les neurones prétraités par le DHA. Ces résultats sont en accord avec ceux de Xue *et al.* (781) qui ont récemment montré une inhibition par le DHA et l'EPA de l'activation de la protéine p38 et de la voie des JNK kinases induite après stimulation des cellules HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) en culture primaire par le TNF-α.

Cette partie II du chapitre Résultats et Discussion a donc permis de démontrer un effet neurotrophique du DHA associé à un effet neuroprotecteur vis-à-vis de la toxicité du peptide Aβ soluble. Ces effets, observés après supplémentation du milieu de culture par des doses submicromolaires de DHA, nécessitent l'incorporation préalable de l'AGPI, pouvant contribuer à un enrichissement discret et très localisé de certains domaines membranaires. Il est toutefois encore impossible de déterminer si l'effet neuroprotecteur est dû au DHA lui-même ou à l'un de ces métabolites.

En revanche, il a pu être établi que l'incorporation du DHA n'altère pas la capacité du peptide A β soluble d'interagir avec la membrane neuronale puisqu'elle ne prévient pas certains des mécanismes précoces. Par contre, l'inhibition de l'activation des SMases semble indiquer que le DHA puisse protéger les neurones de la mort apoptotique en modulant la voie des eicosanoïdes et la conversion de l'AA, notamment par le pouvoir inhibiteur de l'AGPI sur la cycloxygénase-2, comme le rapporte la littérature.

L'analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans la neuroprotection par le DHA a permis de montrer que l'effet repose au moins en partie sur le maintien de voies de signalisation fonctionnelles de la survie cellulaire comme celles impliquant les formes phosphorylées d'ERK1/2, ERK5 et Akt, et l'inhibition concomitante des voies de signalisation pro-apoptotiques conduisant à l'activation des caspases et à l'altération du cytosquelette neuronal induites par le peptide A β , comme le synthétise de façon schématique la figure 88.

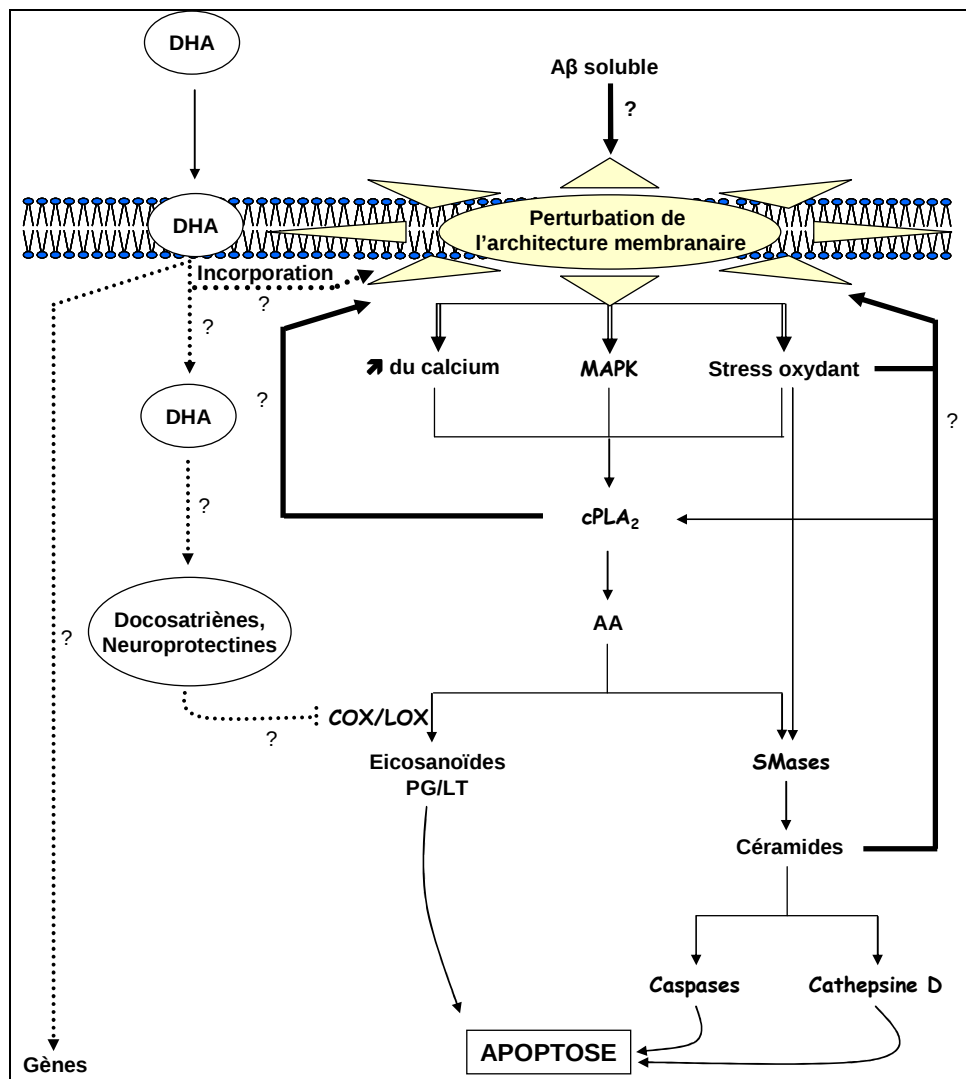


Figure 88. Mécanismes de neuroprotection par le DHA vis-à-vis du peptide A β soluble

Ces différentes voies de signalisation partagent la propriété de prendre naissance au niveau de la membrane plasmique et dépendent à ce titre de l'organisation membranaire. La modulation de ces voies pourrait être liée à l'impact de l'incorporation du DHA sur la composition et l'intégrité des plateformes de signalisation que constituent les microdomaines membranaires. L'analyse des conséquences des traitements par le DHA et par le peptide A β ₄₀ soluble sur les propriétés architecturales et fonctionnelles de ces microdomaines est donc d'un immense intérêt pour élucider les étapes initiant la toxicité du peptide A β et les mécanismes mis en jeu par le DHA pour protéger les neurones de la mort apoptotique associée.

Une grande partie de ces résultats a été publiée en 2006 dans *J Neurochem* (Publication # 2).

Publication # 2

**Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis
induced by soluble amyloid- β oligomers**

Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanyé MC,
Fifre A, Sponne I, Leininger-Muller B, Olivier JL, Pillot T & Oster T

J Neurochem (2006) **96**, 385-95

Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid- β oligomers

Sabrina Florent,* Catherine Malaplate-Armand,*† Ihsen Youssef,* Badreddine Kriem,* Violette Koziel,* Marie-Christine Escanyé,† Alexandre Fifre,* Isabelle Sponne,* Brigitte Leininger-Muller,* Jean-Luc Olivier,*† Thierry Pillot* and Thierry Oster*

*Jeune Équipe Lipidomix, Institut National Polytechnique de Lorraine, Laboratoire Médecine et Thérapeutique Moléculaire, Vandœuvre-lès-Nancy, France

†Service de Biochimie-Biologie Moléculaire, Hôpital Central, CHU de Nancy, Nancy, France

Abstract

A growing body of evidence supports the notion that soluble oligomers of amyloid- β (A β) peptide interact with the neuronal plasma membrane, leading to cell injury and inducing death-signalling pathways that could account for the increased neurodegeneration occurring in Alzheimer's disease (AD). Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6, *n*-3) is an essential polyunsaturated fatty acid in the CNS and has been shown in several epidemiological and *in vivo* studies to have protective effects against AD and cognitive alterations. However, the molecular mechanisms involved remain unknown. We hypothesized that DHA enrichment of plasma membranes could protect neurones from apoptosis induced by soluble A β oligomers. DHA pre-treatment was observed to significantly

increase neuronal survival upon A β treatment by preventing cytoskeleton perturbations, caspase activation and apoptosis, as well as by promoting extracellular signal-related kinase (ERK)-related survival pathways. These data suggest that DHA enrichment probably induces changes in neuronal membrane properties with functional outcomes, thereby increasing protection from soluble A β oligomers. Such neuroprotective effects could be of major interest in the prevention of AD and other neurodegenerative diseases.

Keywords: Alzheimer's disease, docosahexaenoic acid, neuronal apoptosis, neuroprotection, soluble amyloid- β peptide.

J. Neurochem. (2006) **96**, 385–395.

Alzheimer's disease (AD) is a common form of senile dementia characterized by irreversible memory impairment, continuous cognitive decline and behavioural disturbances. It is associated with the 40–42-residue amyloid- β (A β) peptide that results from the processing of the amyloid precursor protein and is known to aggregate in senile plaques, one of the neuropathological hallmarks of this neurodegenerative disease (Selkoe 1994; Yankner 1996). A growing importance has been given lately to the non-fibrillar form of A β (Drouet *et al.* 2000). Indeed, studies from both our group and others have demonstrated that exposure of cells to soluble A β could lead to neuronal apoptosis following oxidative stress, pro-inflammatory signals and cytoskeleton perturbation (Pillot *et al.* 1999; Sponne *et al.* 2003; Kriem *et al.* 2005). Such neurotoxicity strongly suggests that soluble A β oligomers could be the proximate effectors of the neuronal injury and death occurring in the precocious stages of AD (Drouet *et al.* 2000; Kirkitadze *et al.* 2002).

Due to their amphiphilic properties, soluble A β oligomers may directly interact with the neuronal plasma membrane and affect its functioning (Ege and Lee 2004), thereby initiating intracellular pro-apoptotic signalling pathways. It is thus essential to identify the biological factors that could modulate these early interactions and their fatal consequences. Also,

Received June 13, 2005; accepted September 16, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Thierry Oster, Jeune Équipe Lipidomix, Institut National Polytechnique de Lorraine, Laboratoire Médecine et Thérapeutique Moléculaire, 15 rue du Bois de la Champelle, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

E-mail: thierry.oster@mtm.nancy.inserm.fr

Abbreviations used: AA, arachidonic acid; A β , amyloid- β ; AD, Alzheimer's disease; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; ERK, extracellular signal-related kinase; GSH, reduced glutathione; HNE, 4-hydroxynonenal; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline; PUFA, polyunsaturated fatty acid.

considerable attention has been focused in the past few years on the possible influence of lipid status, especially that of *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), in the CNS on the development of AD.

Docosahexaenoic acid (DHA; C22:6) is a PUFA primarily found in marine fish and algae. It is the major *n*-3 PUFA constituent of the neuronal membranes in the grey matter of the cerebral cortex and in retinal photoreceptor cells (Lauritzen *et al.* 2001). As it is highly unsaturated, DHA is expected to increase the fluidity of neuronal membranes, thereby playing a role in various neurochemical processes in brain (Stillwell and Wassal 2003; Horrocks and Faroوقي 2004). A growing body of evidence supports the essential role of DHA in normal neurological and cognitive functions as well as in visual acuity (reviewed by Salem *et al.* 2001). PUFA deficiency has been reported in ageing mouse neuronal membranes (Yehuda *et al.* 2002), leading to memory loss, learning disabilities, cognitive alterations and impaired visual acuity that can be reversed by supplementing the diet with fish oil or DHA (Ikemoto *et al.* 2001). Lower contents of *n*-3 PUFA have also been measured in the plasma (Conquer *et al.* 2000; Tully *et al.* 2003) as well as in the brain (Söderberg *et al.* 1991) of patients with AD. Furthermore, numerous epidemiological studies suggest that increased fatty fish consumption and high DHA intake are associated with reduced risk of AD (Grant *et al.* 2002; Morris *et al.* 2003; Kalmijn *et al.* 2004). The molecular basis for such protective effects still remains unclear. Dietary DHA has been widely demonstrated to be incorporated into neuronal membrane lipids but the extent of structural and functional changes is unknown and its possible influence in modulating A β cytotoxicity has not yet been addressed.

In the present study, we studied the neuroprotective potential of DHA on rat cortical neurones exposed to soluble oligomers of A β . DHA enrichment of plasma membrane is shown to protect neurones from A β -induced cell death not only by inhibiting apoptotic pathways but also by promoting the ERK1/2-related survival pathways. This provides a molecular basis for the preventative effects of dietary DHA supplementation on neurodegeneration.

Materials and methods

Materials, media and reagents

The amyloid peptides A β (1–40) and A β (1–42) were obtained from Neosystem, Strasbourg, France and soluble oligomers were prepared as previously described (Pillot *et al.* 1999). Cell culture media and materials were from Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Tritiated arachidonic acid (AA) ([5,6,8,9,11,12,14,15-³H]AA, 204 Ci/mmol) was purchased from Amersham (Allington Heights, IL, USA). All antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) except antibodies directed against protein adducts to 4-hydroxynonenal (HNE) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) and antibodies raised against phosphorylated and

non-phosphorylated ERK (Cell Signaling, Beverly, MA, USA). All chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma (St Louis, MO, USA) except for methyl arachidonyl fluorophosphonate (Calbiochem). PUFAs, i.e. *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5*n*-3) and *cis*-4,7,10,13,16,19-DHA, were dissolved in isopropanol and stored at –20°C as 1-mm nitrogen-saturated stock fractions.

Cell cultures and treatments

Cortical neurones from Wistar rat fetuses at embryonic day 16–17 were cultured in serum-free medium containing 0.1% (w/v) ovalbumin as described by Pillot *et al.* (1999). For fluorescence microscopy, the cells were cultured on glass coverslips coated with 15 μ g/mL poly-L-ornithine. After 6 days *in vitro*, neurones were treated with 1 or 5 μ M soluble A β (1–40) or A β (1–42) for 24 h before monitoring cell viability. DHA or EPA (indicated concentrations) and fatty acid-free bovine albumin (0.1%, w/v) were added to the medium 48 h before treatment with amyloid peptides in the absence of fatty acid and albumin. Control studies revealed that the final concentration of isopropanol (i.e. the vehicle) in medium had no effect on neurones (data not shown). To inhibit cytosolic phospholipase A₂ activity, cells were pre-incubated for 2 h with methyl arachidonyl fluorophosphonate (0.1 μ M) and then incubated with 1 μ M A β (1–40) in the presence of the inhibitor. All cellular markers described below were investigated in neurones at 7 days *in vitro*, except AA release and caspase activation (at 6 days *in vitro*).

Neuro2A mouse neuroblastoma cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% (v/v) fetal calf serum. Alternatively, the day after seeding, Neuro2A cultures were performed in 1% serum medium supplemented by retinoic acid at final concentrations of 10 μ M for 24 h and 5 μ M for 48 h. These treatments allowed the cells to differentiate into neurones, as followed by expression of specific microtubule-associated proteins as well as by characteristic morphological changes. When required, DHA was added to the medium at day 2 after seeding for 48 h prior to A β exposure. Effects on cell survival were measured at day 5 after seeding.

Cell viability and monitoring of apoptosis

Cell viability was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay (Drouet *et al.* 1999). Cell nuclei were visualized using 4,6-diamidino-2-phenylindole and quantified as described by Pillot *et al.* (1999).

Measurement of membrane enrichment in docosahexaenoic acid

The fatty acid composition of membranes was determined by gas chromatography and samples were prepared by transesterification (Lepage and Roy 1986). Briefly, cell pellets were suspended in 100 μ L of methanol : chloroform (2 : 1) and diluted in 2 mL of methanol : dichloromethane (3 : 1). Acetyl chloride (200 μ L) was slowly added to each sample and tubes were capped and placed for 1 h on a heating block at 100°C. The reaction was stopped by addition of potassium carbonate, hexane was added and the tubes were mixed vigorously for 1 min. The upper organic phase was collected and evaporated under nitrogen and the dry residue was dissolved in 25 μ L of hexane. Fatty acids were separated as methyl esters on a fused silica capillary column (30 $\times$ 0.32 mm i.d. $\times$ 0.25 μ m film thickness) and analyses were performed on a gas chromatograph (Chromopack CP 9001; Chromopack, Middleburg, the Netherlands) equipped with a

flame ionization detector. Nitrogen was used as carrier gas and make-up gas. The injection port and detector temperatures were 230 and 270°C, respectively and the column temperature reached a plateau of 260°C in a step-wise fashion. The gas chromatograph was calibrated using a standard mixture of fatty acids and 8 μ L of each sample was injected. Chromatograms were integrated with the Millenium software (Waters, Milford, MA, USA) and results expressed as DHA : AA ratio.

Measurement of arachidonic acid release

The release of AA from neurones was monitored as described previously (Kriem *et al.* 2005). Briefly, cells were incubated in medium containing 1 μ Ci/mL [3 H]AA 24 h prior to A β exposure. Neurones were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2% (w/v) fatty acid-free bovine albumin and twice with PBS. In the presence of 1 μ M soluble A β (1–40) oligomers, AA release was previously described to be time dependent and to reach a maximum after 10 min (Kriem *et al.* 2005). Hence, the culture medium was recovered after 10 min of exposure to A β , while the neurones were lysed with 0.5 M NaOH. Scintillant solution (Pico-FluorTM 40, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) was added to both lysed cells and media samples and the levels of cellular and released [3 H]AA were measured using a top count scintillant counter (Packard Instrument Company). [3 H]AA release was calculated as the percentage of [3 H]AA released into the supernatant compared with the total [3 H]AA taken up by the neurones.

Intracellular glutathione assay

Attached neurones were rinsed twice with ice-cold PBS and immediately treated with a threefold diluted solution of 10% (v/v) perchloric acid containing 2 mM sodium EDTA, as detailed by Begni *et al.* (2004). The suspension was centrifuged at 4°C for 10 min at 13 000 g. Reduced (GSH) and total unbound glutathione were measured in the supernatant using a reversed-phase HPLC method as previously described (Leroy *et al.* 1993), based on the post-column specific derivatization of GSH with *o*-phthalaldehyde. Glutathione concentrations were calculated from a GSH standard curve and normalized on the protein content in the corresponding pellet.

4-hydroxynonenal adduct assay

4-hydroxynonenal adducts to proteins were detected by slot blot immunoassay. At the end of treatment, the neurones were scraped in ristocetin-induced platelet agglutination buffer. Identical protein amounts (10 μ g) of sample homogenates were separately loaded onto a nitrocellulose membrane prior to blocking for 1 h in PBS containing 5% milk powder. After washing, the membrane was incubated with an antibody raised against HNE Michael adducts (1 : 1000 dilution) for 1 h. After several washes in PBS, the membrane was incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1 : 2000 dilution) for 1 h. After extensive washing, HNE adducts were detected using the electrochemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham) and quantified by densitometric analysis.

Cytoskeleton study

Neuronal cytoskeleton integrity was studied by immunofluorescence, using a monoclonal anti- β -tubulin antibody (1 : 250 dilution)

and an FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG (1 : 1000 dilution). Following the treatments, the cells were treated as previously described (Kriem *et al.* 2005). β -Tubulin was visualized with a microscope (Nikon, Melville, NY, USA) using a PlanFluor $\times 60/1.3$ objective and captured by a digital camera (Nikon DXM1200). The number of cells with perturbed cytoskeleton was calculated after counting as described above for apoptotic cells.

Measurement of caspase-like proteolytic activities

Caspase 3 and 9 activities were measured by following the cleavage of the fluorogenic substrates Ac-DEVD-AMC (*N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin) and Ac-LEHD-AMC (*N*-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-aminomethylcoumarin) using previously described procedures (Sponne *et al.* 2003). Briefly, neurones were washed three times with ice-cold PBS and lysed on ice for 20 min in 25 mM HEPES buffer, pH 7.5, 1% (v/v) Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 10 μ g/mL pepstatin, 10 μ g/mL leupeptin and 5 μ g/mL aprotinin. When lysis was complete, soluble proteins were assayed after 10-min centrifugation at 13 000 g and 4°C. The caspase-related substrates were incubated at the final concentration of 100 μ M for 2 h at 37°C with 50 μ g proteins. Proteolytic cleavage was monitored by fluorescence emission at 460 nm after excitation at 360 nm using a Fluostar microplate reader (BMG-Labtechnologies, Champigny-sur-Marne, France).

Immunoblot analysis of ERK phosphorylation status

The phosphorylated and non-phosphorylated forms of ERK1/2 (p42/p44) were examined by immunoblot. Briefly, attached neurones cultured under different conditions were washed with ice-cold PBS and solubilized in a 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) lysis buffer containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (w/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulphate and protease inhibitors (Complete, Roche, Basel, Switzerland). After homogenization, collected cells were lysed by two freezing/thawing cycles and centrifuged at 4°C for 10 min at 13 000 g. Protein concentration in the supernatants was determined by using a bicinchoninic acid Protein Assay Kit (Interchim, Montluçon, France). Samples of the same protein amounts (10 μ g) were denatured, resolved by 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto Immobilon-P membranes. After 2-h blocking in Tris-buffered saline containing 0.05% (v/v) Tween-20 supplemented with 5% (w/v) skim milk, membranes were sequentially incubated overnight with specific antibodies for p-ERK (1 : 1000 dilution) and ERK (1 : 1000 dilution). The membranes were washed with Tris-buffered saline containing 0.05% (v/v) Tween-20 and then processed for 1 h by using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1 : 2000 dilution). Immunoreactive proteins were visualized by using the ECL detection kit.

Statistical analyses

Data, from three to four separate experiments with four determinations each, were compared using StatView computer software and expressed as means $\pm$ SEM. Multiple pair-wise comparisons among the groups of data were performed using ANOVA followed by a Scheffé's post-hoc test. Statistical differences were determined as $p < 0.05$.

Results

N-3 polyunsaturated fatty acids protect neurones from soluble amyloid- β -induced apoptotic cell death

We first investigated the effects of DHA and EPA on the viability of rat cortical neurones in primary culture. Different fatty acid concentrations of up to 5 μ M were added to the medium and neurones were incubated for 48 h. It is worth noting that PUFAs could be substantially protected and their potential toxicity could be reduced by simply adding fatty acid-free albumin to the culture medium. Indeed, no significant variation was observed in cell viability measured by using the MTT reduction assay, even at the highest PUFA doses tested (Fig. 1). It has to be noted that the MTT assay has been correlated with other cell viability tests such as

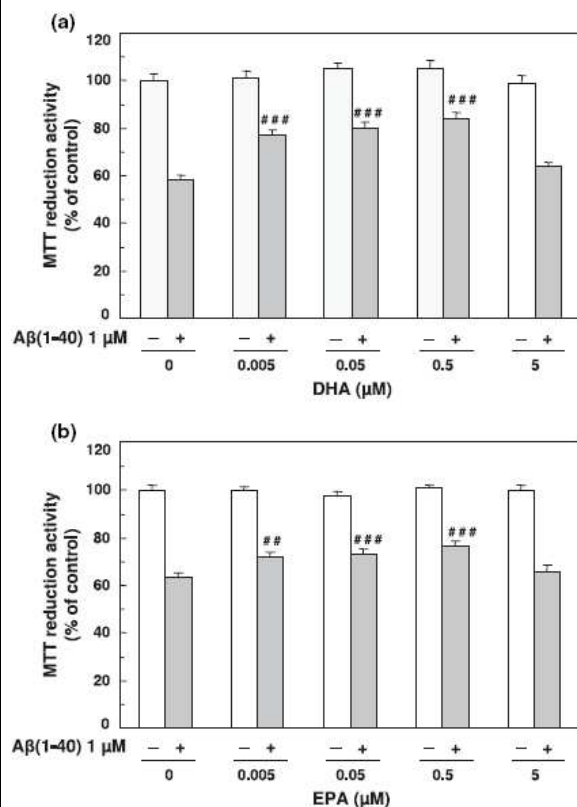


Fig. 1 Pre-incubation with *n*-3 polyunsaturated fatty acid protects neurones from soluble amyloid- β ($A\beta$) cytotoxicity. Cortical neurones were cultured for 48 h in medium enriched with docosahexaenoic acid (DHA) (a) or eicosapentaenoic acid (EPA) (b) prior to exposure to non-fibrillar $A\beta$ for 24 h. Cell viability was then monitored using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Data are expressed as means $\pm$ SEM, calculated from at least three independent experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle designated as 100%. ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$, significantly different from $A\beta(1-40)$ -treated cells.

released lactate dehydrogenase measurement, trypan blue cell counting and calcein fluorescence assay (Pillot *et al.* 1999; Drouet *et al.* 2000; Sponne *et al.* 2003). We then compared the viability of the PUFA-pre-treated neurones after a 24-h exposure to 1 μ M soluble $A\beta(1-40)$ oligomers. As expected from our previous reports (Pillot *et al.* 1999; Sponne *et al.* 2003, 2004; Kriem *et al.* 2005), $A\beta$ cytotoxicity led to 50–60% survival as compared with control cells. In contrast, neurones pre-treated for 48 h with either PUFA showed significant resistance to $A\beta$ cytotoxic effects. A higher level of neuroprotection ($p = 0.015$) was obtained for DHA, leading to 85% survival at 0.5 μ M (Fig. 1a), while EPA protected up to 77% of the cells (Fig. 1b). We also noticed that the neurones pre-treated with 5 μ M of either *n*-3 PUFA were almost unprotected from soluble $A\beta$ as compared with cells that were not pre-incubated with the fatty acids. Hence, the following experiments focused on DHA properties only and the effective and non-toxic concentration of 0.5 μ M was selected.

Docosahexaenoic acid was observed to sustain survival of neurones exposed to soluble oligomers of $A\beta(1-40)$ as well as $A\beta(1-42)$ (Fig. 2), which was not surprising assuming that both non-fibrillar amyloid peptides probably exert their toxic effect by inducing common pathways as previously reported (Pillot *et al.* 1999; Kriem *et al.* 2005). We have also tested the effect of DHA when added to the neurones either 2 h before or together with $A\beta$ oligomers. However, we failed to observe any protection from the peptide cytotoxicity (data not shown), which makes it unlikely that the free fatty acid interacts directly with the $A\beta$ oligomers and suggests

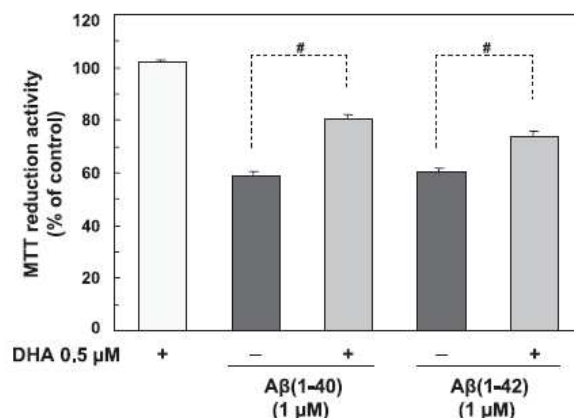


Fig. 2 Docosahexaenoic acid (DHA) pre-incubation protects neurones from amyloid- β ($A\beta$)(1-40) as well as $A\beta(1-42)$ oligomers. Treatments with DHA and $A\beta$ were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. Cell viability was monitored using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Data are expressed as means $\pm$ SEM, calculated from at least three independent experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle designated as 100%. # $p < 0.05$.

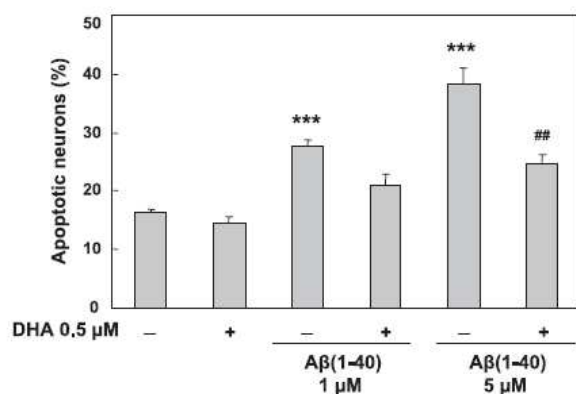


Fig. 3 Protective effects of docosahexaenoic acid (DHA) on neuronal apoptosis induced by soluble amyloid- β (A β)(1–40). Treatments with DHA and A β were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. Apoptotic nuclei in cells were visualized by 4,6-diamidino-2-phenylindole staining and quantified from 10 individual fields per coverslip. Data are expressed as means $\pm$ SEM, calculated from two separate experiments with two independent coverslips each. *** p < 0.001, significantly different from control cells; ## p < 0.01, significantly different from A β (1–40)-treated cells.

rather that DHA exerts its protective effect as a membrane component. Indeed, by measuring the fatty acid composition of cells cultured for 48 h in the presence of DHA in the medium, we observed a very significant dose-dependent increase in DHA proportions. A 4.5-fold higher DHA : AA ratio was calculated in cells treated with 0.5 μ M DHA, which led us to conclude an effective enrichment in spite of the relatively low fatty acid concentration in the medium.

The protective effects of DHA from soluble oligomers of amyloid peptides were further verified by counting the apoptotic neurones under the microscope after 4,6-diamidino-2-phenylindole staining. Non-fibrillar A β (1–40) induced an apoptotic cell death of cortical neurones as already reported (Sponne *et al.* 2003). Here we found that A β -mediated neuronal apoptosis was inhibited by DHA pre-treatment, as indicated by the decreased apoptotic nuclei (Fig. 3).

We previously reported that the soluble A β -induced apoptosis results from the activation of various pathways, including pro-inflammatory signalling cascade (Kriem *et al.* 2005), oxidative stress and microtubule disorganization (Sponne *et al.* 2003). Accordingly, the following experiments were designed in order to investigate these individual pathways in an attempt to elucidate the molecular mechanisms that could be involved in the antiapoptotic effects of DHA in neurones exposed to soluble A β oligomers.

Docosahexaenoic acid does not inhibit activation of cytosolic phospholipase A₂ in amyloid- β -treated neurones
We have recently reported that the pro-apoptotic pathways induced by non-fibrillar A β peptides include an enhancement

in AA release and pro-inflammatory cascade subsequent to an early activation of cytosolic phospholipase A₂ (Kriem *et al.* 2005). Here we demonstrated that the DHA : AA ratio in neuronal membranes was increased upon DHA supplementation. It was thus interesting to explore whether DHA overloading could modulate this particular pathway and thereby protect cells from A β -induced cell death. We first measured the release of AA upon exposure to soluble A β (1–40) oligomers (Fig. 4a). After 10 min, [³H]AA release was 1.8-fold higher in A β -treated cells than in control cells (p < 0.001), which is in agreement with our previous data (Kriem *et al.* 2005). DHA overloading did not affect the basic level of this AA release and nor was it observed to significantly modulate its increase in A β -treated neurones, leading us to conclude that DHA pre-treatment neither inhibits nor delays cytosolic phospholipase A₂ activation upon non-fibrillar A β treatment.

We also compared the protective effects of DHA with those of methyl arachidonyl fluorophosphonate, a cytosolic phospholipase A₂ inhibitor that prevents non-fibrillar A β -induced neuronal apoptosis, as we previously reported (Kriem *et al.* 2005). When used individually, DHA and methyl arachidonyl fluorophosphonate significantly increased cell survival upon treatment with soluble A β (1–40) oligomers, protecting 51 and 76% of neurones, respectively, as calculated after assaying MTT activity (Fig. 4b). Cumulative effects were observed when A β -exposed neurones were pre-treated with both agents, leading to complete protection from A β -mediated cell death. Collectively, these data strongly suggest that DHA does not prevent cell apoptosis by blocking AA liberation and the subsequent dependent pro-inflammatory signalling cascade.

Docosahexaenoic acid enrichment does not prevent amyloid- β -mediated oxidative stress

We next studied the influence of DHA pre-treatment on the redox status in cortical neurones and verified whether the above-mentioned neuroprotection from A β toxicity could rely on an antioxidant effect such as that reported to result from supplementation by DHA or fish oil (Hashimoto *et al.* 2002; Sarsilmaz *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003). We therefore chose to measure intracellular glutathione, i.e. the most abundant cellular non-protein thiol that serves as a major antioxidant and whose metabolism has been described as being altered in diseased regions of AD brains (Aksenov and Markesbery 2001). In accordance with the known oxidative behaviour of the amyloid peptides, we observed that A β (1–40) oligomers decreased the GSH content, with a significant loss of 35% in neurones exposed to 5 μ M soluble A β compared with control cells that received the vehicle only (Fig. 5a). DHA on its own caused a slight but insignificant decrease in GSH content, which could result from residual generation of products from oxidation breakdown of the fatty acid. This phenomenon is probably limited at the concentra-

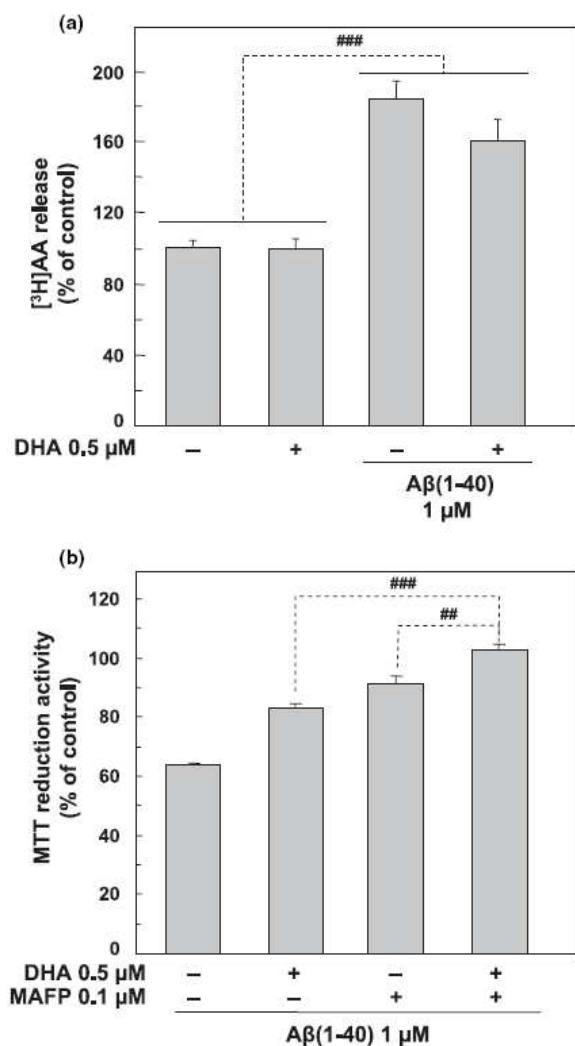


Fig. 4 Docosahexaenoic acid (DHA) protection from soluble amyloid- β ($A\beta$)(1–40) toxicity does not rely on cytosolic phospholipase A_2 inhibition. Treatments with DHA and $A\beta$ were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. (a) [3H]arachidonic acid (AA) release was measured by counting the percentage of tritium β -particle activity released into the culture medium after 10 min exposure to $A\beta$. (b) Neuronal viability was monitored after 24 h exposure to $A\beta$ using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. No effect was observed when neurones were treated with methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) only. Data are expressed as means $\pm$ SEM, calculated from at least three independent experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle designated as 100%. ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$.

tion of 0.5 μ M DHA as cell viability was not affected (Fig. 1). These data indicate that, at least in our model, the neuroprotective effects of DHA do not rely on antioxidant properties. When measuring total glutathione, similar profiles could be obtained, with an increase up to 25% in oxidized

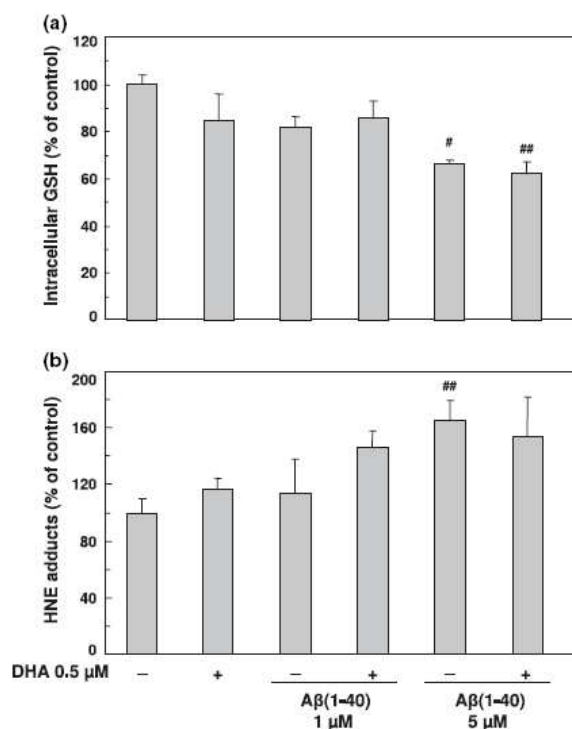


Fig. 5 Docosahexaenoic acid (DHA) does not prevent oxidative stress induced by soluble amyloid- β ($A\beta$)(1–40) oligomers. Treatments with DHA and $A\beta$ were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. Neuronal GSH content was recovered by acidic lysis. (a) GSH concentration was measured by fluorometric detection, normalized on protein concentration and compared with that in untreated cells. (b) 4-hydroxynonenal (HNE) adducts were detected by chemiluminescent slot blot immunoassay and quantified by densitometry. Data are expressed as means $\pm$ SEM, calculated from three independent experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle designated as 100%. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$, significantly different from control cells.

forms of glutathione after exposure to 5 μ M $A\beta$ (data not shown), which suggests that GSH not only underwent oxidation but was either utilized by or released from the neurones upon $A\beta$ treatment.

We also measured HNE-protein adducts, whose accumulation in cells results from lipid peroxidation. A significant increase in the levels of these adducts was measured in $A\beta$ -treated neurones (Fig. 5b). In accordance with the absence of antioxidant effect by DHA deduced from the glutathione variations described above, DHA pre-treatment did not protect neurones from the oxidative formation of HNE adducts upon exposure to soluble $A\beta$ oligomers. DHA on its own was also observed to tend to increase the formation of HNE adducts. Taken together, these data confirmed that neurones exposed to soluble $A\beta$ undergo an oxidative stress that is not prevented by DHA overloading.

Docosahexaenoic acid protects neurones from amyloid- β by preventing cytoskeleton perturbation

Alteration of the cytoskeleton was also reported to occur in the cascade of events leading to cell death in cortical neurones exposed to A β soluble oligomers (Sponne *et al.* 2003). Therefore, we examined the effects of DHA on the A β -induced perturbations of the microtubule network by using an anti- β -tubulin antibody. As expected, the neurotubules were altered in most of the neurites of the degenerating cells injured by soluble A β (1–40) oligomers (Fig. 6a), the ratio of neurones with perturbed cytoskeleton being more dramatically increased upon exposure to 5 μ M amyloid peptides (Fig. 6b). DHA pre-treatment significantly protected the cells from these A β -mediated alterations and preserved

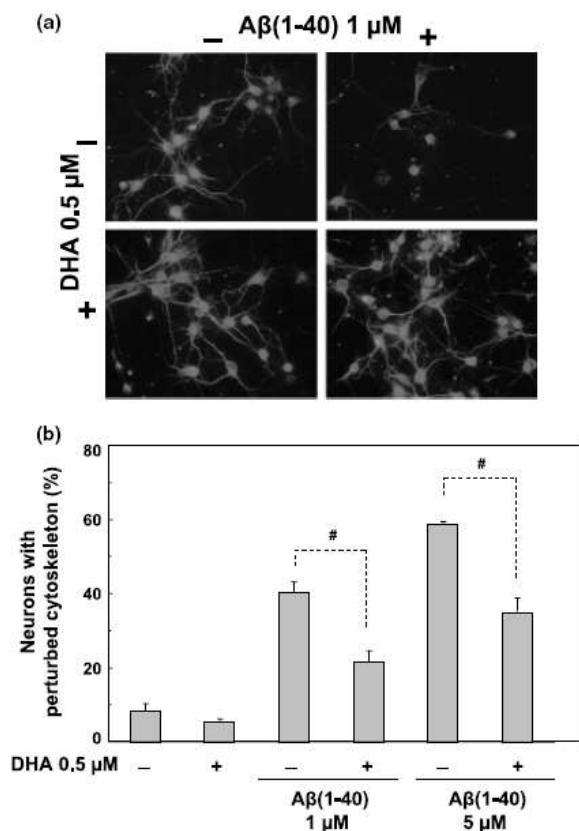


Fig. 6 Protection by docosahexaenoic acid (DHA) from cytoskeleton perturbation induced by soluble amyloid- β (A β)(1–40). Treatments with DHA and A β were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. (a) β -Tubulin labelling was used to study cytoskeleton integrity by immunocytochemistry. Data are indicative of identical effects observed in at least three separate experiments. Magnification: $\times 60$. (b) Cells with perturbed neurones were counted from 10 individual fields per coverslip. Data are expressed as means $\pm$ SEM, calculated from two separate experiments with two independent coverslips each. # $p < 0.05$.

the typical microtubule organization of the neurones. Interestingly, DHA overloading also led to a network of cells that appeared with more neurites and of longer length as compared with control neurones. A similar outcome was previously observed in hippocampal neurones (Calderon and Kim 2004) and might be related to the determinant role of this PUFA in CNS maturation. These data all converge to the idea that neuronal apoptosis upon A β exposure could be prevented by protecting the cytoskeleton from disruption, as already noticed when using taxol (Sponne *et al.* 2003).

