Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort neuronale induite par le peptide de ß-amyloïde soluble : recherche et validation fonctionnelle de cibles cellulaires

Ihsen Youssef

▶ **To cite this version:**

Ihsen Youssef. Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort neuronale induite par le peptide de ß-amyloïde soluble : recherche et validation fonctionnelle de cibles cellulaires. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006. Français. NNT : 2006INPL068N . tel-01752765

HAL Id: tel-01752765
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752765

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE NANCY

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

N° attribué par la bibliothèque
|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Discipline : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Présentée et soutenue publiquement par

Mr. Ihsen YOUSSEF

Le 31 Octobre 2006

Titre

Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort neuronale induite par le peptide β-amyloïde soluble : Recherche et validation fonctionnelle de cibles cellulaires.

Directeur de thèse : Dr. Brigitte Leininger-Muller

JURY

Pr. François Laurent (président)
Dr Bernadette Allinquant, DR2 Inserm (rapporteur)
Dr. Jean-Paul Fuchs, CR1 CNRS (rapporteur)
Dr. Brigitte Leininger-Muller, MCU
Dr. Thierry Pillot, DR2 Inserm

On vous a dit aussi que la vie est obscurité, et dans votre lassitude vous répétez ce que disent les las.

Et je vous dis que la vie est en effet obscure sauf là où il y a élan,

Et tout élan est aveugle sauf là où il y a la connaissance.

Et toute connaissance est vaine sauf là où il y a le travail,

Et tout travail est futile sauf là où il y a l'amour ;

Gibran Khalil Gibran.

A ma mère et mon père

Recevez par l'aboutissement de ce travail la récompense de votre soutien, de votre patience et de vos prières tout le long de ces années et le témoignage de mon amour.

A mes sœurs Saoussan et Imen et mon frère Anis, qu'ils trouvent ici le témoignage de mon affection.

Au souvenir de mes grand parents, Amna et H'mida.

A ma chère patrie, la Tunisie.

Remerciements

A Monsieur le Dr. **Thierry Pillot**, qui assure la lourde tâche de guider et veiller sur l'équipe *Neuro*. Ses décisions judicieuses quant à l'orientation du projet ont été indispensables à l'aboutissement de ce travail. Merci pour sa patience et son soutien indéfectible.

A Madame Le Dr. **Brigitte Leineinger-Muller** pour avoir assuré mon encadrement tout au long de ma thèse.

A Madame le Dr. **Frances Yen-Potin** et Monsieur le Dr. **Bernard Bihain** de m'avoir accueilli dans leur laboratoire et de m'avoir donné les moyens de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions.

A l'association **Alzheimer 57 nord** pour son soutien.

A Monsieur le Pr. **François Laurent**, Madame le Dr. **Bernadette Allinquant** et Monsieur le Dr. **Jean-Paul Fuchs** d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur **El Mostapha Zeggari** et Madame **Hayet Khsiba** pour avoir cultivé ma passion pour la Biologie.

A Monsieur **Med Nejib Youssef** pour m'avoir apporté son aide et son soutien tout le long de mon cursus.

A **Badreddine Kriem** pour m'avoir initié aux techniques des analyses comportementales. Merci pour ses conseils et son soutien.

A **Thierry Oster** pour ses conseils et critiques judicieux durant ces trois années de thèse.

A **Violette Koziel** pour sa gentillesse, sa disponibilité, son aide précieuse et ses conseils. Merci pour son soutien aussi bien personnel que professionnel.

A **Jean-Luc Olivier** pour ses conseils et ses précieuses analyses bibliographiques.

A **Sabrina, Catherine et Lionel** pour leurs conseils et leur aide.

A **Véronique** et **Erwan** pour m'avoir accueilli dans leur l'animalerie. Merci pour leur précieuse aide dans la partie *in vivo* de mon travail.

A tous mes collègues du laboratoire de Médecine et Thérapeutiques Moléculaire.

Ce travail

A été réalisé

Au Laboratoire de Médecine et Thérapeutique Moléculaire

Jeune équipe Lipidomix, JE2482

Institut National Polytechnique de Lorraine

(Pr. F. YEN-POTIN)

15 rue du Bois de la Champelle, 54500 VANDOEUVRE

SOMMAIRE

SOMMAIRE 3
LISTE DES PUBLICATIONS 6
LISTE DES ABREVIATIONS 7
LISTE DES FIGURES 8
LISTE DES TABLEAUX 10
AVANT-PROPOS 11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 15
1. La maladie d'Alzheimer : Historique 15
2. Généralités 16
2.1. La maladie d'Alzheimer, un problème de santé publique 16
2.2. Prévalence de la maladie d'Alzheimer 17
2.2.1. Répartition en fonction de l'âge 17
2.2.2. Répartition en fonction du sexe 18
2.2.3. Niveau d'éducation et réseau social 18
2.2.4. Facteurs nutritionnels 20
3. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer 21
3.1. Circonstances diagnostiques 21
3.1.1. Les signes cliniques cognitifs 23
3.1.2. Mesure de la sévérité de la démence et critères de diagnostic. 25
3.1.3. L'apport des techniques d'imagerie fonctionnelle 27
3.2. Les traitements actuels de la maladie d'Alzheimer 29
3.2.1. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase 29
3.2.2. Les agonistes des récepteurs NMDA 30
3.2.3. Autres médicaments utlisés dans le traitement de la maladie d'Alzheimer 30
4. Caractéristiques histopathologiques de la maladie d'Alzheimer 31
4.1. Les altérations macroscopiques 31
4.2. Lésions histologiques 32
4.2.1. Les plaques amyloïdes 32
4.2.2. Les dégénérescences neurofibrillaires 35
4.2.3. Activation de la microglie et augmentation de la réactivité astrocytaire 38
4.2.4. L'angiopathie amyloïde cérébrale 40
5. Mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie d'Alzheimer 42
5.1. Introduction 42
5.2. La perte neuronale, contribution relative des processus apoptotique et nécrotique dans la maladie d'Alzheimer 44
5.3. Un élément clé dans la maladie d'Alzheimer : la protéine APP 46
5.3.1. Expression et structure génique de l'APP 46
5.3.2. Structure protéique de l'APP 47
5.3.3. Fonctions biologiques de l'APP 49
5.3.4. Clivage protéolytique de l'APP 50
5.4. Le peptide β-amyloïde agrégé, acteur de la cascade amyloïde 55
5.4.1. Structure des fibrilles de peptide Aβ et formation des plaques 56
5.4.2. Propriétés neurotrophiques du peptide Aβ agrégé 58
5.4.3. Cytotoxicité des fibrilles de peptide Aβ 59
5.4.4. Mécanismes cytotoxiques liés à l'accumulation de fibrilles de peptide Aβ 63
5.4.4.1. Le stress oxydant 63
5.4.4.2. Le processus inflammatoire 64
5.5 Une alternative à la cascade amyloïde : l'hypothèse *Aβ* soluble 66

5.5.1. Introduction 66
5.5.2. Forme monomérique et oligomérique du peptide Aβ 67
5.5.3. Implication dans la perte synaptique et le déclin cognitif 67
5.5.4. L'interaction avec les membranes cellulaires, première étape de la cascade neurodégénérative 69
5.5.4.1. Insertion dans les membranes plasmiques 69
5.5.4.2. Accumulation intraneuronale de peptide Aβ 70
5.5.4.3. Interaction avec un partenaire membranaire neuronal ou glial 71
5.5.5. Réalité clinique et impact des oligomères solubles de peptide Aβ dans la MA 72
6. Les modèles *in vivo* d'étude de la maladie d'Alzheimer 75
6.1. Introduction 75
6.2. Les modèles transgéniques de la maladie d'Alzheimer 76
6.2.1. Les souris mono-transgéniques 76
6.2.1.1. Les souris transgéniques pour la protéine APP 76
6.2.1.2. Les souris transgéniques pour la protéine Tau 78
6.2.1.3. Les souris transgéniques pour les présénilines 1 et 2 79
6.2.1.4. Les souris transgéniques pour l'apolipoprotéine E 79
6.2.1.5. Les souris transgéniques pour la β-secrétase 80
6.2.2. Les souris double et triple transgéniques 81
6.2.2.1. Les modèles transgéniques pour la protéine APP et les PS 81
6.2.2.2. Les modèles transgéniques pour la protéine APP et l'apoE 82
6.2.2.3. Les modèles transgéniques pour la protéine APP et la BACE-1 82
6.2.2.4. Les modèles transgéniques pour la protéine APP et Tau 82
6.2.2.5. Les modèles triple-transgéniques 83
6.3. Les modèles d'injection intracérébrale du peptide Aβ 83
6.3.1. Introduction 83
6.3.2. Description des études *in vivo* d'injection de peptide Aβ 88
6.3.2.1. Expériences d'injection de peptides Aβ agrégés 89
6.3.2.2. Modèles d'injections chroniques de peptides Aβ 94
6.3.2.3. Expériences d'injection de formes non agrégées de peptide Aβ 94
6.3.2.4. Les modèles combinant la transgénèse et l'injection 97
6.3.3. Approches pharmacologiques de prévention de la toxicité du peptide Aβ dans les modèles d'injection intracérébrale 97
6.3.3.1. Récepteurs NMDA et récepteurs sigma pour cibles thérapeutiques 98
6.3.3.2. Molécules anti-inflammatoires et antioxydantes 99
6.3.3.3. Molécules antioxydantes 100
6.3.3.4. Le peptide Aβ pour cible thérapeutique 101
6.4. Lésions cérébrales liées au vieillissement chez les primates 101
HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS 106
OBJECTIFS 108
PROCEDURES EXPERIMENTALES 110
1. Les animaux 110
2. Préparation des peptides 110
3. Modèles cellulaires : cultures primaires de neurones corticaux 111
3.1. Mise en culture des neurones 111
3.2. Traitements par le peptide Aβ soluble 113
3.3. Traitements par les agents antioxydants 113
3.4. Traitements par les inhibiteurs 114
4. Etude de la viabilité cellulaire et des marqueurs d'apoptose 114
4.1. Test de cytotoxicité 114

4.2. Mesure de la viabilité neuronale par la calcéine 115
4.3. Marquage nucléaire au DAPI : détection des corps apoptotiques 115
4.4. Mesure de l'activité des caspases 116
5. Electrophorèse et immunoblot 117
5.1. Electrophorèse 117
5.2. Immunoblot 118
6. Etude *in vivo* de la toxicité des peptides Aβ 120
6.1. Techniques stéréotaxiques d'injection 120
6.1.1. Anesthésie 120
6.1.2. Injection intracérébrale 120
6.2. Analyses comportementales 122
6.2.1. Labyrinthe en Y 122
6.2.2. Piscine de Morris 123
6.2.3. Analyses statistiques des données 127
6.3. Etude du stress oxydant *in vivo* 127
6.3.1. Formation des espèces réactives dérivées de l'oxygène (EROs) 127
6.3.2. Mesure de la peroxydation lipidique 128
6.3.3. Mesure de la concentration en protéines 130
7. Techniques d'histochimie et immunohistochimie 131
7.1. Fixation du cerveau par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde 131
7.2. Coupes des cerveaux au cryostat 132
7.3. Marquages immunohistologiques 133
7.4. Coloration histologique à l'acétate de thionine 135
RESULTATS - PREMIERE PARTIE 137
1. Etude des propriétés neurotoxiques des peptides Aβ tronqués dans leur domaine amino-terminal. 138
1.1. Introduction 138
1.2. Objectifs 139
1.3. Résultats - MANUSCRIT # 1 140
1.4. Discussion 174
RESULTATS - DEUXIEME PARTIE 179
2. L'humanine, un peptide neuroprotecteur : étude de ses effets *in vivo* et *in vitro* 180
2.1. Introduction 180
2.2. Objectifs 186
2.3. Résultats - MANUSCRIT # 2 188
2.4. Discussion 229
CONCLUSION GENERALE 236
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 240
ANNEXES 267
PUBLICATION # 1 268
PUBLICATION # 2 281

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications parues

Malaplate-Armand C, Florent-Bechard S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier JL, Oster T, Pillot T (2006). Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA(2)-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway., *Neurobiol. Dis.*, 23(1):178-189.

Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanye MC, Fifre A, Sponne I, Leininger-Muller B, Olivier JL, Pillot T, Oster T (2006). Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. *J. Neurochem.*, 96(2):385-95.

Publication soumise

Youssef I, Florent-Bechard S, Malaplate-Armand C, Koziel V, Kriem B, Olivier JL, Leininger-Muller B, Oster T, Pillot T. Soluble oligomers of N-terminal truncated amyloid-β peptide impair spatial cognition learning ability and induce neuronal apoptotic cell death. (Soumise à *Neurobiol. Aging*)

Publication en préparation

Youssef I, Florent-Bechard S, Malaplate-Armand C., Koziel V, Kriem B, Olivier JL, , Oster T, Pillot T, Leininger-Muller B. Humanin, an endogenous peptide protects against soluble Aβ oligomers *in vivo* and *in vitro*.

Communication orale

Youssef I. Les oligomères solubles du peptide β-amyloïde: études in vivo de cytotoxicité et recherche de cibles thérapeutiques dans la maladie d'Alzheimer. Journée PharmaRecherche. UHP Nancy, Mars 2005.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide arachidonique
ACh : Acétylcholine
AChE : Acétylcholine estérase
ADAM : «A desintegrin and metalloprotease»
ADNF : «Activity-dependent neurotrophic facteur»
AG : Acide gra
AGPI : Acide gras polyinsaturé
AICD : «APP intracellular domain»
AINS : «Anti-inflammatoires non stéroïdiens»
AMM : Autorisation de mise sur le marché
Anaes : Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé
APH-1 : «Anterior pharynx defective 1 a homologue »
APH-2 : «Anterior pharynx defective 2 a homologue »
APLP : «Amyloid precursor-like protein »
apoE : Apolipoprotéine E
APP : Protéine précurseur du peptide β-amyloïde
APPs : Fragment soluble de l'APP
Arc : «Activity-regulated cytoskeleton associated protein»
ATBF1 : «AT motif-binding factor 1»
Aβ: Peptide β-amyloïde
BACE : « β-site APP cleaving enzyme »
BChE : Butyryle choline estérase
BHE : Barrière hémato encéphalique
BMK : «big MAP kinase 1»
C1P : Céramide 1 Phosphate
CAPPD : «Central APP domain»
CDRS : «Clinical dementia rating scale»
Cer1K : «Céramide1 kinase»
ChAT : «Choline acétyle transférase»
COX : Cyclooxygénase
CuBD : «Copper binding domain»
DHA : Acide docosahexaénoïque
DNF : Dégénérescence neurofibrillaire
DSM-VI : «Diagnostic and statistical manual of mental disorder, forth edition»
ERK : «Extracellular signal-regulated kinases»
ERO : Espèce réactive dérivée de l'oxygène
FAD : Forme familiale de la maladie d'Alzheimer
FPRL1 : «Formylpeptide receptor-like-1»
GDNF : «Glial-derived neurotrophic factor»
GFLD : «Growth factor like domain»
GSK-3β : «Glycogen synthase kinase-3β »
H2O2 : Peroxyde d'hydrogène
HN : Humanine
HN-R : «Humanin receptor»
HSPG : «Héparine sulfate protéoglycanes»
i.c.v. : Intracérébroventriculaire
IEG : «Immediate early genes»
IL-1β : Interleukine-1β
IRMf : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
IRMs : Imagerie par résonance magnétique structurale
JNK : «c-jun N-terminal protein kinases»
LPS : Lipopolysaccharides
LRP : «LDLR related protein»
LTP : Potentialisation à long terme
MA : Maladie d'Alzheimer
MAP : «Microtubule Associated Protein»
MAPK : «mitogen-activated protein kinase»
MCI : «Mild cognitive impairment»
Met35 : Méthionine en position 35
MetSO : Méthionine sulfoxyde
MIP-1α : «Macrophage inflammatory protein»
MMSE : «Mini mental state examination»
nAChR : Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NC : Noyau caudé
Nct : Nicastrine
NF-κB : «Nuclear factor κB»
NINCDS-ARDA : «National institute of neurologic and communicative disorder and stroke-alzheimer disease and related disorder association»
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NSE : «Neuron specific enolase»
PA : Plaques amyloïdes
PDGFβ : «Platelet derived growth factor β»
PEN1 : «Presenilin enhancer 1»
PEN2 : «Presenilin enhancer 2»
PHF : «Paired helical filament»
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PS : Préséniline
PSD95 : «postsynaptic density 95»
RAGE : «Receptor for advanced glycation end products»
SAD : Forme sporadique de la maladie d'Alzheimer
SAP : «Serum amyloid P component»
SAPK : «Stress-activated protein kinases»
SDS : Dodécyl sulfate de sodium
SEC-R : «serpin complex receptor»
SNC : Système nerveux central
SOD : Superoxyde dismutase
TACE : «Tumor necrosis factor-α converting enzyme»
TEMP : Tomographie par émission monophotonique
TEP : Tomographie par émission de positrons
VACht : Transporteurs vésiculaires de l'acétylcholine
VL : Ventricule latéral
VIII : Troisième ventricule
VLDLR : «Very low density lipoprotein receptor»
α1-ACT : α1-antichymotrypsine
α7nAChR : «α 7 nicotinic acetylcholine receptor»

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Dessins originaux des dégénérescences neurofibrillaires..... 15
Figure 2 : Schéma simplifié du trajet des informations sensorielles..... 22
Figure 3 : Tomographie d'émission de positons au FDG (fluoro-déoxy-glucose) chez des sujets normaux (*à gauche*), et chez des patients ayant une MA (*à droite*). 29
Figure 4 : Coupe de cerveaux de patient Alzheimer (A) et d'une personne du même âge, non atteinte de pathologie neurodégénérative (B)..... 31
Figure 5 : Composition d'une plaque amyloïde. 33
Figure 6 : Imprégnation argentique d'une coupe de cortex de patient atteint de la MA. 34
Figure 7 : Coupe de cerveau de patient atteint par la MA colorée avec l'hématoxyline et l'éosine montrant des DNF localisées dans les neurones (flêches)..... 35
Figure 8 : Les différents stades d'évolution de la dégénérescence neurofibrillaire. 36
Figure 9 : Organisation et épissage alternatif du gène humain codant la protéine *Tau*. 38
Figure 10 : Coupes de cerveau d'un patient atteint de MA marquées avec les anticorps anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) et anti-HO-1 (*Glial heme oxygenase-1*). 39
Figure 11 : Coupes d'hippocampe d'un cerveau de malade Alzheimer (A) et d'un témoin (B) doublement marquées avec les anticorps anti-RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*) *(en noir) et anti-MHC II (en brun).*..... 40
Figure 12 : Coupe de cerveau de patient atteint de MA illustrant une angiopathie amyloïde caractérisée par un dépôt amyloïde (A) accolé à un vaisseau sanguin (B). 41
Figure 13 : Différentes isoformes de la protéine APP. 47
Figure 14 : Les différents domaines de l'APP (164)..... 48
Figure 15 : Les deux voies de maturation de l'APP..... 51
Figure 16 : Représentation schématique du clivage de l'APP *in situ*. 55
Figure 17 : La cascade amyloïde..... 56
Figure 18 : Structure primaire du peptide Aβ 57
Figure 19 : Modélisation des changements structuraux du peptide Aβ associés à la fibrillogenèse (327). 58
Figure 20 : Voies de signalisation intra- et inter-cellulaire impliquées dans la mort neuronale induite par le peptide Aβ fibrillaire (690) 61
Figure 21 : Représentation schématique de l'intervention des différentes caspases durant l'apoptose neuronale induite par le peptide Aβ fibrillaire..... 62

Figure 22 : Structure tridimensionnelle du peptide $A\beta_{40}$ 68
Figure 23 : Composition d'un canal amyloïde (27) 70
Figure 24 : Coupe horizontale d'un cerveau de souris après coloration à la thionine 88
Figure 25 : Plateforme de signalisation cellulaire de mort neuronale apoptotique induite par les oligomères solubles de peptide Aβ (sAβ) et facteurs neuroprotecteurs identifiés..... 107
Figure 26 : Immunoblot montrant les préparations de peptides oligomériques (lignes 1 et 3) et fibrillaires (lignes 2 et 4) de peptides Aβ(1-40) (lignes 1 et 2) et Aβ(1-42) (lignes 3 et 4). ... 111
Figure 27 : Repères osseux du crâne de souris 121
Figure 28 : Différentes étapes expérimentales suivant l'injection i.c.v. de peptide Aβ 122
Figure 29 : Représentation schématique du dispositif du labyrinthe en Y 123
Figure 30 : Représentation schématique du dispositif de la piscine de Morris..... 124
Figure 31 : Test de la piscine de Morris..... 126
Figure 32 : Principe du test de mesure de la 2',7'-dichlorofluoresceine..... 128
Figure 33 : La réaction de formation de l'adduit malondialdéhyde -acide thiobarbiturique. 129
Figure 34 : Représentation schématique du dispositif de fixation par perfusion intracardiaque. 132
Figure 35 : Les oligomères solubles de peptide Aβ3(pE)-42 perturbent la voie de survie cellulaire impliquant la protéine Akt..... 178
Figure 36 : Modélisation moléculaire de l'humanine (42) 182
Figure 37 : Hypothèses sur les effets neuroprotecteurs de l'HN dans le cadre de la MA 185
Figure 38 : Inhibition de l'activité neuroprotectrice de l'HNG par la toxine pertussique. 230

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Prévalence de la maladie d'Alzheimer en fonction de l'âge..... 18
Tableau 2 : L'épreuve des 5 mots 24
Tableau 3 : Critères NINCDS-ADRDA de la maladie d'Alzheimer 26
Tableau 4 : Souris transgéniques pour la protéine APP..... 76
Tableau 5 : Souris transgéniques pour les protéines APP/PS 81
Tableau 6 : Modèles d'injection de peptide Aβ chez le rat..... 85
Tableau 7 : Modèles d'injection de peptide Aβ chez la souris 87
Tableau 8 : Composition des différents milieux de culture primaire des neurones..... 112
Tableau 9 : Liste des anticorps utilisés en immunoblot..... 119
Tableau 10 : Anticorps primaires et secondaires utilisés dans les essais de marquages immunohistochimiques des coupes de cerveaux de souris. 134
Tableau 11 : Etude structure-fonction de l'HN et de ses dérivés. 181

AVANT-PROPOS

Dès 1901, Alois Alzheimer, neurologue et psychiatre bavarois, fut intrigué par le cas d'Auguste D., une dame de 51 ans dont le comportement devenait progressivement étrange. De telles manifestations étaient généralement imputées au grand âge, ce qui n'était pas le cas ici. Alois Alzheimer a présenté ses observations en 1906 lors de la 37ème Conférence des Psychiatres allemands. Il avait alors mentionné :

« *Bientôt apparurent des absences de mémoire de plus en plus graves. Elle ne se retrouvait plus dans son appartement, traînait les objets ici et là, les dissimulait, croyait parfois qu'on voulait la tuer et se mettait alors à crier. Son comportement à l'asile donne la preuve d'une totale confusion. Elle est complètement désorientée dans le temps comme dans l'espace. Il lui arrive parfois de déclarer qu'elle ne comprend plus rien, qu'elle ne s'y reconnaît plus. [...] Sa perception est complètement perturbée. Si on lui montre certains objets, elle a tout oublié. Quand elle lit, elle saute d'une ligne à l'autre, ânonne les mots avec intonation erronée. En écrivant, elle répète plusieurs fois certaines syllabes, en oublie d'autres et s'égare rapidement. En parlant, elle s'embrouille ou utilise des paraphrases à la place d'un mot (verseur de lait pour tasse, par exemple). Manifestement, elle ne comprend pas le sens de nombreuses questions. Elle semble avoir oublié l'usage de certains objets. La marche est normale et elle se sert correctement de ses mains. Le réflexe rotulien existe, les pupilles réagissent. Les artères radiales sont un peu rigides, le rythme cardiaque est normal, pas d'albumine. Les symptômes se manifestent de manière plus au moins aiguë mais l'hébétude progresse en général. A la fin, la malade était totalement apathique, étendue sur son lit, les jambes allongées, incontinente et, malgré les soins, elle finit par avoir des escarres. [...] L'autopsie révéla une atrophie régulière du cerveau sans foyer macroscopique.*»

Auguste D. (1850-1906)

Aloïs Alzheimer (1864-1915)

Il s'agit là de la première description de l'évolution des atteintes mnésiques et des perturbations comportementales caractéristiques de ce syndrome qui a pris le nom de « maladie d'Alzheimer » (MA). Ces atteintes et perturbations diffèrent de par leurs caractéristiques ainsi que leur évolution de celles observées dans le cadre du vieillissement non pathologique du système nerveux. Ces observations montrent l'impact de la maladie sur la vie quotidienne, ainsi que sur le degré de dépendance des patients. Plus tard, le docteur Aloïs Alzheimer a procédé à une analyse post-mortem du cerveau de la patiente et a décrit une atrophie cérébrale. Cependant, il a fallu attendre le dernier tiers du XX^{ème} siècle pour que les connaissances sur cette maladie neurodégénérative évoluent de façon significative. Depuis les premières descriptions anatomopathologiques, en passant par la caractérisation des événements tissulaires et cellulaires impliqués, jusqu'aux plus récentes alternatives thérapeutiques comme l'immunisation passive, plus de 50 000 articles scientifiques consacrés à cette maladie ont été publiés. L'extrême complexité de cette pathologie qui touche spécifiquement les fonctions cognitives supérieures du système nerveux central (SNC) humain, ainsi que la masse d'informations disponible, rendent illusoire la synthèse des différents aspects relatifs à ce domaine.

De nos jours, les maladies neurodégénératives constituent un problème de santé publique dont l'acuité est exacerbée par l'augmentation de l'espérance de vie. En effet, ces maladies (Alzheimer, Parkinson et autres démences séniles) sont directement liées au vieillissement. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la mort neuronale associée au développement de ces pathologies restent pour l'essentiel incompris, même s'il est admis qu'ils sont soumis à l'influence simultanée de composantes génétiques et environnementales. Ainsi, la détermination des causes des dysfonctionnements cellulaires associés aux pathologies neurodégénératives, la MA en particulier, est l'un des défis majeurs posés à la communauté scientifique. Pourtant, l'examen de la littérature indique que nous sommes encore loin de pouvoir proposer une stratégie thérapeutique efficace pour la MA. Plusieurs raisons peuvent être invoquées, parmi lesquelles la faiblesse des modèles animaux mis au point, un manque de données fiables sur l'impact de facteurs environnementaux et épigénétiques, l'absence de marqueur biologique permettant le diagnostic précoce et le suivi de la progression de la pathologie, mais surtout une méconnaissance des mécanismes et acteurs moléculaires conduisant à la neurodégénérescence, notamment lors des stades les plus précoces de la maladie.

Face à la complexité de la MA et au nombre impressionnant d'excellents travaux publiés, la modestie et la simplicité sont de mise. A l'échelle d'un laboratoire, d'une équipe et bien plus encore d'un chercheur, il est nécessaire de se poser des questions scientifiques simples afin d'apporter notre concours à la progression de nos connaissances fondamentales sur cette pathologie. Dans le monde animal, le SNC humain est sans aucun doute le système le plus complexe et nous en ignorons encore bien des aspects. Pour espérer pouvoir comprendre son fonctionnement et agir sur ses dysfonctionnements, il est nécessaire de développer des modèles d'étude dans un but de simplification.

Mon travail de thèse réalisé avec l'ensemble des membres de l'équipe de Thierry Pillot s'est donc inscrit dans le cadre de l'étude des mécanismes moléculaires par lesquels le peptide Aβ soluble induit les dysfonctionnements synaptiques conduisant à l'apoptose neuronale dans la MA. Considérant le peptide Aβ sous forme d'oligomères solubles comme un acteur précoce et déterminant de la MA et prenant en compte l'aspect intégré du SNC, l'objectif de mon travail de thèse a été de contribuer à l'élaboration de stratégies thérapeutiques appliquées à cette pathologie neurodégénérative.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La maladie d'Alzheimer : 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).

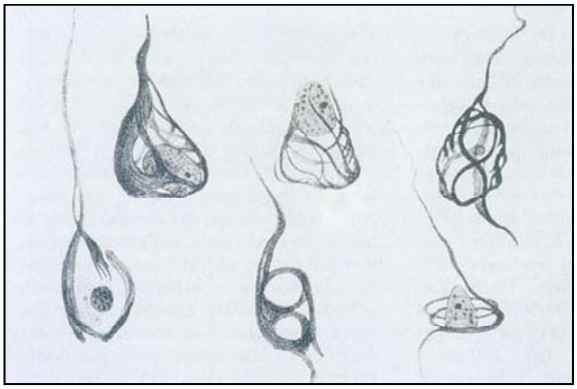


Figure 1 : Dessins originaux des dégénérescences neurofibrillaires

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 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 (PA) ou plaques séniles. Les connaissances relatives à la dégénérescence neurofibrillaire ne connaîtront en revanche d'avancées significatives qu'en 1963, lorsque Kidd (371) démontre grâce à la microscopie électronique qu'il s'agit en fait de paires de filaments en hélice « paired helical filament » (PHF) de 10 nm de diamètre. L'histoire moléculaire de la MA s'ouvre en 1984, lorsque Glenner & Wong (227) caractérisent le peptide amyloïde β (Aβ), constituant principal des PA. En 1986, Brion *et al*. (70) mettent en évidence la présence de protéine *Tau* dans les PHF, tandis que Grundke-Iqbal *et al*. (247) en démontrent la phosphorylation anormale. En 1989, Flament *et al*. (188) proposent les protéines *Tau* comme marqueurs de la dégénérescence neurofibrillaire. Deux grandes hypothèses tentent alors d'expliquer les causes de la MA. L'hypothèse tauïste, qui postule que le facteur déclenchant est la phosphorylation anormale de la protéine *Tau* et la formation des PHF, et l'hypothèse de la cascade amyloïde, qui a pour élément central le peptide Aβ et la formation des PA. Dès 1994 émerge un nouveau centre d'intérêt, le peptide Aβ soluble, proposé comme marqueur cérébral de la MA par Tabaton *et al*. (734) et dont la neurotoxicité a été rapportée pour la première fois par Oda *et al*. (1995) (552). L'origine du peptide Aβ n'est élucidée qu'avec la caractérisation des β- (783) et γ-sécrétases (139) 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.

2. Généralités

2.1. 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 B_{12} 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 (207). 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 Vieillissement 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.

2.2. Prévalence de la maladie d'Alzheimer

2.2.1. 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 neurodégénératives, 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*. (1998) (67) 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 (420). 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 (207)

	Hommes					Femmes				
Age (ans)	65-69	70-74	75-79	80-84	>85	65-69	70-74	75-79	80-84	>85
Prévalence (%)	-	-	7,7	12,5	23,9	-	-	5,7	16,6	38,4

2.2.2. Répartition en fonction du sexe

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 (198), la maladie de Parkinson (835) ou la sclérose amyotrophique latérale (536), suggérant un impact des modifications hormonales liées au vieillissement dans ces pathologies (31). 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 (31). 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 hormonal (835 ; 871).

2.2.3. 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*. (2005) (313) 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 (197), suggérant une influence directe des activités intellectuelles, sportives et sociales dans la protection contre les pathologies neurodégénératives. Berkman *et al*. (2000) (45) avaient 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 (780), stimule l'apprentissage et les fonctions cognitives après l'apparition de différentes lésions cérébrales (405 ; 603), et limite la formation des dépôts amyloïdes caractéristiques de la MA chez les modèles d'animaux transgéniques (422).

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*. (1992) (716) 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 (653). 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 (423), 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.

2.2.4. Facteurs nutritionnels

De nombreuses études épidémiologiques traitant de l'importance de la nutrition dans le développement des maladies neurodégénératives sont disponibles (356 ; 357 ; 594 ; 697 ; 698). 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 (289) et des Japonais émigrés aux États-Unis (242 ; 820) 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 (567 ; 697). 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 (34 ; 113 ; 312 ; 356 ; 514). 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 ω3 (447 ; 726 ; 732). L'intérêt nutritionnel des AGPI et notamment du DHA, proposé par Burr & Burr dès 1929 (77), 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). Les AGPI sont des constituants essentiels des membranes neuronales pour lesquels les patients atteints de la MA présentent souvent un déficit (181 ; 276 ; 695). Ainsi, il a été suggéré que de faibles niveaux sériques de DHA puissent accroître le risque de développement de la MA (117).

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 (458 ; 486 ; 514 ; 571 ; 834). 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 (545 ; 572). L'ensemble de ces travaux suggère une influence déterminante de l'apport et du métabolisme lipidique dans le maintien des fonctions cognitives (464).

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

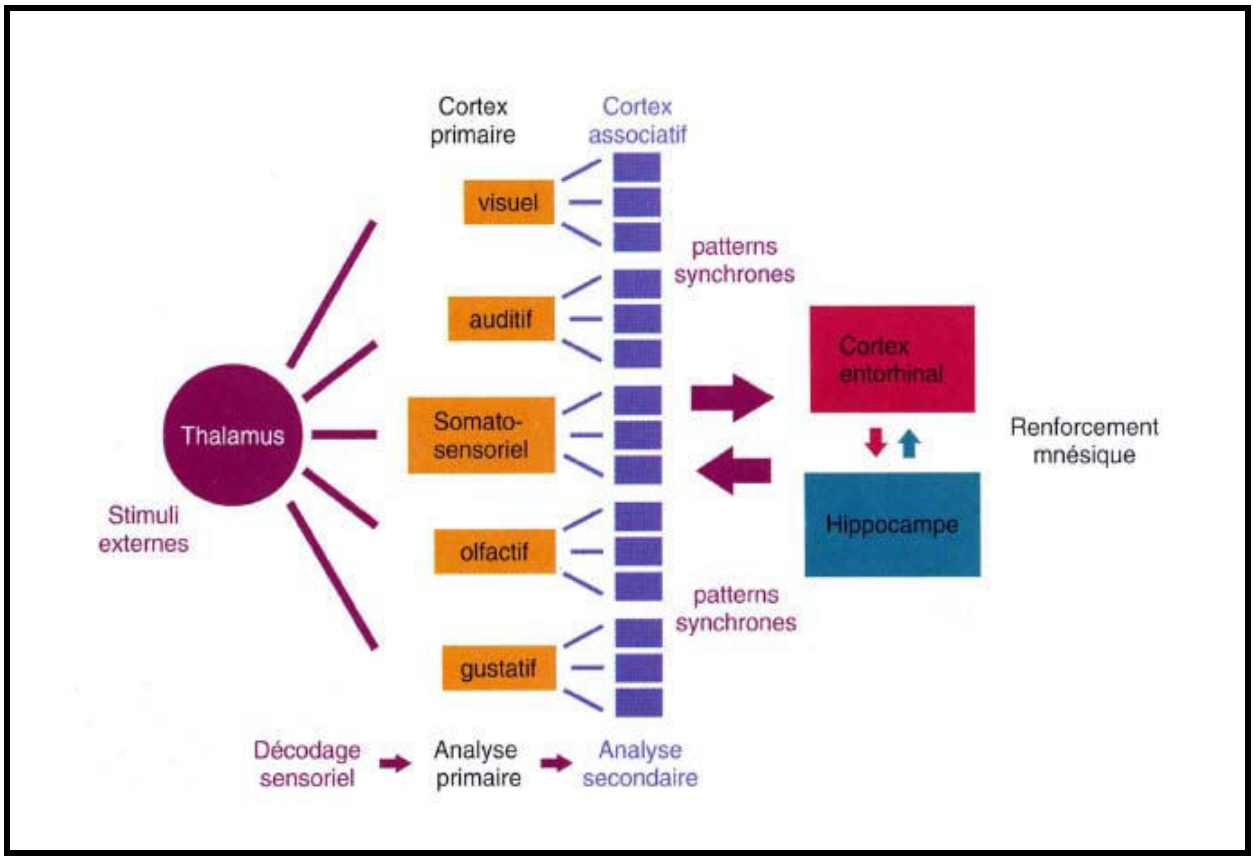
flavonoïdes, pourraient avoir un rôle clef lors du vieillissement en prévenant les maladies neurodégénératives (350). En effet, ces dernières se traduisent souvent par une forte augmentation des marqueurs de stress oxydant (5 ; 350 ; 478) et la survenue d'un processus inflammatoire (175) dont l'ampleur peut être limitée par l'ingestion de ces composés. La présence de métaux tels que l'aluminium dans l'alimentation a également fait l'objet de nombreuses études, mais l'association à un risque accru de maladie neurodégénérative reste controversée (697).

3. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer

En l'absence de marqueurs spécifiques de la MA, l'approche neuropsychologique représente le principal moyen de détection de la maladie. Il s'appuie sur un ensemble de critères permettant la révélation d'un dysfonctionnement apprécié au terme d'un bilan à la fois neurologique, cognitif et comportemental. Récemment, le développement des techniques d'imagerie cérébrale (imagerie par résonance magnétique, scintigraphie et tomographie par émission de positrons) a permis d'y associer des marqueurs objectifs en terme de sévérité et d'étendue des atteintes cérébrales. Une meilleure corrélation entre les techniques d'imagerie et les examens cliniques représente un des aspects de recherche clinique actuellement développés. Cela permettrait un meilleur suivi de l'évolution de la maladie et d'estimer l'efficacité d'un éventuel traitement.

3.1. Circonstances diagnostiques

Les patients atteints de la MA passent par une phase asymptomatique qui peut durer près de 20 ans. Puis apparaissent les premières lésions dans le lobe temporal, plus précisément dans l'hippocampe qui est la structure majeure impliquée dans le processus mnésique et l'orientation spatio-temporelle. Les lésions s'étendent ensuite vers les lobes frontaux, temporaux, pariétaux et occipitaux, aux régions responsables des fonctions supérieures comme le langage, la motricité et l'identification visuelle (Figure 2).



<u>Figure 2</u> : Schéma simplifié du trajet des informations sensorielles

Le début de la MA est insidieux et progressif, il est marqué par l'apparition d'une perte de la mémoire à court terme, qui va avoir un impact sur la vie sociale et familiale des patients. Les sujets présentent un déclin cognitif léger ou MCI « *Mild cognitive impairment* » (245 ; 345 ; 596 ; 644), déclin cependant pathologique qui risque d'évoluer vers une démence. Le malade perd le sens de l'initiative, présente des troubles du langage et perd la capacité d'effectuer les taches les plus courantes comme, par exemple, le fait de s'habiller.

Quelques années plus tard, les symptômes se compliquent avec l'apparition des troubles cognitifs plus profonds : atteinte de la mémoire à long terme, perte de l'orientation spatio-temporelle. Le patient présente alors des troubles du comportement, de l'agitation, le sens du rythme circadien, des troubles psychiques (délires, hallucinations, dépression, troubles de l'humeur). A des phases plus tardives, les patients présentent des altérations du langage (aphasie), des troubles du geste (apraxie), des difficultés à effectuer des tâches plus au moins complexes (utiliser les appareils électroménagers, téléphoner). Ces difficultés dépendent du stade d'évolution de la maladie.

3.1.1. Les signes cliniques cognitifs

Les premiers stades de la MA sont caractérisés par une perte sévère de la mémoire épisodique (capacité à transformer une information précise en souvenir). Ce déficit mnésique reste méconnu par le patient en raison d'une inconscience associée et rend indispensable l'interrogation de l'entourage pour évaluer le retentissement quotidien du déficit mnésique. La quantification du déficit de la mémoire à long terme n'est pas suffisant pour diagnostiquer avec certitude un début de MA. Il faut aussi caractériser la nature du déficit de la mémoire et évaluer les différentes étapes du processus mnésique (encodage, consolidation et récupération). En effet, le déficit de la mémoire observé durant le début de la MA étant dû principalement à des troubles dans la capacité de consolidation, il est nécessaire de pouvoir écarter les autres mécanismes qui peuvent perturber la capacité de rappel et qui sont communs à d'autres syndromes comme la dépression, mais aussi au vieillissement normal du système nerveux central (SNC). C'est tout l'intérêt des tests de mémoire comprenant la vérification de l'encodage initial et une mesure de rappel libre indicé, car ils offrent les moyens de faire cette analyse qualitative du déficit mnésique. Les troubles mnésiques caractéristiques de la MA sont donc : i) un effondrement de la capacité de rappel ; ii) aide insuffisante de l'indiçage ; iii) performance de rappel totale (libre et indicé) atténuée ; iiii) confusion et fausses reconnaissances. Ce tableau clinique nommé « syndrome amnésique de type hippocampique » est différent de celui observé lors du vieillissement normal ou dans les troubles fonctionnels pour lesquels les performances de rappel libre sont moins atténuées et l'indiçage est normal. L'épreuve des 5 mots (161), rapide et réalisable aisément en consultation, permet de tester les capacités mnésiques et de repérer la présence d'une amnésie de type hippocampique (Tableau 2).

La désorientation spatio-temporelle est précoce. Elle peut précéder la désorientation spatiale. Cette dernière fait que le patient perd le sens de l'orientation et se perd de plus en plus souvent même dans un environnement familial.

Les troubles du langage (aphasie) se caractérisent par un manque de mots en langage spontané et en dénomination poussant le patient à utiliser des termes vagues (388 ; 781 ; 808).

Les troubles du geste (apraxie) se caractérisent par l'incapacité d'exécuter les tâches bimanuelles les plus simples et des troubles visuoconstructifs qui sont démontrés par la tâche de copie de dessins (147). L'apraxie est plus tardive et plus handicapante puisqu'elle touche l'exécution des tâches de la vie quotidienne.

Les atteintes des capacités d'abstraction et de conceptualisation apparaissent précocement, mais elles peuvent être masquées par la préservation des habitudes de conversation, le respect des convenances et le jugement social ainsi que l'évitement des situations complexes.

Tableau 2 : L'épreuve des 5 mots *(161)*

Limonade **Passoire** **Camion** **Musée** **Sauterelle**
Consignes **1)** Montrer la liste : « Lisez cette liste de mots à voix haute et essayez de les retenir, je vous les redemanderai tout à l'heure » **2)** Interroger le patient : « Pouvez-vous me dire tout en regardant la liste, quel est le nom de la boisson, l'ustensile de cuisine, le véhicule, le bâtiment, l'insecte ?» **3)** Retourner la liste et interroger à nouveau le patient : « Pouvez-vous me redonner les mots que vous venez de dire ?» **4)** Pour les mots non rappelés, et seulement pour ceux-ci, demander : « Quel était le nom de ...?» (en fournissant l'indice correspondant) ► Comptez le nombre de réponses correctes = **score d'apprentissage** (maximum = 5) **5)** Si le score est inférieur à 5 : remontrer la liste et indiquer du doigt les mots non rappelés, puis retourner la liste et redemander au patient les mots non rappelés en réponse à l'indice. Le but est de s'assurer que le patient a bien enregistré les mots **6)** Poursuivre la consultation médicale ou faire d'autres tests pour détourner l'attention 3 à 5 minutes **7)** Interroger de nouveau le patient : « Pouvez-vous me redonner les 5 mots ?», puis, pour les mots non rappelés, demander « Quel était le nom de ... ?» (en fournissant l'indice correspondant) ► Compter le nombre de bonnes réponses = **score de mémoire** (maximum = 5) **Score global = score d'apprentissage + score de mémoire = normalement à 10**

3.1.2. Mesure de la sévérité de la démence et critères de diagnostic.

Plusieurs tests ont été mis au point pour évaluer le degré d'atteinte cognitive des patients. Ils s'appuient sur un questionnaire visant à évaluer les capacités mnésiques du patient. **L'examen de l'état mini-mental ou MMSE** « *Mini mental state examination* » (551 ; 628) permet d'évaluer rapidement la déficience cognitive globale, l'appréciation de la sévérité de la démence et de repérer facilement un désordre cognitif éventuel. Le diagnostic est porté à l'aide d'un ensemble de critères qui font l'objet d'un consensus international et font référence à un diagnostic de démence de type syndromique basé sur le **DSM-VI** « *Diagnostic and statistical manual of mental disorder, fourth edition* » qui permet de distinguer si la maladie est probable ou possible sans tenir compte du mécanisme causal. C'est pourquoi les médecins se réfèrent à d'autres critères dont le **NINCDS-ADRDA** « *National institute of neurologic and communicative disorder and stroke-Alzheimer disease and related disorders association* » (Tableau 3).

Ces critères sont identifiés à l'issue d'une démarche diagnostique qui s'appuie sur un entretient, un examen clinique et neuropsychologique (bilan neurologique, cognitif et comportemental). Le score obtenu suite à cet entretient permet de classer la probabilité de la démence dans différentes catégories.

Elle est considérée comme :

- Certaine si la preuve histologiques *post-mortem* est apportée.
- Probable lorsque le tableau clinique est typique en l'absence de confirmation par analyse.
- Possible lorsque le tableau clinique est atypique et que la preuve histologique *post-mortem* n'a pas été établie. Le recours à l'imagerie cérébrale permet de vérifier la présence d'une éventuelle atrophie et de distinguer si elle est de type hippocampique ou de type global, touchant différentes structures du cerveau et surtout d'éliminer les autres causes de démence.

En général, lorsque des signes neurologiques sont détectés, un examen physique est demandé. Cet examen comporte entre autre la recherche des désordres qui peuvent être associés avec la MA comme les pathologies cardiovasculaires, des désordres nutritionnels et une perte de poids.

Tableau 3 : Critères NINCDS-ADRDA de la maladie d'Alzheimer

Maladie d'Alzheimer probable

- Démence avérée sur la foi d'un MMS < 24 ou IMC > 8
- Atteinte d'au moins un autre secteur cognitif : aphasie, apraxie, agnosie
- Détérioration progressive de la mémoire et des autres fonctions cognitives
- Absence de trouble de la conscience et d'autres pathologies potentiellement causales
- Début après l'âge de 50 ans

►**Arguments additionnels importants**

- Perturbation des activités de la vie quotidienne ou troubles du comportement
- Histoire familiale, a fortiori si elle est confirmée neuropathologiquement
- PL normale et EEG normal ou anomalies non spécifiques (ondes lentes)
- Atrophie à la tomodensitométrie cérébrale, avec progression sur plusieurs examens successifs

►**Atypie clinique acceptable après exclusion d'autres causes de démence**

- Paliers dans le cours de la maladie
- Présence de dépression, hallucinations, idées délirantes, amaigrissement, incontinence, bouffées d'angoisse ou d'agitation, troubles sexuels, insomnies
- Anomalies neurologiques d'apparition tardives : hypertonie, myoclonies, troubles de la statique, crises d'épilepsie
- Tomodensitométrie considérée comme « normale pour l'âge »

►**Atypies cliniques rendant le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable incertain**

- Début brutal
- Signes neurologiques survenant dans le cours de la maladie : hémiparésie, déficit sensitif, déficit du champ visuel, incoordination
- Crises d'épilepsie ou troubles de la statique de survenue précoce

Maladie d'Alzheimer possible

- Syndrome atypique par : son mode de début, son évolution, sa présentation clinique mais en l'absence d'autre cause de démence
- En cas de pathologie associée, cérébrale ou générale, qui pourrait entraîner une démence mais, dans le cas particulier, n'est pas considérée comme causale
- Déficit cognitif sévère, isolé, graduellement progressif (dans un cadre de recherche)

L'examen physique

Il est « normal » dans la MA, au moins au début. L'examen comporte systématiquement un examen général, notamment cardiovasculaire, ainsi qu'une évaluation nutritionnelle, la perte de poids étant fréquente chez les patients atteints de MA. Tout signe neurologique somatique (crises d'épilepsie, myoclonies) doit faire rechercher d'autres diagnostics.

Le bilan biologique

Selon les recommandations de l'Anaes, il comporte, en dehors de paramètres classiques (hémogramme, ionogramme, glycémie, calcémie, protidémie, enzymes hépatiques) : la TSH, les vitamines B12 et les folates, des sérologies de la syphilis et de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. Dans les démences neurodégénératives, ce bilan doit être normal. A l'heure actuelle, on ne dispose pas de marqueur biologique spécifique de la MA. Récemment, un nouveau test basé sur la mesure des oligomères du peptide Aβ dans le LCR a été proposé (47).

L'imagerie cérébrale : tomodensitométrie et/ou IRM

La tomodensitométrie cérébrale permet d'éliminer d'autres causes de démence. Lorsqu'elle montre une atrophie corticale, celle-ci n'a de valeur diagnostique que si elle touche une région définie du cortex cérébral (389). L'IRM cérébrale permet de mettre en évidence une atrophie de structures hippocampiques à un stade précoce de la MA (129 ; 645).

Autres éléments de diagnostic

Le bilan peut être élargi à d'autres paramètres en fonction du contexte par une ponction lombaire (LCR normal dans le cas d'une MA), un électroencéphalogramme (suspicion de crises épileptiques) ou une scintigraphie cérébrale reposant sur la mesure du débit sanguin cérébral. Ces examens supplémentaires entrent surtout dans le cadre d'un diagnostic différentiel d'autres types de démences (démence fronto-temporale, démence vasculaire).

3.1.3. L'apport des techniques d'imagerie fonctionnelle

L'imagerie cérébrale contribue de plus en plus au diagnostic positif de ces pathologies neurodégénératives, permettant de distinguer les atrophies et les dysfonctionnements cérébraux. Récemment sont apparues des nouvelles techniques à l'aide de radiotraceurs et en imagerie par résonance magnétique (IRM) (566) à très haut champ qui

permettent d'espérer mettre en évidence des plaques séniles (PA) caractéristiques de la MA. Après avoir étudié les stades tardifs de la pathologie, les clinitiens se tournent vers les stades précoces et même présymptomatiques de la maladie. Les données accumulées récemment suggèrent que l'imagerie pourrait détecter des anomalies morphologiques ou fonctionnelles très précocement. La neuro-imagerie fonctionnelle fait appel à des techniques utilisant des traceurs radioactifs comme la tomographie par émission de positons (TEP) (74 ; 337 ; 386) (Figure 3) et la tomographie par émission monophotonique (TEMP) (61 ; 416 ; 677) et de plus à l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf). Les techniques radioactives permettent l'évaluation du métabolisme cérébral du glucose, l'analyse de la perfusion cérébrale et la réalisation d'études pharmacologiques (762). D'autres voies de recherche en cours à l'aide de la technique de TEP visent à mettre au point des marqueurs pour la détection précoce des PA par imagerie *in vivo* (135 ; 682). L'ambition est de produire des molécules ayant une affinité suffisante pour se lier aux PA et de visualiser *in vivo* cette interaction.

Le TEP et TEMP permettent aussi d'étudier les différents systèmes de neurotransmission atteints au cours de la MA. En effet, la diminution du nombre de transporteurs vésiculaires de l'acétylcholine (VAChT) (171) et celle du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) (503 ; 657) constituent des cibles pour une imagerie moléculaire *in vivo.*

L'IRMf permet l'étude du fonctionnement cérébral normal et pathologique. Elle montre un dysfonctionnement des structures temporales médianes dans la MA et des phénomènes de compensation au début de la maladie et chez les sujets à risque, en particulier dans les lobes frontaux (35 ; 770). L'imagerie par résonance magnétique structurale (IRMs) permet de localiser et de quantifier l'atrophie cérébrale observée dans les démences dégénératives (64 ; 334 ; 778).

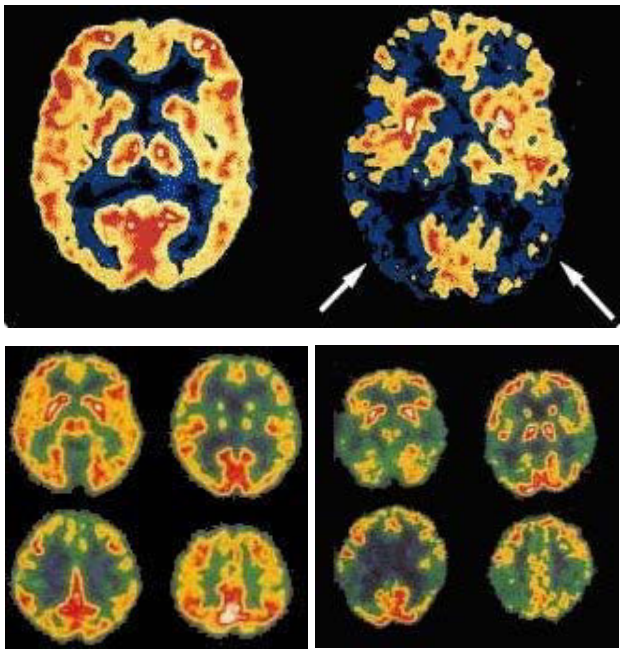


Figure 3 : Tomographie d'émission de positons au FDG (fluoro-déoxy-glucose) chez des sujets normaux (*à gauche*), et chez des patients ayant une MA (*à droite*).

Dans le cerveau de malades Alzheimer, une baisse de l'utilisation du glucose dans différentes zones du cortex est observée. Elle est plus marquée dans les lobes temporaux (Flêches). (http://www.Alzheimer-montpellier.org)

3.2. Les traitements actuels de la maladie d'Alzheimer

A l'heure actuelle, on ne dispose pas de traitement de fond de la MA. L'arsenal thérapeutique se limite à un traitement symptomatique de la maladie.

3.2.1. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

L'atteinte des neurones cholinergiques et le déficit en acétylcholine constatés au cours de la MA ont orienté les stratégies thérapeutiques vers la restauration du *pool* d'acétylcholine disponible dans le cerveau. Les seuls produits cholinergiques qui sont allés au terme de leur développement sont les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, capables d'empêcher le catabolisme du neurotransmetteur (455).

La tacrine (COGNEX®) fut le premier inhibiteur de l'acétylcholinestérase ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 1995. Cependant, ce médicament était fortement hépatotoxique et avait une demi-vie courte, nécessitant une surveillance biologique

régulière et 4 prises quotidiennes. Ce médicament a été retiré du marché à l'arrivée des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase de seconde génération, moins toxiques. Trois substances anti-cholinestérasiques sont actuellement disponibles : le Donépézil (ARICEPT®), la rivastigmine (EXELON®) et la galantamine (REMINYL®). Ils présentent chacun une caractéristique pharmacologique : Le donépézil est un inhibiteur pipéridinique (620), la rivastigmine est un inhibiteur sélectif pseudo-irréversible de la butyrylcholinestérase (123 ; 533) et la galantamine permet une modulation allostérique des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (605). Ces inhibiteurs ne sont indiqués que dans les formes légères à modérées de la MA (score du MMSE compris entre 10 et 26). Ils permettent une stabilisation puis une diminution de la pente du déclin cognitif, voire une amélioration des troubles chez certains patients (740). Malgré leur effet bénéfique limité, ces traitements représentent un progrès important dans la prise en charge et le confort de vie des patients et de leur famille.

3.2.2. Les agonistes des récepteurs NMDA

Mise sur le marché en septembre 2003, la mémantine (EBIXA®) est un agoniste du récepteur du glutamate de type NMDA. Elle est indiquée dans les formes modérées à sévères de la MA (score du MMSE compris entre 3 et 14) (26 ; 76). Ce traitement agit sur l'excitotoxicité du glutamate en réduisant l'influx calcique responsable de la mort neuronale et des atteintes de la plasticité synaptique. Récemment, Dantoine *et al*., (2006) (133) ont montré l'effet bénéfique d'une association avec les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. La mémantine, prescrite chez les malades à un stade modéré ou sévère de MA et déjà traités de façon stable par le donépézil, a permis une amélioration temporaire des capacités cognitives, une réduction de la vitesse du déclin des activités de la vie courante et une réduction de la fréquence de l'apparition de nouveaux symptômes comportementaux, ceci en asssociation avec une diminution du nombre d'épisodes confusionnels et d'agitation comparés aux patients sous placébo (753).

3.2.3. Autres médicaments utlisés dans le traitement de la maladie d'Alzheimer

D'autres classes thérapeutiques sont proposées dans le traitement des troubles psycho-comportementaux comme les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine ayant une efficacité sur la tristesse, l'irritabilité et l'anxiété des patients (462) ou les antiépileptiques thymorégulateurs (carbamazépine, divalproate de sodium) (457 ; 752 ; 754).

4. Caractéristiques histopathologiques de la maladie d'Alzheimer

4.1. Les altérations macroscopiques

Les cerveaux des personnes âgées présentent souvent une atrophie cérébrale modérée qui touche les zones médianes et inférieures des lobes temporaux ainsi que le néocortex pariétal (759). Chez les malades Alzheimer, le degré des altérations est beaucoup plus important (Figure 4). En effet, une atrophie très marquée touche les zones d'association frontale et temporale, ainsi que le lobe pariétal du cortex. La perte de la masse cérébrale est aussi détectée dans la partie ventrale du lobe temporal, notamment au niveau du gyrus parahippocampique alors que les gyrus paracentraux semblent moins touchés tout comme les zones occipitales du cortex. En parallèle, d'autres changements ultrastructuraux ont été mis en évidence comme une dilatation ventriculaire (Figure 4), une atrophie des noyaux amygdaliens et des bulbes olfactifs (557), ainsi qu'une altération de la substance noire et du *locus coerelus* (761 ; 875).

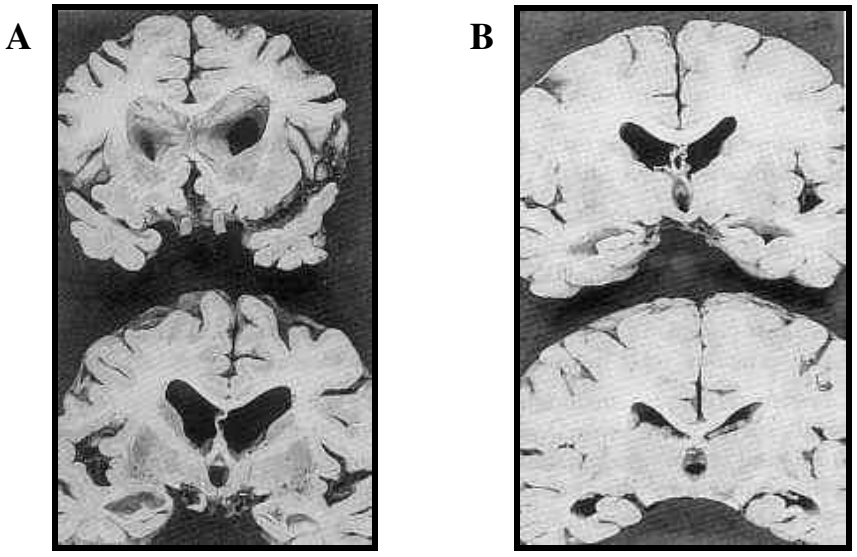


Figure 4 : Coupe de cerveaux de patient Alzheimer (A) et d'une personne du même âge, non atteinte de pathologie neurodégénérative (B).
Une atrophie cérébrale et une dilatation ventriculaire sont observées chez le malade Alzheimer (Pr. J.J. Hauw, Paris).

4.2. Lésions histologiques

En analysant le tissu cérébral, Alzheimer identifia 2 lésions caractéristiques de la maladie dans des régions spécifiques du cerveau, l'hippocampe et le cortex cérébral. Les cerveaux des patients atteints de MA présentent d'autres caractéristiques telles qu'une atrophie corticale (Figure 4) reflétant une perte neuronale massive, une augmentation de la réactivité astrocytaire qui s'étend à la majorité des régions cérébrales, ainsi qu'une activation des cellules microgliales mise en évidence par leur aspect hypertrophique et l'augmentation de leur prolifération (355). L'activation astrogliale caractérise une réaction inflammatoire particulièrement importante dans les régions du cerveau envahis par les PA.

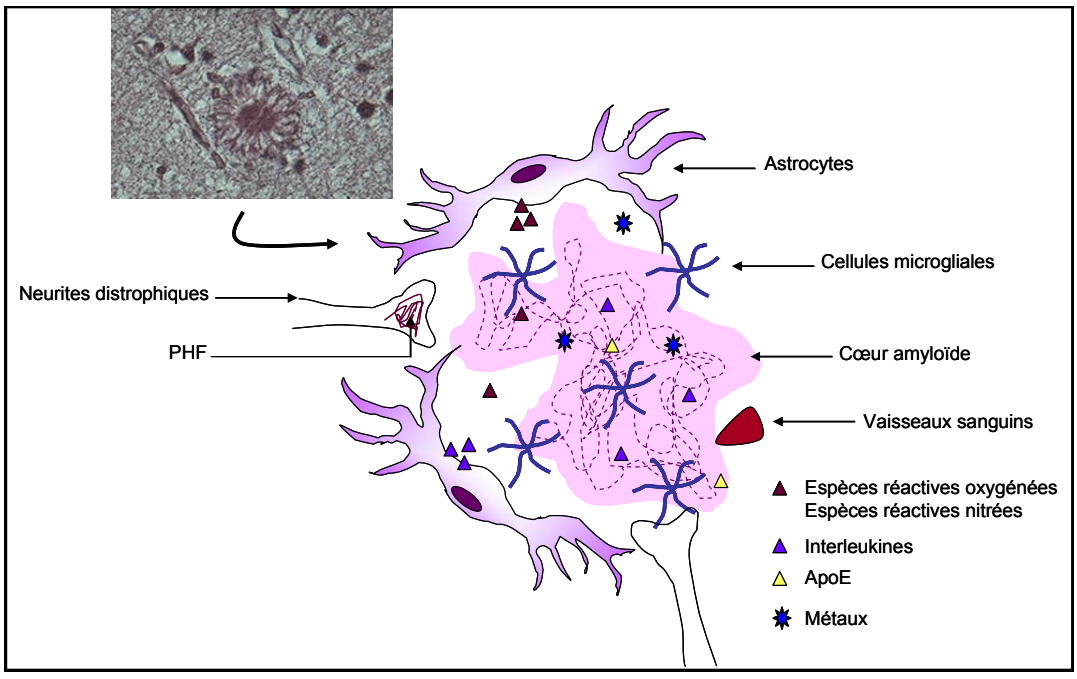
4.2.1. Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes (PA) sont des lésions extracellulaires d'un diamètre compris entre 15 et 200 µm, contenant des noyaux protéiques denses (Figure 5 & 6). Elles se composent d'un noyau central constitué d'un dépôt dense de peptide Aβ, entouré d'une couronne de neurites amyéliniques en dégénérescence contenant des PHF. L'ensemble renferme également des cellules gliales avec de nombreux lysosomes phagocytaires. Les PA sont localisées dans le cortex, le *striatum* et le cervelet. Parmi les autres composants minoritaires des PA, citons l'apolipoprotéine E (apoE) et ses deux récepteurs (le récepteur aux VLDL et le "*LDL receptor related protein*" ou LRP), des protéoglycanes, le peptide amyloïde P3, l'α1-antichymotrypsine, des facteurs du complément, ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire (24 ; 103 ; pour revue, 511)

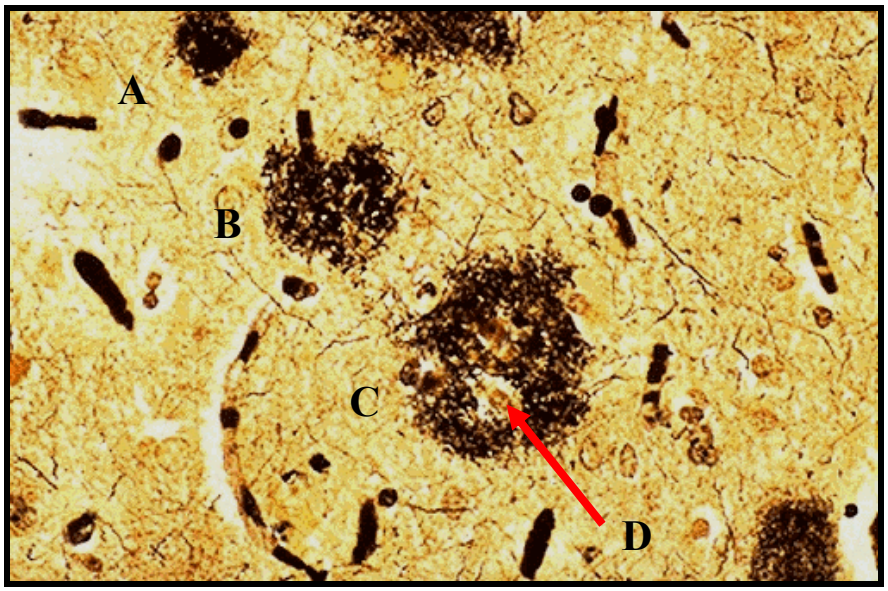
On distingue différentes formes de maturation des PA. Les plaques diffuses sont des agrégats amorphes et peu denses de peptides Aβ non congophile, en l'absence de neurones dystrophiques et neurites anormaux (Figure 5) (303 ; 403 ; 612). Les plaques matures sont formées d'agrégats très denses de peptide Aβ et sont associées à des zones de neurodégénérescence et de réactivité astrogliale (Figure 6) (527 ; 674 ; 685). Il a été démontré chez les souris transgéniques surexprimant l'APP que la formation des PA denses est le résultat de l'excès de synthèse de peptide Aβ, dépassant la capacité de clairance du SNC. Cependant, l'agrégation du peptide Aβ ne dépend pas seulement de sa concentration mais aussi de la présence de cofacteurs favorisant son dépôt. En effet, il a été démontré chez les

souris transgéniques que les plaques amyloïdes contiennent en outre des ions métalliques comme le zinc (430). Ces métaux jouent le rôle de chélateurs et favorisent l'agrégation du peptide Aβ.

Au cours du vieillissement normal, le peptide Aβ peut se déposer au niveau de la *media* des artérioles corticales et s'infiltrer dans le parenchyme cortical avoisinant les vaisseaux pour former des PA (470). Celles ci peuvent apparaître dès la cinquantaine et leur nombre augmente avec l'âge. Elles sont localisées dans l'hippocampe, le néocortex et certains noyaux sous-corticaux (striatum, hypothalamus, substance innominée) (286). Chez les patients atteints de la MA, la densité des plaques corticales est très importante (235). Elles sont localisées au niveau des couches II à IV du néocortex, du cortex entorhinal, de l'hippocampe, du *subiculum* ainsi que dans le cortex associatif des lobes temporaux et les noyaux amygdaliens. Les couches II et III des lobes fronto-pariétaux-occipitaux sont les plus touchées (167 ; 168 ; 568).



<u>Figure 5</u> : Composition d'une plaque amyloïde.



<u>Figure 6</u> : Imprégnation argentique d'une coupe de cortex de patient atteint de la MA.

De multiples plaques séniles sont visibles, elles sont d'âge différent (aspect et taille variable) (A, B et C) avec un centre plus clair (D) (www.Alzheimer-montpellier.org).

Les cerveaux des patients atteints de MA sont également caractérisés par des altérations de divers systèmes de neurotransmission. La dégénérescence du système cholinergique a pu être observée dans le cortex basal comportant le noyau basal de Meynert (293 ; 755 ; 836), où elle s'accompagne d'une baisse des concentrations de l'acétylcholine, de la choline-acétyl transférase (enzyme de synthèse de l'acétylcholine) et une augmentation de l'acétylcholine estérase (enzyme de dégradation de l'acétylcholine) (48 ; 627 ; 696 ; 822). Plusieurs autres systèmes de neurotransmetteurs semblent être affectés dans différentes zones du cerveau, essentiellement le système somatostatinergique dans le cortex et l'hippocampe (176), le système adrénergique dans plusieurs régions sous-corticales (21 ; 294), ainsi que les systèmes sérotoninergique (21 ; 169 ; 294) et glutamatergique (192 ; 309).

4.2.2. Les dégénérescences neurofibrillaires

Chez les personnes âgées et dans certains cas de démence, une abondance de neurofilaments argentophiles dans le péricaryon de certains neurones corticaux (Figure 7), traduisant une dégénérescence neurofibrillaire (DNF) a été signalée (326). Dans la MA, la densité des DNF dans le néocortex est corrélée avec la gravité de la démence (144 ; 166 ; 638). Celle-ci évolue progressivement par la formation massive des DNF dans les neurones du néocortex et on distingue ainsi 11 stades différents dans cette progression, correspondant aux régions cérébrales touchées au cours de la MA (144) (Figure 8).