Docosahexaenoic acid protects neurones from amyloid- β -induced cell death by preventing caspase activation and by promoting survival pathways related to ERK

We previously also showed that the apoptotic cell death induced by soluble A β (1–40) oligomers required the activation of both caspases 3 and 9 (Pillot *et al.* 1999; Sponne *et al.* 2003, 2004). This was verified here by measuring the caspase-like cleavage activities towards specific fluorogenic substrates in the lysates of neurones exposed for 24 h to 1 μ M A β (1–40). Indeed, A β led to simultaneous activation of caspase 3 and 9 (Fig. 7a) and we could clearly demonstrate that DHA pre-treatment protects neurones from A β -induced

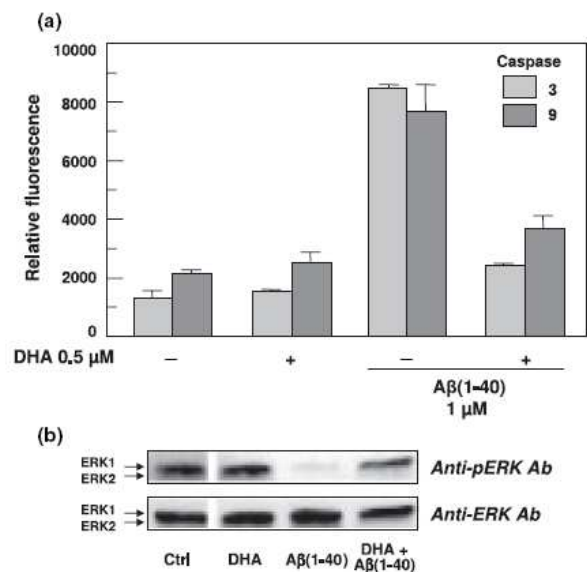


Fig. 7 Docosahexaenoic acid (DHA) prevents caspase induction and ERK dephosphorylation upon exposure to soluble amyloid- β (A β)(1–40). Treatments with DHA and A β were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. (a) Caspase 3 and 9 activation in cortical neurones was monitored by measuring the relative increase in fluorescence due to the cleavage of the fluorogenic substrates in the presence of cell extracts. Data are expressed as means $\pm$ SEM, calculated from three different experiments with four determinations each. (b) Immunoblot analysis of the phosphorylated and non-phosphorylated forms of ERK.

apoptosis through a significant inhibition of caspase activation. We also examined whether DHA enrichment of membranes could lead to an activation of survival pathways by investigating ERK1/2, two proteins whose activity in survival-promoting pathways closely depends on their phosphorylation state. As depicted in Fig. 7(b), ERK phosphorylation is dramatically reduced upon exposure to soluble A β whereas no difference was observed in the levels of total ERK. In contrast, DHA pre-treatment is shown to preserve the phosphorylated form of ERK, which might be of importance in explaining DHA neuroprotection from A β -mediated toxicity.

Docosahexaenoic acid provides protection from amyloid- β -induced cell death to neuronal cells but not to oligodendrocytes

In an attempt to determine whether DHA supplementation could offer protection to other cellular types, Neuro2A cells and primary rat oligodendrocytes were, respectively, chosen as an alternative to primary cortical neurones and as a model of non-neuronal brain cells. Two distinct culture conditions were used to grow Neuro2A cells, depending on the presence of retinoic acid in the medium that determines the capacity of cells to differentiate and to gain neuronal features, including expression of microtubule-associated proteins and acquisition of neuronal aspect and morphology with neurites. Each cell type exhibited similar sensitivity to soluble A β (1–40)-mediated cytotoxicity under *in vitro* conditions comparable to those imposed on primary neurones, leading to MTT activity decreased by 40–50% in A β -treated cells. DHA pre-treatment resulted in a dose-dependent increase in MTT activity in Neuro2A cells cultured in the presence of up to 0.5 μ M DHA (Fig. 8). Such pre-treatment allowed around 80% cell viability among cells exposed to non-fibrillar A β , i.e. a protection level comparable to that measured in primary neurones. However, DHA did not provide protection to oligodendrocytes (data not shown). Interestingly, this result was corroborated by the very low and non-significant level of DHA enrichment in oligodendrocytes, which could indicate that DHA has a lower affinity for non-neuronal cells.

Discussion

Accumulating evidence supports the notion that the incidence and prevalence of AD are significantly influenced by environmental and nutritional factors. Many studies suggest that dysfunctional lipid homeostasis has a significant causative impact on the initiation and progression of AD (for review see Lukiw *et al.* 2005). Indeed, the most potent genetic risk factor identified for late-onset AD is apolipoprotein E, whose implication in lipid redistribution as well as in cholesterol homeostasis might be crucial for neuronal growth and survival. Numerous, although contradictory, data

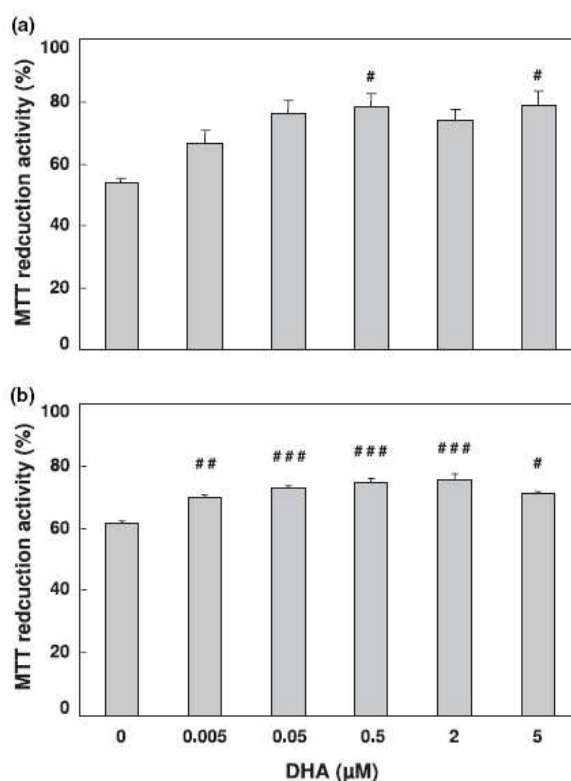


Fig. 8 Docosahexaenoic acid (DHA) protects Neuro2A neuroblastoma cells from soluble amyloid- β (A β)(1–40)-induced cytotoxic effects. (a) Cells were cultured for 48 h in medium enriched with DHA prior to exposure to 0.1 μ M non-fibrillar A β for 24 h. (b) Cells were allowed to differentiate into neurones in retinoic acid (RA)-containing media before and during DHA and A β treatments. Cell viability was monitored using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Data are expressed as means $\pm$ SEM, calculated from two independent experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle designated as 100%. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$, significantly different from A β (1–40)-treated cells.

have been reported regarding the association of cholesterol and AD (Ledesma and Dotti 2005). Recent studies (Abad-Rodriguez *et al.* 2004; Sponne *et al.* 2004), however, suggest that lipid composition is determinant for the biophysical properties of neuronal membranes, which could explain its close association with AD susceptibility and pathogenesis.

With this perspective, *n*-3 PUFAs have been demonstrated to play a crucial role in the CNS as a major lipidic constituent whose flexibility confers appropriate membrane viscosity, especially in neuronal synapses. The interest in dietary DHA supplementation has arisen with a view of protecting neurones from degeneration and subsequently preventing neurological disorders such as AD. Indeed, the risk of AD has been correlated with brain DHA deficiency (Söderberg

et al. 1991; Conquer *et al.* 2000; Tully *et al.* 2003) Recent *in vivo* studies have reported that reduction of dietary *n*-3 PUFA in the Tg2576 AD mouse model resulted in a loss of post-synaptic proteins and behavioural deficits, while a DHA-enriched diet could prevent these effects (Calon *et al.* 2004). In AD models, dietary DHA was shown to protect neurones from A β accumulation and toxicity and to ameliorate cognitive impairments (Hashimoto *et al.* 2002, 2005; Lim *et al.* 2005). This therefore provides a link between neuronal DHA homeostasis, AD pathogenesis and A β effects.

The present study describes the effects of DHA (22:6, *n*-3) on the susceptibility of rat embryonic cortical neurones in primary cultures to the toxicity of soluble oligomers of amyloid peptides. We demonstrate that DHA markedly promotes survival of primary neurones as well as that of Neuro2A neuroblastoma cells, but not oligodendrocytes, upon exposure to non-fibrillar A β peptides. DHA neuroprotection relies on various effects including prevention of cytoskeleton perturbation and caspase activation, two cellular hallmarks of neuronal apoptotic cell death. However, in our cellular model, DHA did not act by preventing the oxidative stress induced by soluble A β peptides in neurones, which differs from the antioxidant effects previously reported (Hashimoto *et al.* 2002; Sarsilmaz *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003). PUFAs, including EPA and DHA, are highly oxidizable, i.e. susceptible to lipid peroxidation (Montine and Morrow 2005), owing to the presence of their double bonds and *bis*-allylic positions in the fatty acyl chain (Wagner *et al.* 1994). At the concentration of 0.5 μ M which we used in neurone cultures, DHA tended to decrease neuronal GSH content and to increase HNE-protein adducts. Therefore, DHA-enriched membranes appear to be slightly more susceptible to oxidative threat, including that caused by exposure to soluble A β oligomers. An even more pronounced oxidative stress as evaluated by lower GSH contents (data not shown) could have resulted from A β treatment after overloading with 5 μ M PUFA, which could at least partly explain the lack of neuroprotection from A β toxicity observed at these PUFA concentrations. These results suggest a biphasic effect of DHA with opposed cellular effects, as already proposed by Véricel *et al.* (2003). This indicates that DHA supplementation is a delicate task that requires accurate optimization of the doses able to lead to clinically important benefits.

We also observed that DHA displayed its neuroprotective properties only after a pre-incubation period, allowing the fatty acid to be incorporated into cellular lipids prior to exerting its preventive effects on cell death upon soluble A β treatment. Similarly, DHA protection from serum starvation- and sphingosine-induced apoptosis could only be observed after enrichment of membrane, along with the modification of phospholipid patterns and primarily that of phosphatidylserine (Kishida *et al.* 1998; Kim *et al.* 2004; Hashimoto

et al. 2005). Interestingly, we observed that neurones were far more prone to DHA enrichment than were oligodendrocytes, suggesting a higher affinity or a more efficient incorporation process in neuronal cells that could at least partially explain the protective effects of DHA observed upon A β exposure. The lack of protection in oligodendrocytes might also result from the absence of functional DHA-sensitive survival pathways, which could alternatively suggest neurone-specific mechanisms. Nonetheless, DHA supplementation was reported to induce various functional consequences in other cell types and tissues (for review see Stillwell and Wassall 2003), which indicates that DHA tropism for neuronal cells is not exclusive.

The DHA protective effect could be observed with a dose as low as 0.5 μ M, lower than the concentrations reported to protect either rat hippocampal neurones from glutamate cytotoxicity (15 μ M, Wang *et al.* 2003), human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells exposed to oxidative stress (6.7 μ M, Mukherjee *et al.* 2004) or Neuro2A cells from staurosporine cytotoxicity (25 μ M, Akbar and Kim 2002). The efficacy and level of protection from soluble A β reported here indicate the high responsiveness of cortical neurones to DHA supplementation. This also suggests that, in addition to its essential requirement as a membrane constituent, DHA probably acts as a sensitive switch of major importance for modulating cell apoptosis and survival signalling pathways.

Due to its unique properties, DHA paucity or enrichment can affect biological membranes in their composition, biophysics and molecular architecture as well as in their functions, with a wide range of interactive functional outcomes, including differential gene expression (Puskás *et al.* 2003). DHA has also been demonstrated to be the precursor of neuroprotectin D1 that was shown to confer resistance to oxidative stress-induced apoptosis (Mukherjee *et al.* 2004). In addition, a more direct consequence of DHA phospholipid content could be the modification of signalling pathways. DHA was shown to promote phosphatidylserine accumulation in cell membranes of Neuro2A cells, thereby enhancing Raf-1 and Akt translocation/activation as well as the associated survival pathways (Akbar and Kim 2002; Akbar *et al.* 2005). We clearly demonstrate here that DHA prevented the soluble A β -mediated disappearance of the phosphorylated forms of ERK. By preserving the capacity of neurones to phosphorylate ERK1/2, DHA has proven its involvement in maintaining a sufficient rate of phosphorylated active proteins, thereby promoting essential survival pathways in neurones. Further experiments are underway to identify the protein(s) involved in the upstream antiapoptotic pathway(s) triggered by DHA enrichment in neurones.

Focusing on the architectural changes which PUFA enrichment could induce in neuronal plasma membrane, the most interesting hypothesis to explain the neuroprotective effects of DHA might concern its impact on the lipid rafts. DHA and PUFA enrichment are known to be accompanied

by lateral phase separation and local lipid redistribution, leading to membrane remodelling (Wassall *et al.* 2004), partial disorganization and selective protein displacement (Ma *et al.* 2004; Li *et al.* 2005). Lipid raft disorganization in neurones has been principally investigated in relation to loss of cholesterol, an essential lipid raft constituent. Subsequent protein displacement is associated with the reduced activity of plasmin, a serine protease able to degrade A β peptide, in AD brains (Ledesma *et al.* 2003) and with increased amyloidogenesis in hippocampal neurones (Abad-Rodriguez *et al.* 2004). Due to the poor affinity of cholesterol for PUFA, DHA-enriched phospholipids probably separate into distinct microdomains that reorganize the segregation of receptors and signalling proteins in favour of lateral changes of slippery platforms (Wassall *et al.* 2004). We hypothesize from our experiments that the neuronal signalling events implicated in survival pathways on the one hand and/or leading to soluble A β -induced apoptosis on the other hand might have been modulated due to the subtle changes in raft organization occurring upon DHA enrichment.

In summary, this study demonstrates that the essential *n*-3 fatty acid DHA provides cortical neurones with a higher resistance level to the cytotoxic effects induced by soluble A β oligomers. This is the first time that such protective properties have been reported at the cellular level with respect to the neurotoxicity of soluble A β peptide, i.e. a specific proximate factor implicated in the early molecular initiation of AD. Identification of the pathways involved may lead to the design of accurate strategies for dietary DHA supplementation aimed at efficiently preventing or delaying AD and perhaps also other neurodegenerative diseases.

Acknowledgements

This work was supported in part by Inserm and by grants from Aventis-Pharma (Vitry-sur-Seine, France), the Région Lorraine and the Communauté Urbaine du Grand Nancy.

References

- Abad-Rodriguez J., Ledesma M. D., Craessaerts K., Perga S., Medina M., Delacourte A., Dingwall C., De Strooper B. and Dotti C. G. (2004) Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J. Cell Biol.* **167**, 953–960.
- Akbar M. and Kim H.-Y. (2002) Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *J. Neurochem.* **82**, 655–665.
- Akbar M., Calderon F., Wen Z. and Kim H.-Y. (2005) Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 10 858–10 863.
- Aksenov M. Y. and Markesbery W. R. (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **302**, 141–145.
- Begni B., Brighina L., Sirtori E. *et al.* (2004) Oxidative stress impairs glutamate uptake in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 892–901.
- Calderon F. and Kim H. Y. (2004) Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **90**, 979–988.
- Calon F., Lim G. P., Yang F. *et al.* (2004) Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* **43**, 633–645.
- Conquer J. A., Tiemeijer M. C., Zecevic J., Bettger W. J. and Fisher R. H. (2000) Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids* **35**, 1305–1312.
- Drouot B., Pinçon-Raymond M., Chambaz J. and Pillot T. (1999) Laminin I attenuates β -amyloid peptide A β (1–40) neurotoxicity of cultured fetal rat cortical neurons. *J. Neurochem.* **73**, 742–749.
- Drouot B., Pinçon-Raymond M., Chambaz J. and Pillot T. (2000) Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 705–715.
- Ege C. and Lee K. Y. C. (2004) Insertion of Alzheimer's A β 40 peptide into lipid monolayers. *Biophys. J.* **87**, 1732–1740.
- Grant W. B., Campbell A., Itzhaki R. F. and Savory J. (2002) The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **4**, 179–189.
- Hashimoto M., Hossain S., Shimada T., Sugioka K., Yamasaki H., Fujii Y., Ishibashi Y., Oka J.-I. and Shido O. (2002) Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J. Neurochem.* **81**, 1084–1091.
- Hashimoto M., Tanabe Y., Fujii Y., Kikuta T., Shibata H. and Shido O. (2005) Chronic administration of docosahexaenoic acid ameliorates the impairment of spatial cognition ability in amyloid β -infused rats. *J. Nutr.* **135**, 549–555.
- Horrocks L. A. and Faroqui A. A. (2004) Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **70**, 361–372.
- Ikemoto A., Ohishi M., Sato Y., Hata N., Misawa Y., Fujii Y. and Okuyama H. (2001) Reversibility of *n*-3 fatty acid deficiency-induced alterations of learning behavior in the rat: level of *n*-6 fatty acids as another critical factor. *J. Lipid Res.* **42**, 1655–1663.
- Kalmijn S., van Boxtel M. P. J., Ocké M., Verschuren W. M. M., Kromhout D. and Launer L. J. (2004) Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology* **62**, 275–280.
- Kim H.-Y., Bigelow J. and Kevala J. H. (2004) Substrate preference in phosphatidylserine biosynthesis for docosahexaenoic acid containing species. *Biochemistry* **43**, 1030–1036.
- Kirkitadze M. D., Bitan G. and Teplow D. B. (2002) Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies. *J. Neurosci. Res.* **69**, 567–577.
- Kishida E., Yano M., Kasahara M. and Masuzawa Y. (1998) Distinctive inhibitory activity of docosahexaenoic acid against sphingosine-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1391**, 401–408.
- Kriem B., Sponne I., Fife A. *et al.* (2005) Cytosolic phospholipase A₂ mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid- β peptide. *FASEB J.* **19**, 85–87.
- Lauritzen L., Hansen H. S., Jørgensen M. H. and Michaelsen K. F. (2001) The essentiality of long chain *n*-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid Res.* **40**, 1–94.
- Ledesma M. D. and Dotti C. G. (2005) The conflicting role of brain cholesterol in Alzheimer's disease: lessons from the brain plasminogen system. *Biochem. Soc. Symp.* **72**, 129–138.
- Ledesma M. D., Abad-Rodriguez J., Galvan C., Biondi E., Navarro P., Delacourte A., Dingwall C. and Dotti C. G. (2003) Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep.* **4**, 1190–1196.

- Lepage G. and Roy C. C. (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* **27**, 114–120.
- Leroy P., Nicolas A., Thioudellet C., Oster T., Wellman M. and Siest G. (1993) Rapid liquid chromatographic assay of glutathione in cultured cells. *Biomed. Chromatogr.* **7**, 86–89.
- Li Q., Wang M., Tan L., Wang C., Ma J., Li N., Li Y., Xu G. and Li J. (2005) Docosahexaenoic acid changes lipid composition and IL-2 receptor signaling in membrane rafts. *J. Lipid Res.* **46**, 1904–1913.
- Lim G. P., Calon F., Morihara T., Yang F., Teter B., Ubeda O., Salem N. Jr, Frautschi S. A. and Cole G. M. (2005) A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J. Neurosci.* **25**, 3032–3040.
- Lukiw W. J., Pappolla M., Pelaez R. P. and Bazan N. G. (2005) Alzheimer's disease — A dysfunction in cholesterol and lipid metabolism. *Cell. Mol. Neurobiol.* **25**, 475–483.
- Ma D. W. L., Seo J., Davidson L. A., Callaway E. S., Fan Y.-Y., Lupton J. R. and Chapkin R. S. (2004) *n*-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *FASEB J.* **18**, 1040–1042.
- Montine T. J. and Morrow J. D. (2005) Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **166**, 1283–1289.
- Morris M. C., Evans D. A., Bienias J. L., Tangney C. C., Bennett D. A., Wilson R. S., Aggarwal N. and Schneider J. (2003) Consumption of fish and *n*-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **60**, 940–946.
- Mukherjee P. K., Marcheselli V. L., Serhan C. N. and Bazan N. G. (2004) Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 8491–8496.
- Pillot T., Drouet B., Queillé S., Labeur C., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Pinçon-Raymond M. and Chambaz J. (1999) The non-fibrillar amyloid β -peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J. Neurochem.* **73**, 1626–1634.
- Puskás L. G., Kitajka K., Nyakas C., Barceló-Coblijn G. and Farkas T. (2003) Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 1580–1585.
- Salem N. Jr, Litman B., Kim H. Y. and Gawrisch K. (2001) Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* **36**, 945–959.
- Sarsilmaz M., Songur A., Özyurt H., Kus I., Özen O. A., Özyurt B., Söğüt S. and Akyol Ö. (2003) Potential role of dietary ω -3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **69**, 253–259.
- Selkoe D. J. (1994) Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **53**, 438–447.
- Söderberg M., Edlund C., Kristensson K. and Dallner G. (1991) Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* **26**, 421–425.
- Sponne I., Fife A., Drouet B., Klein C., Koziel V., Pinçon-Raymond M., Olivier J.-L., Chambaz J. and Pillot T. (2003) Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid- β peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation. *J. Biol. Chem.* **278**, 3437–3445.
- Sponne I., Fife A., Koziel V., Oster T., Olivier J.-L. and Pillot T. (2004) Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of the amyloid- β peptide. *FASEB J.* **18**, 836–838.
- Stillwell W. and Wassall S. R. (2003) Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem. Phys. Lipids* **126**, 1–27.
- Tully A. M., Roche H. M., Doyle R., Fallon C., Bruce I., Lawlor B., Coakley D. and Gibney M. J. (2003) Low serum cholesterol ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study. *Br. J. Nutr.* **89**, 483–489.
- Véricel E., Polette A., Bacot S., Calzada C. and Lagarde M. (2003) Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 566–572.
- Wagner B. A., Buettner G. R. and Burns C. P. (1994) Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* **33**, 4449–4453.
- Wang X., Zhao X., Mao Z. Y., Wang X. M. and Liu Z. L. (2003) Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid on glutamate-induced cytotoxicity in rat hippocampal cultures. *Neuroreport* **14**, 2457–2461.
- Wassall S. R., Brzustowicz M. R., Shaikh S. R., Cherezov V., Caffrey M. and Stillwell W. (2004) Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chem. Phys. Lipids* **132**, 79–88.
- Yankner B. A. (1996) Mechanism of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* **16**, 921–932.
- Yehuda S., Rabinovitz S., Carasso R. L. and Mostofsky D. I. (2002) The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol. Aging* **23**, 843–853.

III. L'acide docosahexaénoïque induit-il un remodelage des microdomaines membranaires à l'origine de la neuroprotection vis-à-vis du peptide amyloïde- β soluble ?

1. Introduction

Dans la partie II du chapitre Résultats et Discussion, nous avons décrit que la toxicité *in vitro* du peptide A β soluble peut être considérablement diminuée lorsque les neurones ont été préalablement traités par des AGPI-lc de type ω 3. Nous avons constaté qu'en conséquence de cette supplémentation, les teneurs membranaires en DHA étaient significativement augmentées, suggérant que les membranes neuronales aient acquis des propriétés physicochimiques, structurales et/ou fonctionnelles différentes. Cependant, la concentration de l'AGPI-lc conduisant à la neuroprotection la plus élevée (0,5 μ M) n'induit pas d'augmentation mesurable de la teneur en DHA dans les phospholipides membranaires. Ceci n'écarte pas néanmoins la possibilité de remodelages locaux discrets, par exemple au niveau de microdomaines particuliers, liés à l'incorporation du DHA nécessaire à l'effet neuroprotecteur. Dans ces conditions, le DHA ne semble pas modifier les modalités de l'interaction entre le peptide A β soluble et la membrane plasmique du neurone. En effet, les mécanismes précoces de la neurotoxicité induite par l'exposition à ces oligomères, en particulier l'apparition d'un stress oxydant et l'activation de la voie des eicosanoïdes, restent globalement inchangés après traitement par le DHA (249). Par contre, la neuroprotection par le DHA est bien associée au blocage de l'activation des caspases, à la préservation du cytosquelette, au maintien de différentes voies de signalisation de survie cellulaire, telles que la voie PI3K/Akt et celles impliquant les protéines ERK1/2 et ERK5 ainsi qu'à l'inhibition de cascades pro-apoptotiques dont la voie p38/JNK. Ces voies de signalisation étant initiées au niveau de la membrane plasmique, elles dépendent en grande partie des propriétés architecturales membranaires. Les microdomaines membranaires décrits dans la partie Introduction de cette étude sont en particulier impliqués dans la régulation de ces signaux cellulaires. L'éventuelle perturbation de ces microdomaines par le peptide A β soluble pourrait en conséquence modifier la régulation des cascades énoncées ci-dessus. L'incorporation du DHA pourrait de même induire un remodelage (485, 699), atténuant en conséquence l'impact du peptide A β oligomérique sur les voies de signalisation associées à sa neurotoxicité.

2. Démarche expérimentale

Dans cette partie III du chapitre Résultats et Discussion, nous avons donc recherché des indices moléculaires permettant d'argumenter en faveur d'un éventuel remodelage des microdomaines membranaires par le peptide A β et par le DHA. L'intégrité des microdomaines membranaires a donc

été étudiée sur les neurones après les différents traitements. Pour ce faire, nous avons tout d'abord examiné les structures membranaires par microscopie. Puis, afin d'affiner les résultats ainsi obtenus, nous avons développé et optimisé un protocole de fractionnement permettant de séparer les différents domaines membranaires dont les rafts. Cette étape nous a permis d'étudier l'impact du peptide A β soluble sur les compositions lipidique et protéique des microdomaines purifiés à partir de la membrane neuronale. Elle nous a ainsi permis d'étayer l'hypothèse selon laquelle le remodelage membranaire induit par le peptide A β pourrait participer à l'initiation des cascades de signalisation proapoptotiques et à l'inhibition des voies de survie cellulaire. L'ensemble des résultats obtenus par les analyses microscopiques et biochimiques des microdomaines membranaires a également fourni des explications moléculaires reliant les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la membrane plasmique aux propriétés neuroprotectrices du DHA.

Remarque. Les résultats présentés ci-après ont été obtenus à la fin de ce travail de thèse. De ce fait et sauf indications contraires, la plupart n'ont pu être reproduits faute de temps et doivent donc être interprétés avec précaution. Toutefois, il nous a semblé intéressant de les présenter dans le cadre d'une réflexion globale ouvrant sur plusieurs perspectives possibles.

3. Résultats et discussion

3-1. Remodelages membranaires dans les neurones traités par le DHA

La clusterisation des flotillines au sein des membranes représente un élément déterminant de la formation des rafts dont elles constituent des marqueurs très largement utilisés dans la littérature (597). L'immunodétection des flotillines par microscopie en fluorescence permet donc une première approche de la structure des microdomaines membranaires. En utilisant cette approche, nous avons ciblé la flotilline-1 pour déterminer si l'exposition au peptide A β soluble affecte l'aspect microscopique des rafts et si cet impact peut être modulé en traitant préalablement les neurones par le DHA.

Les images obtenues mettent en évidence un marquage ponctiforme reflétant l'hétérogénéité structurale de la membrane neuronale et pouvant correspondre à la détection d'éléments discrets de la membrane plasmique, les microdomaines membranaires (figure 89). Les neurones corticaux présentent un marquage de la flotilline-1 au niveau du corps cellulaire et des prolongements, ce qui indique une distribution homogène des microdomaines membranaires le long de la membrane plasmique. Le traitement des neurones durant 48 h par 0,5 μ M de DHA induit une augmentation de la fluorescence liée à la flotilline-1. Cette augmentation peut traduire la constitution de plateformes membranaires supplémentaires et/ou une clusterisation des microdomaines pré-existants. Certains auteurs suggèrent en effet que la formation de ces microdomaines soit au moins en partie induite par un partage d'affinité résultant de l'incompatibilité stérique et physicochimique entre le cholestérol et les AGPI-lc ω 3 (699), même si l'incorporation du DHA et de l'EPA dans les rafts a été rapportée par ailleurs (485, 486).

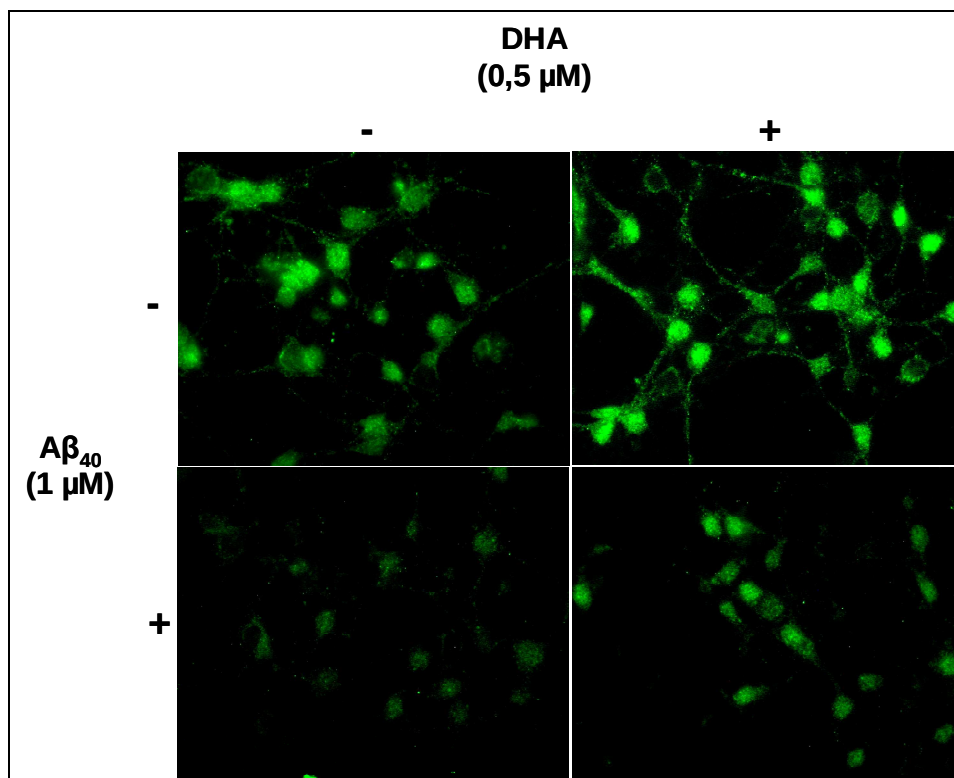


Figure 89. Immunodétection de la flotilline-1 dans les neurones

Les neurones corticaux ont été cultivés pendant 48 h dans un milieu supplémenté en DHA, avant d'être exposés pendant 24 h au peptide $A\beta_{40}$. (G x 90).

L'augmentation de la fluorescence liée à la flotilline-1 constatée après traitement par le DHA peut également être reliée aux propriétés neurotrophiques de l'AGPI observées dans la partie II du chapitre Résultats et Discussion. En effet, confirmant nos résultats sur la figure 61, il a été rapporté dernièrement que le traitement des neurones corticaux embryonnaires par le DHA induit une augmentation du nombre et de la longueur des prolongements, accompagnée d'une expression accrue de la protéine GAP-43 associée à la croissance axonale et à la formation des cônes de croissance (16). Ces informations doivent certainement être reliées à la propriété du DHA de préserver plusieurs protéines de signalisation (ERK1/2, ERK5, Akt) sous forme phosphorylée et donc de maintenir actives des voies de survie et de croissance cellulaire, comme nous l'avons détaillé dans la partie II du chapitre Résultats et Discussion. D'autre part, différents rapports récents indiquent que les flotillines interviennent dans la plasticité du cytosquelette et la génération de filopodes, déformations membranaires soutenues par un réseau dynamique de filaments d'actine et impliquées dans la formation des épines dendritiques à l'origine des nouveaux prolongements (321, 451). La formation des filopodes et des épines dendritiques est significativement réduite chez les patients atteints de pathologies neurodégénératives dont la MA (545). Toutes ces informations analysées dans leur ensemble permettent de corréler les propriétés neurotrophiques du DHA à son potentiel neuroprotecteur et apportent des arguments indéniables supplémentaires en faveur de l'intérêt du DHA dans la prévention de la MA.

L'augmentation de la fluorescence liée à la flotilline-1 peut éventuellement s'expliquer de 2 façons. Elle peut résulter d'un effet transcriptionnel du DHA et/ou d'éventuels métabolites, avec pour conséquence une biosynthèse accrue de protéines impliquées dans la constitution des rafts, dont les flotillines, même si à notre connaissance aucune donnée bibliographique ne peut étayer cette hypothèse. L'autre explication pourrait résider dans la mobilité de la flotilline-1 qui peut se relocaliser entre les endomembranes et la membrane plasmique, au contraire de la flotilline-2 qui, en raison de sa myristoylation irréversible, réside de façon permanente dans la membrane plasmique (321). Si l'on écarte provisoirement l'hypothèse d'une surexpression, l'aspect du marquage de la flotilline-1 et l'augmentation de la fluorescence pourraient aussi refléter une meilleure accessibilité de l'anticorps à la protéine lorsqu'elle se situe au niveau de la membrane plasmique. Ceci suggère donc que le DHA favorise le recrutement de la flotilline-1 et augmente le nombre de rafts en rapport avec la nécessité de croissance neuritique liée à l'effet neurotrophique de l'AGPI.

Contrairement au traitement par le DHA, l'exposition des neurones durant 24 h au peptide A β ₄₀ soluble induit une nette extinction de la fluorescence liée à la flotilline-1 qu'il est difficile d'expliquer, si ce n'est par un effet répresseur sur la transcription ou par une éventuelle dégradation de la protéine, 2 hypothèses non vérifiées mais qui pourraient aussi induire une désorganisation des microdomaines membranaires. Il est toutefois nécessaire de considérer que l'exposition au peptide A β pendant 24 h a induit une importante dégénérescence axonale qui peut également expliquer la diminution de fluorescence. Mais ce temps d'exposition nous a toutefois permis de montrer clairement que le prétraitement des neurones par le DHA empêche cet effet induit par le peptide A β (figure 89). Les mécanismes neuroprotecteurs du DHA pourraient donc reposer sur une membrane neuronale dont les microdomaines ont préservé ou acquis une architecture propice à leur rôle fonctionnel dans la signalisation de croissance et de survie cellulaire. Les relations structurales liant les rafts et le cytosquelette peuvent aussi suggérer que le maintien de l'intégrité des rafts, déduit de l'observation de la distribution de la flotilline-1, puisse être un élément explicatif de la préservation du cytosquelette constatée précédemment dans les neurones prétraités par le DHA.

L'effet du DHA sur la membrane plasmique neuronale et ses microdomaines a aussi été étudié après un marquage fluorescent du ganglioside GM1, enrichi dans les rafts, à l'aide de la toxine cholérique couplée à un fluorochrome. Réalisé sans perméabilisation, ce marquage ne met en évidence que les microdomaines de la membrane plasmique, ce qui explique l'effet de contour observé sur la figure 90. Les images obtenues après détection du GM1 diffèrent de façon notable de celles du marquage de la flotilline-1 (figure 89). En effet, alors que ce dernier présentait un aspect ponctiforme compatible avec la notion d'éléments membranaires discrets, la figure 90 montre plutôt un marquage homogène de la membrane neuronale. Cette différence reflète peut-être une hétérogénéité des rafts neuronaux, cohérente avec les données décrites dans la littérature. Ainsi, Mayor *et al.* (252) ont rapporté une distribution diffuse de la protéine Thy-1 le long de la membrane plasmique, mais une distribution ponctuelle de certaines protéines à ancre GPI telles que les récepteurs aux folates,

suggérant également l'existence de populations distinctes de rafts. Cette hétérogénéité pourrait même être favorisée en conséquence des modifications de la composition lipidique induites par l'incorporation du DHA dans les rafts (485). Contrairement aux images de la flotilline-1, le prétraitement par le DHA ne semble pas augmenter la fluorescence liée au GM1 (figure 90). Ce résultat renforce l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de fluorescence liée à la flotilline-1 sur les neurones traités par le DHA reflète le recrutement de cette protéine à la membrane plasmique en relation spécifique avec l'effet neurotrophique de l'AGPI. En revanche, les résultats obtenus à partir des neurones exposés au peptide $A\beta_{40}$ après traitement par le DHA renforcent l'hypothèse selon laquelle l'AGPI favorise le maintien des structures riches en GM1 que les oligomères d' $A\beta$ semblent faire disparaître simultanément à l'importante dégénérescence axonale observée.

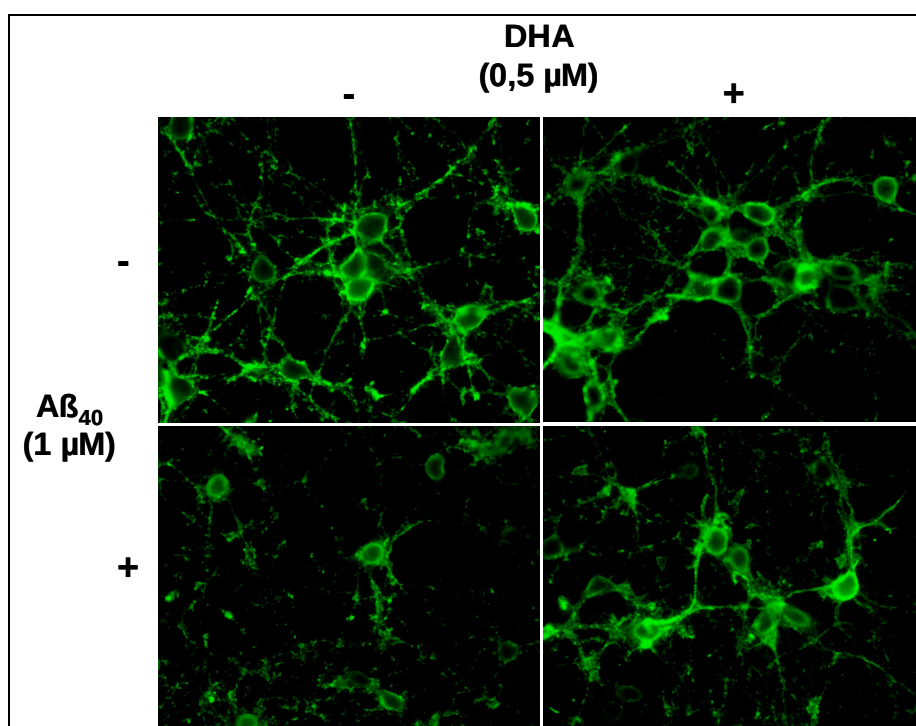


Figure 90. Immunodétection du ganglioside GM_1 à la surface des neurones

Les neurones corticaux ont été cultivés durant 48 h dans un milieu supplémenté en DHA, avant d'être exposés durant 24 h au peptide $A\beta_{40}$. Les lames ont été observées à l'aide d'un objectif à immersion à huile ($G \times 90$). L'effet neuroprotecteur observé a été reproduit sur 3 cultures indépendantes.