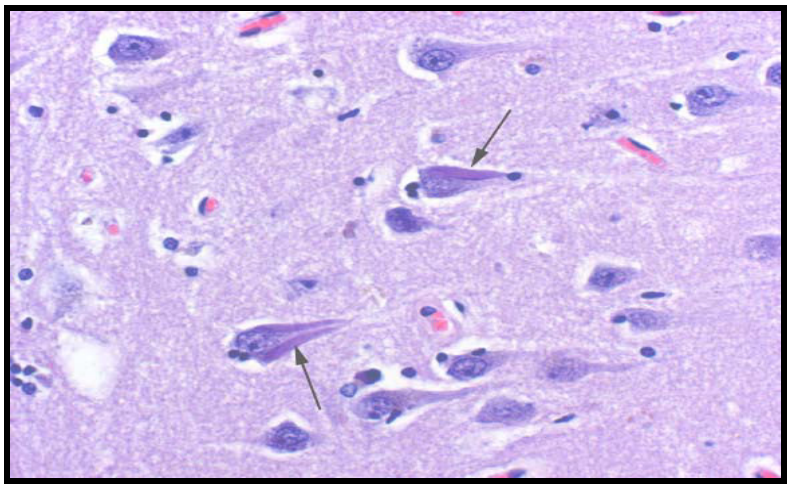
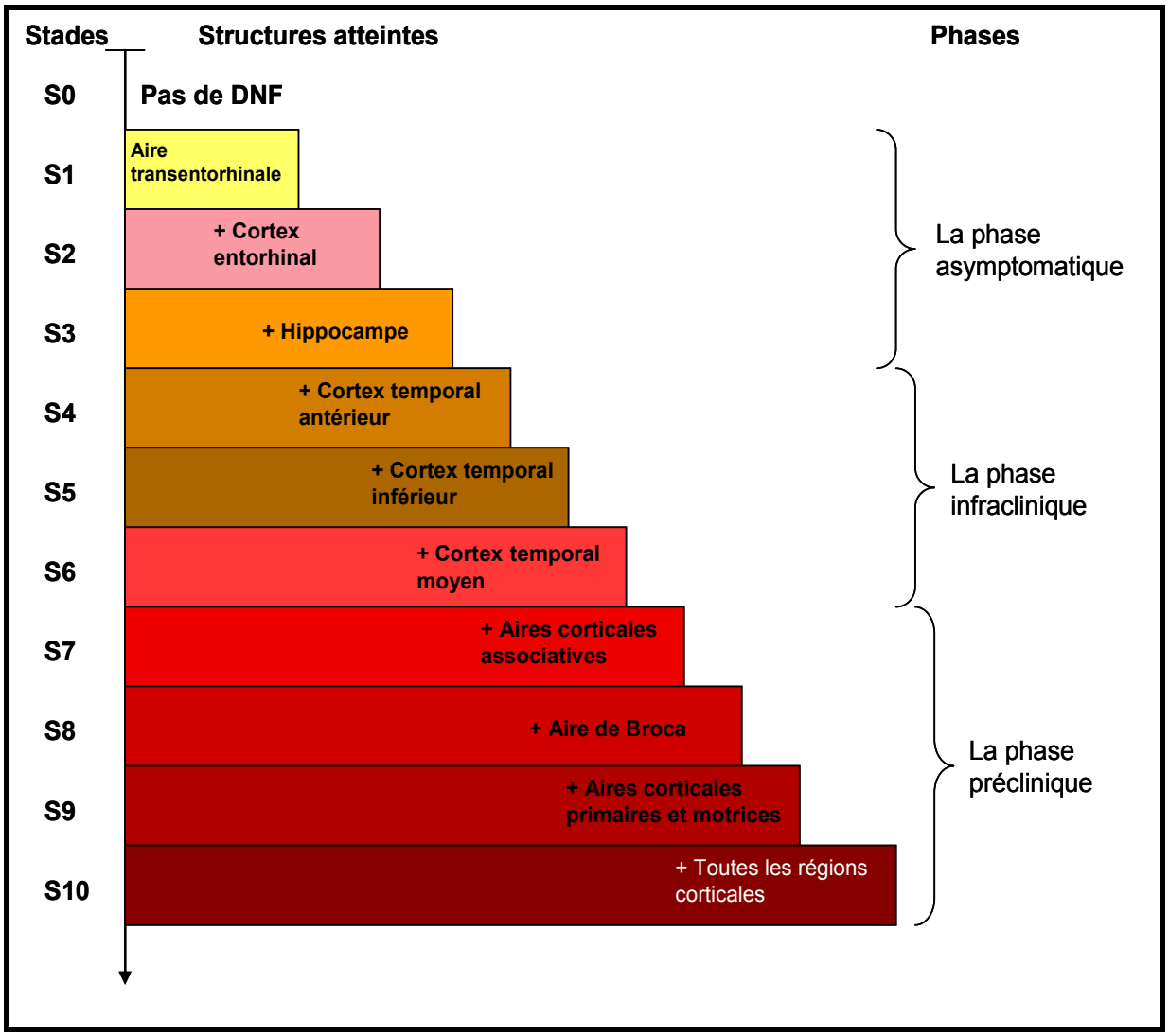


Figure 7 : Coupe de cerveau de patient atteint par la MA colorée avec l'hématoxyline et l'éosine montrant des DNF localisées dans les neurones (flèches).

Les stades de 0 à 3 caractérisent le vieillissement cérébral. Au départ, aucune région cérébrale n'est affectée par la DNF (stade 0). La première région touchée au cours du vieillissement cérébral est l'aire transenthorinale de la région hippocampique (stade 1). Lors du stade suivant, les cortex transentorhinal et enthorinal de la région hippocampique sont affectés (stade 2) puis l'hippocampe (stade 3) (62 ; 66 ; 787). La phase infraclinique est caractérisée par les stades 4 à 6 (29 ; 787). La dégénérescence neurofibrillaire atteint le cortex temporal antérieur (stade 4), puis le cortex temporal inférieur (stade 5) et enfin le cortex temporal moyen (stade 6). Les stades 7 à 10 caractérisent la phase clinique où la dégénérescence s'installe dans toutes les aires corticales associatives (cortex frontal antérieur, cortex temporal supérieur et cortex pariétal inférieur) (stade 7) (143 ; 145), puis les régions moins associatives telle que l'aire de Broca (stade 8). Par la suite, les aires corticales primaires, visuelles et

motrices sont envahies (stade 9) et lors du dernier stade, toutes les régions corticales sont affectées, ainsi que de nombreux noyaux sous-corticaux (stade 10).



<u>Figure 8</u> : Les différents stades d'évolution de la dégénérescence neurofibrillaire.

L'étude ultrastructurale montre que ces DNF sont constituées de protéine *Tau* hyperphosphorylée organisée en PHF. Les PHF sont localisées aussi dans les axones myélinisés, les dendrites, et les synapses (400). La présence de PHF dans les neurites est responsable de la désorganisation des microtubules et d'une baisse du nombre de neurofilaments normaux. Les microtubules sont des polymères constitués par des dimères de protéines α- et β-tubuline et sont indispensables pour différentes fonctions cellulaires. Dans les neurones, les microtubules forment un support pour le transport des organites cellulaires, le transport axonal des métabolites et des neurotransmetteurs synthétisés dans le corps cellulaire.

La polymérisation, la stabilisation, ainsi que les propriétés dynamiques des microtubules sont influencées par leur interaction avec les protéines associées aux microtubules (MAP ou « *Microtubule Associated Proteins* »). Les MAP forment une famille de protéines et sont classées selon leur taille : les protéines de haut poids moléculaire (200-300 kDa) (MAP1A, MAP1B, MAP2a et MAP2b) et les protéines de faible poids moléculaire (MAP2c, MAP2d et *Tau*) (186 ; 232 ; 325).

Les protéines *Tau* sont synthétisées à partir d'un gène unique situé sur le chromosome 17. Un épissage alternatif permet la production de six isoformes de poids moléculaire variant de 48 à 67 kDa (17) (Figure 9). Le polymorphisme de la protéine *Tau* est contrôlé par la polymérisation et la stabilisation des microtubules (401 ; 741). Les protéines *Tau* sont d'excellents marqueurs des processus dégénératifs. En effet, les protéines *Tau* fœtales sont phosphorylées et subissent au cours du vieillissement une déphosphorylation progressive, sauf dans le cas de démence où elles sont hyperphosphorylées. Cette hyperphosphorylation entraîne le désassemblage, puis la désorganisation totale des microtubules dans les neurones (323). Caputo *et al*. (1992) (87) ont envisagé que la formation des DNF serait due à l'altération du métabolisme des protéines *Tau* et APP.

Même si les PA et les DNF sont caractéristiques de la MA, on les retrouve également dans d'autres pathologies comme la trisomie 21, la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy, ainsi que chez les personnes âgées non atteintes de pathologie neurodégénérative (306 ; 307 ; 786).

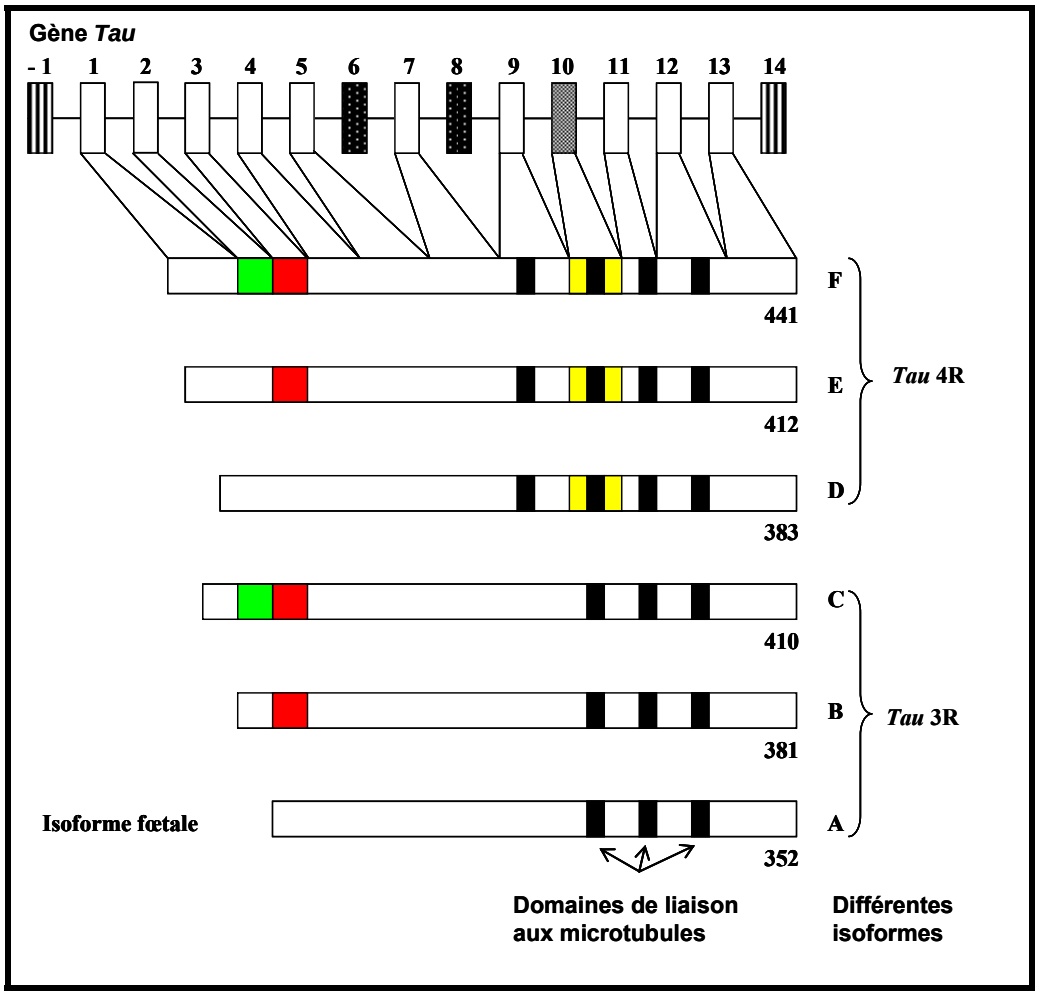


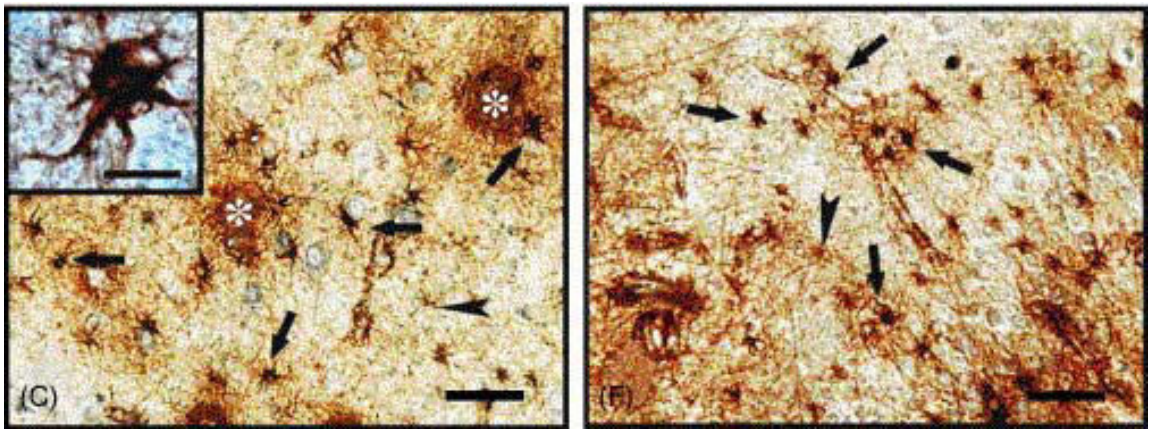
Figure 9 : Organisation et épissage alternatif du gène humain codant la protéine *Tau*.

Trois isoformes de la protéine Tau contiennent trois domaines répétés dits de liaison aux microtubules (microtubule binding repeat) (Tau 3R), alors que les autres en contiennent quatre du fait de l'insertion de l'exon 10 (Tau 4R). L'épissage alternatif est régulé au cours du développement embryonnaire puisque seule l'isoforme courte (352) est exprimée dans le cerveau fœtal.

4.2.3. Activation de la microglie et augmentation de la réactivité astrocytaire

Des études épidémiologiques ont montré un effet protecteur des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) contre la survenue de la MA chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (497 ; 546). A partir de ces données, il a été mis en évidence la présence en abondance de cytokines (en particulier l'interleukine-1β (IL-1β)) dans le cerveau des patients atteints de MA (673). Ces cytokines et autres médiateurs de l'inflammation comme le complément, pourraient jouer un rôle dans la neurotoxicité du peptide Aβ (126 ; 278 ; 466). En effet, l'accumulation de peptide Aβ induit une activation

locale de la microglie et des astrocytes qui libèrent alors des cytokines proinflammatoires et neurotoxiques ainsi que des protéines de phase aiguë. L'IL-1β active la synthèse de l'APP (672) par la saturation de l'activité de l'α-secrétase et en déviant le métabolisme de l'APP vers la voie de production de peptide Aβ. Les astrocytes réactivés et les cellules microgliales activées participent en partie à une augmentation locale des radicaux libres (141 ; 569).



<u>Figure 10</u> : Coupes de cerveau d'un patient atteint de MA marquées avec les anticorps anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) et anti-HO-1 (*Glial heme oxygenase-1*).

La HO-1 appartient à la superfamille des protéines induite par le stress, elle participe avec le cytochrome P450 à l'oxydation de l'hème en biliverdine, ions ferreux libres et monoxyde de carbone, elle est induite par les cytokines proinflammatoires (IL-1 et IL-6) ainsi que par le stress oxydant. Dans les couches II-IV du cortex temporal, on observe une intense immunoréactivité des astrocytes (les flèches et l'encart) autour des PA (astérisques), avec quelques astrocytes normaux (pointe de flèche). Dans la couche moléculaire de l'hippocampe, on observe aussi de nombreux astrocytes activés (flèches).

Barres C : 10 µm et F : 100µm. (656).

L'analyse immunohistochimique et biochimique *post-mortem* a permis de mettre en évidence une activation des astrocytes (Figure 10) et des cellules microgliales (Figure 11) associée aux DNF, aux PA et à la dégénérescence neuronale. Ainsi, Fiala *et al*. (1998) (184) ont montré que des monocytes sécrètent des cytokines proinflammatoires comme l'IL-1β, le TNFα et l'IL-2. D'autre part, l'expression des ARNm de plusieurs cytokines a été mise en évidence dans les cellules microgliales associées au PA (795).

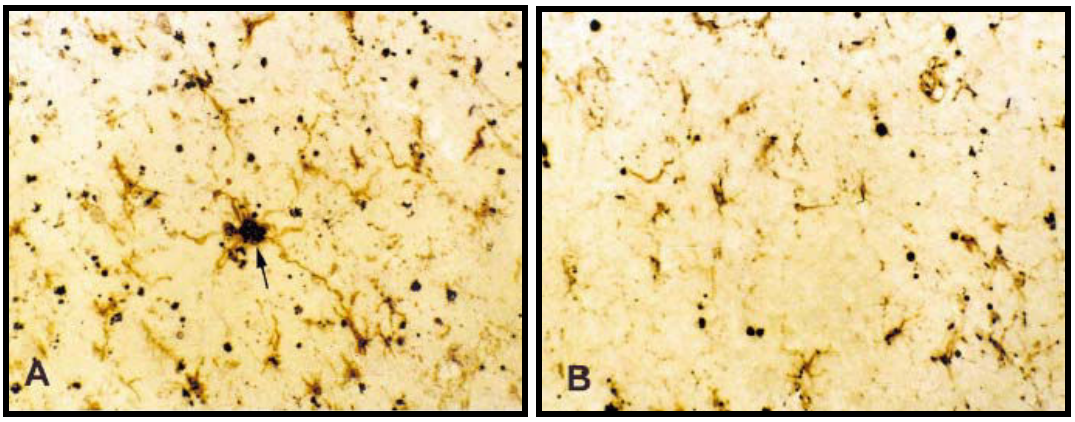


Figure 11 : Coupes d'hippocampe d'un cerveau de malade Alzheimer (A) et d'un témoin (B) doublement marquées avec les anticorps anti-RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*) *(en noir) et anti-MHC II (en brun).*

la protéine MHC II (major histocompatibility complex II) est un marqueur des cellules microgliales activées. Le marquage est plus important dans l'hippocampe de malade Alzheimer que dans l'hippocampe contrôle. L'immunoréactivité des RAGE apparaît sous forme d'une agrégation focale (flèche) spécifique de l'hippocampe de malade Alzheimer (A). Agrandissement X 248 (462).

4.2.4. L'angiopathie amyloïde cérébrale

L'accumulation des dépôts amyloïdes sur les parois des vaisseaux cérébraux est la principale caractéristique des angiopathies amyloïdes (Figure 12). Leur impact varie d'une forme asymptomatique dans les cerveaux normaux à une atteinte sévère de la paroi artérielle, accompagnée d'une hémorragie cérébrale, des infarctus cérébraux et des leuco-encéphalopathies dans de nombreux cas de MA (794).

L'amyloïdose vasculaire concerne les artères corticales de petite taille dont le diamètre varie généralement entre 50 et 150 µm. L'infiltration de peptide Aβ concerne généralement la media artérielle et peut atteindre toute la paroi vasculaire. Il existe deux types d'angiopathie amyloïde cérébrale classée selon l'importance de l'infiltration de peptide Aβ dans la paroi vasculaire :

- l'angiopathie dystrophique, caractérisée par la présence de dépôts amyloïdes dans les zones pariétales et périvasculaires et le neuropile. Ce type d'angiopathie est associé avec les PA ;

- l'angiopathie congophile, caractérisée par une infiltration amyloïde à contours limités dans la zone pariétale des vaisseaux sans que le parenchyme ne soit atteint.

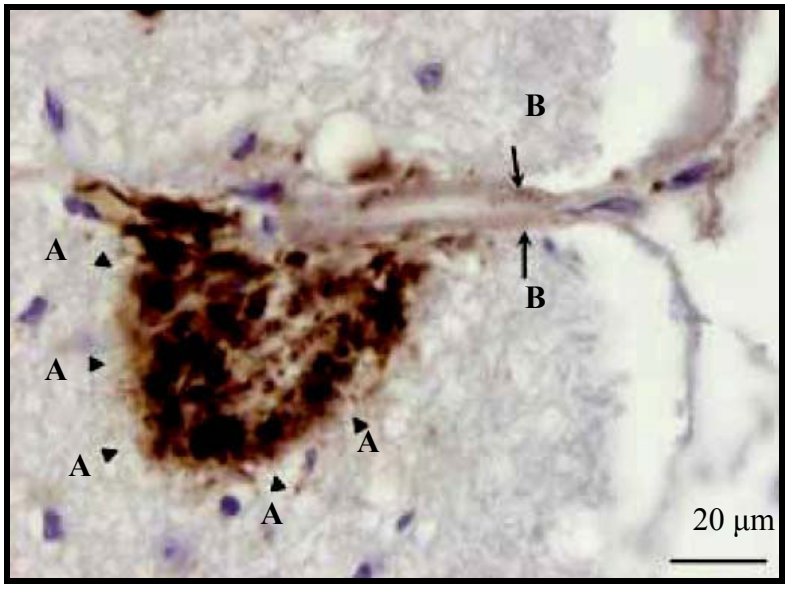


Figure 12 : Coupe de cerveau de patient atteint de MA illustrant une angiopathie amyloïde caractérisée par un dépôt amyloïde (A) accolé à un vaisseau sanguin (B).
(www.franceAlzheimer.org)

5. Mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie d'Alzheimer

5.1. Introduction

La caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la neurodégénérescence associée à la MA représente un des enjeux majeurs en vue de la mise en place de traitements curatifs et/ou préventifs de cette pathologie. Malgré la progression des connaissances sur la physiopathologie de la MA ces dernières années, les acteurs cellulaires et moléculaires ainsi que les facteurs causatifs de la MA ne sont toujours pas identifiés avec certitude (160). Cette situation est d'autant plus compliquée que la MA se présente sous deux formes : les formes familiales apparaissant précocement (de 3 à 5 % des cas recensés) et les formes sporadiques apparaissant généralement après 65 ans (95 à 97 % des cas de MA). Hormis l'âge d'apparition des premiers symptômes cliniques, ces deux formes ne se distinguent pas d'un point de vue clinique et histopathologique.

C'est sans aucun doute l'étude des formes familiales qui a permis de faire les progrès les plus importants dans l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans le développement de la MA. Ainsi, l'étude des familles dans lesquelles la MA survient avant l'âge de 65 ans et ségrège selon un mode de transmission autosomique dominant a permis d'identifier trois gènes porteurs de mutations pathogènes. Le gène codant la protéine précurseur du peptide Aβ (APP) et localisé sur le chromosome 21 fut le premier pour lequel des mutations associées à des formes familiales de MA ont été identifiées (228). Plus récemment, des mutations de deux autres gènes codant les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2) et localisés respectivement sur les chromosomes 14 et 1, ont été identifiées comme facteurs causatifs de formes familiales de la MA (438 ; 619 ; 675). L'ensemble des mutations identifiées sur ces trois gènes serait responsable de 40 à 50 % des cas de formes familiales de MA. De nombreuses études ont clairement démontré que les mutations associées à ces gènes conduisent irrémédiablement à des perturbations du métabolisme de l'APP, entraînant une augmentation de la production du peptide Aβ, son agrégation dans le cerveau et la formation des plaques séniles (pour revue, 663). Ces éléments ont permis de conforter *l'hypothèse de la cascade amyloïde* reconnue durant trois décennies comme un dogme expliquant les phénomènes neurodégénératifs et les aspects cliniques de la MA (227 ; 262).

Clairement impliquée dans l'apparition précoce des formes familiales de MA, la cascade amyloïde fût aussi considérée comme un élément majeur et causatif des formes sporadiques de MA, histopathologiquement similaires aux formes familiales (663). En absence de mécanismes causatifs conduisant à l'accumulation de peptide Aβ dans le SNC des patients atteints de formes sporadiques de la MA, la recherche et l'identification de facteurs de risques associés au développement de la MA a donc permis de mieux comprendre l'étiologie de cette maladie.

En plus des facteurs environnementaux et épigénétiques et de l'âge, le polymorphisme génétique de l'apolipoprotéine E (apoE) représente au niveau moléculaire le facteur de risque associé à la MA le plus important (122 ; 720). Le rôle potentiel de l'apoE dans le développement de la MA a fait l'objet de nombreuses études dont nous ne ferons pas une description dans ce manuscrit. Les travaux publiés, souvent contradictoires, ont conduit à l'élaboration de plusieurs hypothèses, jamais réellement vérifiées chez l'Homme. Par exemple, la localisation de l'apoE au sein des plaques séniles (535) a permis de suggérer que l'apoE pourrait intervenir en tant que protéine chaperon modulant la clairance du peptide Aβ (412 ; 588 ; 592 ; 873), sa neurotoxicité (159 ; 349), mais également en tant que cofacteur de l'amyloïdogénèse par interaction directe ou non avec le peptide Aβ (528 ; 639). Enfin, l'implication de l'apoE dans le développement de la MA a également été suggérée du fait de son rôle crucial dans le métabolisme lipidique (notamment dans le métabolisme du cholestérol) au niveau du SNC, régulant en partie les processus de plasticité synaptique, de croissance, de fonction, de maintien de l'intégrité et de réparation du SNC (56 ; 274 ; 814). Un aspect intéressant démontré récemment par plusieurs groupes dont le nôtre, est que la modulation du statut en cholestérol des membranes neuronales et synaptiques pourrait moduler la production, mais aussi la neurotoxicité du peptide Aβ (1 ; 55 ; 686 ; 706).

Détailler de façon exhaustive l'ensemble des travaux relatifs à l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la MA relève de l'impossible ! Cependant, l'analyse d'une littérature pléthorique sur ces aspects nous permet de conclure aisément que, bien que les causes ne soient identifiées que pour les formes familiales, toutes les formes de MA sont liées à une perturbation du métabolisme de la protéine APP. Ces perturbations touchent à la fois le trafic et la localisation intracellulaire de cette protéine, sa maturation et ses clivages protéolytiques. Par voie de conséquence, le développement de la MA est associé à des perturbations des fonctions physiologiques de l'APP en plus de la

production de produits de clivage pouvant être responsables de la perte neuronale associée à la MA. Dans les chapitres suivants, nous nous focaliserons sur ces aspects.

5.2. La perte neuronale, contribution relative des processus apoptotique et nécrotique dans la maladie d'Alzheimer

L'examen *post mortem* du cerveau de patients décédés de la MA révèle une atrophie corticale traduisant une perte massive de neurones, les plus importantes 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 (aponécrose), selon la sévérité du *stimulus* et le type cellulaire (30 ; 43 ; 59 ; 867). Ces deux processus se caractérisent par des circonstances, des modifications morphologiques et des mécanismes moléculaires distincts (75 ; 369 ; 658). Nicotera *et al*. (1999) (537) avancent l'hypothèse que la nécrose et l'apoptose seraient deux 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 processus de mort cellulaire programmée (424).

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 perturbations de leurs prolongements, la chromatine est souvent non condensée, les organites de morphologie intacte, et les noyaux non picnotiques (418 ; 428 ; 722). 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 tout, Broe *et al*. (2001) (71) ont rapporté la présence de noyaux neuronaux contenant de la chromatine condensée. Cette dernière étude, bien qu'apportant une preuve morphologique de la mort neuronale dans le cerveau des patients atteints de la MA ne permet pas de discriminer le type de mort impliqué puisque nécrose et apoptose sont toutes deux caractérisées par une fragmentation et une condensation de la chromatine (428). La contribution respective de ces deux mécanismes reste donc à évaluer, d'autant que certains auteurs avancent l'hypothèse d'un scénario aponécrotique dans lequel la cellule subirait les deux processus de manière séquentielle (38).

La présence des caspases-3 et -6 sous forme active et l'accumulation de produits issus de leur activation protéolytique dans les cerveaux de ces patients (250 ; 622 ; 723 ; 743) ainsi que 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 de peptide Aβ et/ou de la dégénérescence neurofibrillaire et ne nécessiterait pas la perte neuronale (428). 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 cortex basal, la dégénérescence de ces derniers étant corrélée à la perte des fonctions cognitives. Ces neurones sont constitués d'un corps cellulaire situé dans les aires cérébrales dépourvues d'accumulation de peptide Aβ (335) 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 Aβ est un événement précoce, préalable à l'apoptose nucléaire (701). Cette dernière serait, en fait, la conséquence de la désorganisation axonale et de la perte du transport antérograde (701). Ces deux événements reposeraient sur des mécanismes moléculaires distincts, la dégénérescence axonale impliquant l'activation des calpaïnes mais pas celle des caspases, l'apoptose du noyau cellulaire secondaire à cette atteinte nécessitant l'action conjointe de ces deux classes de protéases (701).

Malgré l'abondance des études réalisées sur la MA, le rôle de la mort cellulaire dans cette pathologie neurodégénérative reste encore très controversé, certains proposant qu'elle participe à la perturbation des capacités cognitives, d'autres suggérant qu'il s'agirait plutôt d'un phénomène secondaire tardif (428). Le type de processus impliqué reste également au centre des débats et l'hypthèse d'un phénomène complexe mêlant dégénérescence axonale, apoptose et éventuellement nécrose est aujourd'hui envisagé (393 ; 453 ; 718). Bien que la place de la mort neuronale dans les troubles mnésiques ne soit pas encore clairement établis, les conséquences de l'initiation des phénomènes apoptotiques ou nécrotiques (stress oxydant, neuroinflammation, dégénérescence axonale) semblent toutefois être déterminantes dans la MA comme elle l'est sans doute dans d'autres pathologies neurodégénératives.

5.3. Un élément clé dans la maladie d'Alzheimer : la protéine APP

5.3.1. 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 (228 ; 230 ; 618). Situé sur le *locus* 21q21.3-q22.05, il contient 18 exons sur environ 170 kb (Figure 13). Sa présence sur le chromosome 21 explique la forte corrélation entre la MA et le syndrome de Down (560 ; 631). L'épissage alternatif du transcrit du gène *app* génère, après traduction, des protéines se distinguant principalement par l'absence (APP^{695}) ou la présence (APP^{750} et APP^{770}) d'un domaine de liaison aux inhibiteurs de protéase Kunitz (KPI) à proximité de l'extrémité *N*-terminale de la protéine (138 ; 383 ; 750). L'isoforme APP^{695} est majoritairement exprimée dans les neurones. Ainsi, Tanaka *et al*. (1989) (747) ont montré que le *ratio* en ARNm des isoformes APP^{770}:APP^{750}:APP^{695} dans le cortex était de 1:10:20 alors que dans les astrocytes en culture, ce même *ratio* est de 2:4:1 (243). Outre ces trois 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 (319). La région pour le peptide Aβ s'étend sur une partie des exons 16 et 17 et correspond à une séquence de 40 à 43 acides aminés situés en partie dans le domaine membranaire de la protéine.

Les protéines APP ont pour analogues structuraux la famille des protéines APLP (*amyloid precursor-like protein*), dont les protéines APLP1 et APLP2 exprimées chez les mammifères. Ces dernières possèdent le domaine KPI, mais sont dépourvues de la séquence correspondant au peptide Aβ (689 ; 810 ; 811). Les souris transgéniques $APP^{-/-}$ sont viables, contrairement aux souris à la fois $APP^{-/-}$ et $APLP^{-/-}$ (288). Ces deux classes de protéines auraient donc des fonctions proches et la perte d'une des deux classes de protéines pourrait être en partie compensée par la présence de ses homologues (792).

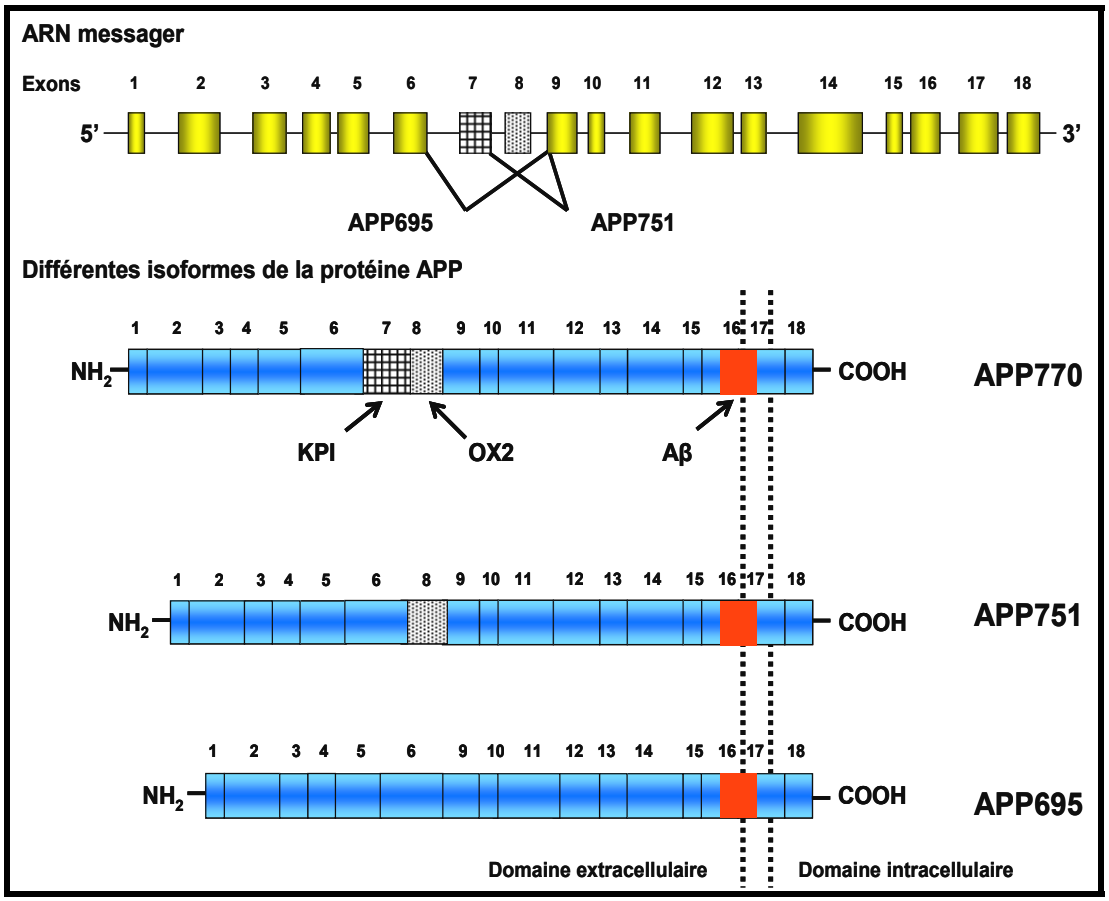


Figure 13 : Différentes isoformes de la protéine APP.

Les formes 770, 751 et 695 sont majoritairement retrouvées dans le SNC et proviennent de l'épissage alternatif des exons 7 et 8 codant respectivement le domaine inhibiteur des protéases de type Kunitz (KPI) et le domaine Ox2 qui présente une homologie avec le marqueur microglial OX2.

5.3.2. Structure protéique de l'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 dont il n'existe pas de structure cristalline à ce jour (610). Elle est composée d'une importante région extracellulaire ou ectodomaine, d'un domaine transmembranaire unique et d'un court fragment intracellulaire (Figure 14).

- 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 (241). Les acides aminés ne participant pas à la formation de ces structures sont regroupés au sein de deux régions flexibles permettant probablement à la protéine de se replier dans l'espace. La première séquence amorphe, Ala^{190}-Glu^{264}, est une région acide comportant 56% de résidus glutamyls ou

aspartyls ; la seconde, His^{507}-Gly^{589}, correspond à un domaine de liaison entre l'extrémité *N*-terminale de la protéine et la région qui porte le peptide Aβ (164 ; 809). La séquence Asp^{23}-Val^{128} a été cristallisée par Rossjohn *et al*. (1999) (625) 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 Ser^{124} à Leu^{189} (132). L'ensemble de ces deux domaines constitue le domaine E1 (Figure 14). Ce dernier est connecté à la région glycosylée par la région acide. La région glycosylée peut être divisée en deux 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.

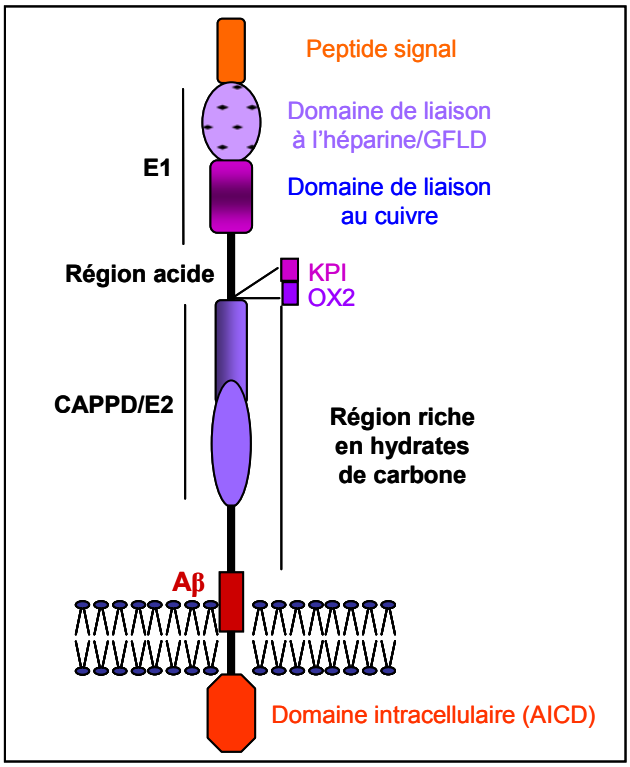


Figure 14 : Les différents domaines de l'APP (164)

(KPI : domaine de liaison aux inhibiteurs de protéases Kunitz ; OX : domaine d'homologie OX2 ; CAPPD : domaine central de l'APP).

- 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

(602). Il est probable que les interactions avec les différents partenaires protéiques provoquent des changements de conformation de la protéine et augmentent sa stabilité (610).

5.3.3. Fonctions biologiques de l'APP

Bien que les souris $APP^{-/-}$ soit viables, elles présentent de nombreux troubles dont une prolifération gliale, une diminution du taux de synaptophysine aux niveaux néocortical et hippocampique, une diminution de la longueur des dendrites des neurones hippocampiques et une diminution de la survie des neurones en culture, suggérant un rôle clef de l'APP dans le maintien de l'intégrité neuronale (137 ; 575). Les études destinées à élucider les fonctions de l'APP ont conduit à la mise en évidence de multiples fonctions potentielles (610). La plupart de ces fonctions correspondent à de grands processus biologiques, tels que l'endocytose, la croissance des dendrites (542), l'arborisation ou la synaptogenèse (520) qui requièrent le plus souvent des interactions entre cellules ou avec la matrice extracellulaire, dans lesquelles l'ectodomaine pourrait jouer un rôle (68 ; 97 ; 635). Ce dernier possède des domaines de liaison à l'héparine (506), au collagène (36) et à la laminine (370). En outre, l'APP est co-localisée avec certaines protéines d'adhésion telles que la β1-intégrine (719) et la télencéphaline (19).

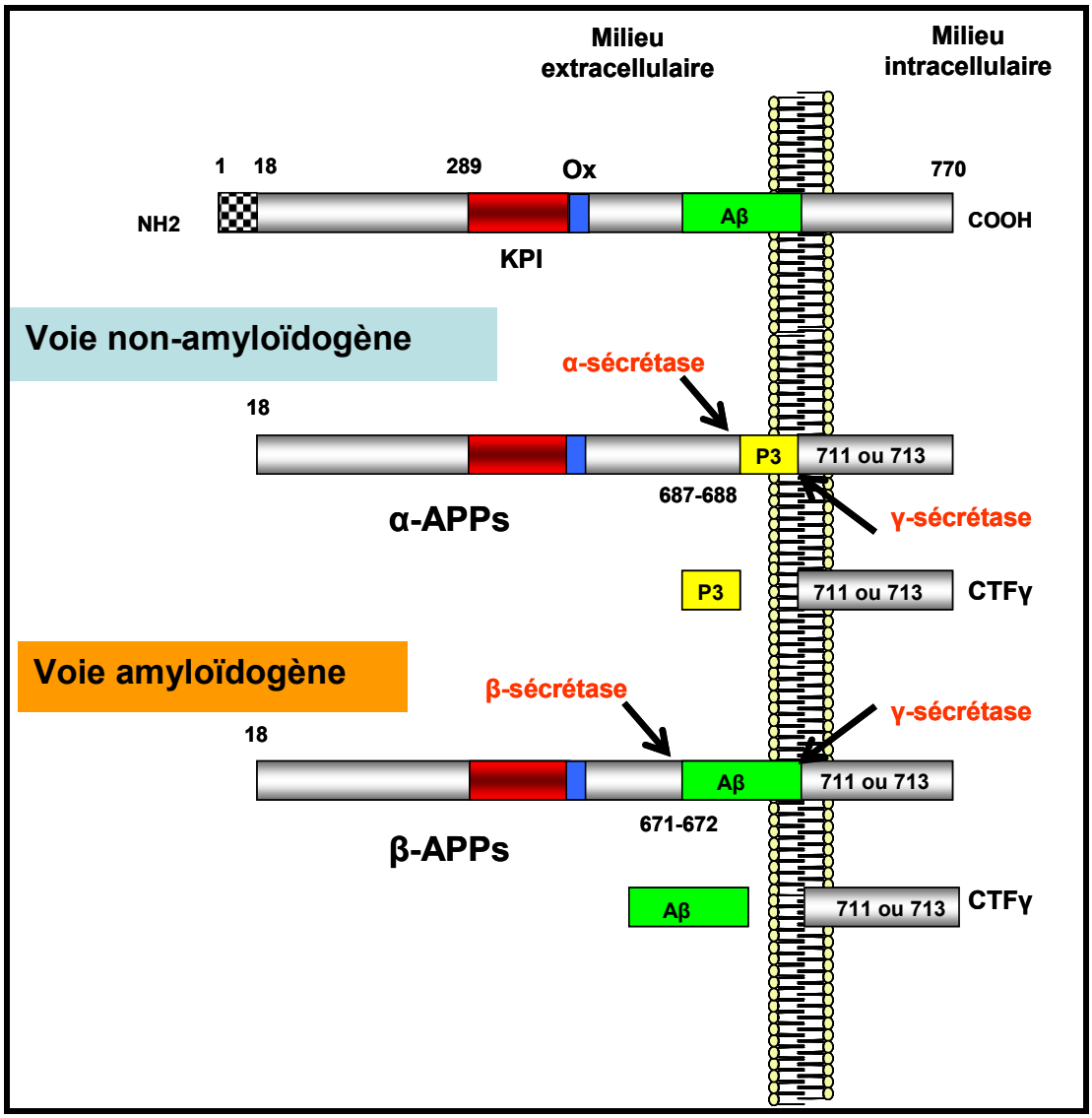
Le domaine AICD semble être le point central d'un réseau d'interactions complexes avec des protéines adaptatrices (85 ; 285). La région Tyr^{663}-Glu-Asn-Pro-Thr-Tyr^{668} est considérée comme une séquence essentielle à la modulation de différentes voies de transduction, avec laquelle peuvent interagir de nombreux facteurs parmi lesquels les protéines X11 et Fe65 modulant la production de peptide Aβ (635). Ces dernières interagissent avec l'APP indépendamment de l'état de phosphorylation de la séquence Tyr^{663}-Glu-Asn-Pro-Thr-Tyr^{668}. Au contraire, Shc et Grb2, deux protéines adaptatrices impliquées dans les voies de survie cellulaire, nécessitent la phosphorylation de la Tyr^{682} pour interagir avec la protéine. La phosphorylation du résidu Thr^{688} semble impliquée dans la régulation de la formation des complexes et dans leur stabilité (16 ; 610). L'APP est associée par son domaine intracellulaire aux protéines G, capables de moduler la signalisation cellulaire en intervenant sur l'adénylate cyclase (72 ; 88 ; 358 ; 558), sur la phospholipase C (512) ou sur les canaux calciques voltage dépendants (299 ; 774). Ainsi, Okamoto *et al*. (1996) (558) 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 (850). Aucun ligand physiologique spécifique capable de se lier à l'APP et d'activer les protéines G n'a pour le moment été mis en évidence.

Le domaine AICD serait également impliqué dans la régulation de la transcription de nombreux gènes, parmi lesquels ceux codant l'APP, la néprilysine et la GSK-3β (84 ; 130 ; 380 ; 793), soit par un mécanisme de translocation nucléaire après clivage par les sécrétases, soit en permettant le recrutement à la membrane et l'activation de protéines de régulation des gènes (285).

5.3.4. Clivage protéolytique de l'APP

L'APP est métabolisée *via* deux voies : la voie non amyloïdogène et la voie amyloïdogène (180 ; 450 ; 548), se distinguant principalement par les protéases impliquées et les métabolites produits (Figure 15). La voie non amyloïdogène est caractérisée par deux clivages endoprotéolytiques consécutifs catalysés par l'α- puis la γ-sécrétase, ayant pour résultat la production de trois fragments distincts : la partie APPα soluble (APPs-α), le domaine AICD et le peptide P3 (Figure 15). 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 (178). Alternativement, l'APP peut être clivée par la β-sécrétase (suivi par la γ-sécrétase) pour produire les peptides Aβ et la partie APPβ soluble (APPs-β). La plupart des mutations du gène de l'APP conduisant à la MA se situent 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.



<u>Figure 15</u> : Les deux voies de maturation de l'APP

Le clivage par l'α-sécrétase intervient à l'intérieur de la région correspondant au peptide Aβ (Figure 15), au niveau de la liaison Lys^{16}-Leu^{17} (178). 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 Aβ (80 ; 206). Trois protéines de la famille des protéases ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*) sont susceptibles de porter l'activité protéolytique de type α-sécrétase : les protéines ADAM9, ADAM10 et TACE (*tumor necrosis factor-α converting enzyme*), aussi appelée ADAM17 (10, 81), dont la fonction première est le clivage du précurseur de TNF-α (51 ; 517). Ces 3 protéines présentent des caractéristiques structurales communes. Elles sont situées au niveau

de la membrane plasmique des cellules permettant ainsi la secrétion du fragment APPs-α dans le milieu extracellulaire (789).

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 (152 ; 320 ; 321). Leur activité intervient dans les endomembranes et plus particulièrement au niveau du réticulum endoplasmique (RE), du réseau golgien et des endosomes (120 ; 244 ; 275 ; 395 ; 826). Le pH optimal acide de la protéine BACE1 suggère qu'elle pourrait également intervenir au niveau des lysosomes (789). 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 transgéniques 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 (82 ; 468). Ainsi, les lignées BACE54/4 et BACE54/11 de souris transgéniques exprimant la protéine BACE1 humaine présentent un taux élevé de peptide Aβ (54), alors que des souris dont le gène BACE1 a été inactivé ne présentent aucune altération phénotypique (468) et ne génèrent pas de peptide Aβ (82). Par ailleurs, les souris issues du croisement de souris transgéniques surproduisant le peptide Aβ avec des souris BACE1$^{-/-}$ ne présentent pas de production de peptide Aβ (82). BACE2 montre des spécificités de substrat similaires (182 ; 853), mais est faiblement exprimée dans le cerveau (44). Pour cette raison, il n'existe pas de relation directe connue entre cette protéine et le développement de la MA (44).

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 (*anterior pharynx defective 1 a homologue*), la protéine PEN2 (*presenilin enhancer 2*) et les présénilines PS1 et PS2 (139 ; 179 ; 378 ; 738 ; 739 ; 788 ; 789). 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 (86 ; 105 ; 767).

- **Les préséniline**s **–** Exprimées de façon ubiquitaire, les PS sont impliquées dans de multiples fonctions cellulaires parmi lesquelles la régulation de l'apoptose (791 ; 833), la régulation de la signalisation intracellulaire (101 ; 377 ; 434 ; 691), 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 (20 ; 120 ; 140). Malgré tout, de faibles quantités de PS ont été mises en évidence dans les membranes nucléaires (441) et dans la membrane plasmique (151 ; 547 ; 606). L'implication des PS dans le métabolisme de l'APP a été suggérée par le lien entre les mutations des gènes *PSEN1* et *PSEN2*, situés respectivement sur les *locus* 14q24.3 et 1q31-q42 (543), et l'apparition des formes familiales de la MA caractérisées par une augmentation du *ratio* $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (619 ; 655 ; 675 ; 769 ; 841). Par ailleurs, les PS immunoprécipitent conjointement avec les fragments C99 et C83, produits des α- et β-sécrétases (785 ; 839).

Les analyses topologiques des protéines PS1 et PS2, longues de 463 et 448 acides aminés respectivement (438 ; 675), 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 16, dans lequel la protéine est constituée de 8 segments transmembranaires et dont les extrémités *N*- et *C*-terminales se projettent dans le cytoplasme (73 ; 443 ; 444 ; 524). Dans de nombreux types cellulaires et dans le cerveau, les PS subissent une maturation protéolytique par clivage entre les domaines transmembranaires 6 et 7 (443 ; 763). 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 (590 ; 708 ; 866). Leur formation est contrôlée par une dégradation dépendante du protéasome des protéines PS excédentaires (707 ; 764). L'activité protéolytique des PS est portée par deux 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 Aβ (295 ; 296 ; 563 ; 669 ; 832). La protéine et son substrat interagissent probablement par les domaines transmembranaires (841).

L'activité γ-sécrétase est portée par un complexe de haute masse moléculaire suggérant une interaction forte entre PS et protéines de régulation (Figure 16). De nombreuses études ont permis d'identifier les acteurs moléculaires responsables de l'activité γ-sécrétase.

- La nicastrine (Nct) –Le premier facteur identifié fut la Nct ou Aph-2 (240 ; 353), une glycoprotéine transmembranaire de type 1 de 709 acides aminés (654), présente au niveau des endomembranes du RE et du réseau golgien (432 ; 866). Le gène codant la Nct (*locus* 1q23) présente un polymorphisme associé à certaines formes sporadiques d'Alzheimer. La mutation de certaines régions conservées induit une diminution du *ratio* $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, leur délétion, abolissant la synthèse des peptides Aβ, ce qui suggère un rôle de régulation de l'activité γ-sécrétase (96 ; 396 ; 450). 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 (680). Cette association est nécessaire pour le passage de la Nct au niveau du réseau golgien où elle poursuivra sa maturation (170 ; 297 ; 379 ; 768). 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 (399 ; 667). Ainsi, les extrémités *N*-terminales de différentes protéines transmembranaires, Notch et APP (fragments C99 et C83) par exemple (397), seraient reconnues par l'ectodomaine de la protéine Nct dont la masse moléculaire correpond à environ 45% de la masse moléculaire estimée du complexe γ-sécrétase (667).

- 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 (191 ; 240). Chez les mammifères, deux protéines codées par les gènes *aph-1α* et *aph-1β* ont été mises en évidence (194). La protéine APH-1α, plus abondante et plus couramment exprimée, présente 2 isoformes issues d'un épissage alternatif et nommées APH-1αS et APH-1αL (248 ; 431). La protéine APH-1 et la Nct interagissent pour former un sous-complexe, préalable à l'association sous forme de complexe γ-sécrétase (316 ; 421 ; 507). Ces interactions interviendraient probablement au niveau du RE, très tôt après la synthèse de APH-1, et induiraient la maturation protéolytique de cette dernière et l'obtention d'un fragment *C*-terminal associé à la Nct (191). 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 être établi.

- PEN-2 (*presenilin enhancer 2*) est une protéine de 101 acides aminés, possédant 2 domaines transmembranaires et principalement localisée dans le RE. Son extrémité *N*-terminale se projette dans le cytoplasme et l'extrémité *C*-terminale dans le milieu extracellulaire (127). 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 (73 ; 194).

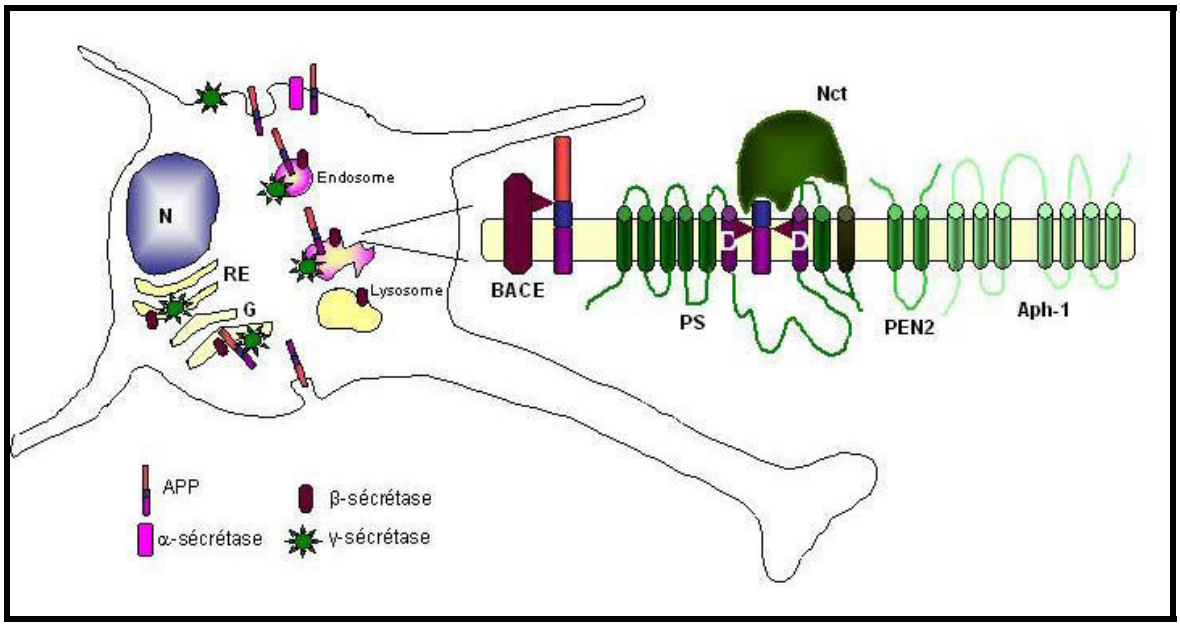


Figure 16 : Représentation schématique du clivage de l'APP *in situ*.

5.4. Le peptide β-amyloïde agrégé, acteur de la cascade amyloïde

La cascade amyloïde, proposée par Hardy & Higgins (1992) (261), postule que les troubles observés dans la MA résultent d'un métabolisme anormal de la protéine APP ayant pour conséquence une accumulation de peptides Aβ sous forme de fibrilles de type amyloïde dans les cerveaux des patients atteints de MA (Figure 17). Depuis, de nombreuses équipes se sont consacrées à l'étude des mécanismes de fibrillogénèse et de cytotoxicité du peptide Aβ agrégé.

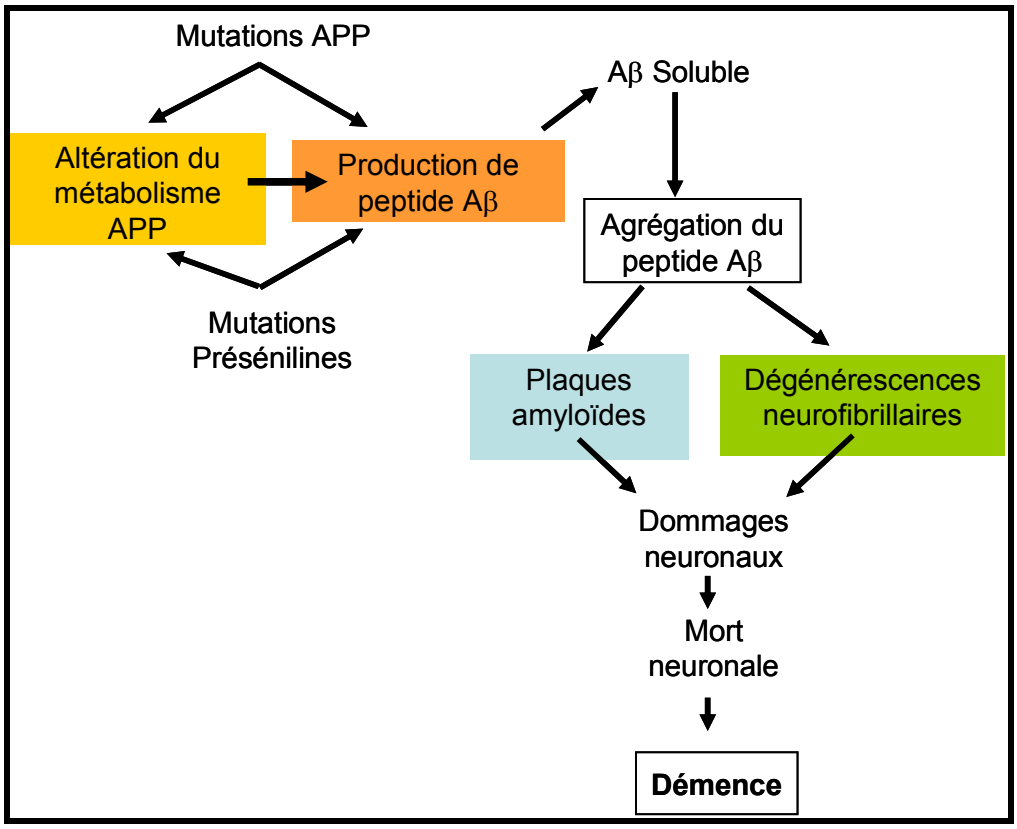


Figure 17 : La cascade amyloïde

5.4.1. Structure des fibrilles de peptide Aβ et formation des plaques

Depuis la découverte du peptide Aβ dont la structure primaire est présentée Figure 18, 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 telles que le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge à transformées de Fourier, la microscope de force atomique, la RMN ou encore la diffraction aux rayons X.

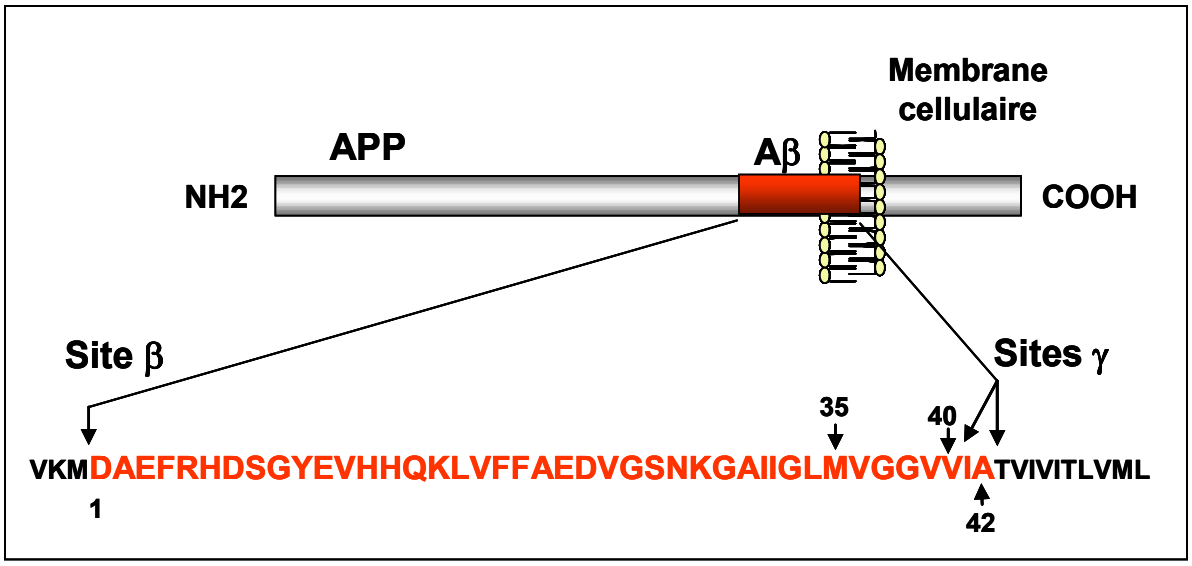


Figure 18 : Structure primaire du peptide Aβ

Ces études convergent vers le modèle présenté dans la Figure 19, confirmé *in silico*, au sein duquel la formation de fibrilles nécessite l'adoption par le peptide Aβ d'une structure en feuillet β (511 ; 518 ; 665). Bien que les fibrilles de peptide $A\beta_{40}$ contiennent des quantités significatives de feuillet β intermoléculaire (665 ; 758), cette structure n'est pas la seule structure secondaire des fibrilles dont la formation nécessite l'apparition d'un coude entre les positions 26-29 du peptide Aβ (301 ; 327 ; 580 ; 668 ; 717). Peu d'études ont été réalisées sur les fibrilles de peptide $A\beta_{42}$, dont la forte hydrophobie des résidus *C*-terminaux impose des contraintes difficiles à exploiter par les techniques de RMN. Afin de contourner cette difficulté, une série de mutants du peptide $A\beta_{42}$ a été préparée par remplacement systématique des résidus par la proline. Cette analyse a démontré que le peptide $A\beta_{42}$ adopte aussi une conformation incluant des feuillets β antiparallèles et un coude, disposant en outre d'un cluster hydrophobe des résidus 35 à 42.

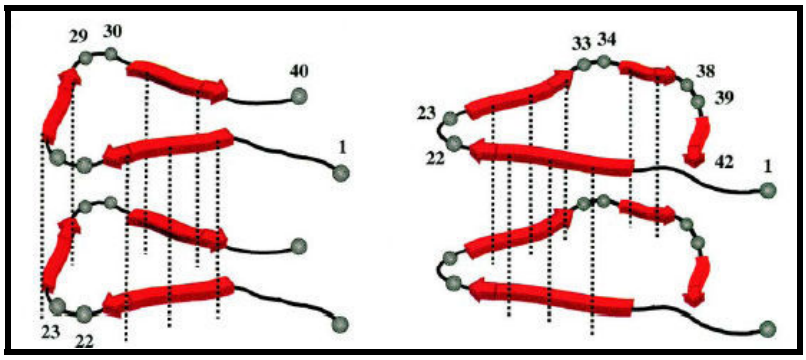


Figure 19 : Modélisation des changements structuraux du peptide Aβ associés à la fibrillogenèse (327).

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 (91). L'analyse structurale des peptides Aβ a toutefois permis de proposer différentes hypothèses quant la neurotoxicité induite *in vitro* par ces peptides fibrillés (456 ; 585). A titre d'exemple, le repliement sous forme de feuillet β permettrait une exposition de la Met^{35} et l'apparition d'un stress oxydant qui pourrait endommager les membranes neuronales et les activités associées (327).

De nombreuses études suggèrent que les fibrilles de peptides Aβ s'accumulent dans le milieu extracellulaire, autour d'un noyau de nucléation dont la nature (gangliosides, métaux, protéines) est encore controversée (270 ; 287 ; 372 ; 856). La mise en évidence d'accumulations intraneuronales de peptides Aβ 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 induisant ainsi l'apoptose des neurones environnants (239 ; 800). Les causes de l'arrêt de la croissance des plaques au profit d'une densification sont encore inconnues à ce jour.

5.4.2. Propriétés neurotrophiques du peptide Aβ agrégé

Si les propriétés physiologiques de la protéine APP demeurent inconnues, il en est de même pour celles de ses produits de clivage protéolytique, le peptide Aβ en particulier. De façon intéressante, plusieurs études suggèrent que ce peptide, présent à des concentrations de

l'ordre du nanomolaire dans le cerveau, aurait des effets neurotrophiques et neuroprotecteurs. En effet, à ces concentrations, le peptide Aβ(1-40) fibrillaire améliore la survie de neurones hippocampiques (860). D'autres études corroborent ces observations et montrent par exemple que les peptides Aβ(1-42) et Aβ(1-28) sont des facteurs stimulant la croissance neuritique mais ils augmentent aussi le nombre et l'arborisation des dendrites (593 ; 730 ; 823 ; 838). De plus, il semble que le peptide Aβ(1-40) soit capable de moduler la croissance des astrocytes, notamment en régulant la synthèse de la protéine S100B (574).

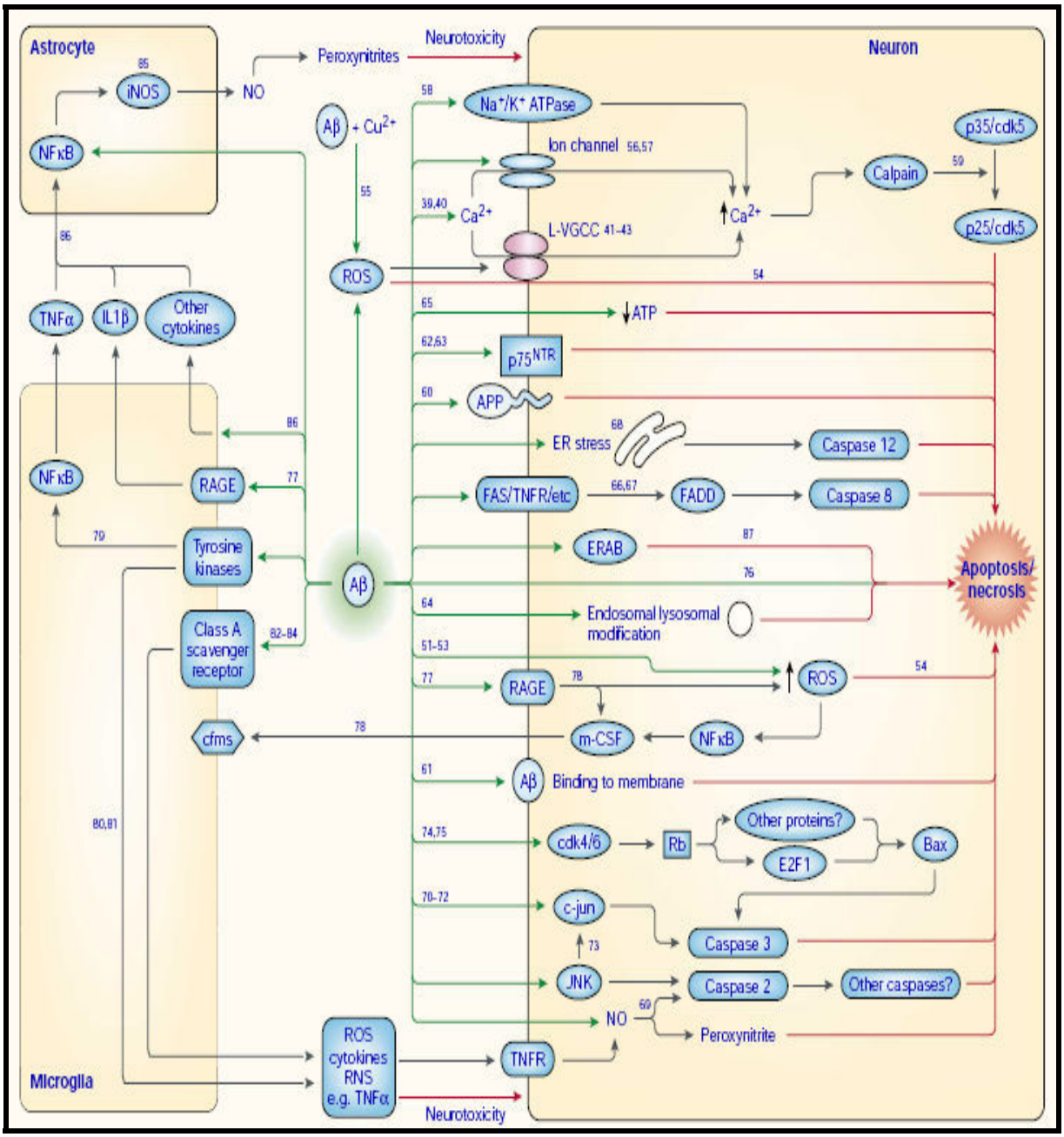
5.4.3. Cytotoxicité des fibrilles de peptide Aβ

L'étude de la cytotoxicité du peptide Aβ sous forme fibrillaire a constitué un champ d'investigation très important durant ces 20 dernières années et de nombreux travaux ont été publiés étayant l'hypothèse de la cascade amyloïde en tant qu'élément causal de la MA. Ainsi, les premiers travaux ont permis de suggérer que l'agrégation du peptide Aβ est un pré-requis à son activité neurotoxique (456 ; 585 ; 775). D'autres travaux vont dans ce sens et l'utilisation de plusieurs types de peptides Aβ suggère que le domaine 25-35 du peptide est responsable à la fois de son agrégation et de sa neurotoxicité (488 ; 584 ; 586). Cette modélisation *in vitro* de la neurotoxicité de peptides Aβ synthétiques a été confirmée par la démonstration de la forte neurotoxicité de fibrilles purifiées à partir de plaques séniles extraites de cerveaux de patients atteints de MA (621). Comme nous le verrons dans le paragraphe 6, ces observations ont été renforcées par l'étude *in vivo* de la neurotoxicité des fibrilles de peptide Aβ.

De nombreux efforts ont été entrepris en vue de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire induite par les fibrilles de peptide Aβ, et d'identifier ses cibles cellulaires. A l'heure actuelle, la synthèse de ces travaux nous montre que les mécanismes et les acteurs membranaires essentiels ne sont toujours pas identifiés, même si plusieurs hypothèses sont avancées. Parmi les plus étayées, nous pouvons citer la perturbation de l'homéostasie calcique, l'induction d'un stress oxydant et des phénomènes neuroinflammatoires (14 ; 110 ; 511 ; 659 ; 727). Ces différents événements cellulaires sont responsables de l'activation de nombreuses voies de signalisation que certains ont tenté sans succès de synthétiser (331 ; 511).

Du fait des nombreux modèles cellulaires utilisés, des variations de préparation de peptides Aβ fibrillaires et des approches choisies, il n'est pas possible d'identifier la (les) voie(s) essentielle(s) d'autant que la plupart de ces cibles n'ont pas été validées *in vivo*. A titre d'exemple, une revue récente nous montre la complexité de ces phénomènes (690). Ainsi, plusieurs récepteurs membranaires ont été proposés comme étant les médiateurs de la réponse cellulaire aux fibrilles de peptide Aβ, les résultats de ces études restant largement controversés (Figure 20). Le candidat le plus intéressant est sans doute le récepteur p75NTR (577 ; 845 ; 846) qui après interaction avec les fibrilles de peptide Aβ activerait différentes voies de transduction impliquant les caspases, les protéines de la famille Bcl-2, la protéine p53 ainsi que différentes cascades de phosphorylation liées à différentes MAP kinases (p38, JNK, et MAPK) (9 ; 13 ; 224 ; 225 ; 256 ; 349 ; 373 ; 745 ; 872).

L'ensemble de ces voies de transduction converge pour la plupart vers une mort neuronale par apoptose dépendante des caspases. Plusieurs travaux ont permis de préciser la place et les classes de caspases impliquées (9 ; 185 ; 190 ; 256 ; 332 ; 427 ; 529 ; 587 ; 704 ; 706 ; 773). La figure 21 résume l'ensemble de ces travaux.