Ces résultats préliminaires devront être confirmés sur des neurones exposés au peptide $A\beta$ durant des temps plus courts pour limiter l'étendue de la dégénérescence axonale observée après 24 h. Une analyse plus fine devra aussi être envisagée par microscopie confocale pour définir si les microdomaines membranaires, ou leurs protéines constitutives comme les flotilline-1 et -2, subissent effectivement une relocalisation, par exemple des endomembranes vers la membrane plasmique neuronale, en conséquence du traitement par le DHA.

Les résultats de l'examen microscopique des microdomaines membranaires permettent d'envisager que le DHA induit des mécanismes de remodelage membranaire sur lesquels reposent sans doute les effets neurotrophiques et neuroprotecteurs de l'AGPI. La nature des modifications membranaires impliquées et les mécanismes moléculaires qui les permettent restent toutefois à définir. La suite de cette étude se propose de suivre différents marqueurs, lipidique et protéiques, dans les différentes fractions membranaires extraites et purifiées à l'aide d'un protocole que nous avons optimisé.

3-2. Étude structurale et fonctionnelle des microdomaines membranaires

3-2-1. Extraction et purification des rafts

Afin de mieux évaluer les éventuels remodelages de l'architecture membranaire induits par les traitements par le peptide A β soluble et le DHA, nous avons mis au point un protocole d'extraction, de fractionnement et de purification des microdomaines membranaires. Ce protocole a été optimisé à partir de celui décrit par Ledesma *et al.* (463). Il repose sur les propriétés physicochimiques des microdomaines membranaires, en particulier leur résistance à l'extraction en présence de Triton X-100 et leur faible densité leur permettant de « flotter » dans un gradient de saccharose. Le protocole résumé sur la figure 91 comprend 2 étapes d'ultracentrifugation, la première pour isoler les membranes après une lyse cellulaire mécanique en milieu hypotonique, et la seconde pour en extraire les différents microdomaines.

Ce protocole a ensuite été validé par l'identification des différents microdomaines membranaires purifiés. Pour cela, nous avons recherché la présence de divers marqueurs spécifiques des régions ordonnées ou des régions fluides de la membrane plasmique dans les 10 fractions obtenues après ultracentrifugation. Des aliquots de chaque fraction ont donc été utilisés afin de détecter par immunoblot d'une part la flotilline-1 et la SNAP-25, marqueurs des rafts, et d'autre part le rTf (récepteur de la transferrine), marqueur des régions fluides. Le cholestérol, particulièrement abondant dans les rafts, a aussi été dosé dans les différentes fractions. Les résultats ainsi obtenus ont permis de caractériser ces fractions (figure 92).

La recherche des marqueurs cholestérol, flotilline-1 et SNAP-25 nous a conduits à des résultats parfaitement cohérents entre eux, desquels nous avons pu déduire que les rafts des neurones témoins sont retrouvés dans les fractions de faibles densités 3 et 4, et en faible proportion dans la fraction 5. Par contre, la fraction 8, également enrichie en flotilline-1 et en cholestérol, pourrait correspondre à des microdomaines distincts, de haute densité, illustrant l'hétérogénéité de ces structures membranaires évoquée ci-dessus. Mis en évidence par différents auteurs (238, 559, 613), ces microdomaines présentent un rapport protéines/lipides élevé en raison de leur implication comme points d'ancrage au cytosquelette. Cette différence s'explique notamment par la présence des protéines fodrine, F-actine, α -actinine,

vimentine, myosine et supervilline. Un modèle a été proposé, dans lequel ces plateformes permettraient une relation dynamique entre ces microdomaines membranaires et le cytosquelette, autorisant ainsi le remodelage et la redistribution des portions de membrane riches en cholestérol (559).

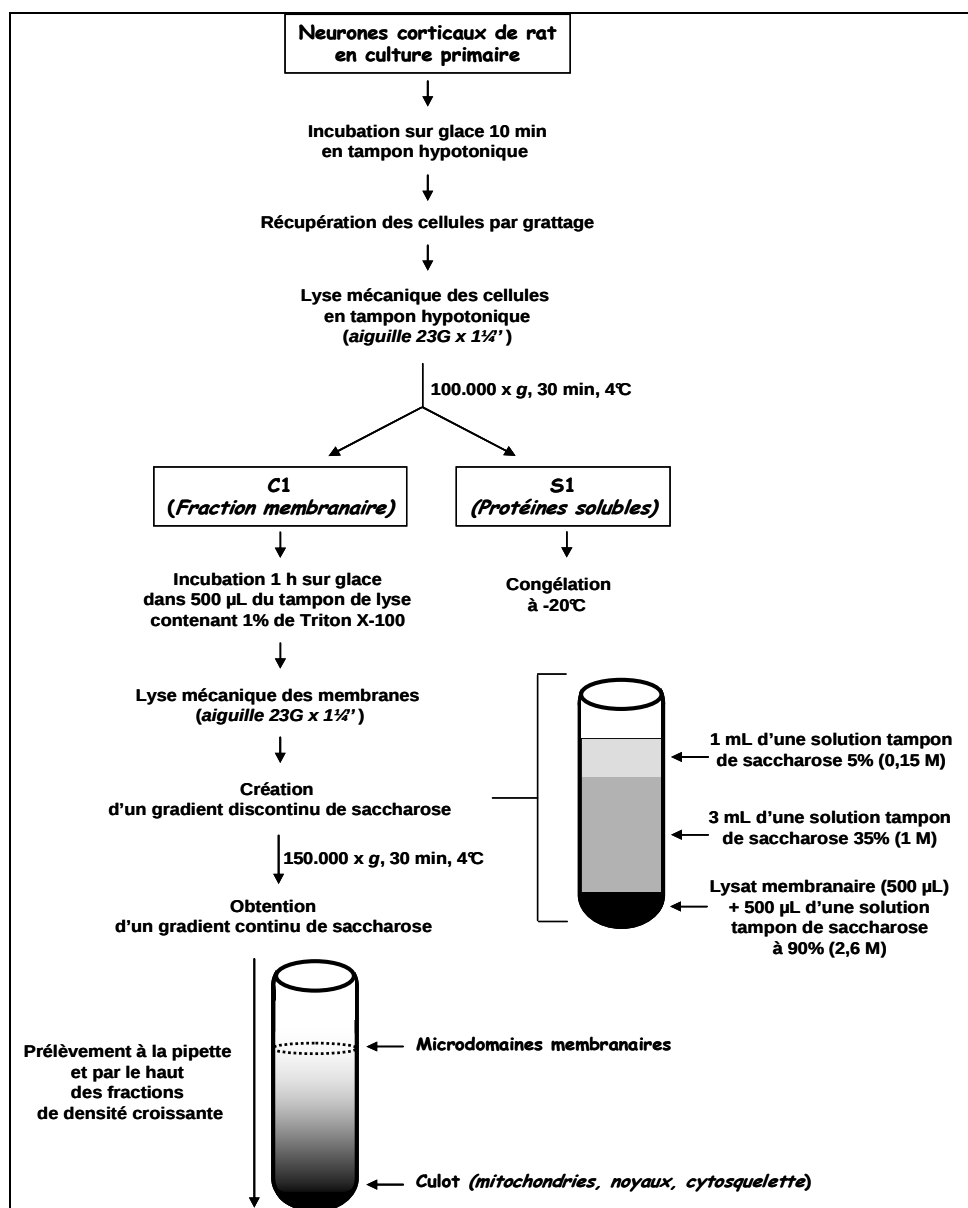


Figure 91. Protocole mis au point pour la purification des microdomaines membranaires

Enfin, le rTf, considéré comme localisé principalement dans les régions fluides des membranes biologiques (596, 597), a été détecté de façon peu spécifique dans les fractions 4 à 10, suggérant que des portions de régions fluides des membranes se dispersent le long du gradient de saccharose en fonction de leur densité.

Le protocole que nous avons optimisé permet donc d'extraire et de purifier efficacement différentes fractions membranaires parmi lesquelles la fraction 3 que nous considérons contenir les rafts des neurones témoins et qui focalisera l'essentiel de notre attention dans la suite de cette étude.

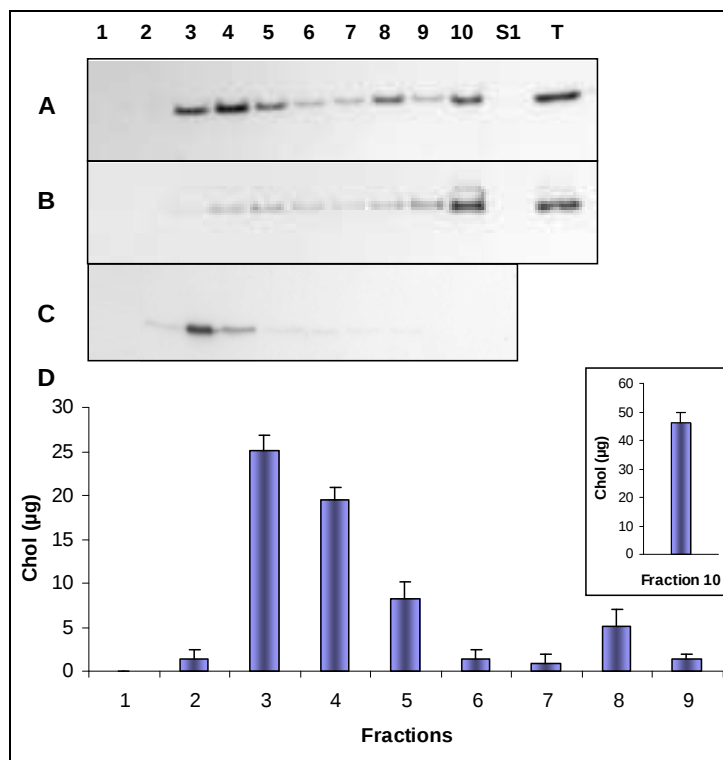
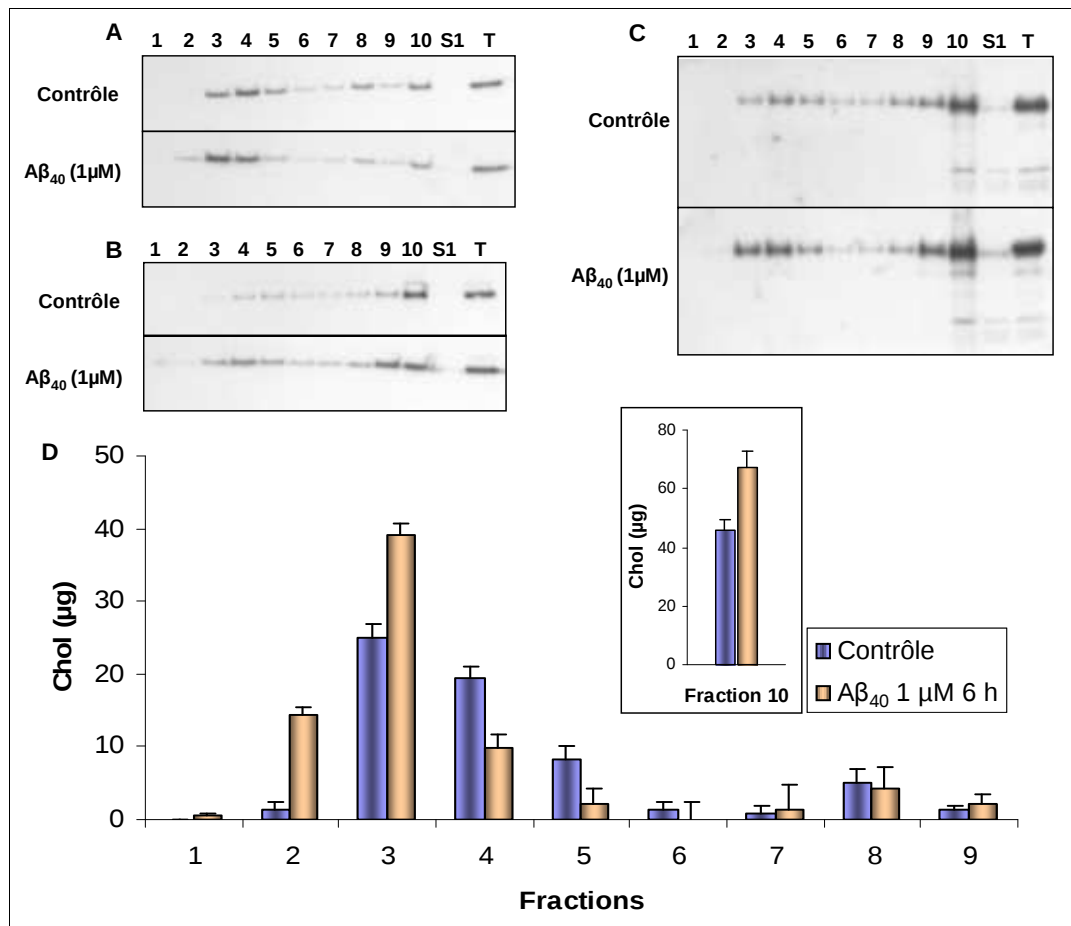


Figure 92. Caractérisation des fractions membranaires des neurones témoins
A, immunodétection de la flotilline-1 ; B, rTf ; C, SNAP-25 ; D, distribution du cholestérol
 Les pistes 1 à 10 correspondent aux fractions récupérées par ultracentrifugation. La piste S1 correspond à la fraction écartée après la 1^{ère} ultracentrifugation et la piste T au lysat cellulaire total.

3-2-2. Perturbation des rafts par le peptide amyloïde- β soluble

Nous avons vu précédemment que la neurotoxicité du peptide $A\beta_{40}$ soluble semble s'exprimer en altérant la membrane au niveau des rafts, comme nous l'avons déduit de l'examen microscopique des neurones après marquage de la flotilline-1 ou du GM_1 . Nous avons donc étudié la distribution des marqueurs des rafts dans les différentes fractions membranaires purifiées à partir des neurones exposés pendant 6 h par 1 μM de peptide $A\beta_{40}$ soluble. Nous avons cette fois opté pour un temps d'exposition plus court afin de limiter les dommages axonaux et la mort apoptotique observés après 24 h.

Le traitement des neurones par le peptide $A\beta$ soluble modifie la distribution de la flotilline-1 et du cholestérol qui se sont relocalisés pour se concentrer dans les fractions de plus faibles densités (figure 93). Ce déplacement confirme l'hypothèse d'une modification des microdomaines par les oligomères d' $A\beta$ suggérée par les marquages de la flotilline-1 et du GM_1 montrés précédemment. Cette hypothèse est également confortée par le fait que les fractions 3 et 4, supposées renfermer l'essentiel des rafts, apparaissent alors nettement moins pures, à en juger par la contamination par le rTf, indiquant clairement que le peptide $A\beta$ soluble altère effectivement la composition des rafts. En revanche, les résultats suggèrent que nous puissions écarter l'éventualité d'un effet transcriptionnel ou d'une dégradation de la flotilline-1 après exposition de 6 h au peptide $A\beta$ soluble.



La redistribution protéique et lipidique suggérée par ces premiers résultats peut aussi être argumentée par l'analyse de la distribution de la protéine APP, rapportée dans la littérature comme majoritairement (95%) extérieure aux rafts lorsqu'elle est maturée selon la voie non amyloïdogène (142, 338, 745). Alors que cette dernière est majoritairement présente dans les fractions membranaires 8, 9 et 10 des neurones témoins, c'est-à-dire les fractions de haute densité, le peptide Aβ₄₀ soluble induit visiblement une relocalisation d'APP dans les rafts modifiés (figure 93). De façon intéressante, cette relocalisation s'accompagne de l'apparition de produits de clivage protéolytique apparus sous la forme d'au moins une protéine immunoréactive supplémentaire de masse moléculaire plus faible. Ces produits résultent peut-être du clivage par les caspases ou par les enzymes de la voie amyloïdogène concentrées dans les rafts (745). Ces résultats suggèrent que l'exposition des neurones au peptide Aβ soluble puisse favoriser le clivage de l'APP, favorisant alors éventuellement l'amyloïdogenèse et la mort neuronale en conséquence. L'explication moléculaire de la relocalisation d'APP et son implication éventuelle dans la neurotoxicité du peptide Aβ feront l'objet d'une autre étude.

Les résultats décrits dans la partie II du chapitre Résultats et Discussion nous ont permis de montrer par microscopie en fluorescence qu'un traitement des neurones par le peptide A β ₄₀ soluble induit une inhibition de la phosphorylation d'Akt, synonyme d'inactivation de la voie de survie cellulaire PI3K/Akt. Des données bibliographiques suggèrent qu'Akt soit phosphorylée au sein des rafts (223) et qu'une altération de ceux-ci puisse induire une inhibition de la voie de survie cellulaire associée. Nous avons donc regardé si les modifications structurales des rafts induites par le peptide A β concernent aussi la distribution d'Akt (sans distinction du statut phosphorylé).

Les résultats obtenus suggèrent un relocalisation de la protéine Akt dans les rafts, comme en témoigne l'intensité accrue des signaux détectés correspondant à cette protéine dans les fractions membranaires 3 et 4 (figures 94A et 94B), sans variation significative de la quantité totale d'Akt après traitement par le peptide A β . Cette relocalisation s'apparente visiblement à une séquestration, au moins transitoire, d'Akt dans les rafts, puisqu'elle est corrélée à la diminution du pool d'Akt phosphorylée active décrite par la figure 86.

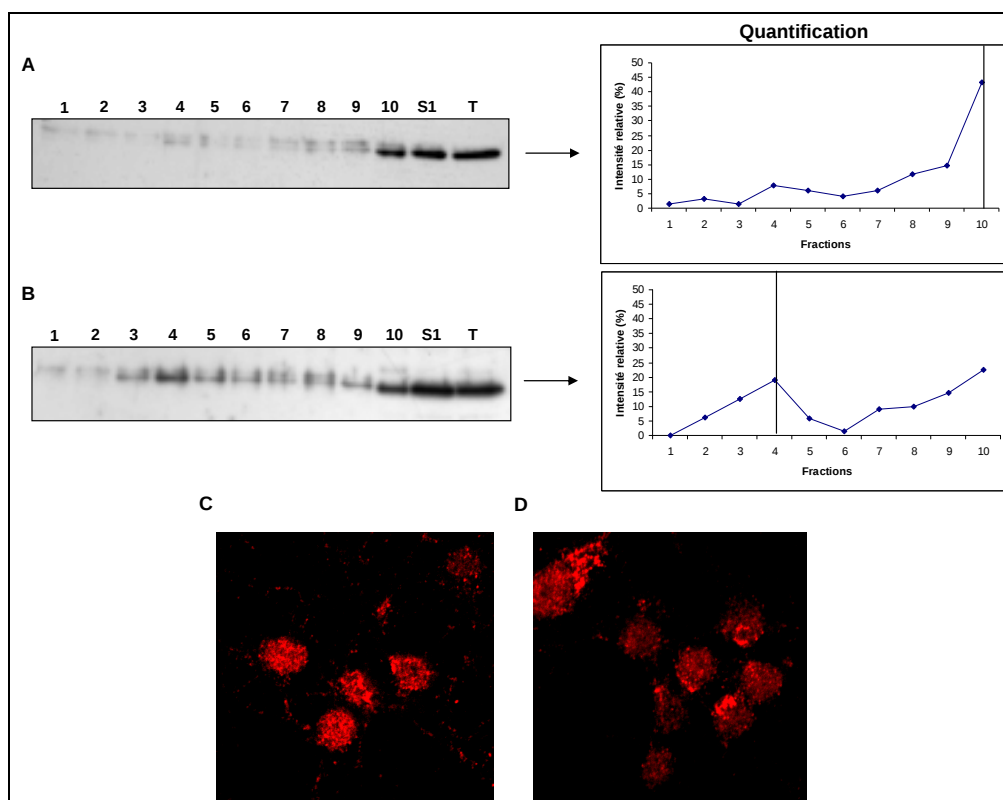


Figure 94. Redistribution de la protéine Akt dans les neurones exposés au peptide A β soluble *A et C, neurones témoins ; B et D, neurones traités durant 6 h par 1 μ M de peptide A β ₄₀.* La quantification correspond à l'intensité du signal détecté mesurée par analyse densitométrique. Les pistes 1 à 10 correspondent aux fractions séparées par ultracentrifugation. La piste S1 correspond à la fraction écartée après la 1^{ère} ultracentrifugation et la piste T au lysat cellulaire total.

Mais nos résultats sont en désaccord avec les données bibliographiques qui suggèrent plutôt qu'Akt subisse une activation dans les rafts. Les travaux de Zundel *et al.* (798) pourraient toutefois expliquer ces résultats apparemment contradictoires. Ces auteurs ont en effet montré que l'activation de l' α -SMase induit, par la production de céramides, une perturbation des rafts conduisant à l'inhibition de la voie de

transduction PI3K/Akt en conséquence d'une séquestration de la PI3K par la Cav-1. Celle-ci possède en effet un domaine d'assemblage que de nombreux auteurs ont impliqué dans la régulation et l'inhibition de différentes cascades de signalisation cellulaire (271, 481, 636). Or, dans la partie I du chapitre Résultats et Discussion, nous avons démontré que l'activation des SMases est impliquée dans la neurotoxicité des peptides A β solubles. Il est donc possible que dans notre modèle expérimental aussi, les perturbations des rafts que nous avons mises en évidence favorisent la séquestration de la PI3K et/ou d'Akt dans les rafts. Toutefois, la flotilline-1 peut elle aussi être impliquée dans des phénomènes de séquestration grâce à son domaine de recrutement reconnu par diverses protéines de signalisation cellulaire (83).

Outre la relocalisation dans les rafts, la protéine Akt semble rejoindre l'espace périnucléaire dans les neurones traités par le peptide A β oligomérique, comme en témoignent les images de microscopie confocale (figures 94C et 94D). La signification de cet effet reste à définir, mais il pourrait s'agir d'un effet de séquestration dans les membranes des vésicules périnucléaires. Les raisons d'une telle relocalisation restent toutefois obscures.

Plusieurs études suggèrent que les rafts, et en particulier les gangliosides qu'ils renferment, représentent des plateformes de réception du peptide A β soluble permettant son oligomérisation et sa fibrillation (412). Certains auteurs ont ainsi mis en évidence la formation d'adduits A β -GM₁ favorisant le changement de conformation nécessaire au passage du peptide de la forme soluble à la forme fibrillaire (785). En revanche, peu d'études ont cherché à évaluer l'impact du peptide A β soluble sur un éventuel remodelage des microdomaines membranaires. Nos résultats, obtenus par microscopie en fluorescence, immunodétection de marqueurs spécifiques dans les différentes fractions membranaires et analyse de la distribution du cholestérol, convergent pour indiquer que le peptide A β soluble induit une perturbation des rafts. Ces résultats encore préliminaires permettent d'envisager un scénario moléculaire dans lequel les oligomères d'A β interagissent avec la membrane plasmique, entraînant directement ou non une modification de l'architecture membranaire conduisant à la mise en place de signaux pro-apoptotiques et à l'inhibition de voies de survie cellulaire. Nous avons ainsi pu constater que dans les neurones traités par le peptide A β soluble, la protéine Akt semble relocalisée et séquestrée dans les membranes, en particulier dans les rafts, tandis que la proportion de la forme phosphorylée active d'Akt est diminuée. Ces observations suggèrent que la voie de survie PI3K/Akt soit effectivement inhibée en conséquence des perturbations induites dans la membrane plasmique des neurones exposés au peptide A β soluble. Ce phénomène de relocalisation et séquestration pourrait concerner d'autres protéines de signalisation et être directement responsable, au moins partiellement, de la neurotoxicité du peptide A β .

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus et les données bibliographiques disponibles nous ont conduits à proposer une représentation schématique du scénario complexe impliqué dans la toxicité neuronale du peptide A β , incluant les perturbations membranaires et leurs possibles conséquences en parallèle aux atteintes évoquées précédemment, parmi lesquelles le stress oxydant, l'activation de la cPLA $_2$ et la conversion de la SM en céramides (Figure 95).

Les images obtenues à l'aide de marqueurs fluorescents des rafts dans la membrane des neurones suggèrent que le potentiel neuroprotecteur du DHA repose sur le maintien et/ou l'acquisition de microdomaines dont les rôles structural et fonctionnel sont préservés au profit d'une architecture et d'une composition optimales. La suite de ce travail vise donc à déterminer l'impact d'un enrichissement en DHA sur la structure et la fonctionnalité de ces plateformes de signalisation cellulaire.

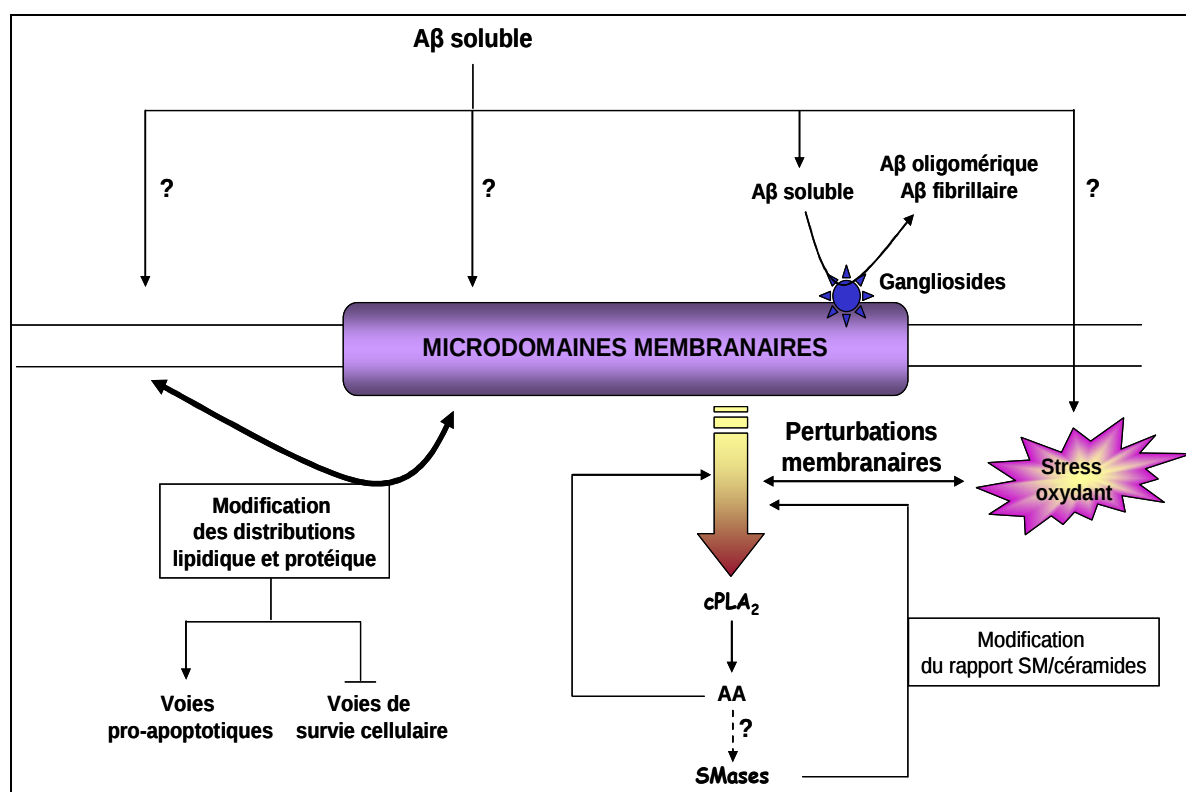


Figure 95. Perturbations membranaires induites par le peptide A β soluble

3-2-3. Impact de l'incorporation de l'acide docosahexaénoïque sur les rafts

La grande majorité des données bibliographiques relatives aux propriétés physicochimiques du DHA suggèrent que cet AG encombrant d'un point de vue stérique soit majoritairement localisé à l'extérieur des rafts, c'est-à-dire dans les portions fluides de la membrane plasmique. Certains auteurs proposent même que l'incompatibilité physicochimique entre les AGPI- ω 3 et le cholestérol soit un moteur de la formation des microdomaines, suggérant ainsi un rôle fort de ces AGPI et en particulier du DHA dans l'organisation et le maintien de l'architecture membranaire (699, 700). Les résultats préliminaires

obtenus par microscopie en fluorescence semblent effectivement suggérer que l'incorporation du DHA permette de prévenir les perturbations membranaires induites par le peptide $A\beta_{40}$ soluble. Nous avons donc étudié si un traitement par le DHA lui-même peut influencer sur les rafts. Pour cela, nous avons comparé la distribution du cholestérol dans les fractions membranaires purifiées à partir des neurones exposés au peptide $A\beta_{40}$ soluble après traitement ou non par le DHA. Préalablement à cette étude, le cholestérol a été dosé sur les lysats cellulaires totaux de façon à vérifier que les traitements ne modifient pas le métabolisme ou le statut du cholestérol dans les neurones, comme cela a notamment été mis en évidence dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 dans lesquelles l'EPA et le DHA sont capables d'inhiber l'enzyme HMGR (213).

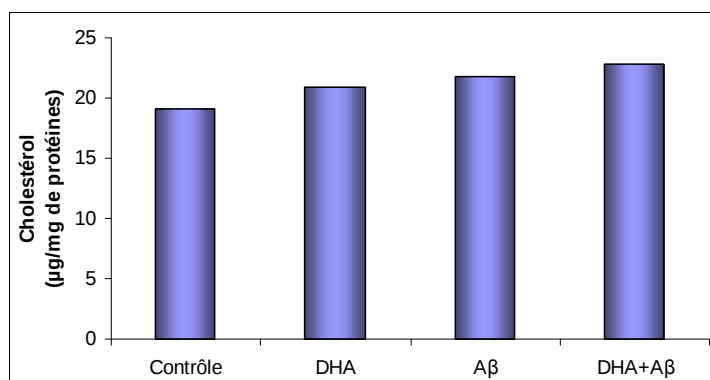


Figure 96. Dosage du cholestérol dans les lysats cellulaires

Les neurones corticaux ont été cultivés durant 48 h dans un milieu contenant du DHA, avant d'être traités par le peptide $A\beta_{40}$ pendant 6 h.

Les résultats présentés par la figure 96 ne mettent en évidence aucune variation significative du taux de cholestérol dans les neurones soumis aux différents traitements. Cette vérification effectuée, nous avons alors étudié la distribution du cholestérol dans les fractions membranaires purifiées.

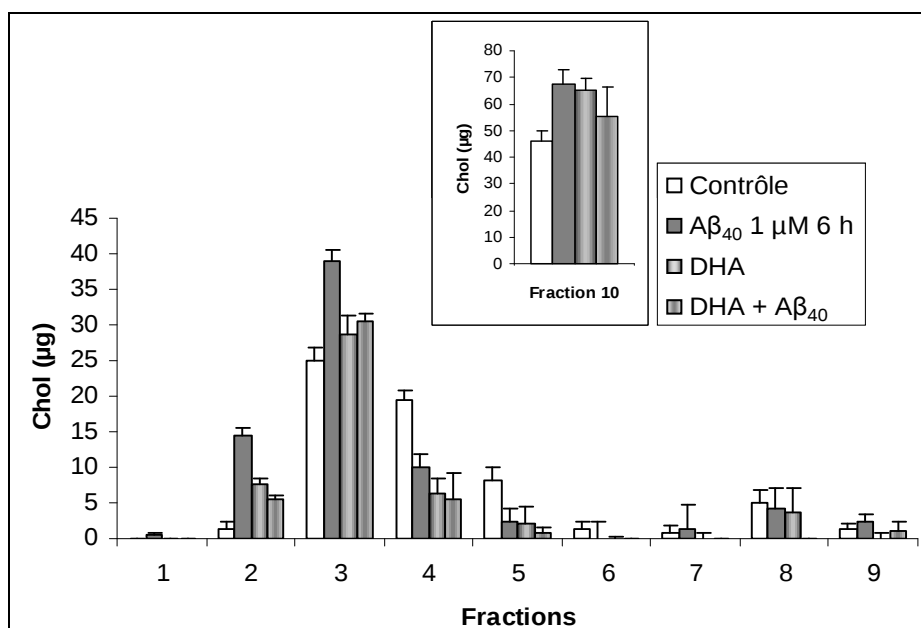


Figure 97. Distribution du cholestérol dans les fractions membranaires

Les neurones corticaux ont été cultivés durant 48 h dans un milieu contenant du DHA, avant d'être traités par le peptide $A\beta_{40}$ pendant 6 h.

Tandis que le peptide A β induit un déplacement du cholestérol vers les fractions de moindre densité, le prétraitement des neurones par le DHA semble limiter ce déplacement (figure 97). Cet effet est particulièrement clair pour la fraction 3, précédemment identifiée comme celle renfermant les rafts. Cette observation conforte l'hypothèse d'un maintien de l'architecture membranaire par le DHA. La fraction 8, renfermant probablement des rafts de haute densité associés au cytosquelette, ne fait en revanche l'objet d'aucune perturbation significative après exposition au peptide A β_{40} ou traitement par le DHA. Ceci paraît en contradiction avec nos hypothèses relatives à l'importance des microdomaines dans la plasticité du cytosquelette et déduite des résultats de marquage de la flotilline-1. Nous avons donc poursuivi cette caractérisation en étudiant la distribution de la flotilline-1 dans les fractions.

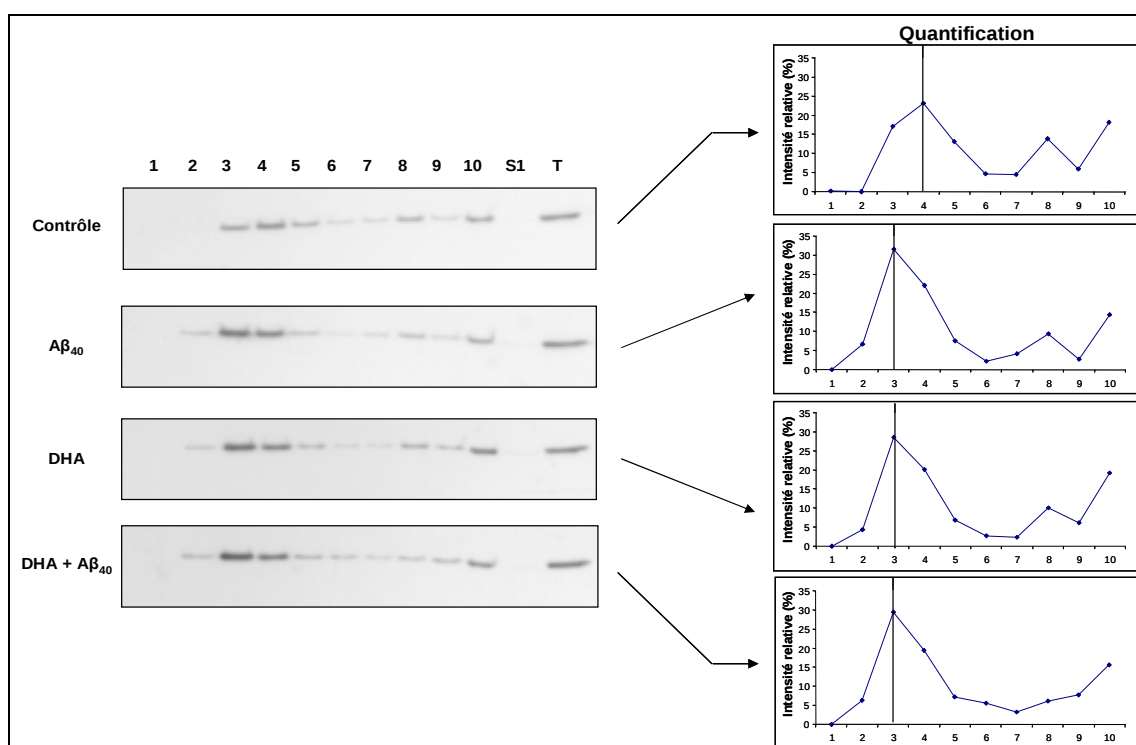


Figure 98. Distribution de la flotilline-1 dans les fractions membranaires

La quantification correspond à l'intensité du signal détecté mesurée par analyse densitométrique. Les pistes 1 à 10 correspondent aux fractions séparées par ultracentrifugation. La piste S1 correspond à la fraction écartée après la 1^{ère} ultracentrifugation et la piste T au lysat cellulaire total.

Contrairement à l'effet constaté sur le cholestérol, le DHA n'empêche pas le déplacement de la flotilline-1 induit par le peptide A β soluble vers les fractions de moindre densité. Comme nous l'avons déjà remarqué lors de l'analyse microscopique, le DHA lui-même exerce un effet propre sur la distribution de la flotilline-1. Nous avons proposé ci-dessus que la flotilline-1 soit impliquée dans les réorganisations du cytosquelette nécessaires à la croissance dendritique et associées aux propriétés neurotrophiques du DHA. Nous aurions alors pu attendre une augmentation, ou au moins une conservation, de la quantité de flotilline-1 détectée dans la fraction 8, ce que n'indiquent pas nos résultats. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre les raisons qui

justifie la redistribution de cette protéine et l'augmentation de l'intensité du marquage correspondant constaté dans les neurones traités par le DHA (figure 84). Quoi qu'il en soit, il est clair désormais que cette augmentation n'est pas due à un effet transcriptionnel de l'AGPI, puisque le niveau de la protéine détecté par immunoblot semble équivalent dans tous les lysats totaux (figure 98).

Nous avons aussi remarqué qu'après exposition au peptide A β , les fractions renfermant les rafts sont « contaminées » par les portions fluides de la membrane, à en juger par l'élargissement de la distribution du rTf. Ceci semble donc conforter l'hypothèse d'une désorganisation structurale des rafts activant en conséquence une signalisation pro-apoptotique. Nous avons donc voulu regarder si le DHA peut empêcher cet effet (figure 99).

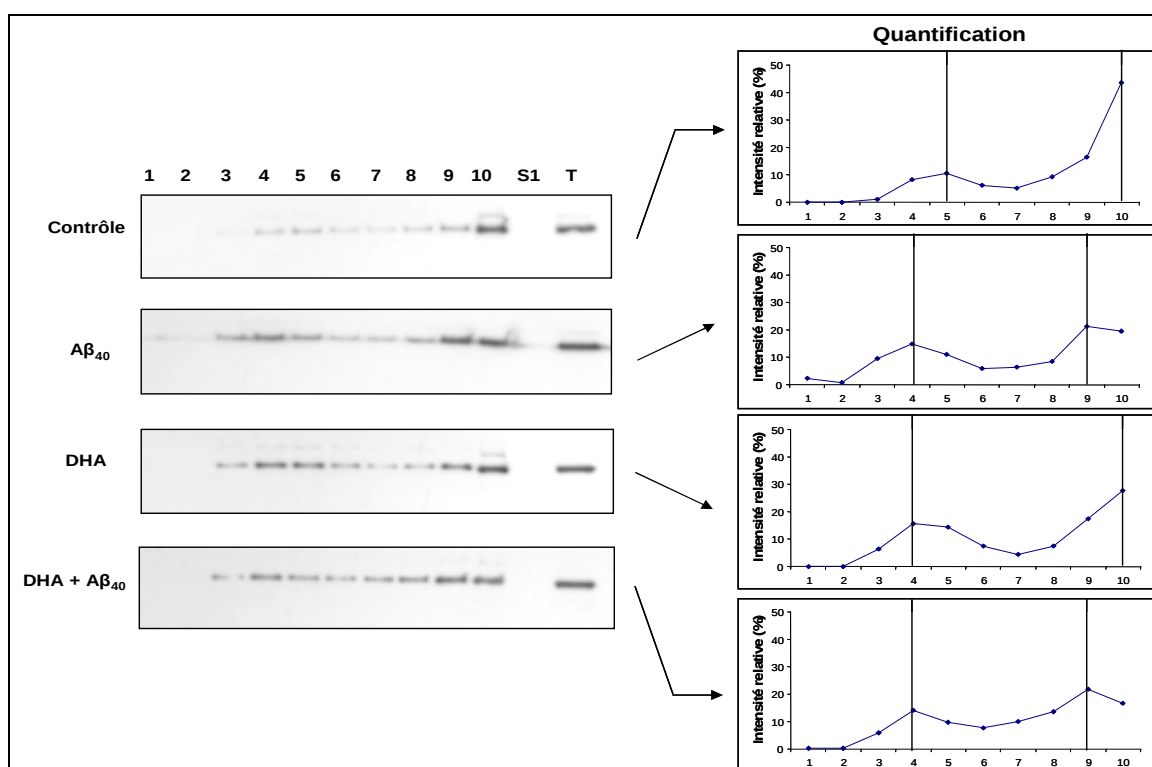


Figure 99. Distribution du rTf dans les fractions membranaires

La quantification correspond à l'intensité du signal détecté mesurée par analyse densitométrique. Les pistes 1 à 10 correspondent aux fractions séparées par ultracentrifugation. La piste S1 correspond à la fraction écartée après la 1^{ère} ultracentrifugation et la piste T au lysat cellulaire total.

Comme nous l'avons noté pour la flotilline-1, le DHA ne semble pas empêcher les perturbations de la distribution du rTf induite par le peptide A β . Toutefois, les fractions 3 et 4 semblent présenter un niveau de rTf plus faible quand les neurones ont été préalablement traités par le DHA qui a lui-même la capacité de relocaliser le rTf pour une distribution plus homogène entre les différentes fractions membranaires. Mais une nouvelle fois, pour le rTf comme pour la flotilline-1, l'exposition au peptide A β soluble ne semble induire aucune relocalisation supplémentaire au sein des membranes des neurones prétraités par le DHA. L'AGPI induit donc un remodelage membranaire qui, au vu des conséquences sur la viabilité des neurones, est forcément différent de celui induit par le peptide, ce

que les marqueurs que nous avons suivis ne parviennent hélas pas à démontrer ici. Mais ce remodelage induit par le DHA semble faire adopter à la membrane une configuration structurale et fonctionnelle plus stable, rendant peut-être ainsi le neurone plus résistant aux oligomères d'A β .

Il est certain que des interprétations définitives sur la notion d'intégrité des membranes neuronales, des rafts en particulier, sont impossibles à formuler sans approfondir davantage ces investigations préliminaires. Les marqueurs que nous avons étudiés ne sont sans doute pas les plus pertinents et il faudra en suivre d'autres, lipidiques ou protéiques. Des expériences de co-marquage associées à la microscopie confocale devront également être conduites pour apporter des éclaircissements utiles sur les relocalisations suspectées en réponse aux traitements par le DHA et le peptide A β oligomérique.

L'ensemble des résultats de l'analyse des microdomaines membranaires nous a permis de constater qu'une exposition au peptide A β soluble induit, dans les neurones corticaux de rat en culture primaire, des perturbations structurales et fonctionnelles des rafts, visibles par microscopie en fluorescence et caractérisées par la redistribution de différents marqueurs biochimiques au sein de la membrane. Les analyses microscopiques réalisées sur les neurones prétraités par le DHA semblent indiquer que l'effet neuroprotecteur du DHA pourrait être porté par un mécanisme de maintien de l'architecture membranaire. Celui-ci pourrait être relié aux propriétés neurotrophiques de l'AGPI qui imposent la présence effective dans les rafts de récepteurs de facteurs de croissance et de neurotrophines, ainsi que de diverses protéines responsables de la transduction des signaux associés. Toutefois, ces résultats, suggérés par l'analyse de la distribution en cholestérol dans les fractions membranaires purifiées, ne semblent pas pleinement confirmés par l'analyse de la distribution des marqueurs flotilline-1 et rTf. Une analyse fonctionnelle est à présent nécessaire, associée à l'étude de la distribution de récepteurs de facteurs de croissance ou de protéines de signalisation comme Akt au sein des membranes traitées par le DHA. La représentation proposée précédemment pour schématiser les perturbations induites par le peptide A β a été modifiée en tenant compte de ces derniers résultats (figure 100). Même s'ils sont encore préliminaires, les résultats que nous présentons dans cette étude indiquent de façon non équivoque néanmoins que la membrane neuronale représente bien une étape déterminante dans le mode d'action et les effets antagonistes de chacun de ces composés. Nous avons démontré que le peptide A β soluble interagit avec la membrane plasmique en perturbant les rafts, avec de multiples conséquences fonctionnelles convergeant vers l'apoptose et pouvant expliquer la perte neuronale associée aux phases précoces de la MA.

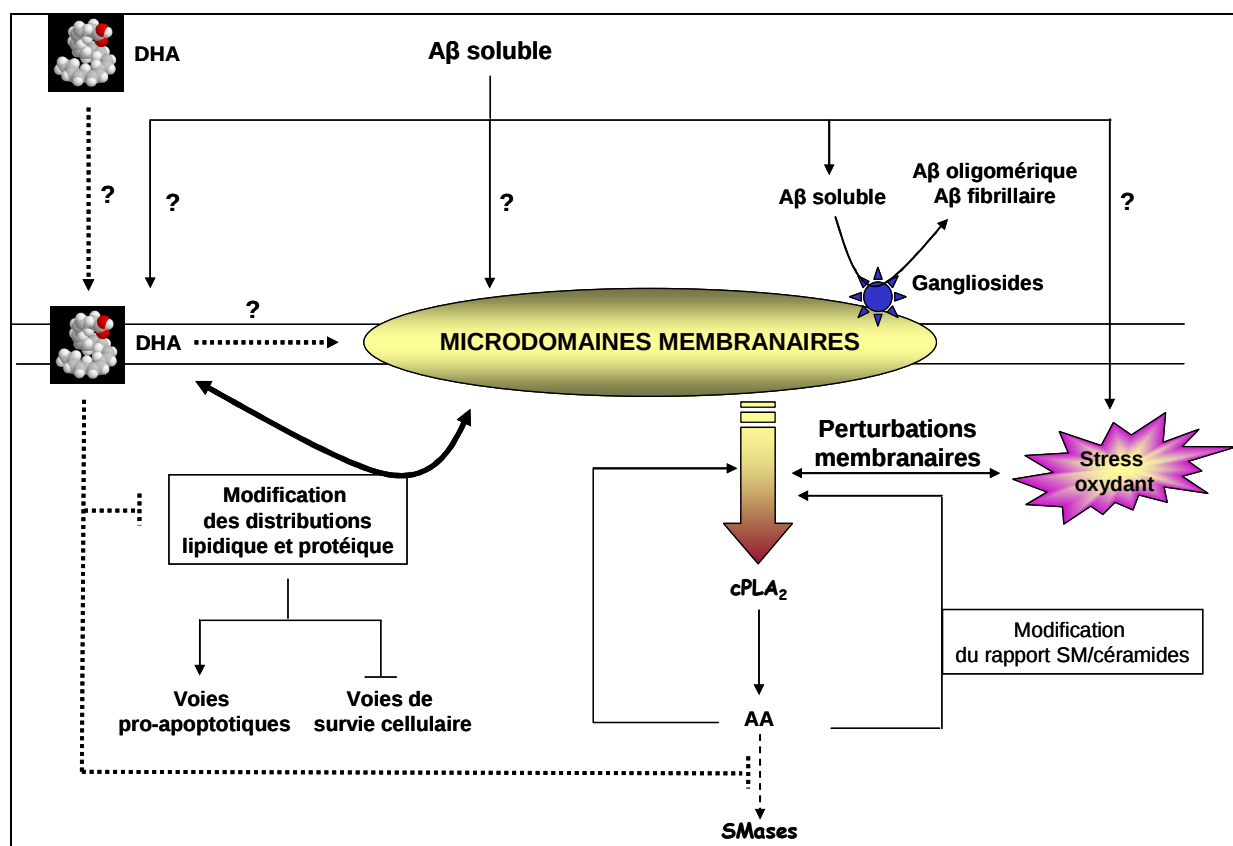
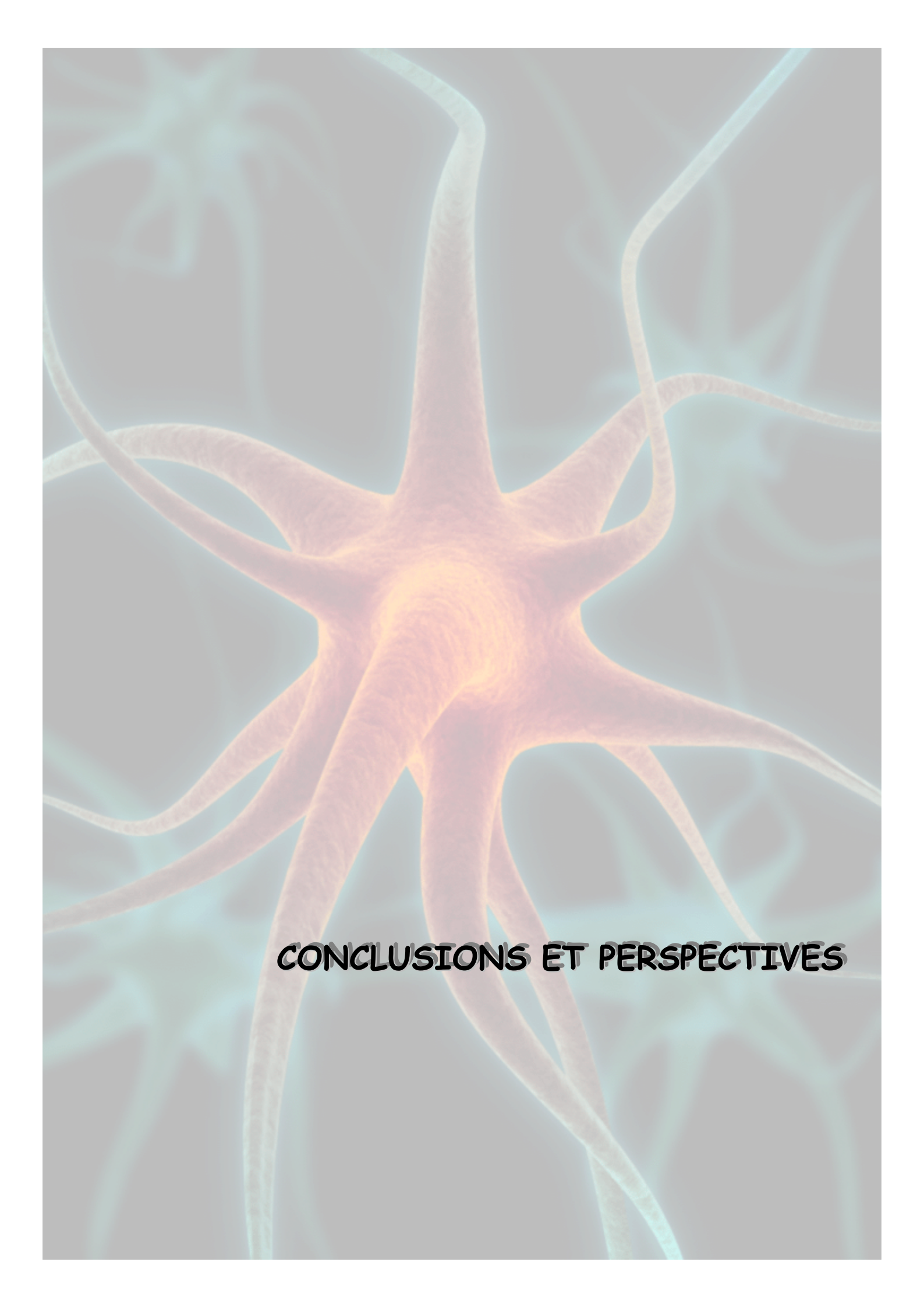


Figure 100. Mécanismes de neuroprotection impliquant le DHA contre le peptide Aβ soluble

Nos résultats apportent également la preuve que le DHA aussi modifie de façon significative l'organisation de la membrane neuronale, à une concentration de 0,5 μM à laquelle aucun enrichissement significatif des phospholipides n'a pourtant pu être mesuré, mais que nous savons largement suffisante pour protéger les neurones contre la toxicité du peptide Aβ soluble après l'incorporation de l'AGPI. En considérant que les neurones corticaux embryonnaires de rat, très pauvres en AGPI- $\omega 3$, représentent un modèle *in vitro* pertinent pour étudier la dégénérescence neuronale lors des phases précliniques de la MA, nous pensons raisonnable de proposer le scénario suivant. L'incorporation du DHA induit un remodelage membranaire approprié et sans doute nécessaire à l'expression des propriétés neurotrophiques de l'AGPI. Entre autres conséquences de ce remodelage, la membrane plasmique se présente alors avec une organisation, une architecture et une composition nouvelles ne semblant pas empêcher que les oligomères d'Aβ puissent interagir avec elle puisque ne prévenant ni le stress oxydant, ni la libération d'AA. Mais ce remodelage abaisserait considérablement les seuils de sensibilité et de vulnérabilité des neurones en préservant l'efficacité des voies de signalisation assurant la survie cellulaire.

Ces mécanismes pourraient expliquer de façon très cohérente à la fois le rôle essentiel du DHA dans le développement et la maturation du SNC et l'intérêt nutritionnel de suppléments en AGPI- ω 3 ou en huiles de poisson en prévention de la MA et d'autres maladies neurodégénératives. Mais les mécanismes moléculaires mis en jeu par le DHA, notamment ceux impliqués dans le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique, et sans doute sa réorganisation subtile, restent encore à définir.



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La MA est une démence neurodégénérative progressive à prédominance corticale qui, en premier lieu, affecte les fonctions cognitives en empêchant l'acquisition de nouveaux souvenirs et se répercute sur le comportement et l'adaptation sociale des patients. Elle est caractérisée par différentes atteintes neuronales causées, au moins en partie, par le peptide A β . Les formes solubles de ce peptide semblent impliquées dans les troubles des fonctions synaptique et neuronale observés dans les phases précliniques lors du développement de la MA. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces différentes atteintes cellulaires et tissulaires précoces n'ont pas encore été clairement définis.

Plusieurs travaux dont ceux de notre équipe ont identifié certains des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort neuronale induite par le peptide A β soluble. Ainsi, l'interaction des oligomères solubles de peptide A β avec la membrane plasmique des neurones induit différents mécanismes, dont la perturbation de l'homéostasie calcique, l'activation d'une voie pro-inflammatoire, la génération d'un stress oxydant et l'altération du cytosquelette, concourant tous à la mort cellulaire programmée. Les objectifs fixés pour ce travail ont été de poursuivre cette caractérisation mécanistique en examinant l'influence du statut lipidique des membranes neuronales sur la neurotoxicité du peptide A β soluble et en évaluant l'implication de certains médiateurs lipidiques dans les cascades de signalisation pro-apoptotique induites.

Nous nous sommes donc focalisés sur l'étude des modifications structurales de la membrane suite à une exposition au peptide A β soluble. Nous avons plus particulièrement analysé le statut lipidique et protéique des microdomaines membranaires. Ces domaines ou rafts présentent un état ordonné, conditionné par l'organisation des lipides et des protéines associées. Ils sont, entre autres, le support de plateformes de signalisation et régulent de nombreux processus cellulaires.

Nos travaux ont permis de montrer qu'en interagissant avec la membrane plasmique, le peptide A β soluble induit effectivement des perturbations structurales des rafts et des membranes en général, mises en évidence par une redistribution du cholestérol et des protéines marqueurs des régions raft, la flotilline-1, et non raft, les rTf et APP (Résultats et Discussion, partie III). Les conséquences de la relocalisation de la protéine APP dans les rafts n'ont pas été étudiées dans ce travail, mais pourraient inclure une modification du métabolisme de l'APP se répercutant sur les effets neurotoxiques générés par le peptide A β .

L'exploration des perturbations de la membrane plasmique sur les voies de signalisation de survie cellulaire a permis de constater également la relocalisation durable de la protéine Akt dans les rafts (Résultats et Discussions, partie III). La diminution concomitante de la forme phosphorylée active d'Akt (Résultats et Discussions, partie II) suggère que la voie de survie cellulaire PI3K/Akt soit inopérante dans les neurones exposés au peptide A β soluble.

La suite de ce projet devra préciser les conditions de relocalisation de la protéine Akt dans les rafts par des expériences de co-marquage en microscopie confocale. Nous devons aussi étudier les interactions éventuelles entre Akt et des protéines d'assemblage présentes au sein des microdomaines membranaires pour confirmer l'hypothèse qu'elle est bien séquestrée. Dans ce contexte, les protéines flotilline et cavéoline seront suivies en priorité en raison de leur implication décrite dans l'inhibition de différentes voies cellulaires par un mécanisme analogue. L'étude devra évidemment être élargie à d'autres protéines de signalisation dont l'activité est potentiellement modulée par leur interaction avec des facteurs membranaires. Il s'agit là notamment des protéines ERK1/2 et ERK5, dont la disparition des formes phosphorylées actives est associée à la mort apoptotique des neurones exposés au peptide A β soluble (Résultats et Discussions, partie II). Enfin, il nous faudra aussi étudier si des protéines spécifiques des terminaisons synaptiques, SNAP-25 par exemple, sont redistribuées, ce qui serait alors associé au dysfonctionnement de la synapse et expliquer en partie la dégénérescence axonale constatée.

Sachant l'influence déterminante de la composition des membranes sur la signalisation cellulaire, il est aisé de concevoir que l'incorporation d'AGPI-lc ω 3 puisse avoir des conséquences structurales et fonctionnelles sur la croissance et la survie. Les membranes neuronales acquièrent alors des avantages en accord avec le rôle de ces AGPI, du DHA surtout, dans le développement et la maturation du SNC et des cellules rétinienne, comme le rapporte une littérature de plus en plus fournie. Les neurones corticaux embryonnaires de rat en culture primaire montrent une composition en AG distincte de celle mesurée dans le cortex de rat adulte, avec un déficit notable en DHA analogue à celui décelé chez les patients atteints de la MA. Nous disposons donc là d'un modèle approprié pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le rôle du DHA sur le SNC lors de la néo-neurogenèse comme dans la prévention contre la dégénérescence neuronale induite par le peptide A β .

Un enrichissement membranaire très significatif en DHA a été mesuré dans les neurones cultivés en présence de DHA libre, mais aussi dans une moindre mesure en EPA libre ou en PL de saumon riches en DHA estérifié (Résultats et Discussion, partie II). Du point de vue de leur morphologie, les neurones cultivés en présence d'AGPI-lc ω 3 présentent des prolongements plus nombreux et plus épais. Ceci suggère que ces AGPI, capables aussi de stimuler la croissance de cellules Neuro2A de neuroblastome, soient doués de propriétés neurotrophiques qui pourraient être associées à un enrichissement membranaire en DHA. Toutefois, la concentration de 0,5 μ M de DHA conduisant aux effets les plus marqués ne semble induire aucun enrichissement notable des membranes neuronales, même dans les PS et les PE, les phospholipides les plus enrichis en DHA après supplémentation par des concentrations plus élevées d'AGPI ω 3. Nous proposons donc que l'effet du DHA repose sur des modifications discrètes et locales de la composition lipidique membranaire, mais pouvant tout de même entraîner des conséquences fonctionnelles.

L'analyse des fractions membranaires indique un statut lipidique et protéique modifié dans les neurones traités par 0,5 μ M de DHA durant 48 h, avec notamment une relocalisation de la flotilline-1

dans les rafts qui pourrait être liée aux propriétés neurotrophiques du DHA (Résultats et Discussion, partie III). Celles-ci résulteraient alors d'une réorganisation membranaire capable de favoriser l'émergence de nouveaux prolongements, impliquant une recomposition des rafts et une redistribution des protéines d'ancrage et de signalisation nécessaires à leur intégrité et donc à la croissance et à la survie neuronales. Ceci souligne la versatilité de la membrane plasmique et l'importance de son organisation dans la régulation des voies de signalisation intracellulaire initiées à son niveau.

Pour la première fois, nous avons démontré qu'un prétraitement de 48 h par le DHA protège les neurones de la toxicité des oligomères solubles de peptide A β . L'effet constaté semble nécessiter l'incorporation de l'AGPI, soulignant l'importance de la réorganisation membranaire évoquée ci-dessus. Ces modifications n'empêchent toutefois pas le peptide A β soluble d'interagir avec la membrane, même si une analyse plus fine est nécessaire pour définir si des partenaires différents sont impliqués. En effet, le DHA protège les neurones sans pouvoir prévenir les événements précoces induits par le peptide A β , notamment le stress oxydant et la libération de l'AA. Par contre, le prétraitement par le DHA préserve l'intégrité du cytosquelette neuronal et diminue l'activation des SMases et des caspases (Résultats et Discussion, partie II). La réorganisation induite par le DHA semble doter la membrane neuronale de nouvelles propriétés architecturales et fonctionnelles qui contribuent à préserver l'activité des voies de signalisation de croissance et de survie cellulaires et à inhiber des voies pro-apoptotiques dont celles initiées par le peptide A β (Résultats et Discussion, partie II).

La modulation de ces voies pourrait donc être liée à l'impact de l'incorporation du DHA sur la composition et l'intégrité des plateformes de signalisation dans les microdomaines membranaires. Dans cette perspective, nous avons optimisé un protocole de purification de membranes synaptiques (synaptosomes) qui nous permettra d'évaluer isolément la sensibilité des domaines membranaires des synapses à l'enrichissement en DHA. L'acquisition prochaine d'un système associant une chromatographie liquide et un spectromètre de masse nous dotera de moyens analytiques adaptés à l'analyse fine de la composition lipidique des membranes. Nous pourrons alors caractériser les espèces lipidiques concernées et identifier le compartiment ou le domaine membranaire qui bénéficie le plus de la supplémentation en DHA. Des études en parallèle seront menées sur la distribution des protéines membranaires impliquées dans la signalisation modifiée en réponse à l'exposition au peptide A β soluble sans ou après traitement par l'AGPI.

La caractérisation des mécanismes moléculaires sur lesquels reposent les propriétés neurotrophiques et le potentiel neuroprotecteur du DHA nécessitera aussi d'évaluer l'influence d'éventuels effets transcriptionnels, par exemple en comparant les effets sur les synaptosomes dépourvus de ce type de régulation. De même, la contribution de médiateurs issus du métabolisme du DHA devra être estimée, par exemple à l'aide de stratégies antisens ou d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant les enzymes impliquées. Ces modes d'action du DHA ne peuvent en effet être écartés, puisque la plus faible concentration de DHA testée, 5 nM, conduit quasiment au niveau maximal de

neuroprotection vis-à-vis du peptide A β soluble mesuré à 0,5 μ M (Résultats et Discussion, partie II). Il est donc très vraisemblable qu'interviennent aux concentrations nanomolaires d'autres processus que celui d'une modification physique de la membrane et que nous n'avons pas encore abordés. Des réactions de biotransformation du DHA et/ou l'activation de voies de signalisation spécifiques pourraient alors intervenir durant le délai de 48 h nécessaire pour une protection maximale. Il nous faudra donc étudier cet aspect essentiel pour expliquer l'efficacité très élevée que nous avons constatée, en abordant aussi la question de la biodisponibilité de l'AGPI et les modalités de son incorporation dans les neurones.

L'intervention des lipides comme médiateurs a été étudiée dans la signalisation cellulaire pro-apoptotique induite par l'interaction des oligomères d'A β avec la membrane neuronale. Ce travail s'est appuyé sur des études de notre équipe ayant rapporté que l'activation précoce de la cPLA₂ est un événement déterminant de la neurotoxicité du peptide A β soluble, à l'origine d'une voie pro-apoptotique et d'une cascade pro-inflammatoire liées à la libération d'AA.

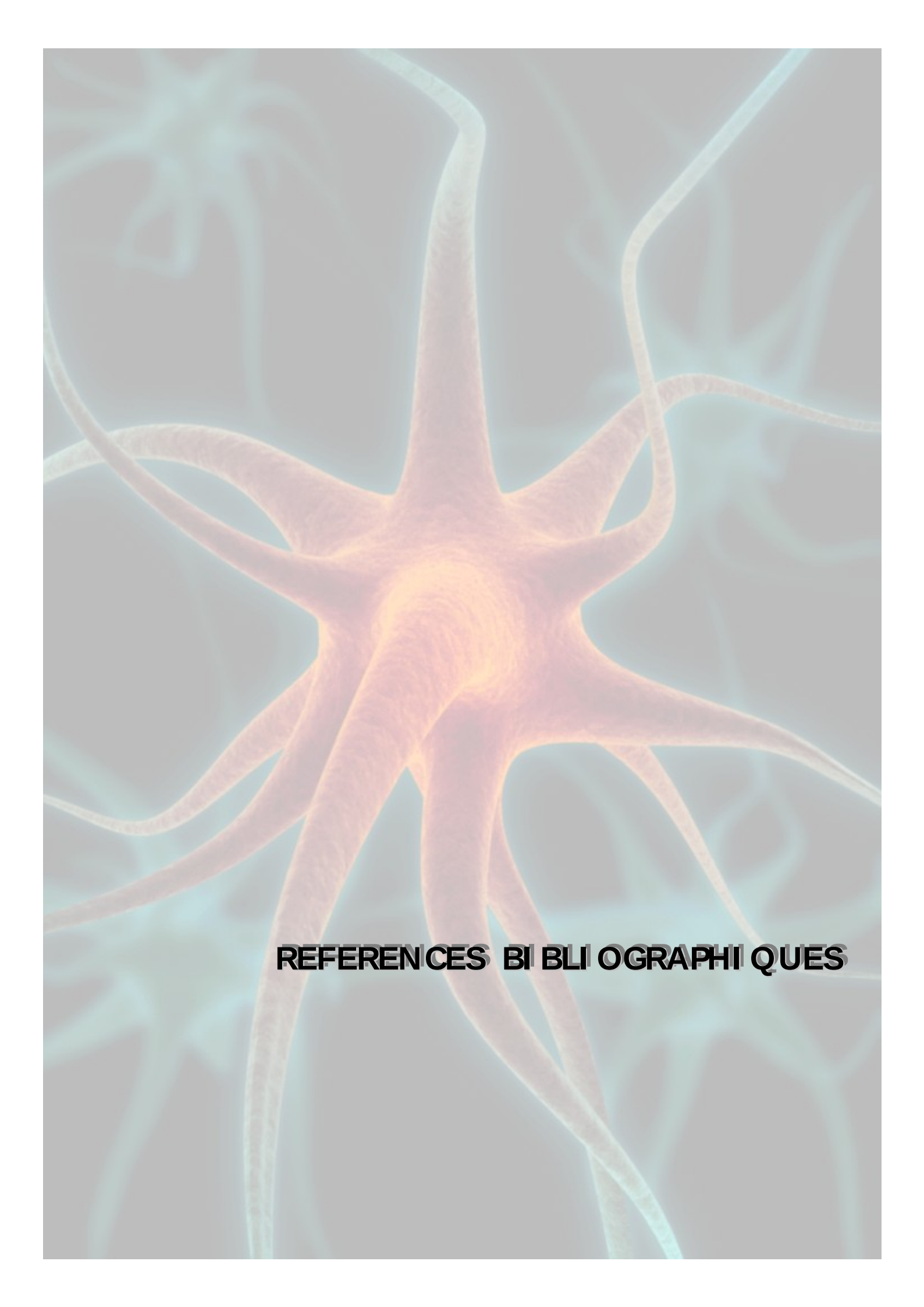
La participation de cette voie métabolique dans la neurotoxicité du peptide A β soluble a été précisée en établissant la toxicité induite par l'exposition directe des cultures à l'AA, entraînant en conséquence l'activation des SMases et la production de céramides apoptogènes (Résultats et Discussion, partie I). Cette voie semble pouvoir être rompue par l'inhibition de la conversion de l'AA en PG ou LT, en accord avec l'utilisation d'agents anti-inflammatoires préconisée par certains auteurs pour le traitement de la MA. Enfin, nos résultats apportent des arguments supplémentaires expliquant la présence de céramides et l'activation des caspases dans le cerveau des patients atteints de la MA.

La description de la voie pro-apoptotique cPLA₂ – SMases – caspases soulève de nombreuses questions sur l'importance de la cPLA₂ dans la neurotoxicité du peptide A β soluble. Tous les intermédiaires lipidiques impliqués n'étant pas encore identifiés, il nous paraît indispensable de définir en priorité l'importance des eicosanoïdes. Une approche mécanistique devra être entreprise, pour laquelle nous pourrions profiter notamment de la lignée de souris transgénique cPLA₂^{-/-}. Les premiers résultats démontrent que les neurones n'exprimant pas la cPLA₂ sont significativement protégés de l'exposition *in vitro* au peptide A β soluble. De façon cohérente, les souris cPLA₂^{-/-} conservent des capacités de mémorisation et d'apprentissage supérieures à celles des souris sauvages après injection intracérébrale de peptide A β soluble. Ces premiers résultats soulignent l'importance de la voie dépendante de l'AA dans l'apoptose neuronale et l'apparition des troubles cognitifs lors des phases précoces de la MA.

La cascade moléculaire ainsi définie désigne le métabolisme des sphingolipides et plus particulièrement les SMases comme des cibles potentielles pour le développement de molécules et de stratégies thérapeutiques dans le traitement de la maladie. Dans ce contexte, la S1P est une molécule prometteuse, ses propriétés anti-apoptotiques reposant à la fois sur l'inhibition de l'a-SMase et sur la modulation des effets pro-apoptotiques des céramides. Le potentiel neuroprotecteur de la S1P vis-à-vis du peptide

A β soluble a pu être vérifié par nos études *in vitro* et *in vivo*, confirmant très clairement que la SMase représente une cible thérapeutique potentielle (Résultats et Discussion, partie I). Ces travaux devront être poursuivis dans l'objectif d'identifier le(s) récepteur(s) impliqué(s) dans l'action de la S1P.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse nous a permis d'établir de façon incontestable l'importance des lipides dans la sensibilité des neurones au peptide A β soluble, confirmant les nombreuses relations rapportées dans la littérature entre le statut lipidique et les risques d'apparition de la MA. De l'influence sur l'organisation membranaire à l'effet protecteur des sphingolipides en passant par la synthèse de médiateurs neurotoxiques, l'implication des lipides dans la régulation des voies de signalisation cellulaire souligne l'intérêt de déterminer les mécanismes moléculaires auxquels ils participent pour concevoir des approches préventives ou thérapeutiques susceptibles de prévenir la MA ou d'en ralentir l'évolution.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABAD-RODRIGUEZ, J., LEDESMA, M. D., CRASSAERTS, K., PERGA, S., MEDINA, M., DELACOURTE, A., DINGWALL, C., DE STROOPER, B. and DOTTI, C. G. (2004). Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J. Cell Biol.* **167**, 953-960.
2. ABRAHA, A., GHOSHAL, N., GAMBLIN, C., CRYNS, V., BERRY, R. W., KURET, J. and BINDER, L. I. (2000). C-terminal inhibition of *Tau* assembly *in vitro* and in Alzheimer's disease. *J. Cell Sci.* **113**, 3737-3745.
3. ABRAMI, L., LIU, S., COSSON, P., LEPLA, H., GISOUT van der GOOT, F. (2003). Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor *via* a lipid raft-mediated clathrin-dependant process. *J. Cell Biol.* **160**, 321-328.
4. ADAM-KLAGES, S., ADAM, D., WIEGMANN, K., STRUVE, S., KOLANUS, W., SCHNEIDER-MEGENER, J. and KRONKE, M. (1996). FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell*. **86**, 937-947.
5. AKBAR, M. and KIM, H. Y. (2002). Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *J. Neurochem.* **82**, 655-665.
6. AKSENOV, M. Y. and MARKESBERY, W. R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **302**, 141-145.
7. ALLINSON, T. M. J., PARKIN, E. T., TURNER, A. J. and HOOPER, N. M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein α -secretases. *J. Neurosci. Res.* **74**, 342-352.
8. ALLMAN, D. W. and GIBSON, D. M. (1965). Fatty acid synthesis during early linoleic acid deficiency in the mouse. *J. Lipid Res.* **6**, 51-62.
9. ALONSO, A. C., ZAIDI, T., GRUNDKE-IQBAL, I. and IQBAL, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated *Tau* in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 5562-5566.
10. ALONSO, A. C., GRUNDKE-IQBAL, I., BARRA, H. S. and IQBAL, K. (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. USA*. **94**, 298-303.
11. ALONSO, A. C., MEDERLYOVA, A., NOVAK, M., GRUNDKE-IQBAL, I. and IQBAL, K. (2004). Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia *tau* mutations. *J. Biol. Chem.* **279**, 34873-34881.
12. ALVAREZ, A., TORO, R., CACERES, A. and MACCIONI, R. B. (1999). Inhibition of *Tau* phosphorylating protein kinase cdk5 prevents β -amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett.* **459**, 421-426.
13. ANCOLIO, K., DUMANDIN, C., BARELLI, H., WARTER, J. M., BRICE, A., CAMPION, D., FREBOURG, T. and CHECLER, F. (1999). Unusual phenotypic alteration of β -amyloid precursor protein (β APP) maturation by a new Val-715 $\rightarrow$ Met β APP-770 mutation responsible for probable early onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 4119-4124.
14. ANDERSON, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199-225.
15. ANDO, K., IJIMA, K. I., ELLIOTT, J. I., KIRINO, Y. and SUZUKI, T. (2001). Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of β -amyloid. *J. Biol. Chem.* **276**, 40353-40361.
16. ANDREADIS, A., BRODERICK, J. A. and KOSIK, K. S. (1995). Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non equivalence of two cassette exons. *Nucleic acids Res.* **23**, 3585-3593.
17. ANDREADIS, A. (2005). *Tau* gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative disease. *Biochim. Biophys. Acta*. **1739**, 91-103.
18. ANDREASEN, N., MINTHON, L., DAVIDSSON, P., VANMECHELEN, E., VANDERSTICHELE, H., WINBLAD, B. and BLENNOW, K. (2001). Evaluation of CSF-*Tau* and CSF-A β_{42} as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch. Neurol.* **58**, 373-379.
19. ANDREASEN, N., SJORGEN, M. and BLENNOW, K. (2003). CSF markers for Alzheimer's disease: total *Tau*, phospho-*Tau* and A β_{42} . *World J. Biol. Psychiatry*. **4**, 147-155.
20. ANDREASEN, N. and BLENNOW, K. (2005). CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **107**, 165-173.
21. ANDRIEU-ABADIE, N., GOUAZE, V., SALVAYRE, R. and LEVADE, T. (2001). Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 717-728.

22. ANNAERT, W. G., LEVESQUE, L., CRAESSAERTS, K., DIERINCK, I., SNELLINGS, G., WESTAWAY, D., GEORGE-HYSLOP, P. S., CORDELL, B., FRASER, P. and DE STROOPER, B. (1999). Presenilin 1 controls γ -secretase processing of amyloid precursor protein in pre-Golgi compartments of hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* **142**, 277-294.
23. ARBUCKLE, T. Y., MAAG, U., PUSHKAR, D. and CHAIKELSON, J. S. (1998). Individual differences in trajectory of intellectual development over 45 years of adulthood. *Psychol. Aging*. **13**, 663-675.
24. ARENDT, T., SCHINDLER, C., BRUCKER, M. K., ESCHRICH, K., BIGL, V., ZEDLICK, D. and MARCOVA, L. (1997). Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein $\epsilon 4$ allele. *J. Neurosci.* **17**, 516-529.
25. ARENDT, T. (2004). Neurodegeneration and plasticity. *Int. J. Devl. Neuroscience*. **22**, 507-514.
26. ARISPE, N., ROJAS, E. and POLLARD, H. B. (1993). Alzheimer disease amyloid- β protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 567-571.
27. ARISPE, N. and DOH, M. (2002). Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease A β P(1-40) and (1-42) peptides. *FASEB J.* **16**, 1526-1536.
28. ARISPE, N. (2004). Architecture of the Alzheimer's A β P ion channel pore. *J. Membrane Biol.* **197**, 33-48.
29. ARITA, M., CLISH, C. B. and SERHAN, C. N. (2005). The contributions of aspirin and microglial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **338**, 149-157.
30. ARMSTRONG, V. T., BRZUCSTOWICZ, M. R., WASSALL, S. R., JENSKI, L. J. and STILLWELL, W. (2003). Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 74-82.
31. ARNOLD, C. S., JOHNSON, G. V. W., COLE, R. N., DONG, D. L.-Y., LEE, M. and HART, G. W. (1996). The microtubule-associated protein *Tau* is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **46**, 28741-28744.
32. ARORA, A. S., JONES, B. J., PATEL, T. C., BRONK, S. F. and GORES, G. J. (1997). Ceramide induces hepatocyte cell death through disruption of mitochondrial function in the rat. *Hepatology*. **25**, 958-963.
33. ARTAL-SANZ, M. and TAVERNARAKIS, N. (2005). Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett.* **579**, 3287-3296.
34. ATWOOD, C. S. (2005). Alzheimer's disease: the impact of age-related changes in reproductive hormones. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 255-256.
35. BABITT, J., TRIGATTI, B., RIGOTTI, A., SMART, E. J., ANDERSON, R. G., XU, S. and KRIEGER, M. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* **272**, 13242-13249.
36. BACIA, K., SCHWILLE, P. and KURZCHALIA, T. (2005). Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 3272-3277.
37. BAHR, B. A., HOFFMAN, K. B., YANG, A. J., HESS, U. S., GLABE, C. G. and LYNCH, G. (1998). Amyloid β protein is internalized selectively by hippocampal field CA1 and causes neurons to accumulate amyloidogenic carboxyterminal fragments of the amyloid precursor protein. *J. Comp. Neurol.* **397**, 139-147.
38. BALAKRISHNAN, K., VERDILE, G., MEHTA, P. D., BEILBY, J., NOLAN, D., GALVAO, D. A., NEWTON, R., GANDY, S. E. and MARTINS, N. R. (2005). Plasma A β_{42} correlates positively with increased body fat in healthy individuals. *J. Alzheimer Dis.* **8**, 269-282.
39. BALARAMAN, Y., LIMAYE, A. R. and SRINIVASAN, S. (2006). Glycogen synthase kinase 3 β and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 1226-1235.
40. BANCHER, C., BRUNNER, C., LASSMANN, H., BUDKA, H., JELLINGER, K., WICHE, G. SEITELBERGER, F., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K. and WISNIEWSKI, H. M. (1989). Accumulation of phosphorylated *Tau* precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **477**, 90-99.
41. BANCHER, C., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., SMITH, H. T. and WISNIEWSKI, H. M. (1991). Abnormal phosphorylation of *Tau* precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. *Brain Res.* **539**, 11-18.
42. BAR, J., LINKE, T., FERLINZ, K., NEUMANN, U., SCHUCHMAN, E. H. and SANDHOFF, K. (2001). Molecular analysis of acid ceramidase deficiency in patients with farber disease. *Hum. Mutat.* **17**, 199-209.
43. BARBERGER-GATEAU, P., LETENNEUR, L., DESCHAMPS, V., PERES, K., DARTIGUES, J.-F. and RENAUD, S. (2002). Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *BMJ.* **325**, 932-933.