<u>Figure 20</u> : Voies de signalisation intra- et inter-cellulaire impliquées dans la mort neuronale induite par le peptide Aβ fibrillaire (690)

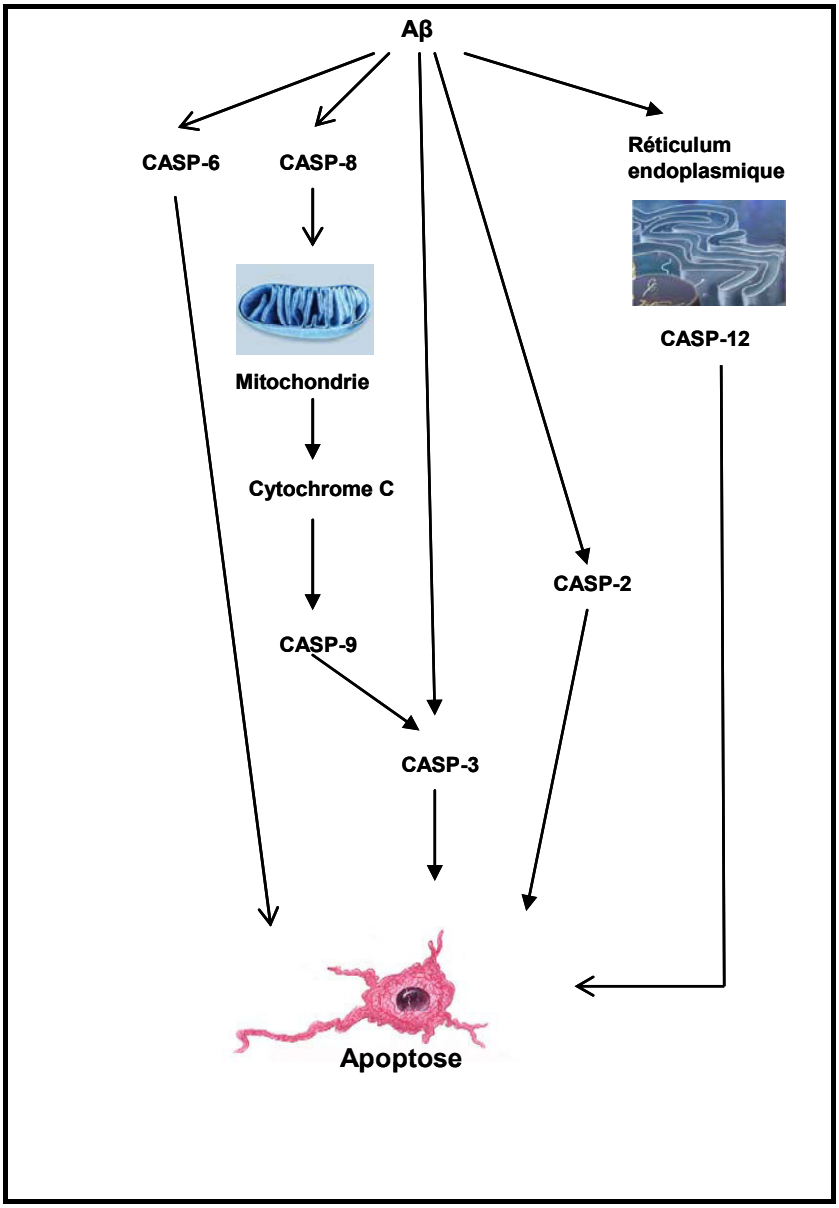


Figure 21 : Représentation schématique de l'intervention des différentes caspases durant l'apoptose neuronale induite par le peptide Aβ fibrillaire.

5.4.4. Mécanismes cytotoxiques liés à l'accumulation de fibrilles de peptide Aβ

5.4.4.1. Le stress oxydant

Les études *post mortem* réalisées sur cortex et hippocampe de patients atteints de la MA et sur des individus témoins ont montré que les malades présentent des taux supérieurs d'acroléine (83), de malondialdéhyde, d'adduits protéines/ hydroxynonénal (478), de protéines oxydées (5 ; 469), de nitration (693), d'ARN oxydés (contenant notamment la base 8-hydroxy-guanosine) (469) ainsi qu'une accumulation de métaux, sources de radicaux libres. L'augmentation du stress oxydant chez les patients atteints de la MA pourrait être due au potentiel oxydant des fibrilles de peptides Aβ (327), à la diminution de l'activité de certaines enzymes mitochondriales telles que le complexe α-cétoglutarate déshydrogénase (220) ou à un stockage exacerbé du calcium au niveau mitochondrial (221) et du RE (222 ; 329). En outre, une réduction significative des agents antioxydants a été observée chez les patients atteints de la MA (569 ; 869). La concentration en acide urique, dont le rôle est de piéger les espèces réactives nitrées telles que l'espèce réactive $ONOO^-$ générée par les cellules gliales (236 ; 842) est également diminuée chez ces patients. La survenue du stress oxydant est un événement majeur dans la MA (338 ; 366 ; 549 ; 595 ; 855). Au niveau cellulaire, ces dernières pourraient perturber les membranes mitochondriales et les enzymes de la chaîne respiratoire, générant ainsi des espèces réactives oxygénées de façon précoce (12 ; 607), préalablement à l'activation des enzymes protéolytiques caspases et calpaïnes et à la désorganisation du cytosquelette (185 ; 704). La désorganisation du cytosquelette et la déformation dendritique pourraient également être dues à une dérégulation des enzymes associées au cytosquelette. La protéine GSK-3β, par exemple, présente une activité induite par les espèces réactives oxygénées (63), la protéine Arc (*activity-regulated cytoskeleton associated protein*), activée lors d'une exposition aux peptides Aβ a été impliquée dans d'autres travaux relatifs à des troubles de l'apprentissage et de la mémorisation (252 ; 368 ; 411). La génération d'espèces réactives oxygénées aurait aussi pour conséquence une perturbation de la membrane plasmique et des endomembranes induisant une activation de la protéine BACE et donc une accumulation d'autant plus marquée de peptide Aβ, amplifiant le phénomène et initiant la formation de plaques amyloïdes (442 ; 744).

L'utilisation d'antioxydants est aujourd'hui envisagée 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 (532) et les taux de peptide Aβ présents dans le cerveau (118 ; 728). Chez ces mêmes souris, l'administration de curcumine, un agent antioxydant, diminue l'apparition des marqueurs du stress oxydant et la formation des plaques amyloïdes (445). Les études épidémiologiques et cliniques 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 (642 ; 868).

5.4.4.2. Le 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 (183). Suite à leur activation, elles secrètent des molécules chimiotactiques permettant le recrutement des astrocytes dont 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 la mise en place d'un processus inflammatoire (254) résultant notamment de la génération d'oxyde nitrique par les enzymes iNOS (*nitroc oxyde synthase*) et arginosuccinate synthétase et de différents médiateurs proinflammatoires neurotoxiques (292).

L'accumulation des peptides Aβ qui constituent de puissants activateurs des cellules gliales et la présence au sein des plaques de protéines du complément telles que C1q ou SAP (*serum amyloid P component*) induisent une réponse neuroinflammatoire (304 ; 650). Le recrutement des astrocytes et des cellules microgliales au niveau des plaques séniles favorise la clairance du peptide Aβ et forment une barrière protectrice entre les dépôts congophyles et les neurones (201 ; 598 ; 626). Outre leur action dans la clairance des neurotoxines par phagocytose ou par libération d'enzymes protéolytiques telles que la néprilysine ou l'enzyme de dégradation de l'insuline, IDE (599), les cellules gliales présentent un potentiel neurotrophes par la sécrétion d'agents neuroprotecteur dont le GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*). La présence de ces cellules à proximité des plaques séniles (25) se traduit par une augmentation de l'expression des protéines de phase aiguë, des cytokines, des chimiokines (IL-1β, IL6, IL8) et d'autres médiateurs proinflammatoires tels que la protéine MIP-1α (*macrophage inflammatory protéine*), le TNF-α, ou encore le facteur de croissance tumorale β (4 ; 650). La production de ces médiateurs est la résultante de différents

mécanismes initiés par l'exposition aux peptides Aβ parmi lesquels l'activation des voies de transduction en amont du facteur NF-κB, l'induction d'un stress oxydant conduisant à la génération d'espèces réactives nitrées et oxygénées et la rupture de l'homéostasie ionique (305). 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 (578).

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 cyclo-oxygénase COX2, est particulièrement importante lors des phases précoces de la maladie suggérant un rôle clef des protofibrilles de peptides Aβ et éventuellement des formes solubles dans la neuroinflammation (116 ; 311). Cette hypothèse est confortée par les études réalisées *in vivo* sur des souris transgéniques APPVal^{717}Ile pour lesquelles l'activation microgliale est initiée préalablement à l'accumulation des dépôts amyloïdes, au déclin cognitif et à l'inhibition de la LTP (254 ; 291). Certaines études mettant en évidence une surexpression de la protéine BACE1 dans les astrocytes soumis à un stress suggèrent que ces cellules pourraient générer les peptides Aβ (626). L'intervention des cellules microgliales et des astrocytes dans le métabolisme de l'APP passe également par une promotion de l'agrégation et du dépôt des peptides Aβ (251), et par une régulation transcriptionnelle de la β-secrétase BACE1 impliquée dans la génération de ces peptides (649).

L'importance des mécanismes inflammatoires dans les pathologies neurodégénératives, en particulier dans la MA a conduit à proposer les anti-inflammatoires non stéroïdiens et notamment les inhibiteurs des cyclo-oxygénase COX1 et COX2, impliquée dans la production de certaines prostaglandines (204 ; 782 ; 829), comme des solutions préventives et/ou curatives aux troubles observés dans ces pathologies. Malgré des résultats épidémiologiques et expérimentaux encourageants, parmi lesquels l'observation d'une diminution de la présence de microglie activée à proximité des plaques (6), le retard des premiers symptômes et la diminution des dépôts amyloïdes et des taux de peptides Aβ soluble *in vivo* sur souris transgéniques Tg2576 soumises à un traitement par des AINS (177 ; 445 ; 446; 782), 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 (187 ; 408 ; 496), 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 ébranler

cette hypothèse (3 ; 311 ; 779). Des études complémentaires seront nécessaires afin d'établir le potentiel des traitements anti-inflammatoires dans la lutte contre cette pathologie neurodégénérative et d'évaluer les éventuels effets secondaires, en particulier au niveau du système digestif.

5.5 Une alternative à la cascade amyloïde : l'hypothèse *Aβ* soluble.

5.5.1. Introduction

La cascade amyloïde représente sans aucun doute un événement important dans le développement de la MA (260 ; 435 ; 662). Elle a été le support dans la démonstration du lien étroit existant entre la pathologie de la MA et le peptide Aβ. Cependant, la nature et la structure du peptide Aβ précocement impliqué dans les phénomènes de neurodégénérescence sont des questions non résolues, donnant lieu à des débats passionnants (160 ; 483 ; 858). La cascade amyloïde pose problème à plusieurs niveaux : elle n'explique pas à elle seule les différentes atteintes tissulaires et cellulaires observées lors du développement de la MA, aussi bien en ce qui concerne la régiospécificité, la nature et la cinétique d'apparition des lésions (475). Les arguments les plus forts viennent sans doute de la clinique. En effet, en plus de la présence de dépôts amyloïdes observés dans le cortex et l'hippocampe de personnes âgées exemptes de toute démence (136 ; 146), il a été montré une absence de corrélation entre la charge en dépôts amyloïdes et le niveau de détérioration des fonctions cognitives chez les patients atteints de MA (67 ; 362 ; 760). De plus, des phénomènes neurodégénératifs ont été observés en absence de plaques amyloïdes (111) et des plaques détectées dans des zones cérébrales ne présentant aucun signe de neurodégénérescence (172 ; 346).

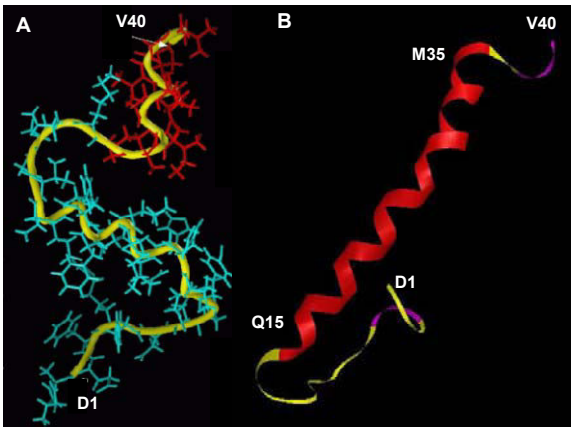
Ainsi, de nombreux auteurs sont désormais convaincus que le peptide Aβ fibrillaire accumulé au sein des plaques séniles ne joue pas un rôle prépondérant dans la mise en place des déficits cognitifs associés aux phases précoces de la MA, mais pourrait représenter une conséquence du processus dégénératif et participer à l'aggravation de la MA en augmentant la mort cellulaire, les processus oxydatifs et inflammatoires (660). Plusieurs équipes dont la nôtre ont ainsi développé une hypothèse alternative, plaçant les oligomères solubles de peptide Aβ au cœur des processus neurodégénératifs associés aux phases précliniques de la MA (160 ; 735).

5.5.2. Forme monomérique et oligomérique du peptide Aβ

Depuis plusieurs années, l'hypothèse selon laquelle le peptide Aβ soluble, découvert par Tabaton *et al*. (1994) (734) pourrait jouer un rôle déterminant dans la mort neuronale et la progression de la maladie s'est développée (159 ; 384 ; 385 ; 415 ; 519 ; 552 ; 587). Les peptides Aβ solubles, définis comme les espèces restant dans le surnageant après ultracentrifugation à 100.000 x *g*, 1 h (409), respectent un équilibre entre formes monomérique et oligomériques, de 2, 3 ou éventuellement 4 unités (50 ; 797). Cet équilibre, également retrouvé pour les peptides synthétiques *in vitro*, est déplacé vers les formes oligomériques lorsque la concentration en peptides Aβ augmente. Une fraction des oligomères formés est très stable, en raison d'interactions hydrophobes fortes et peut donc être secrétée (797). La concentration en peptides Aβ sous formes solubles semble mieux corrélée avec la sévérité de la perte synaptique et de l'atteinte démentielle que la densité des plaques séniles (461 ; 499 ; 807). De plus, différentes études menées sur des souris Tg2576, ont mis en évidence un processus neurodégénératif accompagné de troubles de l'orientation en l'absence de plaques séniles (104 ; 314 ; 391 ; 392 ; 520 ; 541).

5.5.3. Implication dans la perte synaptique et le déclin cognitif

Les travaux de Pillot *et al*. (1996, 1997 & 1999) (587 ; 588 ; 589) ont démontré que le peptide Aβ soluble présente des propriétés fusogènes lui permettant d'interagir avec les membranes et d'en altérer les propriétés et les activités qui lui sont associées. Ces propriétés fusogènes sont liées à une structure tridimensionnelle particulière en solution (114 ; 511 ; 717) pour laquelle différents modèles ont été proposés (Figure 22A). Le modèle le plus récent (Figure 22B) a été obtenu 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 (114).



<u>Figure 22</u> : Structure tridimensionnelle du peptide Aβ$_{40}$

A : *d'après Sticht et al. (1995) (717) ;* ***B :*** *d'après Coles et al. (1998) (114).*

L'interaction du peptide Aβ avec la bicouche lipidique, principalement au niveau des membranes synaptiques (411), pourrait constituer la première étape d'une cascade d'événements dont la résultante serait la perte synaptique, éventuellement la mort cellulaire entraînant les premiers troubles de l'apprentissage et de la mémorisation (298 ; 448 ; 498 ; 522 ; 611). 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 Aβ solubles dans l'hippocampe de rat (387 ; 630 ; 797 ; 799). Un traitement du milieu dans lequel est solubilisé le peptide Aβ par la protéase IDE, capable de dégrader spécifiquement les monomères mais pas les oligomères de peptide Aβ, n'empêche pas l'inhibition de la LTP, suggérant que seules les formes oligomériques soient responsables des perturbations observées (415 ; 798 ; 801). En conséquence, certains auteurs proposent une hypothèse alternative à la cascade amyloïde dans laquelle les peptides Aβ solubles initient, de part leurs intéractions avec les membranes synaptiques, l'altération de la neurotransmission et du remodelage synaptique. Cette hypothèse est confortée par les analyses histologiques montrant une diminution de la densité synaptique préalable à la mort neuronale (46 ; 142) et par les études réalisées *post mortem* sur cerveaux de patients décédés de la MA et sur souris transgéniques. Elles suggèrent que la perte de la fonction synaptique serait antérieure à la diminution de la densité synaptique (564 ; 819).

En outre, l'exposition de cultures primaires de neurones corticaux au peptide Aβ 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 qu'elle est liée à un processus apoptotique dépendant des caspases lorsqu'elle est induite par

les formes solubles du peptide Aβ (484 ; 589 ; 859), alors que la forme fibrillaire serait plutôt responsable d'une mort nécrotique (39 ; 731). Ceci suggère que le type de mort neuronale induit par le peptide Aβ dépend de sa conformation. La formation des monomères et oligomères solubles pourrait donc être déterminante dans la neurotoxicité observée dans la MA (108 ; 272 ; 796).

5.5.4. L'interaction 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 l'interaction du peptide Aβ sous forme oligomérique avec la membrane. Deux hypothèses controversées sont envisageables, d'une part la création par le peptide Aβ fusogène de pores membranaires capables de rompre l'homéostasie ionique de la cellule et d'autre part l'interaction de ce peptide avec un récepteur membranaire ou une entité récepteur-*like*. Quelle que soit l'hypothèse retenue, la composition et la structure de la membrane neuronale constituent un élément clef de l'interaction et de la cytotoxicité du peptide. Ainsi, Arispe & Doh (2002) (28) puis Sponne *et al*. (2004) (706) ont montré que le contenu en cholestérol, qui détermine la fluidité membranaire, est un paramètre important dans la cytotoxicité du peptide Aβ, confirmant le caractère déterminant de l'interaction avec la membrane dans la mort neuronale observée dans la MA.

5.5.4.1. Insertion dans les membranes plasmiques

La formation de canaux amyloïdes a été décrite pour au moins 8 différentes classes de peptides Aβ impliquées dans différentes pathologies neurodégénératives parmi lesquelles les maladies de Parkinson, de Hungtington, et de Creutzfeld-Jakob (226 ; 354). Les peptides Aβ peuvent former des canaux ioniques dans les bicouches lipidiques planes, les liposomes, les neurones, les ovocytes et les fibroblastes (196). Les canaux formés par les peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ semblent présenter les mêmes caractéristiques en terme de taille et de sélectivité ionique (302). Ces canaux relativement larges ne présentent pas de spécificité de cations, sont perméables au Ca^{2+}, bloqués en présence de Zn^{2+}, sensibles au pH, à l'exposition aux solvants, à la concentration en peptide et à la présence d'agents de nucléation (270 ; 302 ; 584). 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 proapoptotiques. Les variants de peptide Aβ ne comptant pas plus de 10 acides aminés ne forment pas de canaux, suggérant la nécessité d'une structure minimale pour l'insertion dans la membrane. Malgré cela, Qi & Qiao (2001) (597) ont rapporté la formation d'oligomères de peptides $A\beta_{25-35}$ capables de s'insérer *in vitro* dans les membranes sous forme de canaux. Les peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ sont capables d'induire des mouvements ioniques dans les neurones corticaux de rat (205 ; 815) ainsi que dans d'autres types cellulaires (363 ; 640).

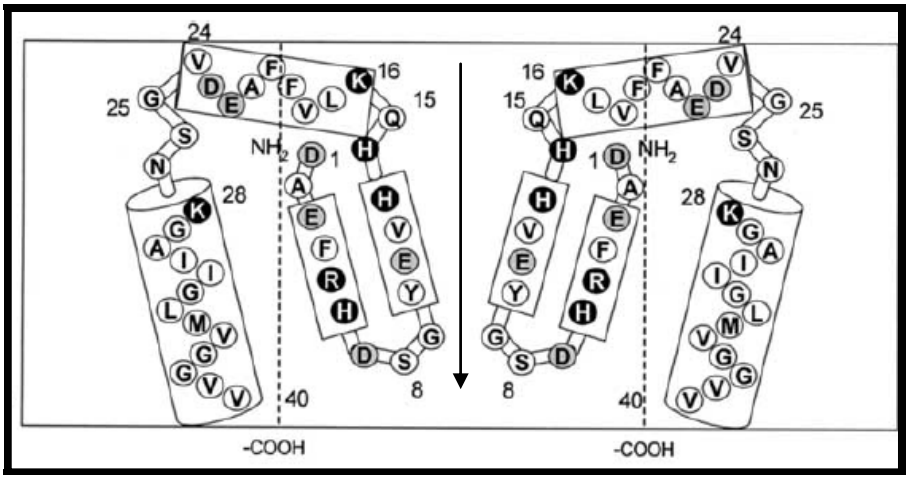


Figure 23 : Composition d'un canal amyloïde (27)

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

Différentes formes de canaux amyloïdes pourraient exister en raison de l'agrégation rapide et variable des peptides Aβ sous forme d'oligomères (402 ; 354). Différents modèles structuraux ont été proposés (165 ; 27), dont celui présenté Figure 23. L'hypothèse des canaux amyloïdes permet de proposer des mécanismes moléculaires de neurotoxicité reposant notamment sur un influx massif de calcium et postule que les formes solubles seraient les principaux agents pathogènes de la MA (354 ; 226).

5.5.4.2. Accumulation intraneuronale de peptide Aβ

Bien que les études *in vitro* sur neurones corticaux de rat en culture primaire suggèrent que les peptides Aβ solubles interagissent quasi-exclusivement avec les membranes synaptiques (90% des peptides Aβ seraient colocalisés avec la protéine post-synaptique PSD-

95 (411), la présence d'une accumulation intraneuronale de peptide Aβ a été rapportée par de multiples études. Ainsi, des études *post mortem* ont mis en évidence la présence de peptides $A\beta_{42}$ 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 (239 ; 417). Ces études sont confortées par la présence de peptides Aβ intraneuronaux *in vivo* sur souris transgéniques présentant une ou plusieurs mutations dans les gènes impliqués dans les formes familiales de la MA (52 ; 749 ; 830 ; 831). La présence de peptides Aβ dans les vésicules péricaryotiques pourrait être liée à leur site de production, celle du peptide $A\beta_{40}$ ayant lieu dans les membranes de l'appareil golgien et des vésicules golgiennes (840 ; 843), et celle du peptide $A\beta_{42}$ intervenant de façon plus précoce dans les membranes du RE, des endosomes et de l'appareil golgien (120 ; 244 ; 275 ; 395). Certains travaux réalisés *in vitro* sur culture cellulaire et sur culture organotypique de tranches de cerveau de rat suggèrent que l'accumulation de peptides Aβ au sein du neurone pourrait en partie résulter de la réinternalisation par endocytose des peptides Aβ extraneuronaux (32 ; 153 ; 857). Les cellules concernées par les accumulations intraneuronales présentent une morphologie synaptique altérée (738 ; 830) suggérant un impact de ce type de lésion dans la perte synaptique et l'inhibition du processus LTP dans les phases précoces de la maladie (49). Par ailleurs, certains auteurs suggèrent que la présence d'oligomères de peptides Aβ au niveau intraneuronale pourrait être à l'origine de perturbations des endomembranes conduisant à la rupture de l'homéostasie ionique et à l'initiation de la cascade proapoptotique par libération de divers agents apoptogènes (376). L'injection de peptide $A\beta_{42}$ dans le milieu intracellulaire a confirmé le caractère neurotoxique de ces accumulations intraneuronales (471 ; 872).

5.5.4.3. Interaction avec un partenaire membranaire neuronal ou glial

Bien que les mécanismes moléculaires d'adressage du peptide Aβ 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 être médiée par un récepteur protéique (411 ; 415). L'hypothèse de l'existence de partenaires protéiques privilégiés a été envisagée dès 1998 par Lambert *et al*. (415) dont les travaux ont montré une diminution des interactions peptide Aβ/membrane après trypsination des cellules. De nombreux partenaires protéiques neuronaux ont été proposés dont :

- La protéine Fyn, une tyrosine kinase non réceptrice surexprimée dans le cerveau des patients atteints de la MA et dont l'invalidation génique chez des souris transgéniques modèles

de cette pathologie permet une résistance à l'apoptose neuronale induite par le peptide Aβ (415 ; 679). Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les interactions existant entre cette protéine et le peptide Aβ.

- Le récepteur de l'insuline (842), en raison de l'existence d'une séquence homologue commune entre le peptide Aβ et l'insuline (384). Cette interaction pourrait être à l'origine des perturbations du métabolisme du glucose observées dans la MA (784).

- Le récepteur SEC-R (*serpin complex receptor*) *via* la séquence $A\beta_{25-31}$ (351). Les expériences de liaison réalisées *in vitro* ont montré que l'interaction des peptides Aβ solubles avec ce récepteur a pour conséquence leur internalisation par endocytose et leur dégradation et ne semble donc pas participer aux mécanismes neurotoxiques (57 ; 58). D'autres médiateurs ont été impliqués dans la clairance du peptide Aβ par un mécanisme endocytose dépendant, parmi ceux-ci les intégrines et plus particulièrement l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (482).

- Le récepteur α7nAChR (*α7 nicotinic acetylcholine receptor*) par la séquence $A\beta_{12-28}$. (805). Afin de comprendre l'éventuel implication de cette interaction dans la neurotoxicité induite par le peptide Aβ, des lignées cellulaires surexprimant ces récepteurs ont été utilisées. Les résultats expérimentaux obtenus montrent que la liaison du peptide $A\beta_{42}$ soluble à ce récepteur induit une rapide et réversible phosphorylation de la protéine *Tau* suggérant un lien entre hypothèse tauïste et myéloïste (806).

- Le récepteur de l'amyline (341).

Par ailleurs, la liaison du peptide Aβ 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 coloni stimulating factor*) responsable de l'activation et de la migration des cellules microgliales (454 ; 854). Au niveau astrocytaire, la liaison au récepteur RAGE induit également l'internalisation et la dégradation du peptide Aβ (648). Par ailleurs le récepteur FPRL1 (*formyl peptide recepteur-like1*) est exprimé dans le cerveau par certaines cellules astrocytaires, par les cellules épithéliales et vasculaires (425) et conduit après réception du peptide Aβ à la libération de médiateurs neurotoxiques et proinflammatoires (765).

5.5.5. Réalité clinique et impact des oligomères solubles de peptide Aβ dans la MA

Les formes oligomériques solubles de peptide Aβ obtenues *in vitro* ou isolées à partir de liquide céphalorachidien sont identiques à celles issues du métabolisme de l'APP

dans différents types cellulaires (78 ; 253 ; 797). Ces oligomères, produits essentiellement par les neurones, sont retrouvés dans de nombreux fluides biologiques dont le liquide céphalorachidien, circulant à de faibles concentrations (de l'ordre du nanomolaire) dans des conditions physiologiques (483 ; 666).

Le développement de dosages ELISA spécifiques du peptide Aβ soluble a permis à plusieurs équipes de montrer l'augmentation de la quantité d'espèces de faibles masses moléculaires dans des broyats de cerveaux de patients atteints de MA (21 à 90 ng/g de tissus) par rapport à des cerveaux de sujets de même âge et exempts de démence 5 à 12 ng/g de tissus) (264 ; 409 ; 734 ; 746). Plus récemment, d'autres groupes ont développé des techniques détectant des femtomoles de peptides Aβ solubles confirmant les précédentes observations (94 ; 231). Ainsi, la sensibilité des techniques actuelles permet de confirmer la présence de monomères, dimères, trimères, tétramères et de dodécamères dans le pool de peptide Aβ soluble (735). Alors que la concentration de ce pool est de 2 ng/g de tissus dans des cerveaux contrôles, 1.5 μg/g de tissus sont détectés en moyenne dans des cerveaux de patients atteints de MA. Cette forte augmentation pourrait permettre aux oligomères solubles de peptide Aβ d'atteindre des concentrations locales suffisantes pour exercer des effets synaptotoxiques et cytotoxiques. De façon importante, il a été montré que la sévérité des atteintes cognitives, mais également les pertes synaptiques chez les patients Alzheimer, est fortement corrélée avec le *pool* de peptide Aβ soluble et non avec les dépôts Aβ (460 ; 499 ; 534 ; 807). Ces données ont partiellement été confirmées par l'analyse de différentes souris transgéniques, modèles murins de MA (154 ; 314 ; 391 ; 392 ; 519 ; 818).

Il est maintenant clairement établi que les oligomères solubles sont des espèces fortement neurotoxiques et qu'elles induisent, à faibles concentrations, l'apoptose neuronale (407 ; 589 ; 701 ; 797). De plus, une étude très importante utilisant des cultures organotypiques d'hippocampe de souris a montré que les oligomères solubles de peptide Aβ induisent une perte synaptique et neuronale spécifique du CA1 de l'hippocampe, les neurones du CA3 étant beaucoup moins atteints (374). Ceci représente la première preuve expérimentale d'une régiosélectivité de la neurotoxicité des oligomères solubles de peptide Aβ, en accord avec les observations cliniques chez l'Homme ! Enfin, ces observations ont été récemment renforcées par la démonstration que les oligomères solubles de peptide Aβ ciblent *in vivo* les terminaisons synaptiques hippocampiques dans un cerveau Alzheimer (411).

L'avancée des connaissances sur l'importance des formes oligomériques solubles de peptide Aβ dans la genèse et la progression de la MA a depuis poussé plusieurs auteurs à émettre l'hypothèse selon laquelle les dépôts fibrillaires de peptide Aβ pourraient, dans les premières phases de la maladie, correspondre à une réponse adaptative et protectrice du SNC : la séquestration des oligomères solubles hautement cytotoxiques serait un moyen de retarder la neurodégénérescence ! L'homéostasie des formes solubles de peptide Aβ (balance entre anabolisme et catabolisme), serait donc un élément déterminant dans le déclenchement de cette pathologie neurodégénérative. Les facteurs moléculaires modulant cette balance, ainsi que ceux inhibant la cytotoxicité des oligomères solubles, pourraient représenter des cibles thérapeutiques prioritaires (799).

6. Les modèles *in vivo* d'étude de la maladie d'Alzheimer

6.1. Introduction

Bien que son étiologie demeure inconnue, il est clair que la MA est une pathologie multifactorielle complexe impliquant des acteurs cellulaires et moléculaires différents (660). Du fait de sa complexité, la MA requiert un maximum de modélisation (simplification) afin de répondre à des questions précises. Les études menées *in vitro* ont permis de faire des progrès extraordinaires et rapides dans la compréhension des mécanismes moléculaires responsables du développement de la MA (160). Entre autre, ces approches ont contribué à la mise en évidence des propriétés cytotoxiques du peptide Aβ, ainsi qu'à l'exploration de la régulation du métabolisme de la protéine APP. Comme pour toutes pathologies, les modèles *in vitro* limitent forcément les champs d'investigation et il est nécessaire de disposer de modèles animaux reproduisant les caractéristiques physiopathologiques et chronologiques du développement de la maladie. En ce qui concerne la MA, la difficulté est bien évidemment due au fait qu'elle touche spécifiquement le système nerveux central et les fonctions cognitives supérieures. Compte tenu du fonctionnement intégré du système nerveux central, plusieurs aspects doivent être pris en compte. Parmi ces facteurs, on peut noter par exemple l'influence de l'âge dans le développement de la maladie, l'importance des interactions neurones/cellules gliales dans les atteintes tissulaires et cellulaires, l'impact sur les différents systèmes de neurotransmission, le rôle du système endocrinien, l'importance de la réaction inflammatoire mettant en jeu plusieurs types cellulaires et divers médiateurs moléculaires, et l'influence des interactions cellules/matrice extracellulaire.

Des modèles comportementaux traditionnels reproduisant les altérations de la mémoire observées dans la MA et reposant sur des lésions des régions spécifiques (noyaux basaux, fornix et hippocampe) ou l'administration de substances neurotoxiques (AF64A et scopolamine) ont été développés (495). Récemment, des modèles de bulbectomie caractérisés par une augmentation de la production du peptide Aβ accompagnée de déficits mnésiques et d'altérations hippocampales spécifiques de la MA ont également été décrits (7). C'est durant les deux dernières décennies que plusieurs modèles murins de la MA ont été développés, en grande partie grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la transgénèse, de techniques d'invalidation de gènes, mais aussi suite à la caractérisation de protéines essentielles au

développement de la MA, identifiées suite à des études épidémiologiques (apoE) ou dans le cadre de l'hypothèse de la cascade Aβ (APP, PS1 et PS2). Dans ce chapitre, nous nous limiterons aux modèles de transgenèse et d'apport d'Aβ exogène, en nous attardant plus longuement dans l'analyse des différents modèles d'injection intracérébrale.

6.2. Les modèles transgéniques de la maladie d'Alzheimer

6.2.1. Les souris mono-transgéniques

6.2.1.1. Les souris transgéniques pour la protéine APP

L'hypothèse de la cascade Aβ provient de l'observation des formes familiales de la MA, liées à des mutations sur le gène codant l'APP. Ces mutations sont responsables d'une augmentation des taux d'Aβ et un développement précoce de la démence (229). En partant de cette hypothèse, plusieurs groupes ont développé des souris transgéniques surexprimant ces formes mutantes du gène de l'APP humain (Tableau 4).

Tableau 4 : Souris transgéniques pour la protéine APP

Nom	Transgène	Expression neurone spécifique	Age d'apparition des plaques	Déficit comportemental	Référence
PDAPP	APP751 (V717F)	oui	4 mois	oui	Games ***et al.***, 1995
APP/Ld	APP751 (V717I)	ND	12 mois	oui	Moechars ***et al.***, 1999
APP23	APPh751 (K670N/M671L)	ND	6 mois	oui	Sturchler-Pierrat ***et al.*** 1997
CRND8	APPh751 (K670N/M671L)	ND	3 mois	oui	Chishti ***et al.***, 2001
NSEAPP	APPh751	Oui	ND	oui	Quon ***et al.***, 1991
APPSwe (Tg2576)	APPh695 (K670N/M671L)	ND	9-10 mois	oui	Hsiao ***et al.***, 1996

Les clones d'ADN complémentaire (ADNc) codant l'APP ont été identifiés il y a plus de 18 ans (609). Cette découverte a permis la mise au point des premiers animaux transgéniques surexprimant différentes formes de la protéine APP humaine (APPh). La

technique générale consiste à inoculer dans les cellules embryonnaires de souris, le gène codant l'APP généralement inséré dans un mini plasmide amplifié chez la levure (YAC). Les cellules transformées sont alors réimplantées à des souris mères, où les embryons génétiquement modifiés se développeront. Les premiers essais de développement de souris transgéniques n'ont pas permis de reproduire les signes pathologiques caractéristiques des phases tardives de la MA (600).

Les souris transgéniques surexprimant l'APP_{751} humain développent une pathologie comparable à celle des stades précoces de la MA chez l'homme (300). Elles présentent en effet de rares dépôts diffus (non colorés par le rouge Congo) constitués essentiellement de peptide Aβ(1-42). Ces dépôts sont associés à une gliose, à des éléments ressemblant à des neurites dystrophiques ainsi qu'à une immunoréactivité *Tau* positive aberrante. Ces souris présentent des déficits de la mémoire de référence spatiale dans la piscine de Morris, ainsi que des déficits des tâches d'alternance dans la labyrinthe en Y à partir de l'âge de 12 mois (508).

Games *et al.* (1995) (208) ont développé des souris transgéniques par insertion de l'ADNc de l'APPh présentant une mutation V717F (APP22). Ces souris (PDAPP) présentent des altérations de l'apprentissage et de la mémoire, une atrophie de l'hippocampe et un début de formation des dépôts amyloïdes dès l'âge de 3 mois (154 ; 155). A l'âge de 6 mois, le nombre des dépôts amyloïdes augmentent, associé à une perte synaptique, une astrogliose et une microgliose que l'on observe plus particulièrement dans les aires de l'hippocampe et du cortex (154 ; 364). A 12 mois, ces souris développent des dégénérescences neurofibrillaires, alors que l'accumulation de la protéine *Tau* hyperphosphorylée n'apparaît que plus tard à l'âge de 14 mois (481).