44. BARCELO-COBLIJN, G., KITAJKA, K., PUSKAS, L. G., HOGYES, E., ZVARA, A., HACKLER, L. Jr. and FARKAS, T. (2003) Gene expression and molecular composition of phospholipids in rat brain in relation to dietary *n*-6 to *n*-3 fatty acid ratio. *Biochim. Biophys. Acta* **1632**, 72-79.
45. BARKETT, M. and GILMORE, T. O. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. **18**, 6910-6924.
46. BAULIEU, E. E. (1998). Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*. **23**, 963-987.
47. BECKER, J. T., MINTUN, M. A., ALEVA, K., WISEMAN, M. B., NICHOLS, T. and DEKOSKY, S. T. (1996). Alterations in functional neuroanatomical connectivity in Alzheimer's disease. Positron emission tomography of auditory verbal short-term memory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **777**, 239-242.
48. BECZKOWSKA, I. W., BUCK, J. and INTURRISI, C. E. (1996). Retinoic acid-induced increase in δ -opioid receptor and *N*-methyl-*D*-aspartate receptor mRNA levels in neuroblastoma x glioma (NG108-15) cells. *Brain Res. Bulletin*. **39**, 193-199.
49. BEFFERT, U., COHN, J. S., PETIT-TURCOTTE, C., TREMBLAY, M., AUMONT, N., RAMASSAMY, C., DAVIGNON, J. and POIRIER, J. (1999). Apolipoprotein E and β -amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res.* **843**, 87-94.
50. BEGNI, B., BRIGHINA, L., SIRTORI, E., FUMAGALLI, L., ANDREONI, S., BERETTA, S., OSTER, T., MALPLATE-ARMAND, C., ISELLA, V., APPOLLINO, I. and FERRARESE, C. (2004). Oxidative stress impairs glutamate uptake in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *Free radic. Biol. Med.* **37**, 892-901.
51. BEHL, C., DAVIES, J. B., Klier, F. G. and SCHUBERT, D. (1994). Amyloid- β peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res.* **645**, 253-264.
52. BEHL, C. (2000). Apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **107**, 1325-1344.
53. BENES, F. M., FAROL, P. A., MAJOCHA, R. E., MAROTTA, C. A. and BIRD, E. D. (1991). Evidence for axonal loss in regions occupied by senile plaques in Alzheimer cortex. *Neuroscience*. **42**, 651-660.
54. BENN, S. C. and WOOLF, C. J. (2004). Adult neuron survival strategies. Slamming on the brakes. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 686-700.
55. BENNECIB, M., GONG, C.-X., GRUNDKE-IQBAL, I. and IQBAL, K. (2001). Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of *Tau* at Ser 262/356. *FEBS Lett.* **490**, 15-22.
56. BENNETT, B. D., BABU-KHAN, S., LOELOFF, R., LOUIS, J.-C., CURRAN, E., CITRON, M. and VASSAR, R. (2000). Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem.* **275**, 20647-20651.
57. BENOLKEN, R. M., ANDERSON, R. E. and WHEELER, T. G. (1973). Membrane fatty acids associated with the electrical response in visual excitation. *Science*. **182**, 1253-1254.
58. BERKMAN, L. F. (2000). Social support, social networks, social cohesion and health. *Soc. work health care*. **31**, 3-14.
59. BERNSTEIN, H. G., ANSORGE, S., RIEDERER, P., REISER, M., FROLICH, L. and BOGERTS, B. (1999). Insulin-degrading enzyme in the Alzheimer's disease brain: prominent localization in neurons and senile plaques. *Neurosci. Lett.* **263**, 161-164.
60. BERTONI-FREDDARI, C., FATTETTI, P., CASOLI, U. and MEIER-RUGE, W. (1996). Deterioration threshold of synaptic morphology in aging and senile dementia of Alzheimer's type. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **18**, 209-213.
61. BERTRAM, L., BLACKER, D., MULLIN, K., KEENEY, D., JONES, J., BASU, S., YHU, S., MCINNIS, M. G., GO, R. C., VEKRELLIS, K., SELKOE, D. J., SAUNDERS, A. J. and TANZI, R. E. (2000). Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science*. **290**, 2302-2303.
62. BERTRAM, L. and TANZI, R. E. (2004). The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol. Res.* **50**, 385-396.
63. BHATIA, R., LIN, H. and LAL, R. (2000). Fresh and globular amyloid β protein (1-42) induces rapid cellular degeneration: evidence for A β P channel-mediated cellular toxicity. *FASEB J.* **14**, 1233-1243.
64. BILLINGS, L. M., ODDO, S., GREEN, K. N., MCGAUGH, J. L. and LAFERTA, F. M. (2005). Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. **45**, 675-688.
65. BINDER, L. I., FRANKFURTER, A. and REBHUN, L. I. (1985). The distribution of *Tau* in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* **101**, 1371-1378.
66. BIONDA, C., PORTOUKALIAN, J., SCHMITT, D., RODRIGUEZ-LAFRASSE, C. and ARDAIL, P. (2004). Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem. J.* **382**, 527-533.
67. BIRBES, H., LUBERTO, C., HSU, Y. T., EL BAWAB, S., HANNUN, Y. A. and OBEID, L. M. (2005). A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNF α -induced Bax

- translocation to mitochondria. *Biochem. J.* **386**, 445-451.
68. BIRCH, D. G., BIRCH, E. E., HOFFMAN, D. R. and UAUY, R. D. (1992) Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 2365-2376.
69. BIRCH, E. E., BIRCH, D. G., HOFFMAN, D. R. and UAUY, D. (1992). Dietary essential fatty acid supply and visual acuity development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 3242-3253.
70. BIRKS, J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane database Syst. Rev.* **25**, CD005593.
71. BITAN, G., LOMAKIN, A. and TEPLow, D. B. (2001). Amyloid β -protein oligomerization: prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 35176-35184.
72. BJORKHEM, I., LUTJOHANN, D., DICZFALUSY, U., STAHLE, L., AHLBORG, G. and WAHREN, J. (1998). Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J. Lipid Res.* **39**, 1594-1600.
73. BJORKHEM, I. and MEANEY, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 806-815.
74. BLACK, R. A., RAUCH, C. T., KOZLOSKY, C. J., PESCHON, J. J., SLACK, J. L., WOLFSON, M. F., CASTNER, B. J., STOCKING, K. L., REDDY, P., SRINIVASAN, S., NELSON, N., BOLANI, N., SCHOLLEY, K. A., GERHART, M., DAVIS, R., FITZNER, J. N., JOHNSON, R. S., PAXTON, R. J., MARCH, C. J. and CERRETTI, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*. **385**, 729-733.
75. BLANCHARD, V., MOUSSAOUI, S., CZECH, C., TOUCHET, N., BONICI, B., PLANCHE, M., CANTON, T., JEDIDI, I., GOHIN, M., WIRTHS, O., BAYER, T. A., LANGUI, D., DUYCKAERTS, C., TREMP, G. and PRADIER, L. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp. Neurol.* **184**, 247-263.
76. BLENNOW, K. and HAMPEL, H. (2003). CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet. Neurol.* **2**, 605-613.
77. BLIGH, E. G. and DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem. Biophysiol.* **37**, 911-917.
78. BODENDORF, U., DANNER, S., FISCHER, F., STEFANI, M., STURCHLER-PIERRAT, C., WIEDERHOLD, K.-H., STAUFENBIEL, M. and PAGANETTI, P. (2002). Expression of human β -secretase in the mouse brain increases the steady-state level of β -amyloid. *J. Neurochem.* **80**, 799-806.
79. BODOVITZ, S. and KLEIN, W. L. (1996). Cholesterol modulates α -secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 4436-4440.
80. BOGDANOVIC, N., BRETILLON, L., LUND, E. G., DICZFALUSY, U., LANNFELT, L., WINBLAD, B., RUSSELL, D. W. and BJORKHEM, I. (2001). On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci. Lett.* **31**, 45-48.
81. BOISE, L. H. and THOMPSON, C. B. (1997). Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 3759-3764.
82. BOLAND, K., MANIAS, K. and PERLMUTTER, O. H. (1995). Specificity in recognition of amyloid- β peptide by the serpin-enzyme complex receptor in hepatoma cells and neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 28022-28028.
83. BOLLINGER, C. R., TEICHGRABER, V. and GULBINS, E. (2005). Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta.* **1746**, 284-294.
84. BONFOCO, E., KRAINIC, D., ANKARCORONA, M., NICOTERA, P. and LIPTON, S. A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartates or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 7162-7166.
85. BONNI, A., BRUNET, A., WEST, A. E., TAKASU, M. A. and GREENBERG, M. E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science.* **286**, 1309-1310.
86. BOWERMAN, B. (2005). Cell biology. Oxidative stress and cancer: a β -catenin convergence. *Science.* **308**, 1119-1120.
87. BRAAK, H., BRAAK, E. and STROTHJOHANN, N. (1994). Abnormally phosphorylated *Tau* protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neurosci. Lett.* **171**, 1-4.
88. BRAAK, H., BRAAK, E., BOHL, J. and BRATZKE, H. (1998). Evolution of Alzheimer's disease related cortical lesions. *J. Neural. Transm. Suppl.* **54**, 97-106.
89. BRAMBLETT, G. T., TROJANOWSKI, J. Q. and LEE, V. M. (1992). Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent *Tau* and accumulation of abnormal *Tau* isoform (A68 products). *Lab. Invest.* **66**, 212-222.
90. BRANDT, R., LEGER, J. and LEE G. (1995). Interaction of *Tau* with the neural plasma membrane mediated by *Tau*'s N-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* **131**, 1327-1340.

91. BRANDT, R., HUNDELT, M. and SHAHANI, N. (2005). *Tau* alterations and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim. And Biophys. Acta.* **1739**, 331-354.
92. BRECHT, W. J., HARRIS, F. M., CHANG, S., TESSEUR, I., YU, G. Q., XU, Q., DEE FISH, J., WYSS-CORAY, T., BUTTINI, M., MUCKE, L., MAHLEY, R. W. and HUANG, Y. (2004). Neuron-specific apolipoprotein *e4* proteolysis is associated with increased *Tau* phosphorylation in brains of transgenic mice. *J. Neurosci.* **24**, 2527-2534.
93. BRECKENRIDGE, D. G., GERMAIN, M., MATHAI, J. P., NGUYEN, M. and SHORE, G. C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathway. *Oncogene.* **22**, 8608-8618.
94. BREEN, K. C., BRUCE, M. and ANDERTON, B. H. (1991). β -amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J. Neurosci. Res.* **28**, 90-100.
95. BRION, J. P., FLAMAND-DURAND, J. and DUSTIN, P. (1986). Alzheimer's disease and *Tau* proteins. *Lancet.* **2**, 1098.
96. BROE, M., SHEPHERD, C. E., MILWARD, E. A. and HALLIDAY, G. M. (2001). Relationship between DNA fragmentation, morphological changes and neuronal loss in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol.* **101**, 616-624.
97. BROOKMEYER, R., GRAY, S. and KAWAS, C. (1998). Projections of Alzheimer's disease in the united states and the public health impact of delaying disease onset. *Am. J. Public Health.* **88**, 1337-1342.
98. BROWN, D. A. and LONDON, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **275**, 17221-17224.
99. BROWN, D. A. and ROSE, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* **68**, 533-544.
100. BRUNKAN, A. L. and GOATE, A. M. (2005). Presenilin function and γ -secretase activity. *J. Neurochem.* **93**, 769-792.
101. BUCCOLIERO, R. and FUTERMAN, A. H. (2003). The roles of ceramides and complex sphingolipids in neuronal cell function. *Pharmacol. Res.* **47**, 409-419.
102. BUEE, L., BUSSIERE, T., BUEE-SCHERRER, V., DELA-COURTE, A. and HOF, P. R. (2000). *Tau* protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* **33**, 95-130.
103. BUEE-SCHERRER, V. and GOEDERT, M. (2002). Phosphorylation of microtubule-associated protein *Tau* by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett.* **515**, 151-154.
104. BUJA, L. M., EIGENBRODT, M. L. and EIGENBRODT, E. H. (1993). Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **117**, 1208-1214.
105. BURR, G. O. and BURR, M. M. (1929). A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Nutr. Class. J. Biol. Chem.* **82**, 345-367.
106. BUXBAUM, J. D., KOO, E. H. and GREENGARD, P. (1993). Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid- β /A4 peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 9195-9198.
107. BUXBAUM, J. D., LIU, K.-N., LUO, Y., SLACK, J. L., STOCKING, K. L., PESCHON, J. J., JONHSON, R. S., CASTNER, B. J., CERRETTI, D. P. and BLACK, R. A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* **273**, 27765-27767.
108. CACCHIONE, P. Z., POWLICHTA, K. K., GRANT, E. A., BUCKLES, V. D. and MORRIS, J. D. (2003). Accuracy of collateral source reports in very mild to mild dementia of the Alzheimer type. *J. Am. Geriatr. Soc.* **51**, 819-823.
109. CAGNIN, A., BROOKS, D. J., KENNEDY, A. M., GUNN, R. N., MYERS, R., TURKHEIMER, F. E., JONES, T. and BANATI, R. B. (2001). *In vivo* measurement of activated microglia in dementia. *Lancet.* **358**, 461-467.
110. CAI, H., WANG, Y., MCCARTHY, D., WEN, H., BORCHELT, D. R., PRICE, D. L. and WONG, P. C. (2001). BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* **4**, 233-234.
111. CALDERON, F. and KIM, H. Y. (2004). Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **90**, 979-988.
112. CALINGASAN, N. Y., UCHIDA, K. and GIBSON, G. E. (1999). Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **72**, 751-756.
113. CAMANDOLA, S., LEONARDUZZI, G., MUSSO, T., VARESEO, L., CARINI, R., SCAVAZZA, A., CHIARPOTTO, E., BAEUERLE, P. A. and POLI, G. (1996). Nuclear factor- κ B is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 643-647.
114. CAO, X. and SUDHOF, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science.* **293**, 115-120.
115. CAO, X. and SUDHOF, T. C. (2004). Dissection of amyloid- β precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J. Biol. Chem.* **279**, 24601-24611.
116. CAO, D., XUE, R., XU, J. and LIU, Z. (2005) Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 538-546.

117. CAPORASO, G. L., TAKEI, K., GANDY, S. E., MATTEOLI, M., MUNDIGL, O., GREENGARD, P. and DE CAMILLI, P. (1994). Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* **14**, 3122-3138.
118. CARDONE, M. H., ROY, N., STENNICK, H. R., SALVESEN, G. S., FRANKE, T. F., STANBRIDGE, E., FRISCH, S. and REED, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. **282**, 1318-1321.
119. CARNIELLI, V. P., WATTIMENA, D. J., LUIJENDIJK, I. H., BOERLAGE, A., DEGENHART, H. J. and SAUER, P. J. (1996). The very low birth weight premature infant is capable of synthesizing arachidonic and docosahexaenoic acids from linoleic and linolenic acids. *Pediatr. Res.* **40**, 169-174.
120. CARRIE, I., CLEMENT, M., DE JAVEL, D., FRANCES, H. and BOURRE, J.-M. (2000). Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J. Lipid Res.* **41**, 473-480.
121. CARSON, J. A. and TURNER, A. J. (2002). β -amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases. *J. Neurochem.* **81**, 1-8.
122. CARTER, B. D. and MEDZIHRADESKI, F. (1993). G_0 mediates the coupling of the μ opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 4062-4066.
123. CASCIOLA-ROSEN, L., NICHOLSON, D. W., CHONG, T., ROWAN, K. R., THORNBERRY, N. A., MILLER, D. and ROSEN, A. (1996). Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J. Exp. Med.* **183**, 1947-1951.
124. CASTELLANI, R. J., SMITH, M. A., PERRY, G. and FRIEDLAND, R. D. (2004). Cerebral amyloid angiopathy: major contributor or decorative response to Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol. Aging*. **25**, 599-602.
125. CATALDO, A. M., PETERHOFF, C. M., TRONCOSO, J. C., GOMEZ-ISLA, T., HYMAN, B. T. and NIXON, R. A. (2000). Endocytic pathway abnormalities precede amyloid- β deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome. *Am. J. Pathol.* **157**, 277-286.
126. CATALDO, A. M., PETERHOFF, C. M., SCHMIDT, S. D., TERIO, N. B., DUFF, K., BEARD, M., MATHEWS, P. M. and NIXON, R. A. (2004). Presenilin mutations in familial Alzheimer's disease and transgenic mouse models accelerate neuronal lysosomal pathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63**, 821-830.
127. CAUGHEY, B. and LANSBURY Jr. P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267-298.
128. CAVANAUGH, J. E. (2004). Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2056-2059.
129. CECCARELLI, B., APORTI, F. and FINESSO, M. (1976). Effects of brain gangliosides on functional recovery in experimental regeneration and reinnervation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **71**, 257-93.
130. CHALFANT, C. E. and SPIEGEL, S. (2005). Sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* **118**, 4605-4612.
131. CHAMBERLAIN, L. H., BURGOYNE, R. D. and GOULD, G. W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 5619-5624.
132. CHANG, L. K., PUTCHA, G. V., DESHMUKH, M. and JOHNSON, E. M. Jr. (2002). Mitochondrial involvement in the point of no return in neuronal apoptosis. *Biochimie*. **84**, 223-231.
133. CHATTERJEE, S. (1999). Neutral sphingomyelinase: past, present and future. *Chem. Phys. Lipids*. **102**, 79-96.
134. CHAU, V., TOBIAS, J. W., BACHMAIR, A., MARRIOTT, D., ECKER, D. J., GONDA, D. K. and VARSHAVSKI, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*. **243**, 1576-1583.
135. CHEN, M. and YANKNER, B. A. (1991). An antibody to β -amyloid and amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci. Lett.* **125**, 223-226.
136. CHEN, F., YU, G., ARAKAWA, S., NISHIMURA, M., KAWARAI, T., YU, H., TANDON, A., SUPALA, A., SONG, Y. Q., ROGAEVA, E., MILMAN, P., SATO, C., YU, C., JANUS, C., LEE, J., SONG, L., ZHANG, L., FRASER, P. E. and GEORGE-HYSLOP, P. S. (2001). Nicastrin binds to membrane-tethered Notch. *Nat. Cell Biol.* **3**, 751-754.
137. CHERNY, R. A., ATWOOD, C. S., XILINAS, M. E., GRAY, D. N., JONES, W. D., MCLEAN, C. A., BARNHAM, K. J., VOLITAKIS, I., FRASER, F. W., KIM, Y., HUANG, X., GOLDSTEIN, L. E., MOIR, R. D., LIM, J. T., BEYREUTHER, K., ZHENG, H., TANZI, R. E., MASTERS, C. L. and BUSH, A. I. (2001). Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease

- transgenic mice. *Neuron*. **30**, 665-676.
138. CHINNAIYAN, A. M., TEPPER, C. G., SELDIN, M. F., O'ROURKE, K., KISCHKE, F. C., HELLBARDT, S., KRAMMER, P. H., PETER, M. E. and DIXIT, V. M. (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 4961-4965.
 139. CHITTENDEN, T., HARRINGTON, E. A., O'CONNOR, R., FLEMINGTON, C., LUTZ, R. J., EVAN, G. I. and GUILD, B. C. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*. **374**, 733-736.
 140. CHONG, Z. Z., LI, F. and MAIESE, K. (2005). Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* **49**, 1-21.
 141. CHONG, M. S. and SAHADEVAN, S. (2005). Preclinical Alzheimer's disease: diagnosis and prediction of progression. *Lancet Neurol*. **4**, 576-579.
 142. CHOO-SMITH, L. P., GARZON-RODRIGUEZ, W., GLABE, C. G. and SUREWICZ, W. K. (1997). Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of A β -(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **272**, 22987-22990.
 143. CHU, C. T., LEVINTHAL, D. J., KULICH, S. M., CHALOVICH, E. M. and DEFRANCO, D. B. (2004). Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2060-2066.
 144. CHUI, D. H., TANAHASHI, H., OZAWA, K., IKEDA, S., CHECLER, F., UEDA, O., SUZUKI, H., ARAKI, W., INOUE, H., SHIOTANI, K., TAKAHASHI, K., GALLYAS, F. and TABIRA, T. (1999). Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat. Med.* **5**, 560-564.
 145. CHYUNG, J. H., RAPER, D. M. and SELKOE, D. J. (2005). γ -secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J. Biol. Chem.* **280**, 4383-4392.
 146. CITRON, M., OLTERSDORF, T., HAASS, C., MCCONLOGUE, L., HUNG, A. Y., SEUBERT, P., VIGO-PELFREY, C., LIEBERBURG, I. and SELKOE, D. J. (1992). Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature*. **360**, 672-674.
 147. CLEARY, J. P., WALSH, D. M., HOFMEISTER, J. J., SHANKAR, G. M., KUSKOWSKI, M. A., SELKOE, D. J. and ASHE, K. H. (2005). Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* **8**, 79-84.
 148. CLEVELAND, D. W., HWO, S.-Y. and KIRSCHNER, M. W. (1977). Physical and chemical properties of purified *Tau* factor and the role of *Tau* in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.*, **116**, 227-247.
 149. COFFER, P. J. and WOODGETT, J. R. (1991). Molecular cloning and characterization of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem.* **201**, 475-481.
 150. COHEN, J. J. (1993). Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp. Pract.* **28**, 35-43.
 151. COHEN, A. J. and MILLER, Y. E. (1999). Neuroendocrine differentiation, neuropeptides, and neprilysin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 1-3.
 152. COLE, G. M., LIM, G. P., YANG, F., TETER, B., BEGUM, A., MA, Q., HARRIS-WHITE, M. E. and FRAUTSCHY, S. A. (2005). Prevention of Alzheimer's disease: omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. *Neurobiol. Aging*. **S1**, 133-136.
 153. COLEMAN, P., FEDEROFF, H. and KURLAN, R. (2004). A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology*. **63**, 1155-1162.
 154. COLES, M., BICKNELL, W., WATSON, A. A., FAIRLIE, D. P. and CRAIK, D. J. (1998). Solution structure of the amyloid β -peptide (1-40) in a water-micelle environment is the membrane-spanning domain where we think it is? *Biochemistry*. **37**, 11064-11077.
 155. COLOMBAIONI, L. and GARCIA-GIL, M. (2004). Sphingolipid metabolites in neural signaling and function. *Brain Res. Rev.* **46**, 328-355.
 156. COMBARROS, O., INFANTE, J., LLORCA, J. and BERCIAÑO, J. (2004). Genetic association of CYP46 and risk for Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **18**, 257-260.
 157. COMBRINCK, M., WILLIAMS, J., DE BERARDINIS, M. A., WARDEN, D., PUOPOLO, M., SMITH, A. D. and MINGHETTI, L. (2006). Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline, and survival in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **77**, 85-88.
 158. COMPAGNONE, N. A. and MELLON, S. H. (1998). Dehydroepiandrosterone: a potential signaling molecule for neocortical organization during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 4678-4683.
 159. CONSILVIO, C., VINCENT, A. M. and FELDMAN, E. L. (2004). Neuroinflammation, COX-2, and ALS--a dual role? *Exp. Neurol.* **187**, 1-10.
 160. CONTE, V., URYU, K., FUJIMOTO, S., YAO, Y., ROKACH, J., LONGHI, L., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V.

- M., MACINTOSH, T. K. and PRATICO, D. (2004). Vitamin E reduces amyloidosis and improves in Tg2576 mice following repetitive concussive brain injury. *J. Neurochem.* **90**, 758-764.
161. COOK, D. G., FORMAN, M. S., SUNG, J. C., LEIGHT, S., KOLSON, D. L., IWATSUBO, T., LEE, V. M. and DOMS, R. W. (1997). Alzheimer's A β (1-42) is generated in the endoplasmic/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat. Med.* **3**, 1021-1023.
 162. COORAY, S. (2004). The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *J. General. Virology.* **85**, 1065-1076.
 163. CORDER, E. H., SAUNDERS, A. M., STRITTMATTER, W. J., SCHMECHEL, D. E., GASKELL, P. C., SMALL, G. W., ROSES, A. D., HAINES, J. L. and PERICAK-VANCE, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* **261**, 921-923.
 164. COREY, E. J., SHIH, C. and CASHMAN, J. R. (1983). Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 3581-3584.
 165. CREGAN, S. P., DAWSON, V. L. and SLACK, R. S. (2004). Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* **23**, 2785-2796.
 166. CREMESTI, A. E., GONI, F. M. and KOLESNICK, R. (2002). Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett.* **531**, 47-53.
 167. CRISTOFANON, D., DICATO, M., Ghibelli, L. and DIEDERICH, M. (2006). Glutathione as a mediator of apoptotic cell signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* **In Press**.
 168. CRYNS, V. L., BYUN, Y., RANA, A., MELLOR, H., LUSTIG, K. D., GHANEM, L., PARKER, P. J., KIRSCHNER, M. W. and YUAN, J. (1997). Specific proteolysis of the kinase protein kinase C-related kinase 2 by caspase-3 during apoptosis. Identification by a novel, small pool expression cloning strategy. *J. Biol. Chem.* **272**, 29449-29453.
 169. CRYNS, V. and YUAN, J. (1998). Proteases to die for. *Genes Dev.* **12**, 1551-1570.
 170. CRYSTAL, A. S., MORAIS, V. A., PIERSON, T. C., PIJAK, D. S., CARLIN, D., LEE, V. M.-Y. and DOMS, R. W. (2003). Membrane topology of γ -secretase component PEN-2. *J. Biol. Chem.* **278**, 20117-20123.
 171. CUPERS, P., ORLANS, I., CRAESSAERT, K., ANNAERT, W. and DE STROOPER, B. (2001). The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by γ -secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurone in culture. *J. Neurochem.* **78**, 1168-1178.
 172. CURTAIN, C. C., ALI, F. E., VOLITAKIS, I., CHERNY, R. A., NORTON, R. S., BEYREUTHER, K., BARROW, C. J., MASTERS, C. L., BUSH, A. I. and BARNHAM, K. J. (2001). Alzheimer's disease amyloid- β binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J. Biol. Chem.* **276**, 20466-20473.
 173. CURTAIN, C. C., ALI, F. E., SMITH, D. G., BUSH, A. I., MASTERS, C. L. and BARNHAM, C. L. (2003). Metal ions, pH, and cholesterol regulate the interactions of Alzheimer's disease amyloid- β peptide with membrane lipid. *J. Biol. Chem.* **278**, 2977-2982.
 174. CURTIS, D. (2002). Aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP and presenilin protein accumulation. *Development. Cell.* **3**, 85-97.
 175. CUTLER, R. G., KELLY, J., STORIE, K., PEDERSON, W. A., TAMMARA, A., HATANPAA, K., TRONCOSO, J. C. and MATTSON, M. P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 2070-2075.
 176. CUVILLIER, O., PIRIANOV, G., KLEUSER, P. G., COSO, D. A., GUTKIND, S. and SPIEGEL, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature.* **381**, 800-803.
 177. CUVILLIER, O., ANDIEU-ABADIE, N., SEGUI, B., MALAGARIE-CAZENAVE, S., TARDY, C., BONHOURE, E. and LEVADE, T. (2003). [Sphingolipid-mediated apoptotic signaling pathways]. *J. Soc. Biol.* **197**, 217-221.
 178. DANIK, M., CHAMPAGNE, D., PETIT-TURCOTTE, C., BEFFERT, U. and POIRIER, J. (1999). Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease. *Crit. Rev. Neurobiol.* **13**, 357-407.
 179. DAVIGNON, J. and LAAKSONEN, R. (1999). Low-density lipoprotein-independent effects of statins. *Curr. Opin. Lipidol.* **10**, 543-559.
 180. DAWSON, G. R., SEABROOK, G. R., ZHENG, H., SMITH, D. W., GRAHAM, S., O'DOWD, G., BOWERY, B. J., BOYCE, S., TRUMBAUER, M. E., CHEN, H. Y., VAN DER PLOEG, L. H. and SIRINATHSINGHI, D. J. (1999). Age-related cognitive deficits, long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the β -amyloid precursor protein. *Neuroscience.* **90**, 1-13.

181. DECARLI, C., MURPHY, D. G., MCINTOSH, A. R., TEICHBERG, D., SCHAPIRO, M. B. and HORWITZ, B. (1995). Discriminant analysis of MRI measures as a method to determine the presence of dementia of the Alzheimer type. *Psychiatry Res.* **57**, 119-130.
182. DE CESARE, D. and SASSONE-CORSI, P. (2000). Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **64**, 343-369.
183. DEKOSKY, S. T. and SCHEFF, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* **27**, 457-464.
184. DELACOURTE, A. (2005). Tauopathies: recent insights into old diseases. *Folia Neuropathol.* **43**, 244-257.
185. DELACOURTE, A., DAVID, J. P., SERGEANT, N., BUEE, L., WATTEZ, A., VERMERSCH, P., GHOZALI, F., FALLET-BIANCO, C., PASQUIER, F., LEBERT, F., PETIT, H. and DI MENZA, C. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology.* **52**, 1158-1165.
186. DE LA LLERA-MOYA, M., ROTHBLAT, G. H., CONNELLY, M. A., KELLNER-WEIBEL, G., SAKR, S. W., PHILLIPS, M. C. and WILLIAMS, D. L. (1999). Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.* **40**, 575-580.
187. DELATTRE, J., DURAND, G. and JARDILLIER, J.-C. (2003). In *Biochimie pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires*. (Ed. Médecine-Sciences Flammarion). pp 244.
188. DEL POZO, M. A., BALASUBRAMANIAN, N., ALDERSON, N. B., KIOSSES, W. B., GRANDE-GARCIA, A., ANDERSON, R. G. W. and SCHWARTZ, M. A. (2005). Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat. Cell Biol.* **7**, 901-908.
189. DESAI, A. K. and GROSSENBERG, G. T. (2005). Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Neurology.* **64**, 34-39.
190. DE SAUVAGE, F. and OCTAVE, J. N. (1989). A novel mRNA of the A4 amyloid precursor gene coding for a possibly secreted protein. *Science.* **245**, 651-653.
191. DESSI, F., COLLE, M. A., HAUW, J. J. and DUYCKAERTS, C. (1998). Brain lesions, pathogenic and etiologic hypotheses of Alzheimer's disease. *Rev. Prat.* **48**, 1873-1878.
192. DE STROOPER, B. S., BEULLENS, M., CONTRERAS, B., LEVESQUE, L., CRAESSAERTS, K., CORDELL, B., MOECHARS, D., BOLLEN, M., FRASER, P., GEORGE-HYSLOP, P. S. and VAN LEUVEN, F. (1997). Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J. Biol. Chem.* **272**, 3590-3598.
193. DE STROOPER, B., ANNAERT, W., CUPERS, P., SAFTIG, P., CRASSAERTS, K., MUMM, J. S., SCHROETER, E. H., SCHRJVERS, V., WOLFE, M. S., RAY, W. J., GOATE, A. and KOPAN, R. (1999). A presenilin-1-dependent γ -secretase like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature.* **398**, 518-522.
194. DE STROOPER, B. (2003). Aph-1, Pen-2 and Nicastrin with presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron.* **38**, 9-12.
195. DE VRIJ, F. M. S., FESCHER, D. F., VAN LEEUWEN, F. W. and HOL, E. M. (2004). Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Prog. Neurobiol.* **74**, 149-270.
196. DEWJI, N. N. and SINGER, S. J. (1997). Cell surface expression of the Alzheimer disease-related presenilin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 9926-9931.
197. DHENAIN, M., PRIVAT, N., DUYCKAERTS, C. and JACOBS, R. E. (2002). Senile plaques do not induce susceptibility effects in T2*-weighted MR microscopic images. *NMR Biomed.* **15**, 197-203.
198. DICKSON, D. W. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 321-339.
199. DICKSON, T. C. and VICKERS, J. C. (2001). The morphological phenotype of β -amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* **105**, 99-107.
200. DICKSON, D. W. (2004). Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect. *J. Clin. Invest.* **114**, 23-27.
201. DIETSCHY, J. M. and TURLEY, S. D. (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 105-112.
202. DIETSCHY, J. M. and TURLEY, S. D. (2004). Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lip. Res.* **45**, 1375-1397.
203. DINGWALL, C. (2001). Spotlight on BACE: the secretase as targets for treatment in Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **108**, 1243-1246.
204. DINOTO, L., DETURE, M. A. and PURICH, D. L. (2005). Structural insights into Alzheimer filament assembly pathways based on site-directed mutagenesis and S-glutathionylation of three-repeat neuronal *Tau* protein. *Microsc. Res. Tech.* **67**, 156-163.
205. DITARANTO, K., TEKIRIAN, T. L. and YANG, A. J.

- (2001). Lysosomal membrane damage in soluble A β -mediated cell death in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **8**, 19-31.
206. DOBLE, B. W. and WOODGETT, J. R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Biol.* **116**, 1175-1186.
 207. DOODY, R., WIRTH, Y., SCHMITT, F. and MOBIUS, H. J. (2004). Specific functional effects of memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **18**, 227-232.
 208. DOTI, C. G., SULLIVAN, A. and BANKER, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **8**, 1454-1468.
 209. DREWES, G., LICHTENBERG-KRAAG, B., DORING, F., MANDELKOW, E.-M., BIERNAT, J., GORIS, J., DOREE, M. and MANDELKOW, E. (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms *Tau* protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* **11**, 2131-2138.
 210. DROUET, B., FIFRE, A., PINÇON-RAYMOND, M., VANDEKERCKHOVE, J., ROSSENEU, M., GUEANT, J.-L., CHAMBAZ, J. and PILLOT, T. (2001). ApoE protects cortical neurones against neurotoxicity induced by the non-fibrillar C-terminal domain of the amyloid- β peptide. *J. Neurochem.* **76**, 117-127.
 211. DUFF, K., ECKMAN, C., ZEHR, C., YU, X., PRADA, C. M., PEREZ-TUR, J., HUTTON, M., BUEE, L., HARIGAYA, Y., YAGER, D., MORGAN, D., GORDON, M. N., HOLCOMB, L., REFOLO, L., ZENK, B., HARDY, J. and YOUNKIN, S. (1996). Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*. **383**, 710-713.
 212. DULUBOVA, I., HO, A., HURYEVA, I., SUDHOF, T. C. and RIZO, J. (2004). Three-dimensional structure of an independently folded extracellular domain of human amyloid- β precursor protein. *Biochemistry*. **43**, 9583-9588.
 213. DUNCAN, R. E., SOHEMY, A. and ARCHER, M. C. (2005). Regulation of HMG-CoA reductase in MCF-7 cells by genistein, EPA, and DHA, alone and in combination with mevastatin. *Cancer Lett.* **224**, 221-228.
 214. DURELL, S. R., GUY, H. R., ARSPE, N., ROJAS, E. and POLLARD, H. B. (1994). Theoretical models of the ion channel structure of amyloid β -protein. *Biophys. J.* **67**, 2137-2145.
 215. DUTTA-ROY, A. K. (2000). Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, S315-S322.
 216. EARNSHAW, W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 337-343.
 217. EDBAUER, D., WINKLER, E., HAASS, C. and STEINER, H. (2002). Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 8666-8671.
 218. EDIDIN, M. (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257-283.
 219. EGE, C. and LEE, K. Y. (2004). Insertion of Alzheimer's A β ₄₀ peptide into lipid monolayers. *Biophys. J.* **87**, 1732-1740.
 220. EHEHALT, R., KELLER, P., HAASS, C., THIELE, C. and SIMONS, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* **160**, 113-123.
 221. EHRINGER, W., BELCHER, D., WASSALL, S. R. and STILLWELL, W. (1990). A comparison of the effects of linolenic (18:3 omega 3) and docosahexaenoic (22:6 omega 3) acids on phospholipid bilayers. *Chem. Phys. Lipids*. **54**, 79-88.
 222. EL BAWAB, S., MAO, C., OBEID, L. M. and HANNUN, Y. A. (2002). Ceramidases in the regulation of ceramide levels and function. *Subcell Biochem.* **36**, 187-205.
 223. ELHYANY, S., ASSA-KUNIK, E., TSORY, S., MULLER, T., FEDIDA, S., SEGAL, S. and FISHMAN, D. (2004). The integrity of cholesterol-enriched microdomains is essential for the constitutive high activity of protein kinase B in tumour cells. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 837-839.
 224. ELLENS, H., SIEGEL, D. P., ALFORD, D., YEAGLE, P. L., BONI, L., LIS, L. J., QUINN, P. J. and BENTZ, J. (1989). Membrane fusion and inverted phases. *Biochemistry*. **28**, 3692-3703.
 225. ELSER, L., BETZ, R., SCHWARTZMANN, G., SANDHOFF, K., VAN ECHTEN-DECKERT, G. (2002). Identification of ceramide binding proteins in neuronal cells: a critical point of view. *Neurochem. Res.* **27**, 717-727.
 226. ERIKSEN, J. L., SAGI, S. A., SMITH, T. E., WEGGEN, S., DAS, P., MCLENDON, D. C., OZOLS, V. V., JESSING, K. W., ZAVITZ, K. H., KOO, E. H. and GOLDE, T. E. (2003). NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target γ -secretase and lower A β ₄₂ in vivo. *J. Clin. Invest.* **112**, 440-449.
 227. ERTEKIN-TANER, N., GRAFF-RADFORD, N., YOUNKIN, L. H., ECKMAN, C., BAKER, M., ADAMSON, J., RONALD, J., BLANGERO, J., HUTTON, M. and YOUNKIN, S. G. (2000). Linkage of plasma A β ₄₂ to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science*. **290**, 2303-2304.
 228. ESCH, F. S., KEIM, E. C., BEATTIE, E. C., BLACHER, R. W., CULWELL, A. R., OLTERSDORF, T., MCCLURE, D.

- and WARD, P. J. (1990). Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. **248**, 1122-1124.
229. ESLER, W. P., KIMBERLY, W. T., OSTASZEWSKI, B. L., YE, W., DIEHL, T. S., SELKOE, D. J. and WOLFE, M. S. (2002). Activity-dependent isolation of the presenilin- γ -secretase complex reveals nicastrin and a γ substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 2720-2725.
 230. ESMAELI-AZAD, B., MCCARTHY, J. H. and FEINSTEIN, S. C. (1994). Sense and antisense transfection analysis of *Tau* function: *Tau* influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *J. Cell Sci.* **107**, 869-879.
 231. EVIN, G. and WEIDEMANN, A. (2002). Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides. *Peptides*. **23**, 1285-1297.
 232. FAN, T. J., HAN, L. H., CONG, R. S. and LIANG, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **37**, 719-727.
 233. FARKAS, T., FERRIS, S. H., DE LEON, M. J., CHRISTMAS, D. R., REISBERG, B., ALAVI, A., FOWLER, J. S., GEORGE, A. E. and REIVICH, M. (1982). ¹⁸F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose as a tracer in the positron emission tomographic study of senile dementia. *Am. J. Psychiatry*. **139**, 352-353.
 234. FAROOQUI, A. A., HORROCKS, L. A. and FAROOQUI, T. (2000). Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids. *J. Mol. Neurosci.* **14**, 123-135.
 235. FAROOQUI, A. A., ONG, W.-Y. and HORROCKS, L. A. (2004). Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A₂. *Neurochem. Res.* **29**, 1961-1977.
 236. FARZAN, M., SCHNITZLER, C. E., VASILIEVA, N., LEUNG, D. and CHOE, H. (2000). BACE2, a β -secretase homolog, cleaves at the β -site and within the amyloid- β region of the amyloid- β precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 9712-9717.
 237. FELLER, S. E., GAWRISCH, K. and MACKERELL, A. D. (2002). Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 318-325.
 238. FERNANDES, M. J., ROLLET-LABELLE, E., PARE, G., MAROIS, S., TREMBLAY, M. L., TEILLAUD, J. L. and NACCACHE, P. H. (2006). CD16b associates with high-density, detergent-resistant membranes in human neutrophils. *Biochem. J.* **393**, 351-359.
 239. FERNANDEZ, I., YING, Y., ALBANES, J. and ANDERSON, R. G. W. (2002). Mechanism of caveolin filament assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 11193-11198.
 240. FERRER, I., BLANCO, R., CUTILLAS, B. and AMBROSIO, S. (2000). Fas and Fas-L expression in Huntington's disease and Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **26**, 424-433.
 241. FESUS, L., THOMAZY, V. and FALUS, A. (1987). Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett.* **224**, 104-108.
 242. FETLER, L. and AMIGORENA, S. (2005). Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science*. **309**, 392-393.
 243. FIELDING, C. J., BIST, A. and FIELDING, P. E. (1999). Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts. *Biochemistry*. **38**, 2506-2513.
 244. FIELDING, C. J. and FIELDING, P. E. (2003). Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochim. Biophys. Acta*. **1610**, 219-228.
 245. FIFRE, A., SPONNE, I., KOZIEL, V., KRIEM, B., YEN-POTIN, F. T., BIHAIN, B. E., OLIVIER, J. -L., OSTER, T. and PILLOT, T. (2006). Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid β -peptide induced apoptosis. synergistic involvement of calpain and caspase-3. *J. Biol. Chem.* **281**, 229-240.
 246. FILIPPA, N., SABLE, C. L., FILLOUX, C., HEMMINGS, B. and VAN OBBERGHEN, E. (1999). Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4989-5000.
 247. FLAMENT, S., DELACOURTE, A., HEMON, B. and DEFOSSEZ, A. (1989). Characterization of two pathological *Tau* protein, variants in Alzheimer brain cortices. *J. Neurol. Sci.* **92**, 133-141.
 248. FLECK, M. W., BARRIONUEVO, G. and PALMER, A. M. (2001). Synaptosomal and vesicular accumulation of L-glutamate, L-aspartate and D-aspartate. *Neurochem. Int.* **39**, 217-225.
 249. FLORENT, S., MALAPLATE-ARMAND, C., YOUSSEF, I., KRIEM, B., KOZIEL, V., ESCANYE, M.-C., FIFRE, A., SPONNE, I., LEININGER-MULLER, B., OLIVIER, J.-L., PILLOT, T. and OSTER, T. (2006). Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid- β oligomers. *J. Neurochem.* **96**, 385-395.
 250. FOLK, J. E. (1983). Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed ϵ - (γ -glutamyl) lysine bond formation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **54**, 1-56.
 251. FOLSTEIN, M. F., FOLSTEIN, S. E. and MCHUGH, P. R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* **12**, 189-198.

252. FORTNA, R. R., CRYSTAL, A. S., MORAIS, V. A., PIJAK, D. S., LEE, V. M.-Y. and DOMS, R. W. (2004). Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the γ -secretase complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 3685-3693.
253. FOSTER, L. J., DE HOOG, C. L. and MANN, M. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 5813-5818.
254. FRA, A. M., WILLIAMSON, E., SIMONS, K. and PARTON, R. G. (1995). *De novo* formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 8655-8659.
255. FRADINGER, E. A. and BITAN, G. (2005). En route to early diagnosis of Alzheimer's disease-are we there yet? *Trends Biotechnol.* **23**, 531-533.
256. FRANCIS, R., MCGRATH, G., ZHANG, J., RUDDY, D. A., SYM, M., APFELD, J., NICOLL, M., MAXWELL, M., HAI, B., ELLIS, M. C., PARKS, A. L., XU, W., LI, J., GURNEY, M., MYERS, R. L., HIMES, C. S., HIEBSCH, R., RUBLE, C., NYE, J. and CURTIS, D. (2002). Aph-1 and Pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell*. **3**, 85-97.
257. FRANK, P. G., GALBIATI, F., VOLONTE, D., RAZANI, B., COHEN, D. E., MARCEL, Y. L. and LISANTI, M. P. (2001). Influence of caveolin-1 on cellular cholesterol efflux mediated by high-density lipoproteins. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C1204-C1214.
258. FRASER, S. P., SUH, Y. H. and DJAMGOZ, M. B. (1997). Ionic effects of the Alzheimer's disease β -amyloid precursor protein and its metabolic fragments. *Trends Neurosci.* **20**, 67-72.
259. FRATIGLIONI, L., VIITANEN, M., VON STRAUSS, E., TONTODONATI, V., HERLITZ, A. and WINBLAD, B. (1997). Very old women at higher risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen project, Stockholm. *Neurology*. **48**, 132-138.
260. FRATIGLIONI, L., PAILLARD-BORG, S. and WINBLAD, B. (2004). An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol.* **3**, 343-353.
261. FRIDRIKSSON, E. K., SHIPKOVA, P. A., SHEETS, E. D., HOLOWKA, D., BAIRD, B. and MCLAFFERTY, F. W. (1999). Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry*. **38**, 8056-8063.
262. FRIEDLAND, R. P., BUDINGER, T. F., GANZ, E., YANO, Y., MATHIS, C. A., KOSS, B., OBER, B. A., HUESMAN, R. H. and DERENZO, S. E. (1983). Regional cerebral metabolic alterations in dementia of the Alzheimer type: positron emission tomography with [18 F]fluorodeoxyglucose. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **7**, 590-598.
263. FRISONI, G. B., PADOVANI, A. and WAHLUND, L. O. (2004). The predementia diagnosis of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **18**, 51-53.
264. FUJIMOTO, T., HAGIWARA, H., AOKI, T., KOGO, H. and NOMURA, R. (1998). Caveolae: from a morphological point of view. *J. Electron Microsc.* **47**, 451-460.
265. FUKUYAMA, R., MIZUNO, T., MORI, S., NAKAJIMA, K., FUSHIKI, S. and YANAGISAWA, K. (2000). Age-dependent change in the levels of $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of $A\beta_{42}$ to $A\beta_{40}$ level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. *Eur. Neurol.* **43**, 155-160.
266. FURUKAWA, K., ABE, Y. and AKAIKE, N. (1994). Amyloid β protein-induced irreversible current in rat cortical neurons. *Neuroreport*. **5**, 2016-2018.
267. FUTERMAN, A. H. and HANNUN, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **5**, 777-782.
268. GALLEZ, C. (2005). Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées. *Office parlementaire des politiques de santé publique, bibliothèque des rapports publics* (www.Ladocumentationfrançaise.fr).
269. GAMBLIN, T. C. (2005). Potential structure/function relationships of predicted secondary structural elements of *Tau*. *Biochim. Biophys. Acta*. **1739**, 140-149.
270. GAMOH, S., HASHIMOTO, M., HOSSAIN, S. and MASUMURA, S. (2001). Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **28**, 266-270.
271. GARCIA-CARDENA, G., FAN, R., STERN, D. F., LIU, J. and SESSA, W. C. (1996). Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* **271**, 27237-27240.
272. GARCIA-RUIZ, C., COLELL, A., MARI, M., MORALES, A. and FERNANDEZ-CHECA, J. C. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.* **272**, 11369-11377.
273. GARCIA-SEGURA, L. M., AZCOITIA, I. and DONCARLOS, L. L. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Prog. Neurobiol.* **63**, 29-60.
274. GARRIDO, C., GALLUZZI, L., BRUNET, M., PUIG, P. E., DIDELOT, C. and KROEMER, G. (2006). Mechanisms of

- cytochrome *c* release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **13**, 1423-1433.
275. GEORGE-HYSLOP, P. S., HAINES, J., ROGAEV, E., MORTILLA, M., VAULA, G., PERICAK-VANCE, M., FONCIN, J.-F., MONTESI, M., BRUNI, A., SORBI, S., RAINERO, I., PINESSI, L., POLLEN, D., POLINSKY, R., NEE, L., KENNEDY, J., MACCIARDI, F., ROGAEVA, E., LIANG, Y., ALEXANDROVA, N., LUKIW, W., SCHLUMPF, K., TANZI, R., TSUDA, T., FARRER, L., CANTU, J.-M., DUARA, R., AMADUCCI, L., BERGAMINI, L., GUSELLA, J., ROSES, A., CRAPPER MCLACHLAN, D. (1992). *Nat. Genet.* **2**, 330-334.
 276. GHAYUR, T., HUGUNIN, M., TALANIAN, R. V., RATNOFSKY, S., QINLAN, C., EMOTO, Y., PANDEY, P., DATTA, R., HUANG, Y., KHARBANDA, S., ALLEN, H., KAMEN, R., WONG, W. and KUFE, D. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C δ by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* **184**, 2399-2404.
 277. GIBSON, G. E., ZHANG, H., TORAL-BARZA, L., SZOLOS, S. and TOFEL-GREHL, B. (1996). Calcium stores in cultured fibroblasts and their changes with Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1316**, 71-77.
 278. GIBSON, G. E. and HUANG, H. M. (2004). Mitochondrial enzymes and endoplasmic reticulum calcium stores as targets of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**, 335-340.
 279. GIBSON WOOD, W., ECKERT, G. P., IGBAVBOA, U. and MULLER, W. E. (2003). Amyloid β -protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1610**, 281-290.
 280. GLABE, G. G. (2006). Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging.* **27**, 570-575.
 281. GLEBOV, O. O., BRIGHT, N. A. and NICHOLS, B. J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 46-54.
 282. GLENNER, G. G., HENRY, J. H. and FUJIHARA, S. (1981). Congophilic angiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's degeneration. *Ann. Pathol.* **1**, 120-129.
 283. GLENNER, G. G. and WONG, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 885-890.
 284. GOEDERT, M., SPILLANTINI, M. G., JAKES, R., RUTHERFORD, D. and CROWTHER, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein *Tau*: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* **3**, 519-526.
 285. GOEDERT, M. and JAKES, R. (1990). Expression of separate isoforms of human *Tau* protein: correlation with the *Tau* pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* **9**, 4225-4230.
 286. GOLDGABER, D., LERMAN, M. I., MCBRIDE, O. W., SAFFIOTTI, U. and GAJDUSEK, D. C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science.* **235**, 877-880.
 287. GOLUB, T., WACHA, S. and CARONI, P. (2004). Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 542-550.
 288. GOMEZ-MUNOZ, A., KONG, J., SALH, B. and STEINBRECHER, U. P. (2003). Sphingosine-1-phosphate inhibits acid sphingomyelinase and blocks apoptosis in macrophages. *FEBS Lett.* **539**, 56-60.
 289. GOMEZ-MUNOZ, A., KONG, J. Y., PARHAR, K., WANG, S. W., GANGOITI, P., GONZALEZ, M., EIVEMARK, S., SAHL, B., DURONIO, V. and STEINBRECHER, U. P. (2005). Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett.* **579**, 3744-3750.
 290. GONG, C.-X., SINGH, T. J., GRUNDKE-IQBAL, I. and IQBAL, K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* **61**, 921-927.
 291. GONG, C.-X., LIDSKY, T., WEGIEL, J., ZUCK, L., GRUNDKE-IQBAL, I. and IQBAL, K. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein *Tau* is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **275**, 5535-5544.
 292. GONG, C.-X., LIU, F., WU, G., ROSSIE, S., WEGIEL, J., LI, L., GRUNDKE-IQBAL, I. and IQBAL, K. (2004). Dephosphorylation of microtubule-associated protein *Tau* by protein phosphatase 5. *J. Neurochem.* **88**, 298-310.
 293. GONG, C.-X., LIU, F., GRUNDKE-IQBAL, I. and IQBAL, K. (2005). Post-translational modifications of *Tau* protein in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **112**, 813-838.
 294. GONI, F. M. and ALONSO, A. (2002). Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* **531**, 38-46.
 295. GOODMAN, Y. and MATTSON, M. P. (1996). Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative

- insults, and amyloid β -peptide toxicity. *J. Neurochem.* **66**, 869-872.
296. GOSSETT, R. E., FROLOV, A. A., ROTH, J. B., BEHNKE, W. D., KIER, A. B. and SCHROEDER, F. (1996). Acyl-CoA binding proteins: multiplicity and function. *Lipids*. **31**, 895-918.
 297. GOURAS, G. K., ALMEIDA, C. G. and TAKAHASHI, R. H. (2005). Intraneuronal A β accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. **26**, 1235-1244.
 298. GOUTTE, C., TSUNZAKI, M., HALE, V. A. and PRIESS, J. R. (2002). APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 775-779.
 299. GOUX, W. J., KOPPLIN, L., NGUYEN, A. D., LEAK, K., RUTKOFKY, M., SHANMUGANANDAM, V. D., SHARMA, D., INOUE, H. and KIRSCHNER, D. A. (2004). The formation of straight and twisted filaments from short *Tau* peptides. *J. Biol. Chem.* **279**, 26868-26875.
 300. GRAF, G. A., MATVEEV, S. V. and SMART, E. J. (1999). Class B scavenger receptors, caveolae and cholesterol homeostasis. *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 221-225.
 301. GRALLE, M., BOTHELO, M. M., DE OLIVEIRA, C. L., TORRIANI, I. and FERREIRA, S. T. (2002). Solution studies and structural model of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *Biophys. J.* **83**, 3513-3524.
 302. GRANGIRARD, D., STUDER, D., MONNEY, L., BELSER, T., FELLAY, I., BORNER, C. and MICHEL, M. R. (1998). Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *EMBO J.* **17**, 1268-1278.
 303. GRASSME, H., CREMESTI, A., KOLESNICK, R. and GULBINS, E. (2003). Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene*. **22**, 5457-5470.
 304. GRAVES, A. B., LARSON, E. B., EDLAND, S. D., BOWEN, J. D., MCCORNICK, W. C., MCCURRY, S. M., RICE, M. M., WENSLow, A. and UOMOTO, J. M. (1996). Prevalence of dementia and its subtypes in the Japanese American population in King County, Washington state. The kame project. *Am. J. Epidemiol.* **144**, 760-771.
 305. GRAY, C. W. and PATEL, A. J. (1993). Regulation of β -amyloid precursor protein isoform mRNAs by transforming growth factor- β 1 and interleukin-1 β in astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **19**, 251-256.
 306. GREENBERG, S. M., REBECK, G. W., VONSATTEL, J. P., GOMEZ-ISLA, T. and HYMAN, B. T. (1995). Apolipoprotein E ϵ 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann. Neurol.* **38**, 254-259.
 307. GREENFIELD, J. P., TSAI, J., GOURAS, G. K., HAI, B., THINAKARAN, G., CHECLER, F., SISODIA, S. S., GREENGARD, P. and XU, H. (1999). Endoplasmic reticulum and *trans*-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer β -amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 742-747.
 308. GRIFFITH, L. S. and SCHMITZ, B. (1995). O-linked N-acetylglucosamine is upregulated in Alzheimer brains. *Biochem. Biophys. Res.* **213**, 424-431.
 309. GRIMES, C. A. and JOPES, R. S. (2001). CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 β and facilitated by lithium. *J. Neurochem.* **78**, 1219-1232.
 310. GRIMM, M. O., GRIMM, H. S., PATZOLD, A. J., ZINSER, E. G., HALONEN, R., DUERING, M., TSCHAPE, J. A., DE STROOPER, B., MULLER, U., SHEN, J. and HARTMANN, T. (2005). Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid- β and presenilin. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1118-1123.
 311. GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., TUNG, Y.-C., QINLAN, M., WISNIEWSKI, H. M. and BINDER, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (*Tau*) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 4913-4917.
 312. GU, Y., OYAMA, F. and IHARA, Y. (1996). *Tau* is widely expressed in rat tissues. *J. Neurochem.* **67**, 1235-1244.
 313. GU, Y., CHEN, F., SANJO, N., KAWARAI, T., HASEGAWA, H., DUTHIE, M., LI, W., RUAN, X., LUTHRA, A., MOUNT, H. T., TANDON, A., FRASER, P. E. and GEORGE-HYSLOP, P. S. (2003). Aph-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 7374-7380.
 314. GUO, J. T., YU, J., GRASS, D., DE BEER, F. C. and KINDY, M. S. (2002). Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid A protein in a mouse model of amyloidosis. *J. Neurosci.* **22**, 5900-5909.
 315. GUO, H., ALBRECHT, S., BOURDEAU, M., PETZKE, T., BERGERON, C. and LEBLANC, A. C. (2004). Active caspase-6 and caspase-6-cleaved *Tau* in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **165**, 523-531.
 316. GUSTAFSON, D., ROTHENBERG, E., BLENNOW, K., STEEN, B. and SKOOG, I. (2004). An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch. Intern. Med.* **163**, 1524-1528.
 317. GUSTKE, N., TRINCZEK, B., BIERNAT, J., MANDELKOW, E. M. and MANDELKOW, E. (1994).

- Domains of *Tau* protein and interaction with microtubules. *Biochemistry*. **33**, 9511-9522.
318. GYLYS, K. H., FEIN, J. A., YANG, F. and COLE, G. M. (2004). Enrichment of presynaptic and postsynaptic markers by size-based gating analysis of synaptosome preparations from rat and human cortex. *Cytometry A*. **60**, 90-96.
 319. HAASS, C., HUANG, A. Y., SELKOE, D. J. and TEPLow, D. B. (1998). Mutations associated with a *locus* for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid β -protein precursor. *J. Biol. Chem.* **269**, 17741-17748.
 320. HAGGARTY, P. (2004). Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. *Eur. J. Clin. Nutr.* **58**, 1559-1570.
 321. HAGLUND, K., IVANKOVIC-DIKIC, I., SHIMOKAWA, N., KRUH, G. D. and DIKIC, I. (2004). Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neuritis. *J. Cell Sci.* **117**, 2557-2568.
 322. HALL, E. D., DETLOFF, M. R., JOHNSON, K. and KUPINA, N. C. (2004). Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*. **21**, 9-20.
 323. HAMPTON, M. B. and ORRENIUS, S. (1998). Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors*. **8**, 1-5.
 324. HAN, X., HOLTZMAN, D., MCKEEL, D. W. Jr., KELLEY, J. and MORRIS, J. C. (2002). Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J. Neurochem.* **82**, 809-818.
 325. HANISCH, U. K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. **40**, 140-155.
 326. HANNUN, Y. A. and BELL, R. M. (1989). Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*. **243**, 500-507.
 327. HANSEN, G. H., IMMERDAL, L., THORSEN, E., NIELS-CHRISTIANSEN, L. L., NYSTROM, B. T., DEMANT, E. J. and DANIELSEN, E. M. (2001). Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. *J. Biol. Chem.* **276**, 32338-32344.
 328. HARADA, J., FOLEY, M., MOSKOWITZ, M. A. and WAEBER, C. (2004). Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *J. Neurochem.* **88**, 1026-1039.
 329. HARDER, T., SCHEIFFEL, P., VERKADE, P. and SIMONS, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* **141**, 929-942.
 330. HARDY, J. A. and HIGGINS, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. **256**, 184-185.
 331. HARPER, J. D. and LANSBURY, P. T. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 385-407.
 332. HARTMANN, T., BIEGER, S. C., BRUHL, B., TIENARI, P. J., IDA, N., ALLSOP, D., ROBERTS, G. W., MASTERS, C. L., DOTI, C. G., UNSICKER, K. and BEYREUTHER, K. (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease $A\beta_{40/42}$ amyloid peptides. *Nat. Med.* **3**, 1016-1020.
 333. HARTWOOD, S. M., YAGOOB, M. M. and ALLEN, D. A. (2005). Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann. Clin. Biochem.* **42**, 415-431.
 334. HASEGAWA, M., MORISHIMA-KAWASHIMA, M., TAKIO, K., SUZUKI, M. and IHARA, Y. (1992). Protein sequence and mass spectrometric analysis of *Tau* in the Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* **267**, 17047-17054.
 335. HASHIMOTO, M., HOSSAIN, S., SHIMADA, T., SUGIOKA, K., YAMASAKI, H., FUJII, Y., ISHIBASHI, Y., OKA, J.-I. and SHIDO, O. (2002). Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J. Neurochem.* **84**, 1084-1091.
 336. HASHIMOTO, M., TANABE, Y., FUJII, Y., KIKUTA, T., SHIBATA, H. and SHIDO, O. (2005). Chronic administration of docosahexaenoic acid ameliorates the impairment of spatial cognition learning ability in amyloid- β -infused rats. *J. Nutr.* **135**, 549-555.
 337. HASS, M. R. and YANKNER, B. A. (2005). A γ -secretase-independent mechanism of signal transduction by the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **280**, 36895-36904.
 338. HAYASHI, H., KIMURA, N., YAMAGUSHI, H., HASEGAWA, K., YOKOSEKI, T., SHIBATA, M., YAMAMOTO, N., MICHIKAWA, M., YOSHIKAWA, Y., TERAOKA, K., MATSUZAKI, K., LEMERE, C. A., SELKOE, D. J., NAIKI, H. and YANAGISAWA, K. (2004). A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J. Neurosci.* **24**, 4894-4902.
 339. HEART PROTECTION STUDY COLLABORATIVE GROUP (2002). Study of cholesterol lowering with simvastatin placebo-controlled trial. *Lancet*. **360**, 7-22.
 340. HEBER, S., HERMS, J., GAJIC, V., HAINFELLNER, J., AGUZZI, A., RULICKE, T., VON KRETZSCHMAR, H., VON KOCH, C., SISODIA, S., TREMMEL, P., LIPP, H. P., WOLFER, D. P. and MULLER, U. (2000). Mice with combined knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid

- precursor protein family members. *J. Neurosci.* **20**, 7951-7963.
341. HEINRICH, M., NEUMEYER, J., JAKOB, M., HALLAS, C., TCHIKOV, V., WINOTO-MORBACH, S., WICKEL, M., SCHNEIDER-BRACHER, W., TRAUZOLD, A., HETHKE, A. and SCHUTZE, S. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell death differ.* **11**, 550-563.
 342. HEIRD, W. C. and LAPILLONE, A. (2005). The role of essential fatty acids in development. *Annu. Rev. Nutr.* **25**, 549-571.
 343. HENDRIE, H. C., OSUNTOKUN, B. O., HALL, K. S., OGUNNIYI, A. O., HUI, S. L., UNVERZAGT, F. W., GUREJE, O., RODENBERG, C. A., BAIYEWU, O. and MUSICK, B. S. (1995). Prevalence of Alzheimer's disease and dementia in two communities: Nigerian Africans and African Americans. *Am. J. Psychiatry.* **152**, 1485-1492.
 344. HENKA, M. T., SASTRE, M., DUMITRESCU-OZIMEK, L., DEWTCHE, I., WALTER, J., KLOCKGETHER, T. and VAN LEUVEN, F. (2005). Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J. Neuroinflammation.* **2**, 22.
 345. HERNANDEZ, F., PEREZ, M., LUCAS, J. J., MATA, A. M., BHAT, R. and AVILA, J. (2004). Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in *Tau* exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. *J. Biol. Chem.* **279**, 3801-3806.
 346. HERTEL, C., TERZI, E., HAUSER, N., JAKOB-ROTH, R., SEELIG, J. and KEMP, J. A. (1997). Inhibition of the electrostatic interaction between β -amyloid peptide and membranes prevents β -amyloid-induced toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 9642-9416.
 347. HERZ, J. and BOCK, H. H. (2002). Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 405-434.
 348. HESCHELER, J., ROSENTHAL, W., TRAUTWEIN, W. and SCHULTZ, G. (1987). The GTP-binding protein, G_0 , regulates neuronal calcium channels. *Nature.* **325**, 445-447.
 349. HETMAN, M. and GOZDZ, A. (2004). Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2050-2055.
 350. HILBICH, C., KISTERS-WOIKE, B., REED, J., MASTERS, C. L. and BEYREUTHER, K. (1991). Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid- β A4 peptides of Alzheimer's disease. *J. Mol. Biol.* **218**, 149-163.
 351. HILTBOLD, E. M., POLOSO, N. J. and ROCHE, P. A. (2003). MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J. Immunol.* **170**, 1329-1338.
 352. HIROKAWA, N., SHIOMURA, Y. and OKABE, S. (1988). *Tau* proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J. Cell. Biol.* **107**, 1449-1459.
 353. HO, G. J., DREGO, R., HAKIMIAM, E. and MASLIAH, E. (2005). Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* **4**, 247-256.
 354. HONG, S., GRONERT, K., DEVCHAND, P. R., MOUSSIGNAC, R.-L. and SERHAN, C. N. (2003). Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 14677-14687.
 355. HONTECILLAS, R., WANNENMEULHER, M. J., ZIMMERMAN, D. R., HUTTO, D. L., WILSON, J. H., AHN, D. U. and BASSAGANYA-RIERA, J. (2002). Nutritional regulation of porcine bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid. *J. Nutr.* **132**, 2019-2027.
 356. HOOZEMANS, J. J. M., VEERHUIS, R., ROZEMULLER, J. M. and EIKELENBOOM, P. (2006). Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. *Int. J. Devl. Neuroscience.* **24**, 157-165.
 357. HORIGUCHI, T., URYU, K., GIASSON, B. I., ISCHIROPOULOS, H., LIGHTFOOT, R., BELLMANN, C., RICHTER-LANDSBERG, C., LEE, V. M. and TROJANOWSKI, J. Q. (2003). Nitration of *Tau* protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am. J. Pathol.* **163**, 1021-1031.
 358. HORROCKS, L. A. and FAROOQUI, A. A. (2004). Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **70**, 361-372.
 359. HORROCKS, L. A. and YEO, Y. K. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.* **40**, 211-225.
 360. HOUSE, J. S., LEPKOWSKI, J. M., KINNEY, A. M., MERO, R. P., KESSLER, R. C. and HERZOG, A. R. (1994). The social stratification of aging and health. *J. Health Soc. Behav.* **35**, 213-234.
 361. HSIA, A. Y., MASLIAH, E., MCCONLOGUE, L., YU, G.-Q., TATSUNO, G., HU, K., KHOLODENKO, D., MALENKA, R. C., NICOLL, R. A. and MUCKE, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 3228-3233.
 362. HU, Y. and FORTINI, M. E. (2003). Different cofactor activities in γ -secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex. *J. Cell Biol.* **161**, 685-690.
 363. HUANG, Y. and MAHLEY, R. W. (2006). Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology.

364. HUNG, A. Y. and SELKOE, D. J. (1994). Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of β -amyloid precursor protein. *EMBO J.* **13**, 534-542.
365. HUSE, J. T. and DOMS, R. W. (2000). Cloning in on the amyloid cascade: recent insights in the cell biology of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* **22**, 81-98.
366. HUSSAIN, I., POWELL, D., HOWLETT, D. R., TEW, D. G., MEEK, T. D., CHAPMAN, C., GLOGER, I. S., MURPHY, K. E., SOUTHAN, C. D., RYAN, D. M. SMITH, T. S., SIMMONS, D. L., WALSH, F. S., DINGWALL, C. and CHRISTIE, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol. and Cell Neurosci.* **14**, 419-427.
367. IKEMOTO, A., OHISHI, M., SATO, Y., HATA, N., MISAWA, Y., FUJII, Y. and OKUYAMA, H. (2001). Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced alterations of learning behavior in the rat: level of n-6 fatty acids as another critical factor. *J. Lipid Res.* **42**, 1655-1663.
368. IKONEN, E., HEINO, S. and LUSA, S. (2004) Caveolins and membrane cholesterol. *Biochem. Soc.* **32**, part 1.
369. INESTROSA, N. C., ALVAREZ, A. and CALDERON, F. (1996). Acetylcholinesterase is a senile plaque component that promotes assembly of amyloid β -peptide into Alzheimer's filaments. *Mol. Psychiatry.* **1**, 359-361.
370. INGELSON, M., VANMECHELEN, E. and LANNFELT, L. (1996). Microtubule-associated protein *Tau* in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci. Lett.* **220**, 9-12.
371. INNIS, S. M. (1993). Essential fatty acid requirements in human nutrition. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71**, 699-706.
372. IRIE, F. and HIRABAYASHI, Y. (1998). Application of exogenous ceramide to cultured rat spinal motoneurons promotes survival or death by regulation of apoptosis depending on its concentrations. *J. Neurosci. Res.* **54**, 475-485.
373. IRIE, K., MURAKAMI, K., MASUDA, Y., MORIMOTO, A., OHIGASHI, H., OHASHI, R., TAKEGOSHI, K., NAGAO, M., SHIMIZU, T. and SHIRASAWA, T. (2005). Structure of β -amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 437-447.
374. IWATA, N., TSUBUKI, S., TAKAKI, Y., WATANABE, K., SEKIGUCHI, M., HOSOKI, E., KAWASHIMA-MORISHIMA, M., LEE, H. J., HAMA, E., SEKINE-AIZAWA, Y. and SAIDO, T. C. (2000). Identification of the major $A\beta$ 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* **6**, 718-719.
375. IWATSUBO, T., ODAKA, A., SUZUKI, N., MIZUSAWA, H., NUKINA, N. and IHARA, Y. (1994). Visualization of $A\beta$ ₄₂₍₄₃₎ and $A\beta$ ₄₀ in senile plaques with end-specific $A\beta$ monoclonals: evidence that an initially deposited species is $A\beta$ ₄₂₍₄₃₎. *Neuron.* **13**, 45-53.
376. JACOBSEN, J. S., REINHART, P. and PANGALOS, M. N. (2005). Current concepts in therapeutic strategies targeting cognitive decline and disease modifications of Alzheimer's disease. *NeuroRx.* **2**, 612-626.
377. JACOBSON, M. D., BURNE, J. F. and RAFF, M. C. (1994). Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of nucleus. *EMBO J.* **13**, 1899-1910.
378. JAFFREZOU, J. P., MAESTRE, N., DE MAS-MANSAT, V., BEZOMBES, C., LEVADE, T. and LAURENT, G. (1998). Positive feedback control of neutral sphingomyelinase activity by ceramide. *FASEB J.* **12**, 999-1006.
379. JANA, A. and PAHAN, K. (2004). Fibrillar amyloid- β peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase. Implications for Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **279**, 51451-51459.
380. JANICKE, R. U., SPRENGART, M. L., WATI, M. R. and PORTER, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 9357-9360.
381. JARRETT, J. T., BERGER, E. P. and LANSBURY, P. T. Jr. (1993). The carboxy terminus of the β -amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* **32**, 4693-4697.
382. JARRETT, J. T. and LANSBURY, P. T. Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell.* **73**, 1055-1058.
383. JENSEN, R. G. (1999). Lipids in human milk. *Lipids.* **34**, 1243-1271.
384. JHAMANDAS, J. H. and MACTAVISH, D. (2004). Antagonist of the amylin receptor blocks β -amyloid toxicity in rat cholinergic basal forebrain neurons. *J. Neurosci.* **24**, 5579-5584.
385. JI, Y., JIAN, B., WANG, N., SUN, Y., MOYA, M. L., PHILLIPS, M. C., ROTHBLAT, G. H., SWANEY, J. B. and TALL, A. R. (1997). Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* **272**, 20982-20985.
386. JI, Z. S., MULLENDORFF, K., CHENG, I. H., MIRANDA, R. D., HUANG, Y. and MAHLEY, R. W. (2006). Reactivity of apolipoprotein E4 and amyloid β peptide: lysosomal stability and neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* **281**, 2683-2692.

387. JOSEPH, J. A., SHUKITT-HALE, B. and CASADESUS, G. (2005). Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, S313-S316.
388. JOSEPH, J. A., SHUKITT-HALE, B., CASADESUS, G. and FISHER, D. (2005). Oxidative stress and inflammation in brain aging: nutritional considerations. *Neurochem. Res.* **30**, 927-935.
389. JOSLIN, G., KRAUSE, J. E., HERSHEY, A. D., ADAMS, S. P., FALLON, R. J. and PERLMUTTER, D. H. (1991). Amyloid- β peptide, substance P, and bombesin bind to the serpin-enzyme complex receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 21897-21902.
390. JUMP D. B. (2002) Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 155-164.
391. JUREVICS, H. and MORELL, P. (1995). Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J. Neurochem.* **64**, 895-901.
392. KAETHER, C., LAMMICH, S., EDBAUER, D., ERTL, M., RIETDORF, J., CAPELL, A., STEINER, H. and HAASS, C. (2002). Presenilin-1 affects trafficking and processing of β APP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **158**, 151-161.
393. KAETHER, C. and HAASS, C. (2004). A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid β -peptide generation. *J. Cell Biol.* **167**, 809-812.
394. KAGAN, B. L., AZIMOV, R. and AZIMOVA, R. (2004). Amyloid peptide channel. *J. Membrane. Biol.* **202**, 1-10.
395. KAKIO, A., NISHIMOTO, S.-I., KOZUTSUMI, Y. and MATSUZAKI, K. (2003). Formation of a membrane-active form of amyloid β -protein in raft-like model membranes. *Biochim. Biophys. Res. Com.* **303**, 514-518.
396. KALANT, D. and CIANFLONE, K. (2004). Regulation of fatty acid transport. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 309-314.
397. KALMIJN, S., LAUNER, L. J., OTT, A., WITTEMAN, J. C., HOFMAN, A. and BRETELIER, M. M. (1997). Dietary fat intake and the risk of incidence dementia in the Rotterdam study. *Ann. Neurol.* **42**, 776-782.
398. KALMIJN, S., VAN BOXTEL, M. P. J., OCKE, M., VERSCHUREN, W. M. M., KROMHOUT, D., and LAUNER, L. J. (2004). Dietray intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology*, **62**, 275-280.
399. KALVODOVA, L., KAHYA, N., SCHWILLE, P., EHEHALT, R., VERKADE, P., DRECHSEL, D. and SIMONS K. (2005). Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionics phospholipids *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **280**, 36815-36823.
400. KANG, J. X. and LEAF, A. (1996). Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na^+ channels by directly binding to the channel proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 3542-3546.
401. KAWARABAYASHI, T., SHOGI, M., YOUNKIN, L. H., WEN-LANG, L., DICKSON, D. W., MURAKAMI, T., MATSUBARA, E., ABE, K., ASHE, K. H. and YOUNKIN, S. G. (2004). Dimeric amyloid β protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated *Tau* accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **24**, 3801-3809.
402. KEMPF, M., CLEMENT, A., FAISSNER, A., LEE, G. and BRANDT, R. (1996). *Tau* binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J. Neurosci.* **16**, 5583-5592.
403. KENESSEY, A. and YEN, S. H. (1993). The extent of phosphorylation of fetal *Tau* is comparable of PHF-*Tau* from Alzheimer paired helical filament. *Brain Res.* **629**, 40-46.
404. KIBBEY, M. C., JUCKER, M., WEEKS, B. S., NEVE, R. L., VAN NOSTRAND, W. E. and KLEINMAN, H. K. (1993). β -amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10150-10153.
405. KIDD, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* **197**, 192-193.
406. KIHARA, M., CHATANI, E., SAKAI, M., HASEGAWA, K., NAKAI, H. and GOTO, Y. (2005). Seeding-dependent maturation of β 2 macroglobulin amyloid fibrils at neutral pH. *J. Biol. Chem.* **280**, 12012-12018.
407. KIHARA, T. and SHIMOHAMA, S. (2004). Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. *Acta Neurobiol. Exp.* **64**, 99-105.
408. KILKUS, J., GOSWANI, R., TESTAI, F. D. and DAWSON, G. (2003). Ceramide in rafts (detergent-insoluble fraction) mediates cell death in neurotumor cell lines. *J. Neurosci. Res.* **72**, 65-75.
409. KIM, J. W., CHANG, T. S., LEE, J. E., HUH, S. H., YEON, S. W., YANG, W. S., JOE, C. O., MOOK-JUNG, I., TANZI, R. E., KIM, T. W. and CHOI, E. J. (2001). Negative regulation of the SAPK/JNK signaling pathway by presenilin 1. *J. Cell Biol.* **153**, 457-463.
410. KIM, H. S., LEE, J. H., LEE, J. P., KIM, E. M., CHANG, K. A., PARK, C. H., JEONG, S. J., WITTENDORP, M. C., SEO, J. H. and SUH, Y. H. (2002). Amyloid β peptide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. *Neuroreport.* **13**, 1989-1993.
411. KIM, R., EMI, M. and TANABE, K. (2005). Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer chemoter.*