Les souris Tg2576 expriment l'APP_{695} humain présentant la double mutation suédoise K670N/M671L (APP_{swe}) sous le contrôle du promoteur du gène codant la protéine du prion (315). Dès 9 mois, les souris Tg2576 montrent des déficits des performances de l'apprentissage spatial lors du test de la piscine de Morris et des tâches d'alternance (818). Ces déficits sont accompagnés d'une inhibition de la LTP (336). L'examen histologique de leurs cerveaux à l'âge de 9 mois révèle des plaques séniles classiques avec un cœur dense de substance amyloïde, ainsi que des dépôts diffus de peptide Aβ (382). La quantité de peptide Aβ(1-40) produit est multipliée par 5 et celle du peptide Aβ(1-42/43) par 14. De plus, ces dépôts sont associés à une astrogliose et à des neurites dystrophiques détectés autour des plaques (364). Une publication récente montre de façon élégante que les perturbations de la mémoire des souris Tg2576 âgées de 6 à 14 mois sont dues à l'accumulation spécifique

d'oligomères solubles de peptides Aβ(1-40) et Aβ(1-42) dans le cerveau et cela en absence de mort cellulaire massive (436).

En 1997, Sturchler-Pierrat *et al.* (721) ont développé deux lignées de souris. La première concerne des souris transgéniques qui surexpriment l'APPh combinant les mutations K670N/M671L et V717F (228 ; 521). L'expression du gène muté est sous le contrôle du promoteur du gène codant la glycoprotéine membranaire Tyh-1 murine. Ces souris présentent des dépôts amyloïdes diffus dans le néocortex et l'hippocampe à partir de l'âge de 18 mois, ainsi que quelques plaques amyloïdes (721). La deuxième lignée de souris ne porte que la mutation suédoise (APP23). Elles présentent des plaques amyloïdes dès l'âge de 6 mois. Ces plaques sont associées à des atteintes des prolongements neuronaux et des fibres cholinergiques dystrophiques, ainsi qu'à une réaction inflammatoire importante (210). Au niveau comportemental, les altérations de l'apprentissage lors des tests de Morris et d'évitement passif sont corrélées avec l'âge (367). Ces perturbations apparaissent dès l'âge de 3 mois parallèlement à l'apparition des premiers dépôts amyloïdes et s'aggravent avec le vieillissement des animaux pour atteindre un stade critique à l'âge de 18 à 25 mois correspondant à la multiplications des plaques amyloïdes et à l'atteinte des capacités motrices (367).

6.2.1.2. Les souris transgéniques pour la protéine Tau

Les souris transgéniques (Tg4510) exprimant le gène codant la protéine *Tau* humaine portant une mutation P301L sous le contrôle du promoteur du gène codant la protéine du prion (JNPL3) ont été générées (440). Ces souris présentent des DNF dans différentes zones du cerveau et des pré-DNF dans l'hippocampe et les ganglions basaux, cette formation apparaissant plus tôt chez les souris homozygotes (4,5 mois) que chez les hétérozygotes (6,5 mois). Comparées à des souris sauvages, les souris Tg4510 présentent une atrophie du cerveau qui atteint 67% du poids total à l'âge de 10 mois. Cette atrophie est corrélée à de sévères perturbations des capacités motrices, et en partie à une perte neuronale qui atteint 30% de la population neuronale du CA1 de l'hippocampe à l'âge 5,5 mois (643). Les souris Tg4510 présentent des perturbations de la mémoire spatiale dès l'âge de 4,5 mois. Ces atteintes mnésiques atteignent un stade critique à l'âge de 9,5 mois avec une détérioration totale de la mémoire de référence (604). Néanmoins à cause des sévères atteintes locomotrices, les souris Tg4510 sont rarement utilisées. Toutefois, une étude récente a montré une dissociation entre la mort neuronale et la pathologie neurofibrillaire chez les souris Tg4510 (703). Ces auteurs ont

décrit de façon précise la perte neuronale (probablement due à des phénomènes apoptotiques) avant l'apparition de dégénérescences neurofibrillaires dans l'hippocampe, alors que des DNF apparaissent de façon massive dans le striatum en absence de mort neuronale (703). Tout comme pour les dépôts amyloïdes, il semble clairement établi que les agrégats intracellulaires de protéine *Tau* ne sont pas suffisants pour entraîner la mort cellulaire.

6.2.1.3. Les souris transgéniques pour les présénilines 1 et 2

Comme nous l'avons décrit précédemment, les mutations des gènes codants les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2) sont aussi impliquées dans la cascade amyloïde en altérant le métabolisme de l'APP et en favorisant la voie amyloïdogène. En se basant sur ces observations, Duff *et al.* (1996) (163) ont généré des souris transgéniques par insertion des gènes codant la PS1 portant les mutations M146L ou M146V. L'expression des transgènes est mise sous le contrôle du promoteur du gène codant la protéine PDGFβ. Ces souris présentent une augmentation dans la production des peptides Aβ(1-42) et Aβ(1-43), alors que celles surexprimant la protéine PS1 sauvage ne présentent aucune perturbation dans la production des peptides Aβ (163 ; 318).

Des souris transgéniques surexprimant la protéine PS2 humaine sauvage ou portant la mutation (N141I) sous le contrôle du promoteur du gène codant la NSE (énolase spécifique des neurones) ont été générées (322). À l'âge de 12 mois, ces souris présentent une atteinte de la mémoire de référence lors du test de la piscine de Morris, une augmentation (2 à 3 fois) dans la production du peptide Aβ(1-42), une activation de la caspase-3, ainsi q'une augmentation (1,5 à 2 fois) de l'expression de la COX2 dans le cortex et l'hippocampe (322).

6.2.1.4. Les souris transgéniques pour l'apolipoprotéine E

L'implication des apoE dans les formes sporadiques et familiales de la MA a été démontrée lors d'études cliniques décrivant que plus de 64% des patients atteints par la MA présentent au moins une copie de l'allèle *ε4* de l'apoE (652). L'implication de l'apoE a été vérifiée dans des souris $apoE^{-/-}$ ou des souris n'exprimant que l'une des isoformes de l'apoE humaine. Des marquages immunohistochimiques montrent qu'à l'âge de 4 mois et par rapport aux souris $apoE^{+/+}$, les souris $apoE^{-/-}$ présentent une baisse de 15% du marquage des protéines MAP2 et de la synaptophysine (un marqueur des éléments présynaptiques) (480). Cette baisse atteint 35 à 40 % à l'âge de 8 à 10 mois. Ces perturbations sont corrélées à une atteinte des

prolongements dendritiques qui touchent différentes zones du cortex et de l'hippocampe (343). A l'âge de 12 mois, les souris apoE$^{-/-}$ présentent une baisse dans le marquage immunohistologique des protéines α- et β-tubuline, cette baisse est accompagnée d'une fragmentation des neurites (480). Des études comportementales effectuées dans la piscine de Morris, montrent que les souris apoE$^{-/-}$ présentent un déficit de la mémoire de travail dès l'âge de 6 mois (238), mais ces résultats restent controversées. En effet, plusieurs études n'ont pas réussi à reproduire ces altérations mnésiques (15 ; 273).

Des souris exprimant l'une des deux isoformes humaines de l'apoE (apoE3 ou apoE4) ont été générées la première fois par Xu *et al.* (1996) (844). Plus tard, des souris n'exprimant que l'apoE3 ou apoE4 humaine sous le contrôle du promoteur de la GFAP (souris GFAP-apoE3 et souris GFAP-apoE4) ont été générées (273). Ces souris ont été générées à partir de souris apoE$^{-/-}$. Les souris GFAP-apoE4 présentent un déficit important pour la mémoire de travail dés l'âge de 11 mois, alors que les souris apoE$^{-/-}$ ne présentent aucun signe pathologique de la MA comme les atteintes neuronales, synaptiques et gliales. Une série de tests comportementaux a permis de montrer l'implication de l'allèle *ε4* de l'apoE dans les perturbations de la mémoire spatiale (piscine de Morris) et de travail (évitement actif) qui apparaissent dès l'âge de 4 à 5 mois et qui sont plus prononcées chez les mâles **(**246). Ces perturbations sont accompagnées par une inhibition de la LTP et de la transmission synaptique (772 ; 803). Alors que les souris GFAP-apoE3 présentent une amélioration des capacités mnésiques et une augmentation de la densité synaptique lorsqu'elles sont élevées pendant 20 semaines dans un environnement enrichi, les souris GFAP-apoE4 ne présentent aucune amélioration (437).

6.2.1.5. Les souris transgéniques pour la β-secrétase

Des souris transgéniques exprimant le gène humain codant la BACE-1 sous le contrôle du promoteur du gène codant la Cam Kinase II et des souris BACE $^{-/-}$, ont été générées par Harrison *et al.* (2003) (271). En dehors d'une anxiété plus élevée chez les souris surexprimant la BACE-1, aucune différence significative n'a été observée entre les deux souches. La surexpression de BACE-1 permet de reproduire les atteintes caractérisant la MA lorsqu'elle est combinée avec celle pour le gène APPh sauvage (54) ou muté (429 ; 827).

6.2.2. Les souris double et triple transgéniques

6.2.2.1. Les modèles transgéniques pour la protéine APP et les PS

Le Tableau 5 résume l'essentiel des souches de souris transgéniques APP/PS décrites dans la littérature. Certaines souris PS/APP sont issues du croisement entre la souche Tg2576 et la souche PS1 M146L (570 ; 742). Ces souris présentent une élévation du rapport Aβ42/Aβ40 qui caractérise la souche PS1 M146L et une accélération de l'apparition des dépôts du peptide Aβ. Ces dépôts apparaissent dès l'âge de 6 mois, alors que chez la souche Tg2576 il faut attendre l'âge de 9 mois pour pouvoir observer un début de formation des dépôts amyloïdes (308). Ces dépôts amyloïdes sont corrélés à une perturbation de la mémoire de travail vérifiée par le test du labyrinthe en Y (308).

Tableau 5 : Souris transgéniques pour les protéines APP/PS

Nom	Transgènes	Expression neurone spécifique	Age d'apparition des plaques	Déficit comportemental	Référence
APPswe/ PS1	APP695 (K670M/N671L) et PS1 (P264L)	ND	ND	ND	Siman ***et al.***, 2000
APPLon/ PS1	APP751 (V717I) et PS1 (A246E)	oui	6-9 mois	ND	Dewachter ***et al.***, 2000
APPLon/ PS1$^{-/-}$	APP751(V717I)	ND	ND	oui	Dewachter ***et al.***, 2002
APPSL/PS1KI	APP751 (V717I/K670N/ M671L) et PS1(M233T/ L235P)	ND	9-10 mois	ND	Casas ***et al.***, 2004
APPswe/ PS1dE9	APP695 (K670N/M671L) et PS1 (ΔE9)	oui	9 mois	ND	Jankowsky ***et al.***, 2001
APPswe/ PS1	APP695 (K670N/M671L) et PS1 (A246E)	ND	10 mois	oui	Borchelt ***et al.***, 1997
APPswe/ PS2	APP (K670M/N671L) et PS2 (N141I)	ND	8 mois	oui	Richards ***et al.***, 2003

6.2.2.2. Les modèles transgéniques pour la protéine APP et l'apoE

L'implication de l'apoE dans la MA a été mieux démontrée dans un modèle de souris double-transgénique exprimant le gène codant l'APP V717E et l'une des deux isoformes de l'apoE (apoE3 ou apoE4) humaine (310). Sur ces modèles, on a constaté que les dépôts amyloïdes sont 10 fois plus nombreux chez les souris exprimant l'apoE4 que celles exprimant l'apoE3, alors que les souris apoE$^{-/-}$ ne présentent aucune perturbation. Par ailleurs, des souris exprimant l'APP_{695} sauvage et l'une des deux isoformes d'apoE3 ou E4 ont été générées (601). Les souris APP_{695}/apoE4 présentent un déficit de la mémoire de travail et de référence en absence de dépôts amyloïdes dès l'âge de 6 mois (601).

6.2.2.3. Les modèles transgéniques pour la protéine APP et la BACE-1

Des souris transgéniques combinant l'expression de l'APP_{695} ou mutante et la suppression ou la surexpression de la BACE-1 ont permis de démontrer l'implication de cet enzyme dans le développement de la MA. En effet, chez des souris APP695/BACE-1$^{-/-}$, il a été observé une inhibition de la surproduction de peptide Aβ, sans qu'un phénomène de compensation par la présence de la BACE-2 ne soit observé (467). Par contre, les souris combinant l'expression des gènes codant la BACE-1 et l'APP_{swe} présentent une production du peptide Aβ deux fois plus importante, une accélération dans l'apparition des dépôts amyloïdes et une activation de la microglie plus importante par rapport aux souris monotransgéniques APP_{swe} (505).

6.2.2.4. Les modèles transgéniques pour la protéine APP et Tau

Afin d'étudier l'implication du peptide Aβ dans la formation des DNF, des souris issues du croisement entre les JNPL3 et Tg2576 ont été générées (439). Elles développent des plaques amyloïdes à l'âge de 6 mois (comme les Tg2576), alors que les DNF apparaissent plus tôt dans différentes zones du cerveau dés l'âge de 3 mois. Ces souris présentent des déficiences motrices comparables à celle observées dans la lignée JNPL3 et a permis de montrer que le peptide Aβ potentialise la formation des DNF, alors que la protéine *Tau* n'influence pas la production du peptide Aβ (439).

6.2.2.5. Les modèles triple-transgéniques

Dans leur course vers le modèle parfait, Oddo *et al.* (2003a & b) (554 ; 555) ont généré une souris qui combine l'expression de trois protéines mutantes. Il s'agit de la protéine APP_{swe}, de la protéine PS1-M146V et la protéine *Tau*-P301L. Ces souris développent des plaques amyloïdes dans le cortex à l'âge de 3 mois et dans l'hippocampe à l'âge de 6 mois. Les DNF apparaissent plus tardivement dans l'hippocampe à l'âge de 12 mois, puis dans le cortex vers l'âge de 18 mois. Ce modèle présente aussi une perte synaptique, une perturbation de la LTP et une augmentation dans la réactivité astrocytaire (49 ; 339 ; 554 ; 555). La chronologie de l'apparition des différents phénomènes pathologiques chez la souris triple-transgénique pourrait bien résumer l'évolution de la MA chez l'homme. En effet, l'administration d'anticorps anti-peptide Aβ à ces souris réduit significativement la quantité des dépôts amyloïdes ainsi que le taux de peptide Aβ soluble (553). Plus récemment, ces mêmes auteurs ont montré qu'en plus de protéger les souris du développement de la pathologie amyloïde, les anticorps anti-peptide Aβ réduisent fortement les signes histopathologiques liés à la protéine *Tau* (556). L'ensemble des ces résultats suggère fortement que les oligomères solubles de peptide Aβ sont impliqués dans l'initiation de la pathologie *Tau*.

6.3. Les modèles d'injection intracérébrale du peptide Aβ

6.3.1. Introduction

Le développement de modèles transgéniques de la MA a permis des progrès importants dans la compréhension des mécanismes moléculaires liés à des formes familiales de MA associées à des mutations des gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme de la protéine APP et la surproduction de peptide Aβ. Comme nous l'avons vu précédemment, ces différents modèles reproduisent, le plus souvent de façon incomplète, les phases tardives de la MA. Il apparaît donc extrêmement difficile de développer un modèle animal correspondant à des formes sporadiques de la MA. Cependant, dans certains cas comme les souris Tg2576, il a été possible de corréler l'apparition de troubles cognitifs et mnésiques avec l'accumulation d'oligomères solubles de peptide Aβ, en absence de dépôt amyloïde (314 ; 391 ; 392).

Une approche alternative peut être représentée par un modèle animal d'injection intracérébrale de peptide Aβ. Un des avantages apportés par ce type de modèles est de reproduire rapidement différentes altérations cellulaires et moléculaires induites par le peptide Aβ et de les corréler avec les performances cognitives des animaux. Les Tableaux 6 et 7 regroupent les principaux modèles d'injection intracérébrale du peptide Aβ chez le rat (Tableau 6) et la souris (Tableau 7) développés dans la littérature durant ces 2 dernières décennies. Ces derniers reposent essentiellement sur des expériences d'injections intracérébrales du peptide sous sa forme agrégée.

Les résultats concernant la neurotoxicité *in vivo* du peptide Aβ restent assez controversés. Par exemple, certains auteurs n'ont pas observé d'effet toxique chez les rongeurs (109 ; 209). Ces variations sont essentiellement liées à la quantité injectée, à la séquence du peptide Aβ utilisé et au lieu d'injection. Plusieurs équipes ont procédé à l'injection des fragments du peptide Aβ dans diverses zones du cerveau. Elles regroupent principalement l'hippocampe (189 ; 209 ; 713), le cortex (174 ; 678) et différents noyaux centraux comme le *striatum* (816) ou encore le noyau magnocellulaire (265 ; 266). Les solutions comportant différents type de peptide Aβ ont généralement été administrées sous forme d'injections aiguës, la quantité de peptide variant de 200 pmoles (491) à 10 nmoles (849). D'autres auteurs ont procédé par microdialyse (848), par injections répétées dans le temps (107 ; 473) ou encore par des infusions continues grâce à des mini-pompes osmotiques (374 ; 531 ; 544 ; 559 ; 848). Un aspect important de variabilité dans ces modèles est la zone d'injection ciblée. La voie intra-tissulaire peut être justifiée par le fait qu'apporter le peptide directement au contact de la structure ciblée permet d'optimiser les effets de l'injection. Cependant, plusieurs études montrent que l'injection directe du peptide dans le tissu cérébral induit une forte activation des cellules microgliales qui finissent par éliminer le peptide par phagocytose. Cette clairance serait plus importante que celle induite par l'injection du peptide dans les ventricules cérébraux (199 ; 816). Cette phagocytose a pu être réduite par une co-injection de peptide Aβ et de TGF-β qui inhibe partiellement l'activation de la microglie (200).

Tableau 6 : Modèles d'injection de peptide Aβ chez le

Rat	Peptide Aβ	Site d'injection	Paramètres étudiés	Références
Sprague-Dawley	Aβ(1-40) soluble	cortex	Neurotoxicité Phosphorylation de tau	Kowall ***et al.***, 1991
Sprague-Dawley	Aβ(1-40) agrégé	cortex	Neurotoxicité aigue	Emre ***et al.***, 1992
Sprague-Dawley	Aβ(1-42) agrégé	cortex	Pas de neurotoxicité	Games ***et al.***, 1992
Wistar	Aβ(25-35) agrégé	hippocampe	Pas de neurotoxicité	Stein-Behrens ***et al.***, 1992
Wistar	Aβ(25-35)/(1-42) agrégé	septum	Acétylcholine	Abe ***et al.***, 1994
Wistar	Aβ(1-40) agrégé	i.c.v.	ChAT Apprentissage	Nitta ***et al.***, 1994
Sprague-Dawley	Aβ(1-40) soluble	hippocampe	Apprentissage	Cleary ***et al.***, 1995
Wistar	Aβ(1-42) agrégé	septum	Système cholinergique	Harkany ***et al.***, 1995a
Sprague-Dawley	Aβ(1-42) agrégé	MBN	Système cholinergique	Harkany ***et al.***, 1995b
Wistar	Aβ(1-40) agrégé	i.c.v.	LTP	Cullen ***et al.***, 1996
Kb1- Wistar	Aβ(1-40) agrégé	hippocampe	Système cholinergique et dopaminergique	Itoh ***et al.***, 1996
Sprague-Dawley	Aβ(1-40) soluble	hippocampe	Apprentissage et mémoire	McDonald ***et al.***, 1996
Sprague-Dawley	Aβ(1-40) soluble	i.c.v.	Apprentissage	Sweeney ***et al.***, 1997
Wistar	Aβ(1-40)/(1-42) agrégés	i.c.v.	LTP	Cullen ***et al.***, 1997
Fisher	Aβ(25-35) agrégé	amygdale	Tau, GFAP, ChAT, IL-1β, apprentissage	Sigurdson ***et al.***, 1997
Sprague-Dawley	Aβ(25-35)/(1-42) agrégé	MBN	AchE et nNOS	O'Mahony ***et al.***, 1998
Wistar	Aβ(1-42) agrégé	MBN	Système cholinergique	Abraham ***et al.***, 2000
Kb1- Wistar	Aβ(1-40) agrégé	i.c.v. minipompe	Comportement ChAT	Yamada ***et al.***, 1998
Sprague-Dawley	Aβ(25-35) agrégé	MBN	Comportement ChAT	Harkany ***et al.***, 1998
Sprague-Dawley	Aβ(1-40)/(1-42) agrégés	hippocampe	Neurotoxicité et activation microglie	Miguel-Hidalgo ***et al.***, 1998
Sprague-Dawley	Aβ(1-40) agrégé et soluble	striatum	GFAP, CD11b, iNOS	Weldon ***et al.***, 1998
Sprague-Dawley	Aβ(1-40) agrégé	i.c.v. minipompe	ChAT	Nag ***et al.***, 1999
Wistar	Aβ(1-42) agrégé	MBN	IL-1β, p38MAPK	Giovannini ***et al.***, 2000
Wistar	Aβ(25-35)/(15-35 agrégés	hippocampe	LTP Système glutamatergique	Freir ***et al.***, 2000

<u>Tableau 6 (suite)</u> : Modèles d'injection de peptide Aβ chez le rat

Rat	Peptide Aβ	Site d'injection	Paramètres étudiés	Références
Sprague-Dawley	Aβ(1-40)/(1-42) agrégés	hippocampe	Mémoire et apprentissage	Malin ***et al.***, 2001
Wistar et Sprague-Dawley	Aβ(1-40)/(1-43) solubles	hippocampe	Neurotoxicité, LTP, mémoire et apprentissage	Stephan ***et al.***, 2001
Fisher	Aβ(1-42) agrégé	i.c.v. minipompe	Mémoire et apprentissage, ChAT	Nakamura ***et al.***, 2001
Sprague-Dawley	Aβ(1-42) agrégé et soluble	Intravitréal	Cytotoxicité	Walsh ***et al.***, 2002
Wistar	Aβ(25-35) agrégé	i.c.v.	AChE	Saez-Valero ***et al.***, 2002
Wistar r	Aβ(25-35) agrégé	i.c.v.	Comportement	Stepanichev ***et al.***, 2003
Wistar	Aβ(1-40) agrégé	cortex	Neurotoxicité	Gonzalo-Ruiz ***et al.***, 2003
Sprague-Dawley	Aβ(1-42) agrégé	Corps calleux	Cytotoxicité, gliose	Jantaratnotai ***et al.***, 2003
Wistar	Aβ(1-40) agrégé Aβ(1-40Q22) Aβ(1-40G22)	i.c.v.	comportement	Klyubin ***et al.,*** 2004
Wistar	Aβ(1-42) agrégé	i.c.v.	Clairance	Nakagawa ***et al.***, 2004
Wistar	Aβ(1-40) agrégé	hippocampe	Activités LPO, GPX, IL-1β, IL-6, TNF-α	Rosales-Corral ***et al.***, 2004
Wistar	Aβ(25-35) agrégé	i.c.v.	Comportement, neurotoxicité et stress oxydant	Stepanichev ***et al.***, 2004
Wistar	Aβ(1-42) agrégé	MBN	Protéines oxydées	Boyd-Kimball ***et al.***, 2005
Wistar	Aβ(25-35) agrégé	i.c.v.	Apprentissage	Stepanichev ***et al.***, 2005
Wistar	Aβ(25-35) agrégé	i.c.v.	Apprentissage	Stepanichev ***et al.***, 2006

Tableau 7 : Modèles d'injection de peptide Aβ chez la souris

Souris	Peptide Aβ	Site d'injection	Paramètres étudiés	Références
CD-1, 6 sem	Aβ(1-28)/(12-28), (18-28), (12-20)	i.c.v.	Mémoire	Flood ***et al.***, 1994
CD-1, 6 sem	Aβ(12-28)	Hip, amyg,NC	Mémoire	Flood ***et al.,*** 1994
Swiss male, 6 sem	Aβ(1-28)/(25-35) agrégés	i.c.v.	Effets amnésiques Histologie	Maurice ***et al.***, 1996
Swiss male, 6 sem	Aβ(25-35) agrégé	i.c.v.	Amnésie	Maurice ***et al.***, 1998
C57BL/6J apoE$^{-/-}$	Aβ(1-40) soluble	NC	Transport BHE	Shibata ***et al.***, 2001
ICR	Aβ(1-42)/(25-35) agrégés et solubles	i.c.v.	Dosage IL-6, IL-1β, TNFα	Song ***et al.***, 2001
ICR	Aβ(1-42) agrégé	i.c.v.	Comportement Apoptose Acétylcholine	Yan ***et al.***, 2001
	Aβ(1-42)/(1-40) solubles	i.c.v.	Transport BHE	Ji ***et al.***, 2001
CD36$^{+/+}$ CD36 $^{-/-}$	Aβ(1-42) agrégé	cortex	Immunohisto F4/80 Apoptose	El Khoury ***et al.***, 2003
Swiss male, 6 sem	Aβ(1-42)/25-35) agrégés	i.c.v.	Mémoire de travail Apprentissage	Mazzola ***et al.***, 2003
C57BL/6J	Aβ(1-42) agrégé	i.c.v.	SNAP25/GFAP (CA1, CA3, DG)	Chauhan ***et al.***, 2003
C57BL/6J	Aβ(1-42) + HDL	i.c.v. minipompe	Histologie Immunohisto: GFAP, F4/80 ELISA : IL1β,TNFα, S100b, SY38	Craft ***et al.***, 2004
C57BL/6J 15 mois	Aβ(1-42) agrégé et Aβ(40-1)	i.c.v.	Immunohisto: SOD, GPx, MDA Carbonyles	Jhoo ***et al.***, 2004
ICR	Aβ(1-42) agrégé	i.c.v.	Immunohisto: OX-42, GFAP, eNOS IFNγ	Kim ***et al.***, 2004
ddY	Aβ(25-35) agrégé	i.c.v.	Mémoire, locomotion MAP2 et SYN	Tohda ***et al.***, 2004
Balb/c	Aβ(25-35) agrégé	i.c.v.	Effets amnésiques Expression génique	Kong ***et al.***, 2005
CD-1	Aβ(25-35) agrégé	i.c.v.	Mémoire de travail Marquage ChAT	Yamada ***et al.***, 2005

Les injections intracérébroventriculaires (i.c.v.) s'effectuent dans les ventricules latéraux (VL) ou le troisième ventricule (VIII). Selon Flood *et al.* (1991) (189), l'injection d'un composé dans le troisième ventricule lui permet d'atteindre plus facilement le système limbique comportant l'hippocampe, ce dernier étant situé entre les VL et le VIII (Figure 24). De plus, les injections i.c.v. permettent l'injection de plus grandes quantités de peptide sur des périodes plus longues (jusqu'à 30 jours) *via* l'utilisation des mini-pompes osmotiques ou l'implantation de canules à demeure. Récemment, Yamada *et al.* (2005) (849) ont montré que des injections répétées de peptide Aβ(25-35) fibrillaire (1 injection quotidienne pendant 5 jours) *via* une canule implantée dans le ventricule cérébral, entraînait une altération significative de la mémoire spatiale corrélée à un diminution du nombre de neurones cholinergiques dans les régions paraventriculaires chez la souris.

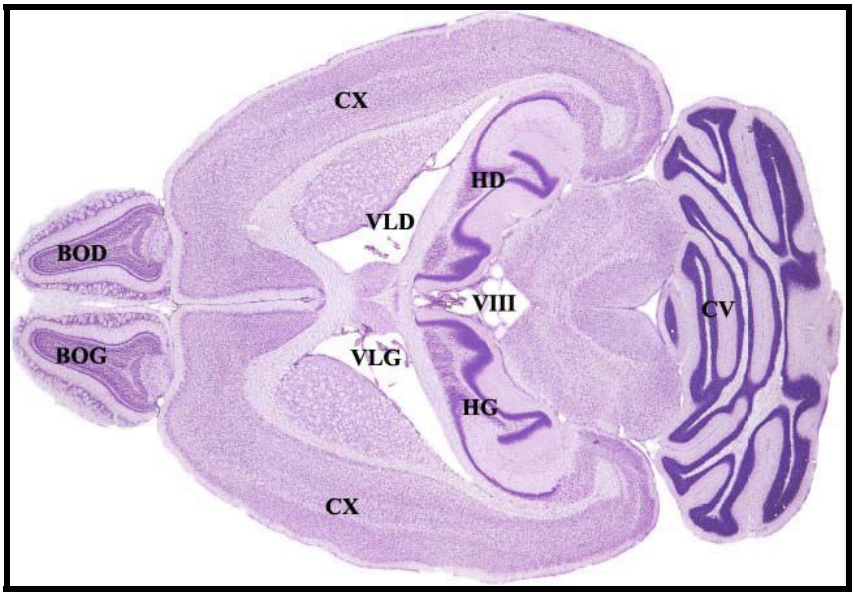


Figure 24 : Coupe horizontale d'un cerveau de souris après coloration à la thionine acétate *Abréviations : CX, cortex, HD ; Hippocampe droit, HD ; HG, Hippocampe gauche ; BOD, Bulbe olfactif droit ; BOG, Bulbe olfactif gauche ; CV, Cervelet ; VIII, troisième ventricule ; VLD, Ventricule latéral droit ; VLG, Ventricule latéral gauche. (selon 573)*

6.3.2. Description des études *in vivo* d'injection de peptide Aβ

Le choix du peptide injecté et de ses caractéristiques physicochimiques est guidé non seulement par la nature des phénomènes ciblés et le stade de la maladie à reproduire, mais aussi par le degré de toxicité, la stabilité et la demi-vie du peptide dans le cerveau. Plusieurs

types de peptide Aβ ont été injectés aussi bien chez le rat que chez la souris (Tableaux 6 & 7). Il s'agit notamment des peptides Aβ(1-40), Aβ(1-42) et Aβ(25-35) sous forme soluble ou agrégée. Les données issues de ces études ont confirmé l'implication de formes diffusibles de peptide Aβ dans des processus rapides de dysfonctionnement synaptique. Elles montrent également que des mécanismes secondaires comme l'inflammation et le stress oxydant induits par les formes fibrillaires jouent un rôle important dans les effets à long terme du peptide Aβ sur les fonctions synaptiques et cellulaires.

6.3.2.1. Expériences d'injection de peptides Aß agrégés

Dans les phases tardives de la MA, on observe de manière caractéristique les plaques amyloïdes présentes dans différentes structures du SNC, plus particulièrement dans le cortex frontal et l'hippocampe. Ces plaques sont essentiellement constituées des peptides Aβ (Aβ(1-40) et Aβ(1-42)) sous forme fibrillée. Une grande part des expériences *in vivo* repose sur des injections intracérébrales de peptide Aβ agrégé.

L'étude du devenir de ce peptide après injection dans le cerveau constitue un facteur important dans la conception de ces modèles. Une étude comparative de l'efflux de peptide Aβ(1-40) *versus* Aβ(1-42) radiomarqués après injection i.c.v. dans le cerveau de souris a été réalisée. Il en ressort que le peptide Aβ(1-40) est rapidement éliminé *via* la BHE (50% d'élimination 5 min après l'injection), alors que le peptide Aβ(1-42) est éliminé plus lentement (344). Les auteurs suggèrent que le peptide Aβ serait éliminé *via* le récepteur membranaire LRP-1 retrouvé en abondance dans les capillaires formant la BHE. Chez le rat, 2-7 jours après l'infusion de peptide Aβ(1-42), on retrouve des agrégats insolubles dans le système ventriculaire dont la plupart sont pris en charge par des cellules phagocytaires et déposés dans les vaisseaux méningés ou encore au niveau des plexus choroïdes (530). Ceci suggère une clairance active de ce peptide hors du système ventriculaire. Il existe également des endopeptidases intracérébrales (insulysine et néprisyline) qui interviennent dans l'élimination du peptide Aβ (751). Les capacités de transfert à travers la BHE diminuent avec l'âge : une réduction de 55 à 65% de la clairance du peptide Aβ(1-40) a été mesurée chez la souris C57BL/6 âgée de 9 mois (676). D'autres auteurs ont montré que l'efflux de peptide Aβ(1-42) se faisait *via* un transport non saturable chez les souris jeunes, alors qu'il disparaît complètement chez les souris âgées (33).

Les effets de l'âge de l'animal sur la toxicité du peptide Aβ fibrillaire ont été mis en évidence chez des souris âgées de 8 et 24 mois par des expériences d'injection i.c.v. de 2.2 nmoles de peptide Aβ(1-42) agrégé. Des mesures par immunohistologie de la densité synaptique (anticorps anti-SNAP25) et de l'activation des astrocytes (anticorps anti-GFAP) dans différentes zones de l'hippocampe ont permis de montrer que la toxicité du peptide Aβ augmente avec l'âge (95). En effet, chez les souris jeunes, l'injection du peptide conduit à une augmentation transitoire de 20 fois de l'immunoréactivité de la GFAP dans la fimbria et de 2 fois dans le neuropile de l'hippocampe une semaine après injection. Les niveaux de base sont retrouvés 8 semaines plus tard. Chez la souris âgée, elle est largement supérieure dans l'hippocampe et reste encore significativement élevée après 8 semaines. De même, la déplétion pré-synaptique de SNAP-25 augmente également avec l'âge, plus particulièrement dans le gyrus dentelé.

Des marquages histologiques au Crésyl Violet et l'application de la technique *TUNEL* sur des coupes de cerveaux de rats 5 jours après une injection intra-hippocampale de 3 nmoles de peptide Aβ(1-40) agrégé, montrent une dégénérescence neuronale apoptotique spécifiquement localisée dans la région du CA1 et le gyrus dentelé de l'hippocampe. Dans cette même étude, le peptide Aβ(1-42) semble moins toxique que le peptide Aβ(1-40) : les pertes neuronales restent limitées autour de la zone d'injection (501). De plus, de petites quantités de peptide Aβ(1-40) agrégé (0,5 à 1 nmole dans 2µl) injectées dans le cortex retrosplenial suffisent également pour induire, 1 à 2 semaines après, une perte neuronale dans différents noyaux centraux, notamment dans le noyau dorsal du Raphé où le nombre de neurones sérotoninergiques diminue de 31,7%. Cette perte est associée à une réduction de la densité neuronale totale de plus de 17% par rapport aux rats témoins (233). Les pertes neuronales concernent les neurones GABAergiques (828), sérotoninergiques, noradrénergiques, dopaminergiques et cholinergiques (2 ; 233 ; 234).

Souvent associée à la mort neuronale, une réaction inflammatoire caractérisée par une activation des cellules microgliales et une augmentation de la réactivité astrocytaire est retrouvée dans les modèles animaux d'injection de peptide Aβ agrégé. Les données chez l'Homme et l'animal indiquent clairement que l'accumulation de microglie dans les sites de dépôts fibrillaires de peptide Aβ contribue à la dégénérescence neuronale associée à la MA (661). Des expériences menées sur des souris n'exprimant pas le gène codant le CD36 (récepteur *scavenger* de la classe B) et soumises à des injections stéréotaxiques de peptide

Aβ(1-42) agrégé, montrent que ce dernier est un médiateur direct du recrutement des cellules microgliales dans l'initiation de la réponse inflammatoire (173). Une étude originale menée par Song *et al*. (2001) (699) montre que l'administration i.c.v. de 205 pmoles de peptide Aβ(1-42) fibrillaire induit 2 h après l'injection un pic de production d'Il-6 plasmatique, bien avant son apparition dans le cerveau en même temps que l'Il-1β (détectée 4 h plus tard) ou encore du TNFα (détecté 24 h après l'injection). Ceci est relié à une activation du système de la norépinéphrine à la fois au niveau périphérique et central par le peptide Aβ(1-42).