412. KIM, S., YI, J. S. and KO, Y. G. (2006). Amyloid β oligomerization is induced by brain lipid rafts. *J. Cell Biochem.* **99**, 878-889.
413. KIMBERLY, W. T., ZHENG, J. B., GUENETTE, S. Y. and SELKOE, D. J. (2001). The intracellular domain of the β -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a Notch-like manner. *J. Biol. Chem.* **276**, 40288-40292.
414. KIMBERLY, W. T., LAVOIE, M. J., OSTASZEWSKI, B. L., YE, W., WOLFE, M. S. and SELKOE, D. J. (2002). Complex N-linked glycosylated nicastrin associates with γ -secretase and undergoes tight cellular regulation. *J. Biol. Chem.* **277**, 35113-35117.
415. KIMBERLY, W. T., LA VOIE, M. J., OSTSZEWSKI, B. L., YE, W., WOLFE, M. S. and SELKOE, D. J. (2003). γ -secretase is a membrane protease complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1 and Pen-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 6382-6387.
416. KINS, S., CRAMERI, A., EVANS, D. R., HEMMINGS, B. A., NITSCH, R. M. and GOTZ, J. (2001). Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of *Tau* in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 38193-38200.
417. KINS, S., KUROSINSKI, P., NITSCH, R. M. and GOTZ, J. (2003). Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **163**, 833-843.
418. KIRKHAM, M., FUJITA, A., CHADDA, R., NIXON, S. J., KURZCHALIA, T. V., SHARMA, D. K., PAGANO, R. E., HANCOCK, J. F., MAYOR, S. and PARTON, R. G. (2005). Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vesicles. *J. Cell Biol.* **168**, 465-476.
419. KITAGUCHI, N., TAKAHASHI, Y., TOKUSHIMA, Y., SHIOJIRI, S. and ITO, H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*. **331**, 530-532.
420. KITAJKA, K., PUSKA, L. G., ZVARA, A., HACKLER, L. Jr. BARCELO-COBLIJN, G., YEO, Y. K. and FARKAS, T. (2002). The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 2619-2624.
421. KLEIN, W. L., KRAFFT, G. A. and FINCH, C. E. (2001). Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* **24**, 219-224.
422. KLUNK, W. E., ENGLER, H., NORDBERG, A., WANG, Y., BLOMQVIST, G., HOLT, D. P., BERGSTROM, M., SAVITCHEVA, I., HUANG, G.-F., ESTRADA, S., AUSEN, B., DEBNATH, M. L., BARLETTA, J., PRICE, J. C., SANDELL, J., LOPRESTI, B. J., WALL, A., KOIVISTO, P., ANTONI, G., MATHIS, C. A. and LANGSTROM, B. (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. *Ann. Neurol.* **55**, 306-319.
423. KNOWLES, R. B., WYART, C., BULDYREV, S. V., CRUZ, L., URBANC, B., HASSELMO, M. E., STANLEY, H. E. and HYMAN, B. T. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 5274-5279.
424. KOITSINAHO, M., ORT, M., CIMADEVILLA, J. M., VONDROUS, R., CORDELL, B., KOITSINAHO, J., BURES, J. and HIGGINS, L. S. (2001). Specific spatial learning deficits become severe with age in β -amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse β -amyloid deposits but do not form plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 14675-14680.
425. KOJRO, E., GIMPL, G., LAMMICH, S., MARZ, W. and FAHRENHOLZ, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effects on the α -secretase ADAM10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 5815-5820.
426. KOKUBO, H., HELMS, J. B., OHNO-IWASHITA, Y., SHIMADA, Y., HORIKOSHI, Y. and YAMAGUCHI, H. (2003). Ultrastructural localization of flotillin-1 to cholesterol-rich membrane microdomains, rafts, in rat brain tissue. *Brain Res.* **965**, 83-90.
427. KOLESNICK, R. N., GONI, F. M. and ALONSO, A. (2000). Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell Physiol.* **184**, 285-300.
428. KOLSCH, H., HEUN, R., KERKSIEK, A., BERGMANN, V. K., MAIER, W. and LUTJOHANN, D. (2004). Altered levels of plasma 24S- and 27S-hydroxycholesterol in demented patients. *Neurosci. Lett.* **368**, 303-308.
429. KOO, E. H. and SQUAZZO, S. L. (1994). Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **269**, 17386-17389.
430. KOPAN, R. and GOATE, A. (2002). Aph-2/nicastrin: an essential component of γ -secretase and regulator of Notch signaling and presenilin localization. *Neuron*. **33**, 321-324.
431. KOPAN, R. and ILAGAN, M. X. (2004). γ -secretase: proteasome of the membrane. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 499-504.
432. KOPKE, E., TUNG, Y.-C., SHAIKH, S., ALONSO, A DEL C., IQBAL, K. and GRUNDKE-IQBAL, I. (1993). Microtubule-associated protein *Tau*. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J.*

- Biol. Chem.* **268**, 24374-24384.
433. KORNILOVA, A. Y., BIHEL, F., DAS, C. and WOLFE, M. S. (2005). The initial substrate-binding site of γ -secretase is located on presenilin near the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 3230-3235.
 434. KOSIK, K. S., ORECCHIO, L. D., BAKALIS, S. and NEVE, R. L. (1989). Developmentally regulated expression of specific *Tau* sequences. *Neuron*. **2**, 1389-1397.
 435. KOUDINOV, A. R. and KOUDINOVA, N. V. (2005). Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration. *J. Neurol. Sci.* **229-230**, 233-240.
 436. KOURIE, J. I., HENRY, C. L. and FARRELLY, P. (2001). Diversity of amyloid β protein fragment (1-40)-formed channels. *Cell Mol. Neurobiol.* **21**, 255-284.
 437. KOWALL, N. W. and KOSIK, K. S. (1987). Axonal disruption and aberrant localization of *Tau* protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **22**, 639-643.
 438. KOWALSKA, A. (2004). Genetic basis of neurodegeneration in familial Alzheimer's Disease. *Polish. J. Pharmacol.* **56**, 171-178.
 439. KRAJEWSKA, M., WANG, H. G., KRAJEWSKI, S., ZAPATA, J. M., SHABAIK, A., GASCOYNE, R. and REED, J. C. (1997). Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.* **57**, 1605-1613.
 440. KRIEM, B., SPONNE, I., FIFRE, A., MALAPLATE-ARMAND, C., LOZAC'H-PILLOT, K., KOZIEL, V., YEN-POTIN, F. T., BIHAIN, B., OSTER, T., OLIVIER, J.-L. and PILLOT, T. (2005). Cytosolic phospholipase A_2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid- β peptide. *FASEB J.* **19**, 85-87.
 441. KROEMER, G. (1998). The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell death differ.* **5**, 547.
 442. KUO, Y.-M., EMMERLING, M. R., VIGO-PELFREY, C., KASUNIC, T. C., KIRKPATRICK, J. B., MURDOCH, G. H., BALL, M. J. and ROHER, A. E. (1996). Water soluble $A\beta$ (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* **271**, 4077-4081.
 443. KUO, Y. M., EMMERLING, M. R., WOODS, A. S., COTTER, R. J. and ROHER, A. E. (1997). Isolation, chemical characterization, and quantitation of $A\beta$ 3-pyroglyutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 188-191.
 444. KUROCHKIN, I. V. and GOTO, S. (1994). Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* **345**, 33-37.
 445. KUSHNAREVA, Y., MURPHY, A. N. and ANDREYEV, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome *c* and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem. J.* **368**, 545-553.
 446. LACOR, P. N., BUNIEL, M. C., CHANG, L., FERNANDEZ, S. J., GONG, Y., VIOLA, K. L., LAMBERT, M. P., VELASCO, P. T., BIGIO, E. H., FINCH, C. E., KRAFFT, G. A. and KLEIN, W. L. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid- β oligomers. *J. Neurosci.* **24**, 10191-10200.
 447. LAEMMLI, U. K. and FAVRE, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* **80**, 575-599.
 448. LAFONT, F. and VAN DER GOOT, F. G. (2005). Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol.* **7**, 613-620.
 449. LAMBERT, M. P., BARLOW, A. K., CHROMY, B. A., EDWARDS, C., FREED, R., LIOSATOS, M., MORGAN, T. E., ROZOVSKY, I., TROMMER, B., VIOLA, K. L., WALS, P., ZHANG, C., FINCH, C. E., KRAFFT, G. A. and KLEIN, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from $A\beta_{1-42}$ are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 6448-6453.
 450. LANE, M. A. and BAILEY, S. J. (2005). Role of retinoic signaling in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* **75**, 275-293.
 451. LANGHORST, M. F., REUTER, A. and STUERMER, C. A. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2228-2240.
 452. LANGUI, D., GIRARDOT, N., EL HACHIMI, K. H., ALLINQUANT, B., BLANCHARD, V., PRADIER, L. and DUYSKAERTS, C. (2004). Subcellular topography of neuronal $A\beta$ peptide in APPxPS1 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **165**, 1465-1477.
 453. LAPILLONNE, A., CLARKE, S. D. and HEIRD, W. C. (2004). Polyunsaturated fatty acids and gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**, 151-156.
 454. LAUNER, L. J. (2005). The epidemiologic study of dementia: a life-long quest? *Neurobiol. of aging*. **26**, 335-340.
 455. LAURITZEN, L., HANSEN, H. S., JORGENSEN, M. H. and MICKAELSEN, K. F. (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid Res.* **40**, 1-94.
 456. LAVOIE, M. J., FRAERING, P. C., OSTASZEWSKI, B. L., YE, W., KIMBERLY, W. T., WOLFE, M. S. and SELKOE, D. J. (2003). Assembly of the γ -secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J. Biol. Chem.* **278**, 37213-37222.

457. LAZAROV, O., ROBINSON, J., TANG, Y.-P., HAIRSTON, I. S., KORADE-MIRNICS, Z., LEE, V. M.-Y., HERSH, L. B., SAPOLSKY, R. M., MIRNICS, K. and SISODIA, S. S. (2005). Environmental enrichment reduces A β levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*. **120**, 701-713.
458. LAZEBNIK, Y. A., TAKAHASHI, A., MOIR, R. D., GOLDMAN, R. D., POIRIER, G. G., KAUFMAN, S. H. and EARNSHAW, W. C. (1995). Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 9042-9046.
459. LEBLANC, A. C. (2005). The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death. *Curr. Alzheimer Res.* **2**, 389-402.
460. LE CARRET, N., AURIACOMBE, S., LETENNEUR, L., BERGUA, V., DARTIGUES, J.-F. and FABRIGOULE, C. (2005). Influence of education on the pattern of cognitive deterioration in AD patients: the cognitive reserve hypothesis. *Brain Cogn.* **57**, 120-126.
461. LEDESMA, M. D., BONAY, P., COLAÇO, C. and AVILA, J. (1994). Analysis of microtubule-associated protein *Tau* glycation in paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* **269**, 21614-21619.
462. LEDESMA, M. D., BONAY, P. and AVILA, J. (1995). *Tau* protein from Alzheimer's disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. *J. Neurochem.* **65**, 1658-1664.
463. LEDESMA, M. D., DA SILVA, J. S., SCHEVCHENKO, A., WILM, M. and DOTTI, C. G. (2003). Proteomic characterisation of neuronal sphingolipid-cholesterol microdomains: role in plasminogen activation. *Brain res.* **987**, 107-116.
464. LEE, G., NEVE, R. L. and KOSIK, K. S. (1989). The microtubule binding domain of *Tau* protein. *Neuron*. **2**, 1615-1624.
465. LEE, G. and ROOK, S. L. (1992). Expression of *Tau* protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J. Cell Sci.* **102**, 227-237.
466. LEEM, J. Y., VIJAYAN, S., HAN, P., CAI, D., MACHURA, M., LOPES, K. O., VESELITS, M. L., XU, H. and THINAKARAN, G. (2002). Presenilin-1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. *J. Biol. Chem.* **277**, 19236-19240.
467. LEISSRING, M. A., YAMASAKI, T. R., WASCO, W., BUXBAUM, J. D., PARKER, I. and LAFERLA, F. M. (2000). Calsenilin reverses presenilin-mediated enhancement of calcium signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 8590-8593.
468. LEIST, M. and JAATTELA, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 589-598.
469. LEMERE, C. A., LOPERA, F., KOSIK, K. S., LENDON, C. L., OSSA, J., SAIDO, T. C., YAMAGUSHI, H., RUIZ, A., MARTINEZ, A., MADRIGAL, L., HINCAPIE, L., ARANGO, J. C., ANTHONY, D. C., KOO, E. H., GOATE, A. M., SELKOE, D. J. and ARANGO, J. C. (1996). The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A β_{42} deposition and severe cerebellar pathology. *Nat. Med.* **2**, 1146-1150.
470. LENDON, C. L., ASHALL, F. and GOATE, A. M. (1997). Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. *JAMA*. **277**, 825-831.
471. LENNERNAS, H. and FAGER, G. (1997). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin. Pharmacokinet.* **32**, 403-425.
472. LEPAGE, G. and ROY, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* **27**, 114-120.
473. LEROY, P., NICOLAS, A., THIOUDELLET, C., OSTER, T., WELLMAN, M. and SIEST, G. (1993). Rapid liquid chromatographic assay of glutathione in cultured cells. *Biomed. Chromatogr.* **7**, 86-89.
474. LESLIE, N. R. and DOWNES, C. P. (2002). PTEN: the down side of PI3-kinase signaling. *Cell Signal.* **14**, 285-295.
475. LEVADE, T., MALAGARIE-CAZENAVE, S., GOUAZE, V., SEGUI, B., TARDY, C., BETITO, S., ANDRIEU-ABADIE, N. and CUVILLIER, O. (2002). Ceramide in apoptosis: a revisited role. *Neurochem. Res.* **27**, 601-607.
476. LEVANT, B., RADEL, J. D. and CARLSON, S. E. (2004). Decreased brain docosahexaenoic acid during development alters dopamine-related behaviours in adult rats that are differentially affected by dietary remediation. *Behavior. Brain Res.* **152**, 49-57.
477. LEVY-LAHAD, E., WIJSMAN, E. M., NEMENS, E., ANDERSON, L., GODDART, K. A., WEBER, J. L., BIRD, T. D. and SCHELLENBERG, G. D. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*. **269**, 970-973.
478. LEWCZUK, P., ESSELMANN, H., OTTO, M., MALER, J. M., HENKEL, A. W., EIKELBERG, O., ANTZ, C., KRAUSE, W. P., REULBACH, U., KORNHUBER, J. and WILTFANG, J. (2004). Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF A β_{42} , A β_{42} /A β_{40} ratio and total *Tau*. *Neurobiol. Aging*. **25**, 273-281.
479. LI, X. and GREENWALD, I. (1996). Membrane topology of the *c. elegans* SEL-12 presenilin. *Neuron*. **17**, 1015-1021.
480. LI, X. and GREENWALD, I. (1998). Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *caenorhabditis*

- elegans* and human presenilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 7109-7114.
481. LI, S., COUET, J. and LISANTI, M. P. (1996). Src tyrosine kinases, G α subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 29182-29190.
 482. LI, J., XU, M., ZHOU, H., MA, J. and POTTER, H. (1997). Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. *Cell*. **90**, 917-927.
 483. LI, K., LI, Y., SHELTON, J. M., RICHARDSON, J. A., SPENCER, E., CHEN, Z. J., and WILLIAMS, R. S. (2000). Cytochrome *c* deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*. **101**, 389-399.
 484. LI, G., HIGDON, R., KUKULL, W. A., PESKIND, E., VAN VALEN MOORE, K., TSUANG, D., VAN BELLE, G., MACCORMICK, W., BOWEN, J. D., TERI, L., SCHELLENBERG, G. D. and LARSON, E. B. (2004). Statin therapy and risk of dementia in the elderly: a community-based prospective cohort study. *Neurology*. **63**, 1624-1628.
 485. LI, Q., WANG, M., TAN, L., WANG, C., MA, J., LI, N., LI, Y., XU, G. and LI, J. (2005) Docosahexaenoic acid changes lipid composition and interleukin-2 receptor signaling in membrane rafts. *J. Lipid Res.* **46**, 1904-1913.
 486. LI, Q., TAN, L., WANG, C., LI, N., LI, Y., XU, G. and LI, J. (2006) Polyunsaturated eicosapentaenoic acid changes lipid composition in lipid rafts. *Eur. J. Nutr.* **45**, 144-151.
 487. LIM, G. P., CHU, T., YANG, F., BEECH, W., FRAUTSCHY, S. A. and COLE, G. M. (2001). The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* **21**, 8370-8377.
 488. LIM, G. P., CALON, F., MORIHARA, T., YANG, F., TETER, B., UBEDA, O., SALEM, N. Jr., FRAUTSCHY, S. A. and COLE, G. M. (2005). A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J. Neurosci.* **25**, 3032-3040.
 489. LIM, S. and SUZUKI, H. (2001). Changes in maze behavior of mice occur after sufficient accumulation of docosahexaenoic acid in brain. *J. Nutr.* **131**, 319-324.
 490. LIN, L. L., WARTMANN, M., LIN, A. Y., KNOF, J. L., SETH, A. and DAVIS, R. J. (1993). cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*. **72**, 269-278.
 491. LIN, H., BHATIA, R. and LAL, R. (2001). Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.* **15**, 2433-2444.
 492. LINDWALL, G. and COLE, R. D. (1984). Phosphorylation affects the ability of *Tau* protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* **259**, 5301-5305.
 493. LING, Y., MORGAN, K. and KALSHEKER, N. (2003). Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 1505-1535.
 494. LIU, B. and HANNUN, Y. A. (1997). Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J. Biol. Chem.* **272**, 16281-16287.
 495. LIU, Y., DARGUSCH, R. and SCHUBERT, D. (1997). β amyloid toxicity does not require RAGE protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 37-40.
 496. LIU, F., IQBAL, K., GRUNDKE-IQBAL, I. and GONG, C.-X. (2002). Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of *Tau* by cdk5 and GSK-3 β . *FEBS Lett.* **530**, 209-214.
 497. LO, A. C., HOUENOU, L. J. and OPPENHEIM, R. W. (1995). Apoptosis in the nervous system: morphological features, methods, pathology, and prevention. *Arch. Histol. Cytol.* **58**, 139-149.
 498. LORENZO, A. and YANKNER, B. A. (1994). β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 12243-12247.
 499. LOVESTONE, S. and REYNOLDS, C. H. (1997). The phosphorylation of *Tau*: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience*. **78**, 309-324.
 500. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. and RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 501. LUCHSINGER, J. A., TANG, M. W., SHEA, S. and MAYEUX, R. (2002). Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **59**, 1258-1263.
 502. LUE, L. F., KUO, Y. M., ROHER, A. E., BRACHOVA, L., SHEN, Y., SUE, L., BEACH, T., KURTH, J. H., RYDEL, R. E. and ROGERS, J. (1999). Soluble amyloid- β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **155**, 853-862.
 503. LUKIW, W. J., PAPPOLLA, M., PELAEZ, R. P. and BAZAN, N. G. (2005). Alzheimer's disease: a dysfunction in cholesterol and lipid metabolism. *Cell Mol. Neurobiol.* **25**, 475-483.
 504. LUND, E. G., GUILLEYARDO, J. M. and RUSSELL, D. W. (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **26**, 7238-7243.
 505. LUND, E. G., XIE, C., KOTTI, T., TURLEY, S. D., DIETSCH, J. M. and RUSSELL, D. W. (2003). Knockout of the cholesterol

- 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J. Biol. Chem.* **278**, 22980-22988.
506. LUO, Y., BOLON, B., KHAN, S., BENNETT, B. D., BABU-KHAN, S., DENIS, S. P., FAN, W. S., KHA, H., ZHANG, J., GONG, Y., MARTIN, L., LOUIS, J. C., YAN, Q., RICHARDS, W. G., CITRON, M. and VASSAR, R. (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. *Nat. Neurosci.* **4**, 231-232.
 507. LUTJOHANN, D. and VON BERGEN, K. (2003). 24S-hydroxycholesterol: a marker of brain cholesterol metabolism. *Pharmacopsychiatry*. **36**, S102-S106.
 508. LYRAS, L., CAIRNS, N. J., JENNER, A., JENNER, P. and HALLIWELL, B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **68**, 2061-2069.
 509. MACEYKA, M., PAYNE, S. G., MILSTIEN, S. and SPIEGEL, S. (2002). Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*. **1585**, 193-201.
 510. MADORE, N., SMITH, K. L., GRAHAM, C. H., JEN, A., BRADY, K., HALL, S. and MORRIS, R. (1999). Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J.* **18**, 6917-6926.
 511. MAHLEY, R. W., WEISGRABER, K. H. and HUANG, Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 5644-5651.
 512. MAJNO, G. and JORIS, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**, 3-15.
 513. MALAPLATE-ARMAND, C., FLORENT-BECHARD, S., YOUSSEF, I., KOZIEL, V., SPONNE, I., KRIEM, B., LEININGER-MULLER, B., OLIVIER, J.-L., OSTER, T. and PILLOT, T. (2006). Soluble oligomers of amyloid- β peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA₂-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol. Dis.* **23**, 178-189.
 514. MANDYBUR, T. I. and CHUIRAZZI, C.C. (1990). Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. *Neurology*. **40**, 635-639.
 515. MARCHESELLI, V. L., HONG, S., LUKIW, W. J., TIAN, X. H., GRONERT, K., MUSTO, A., HARDY, M., GIMENEZ, J. M., CHIANG, N., SERHAN, C. N. and BAZAN, N. G., (2003). Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 43807-43817.
 516. MARCHESINI, N. and HANNUN, Y. A. (2004). Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 27-44.
 517. MARKESBERY, W. R. (1999). The role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **56**, 1449-1452.
 518. MARTIN, D. S. D., SPENCER, P., HORROBIN, D. F. and LYNCH, M. A. (2002). Long-term potentiation in aged rats is restored when the age-related decrease in polyunsaturated fatty acid concentration is reversed. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **67**, 121-130.
 519. MARTINOU, J. C., DUBOIS-DAUPHIN, M., STAPLE, J. K., RODRIGUEZ, I., FRANKOWSKI, H., MISSOTTEN, M., ALBERTINI, P., TALABOT, D., CATSICAS, S., PIETRA, C. and HUARTE, J. (1994). Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*. **13**, 1017-1030.
 520. MASDEU, J. C., ZUBIETA, J. L. and ARBIZU, J. (2005). Neuroimaging as a marker of the onset and progression of Alzheimer's disease. *J. Neurological Sci.* **236**, 55-64.
 521. MATTSON, M. P., KELLER, J. N. and BEGLEY, J. G. (1998). Evidence for synaptic apoptosis. *Exp. Neurol.* **153**, 35-48.
 522. MATTSON, M. P., CUTLER, R. G. and JO, D.-G. (2005). Alzheimer peptides perturb lipid-regulating enzymes. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1045-1046.
 523. MATVEEV, S., VAN DER WESTHUYZEN, D. R. and SMART, E. J. (1999). Co-expression of scavenger receptor-BI and caveolin-1 is associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages. *J. Lipid Res.* **40**, 1647-1654.
 524. MAY, P. C., BOGGS, L. N. and FUSON, K. S. (1993). Neurotoxicity of human amylin in rat primary hippocampal cultures: similarity to Alzheimer's disease amyloid- β neurotoxicity. *J. Neurochem.* **61**, 2330-2333.
 525. MAYOR, S., ROTHBERG, K. G. and MAXFIELD, F. R. (1994). Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science*. **264**, 1948-1951.
 526. MAYOR, S. and MAXFIELD, F. R. (1995). Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface alter detergent treatment. *Mol. Biol. Cell.* **6**, 929-944.
 527. MCCANN, J. C. and AMES, B. N. (2005). Is docosahexaenoic acid, an n-3 long chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**, 281-295.
 528. MCGEER, P. L. and MCGEER, E. G. (2006). NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol. Aging*. **In press**.
 529. MCGINNIS, K. M., WHITTON, M. M., GREGY, M. E. and WANG, K. K. (1998). Calcium/calmodulin-dependent protein

- kinase IV is cleaved by caspase-3 and calpain in SH-SY5Y human neuroblastoma cells undergoing apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 19993-20000.
530. MCLEAN, C. A., CHERNY, R. A., FRASER, F. W., FULLER, S. J., SMITH, M. J., BEIREUTHER, K., BUSH, A. I. and MASTERS, C. L. (1999). Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **46**, 860-866.
 531. MELLON, S. H. and GRIFFIN, L. D. (2002). Synthesis, regulation, and function of neurosteroids. *Endocr. Res.* **28**, 463.
 532. MEUNIER-DURMORT, C., POIRIER, H., NIOT, I., FOREST, C. and BESNARD, P. (1996). Up-regulation of the expression of the gene for liver fatty acid-binding protein by long-chain fatty acids. **319**, 493-497.
 533. MICHALIK, L., DESVERGNE, B. and WAHLI, B. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors β/δ : emerging roles for a previously neglected third family member. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**, 129-135.
 534. MIELKE, M. M., ZANDI, P. P., SJOGREN, M., GUSTAFSON, D., OSTLING, S., STEEN, B. and SKOOG, I. (2005). High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology.* **64**, 1689-1695.
 535. MILLER, M. L. and JOHNSON, G. V. (1995). Transglutaminase cross-linking of the *Tau* protein. *J. Neurochem.* **65**, 1760-1770.
 536. MINN, A. J., VELEZ, P., SCHENDEL, S. L., LIANG, H., MUCHMORE, S. W., FESIK, S. W., FILL, M. and THOMPSON, C. B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature.* **385**, 353-357.
 537. MINTZER, J. E. (2004). What are the challenges faced by psychiatrists in the management of Alzheimer's disease? *CNS Spectr.* **S5**, 13-15.
 538. MIRAVALLE, L., TOKUDA, T., CHIARLE, R., GIACCONE, G., BUGIANO, O., TAGLIAVINI, F., FRANGIONE, B. and GHISO, J. (2000). Substitutions at codon 22 of Alzheimer's A β peptide induce diverse conformational changes and apoptotic effects in human cerebral endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 27110-27116.
 539. MITCHELL, D. C. and LITMAN, B. J. (1998). Molecular order and dynamics in bilayers consisting of highly polyunsaturated phospholipids. *Biophys. J.* **74**, 879-891.
 540. MOCCHETTI, I. (2005). Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2283-2294.
 541. MODREGO, P. J., FAYED, N. and PINA, M. A. (2005). Conversion from mild cognitive impairment to probable Alzheimer's disease predicted by brain magnetic resonance spectroscopy. *Am. J. Psychiatry.* **162**, 667-675.
 542. MONIER, S., PARTON, R. G., VOGEL, F., BEHLKE, J., HENSKE, A. and KURZCHALIA, T. V. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Biol. Cell.* **6**, 911-927.
 543. MONTINE, K. S., QUINN, J. F., ZHANG, J., FESSEL, J. P., ROBERTS, L. J., MORROW, J. D. and MONTINE, T. J. (2004). Isoprostanes end related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chem. Phys. Lipids.* **128**, 117-124.
 544. MONTINE, T. J. and MORROW, J. D. (2005). Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **166**, 1283-1289.
 545. MOOLMAN, D. L., VITOLO, O. V., VONSATTEL, J. P. and SHELANSKI, M. L. (2004) Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J. Neurocytol.* **33**, 377-387.
 546. MORGAN, C., COLOMBRES, M., NUNEZ, M. T. and INESTROSA, N. C. (2004). Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **74**, 323-349.
 547. MORISHIMA-KAWASHIMA, M., HASEGAWA, M., TAKIO, K., SUZUKI, M., TITANI, K. and IHARA, Y. (1993). Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed *Tau* in paired helical filaments. *Neuron.* **10**, 1151-1160.
 548. MORISHIMA-KAWASHIMA, M. and IHARA, Y. (1998). The presence of amyloid β -protein in the detergent-insoluble membrane compartment of human neuroblastoma cells. *Biochemistry.* **37**, 15247-15253.
 549. MORRIS, M. C., EVANS, D. A., BIENIAS, J. L., TANGNEY, C. C., BENNETT, D. A., WILSON, R. S., AGGARWAL, N. and SCHNEIDER, J. (2003). Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **60**, 923-924.
 550. MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55-63.
 551. MOUSSEAU, N. and DERREUMEUX, P. (2005). Exploring the early steps of amyloid peptide aggregation by computers. *Acc. Chem. Res.* **38**, 885-891.
 552. MUKHERJEE, P. K., MARCHESELLI, V. L., SERHAN, C. N. and BAZAN, N. G. (2004). Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 8491-8496.
 553. MUKHERJEE, S. and MAXFIELD, F. R. (2000). Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic.* **1**, 203-211.

554. MULLAN, M., HOULDEN, H., WINDELSPECHT, M., FIDANI, L., LOMBARDI, C., DIAZ, P., ROSSOR, M., CROOK, R., HARDY, J., DUFF, K. and CRAWFORD, F. (1992). A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the α 1-antichymotrysin gene. *Nat. Genet.* **2**, 340-342.
555. MULOT, S. F., HUGHES, K., WOODGETT, J. R., ANDERTON, B. H. and HANGER, D. P. (1994). PHF-Tau from Alzheimer's brain comprises four species on SDS-PAGE which can be mimicked by *in vitro* phosphorylation of human Tau by glycogen synthase kinase-3 β . *FEBS Lett.* **349**, 359-364.
556. MURTHY, S. N., WILSON, J. H., LUKAS, T. J., KURET, J. and LORAND, L. (1998). Cross-linking sites of the human Tau protein, probed by reactions with human transglutaminase. *J. Neurochem.* **71**, 2607-2614.
557. NAGÈLE, R. G., WEGIEL, J., VENKATARAMAN, V., IMAKI, H., WANG, K.-C. and WIGIEL, J. (2004). Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. **25**, 663-674.
558. NAKASHIMA, H., ISHIHARA, T., YOKOTA, O., TERADA, S., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V. M.-Y. and KURODA, S. (2004). Effects of α -tocopherol on an animal model of tauopathies. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 176-186.
559. NEBL, T., PESTONJAMASP, K. N., LESZYK, J. D., CROWLEY, J. L., OH, S. W. and LUNA, E. J. (2002). Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **277**, 43399-43409.
560. NELSON, L. M. (1995). Epidemiology of ALS. *Clin. Neurosci.* **3**, 327-331.
561. NESTOR, P. J., CAINE, D., FRYER, T. D., CLARKE, J. and HODGES, J. R. (2003). The topography of metabolic deficits in posterior cortical atrophy (the visual variant of Alzheimer's disease) with FDG-PET. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **74**, 1521-1529.
562. NEUMANN-GIESEN, C., FALKENBACH, B., BEICHT, P., CLAASEN, S., LUERS, G., STUERMER, C. A., HERZOG, V. and TIKKANEN, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem. J.* **378**, 509-518.
563. NEURINGER, M., CONNOR, W. E., VAN PETTEN, C. and BARSTAD, L. (1984). Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys. *J. Clin. Invest.* **73**, 272-276.
564. NICHOLS, B. (2003). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell Sci.* **116**, 4707-4714.
565. NICOLL, J. A. R., YAMADA, M., FRACKOWIAK, J., MAZUR-KOLECKA, B. and WELLER, R. O. (2004). Cerebral amyloid angiopathy plays a direct role in the pathogenesis of Alzheimer's disease pro-CAA position statement. *Neurobiol. Aging*. **25**, 589-597.
566. NICOTERA, P., LEIST, M. and FERRANDO-MAY, E. (1999). Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem. Soc. Symp.* **66**, 69-73.
567. NILSBERG, C., WESTLIND-DANIELSSON, A., ECKMAN, C. B., CONDRON, M. M., AXELMAN, K., FORSELL, C., STENH, C., LUTTMAN, J., TEPLow, D. B., YOUNKIN, S. G., NASLUND, J. and LANNFELT, L. (2001). The "arctic" APP mutation (E693)G causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat. Neurosci.* **4**, 887-893.
568. NIXON, R. A. (2004). Niemann-Pick type C disease and Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **164**, 757-761.
569. NUNAN, J. and SMALL, D. H. (2000). Regulation of APP cleavage by α -, β -, and γ -secretases. *FEBS Lett.* **483**, 6-10.
570. NUNOMURA, A., PERRY, G., ALIEV, G., HIRAI, K., TAKEDA, A., BALRAJ, E. K., JONES, P. K., GHANBARY, H., WATAYA, T., SHIMOHAMA, S., CHIBA, S., ATWOOD, C. S., PETERSON, R. B. and SMITH, M. A. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 759-767.
571. ODA, T., WALS, P., OSTERBURG, H. H., JOHNSON, S. A., PASINETTI, G. M., MORGAN, T. E., ROGOVSKY, I., STINE, S. W., SNYDER, S. W., HOLZMAN, T. F., KRAFFIT, G. A. and FINCH, C. E. (1995). Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid β -peptide (A β ₁₋₄₂) and forms slowly sedimenting A β complexes that cause oxidative stress. *Exp. Neurol.* **136**, 22-31.
572. OKAMOTO, T., TAKEDA, S., GIAMBARELLA, U., MURAYAMA, Y., MATSUI, T., KATADA, T., MATSUURA, Y. and NISHIMOTO, I. (1996). Intrinsic signaling function of APP as a novel target of three V642 mutations linked to familial Alzheimer's disease. *EMBO J.* **15**, 3769-3777.
573. OLIVERA, A. and SPIEGEL, S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*. **365**, 557-560.
574. OLIVERA, A., KOHAMA, T., EDSALL, L., NAVA, V., CUVILLIER, O., POULTON, S. and SPIEGEL, S. (1999). Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J. Cell Biol.* **147**, 545-558.
575. OLSON, M. I. and SHAW, C. M. (1969). Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain*. **92**, 147-156.

576. ONO, K., YOSHIIKE, Y., TAKASHIMA, A., HASEGAWA, K., NAIKI, H. and YAMADA, M. (2003). Potent anti-amyloidogenic and fibrils-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **87**, 172-181.
577. ONO, K., HASEGAWA, K., NAIKI, H. and YAMADA, M. (2004). Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. *J. Neurosci. Res.* **75**, 742-750.
578. OPPENHEIM, R. W., PREVETTE, D., TYTELL, M. and HOMMA, S. (1990). Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo *in vivo* requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev. Biol.* **138**, 104-113.
579. OSBORNE, T. F. (2000). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* **275**, 32379-32382.
580. OWADA, Y., UTSUNOMIYA, A., YOSHIMOTO, T. and KONDO, H. (1997). Expression of mRNA for Akt, serine-threonine protein kinase, in the brain during development and its transient enhancement following axotomy of hypoglossal nerve. *J. Mol. Neurosci.* **9**, 27-33.
581. OWENS, K. (1966). A two-dimensional thin-layer chromatographic procedure for the estimation of plasmalogens. *Biochem. J.* **100**, 354-361.
582. PANZA, F., SOLFRIZZI, V., COLACICCO, A. M., D'INTRONO, A., CAPURSO, C., TORRES, F., DEL PARIGI, A., CAPURSO, S. and CAPURSO, A. (2004). Mediterranean diet and cognitive decline. *Public health Nutr.* **7**, 959-963.
583. PARNETTI, L., LANARI, A., SILVESTRELLI, G., SAGGESE, E. and REBOLDI, P. (2006). Diagnosing prodromal Alzheimer's disease: role of CSF biochemical markers. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 129-132.
584. PARTON, R. G. and RICHARDS, A. A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*. **4**, 724-738.
585. PATEL, N. V., GORDON, M. N., CONNOR, K. E., GOOD, R. A., ENGELMAN, R. W., MASON, J., MORGAN, D. G., MORGAN, T. E. and FINCH, C. E. (2005). Caloric restriction attenuates A β -deposition in Alzheimer transgenic models. *Neurobiol. Aging*. **26**, 995-1000.
586. PAYNE, S. G., MILSTIEN, S. and SPIEGEL, S. (2002). Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* **531**, 54-57.
587. PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B. E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. and COBB, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**, 153-183.
588. PEI, J. J., TANAKA, T., TUNG, Y. C., BRAAK, E., IQBAL, K. and GRUNDKE-IQBAL, I. (1997). Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 70-78.
589. PELKMANS, L. (2005). Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim. Biophys. Acta.* **1746**, 295-304.
590. PELKMANS, L. and ZERIAL, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*. **436**, 128-133.
591. PEREZ, R. G., ZHENG, H., VAN DER PLOEG, L. H. T. and KOO, E. H. (1997). The β -amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J. Neurosci.* **17**, 9407-9414.
592. PERMANNE, B., ADESSI, C., FRAGA, S., FROSSARD, M. J., SABORIO, G. P. and SOTO, C. (2002). Are β -sheet breaker peptides dissolving the therapeutic problem of Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* **62**, 293-301.
593. PETTUS, B. J., CHALFANT, C. E. and HANNUN, Y. A. (2004). Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta.* **1585**, 114-125.
594. PFRIEGER, F. W. (2003). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 1158-1171.
595. PING, S. E. and BARRETT, G. L. (1998). Ceramide can induce cell death in sensory neurons, whereas ceramide analogues and sphingosine promote survival. *J. Neurosci.* **54**, 206-213.
596. PIKE, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655-667.
597. PIKE, L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* **378**, 281-292.
598. PILLOT, T., GOETHALS, M., VANLOO, B., TALUSSOT, C., BRASSEUR, R., VANDERKERCKHOVE, J., ROSSENEU, M. and LINS, L. (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer β -amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **271**, 28757-28765.
599. PILLOT, T., DROUET, B., QUEILLE, S., LABEUR, C., VANDERKERCKHOVE, J., ROSSENEU, M., PINÇON-RAYMOND, M. and CHAMBAZ, J. (1999). The nonfibrillar amyloid β -peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J. Neurochem.* **73**, 1626-1634.
600. PITAS, R. E., BOYLES, J. K., LEE, S. H., FOSS, D. and

- MAHLEY, R. W. (1987). Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*. **917**, 148-161.
601. PODLISNY, M. B., CITRON, M., AMARANTE, P., SHERRINGTON, R., XIA, W., ZHANG, J., DIEHL, T., LEVESQUE, G., FRASER, P., HAASS, C., KOO, E. H. M., SEUBERT, P., GEORGE-HYSLOP, P. S., TEPLow, D. B. and SELKOE, D. J. (1997). Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr²⁹¹ and Ala²⁹⁹ and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiol. Disease*. **3**, 325-337.
602. POIRIER, J. (2005). Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. **26**, 355-361.
603. POLING, J. S., VICINI, S., ROGAWSKI, A. and SALEM, N. Jr. (1996). Docosahexaenoic acid block of neuronal voltage-gated K⁺ channels: subunit selective antagonism by zinc. *Neuropharmacology*. **35**, 969-982.
604. POLSTER, B. M. and FISKUM, G. (2004). Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J. Neurochem*. **90**, 1281-1289.
605. PRINETTI, A., CHIGORNO, V., TETTAMANTI, G. and SINNINO, S. (2000). Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J. Biol. Chem*. **275**, 11658-11665.
606. PROBST, A., BASLER, V., BRON, B. and ULRICH, J. (1983). Neuritic plaques in senile dementia of Alzheimer type: a Golgi analysis in the hippocampal region. *Brain Res*. **6**, 249-254.
607. PROBST, A., LANGUI, D. and ULRICH, J. (1991). Alzheimer's disease: a description of the structural lesions. *Brain Pathol*. **4**, 229-239.
608. PUGLIELLI, L., TANZI, R. E. and KOVACS, D. M. (2003). Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat. Neurosci*. **6**, 345-351.
609. PUSHKAREVA, M., OBEID, L. M. and HANNUN, Y. A. (1995). Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunol. Today*. **5**, 294-297.
610. PUSKAS, L. G., KITAJKA, K., NYAKAS, C., BARCELO-COBLIJN, G. and FARKAS, T. (2002). Short term administration of ω 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 1580-1585.
611. QI, J. S. and QIAO, J. T. (2001). Amyloid β -protein fragment 31-35 forms ion channels in membrane patches excised from rat hippocampal neurons. *Neuroscience*. **105**, 845-852.
612. QIU, W. Q., YE, Z., KHOLODENKO, D., SEUBERT, P. and SELKOE, D. J. (1997). Degradation of amyloid β -protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *J. Biol. Chem*. **272**, 6641-6646.
613. RADEVA, G., PERABO, J. and SHAROM, F. J. (2005). P-Glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains. *FASEB J*. **272**, 4924-4937.
614. RAMPON, C., TANG, Y. P., GOODHOUSE, J., SHIMIZU, E., KYIN, M. and TSIEN, J. Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDA AR1 knockout mice. *Nat. Neurosci*. **3**, 238-244.
615. RAPOPORT, S. I., CHANG, M. C. and SPECTOR, A. A. (2001). Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *J. Lipid Res*. **42**, 678-685.
616. RAPOPORT, M., DAWSON, H. N., BINDER, L. I., VITEK, M. P. and FERREIRA, A. (2002). Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 6364-6339.
617. RAZANI, B., WOODMAN, S. E. and LISANTI, M. P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev*. **54**, 431-467.
618. 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**, 1-13.
619. REED, J. C., ZHA, H., AIME-SEMPE, C., TAKAYAMA, S. and WANG, H. G. (1996). Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv. Exp. Med. Biol*. **406**, 99-112.
620. REFOLO, L. M., PAPPOLLA, M. A., LAFRANCOIS, J., MALESTER, B., SCHMIDT, S. D., THOMAS-BRYANT, T., TINT, G. S., WANG, R., MERCKEN, M., PETANCESKA, S. S. and DUFF, K. E. (2001). A cholesterol-lowering drug reduces β -amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis*. **8**, 890-899.
621. REINHARD, C., HEBERT, S. S. and DE STROOPER, B. (2005). The amyloid- β precursor protein: integrating structure with biological functions. *EMBO J*. **24**, 3996-4006.
622. REYES, A. E., CHACON, M. A., DINAMARCA, M. C., CERPA, W., MORGAN, C. and INESTROSA, N. C. (2004). Acetylcholinesterase-A β complexes are more toxic than A β fibrils in rat hippocampus. *Am. J. Pathol*. **164**, 2163-2174.
623. REYNOLDS, M. R., LUKAS, T. J., BERRY, R. W. and BINDER, L. I. (2006). Peroxynitrite-mediated Tau modifications stabilize preformed filaments and destabilize microtubules through distinct mechanisms. *Biochemistry*. **45**, 4314-4326.
624. ROBAKIS, N. K., WISNIEWSKI, H. M., JENKINS, E. C.,

- DEVINE-GAGE, E. A., HOUCK, G. E., YAO, X. L., RAMAKRISHNA, N., WOLFE, G., SILVERMAN, W. P. and BROWN, W. T. (1987). Chromosome 21q21 sublocalization of gene encoding β -amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet*. **1**, 384-385.
625. ROBINSON, D. R., XU, L. L., TATENO, S., GUO, M. and COVIN, R. B. (1993). Suppression of autoimmune disease by dietary n-3 fatty acids. *J. Lipid Res.* **34**, 1435-1444.
626. ROBINSON, B. S., HIL, C. S., POULOS, A. and FERRATE, A. (1997). Activation of neutral sphingomyelinase in human neutrophils by polyunsaturated fatty acids. *Immunology*. **91**, 274-280.
627. ROCKWOOD, K., KIRKLAND, S., HOGAN, D. B., MACKNIGHT, C., MERRY, H., VERREAULT, R., WOLFSON, C. and MCDOWELL, I. (2002). Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch. Neurol.* **59**, 223-227.
628. ROGAEV, E. I., SHERRINGTON, R., ROGAEVA, E. A., LEVESQUE, G., IKEDA, M., LIANG, Y., CHI, H., LIN, C., HOLMAN, K., TSUDA, T., MAR, L., SORBI, S., NACMIAS, B., PIACENTINI, S., AMADUCCI, L., CHUMAKOV, I., COHEN, D., LANNFELT, L., FRASER, P. E., ROMMENS, J. M. AND GEORGE-HYSLOP, P. S. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. **376**, 775-778.
629. ROGAN, W. J. and GLADEN, B. C. (1993). Breast-feeding and cognitive development. *Early Hum. Dev.* **31**, 181-193.
630. ROHER, A. E., LOWENSON, J. D., CLARKE, S., WOLKOW, C., WANG, R., COTTER, R. J., REARDON, I. M., ZURCHER-NEELY, H. A., BALL, M. J. and GREENBERG, B. D. (1993). Structural alterations in the peptide backbone of β -amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **268**, 3072-3083.
631. ROMAS, S. N., TANG, M. X., BERGLUND, L. and MAYEUX, R. (1999). APOE genotype, plasma lipids, lipoproteins, and AD in community elderly. *Neurology*. **53**, 517-521.
632. ROTHBERG, K. G., HEUSER, J. E., DONZELL, W. C., YING, Y. S., GLENNEY, J. R. and ANDERSON, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. **68**, 673-682.
633. ROSSJOHN, J., CAPPAL, R., FEIL, S. C., HENRY, A., MCKINSTY, W. J., GALATIS, D., HESSE, L., MULTHAUP, G., BEYREUTHER, K., MASTERS, C. L. and PARKER, M. W. (1999). Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 327-331.
634. ROSSNER, S., LANGE-DOHNA, C., ZEITSCH, U. and PEREZ-POLO, J. R. (2005). Alzheimer's disease β -secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *J. Neurochem.* **92**, 226-234.
635. ROWAN, M. J., KLYUBIN, I., WANG, Q. and ANWYL, R. (2005). Synaptic plasticity disruption by amyloid- β protein: modulation by potential Alzheimer's disease modifying therapies. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, part 4.
636. ROY, S., LUETTERFORST, R., HARDING, A., APOLLINI, A., ETHERIDGE, M., STRANG, E., ROLLS, B., HANCOCK, J. F. and PARTON, R. G. (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat. Cell Biol.* **1**, 98-105.
637. RYAN, K. A. and PIMPLIKAR, S. W. (2005). Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J. Cell Biol.* **171**, 327-335.
638. SABO, S. L., IKIN, A. F., BUXBAUM, J. D. and GREENGARD, P. (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J. Cell Biol.* **153**, 1403-1414.
639. SAITO, T., ISHIGURO, K., UCHIDA, T., MIYAMOTO, E., KISHIMOTO, E. and HISAGANA, S. (1995). *In situ* dephosphorylation of *Tau* by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons. *FEBS Lett.* **376**, 238-242.
640. SALAUN, C., GOULD, G. W. and CHAMBERLAIN, L. H. (2005). Lipid rafts association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 19449-19453.
641. SAMPATH, H. and NTAMBI, J. M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **25**, 317-340.
642. SAMUELSSON, B. (1987). An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes. *Drugs*. **33**, 2-9.
643. SANKARAM, M. B. and THOMPSON, T. E. (1990). Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*. **29**, 10670-10675.
644. SARGIACOMO, M., SCHERER, P. E., TANG, Z., KUBLER, E., SONG, K. S., SANDERS, M. C. and LISANTI, M. P. (1995). Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 9407-9411.
645. SARSILMAZ, M., SONGUR, A., OZYURT, H., KUS, I., OZEN, O. A., OZYURT, B., SOGUT, S. and AKYOL, O.

- (2003). Potential role of dietary omega-3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **69**, 253-259.
646. SASTRE, M., KLOCKGETHER, T. and HENEKA, M. T. (2006). Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int. J. Devl. Neuroscience*. **24**, 167-176.
 647. SAUERWALD, T. U., HACHEY, D. L., JENSEN, C. L., CHEN, H., ANDERSON, R. E. and HEIRD, W. C. (1997). Intermediates in endogenous synthesis of C22:6 ω 3 and C20:4 ω 6 by term and preterm infants. *Pediatr. Res*. **41**, 183-187.
 648. SAWAI, H., DOMAE, N., NAGAN, N. and HANNUN, Y. A. (1999). Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C. *J. Biol. Chem*. **274**, 38131-38139.
 649. SCARMEAS, N. and STERN, Y. (2004). Cognitive reserve: implications for diagnosis and prevention of Alzheimer's disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*. **4**, 374-380.
 650. SCHEFFE, H. (1953). A method for judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrika*. **40**, 87-104.
 651. SCHEID, M. D. and WOODGETT, J. R. (2003). Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett*. **3**, 108-112.
 652. SCHELLENBERG, G. D., BIRD, T. D., WIJSMAN, E. M., ORR, H. T., ANDERSON, L., NEMENS, E., WHITE, J. A., BONNYCASTLE, L., WEBER, J. L., ALONSO, M. E., POTTER, H., HESTON, L. L. and MARTIN, G. M. (1992). Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*. **258**, 668-671.
 653. SCHEUNER, D., ECKMAN, C., JENSEN, M., SONG, X., CITRON, M., SUZUKI, N., BIRD, T. D., HARDY, J., HUTTON, M., KUKULL, W., LARSON, F., LEVY-LAHAD, E., VIITANEN, M., PESKIND, E., POORKAJ, P., SCHELLENBERG, G., TANZI, R., WASCO, W., LANNFELT, L., SELKOE, D. and YOUNKIN, S. (1996). Secreted amyloid- β protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased *in vivo* by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med*. **2**, 864-870.
 654. SCHLEGEL, A. and LISANTI, M. P. (2000). A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions *in vivo*. *J. Biol. Chem*. **275**, 21605-21617.
 655. SCHMITZ, G. and KAMINSKI, W. E. (2002). ABCA2: a candidate regulator of neural transmembrane lipid transport. *Cell Mol. Life Sci*. **59**, 1285-1295.
 656. SCHNITZER, J. E., MCINTOSH, D. P., DVORAK, A. M., LIU, J. and OH, P. (1995). Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science*. **269**, 1435-1439.
 657. SCHWEERS, O., SCHONBRUNN-HANEBECK, E., MARX, A. and MANDELKOW, E. (1994). Structural studies of *Tau* protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for β -structure. *J. Biol. Chem*. **269**, 24290-24297.
 658. SEGAL, M. and MURPHY, D. (2001). Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. *Horm. Behav*. **40**, 156-159.
 659. SELKOE, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev*. **81**, 741-766.
 660. SELKOE, D. J. and PODLISNY, M. B. (2002). Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. genomics Hum. Gen*. **3**, 67-99.
 661. SERGEANT, N., DELACOURTE, A. and BUEE, L. (2005). *Tau* protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta*. **1739**, 173-197.
 662. SERHAN, C. N., GOTLINGER, K., HONG, S. and ARITA, M. (2004). Resolvins, Docosatrienes and neuroprotectins, novel ω -3 derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostag. Other Lipid Mediators*. **73**, 155-172.
 663. SERPELL, L. C. (2000). Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assemble. *Biochim. Biophys. Acta*. **1502**, 16-30.
 664. SESSLER, A. M. and NTAMBI, J. M. (1998). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J. Nutr*. **128**, 923-926.
 665. SHAH, S., LEE, S.-F., TABUCHI, K., HAO, Y.-H., YU, C., LAPLANT, Q., BALL, H., DANN III, C. E., SUDHOF, T. and YU, G. (2005). Nicastrin functions as a γ -secretase-substrate receptor. *Cell*. **122**, 435-447.
 666. SHARMA, P., VARMA, R., SARASIJ, R. C., IRA, K., GOUSSET, G., KRISHNAMOORTHY, G., RAO, M. and MAYOR, S. (2004). Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell*. **116**, 577-589.
 667. SHERRINGTON, R., ROGAEV, E. I., LIANG, Y., ROGAEVA, E. A., LEVESQUE, G., IKEDA, M., CHI, H., LIN, C., LI, G. and HOLMAN, K. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. **375**, 754-760.
 668. SHIMURA, H., SCHWARTZ, D., GYGI, S. P. and KOSIK, K. S. (2004). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated *Tau* and enhances cell survival. *J. Biol. Chem*. **279**, 4869-4876.
 669. SHIN, J. S. and ABRAHAM, S. N. (2001). Caveolae as portals

- of entry for microbes. *Microbes Infect.* **3**, 755-761.
670. SHIOTANI, K., EDBAUER, D., CAPELL, A., SCHMITZ, J., STEINER, H. and HAASS, C. (2003). γ -secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. *J. Biol. Chem.* **278**, 16474-16477.
 671. SHOBAB, L. A., HSIUNG, G.-Y. R. and FELDRNAN, H. H. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet. Neurol.* **4**, 841-852.
 672. SHOGHI-JADID, K., SMALL, G. W., AGDEPPA, E. D., KEPE, V., ERCOLI, L. M., SIDDARTH, P., READ, S., SATYA-MURTHY, N., PETRIC, A., HUANG, S. and BARRIO, J. R. (2002). Localization of neurofibrillary tangles and β -amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am. J. Psychiatry.* **10**, 24-35.
 673. SILVERMAN, D. H., SMALL, G. W., CHANG, C. Y., KUNG DE ALBURTO, M. A., CHEN, W., CZERNIN, J., RAPOPORT, S. I., PIETRINI, P., ALEXANDER, G. E., SCHAPIRO, M. B., JAGUST, W. J., HOFFMAN, J. M., WELSH-BOHMER, K. A., ALAVI, A., CLARK, C. M., SALMON, E., DE LEON, M. J., MIELKE, R., CUMMINGS, J. L., KOWELL, A. P., GAMBHIR, S. S., HOH, C. K. and PHELPS, M. E. (2002). Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA.* **286**, 2120-2127.
 674. SILVIUS, J. R. (2005). Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains: insights from model-membrane studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1746**, 193-202.
 675. SIMBULAN-ROSENTHAL, C., ROSENTHAL, D. S., IYER, S., BOULARES, H. and SMULSON, M. E. (1998). Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 13703-13712.
 676. SIMONS, M., KELLER, P., DE STROOPER, B., BEYREUTHER, K., DOTTI, C. G. and SIMONS, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 6460-6464.
 677. SIMONS, M., SCHWARTZLER, F., LUTJOHANN, D., VON BERGMANN, K., BEYREUTHER, K., DICHGANS, J., WORMSTALL, H., HARTMANN, T. and SCHULTZ, J. B. (2002). Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann. Neurol.* **52**, 346-350.
 678. SIMONS, K. and TOOMRE, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31-39.
 679. SINGER, S. J. and NICHOLSON, G. L. (1971). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* **175**, 720-731.
 680. SISKIND, L. J. (2005). Mitochondrial ceramides and the induction of apoptosis. *J. Bioenerg. Biomemb.* **37**, 143-153.
 681. SJOGREN, M., DAVIDSSON, P., WALLIN, A., GRANERUS, A. K., GRUNSTROM, E., ASKMARK, H., VANMECHELEN, E. and BLENNOW, K. (2002). Decreased CSF- β -amyloid 42 in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis may reflect mismetabolism of β -amyloid induced by disparate mechanisms. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **13**, 112-118.
 682. SJOGREN, M., MIELKE, M., GUSTAFSON, D., ZANDI, P. and SKOOG, I. (2006). Cholesterol and Alzheimer's disease-is there a relation? *Mech. Ageing Dev.* **127**, 138-147.
 683. SMART, E. J., YING, Y.-S., MINEO, C. and ANDERSON, R. G. W. (1995). A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. acad. Sci. USA.* **92**, 10104-10108.
 684. SMART, E. J., YING, Y., DONZELL, W. C. and ANDERSON, R. G. (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **271**, 29427-29435.
 685. SODERBERG, M., EDLUND, C., ALAFUZOFF, I., KRISTENSSON, K. and DALLNER, G. (1992). Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J. Neurochem.* **59**, 1646-1653.
 686. SOLFRIZZI, V., PANZA, F. and CAPURSO, A. (2003). The role of diet in cognitive decline. *J. Neural Transm.* **110**, 95-110.
 687. SONG, K. S., LI, S., OKAMOTO, T., QUILLIAM, L. A., SARGIACOMO, M. and LISANTI, M. P. (1996). Co-purification and direct interaction of ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* **271**, 9690-9697.
 688. SONG, G., OUYANG, G. and BAO, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 59-71.
 689. SONG, M.-S., SAAVEDRA, L. and POSSE DE CHAVES. (2005). Apoptosis is secondary to non-apoptotic axonal degeneration in neurons exposed to A β in distal axons.
 690. SONTAG, E., LUANGPIROM, A., HLADIK, C., MUDRAK, I., OGRIS, E., SPECIALE, S. and WHITE, C. L. 3rd. (2004). Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β C enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63**, 287-301.
 691. SPARKS, D. L., SCHEFF, S. W., HUNSAKER, J. C. 3rd, LIU, H., LANDERS, T. and GROSS, D. R. (1994). Induction of Alzheimer-like β -amyloid immunoreactivity in the brains of

- rabbits with dietary cholesterol. *Exp. Neurol.* **126**, 88-94.
692. SPARKS, D. L., MARTIN, T. A., GROSS, D. R. and HUNSAKER, J. C. 3rd. (2000). Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease: a review. *Microsc. Tech. Res.* **50**, 287-290.
 693. SPIEGEL, S. and MILSTIEN, S. (2003). Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1216-1219.
 694. SPONNE, I., FIFRE, A., DROUET, B., KLEIN, C., KOZIEL, V., PINÇON-RAYMOND, M., OLIVIER, J.-L., CHAMBAZ, J. and PILLOT, T. (2003). Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid- β peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependant cytoskeleton perturbation. *J. Biol. Chem.* **278**, 3437-3445.
 695. SPONNE, I., FIFRE, A., KRIEM, B., KOZIEL, V., BIHAIN, B., OSTER, T., OLIVIER, J.-L. and PILLOT, T. (2004). Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of the amyloid- β peptide. *FASEB J.* **18**, 836-838.
 696. STEPHERD, J., BLAW, G. J., MURPHY, M. B., BOLLEN, E. L., BUCKLEY, B. M., COBBE, S. M., FORD, I., GAW, A., HYLAND, M., JUKEMA, J. W., KAMPER, A. M., MACFARLONE, P. W., MEINDERS, A. E., NORRIE, J., PACKARD, C. J., PERRY, I. J., STOTT, D. J., SWEENEY, B. J., TWOMEY, C. and WESTENDORP, R. G. (2002). Proper study group. Prospective study of pravastatin in the elderly at risk. *Lancet.* **360**, 1623-1630.
 697. STERN, Y., ALEXANDER, G. E., PROHOVNIK, I. and MAYEUX, R. (1992). Inverse relationship between education and parietotemporal perfusion deficit in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **32**, 371-375.
 698. STICHT, H., BAYER, P., WILLBOLD, D., DAMES, S., HILBICH, C., BEYREUTHER, K., FRANK, R. W. and ROSCH, P. (1995). Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease. *Eur. J. Biochem.* **233**, 293-298.
 699. STILLWELL, W. and WASSALL, S. R. (2003). Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acids. *Chem. Phys. Lip.* **126**, 1-27.
 700. STILLWELL, W., SHAIKH, S. R., ZEROUGA, M., SIDDIQUI, R. and WASSALL, S. R. (2005). Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod. Nutr. Dev.* **45**, 559-579.
 701. STOFFEL, W. (1999). Functional analysis of acid and neutral sphingomyelinases *in vitro* and *in vivo*. *Chem. Phys. Lipids.* **102**, 107-121.
 702. STOICA, B. A., MOVSESYAN, V. A., KNOBLACH, S. M. and FADEN, A. I. (2005). Ceramide induces neuronal apoptosis through mitogen-activated protein kinases and causes release of multiple mitochondrial proteins. *Mol. Cell Neurosci.* **29**, 355-371.
 703. STOREY, E., BEYREUTHER, K. and MASTERS, C. L. (1996). Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Res.* **7**, 217-231.
 704. STRITTMATTER, W. J., SAUNDERS, A. M., SCHMECHEL, D., PERICAK-VANCE, M., ENGHILD, J., SALVESEN, G. S. and ROSES, A. D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 1977-1981.
 705. STROZYK, D., BLENNOW, K., WHITE, L. R. and LAUNER, L. J. (2003). CSF A β_{42} levels correlate with amyloid-angiopathy in a population-based autopsy study. *Neurology.* **60**, 652-656.
 706. STUERMER, C. A., LANG, D. M., KIRSCH, F., WIECHERS, M., DEININGER, S. O. and PLATTNER, H. (2001). Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3021-3045.
 707. SUNG, S., YAO, Y., URYU, K., YANG, H., LEE, V. M., TROJANOWSKI, J. Q. and PRATICO, D. (2004). Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces A β levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **18**, 323-325.
 708. SUZUKI, A. (1997). Amyloid β -protein induces necrotic cell death mediated by ICE cascade in PC12 cells. *Exp. Cell. Res.* **234**, 507-511.
 709. SUZUKI, H., MANABE, S., WADA, O. and CRAWFORD, M. A. (1997). Rapid incorporation of docosahexaenoic acid from dietary sources into brain microsomal, synaptosomal and mitochondrial membranes in adult mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **67**, 272-278.
 710. SUZUKI, H., PARK, S. J., TAMURA, M. and ANDO, S. (1998). Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mach. Ageing Dev.* **101**, 119-128.
 711. SVENNERHOLM, L. (1994). Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Prog. Brain Res.* **101**, 11-14.

712. SWATTON, J. E., SELLERS, L. A., FAULL, R. L., HOLLAND, A., IRITANI, S. and BAHN, S. (2004). Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2711-2719.
713. SWEET, R. A., PANCHALINGAM, K., PETTEGREW, J. W., MCCLURE, R. J., HAMILTON, R. M., LOPEZ, O. L., KAUFER, D. I., DEKOSKY, S. T. and KLUNK, W. E. (2002). Psychosis in Alzheimer disease: *postmortem* magnetic resonance spectroscopy evidence of excess neuronal and membrane phospholipid pathology. *Neurobiol. Aging*. **23**, 547-553.
714. TABATON, M. (1994). Research advances in the biology of Alzheimer's disease. *Clin. Geriatr. Med.* **10**, 249-255.
715. TABATON, M. and PICCINI, A. (2005). Role of water-soluble Amyloid- β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Path.* **86**, 139-145.
716. TAKAHASHI, M., TSUJIOKA, Y., YAMADA, T., TSUBOI, Y., OKADA, H., YAMAMOTO, T. and LIPOSITZ, Z. (1999). Glycosylation of microtubule-associated protein *Tau* in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol.* **97**, 635-641.
717. TAKASHIMA, A., HONDA, T., YASUTAKE, K., MICHEL, G., MURAYAMA, O., MURAYAMA, M., ISHIGURO, K. and YAMAGUSHI, H. (1998). Activation of *Tau* protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β by amyloid β peptide (25-35) enhances phosphorylation of *Tau* in hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* **31**, 317-323.
718. TAKUMA, H., TOMIYAMA, T., KUIDA, K. and MORI, H. (2004). Amyloid β peptide-induced cerebral neuronal loss is mediated by caspase-3 *in vivo*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63**, 255-261.
719. TAMAGNO, E., BARDINI, P., OBBILI, A., VITALI, A., BORGHI, R., ZACCHEO, D., PRONZATO, M. A., DANNI, O., SMITH, M. A., PERRY, G. and TABATON, M. (2002). Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol. Disease.* **10**, 279-288.
720. TANABE, Y., HASHIMOTO, M., SUGIOKA, K., MARUYAMA, M., FUJII, Y., HAGIWARA, R., HARA, T., HOSSAIN, S. M. and SHIDO, O. (2004). Improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid is associated with an increase in FOS expression in rat CA1 hippocampus. *Clin. Exp. Pharma. Physiol.* **31**, 700-703.
721. TANAKA, S., SHIOJIRI, S., TAKAHASHI, Y., KITAGUCHI, N., ITO, H., KAMEYAMA, M., KIMURA, J., NAKAMURA, S. and UEDA, K. (1989). Tissue-specific expression of three types of β -protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 1406-1414.
722. TATEBAYASHI, Y., HAQUE, N., TUNG, Y.-C., IQBAL, K. and GRUNDKE-IQBAL, I. (2004). Role of *Tau* phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β in the regulation of organelle transport. *J. Cell Sci.* **117**, 1653-1663.
723. THELEN, K. M., RENTSCH, K. M., GUTTECK, U., HEVERIN, M., OLIN, M., ANDERSSON, U., VON ECKARDSTEIN, A., BJORKHEM, I. and LUTJOHANN, D. (2006). Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 1146-1152.
724. TIFFANY, H. L., LAVIGNE, M. C., CUI, Y. H., WANG, J. M., LETO, T. L., GAO, J. L. and MURPHY, P. M. (2001). Amyloid- β induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J. Biol. Chem.* **276**, 23645-23652.
725. TOMAN, R. E. and SPIEGEL, S. (2002). Lysophospholipid receptors in the nervous system. *Neurochem. Res.* **27**, 619-627.
726. TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.
727. TROMMER, B. L., SHAH, C., YUN, S. H., GAMKRELIDZE, G., PASTERNAK, E. S., YE, G. L., SOTAK, M., SULLIVAN, P. M., PASTERNAK, J. F. and LADU, M. J. (2004). ApoE isoform affects LTP in human targeted replacement mice. *Neuroreport.* **15**, 2655-2658.
728. TSUZUKI, K., FUKATSU, R., YAMAGUCHI, H., TATENO, M., IMAI, K., FUJII, N. and YAMAUCHI, T. (2000). Transthyretin binds amyloid β peptides, A β 1-42 and A β 1-40 to form complex in the autopsied human kidney - possible role of transthyretin for A β sequestration. *Neurosci. Lett.* **281**, 171-174.
729. TUCHOLSKI, J., KURET, J. and JOHNSON, G. V. W. (1999). *Tau* is modified by tissue transglutaminase *in situ*: possible functional and metabolic effects of polyamination. *J. Neurochem.* **73**, 1871-1880.
730. TURNER, P. R., O'CONNOR, K., TATE, W. P. and ABRAHAM, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress Neurobiol.* **70**, 1-32.
731. UAUY, R., HOFFMAN, D. R., MENA, P., LLANOS, A. and BIRCH, E. E. (2003). Term infant studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials. *J. Pediatr.* **143**, S17-S25.
732. UBEDA, M. and HABENER, J. F. (1997). The large subunit

- of the DNA replication complex C (DSEB/EF-C140) cleaved and inactivated by caspase-3 (CPP32/YAMA) during Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 19562-19568.
733. UITTENBOGAARD, A. and SMART, E. J. (2000). Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperon complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J. Biol. Chem.* **275**, 25595-25599.
734. UTERMANN, G., LANGENBECK, U., BEISIEGEL, U. and WEBER, W. (1980). Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 339-347.
735. VALENZUELA, M. J. and SACHDEV, P. (2001). Magnetic resonance spectroscopy in AD. *Neurology*. **56**, 592-598.
736. VAN BROECKHOVEN, C., BACKHOVENS, H., CRUTS, M., DE WINTER, G., BRUYLAND, M., CRAS, P. and MARTIN, J. J. (1992). Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3. *Nat. Genet.* **2**, 335-339.
737. VANCE, J. E., HAYASHI, H. and KARTEN, B. (2005). Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Seminars in cell and developmental biology*. **16**, 193-212.
738. VAN GOOL, W. A., AISEN, P. S. and EIKELENBOOM, P. (2003). Anti-inflammatory therapy in Alzheimer's disease: is hope still alive? *J. Neurol.* **250**, 788-792.
739. VAN PRAAG, H., KEMPERMANN, G., GAGE, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 191-198.
740. VAN WEZEL-MEIJLER, G., VAN DER KNAPP, M. S., HUISMAN, J., JONKMAN, E. J., VALK, J. and LAFEVER, H. N. (2002). Dietary supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants: effects on cerebral maturation. *Acta Paediatr.* **91**, 942-950.
741. VARDY, E. R. L. C., CATTO, A. J. and HOOPER, N. M. (2005). Proteolytic mechanism in amyloid- β metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* **11**, 464-472.
742. VASSAR, R., BENNETT, B. D., BABU-KHAN, S., KAHN, S., MENDIAZ, E. A., DENIS, P., TELOW, D. B., ROSS, S., AMARANTE, P., MOELOFF, R., LUO, Y., FISHER, S., FULLER, J., EDENSON, S., LILE, J., JAROSINSKI, M. A., LEONA BIERE, A., CURRAN, E., BURGESS, T., LOUIS, J.-L., COLLINS, F., TREANOR, J., ROGERS, G. and CITRON, M. (1999). β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. **286**, 735-741.
743. VERDIER, Y., ZARANDI, M. and PENKE, B. (2004). Amyloid β -peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications in Alzheimer's disease. *J. Peptide. Sci.* **10**, 229-248.
744. VERDILE, G., FULLER, S., ATWOOD, C. S., LAWS, S. M., GANDY, S. E. and MARTINS, R. N. (2004). The role of β amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacol. Res.* **50**, 397-409.
745. VETRIVEL, K. S., CHENG, H., LIN, W., SAKURAI, T., LI, T., NUKINA, N., WONG, P. C., XU, H. and THINAKARAN, G. (2004). Association of γ -secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosomes-membranes. *J. Biol. Chem.* **279**, 44945-44954.
746. VETRIVEL, K. S. and THINAKARAN, G. (2006). Amyloidogenic processing of β -amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology*. **66**, S69-S73.
747. VINTERS, H. V., WANG, Z. Z. and SECOR, D. L. (1996). Brain parenchymal and microvascular amyloid in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **6**, 179-195.
748. VITO, P., WOLOZIN, B., GANJEI, J. K., IWASAKI, K., LACANA, E. and D'ADAMIO, L. (1996). Requirement of the familial Alzheimer's disease gene PS2 for apoptosis. Opposing effect of ALG-3. *J. Biol. Chem.* **271**, 31025-31028.
749. VOELKER, D. R. (2003). New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. *J. Lipid Res.* **44**, 441-449.
750. VON BERGEN, M., BARGHORN, S., BIERNAT, J., MANDELKOW, E.-M. and MANDELKOW, E. (2005). *Tau* aggregation is driven by a transition from random coil to β sheet structure. *Biochim. Biophys. Acta*. **1739**, 158-166.
751. VON KOCH, C. S., ZHENG, H., CHEN, H., TRUMBAUER, M., THINAKARAN, G., VAN DER PLOEG, L. H., PRICE, D. L. and SISODIA, S. S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging*. **18**, 661-669.
752. VON ROTZ, R. C., KOHLI, B. M., BOSSET, J., MEIER, M., SUZUKI, T., NITSCH, R. M. and KONIETZKO, U. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J. Cell Sci.* **117**, 4435-4448.
753. WAHRLE, S. E., JIANG, H., PARSADANIAN, M., LEGLEITER, J., HAN, X., FRYER, J. D., KOWALEWSKI, T. and HOLTZMAN, D. M. (2004). ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J. Biol. Chem.* **279**, 40987-40993.
754. WAKABAYASHI, M., OKADA, T., KOZUTSUMI, Y. and MATSUZAKI, K. (2005). GM₁ ganglioside-mediated accumulation of amyloid β -protein on cell membranes. *Biochem. Biophys. Res.* **328**, 1019-1023.

755. WALSH, D. M. and SELKOE, D. J. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*. **44**, 181-193.
756. WALSH, D. M., KLYUBIN, I., SHANKAR, G. M., TOWNSEND, M., FADEEVA, J. V., BETTS, V., PODLISNY, M. B., CLEARY, J. P., ASHE, K. H., ROWAN, M. J. and SELKOE, D. J. (2005). The role of cell-derived oligomers of A β in Alzheimer's disease and avenues for therapeutics intervention. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, part 5.
757. WANG, G. P., KHATOON, S., IQBAL, K. and GRUNDKE-IQBAL, I. (1991). Brain ubiquitin is markedly elevated in Alzheimer disease. *Brain. Res.* **566**, 146-151.
758. WANG, J. Z., GRUNDKE-IQBAL, I. and IQBAL, K. (1996). Glycosylation of microtubule-associated protein *Tau*: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2**, 871-875.
759. WANG, K. K., POSMANTUR, R., NATH, R., MCGINNIS, K., WHITTON, M., TALANIAN, R. V., GLANTZ, S. B. and MORROW, J. S. (1998). Simultaneous degradation of α II- and β II-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 22490-22497.
760. WANG, S. S., RYMER, D. L. and GOOD, T. A. (2001). Reduction in cholesterol and sialic acid content protects cells from the toxic effects of β -amyloid peptides. *J. Biol. Chem.* **276**, 42027-42034.
761. WANG, H. Y., BEBEDETTI, N. J. and LEE, D. H. (2003). A 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate β -amyloid peptide-induced *Tau* protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 31547-31553.
762. WANG, X., ZHAO, X., MAO, Z., WANG, X. M. and LIU, Z. L. (2003). Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid on glutamate-induced cytotoxicity in rat hippocampal cultures. *Neuroreport*. **14**, 2457-2461.
763. WASCO, W., BROOK, J. D. and TANZI, R. E. (1993). The amyloid precursor-like protein (APLP) gene maps to the long arm of human chromosome 19. *Genomics*. **15**, 237-239.
764. WEIL, M., JACOBSON, M. D., COLES, H. S. R., DAVIES, T. J., GARDER, R. L., RAFF, K. D. and RAFF, M. C. (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell Biol.* **133**, 1053-1059.
765. WEINGARTEN, M. D., LOCKWOOD, A. SHU-YING, H. and KIRSCHNER, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 1858-1862.
766. WIDMANN, C., GERWINS, P., JOHNSON, N. L., JARPE, M. B. and JOHNSON, G. L. (1998). MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2416-2429.
767. WILLIAMSON, P. and SCHLEGEL, R. A. (2002). Transbilayer phospholipids movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1585**, 53-63.
768. WILLIARD, D. E., HARMON, S. D., KADUCE, T. L., PREUSS, M., MOORE, S. A., ROBBINS, M. E. and SPECTOR, A. A. (2001). Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. *J. Lipid Res.* **42**, 1368-1376.
769. WIRTHS, P., MÜLTHAUP, G. and BAYER, T. A. (2004). A modified β -amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the β -amyloid peptide - the first step of a fatal cascade. *J. Neurochem.* **91**, 513-520.
770. WISNIEWSKI, H. M., WEGIEL, J., VORBRODT, A. W., MAZUR-KOLECKA, B. and FRACKOWIAK, J. (2000). Role of perivascular cells and myocytes in vascular amyloidosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **903**, 6-18.
771. WOLFE, M. S., XIA, W., OSTASZEWSKI, B. L., DIEHL, T. S., KIMBERLY, W. T. and SELKOE, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature*. **398**, 513-517.
772. WOLOZIN, B., IWASAKI, K., GANJEI, J. K., LACANA, E., SUNDERLAND, T., ZHAO, B., KUSIAK, J. W., WASCO, W. and D'ADAMIO, L. (1996). Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science*. **274**, 1710-1713.
773. WOLOZIN, B. (2004). Cholesterol, statins and dementia. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 667-672.
774. WONG, W. and SCHLICHTER, L. C. (2004). Differential recruitment of Kv1.4 and Kv4.2 to lipid rafts by PSD-95. *J. Biol. Chem.* **279**, 444-452.
775. WOOTEN, G. F., CURRIE, L. J., BOVBJERG, V. E., LEE, J. K. and PATRIE, J. (2004). Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **75**, 637-639.
776. WORGALL, T. S. and DECKELBAUM, R. J. (1999). Fatty acids: links between genes involved in fatty acid and cholesterol metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. **2**, 127-133.
777. WU, M., HARVEY, K. A., RUZMETOV, N., WELCH, Z. R., JACKSON, K., STILLWELL, W., ZALOGA, G. P. and SIDDQUI, G. P. (2005). Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway. *Int. J. Cancer*. **117**, 340-348.
778. WYLLIE, A. H., HERR, J. F. and CURRIE, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.

779. XIA, W., ZHANG, J., KHOLODENKO, D., CITRON, M., PODLISNY, M. B., TELOW, D. B., HAASS, C., SEUBERT, P., KOO, E. H. and SELKOE, D. J. (1997). Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid β -protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *J. Biol. Chem.* **272**, 7977-7982.
780. XIA, W., RAY, W. J., OSTASZEWSKI, B. L., RAHMATI, T., KIMBERLY, W. T., WOLFE, M. S., ZHANG, J., GOATE, A. M. and SELKOE, D. J. (2000). Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the site of amyloid β -protein generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9299-9304.
781. XUE, H., WAN, M., SONG, D., LI, Y. and LI, J. (2006). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate mitogen-activated protein kinase activity in endothelium. *Vascul. Pharmacol.* **44**, 464-472.
782. YAMADA, M. (2004). Cerebral amyloid angiopathy and gene polymorphisms. *J. Neurol. Sci.* **226**, 41-44.
783. YAMAMOTO, H., SAITOH, Y., FUKUNAGA, K., NISHIMURA, H. and MIYAMOTO, E. (1988). Dephosphorylation of microtubule proteins by brain protein phosphatases 1 and 2A, and its effect on microtubule assembly. *J. Neurochem.* **50**, 1614-1623.
784. YAN, S.-D., YAN, S. F., FU, I., CHEN, M., KUPPUSAMY, P., SMITH, M. A., PERRY, G., GODMAN, G. C., NAWROTH, P., ZMEIER, J. L. and STERN, D. (1995). Non-enzymatically glycosylated *Tau* in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid- β peptide. *Nat. Med.* **1**, 693-699.
785. YANAGISAWA, K. (2005). GMI gangioside and the seeding of amyloid in Alzheimer's disease: endogenous seed for amyloid. *Neuroscientist* **11**, 250-260.
786. YANKNER, B. A., DAWES, L. R., FISHER, S., VILLAKOMAROFF, L., OSTER-GRANITE, M. L. and NEVE, R. L. (1989). Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* **245**, 417-420.
787. YAVIN, E. and YAVIN, Z. (1974). Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. *J. Cell Biol.* **62**, 540-546.
788. YE, S., HUANG, Y., MULLENDORFF, K., DONG, L., GIEDT, G., MENG, E. C., COHEN, F. E., KUNTZ, I. D., WEISGRABER, K. H. and MAHLEY, R. W. (2005). Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 18700-18705.
789. YEHUDA, S., RABINOVITZ, S., CARASSO, R. L. and MOSTOFISKY, D. I. (2002). The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol. Aging* **23**, 843-853.
790. YOSHIKAWA, T., SHIMANO, H., YAHAGI, N., IDE, T., AMEMIYA-KUDO, M., MATSUZAKA, T., NAKAKUKI, M., TOMITA, S., OKAZAKI, H., TAMURA, Y., IIZUKA, Y., OHASHI, K., TAKAHASHI, A., SONE, H., OSUYA, T., ISHIBASHI, S. and YAMADA, M. (2002). Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J. Biol. Chem.* **277**, 1705-1711.
791. ZAAS, D. W., DUNCAN, M., WRIGHT, J. R. and ABRAHAM, S. N. (2005). The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections. *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 305-313.
792. ZAMZAMI, N., SUSIN, S. A., MARCHETTI, P., HIRSCH, T., GOMEZ-MONTERREY, I., CASTEDO, M. and KROEMER, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**, 1533-1544.
793. ZANDI, P. P., ANTHONY, J. C., KHACHATURIAN, A. S., STONE, S. V., GUSTAFSON, D., TSCHANZ, J. T., NORTON, M. C., WELSH-BOHMER, K. A., BREITNER, J. C., Cache county study group. (2004). Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch. Neurol.* **61**, 82-88.
794. ZHANG, Y., MCLAUGHLIN, R., GOODYER, C. and LEBLANC, A. (2002). Selective cytotoxicity of intracellular amyloid β peptide 1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J. Cell Biol.* **156**, 519-529.
795. ZHAO, Y., JOSHI-BARVE, S., BARVE, S. and CHEN, L. H. (2004). Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- α expression by preventing NF- κ B activation. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**, 71-78.
796. ZHOU, Y. and RICHARDSON, J. S. (1996). Cholesterol protects PC12 cells from β -amyloid induced calcium disordering and cytotoxicity. *Neuroreport* **7**, 2487-2490.
797. ZHU, X., LEE, H. G., RAINA, A. K., PERRY, G. and SMITH, M. A. (2002). The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* **11**, 270-281.
798. ZUNDEL, W., SWIERSZ, L. M. and GIACCIA, A. (2000). Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1507-1514.
799. ZIEGLER, U. and GROSCURTH, P. (2004). Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.* **19**, 124-128.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Jean CHAMBAZ, Professeur, Université Pierre & Marie Curie, Paris

Madame Joëlle CHABRY, Chargé de Recherche, IPMC, Valbonne

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame FLORENT-BÉCHARD Sabrina

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
une thèse intitulée :

**"Lipides et maladie d'Alzheimer : influence du statut et de la signalisation lipidiques
sur la neurodégénérescence induite par le peptide A β soluble"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 17 octobre 2006

Le Président de l'IN.P.L.,

L. SCHUFFENECKER