Weldon *et al.* (1998) (816) ont montré que, jusqu'à 30 jours après l'injection de peptide Aβ(1-40) agrégé, on peut observer la microglie phagocytant les agrégats, alors que les astrocytes avoisinants forment un « mur virtuel » entre la microglie contenant le peptide Aβ fibrillaire et le neuropile qui l'entoure. Dans cette même étude, l'expression de la iNOS était significativement accrue dans les astrocytes et dans la microglie autour du site d'injection. Cette activation s'accompagne souvent d'une augmentation de la production des interleukines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6 ou encore le TNF-α (624 ; 699) et de l'activité de la COX-2. L'implication de la voie de la p38-MAPK a été mise en évidence chez le rat après injection de peptide Aβ(1-42) fibrillaire. En effet, une co-localisation de phospho-p38MAPK dans la microglie accompagne la réaction inflammatoire habituellement observée (225). Des expériences d'injection i.c.v. de peptide Aβ(25-35) montrent également la présence de microglie activée et une astrocytose dans l'hippocampe de rat (821). La réponse inflammatoire associée au peptide Aβ contribuerait également à une démyélinisation et une atteinte des oligodendrocytes : chez le rat, l'injection de 1 nmole de peptide Aβ(1-42) fibrillaire dans le corps calleux est suffisante pour endommager les axones et induire une activation de la caspase-3 dans les oligodendrocytes (340).

La réaction inflammatoire induite par l'injection de peptides Aβ sous forme agrégée s'accompagne souvent d'un stress oxydant. Par des expériences d'injection intra-hippocampale de peptide Aβ(1-40) chez le rat, Rosales-Corral *et al.* (2004) (624) montrent une corrélation entre la cinétique d'apparition des marqueurs de l'inflammation et celle des marqueurs du stress oxydant : les marqueurs de la peroxydation lipidique (malondialdéhyde et 4-hydroxyalkénal) augmentent significativement 36 h après l'injection pour atteindre un pic à 60 h. Ceci est inversement corrélé à l'activité de la GSH-Px (enzyme de dégradation du H_2O_2). L'injection i.c.v. de 15 nmoles de peptide Aβ(25-35) conduit à une augmentation progressive

du stress oxydant dans l'hippocampe de rat : la production de TBARS est significativement accrue à 3 jours après l'injection et augmente régulièrement jusqu'à 60 jours (712). De plus, il a été montré que le peptide Aβ(1-42) induit l'oxydation des protéines *in vivo* (79 ; 862). Une analyse protéomique de mesure des groupements carbonyles par spectrométrie de masse a permis d'identifier les protéines oxydées dans le cerveau de rat après injection de peptide Aβ(1-42) dans le noyau basal : dans l'hippocampe, la β-synucléine ou encore des protéines enzymatiques comme la pyruvate déshydrogénase ont été identifiées. Des taux élevés de groupements carbonyles ont également été mesurés pour la glutamine synthétase et les tubulines α et β du cortex cérébral, ainsi que la protéine chaperonne HL60 dans le noyau basal (65).

L'ensemble des atteintes neuronales et synaptiques induites par l'injection du peptide Aβ sont corrélées à des altérations du comportement des animaux, se traduisant par une perturbation des capacités mnésiques et du processus de mémorisation. Dès 1997, Delobette *et al.* (1997) (148) ont comparé l'effet des formes monomériques et agrégées du peptide Aβ(25-35) chez le rat : les déficits de mémoire mesurés dans la piscine de Morris 14 jours après l'injection i.c.v. de 15 nmoles de peptide Aβ(25-35) agrégé étaient significativement plus importants qu'en présence du peptide sous forme monomérique. La même équipe a montré des effets similaires chez la souris où l'injection i.c.v. de plus petites quantités de peptide Aβ(25-35) agrégé (3 et 9 nmoles) conduit à une diminution des capacités mnésiques 6 à 13 jours après injection dans les 3 tests effectués : labyrinthe en Y, piscine de Morris et test d'évitement passif (489). Cette même étude a également permis de montrer un effet protecteur dose-dépendant de la tacrine. Plus tard, ces observations ont été confirmées par une série d'études comportementales effectuées par Stepanichev *et al.* (2003) (710), montrant notamment que l'injection i.c.v. de 15 nmoles de peptide Aβ(25-35) agrégé perturbe plutôt la mémoire à court terme que la mémoire à long terme, ceci grâce à des mesures dans le labyrinthe en Y de 17 jusqu'à 180 jours après l'administration du peptide. Un peu plus tard, dans les mêmes conditions expérimentales, mais en utilisant un test comportemental consistant à retrouver des aliments dans un labyrinthe à 8 bras, les auteurs ont montré que le peptide Aβ(25-35) produit une altération plus importante de la mémoire de travail que de la mémoire à long terme (709).

L'effet du peptide Aβ sur la mémoire de travail peut être prolongé jusqu'à 7 semaines après injections bilatérales multiples de peptides Aβ(1-40) et Aβ(1-43) agrégés (respectivement 2.5 et 1.25 nmoles) dans le gyrus dentelé dorsal de rat. Ces perturbations sont accompagnées d'une mort neuronale, de la présence de dépôts amyloïdes dans la zone d'injection et d'une inhibition de la LTP (713). D'une manière générale, l'administration de formes agrégées du peptide Aβ affecte plutôt la mémoire à court terme : plusieurs semaines après l'administration des différents peptides, les rats montrent des altérations dans les tâches relatives à la mémoire de travail, telles que la reconnaissance sociale ou le pourcentage d'alternance dans le labyrinthe à 8 bras. Aucun effet sur la mémoire à long terme n'est détecté dans le test d'évitement passif ou la piscine de Morris (269 ; 683 ; 710). A l'inverse, d'autres études ont montré un effet délétère de peptides Aβ(1-42) et Aβ(25-35) à la fois sur la mémoire à court et à long terme après des injections répétées i.c.v. ou dans l'hippocampe (98 ; 531 ; 847). Ceci serait associé à une augmentation progressive de sérotonine et de norépinéphrine ou à une diminution de l'activité cholinergique, ce qui suggère qu'une administration répétée de peptide Aβ affecte un large éventail de neurotransmetteurs. D'autres auteurs montrent que les atteintes mnésiques deviennent de plus en plus apparentes dans le temps après l'administration de peptide : après avoir injecté du peptide Aβ agrégé dans le cerveau de rat, Giovannelli *et al* (1995) (223) observent des déficiences dans le test de la reconnaissance d'objet 60 jours après, mais pas 30 jours après l'injection. De plus, l'injection i.c.v. de peptide Aβ(25-35) résulte en une diminution progressive du pourcentage d'alternance à partir du 17ème jour et mesurable jusqu'au 180ème jour après l'injection.

Enfin, le profil d'expression de 1176 gènes a récemment été étudié dans le cortex cérébral de souris par la technique des « *microarrays* » dans un modèle d'injection i.c.v. de peptide Aβ(25-35) agrégé (394). L'expression de 19 gènes est augmentée, notamment ceux codant les facteurs de transcription NF-*κ*B ou AP-1/*c-jun*, ainsi que des molécules d'adhésion (intégrine, cadhérine). A l'inverse, l'expression d'autres gènes est réduite comme ceux associés à l'expression de la Na^+/K^+-ATPase : *Na^+/K^+-ATPase 2β2*, *ATBF1* (*AT motif-binding factor1*), ceci étant en accord avec des observations précédentes relatives à une inhibition de l'activité de la Na^+/K^+-ATPase par le peptide Aβ *in vitro* (476). Une diminution de l'expression des gènes codant le NGF (*nerve-growth factor*) et la glucose phosphate isomérase-1, deux facteurs neurotrophiques jouant un rôle important dans la survie des neurones, a également été mise en évidence. L'identification de ces gènes constitue de

nouvelles voies d'investigation des mécanismes moléculaires de la neurotoxicité du peptide Aβ *in vivo*.

6.3.2.2. Modèles d'injections chroniques de peptides Aβ

Le développement de la technique d'infusion continue par l'implantation de mini-pompes osmotiques a permis d'injecter des quantités plus importantes de peptide Aβ sur des périodes plus longues. Parmi les premiers essais effectués chez le rat, Nitta *et al.* (1994) (544) montrent qu'une infusion continue de peptide Aβ(1-40) agrégé durant 14 jours entraîne une accumulation du peptide dans le cortex cérébral et l'hippocampe associée à une diminution significative de l'activité de la choline acétyltransférase, ainsi qu'à une altération des performances des animaux dans le test de la piscine de Morris. Les effets délétères de l'infusion de ce peptide seraient indépendants du vieillissement (526). Selon une étude plus récente, les altérations de la mémoire seraient en partie liées à une perte de l'activation de la PKC (559). De plus, Yamada *et al.* (1999) (847) ont effectué une analyse comportementale plus détaillée de rats soumis à une infusion de 300 pmoles par jour de peptide Aβ(1-42) agrégé pendant 2 semaines. Ils ont montré des altérations de la mémoire dans le test du labyrinthe en Y, dans la piscine de Morris, ainsi que dans celui de l'évitement passif. Le rôle préventif de substances antioxydantes comme l'α-tocophérol ou l'idébénone a été mis en évidence dans cette même étude, malgré l'absence d'une augmentation significative du taux de MDA dans le tissu cérébral des animaux. Plus récemment, cette même équipe s'est penchée sur l'évolution des défenses antioxydantes dans ce même modèle d'étude : l'immunoréactivité de la SOD mitochondriale, de la glutathion *S*-transférase (GST) et la GPx, mais également les taux de glutathion était significativement diminués dans le cortex, ainsi que dans l'hippocampe et le thalamus de ces animaux (374). Une étude similaire a permis de montrer des déficits comportementaux associés à des atteintes cellulaires dans le striatum et l'hippocampe 80 jours après la fin de l'infusion de peptide Aβ(1-42) (531).

6.3.2.3. Expériences d'injection de formes non agrégées de peptide Aβ.

Plusieurs groupes se sont focalisés sur l'étude des effets neurotoxiques *in vivo* de peptides Aβ non agrégés. Il est à noter que l'examen des conditions expérimentales de préparation des peptides solubles nous fait penser que ces expériences ont été réalisées avec

des préparations de peptides Aβ contenant en proportions diverses des monomères, des oligomères solubles de différentes tailles, ainsi que des fibrilles.

Flood *et al.* (1991) (189) sont les pionniers dans ce domaine en montrant que l'injection i.c.v. de différentes formes solubles de peptide Aβ [Aβ(1-28), Aβ(12-28), Aβ(18-28) et Aβ(12-20)] entraîne une amnésie à court terme mise en évidence par le test d'évitement passif. La même année, Kowall *et al.*, (1991) (404) observent 7 jours après injection d'une préparation de peptide Aβ(1-40) "soluble" (12 fmoles ou 3 nmoles) dans le cortex, une mort neuronale dans le CA1 de l'hippocampe. Chez le rat, Cleary *et al.* (1995) (107) montrent que si une injection aiguë de peptide Aβ(1-40) "soluble" dans l'hippocampe de rat n'entraîne pas d'altération de la mémoire, des injections quotidiennes d'une solution de 1 nmoles de peptide Aβ(1-40) pendant 15 jours induit une perturbation de la mémoire de travail mesurée dans un test de discrimination. Cette perturbation n'est significative que 30 jours après le début des injections et est corrélée à la formation de dépôts amyloïdes révélés à la Thioflavine-*S*.

La MA se caractérise par des pertes de mémoire à court terme : toutes les études basées sur l'administration de peptide Aβ juste avant ou après le processus d'apprentissage montrent qu'il n'a pas d'effet à court terme sur le stockage ou la rétention d'informations (189 ; 489 ; 494). En effet, même après plusieurs injections répétées de peptide Aβ(1-40) dans l'hippocampe, les rats ne montrent aucune difficulté dans une épreuve apprise précédemment dans le labyrinthe à 8 bras (494 ; 561). Le peptide Aβ aurait donc une action spécifique sur les processus de consolidation de la mémoire et sur la mémoire de travail, mais n'affecterait pas les capacités de restauration des informations stockées (715). Les effets du peptide Aβ sur la mémoire dépendent de la structure dans laquelle il est injecté : l'administration d'une même dose de peptide Aβ dans le parenchyme est plus efficace dans l'induction de l'amnésie que lorsqu'il est injecté i.c.v. (189). Quoi qu'il en soit, les études montrant une altération immédiate de la mémoire après l'injection du peptide soluble indiquent que les effets du peptide Aβ ne dépendent pas de son état d'agrégation (494 ; 733).

L'équipe de M. Rowan s'est consacrée plus spécifiquement à l'action des formes solubles de peptide Aβ sur le dysfonctionnement et la plasticité synaptique des rongeurs (796). L'injection i.c.v. de concentrations sub-nanomolaires de formes oligomériques de peptide Aβ suffit pour réduire la LTP dans la région de CA1 24 h après l'injection. L'injection de faibles quantités de formes solubles de peptide Aβ(1-40) s'accompagne de dommages cellulaires : une

perte neuronale significative et une gliose apparaissent autour de la zone d'injection après une administration intrahippocampale du peptide (473). Le blocage de la LTP dans le CA1 a également été mesuré en présence de peptide Aβ(25-35) chez le rat (202). Yamada *et al*. (2005) (849) ont administré tous les 2 jours pendant 3 semaines (10 injections au total) de faibles quantités (30 pmoles à 1 nmole) de peptide Aβ(25-35) "soluble" *via* une canule à demeure implantée dans le ventricule latéral gauche de souris. Par rapport aux animaux témoins, une altération significative de la mémoire de travail a été mesurée dans les tests effectués en *Openfield* et dans le labyrinthe en Y. Ces altérations comportementales sont couplées à une réduction du nombre de neurones cholinergiques dans la région paraventriculaire. Plus récemment, il a été proposé que le peptide Aβ soluble induit une diminution de la plasticité synaptique dans les cellules pyramidales en ciblant de manière préférentielle les récepteurs AMPA post-synaptiques (670).

D'autres équipes se sont plutôt penchées sur les conséquences de l'administration de formes solubles de peptide Aβ(1-42) : 4 semaines après l'injection i.c.v. de 410 pmoles de peptide Aβ(1-42) "soluble", Yan *et al.* (2001) (851) observent une altération du comportement des souris dans les 3 tests retrouvés habituellement : l'évitement passif, le labyrinthe en Y et la piscine de Morris. Dès le 5ème jour, ils mettent en évidence une augmentation de l'immunoréactivité de la GFAP et de l'Il-β dans l'hippocampe, ainsi qu'une diminution de 30% du taux d'acétylcholine dans le cortex. Par contre, ce traitement n'induit ni une apoptose, ni une dégénérescence des cellules hippocampales. Les auteurs ont pu montrer l'effet protecteur d'un composé phénolique aux propriétés antioxydantes, l'acide férulique (342). Une activation transitoire de la microglie a également été observée dans l'hippocampe de ces souris : celle-ci apparaît dès 8 h après l'injection pour rejoindre le niveau basal 1 jour plus tard (375).

Afin de maintenir le peptide Aβ(1-42) sous une forme oligomérique soluble lors d'injections chroniques, Craft *et al*., (2004) (124) ont utilisé une préparation conjointe de lipoprotéines de haute densité. Les expériences d'infusion sur une durée de 28 jours ont permis de mettre en évidence que le peptide Aβ(1-42) soluble induit non seulement une mort neuronale, mais aussi une réaction inflammatoire caractérisée par l'activation de la microglie, par une augmentation de la réactivité astrocytaire, par une augmentation de la libération des interleukines pro-inflammatoire (IL-1β et TNFα), par une augmentation de l'expression de la COX-2, ainsi que par une perte synaptique.

Enfin, Walsh *et al.* (2002) (796) ont utilisé des peptides solubles préparés à partir du milieu de culture des cellules CHO surexprimant la protéine APP_{695}. Ces milieux conditionnés contiennent des fragments monomériques et oligomériques de peptide Aβ et se caractérisent par l'absence d'agrégat insoluble. L'injection i.c.v. de ces préparations dans le ventricule latéral de rat inhibe la LTP dans l'hippocampe. De plus, elle induit rapidement (à J0), mais de manière transitoire, une baisse des capacités d'apprentissage des animaux en absence de mort neuronale détectable (108). La séparation par chromatographie d'exclusion de 2 fractions, l'une contenant des oligomères et l'autre des monomères, a permis de montrer que seuls les oligomères de peptide Aβ étaient responsables des troubles du comportement.

6.3.2.4. Les modèles combinant la transgénèse et l'injection

Plusieurs équipes ont procédé à l'injection de peptide Aβ chez des souris transgéniques. Ji *et al.* (2001) (344) se sont intéressées à la clairance et au dépôt des peptides Aβ(1-40) ou Aβ(1-42) injecté en i.c.v. chez des souris $APOE^{-/-}$ et des souris transgéniques pour l'apoE3 et l'apoE4. Dans cette étude, les auteurs ont montré que le peptide Aβ(1-40) est rapidement éliminé *via* la BHE et que le peptide Aβ(1-42) l'est moins. Ils ont montré aussi que l'apoE n'intervient pas dans l'élimination du peptide Aβ *via* la BHE, mais que cette apolipoprotéine intervient dans l'accélération du processus de dépôt amyloïde dans les tissus nerveux des souris injectées.

La S100-B est protéine produite par les astrocytes. Elle serait impliquée dans la réaction inflammatoire en activant les cellules microgliales lorsqu'elle est produite en grandes quantités. La production de cette protéine est augmentée dans les régions du cerveau les plus affectées au cour du développement de la MA, essentiellement l'hippocampe (452). L'équipe de Craft (125) a montré que l'infusion de peptide Aβ(1-42) oligomérique durant 28 jours chez des souris surexprimant la S100-B induit une activation microgliale, une perte synaptique et des dommages neuronaux en l'absence de dépôts amyloïdes.

6.3.3. Approches pharmacologiques de prévention de la toxicité du peptide Aβ dans les modèles d'injection intracérébrale.

Les inhibiteurs de l'AChE constituent actuellement les médicaments les plus

largement prescrits dans le traitement symptomatique de la MA (193 ; 451 ; 509 ; 740). Compte tenu de "l'hypothèse du déficit cholinergique" proposée par Perry en 1986 (579), l'amélioration des troubles cognitifs sous l'effet de ces molécules a largement été décrite dans des modèles d'injection intracérébrale de peptide Aβ, le groupe de Giacobini étant parmi les premiers investigateurs (128 ; 217 ; 219). Face aux effets secondaires limitant l'utilisation des inhibiteurs de l'AChE (hépatotoxicité, effets sur les systèmes cholinergiques périphériques), d'autres molécules sont actuellement développées et testées chez l'animal (771). Il est intéressant de noter que de nouvelles stratégies thérapeutiques sont à l'étude. Nous nous limiterons ici à l'apport des modèles *in vivo* d'injection intracérébrale du peptide Aβ dans la mise en évidence de l'effet bénéfique de molécules impliquées dans d'autres voies métaboliques.

6.3.3.1. Récepteurs NMDA et récepteurs sigma pour cibles thérapeutiques

Blocage de l'entrée de calcium intracellulaire : rôle des récepteurs NMDA

Il a été démontré *in vitro* et *in vivo*, que le peptide Aβ entraîne une augmentation de l'influx du calcium dans les neurones, perturbant ainsi différentes fonctions vitales des neurones (485 ; 729). Les récepteurs NMDA seraient les principaux médiateurs de ces effets. Ainsi, l'activation des récepteurs NMDA par l'utilisation d'agonistes ou par diminution du taux de Mg^{2+} (les ions Mg^{2+} ont un rôle physiologique régulateur évitant un passage continu des ions Ca^{2+} dans le canal) entraîne des déficits de la plasticité synaptique chez l'animal se traduisant par des déficiences dans le test de l'évitement passif et une altération de la LTP dans la région CA1 de l'hippocampe. Des études antérieures ont montré que l'administration de l'antagoniste du récepteur NMDA (MK-801) ou de l'ifenprodil, un ligand du site extracellulaire, réduit la toxicité du peptide Aβ *in vivo* (267 ; 268 ; 269 ; 489 ; 513 ; 562). Une autre stratégie consiste à cibler les canaux calciques voltage-dépendants : l'utilisation d'un antagoniste comme la nimodipine a permis à Luiten *et al.* (1994) (463) de réduire la dégénérescence des neurones cholinergiques dans les noyaux magnocellulaires du cerveau de rat. La mémantine, utilisée actuellement dans le traitement de la MA (134), est un antagoniste du récepteur NMDA (398). Chez le rat ayant subi une injection de peptide Aβ(1-40) dans l'hippocampe, la plasticité synaptique peut être restaurée par l'administration de doses thérapeutiques de mémantine (500).

Le syndrome dépressif associé

La dépression appartient aux signes avant coureurs de la MA et souvent, elle est diagnostiquée et traitée avant même que celui de la MA ne soit établi. Urani *et al.* (2002 & 2004) (776 ; 777) ont montré, dans un test de nage forcée, un effet antidépresseur de différents agonistes du récepteur σ1 (igmésine, PRE-084, SKF-10 047) chez des souris ayant subi une injection i.c.v. de peptide Aβ(25-35) ou Aβ(1-40). Des travaux antérieurs avaient déjà montré que ces agonistes étaient capables d'inhiber les déficits de la mémoire à long terme engendrés par l'administration i.c.v. de peptide Aβ(25-35) (490). Plus récemment, un effet synergique de la mémantine et d'agonistes des récepteurs σ1 a été rapporté chez le rat (687).

6.3.3.2. Molécules anti-inflammatoires et antioxydantes

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent la classe médicamenteuse la plus étudiée dans les modèles *in vivo*. Chez l'Homme, il est à présent établi qu'un traitement par les AINS réduit le risque de développer la MA, ralentit la progression de la maladie et réduit l'activation de la microglie (419). Cependant, les bases moléculaires de leur mode d'action restent mal définies. Un traitement par la néfiracétame, l'ibuprofène ou l'indométhacine restaure les capacités d'apprentissage et de mémoire de travail de rats soumis à une injection de peptide Aβ et prévient les atteintes de la plasticité synaptique (614 ; 714 ; 847). Dans ces études, les effets bénéfiques ne sont pas associés à une clairance des agrégats hors de l'hippocampe, mais à une réduction de la microglie et de la réactivité des astrocytes. Les AINS protègent des déficits comportementaux en inhibant la COX-2 qui catalyse l'oxydation de l'acide arachidonique en prostaglandine G. Ils auraient également un effet régulateur sur l'activité de la γ-sécrétase en réduisant la production de peptide Aβ(1-42) et en favorisant celle de la forme moins toxique Aβ(1-38) (812). L'énantiomère *R*-flurbipprofène est actuellement en phase III des essais cliniques menés chez l'Homme (156). Enfin, les cytokines pro-inflammatoires activent la β-sécrétase et les AINS pourraient inhiber cet effet *via* le récepteur PPAR-γ : un effet anti-inflammatoire des agonistes de ce récepteur (rosiglitazone) a été montré (290).

Toujours en relation avec le développement de l'inflammation dans le cerveau de patients atteints de MA, Ryu *et al*. (2004) (634) montrent que l'injection intrapéritonéale d'un

composé tétracyclique, la minocycline, réduit significativement la perte neuronale et le nombre de cellules microgliales chez le rat, après une injection intrahippocampale de peptide Aβ(1-42). La minocycline est par ailleur connue pour inhiber la formation de microglie en réponse à un accident vasculaire cérébral (865) ou dans la maladie de Parkinson (837).

6.3.3.3. Molécules antioxydantes

La production des ERO est l'un des évènements caractérisant les cascades biochimiques induites par le peptide Aβ. En effet, dans les cerveaux de patients atteints de MA, on retrouve des lésions caractéristiques de l'attaque radicalaire : produits de peroxydation lipidique (MDA, 4-HNE), protéines oxydées (groupements carbonyles), lésions de l'ADN, produits de glycation avancée. De plus, on y retrouve des métaux ayant une activité catalytique productrice de ERO (fer, cuivre, zinc et aluminium). L'utilisation des molécules anti-oxydantes permettrait de ralentir l'évolution de la pathologie (37 ; 477 ; 523). Plusieurs piégeurs de radicaux libres ont donné des résultats prometteurs chez l'Homme (vitamine E, sélégéline, *Ginkgo biloba*), y compris les AINS et les oestrogènes (40 ; 237) ayant également un effet antioxydant (102).

Des extraits végétaux ont également été testés pour leur effet inhibiteur des pertes de mémoire induites par l'injection de peptide Aβ dans le cerveau de rongeurs. L'effet protecteur de ces extraits est lié à la fois à leur propriété antioxydante et anti-inflammatoire. Dans leur modèle d'injection i.c.v. de peptide Aβ(1-42) chez la souris décrit plus haut, Yan *et al*. (2001) (851) décrivent l'effet protecteur d'un composé phénolique retrouvé dans l'extrait de nombreuses plantes, l'acide férulique. Non seulement il améliore les scores des animaux dans les tests comportementaux, mais son administration a également un effet protecteur vis-à-vis des paramètres chimiques comme le taux d'acétylcholine ou l'activation de la microglie (375). Les altérations de la mémoire dans le test de l'évitement passif apparaissant 48 h après l'injection i.c.v. de peptide Aβ(1-42) dans le cerveau de souris ont pu être réduites par une administration orale d'un extrait de *Angelica gigas* (852). Selon les auteurs, l'action protectrice serait également liée à un effet inhibiteur de l'activité acétylcholinestérase, en dehors de ses propriétés antioxydantes. Les saponines, constituants principaux du Ginseng, réduisent significativement les pertes synaptiques et les déficits mnésiques mesurés chez les souris ayant subi une injection i.c.v. de peptide Aβ(25-35) (766). D'autres composés comme l'α-tocophérol (342 ; 493), la mélatonine (671) ou encore la *S*-Allylcysteine (576) montrent

également un effet protecteur. Enfin, l'extrait EGb761 de *Ginkgo biloba* a fait l'objet de plusieurs études montrant son effet protecteur de la toxicité de Aβ *in vitro* lors de travaux antérieurs reliés à l'oxydation de l'apoE (433), sur des neurones hippocampaux en culture, ainsi que *in vivo* dans les neurones cholinergiques de cerveaux de rats ayant subi une infusion de peptide Aβ(1-40) (748). Cet extrait a déjà fait l'objet d'investigations cliniques en Allemagne et aux Etats-Unis (102). Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent son effet bénéfique commencent à être décrits, notamment son implication dans la régulation de l'α-sécrétase (112).

6.3.3.4. Le peptide Aβ pour cible thérapeutique

La formation des dépôts diffus dans différentes régions des cerveaux des animaux est observée après injection de peptide Aβ sans atteindre le stade de dépôts amyloïdes denses (544). En se basant sur ces observations, l'équipe de Chaçon a testé un « peptide inhibiteur des feuillets β » (***β-sheet breaker peptide***) qui est un peptide homologue de la zone centrale de Aβ et qui en se liant à ce dernier, empêche la fibrillation (93). Ce peptide a été testé par une injection intraveineuse répétée sur des rats qui ont reçu une injection bilatérale de peptide Aβ(1-42) agrégé dans l'hippocampe et a permis de réduire les dépôts amyloïdes et d'améliorer les capacités cognitives. Des composés interférant avec l'agrégation du peptide Aβ font actuellement l'objet d'essais cliniques chez l'Homme (565)

Des ***protéases*** dégradant le peptide Aβ ont été étudiées *in vitro* et *in vivo*. La néprysiline est une métalloprotéase à zinc ayant un nombre important de substrats (glucagon, peptide natriurétique, substance P) et ses propriétés de dégradation du peptide Aβ ont été mises en évidence *in vivo* après son injection dans l'hippocampe de rat (479). La néprysiline est régulée par de nombreux facteurs, notamment le vieillissement et le taux de stomatostatine, dont le taux est réduit dans le cerveau de MA.

6.4. Lésions cérébrales liées au vieillissement chez les primates

La modélisation de la MA à l'aide d'espèces murines nécessite le recours à des techniques de transgénèse ou d'apport exogène de peptide Aβ. Bien que difficile d'accès, certaines espèces de primates non-humains constituent des modèles intéressants pour l'étude

de la MA. En effet, plusieurs aspects de cette pathologie neurodégénérative liée au vieillissement sont retrouvés: les homologies des séquences de différentes protéines impliquées dans la MA comme l'APP (591) et l'apoE (212 ; 510), la reproduction spontanée des différents aspects pathologiques caractéristiques de la maladie comme les plaques amyloïdes, l'angiopathie amyloïde, une perte neuronale et des perturbations comportementales et cognitives qui augmentent avec l'âge, une distribution région-spécifique des atteintes amyloïdes similaire à celle observée chez les patients atteints de MA.

Au cours du vieillissement, les primates non humains accumulent spontanément du peptide Aβ dans différentes structures de leur cerveau. Chez certaines espèces de primates non-humains, le peptide Aβ s'accumule sous forme de dépôts diffus et de plaques amyloïdes entourées de neurites dystrophiques, ainsi que d'astrocytes et de cellules microgliales réactives, cela en l'absence de DNF (213 ; 214 ; 218 ; 414 ; 641). Il a également été observé une angiopathie amyloïde dans les vaisseaux sanguins leptoméningés, ainsi que dans ceux du cortex cérébral (214 ; 664). Chez le Macaque *rhesus* et les singes Orang-outan, les plaques amyloïdes sont nombreuses (214 ; 641), tandis que chez les chimpanzés (213) il a été détecté essentiellement une angiopathie amyloïde. Les dépôts amyloïdes apparaissent initialement dans différentes aires corticales, comme le cortex temporal et cingulé, puis atteignent en fonction de l'âge les structures limbiques. Les structures paralimbiques comme l'hypothalamus ne sont que faiblement atteintes (218 ; 641 ; 688). Cette accumulation intracérébrale spontanée de peptide Aβ peut être en partie expliquée par l'existence d'une similitude entre la séquence de l'apoE chez le singe (une seule isoforme) et l'isoforme E4 de l'apoE chez l'Homme. En effet, l'apoE chez le singe présente comme l'apoE4 un acide aminé Arg en position 112 et 158 à la place de l'acide aminé Cys dans le cas de l'isoforme E2 (89 ; 211 ; 510), ce qui entraînerait une faible capacité d'élimination du peptide Aβ à travers la BHE et une augmentation de sa fibrillation (8 ; 89 ; 413). D'autre part, des analyses biochimiques et immunohistologiques faites sur des prélèvements de cerveaux de singes Cynomolgus à différents âges (du stade embryonnaire (87 jours) jusqu'à 32 ans) montrent que l'expression de la PS1 et la production de ses produits de clivage (fragments Ct et Nt) augmentent avec l'âge à partir de 21 ans (381). Cette augmentation est localisée dans les fractions nucléaires et synaptosomales des neurones et est corrélée à une perte des mitochondries. Dans cette étude, les auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle le nombre des mitochondries dans les neurones diminue avec l'âge chez cette espèce de primates non-humains. Cette baisse entraîne une réduction de la production d'énergie dans les neurones et une diminution de l'activité du protéasome.

L'augmentation de la quantité de PS-1 favoriserait l'activité de la γ-secrétase et donc la production de peptide Aβ (3). D'autre part, des analyses biochimiques faites sur des prélèvements de cerveaux de singes *rhesus* jeunes (4 à 12 ans) et âgés (20 à 30 ans) montrent une augmentation de l'activité enzymatique de la β-secrétase dans le cortex frontal et temporal en l'absence de changement du niveau d'expression de cette enzyme (203).

Chez les patients atteints de MA, le rapport Aβ40/Aβ42 dans les plaques amyloïdes est de 0,3 (213 ; 333). Ce rapport s'élève à 2 chez les primates non-humains (213 ; 214 ; 641), mais pas chez les singes Vervet des Caraïbes où le peptide Aβ1-42 prédomine (414). Les mécanismes moléculaires responsables de l'accumulation préférentielle de peptide Aβ(1-40) dans les dépôts amyloïdes chez les primates non-humains sont encore mal connus. Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle l'apoE pourrait favoriser le dépôt de peptide Aβ(1-40) au dépend du peptide Aβ(1-42) ou encore augmenter l'activité d'une carboxypeptidase qui métaboliserait le peptide Aβ(1-42) en peptide Aβ(1-40) a été proposée par Gearing *et al*. (1996) (213). Plusieurs analyses immunohistologiques montrent qu'en plus du peptide Aβ, les plaques amyloïdes chez différentes espèces de primates non-humains contiennent différentes protéines et enzymes, dont l'acétylcholine estérase (AChE), la butyrylcholine estérase (BChE), l'apoE, le protéoglycane héparine sulfate (HSPG) et l'α1-antichymotrypsine (α1-ACT) (214 ; 218 ; 641).

En 1997, Sloane *et al*. (688) ont montré à l'aide d'une série de tests comportementaux et des analyses immunohistologiques qu'il n'existe pas de corrélation entre le nombre de plaques amyloïdes et les perturbations cognitives chez les singes *rhesus* de différents âges (5 à 30 ans). Ces observations ont été confirmées aussi bien chez les souris transgéniques Tg2576 (314 ; 391 ; 392), que chez les patients atteints de MA où les perturbations cognitives sont mieux corrélées avec le *pool* de peptide Aβ soluble qu'avec celui de peptide Aβ agrégé (430 ; 499).

Les noyaux cholinergiques tels que le NBM et l'amygdale sont impliqués dans le processus mnésique en permettant l'acquisition et l'encodage des informations avant leur stockage sous forme de mémoire à long terme (647 ; 813). Des tests comportementaux couplés à des analyses immunohistologiques réalisés chez des singes *rhesus* jeunes (moyenne d'âge de 11 ans) et adultes (moyenne d'âge de 25 ans), montrent que les perturbations comportementales et les atteintes de la mémoire de travail augmentent avec l'âge et sont associées à une perte de neurones corticaux et subcorticaux cholinergiques, ainsi qu'à une

réduction des terminaisons axonales cholinergiques (692). De plus, les atteintes cognitives ont pu être reproduites chez de nombreuses espèces de primates non-humains tels que les singes marmoset et les macaques *rhesus* par l'utilisation de toxines cholinergiques comme la scopolamine (258 ; 525 ; 702) ou l'acide ibotenique (18 ; 41). Afin de cibler spécifiquement le système cholinergique, une toxine ribosomale (saporine) a été couplée à un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de la neurotrophine (anti-p75NTR). L'administration de cette immunotoxine dans les cerveaux de singes adultes (marmoset ou *rhesus*) a permis de reproduire des perturbations de l'apprentissage et de la mémoire de travail (162 ; 615 ; 616).

HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Une analyse des travaux les plus récents concernant la physiopathologie de la MA permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle cette pathologie neurodégénérative implique des dysfonctionnements synaptiques hippocampiques liés à des altérations membranaires (160 ; 486 ; 629 ; 630 ; 663).

La caractérisation des altérations subtiles impliquées dans les dysfonctionnements synaptiques, responsables des atteintes précoces de la MA, représente l'un des enjeux majeurs pour la compréhension des mécanismes moléculaires associés aux pathologies neurodégénératives, en particulier la MA. La mise en évidence de l'implication précoce des oligomères solubles de peptide Aβ dans les atteintes cellulaires et tissulaires, l'étude de leur neurotoxicité, ont contribué en partie à reconsidérer la physiopathologie de la MA et les approches thérapeutiques possibles (160 ; 411 ; 660 ; 735). Cette hypothèse, dont la réalité physiopathologique est désormais reconnue par de nombreux groupes de recherche, permet de proposer une alternative à l'hypothèse de la cascade amyloïde (160 ; 797 ; 475).

Le projet de l'équipe de Thierry Pillot repose sur l'hypothèse générale selon laquelle les phases précoces et pré-cliniques de la MA sont inhérentes à des dysfonctionnements des synapses cholinergiques hippocampiques, impliquant des perturbations du métabolisme lipidique (Figure 25). Le ciblage et une perturbation fonctionnelle des synapses hippocampiques par les oligomères solubles de peptide Aβ pourraient représenter une explication moléculaire des premiers symptômes cliniques de la MA (231 ; 393 ; 587 ; 704). Ces perturbations auraient des conséquences sur la structure et l'activité des membranes synaptiques, et donc sur leur sensibilité à différents types de stress cellulaire (411).

L'ensemble de ces résultats montre clairement que la signalisation cellulaire proapoptotique induite par le peptide Aβ soluble implique une voie mettant en jeu des médiateurs lipidiques (acide arachidonique, céramides) (185 ; 472 ; 407 ; 704 ; 706). De plus, il apparaît que le statut lipidique des membranes module la sensibilité des neurones vis-à-vis des différents types de stress induits par ces oligomères. Nous avons ainsi pu montrer que

l'enrichissement des membranes neuronales en acide docosahexaénoïque (acide gras polyinsaturé à longue chaîne de type ω3) protège de façon très efficace des neurones en culture primaire de l'apoptose induite par le peptide Aβ soluble (190).

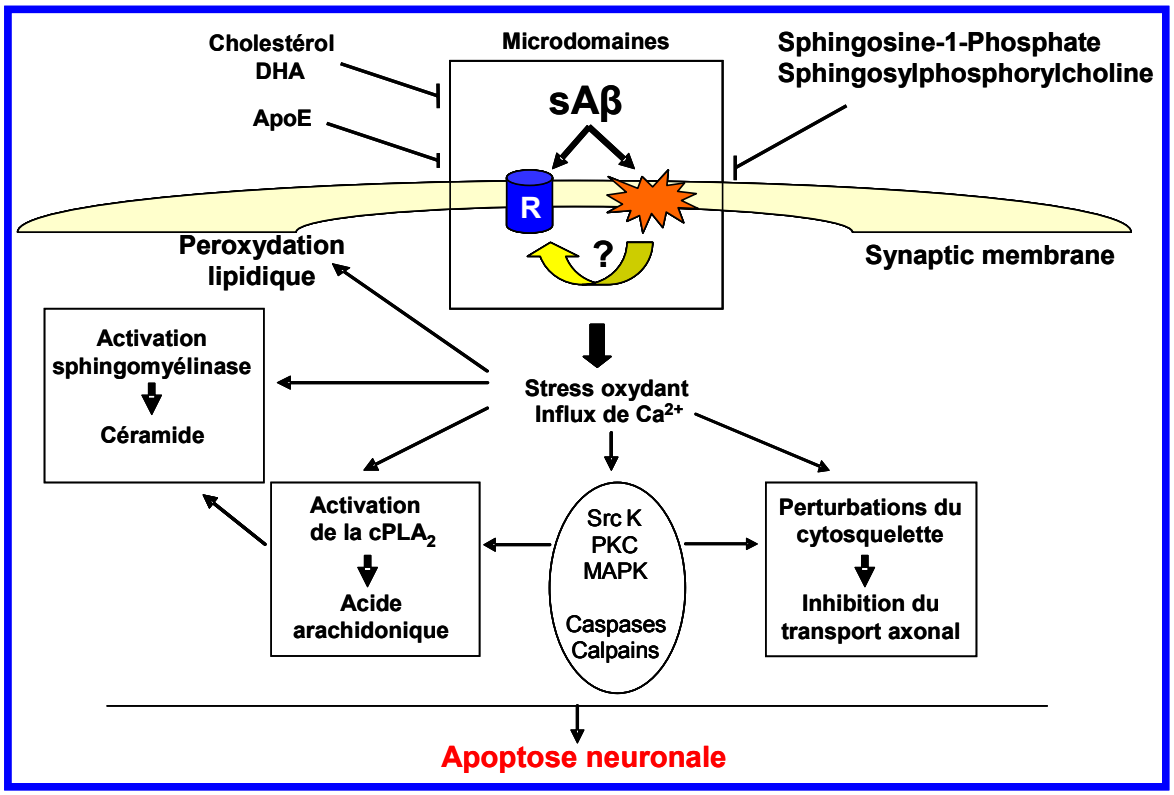


Figure 25 : Plateforme de signalisation cellulaire de mort neuronale apoptotique induite par les oligomères solubles de peptide Aβ (sAβ) et facteurs neuroprotecteurs identifiés

Ainsi, nous nous basons sur les éléments de réflexion suivants : **(1)** Le peptide Aβ soluble joue un rôle clé dans les phases précoces de la MA. Par ses propriétés spécifiques d'interaction avec les membranes, le peptide Aβ soluble modifierait la structure et le fonctionnement des synapses. **(2)** Ces modifications des membranes synaptiques seraient localisées en particulier dans des microdomaines riches en cholestérol et sphingolipides (rafts et/ou cavéoles) et auraient pour conséquence une modification de la signalisation cellulaire dépendante de ces microdomaines. **(3)** Le peptide Aβ soluble provoquerait donc la transduction d'un signal neurodégénératif *via* les rafts, conduisant à des modifications précoces du cytosquelette neuronal, à une perturbation des transports antérograde et rétrograde (essentiels à la survie du neurone), et aboutirait à une mort par apoptose. **(4)** La neurodégénérescence et la mort cellulaire induites par le peptide Aβ soluble impliqueraient des

voies de transduction mettant en jeu les phospholipides et seraient modulées par le statut lipidique des membranes neuronales. **(5)** L'activation de la $cPLA_2$ serait un des événements les plus précoces de cette cascade et conditionnerait l'induction ultérieure de plusieurs voies menant à l'apoptose neuronale. **(6)** Une observation importante concerne l'hétérogénéité moléculaire des peptides Aβ présents dans les cerveaux de patients atteints de MA (735). Bien que les déterminismes moléculaires de cette hétérogénéité restent inconnus, différentes espèces moléculaires correspondant à des peptides Aβ tronqués dans leurs parties amino- et carboxy-terminales sont détectées précocement dans les cerveaux Alzheimer (409). Ces espèces, en particulier les peptides Aβ tronqués dans leur domaine amino-terminal pourraient être des acteurs moléculaires essentiels au développement de la MA.

OBJECTIFS

Compte tenu de ces observations et de ces hypothèses, mon travail de thèse s'est inscrit directement dans le projet de l'équipe de Thierry Pillot. **Mon objectif principal a été de renforcer nos connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la neurotoxicité des oligomères solubles de peptides Aβ.** Les travaux de notre équipe ont permis de caractériser *in vitro* une partie de la plateforme de signalisation cellulaire conduisant à l'apoptose neuronale induite par le peptide Aβ soluble, ainsi que de mettre en évidence plusieurs facteurs capables de moduler cette toxicité (Figure 25). **Afin de valider de façon fonctionnelle ces mécanismes et les cibles cellulaires associées, il était nécessaire de disposer au laboratoire d'un modèle *in vivo* de toxicité des oligomères solubles de peptide Aβ.** Cet aspect a représenté la première partie de mon travail.

Par la suite, mes objectifs spécifiques ont été :

1 – Etudier et évaluer *in vitro* et *in vivo* l'importance de formes oligomériques de peptides Aβ tronqués dans leur domaine amino-terminal et de les comparer aux peptides Aβ(1-40) et Aβ(1-42),

2 – Démontrer et étudier les effets neuroprotecteurs *in vitro* et *in vivo* d'un peptide endogène, l'humanine, sur la toxicité du peptide Aβ soluble,

PROCEDURES EXPERIMENTALES

PROCEDURES EXPERIMENTALES

1. Les animaux

Les expérimentations *in vivo* ont été effectuées sur des souris de souche C57BL/6J provenant du centre d'élevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Les animaux sont maintenus dans une animalerie à une température ambiante de 22-23°C, un cycle lumière/obscurité de 12 h, avec un libre accès à la nourriture et à l'eau de boisson. Les manipulations des animaux sont effectuées selon les recommandations du Comité National de Réflexion d'Ethique sur l'Expérimentation Animale (Autorisations : Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, agrément # 3925 CA-II ; Direction Départementale des Services Vétérinaires de Meurthe-et-Moselle, agrément # DDSV/54/04/ENV/065).

2. Préparation des peptides

Les peptides Aβ(1-40), Aβ(1-42), et Aβ(42-1) (Bachem, France) sont préparés selon la méthode décrite par Pillot *et al.* (1996 & 1999). Les peptides sont solubilisés dans l'hexafluoro-2-propanol (Sigma Chemicals, France) à une concentration de 5 mg/mL. Au moment de l'utilisation, des aliquots de la solution stock sont rapidement évaporés sous azote et solubilisés à la concentration voulue dans le milieu de culture (pour les essais *in vitro*) ou dans NaCl 0,9% (pour les injections *in vivo*) et immédiatement congelés en fractions aliquotes à –20°C afin d'éviter leur agrégation (Figure 26). La présence des oligomères de peptide Aβ est détectée par SDS-PAGE et immunoblot : les préparations contiennent des monomères, trimères et tétramères (131 ; 472 ; 587 ; 589).

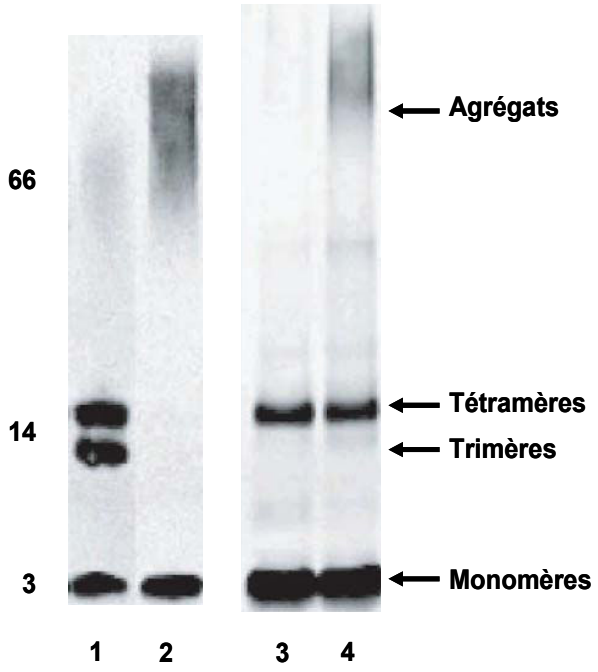


Figure 26 : Immunoblot montrant les préparations de peptides oligomériques (lignes 1 et 3) et fibrillaires (lignes 2 et 4) de peptides Aβ(1-40) (lignes 1 et 2) et Aβ(1-42) (lignes 3 et 4).

3. Modèles cellulaires : cultures primaires de neurones corticaux

3.1. 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 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 35°C en atmosphère humide saturée en eau et avec 6% CO_2. 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 (863).

La composition des milieux de culture est présentée dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Composition des différents milieux de culture primaire des neurones

Milieux	Composition		Fournisseurs
Milieu de base (pH 7,4)	DMEM (***Dulbecco-modified Eagle's medium***, 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
	Sélénium	30 µM	Sigma
Milieu de croissance (pH 7,4)	Milieu complet +		
	Ovalbumine	20 µM	Sigma

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 17ème 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 (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 sont ensemencées à une densité cellulaire de 0,3 x 10^6 par puits de 1.9 cm^2 de surface (plaques de 4 ou 24 puits), 1,5 x 10^6 par puits de 9,5 cm^2 de surface (plaques de 6 puits) et 15 x 10^6 par boîtes de Pétri de 55 cm^2 de surface. Après 3 jours, plus de 95% des cellules adhérentes sont de type neuronal.

3.2. Traitements par le peptide Aβ soluble

Les traitements par les peptides Aβ sont réalisés 6 jours après la mise en culture des neurones. 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 Aβ soluble lui est substitué. Habituellement, la toxicité cellulaire du peptide est évaluée après 24 h à 48 h de traitement, mais des temps plus courts, précisés dans la partie Résultats, ont parfois été utilisés.

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 Aβ.

3.4. Traitements par les inhibiteurs

Afin de mieux appréhender les mécanismes de toxicité du peptide Aβ, différents inhibiteurs pharmacologiques ont été employés. Les traitements par les inhibiteurs sont réalisés 2 h avant et pendant l'exposition au peptide Aβ. Leurs conditions respectives d'utilisation sont détaillées dans la partie Résultats.

4. Etude de la viabilité cellulaire et des marqueurs d'apoptose

4.1. Test de cytotoxicité

Principe

Les sels de tétrazolium sont des composés organiques hétérocycliques qui forment, après réduction, des formazans insolubles et colorés dans les cellules métaboliquement actives. Ces composés sont utilisés comme indicateurs de viabilité et des systèmes rédox (11). Le bromure de 3-(4,5-diméthyyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) est un sel monotétrazolium couramment utilisé pour mesurer la prolifération cellulaire et la cytotoxicité (516). Dans les cellules vivantes, le sel de tétrazolium est converti dans les mitochondries intactes en formazan qui, sous l'action de deshydrogénases génératrices de NADH, forme un précipité violet pouvant être détecté par spectrophotométrie après solubilisation (255). Cette conversion cellulaire est directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

Protocole

Les neurones sont incubés pendant une heure dans l'incubateur (IGO150, JOUAN) à 35°C en présence de MTT 12 mM (Sigma, France), puis lysés par l'ajout d'une solution de dimethyl sulfoxyde (DMSO, Prolabo), à raison de 150 µl/puits. Les cristaux de formazan sont dissous par 10 min d'agitation vigoureuse sur un agitateur de plaques (Heidorph, Allemagne). Des prélèvements de 100 µl par puits sont transférés dans les puits d'une micro-plaque de 96 puits (Nunc, USA) et l'absorbance est mesurée à 570 nm dans un lecteur de microplaques

(Fluostar Galaxy, BMG-Labtechnologies, France). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux valeurs obtenues à partir de neurones témoins.

4.2. Mesure de la viabilité neuronale par la calcéine

Principe

Les cellules vivantes peuvent être distinguées grâce à la présence de l'activité d'estérases ubiquitaires qui assurent la conversion enzymatique de la calcéine acétoxyméthyle (AM) non fluorescente en calcéine intensément fluorescente. La calcéine est un colorant polyanionique retenu à l'intérieur de la cellule vivante, produisant une fluorescence verte intense.

Protocole

Préparation des solutions :

- Solution de calcéine AM : Calcéine AM (Sigma, France) 2 µM dans PBS 1X
- Solution de Triton X-100 : Triton X-100 1% (v/v) dans H_2O ultrapure

Le milieu de culture est éliminé par aspiration puis les cellules sont rincées dans la solution de PBS 1X puis incubées en présence de la solution de calcéine AM pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont alors décollées du fond des puits et lysées dans la solution de Triton X-100 pendant 15 min sous agitation. Des prélèvements de 100 µl par puits sont transférés dans une microplaque noire de 96 puits à fond clair (Nunc, USA). La fluorescence est lue sur le lecteur de microplaques (Fluostar Galaxy, BMG-Labtechnologies, France) à $\lambda_{ém}$ = 530 nm et λ_{ex} = 485 nm.

4.3. Marquage nucléaire au DAPI : détection des corps apoptotiques

Principe

La morphologie nucléaire et la structure de la chromatine sont fortement affectées au cours de la mort cellulaire programmée. L'état du noyau et la structure de la chromatine peuvent être visualisés par l'incorporation d'un fluorochrome, le 4,6-diamidino-2-

phenylindole (DAPI, Sigma Chemicals) qui se fixe sur les séquences nucléotidiques composées d'une succession de bases A-T.

Protocole

Les neurones sont mis en culture sur des lamelles de verre préalablement déposées au fond des puits des plaques de culture. Le milieu de culture est retiré par aspiration et les cellules sont rincées 3 fois dans la solution de PBS 1X, puis fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (PAF) à 4%. Après 3 rinçages successifs dans la solution de PBS 1X, les cellules sont incubées en présence d'une solution de DAPI 0.001% (Sigma, France) pendant 10 à 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 3 rinçages successifs au PBS suivis d'une étape dans H_2O ultrapure, les lamelles sont retirées des puits et fixées sur des lames à l'aide d'une goutte de milieu de montage (Gel Mont, Microm, France). Après une nuit de séchage à 4°C, les noyaux des cellules est observé au microscope à fluorescence (Nikon, France) équipé d'un filtre UV (λ_{exc} = 358 nm, $\lambda_{émi}$ = 461 nm). Pour évaluer le pourcentage de cellules apoptotiques, les cellules sont comptées dans 10 champs microscopiques différents choisis de façon aléatoire (environ 400 cellules).

4.4. Mesure de l'activité des caspases

Principe

L'activité protéolytique des caspases-3 et -9 est évaluée par un suivi du clivage des substrats fluorophores N-acéthyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminométhylcoumarine (Ac-DEVD-AMC) et N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-aminométhylcoumarine (Ac-LEHD-AMC) selon la procédure décrite par Sponne *et al*. (2003) (704).

Protocole

Les neurones sont rincés 3 fois dans du PBS, puis incubés pendant 20 min dans un tampon Hepes 25 mM, pH 7,5 contenant : Triton X-100 1% (v/v) ; EDTA 5 mM ; EGTA 1 mM ; $MgCl_2$ 5 mM ; dithiothreitol 5 mM ; PMSF 1 mM ; pepstatine et leupeptine 10 µg/ml et aprotinine 5 µg/ml. Après homogénéisation, les cellules sont lysées par 3 cycles congélation/décongélation puis centrifugées à 4°C pendant 10 min à 12 000 *g*. Les substrats fluorophores (concentration finale de 100 µM) sont incubés pendant 2 h à 37°C en présence de 50 µg de protéines par essai. La fluorescence émise par les produits des clivages des caspases

est ensuite mesurée sur le lecteur de microplaques (Fluostar Galaxy, BMG-Labtechnologies, France) à λ_{emi} = 460 nm et λ_{exc} = 360 nm.

5. Electrophorèse et immunoblot

5.1. Electrophorèse

Principe

La technique d'électrophorèse est basée sur une méthode de séparation des protéines consiste à séparer les protéines selon leur taille dans un gel de polyacrylamide. Nous avons réalisé des électrophorèses discontinues en conditions dénaturantes, c'est-à-dire en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) qui confère à toutes les protéines une charge négative permettant ainsi leur séparation en fonction d'un seul critère : le poids moléculaire.

Réactifs

- Tampon de dépôt de Laemmli 2X : Tris-HCl 125mM, SDS 4%, 2-mercaptoéthanol 10% (v/v), bleu de bromophénol 0.004%.

- Gel de concentration 5% : Tris-HCl 0,5M pH 6,8 ; 17% d'acrylamide/bis acrylamide (29%/1%) ; 1% d'une solution de SDS 10% (v/v) ; persulfate d'ammonium à 10% ; TEMED 0.001% (v/v) dans H_2O ultra pure *qsp* 2 ml final.

- Gel de séparation 12% : Tris-HCl 0,75M, pH 8,8 ; acrylamide/bis acrylamide (29%/1%) à 40% (v/v), 1% de SDS à 10%, 1% de persulfate d'ammonium à 10%, TEMED 0.04% dans H_2O ultra pure *qsp* 10 ml final.

- Tampon de migration pH 8,3 (10X) : Tris-HCl 25mM ; SDS 0,1% ; Glycine 192mM dans H_2O ultra pure *qsp* 1L.

Protocole

L'électrophorèse est réalisée dans un système de migration verticale (Mini Protean II, Bio-Rad, USA). Les échantillons sont déposés dans les puits du gel de concentration après dénaturation pendant 5 min à 100 °C dans le tampon de dépôt. Les protéines migrent à un voltage constant de 100 V pendant 1h30 dans le tampon de migration.

5.2. Immunoblot

Réactifs

- Tampon de transfert pH 9,2 (10X) : Tris-HCl 48mM ; Glycine 39mM ; SDS 1,3mM, méthanol 10% dans H_2O ultrapure *qsp* 1L.

- Tampon de lavage TBS pH7,4 (10X) : Tris-HCL 20mM ; NaCl 1,5M dans H_2O ultrapure *qsp* 1L.

- Tampon de lavage TBST pH7,4 (1X) : Tween20 0,1% ajouté au tampon TBS, dans H_2O ultrapure *qsp* 1L.

- Solution de blocage : sérumalbumine bovine à 5% dans tampon TBST.

Protocole

Après séparation, les protéines contenues dans le gel de polyacrylamide sont transférées sur une membrane PVDF dans le système de transfert en milieu liquide Bio-Rad (BIO-RAD, USA) dans le tampon de transfert à 350 mA pendant 45 min. A la fin du transfert, les protéines sont colorées au Rouge Ponceau (acide trichloracétique 3%, Rouge Ponceau (Sigma) 0,2%), puis la membrane est décolorée au méthanol. Les protéines fixées sur la membrane sont révélées par une méthode dite en "sandwich". Un premier anticorps spécifique se fixe sur la protéine d'intérêt, puis un anticorps secondaire couplé à la péroxydase se fixe sur le premier anticorps. Les anticorps sont dilués dans la solution de blocage (Tableau 9). Le schéma d'immunorévélation est le suivant : la membrane est incubée dans les différentes solutions sous agitation douce selon les étapes suivantes :

- Méthanol
- Lavages TBST (2 x 5 min)
- Solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante
- Lavages TBST (2 x 5 min)
- Incubation avec le premier anticorps spécifique pour la nuit à 4°C
- Lavages TBST (2 lavages rapides suivis de 4 lavages de 15 min.)
- Incubation avec le second anticorps pendant 1 heure, à température ambiante
- Lavages TBST (2 lavages rapides suivis de 4 lavages de 15 min.)

Tableau 9 : Liste des anticorps utilisés en immunoblot

Protéines recherchées	Anticorps primaires		Anticorps secondaires	
	Source	Dilution	Source	Dilution
ERK1/2	Lapin	1 : 1.000	chèvre	1 : 2.000
ERK1/2 phosphorylées	Souris	1 : 1.000	âne	1 : 2.000
CREB	Lapin	1 : 1.000	chèvre	1 : 2.000
CREB phosphorylée (Ser133)	Souris	1 : 1.000	âne	1 : 2.000
Akt/PKB	Lapin	1 : 1.000	chèvre	1 : 2.000
Akt/PKB phosphorylée (Ser473)	Souris	1 : 1.000	âne	1 : 2.000
p-38	**Lapin**	1 : 1.000	**chèvre**	1 : 2.000
p-38 phosphorylée (Thr180/Tyr182)	**Souris**	1 : 1.000	**âne**	1 : 2.000

La révélation est faite par chimiluminescence ("*Enhanced chemiluminescence"* ou ECL, Pierce, USA). La péroxydase, en présence de son substrat, le luminol, émet de la lumière qui impressionne un film « Hyperfilm » ECL (Amersham Biosciences, Angleterre). L'intensité des bandes de migration électrophorétique des protéines est quantifiée par densitométrie grâce à l'analyseur d'images Versadoc (Bio-Rad, USA) *via* le logiciel d'analyse d'images *Quantity one V4.4* (Bio-Rad, USA).

6. Etude *in vivo* de la toxicité des peptides Aβ

6.1. Techniques stéréotaxiques d'injection

6.1.1. Anesthésie

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de Kétamine-Xylasine (Sigma Chemicals, France) respectivement à 0.08% et 0.01% en solution dans NaCl 0.9%. La solution d'anesthésie est administrée par voie intrapéritonéale à raison 8 mg/Kg de kétamine et 1 mg/Kg de xylazine.

6.1.2. Injection intracérébrale

L'animal anesthésié est placé dans un appareil stéréotaxique muni d'un microinjecteur (Unimécanique, France). La tête de la souris est maintenue en place grâce à un système permettant la fixation sur les plans sagittal et frontal. La fixation sur le plan sagittal est réalisée grâce à deux barres d'oreilles introduites dans les conduits auditifs. La fixation sur le plan frontal se fait grâce à une plaque munie d'un anneau dans lequel les incisives sont engagées jusqu'à leur base et la distance antéropostérieure est réglée en tirant la plaquette vers l'avant jusqu'à apprécier la résistance des incisives. La position de la tête doit être ajustée de manière que la hauteur de la surface osseuse soit la même aux points lambda et bregma. Une fois l'animal placé dans l'appareil à stéréotaxie, la peau de la région dorsale du crâne est nettoyée à l'éthanol 70%, rasée puis incisée selon une ligne médio-longitudinale. On peut alors observer les points de repère osseux (lambda, bregma et suture sagittale) à partir desquels seront calculées les coordonnées d'injection. A l'aide des vis micrométriques, on définit les coordonnées du point «zéro» à partir duquel seront calculées les coordonnées stéréotaxiques d'injection en positionnant la pointe de l'aiguille du microinjecteur sur le *bregma* (Figure 27). Les coordonnées d'implantation sont calculées sur la base d'un trièdre de référence défini à la surface du crâne par :

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

La recherche des coordonnées du ventricule latéral droit et gauche a été réalisée à partir de l'atlas stéréotaxique de souris (573) et adaptée à nos conditions expérimentales :

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

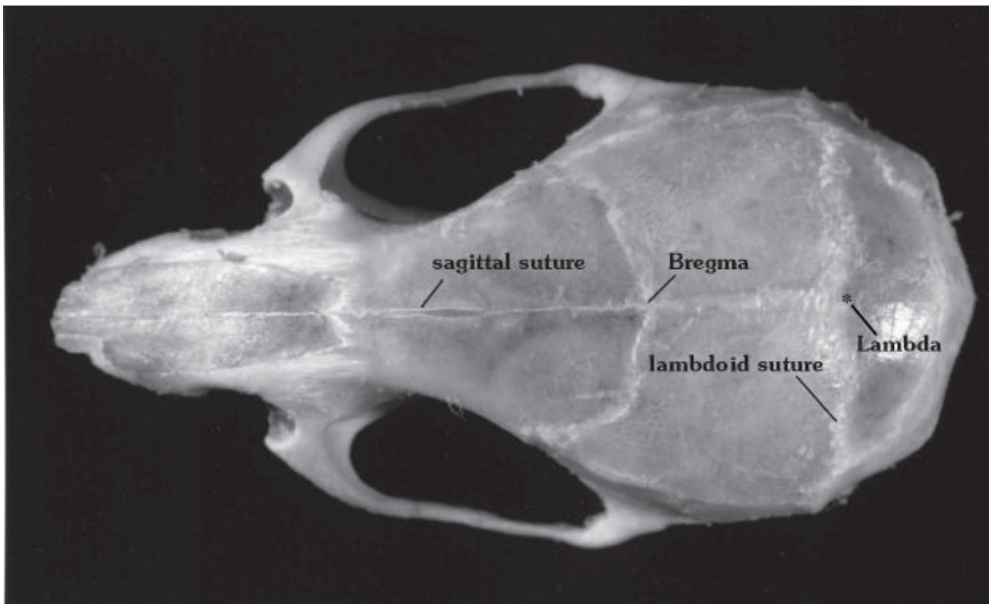


Figure 27 : Repères osseux du crâne de souris (*573*)

A l'aide d'une fraise (Ø 0,5 mm), un petit orifice est percé dans la voûte osseuse en prenant soin d'éviter toute lésion du sinus veineux sagittal supérieur et du réseau capillaire sous-jacent. L'aiguille de la seringue du micro injecteur est alors introduite dans le ventricule droit. La solution de peptides Aβ est alors injectée automatiquement avec un débit 1µl/min. A la fin de l'injection, l'aiguille est laissée en place pendant 2 min afin d'éviter le reflux de la solution injectée, puis remontée doucement. L'orifice est recouvert de cire hémostatique (Finescience, Phymep, France) et la peau de la région dorsale du crâne est recousue. A la fin de l'opération, l'animal est placé dans une cage individuelle.

6.2. Analyses comportementales

Le protocole expérimental mis en place dans le cadre de l'étude *in vivo* de la toxicité des oligomères solubles de peptides Aβ est présenté Figure 28.

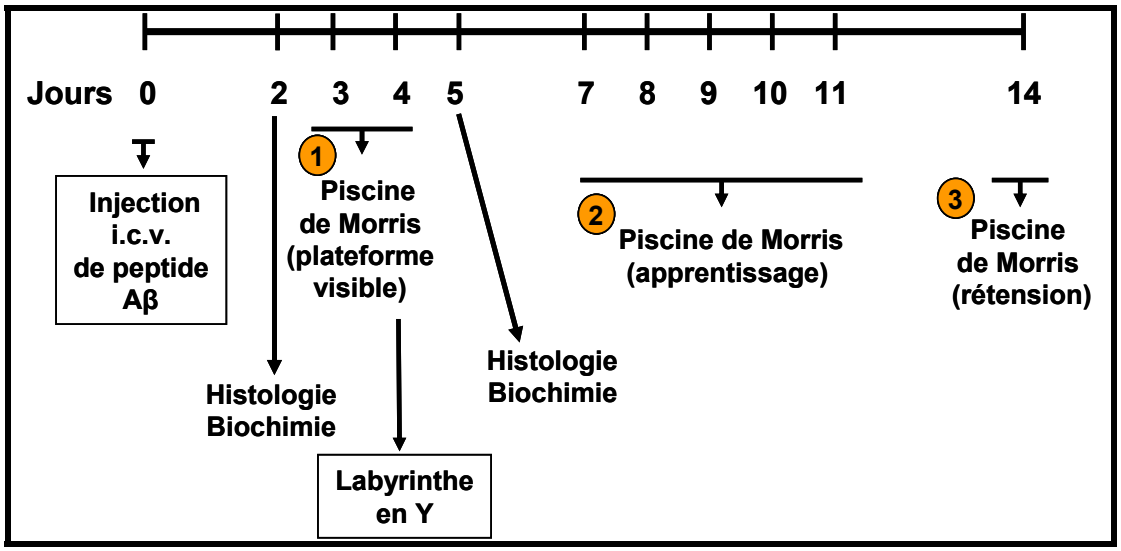


Figure 28 : Différentes étapes expérimentales suivant l'injection i.c.v. de peptide Aβ

6.2.1. Labyrinthe en Y

Principe

Ce test permet d'analyser la mémoire de travail et la mémoire de référence de chaque souris (646).

Protocole

Le labyrinthe en Y est composé de trois allées identiques disposées selon les médianes d'un triangle équilatéral (Figure 29). Les allées ont une longueur de 40 cm, une largeur de 9 cm et une hauteur de 16 cm (Nancy-Plast, Nancy). Les parois des allées sont opaques et le plancher est transparent. Le plancher de chaque allée (A, B et C) est recouvert de formes géométriques visibles par l'animal constituant des repères visuels différents d'une allée à l'autre. Le test est réalisé à J+4 après l'injection ICV. Il démarre lorsque l'animal est placé à l'extrémité d'une allée. Le trajet effectué par l'animal dans le labyrinthe est filmé à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur qui numérise ce trajet et l'enregistre grâce à un logiciel (*VLIR*

track, Intellibio, France). Pendant 5 min, le nombre de fois où la souris a visité chaque allée est compté. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'alternances effectuées par rapport au nombre total d'alternances possibles (nombre total d'entrée – 2) entre les 3 branches du labyrinthe.

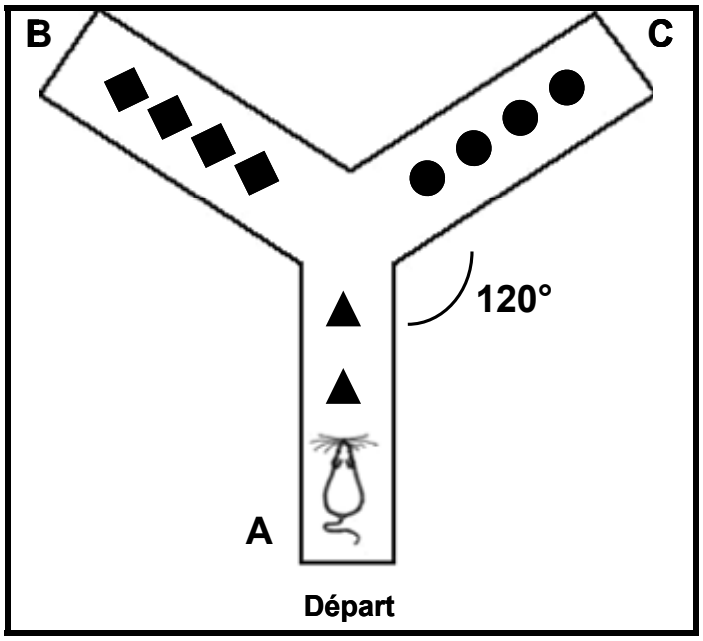


Figure 29 : Représentation schématique du dispositif du labyrinthe en Y

6.2.2. Piscine de Morris

Principe

Ce test, conçu par Morris (1984) (515), permet d'évaluer les capacités à mémoriser et à gérer l'information spatiale chez l'animal dans une situation aversive (l'eau d'un bassin) en atteignant un refuge le plus rapidement possible (une plate-forme invisible par immersion dans un bassin rempli d'eau).

Protocole

Le dispositif expérimental de ce test est constitué d'un bassin cylindrique en Altuglace gris (diamètre : 90 cm ; hauteur : 50cm) rempli sur 25cm de hauteur d'eau rendue opaque par l'adjonction d'une faible quantité de peinture acrylique blanche (Nancy-Plast, Nancy). La température de l'eau est ajustée à 22°C, ce qui est aversif pour l'animal. La plate-forme est constituée d'un cylindre en plastique gris opaque. Elle est déposée à l'intérieur du bassin et

reste invisible pour l'animal car située à 1cm sous la surface de l'eau (Figure 30). Autour du bassin, sont disposés plusieurs repères distaux (imprimés accrochés sur le mur comportant des formes géométriques) permettant à l'animal d'avoir un ensemble de repères spatiaux (Figure 30). Ainsi, la souris peut repérer la position de la plate-forme par rapport à un cadre de références allocentriques.

Le trajet effectué par l'animal dans la piscine est filmé à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur qui numérise ce trajet et l'enregistre grâce à un logiciel VLIR track (Intellibio, France). Ce logiciel permet de calculer entre autres, le temps mis par l'animal pour atteindre la plate-forme.

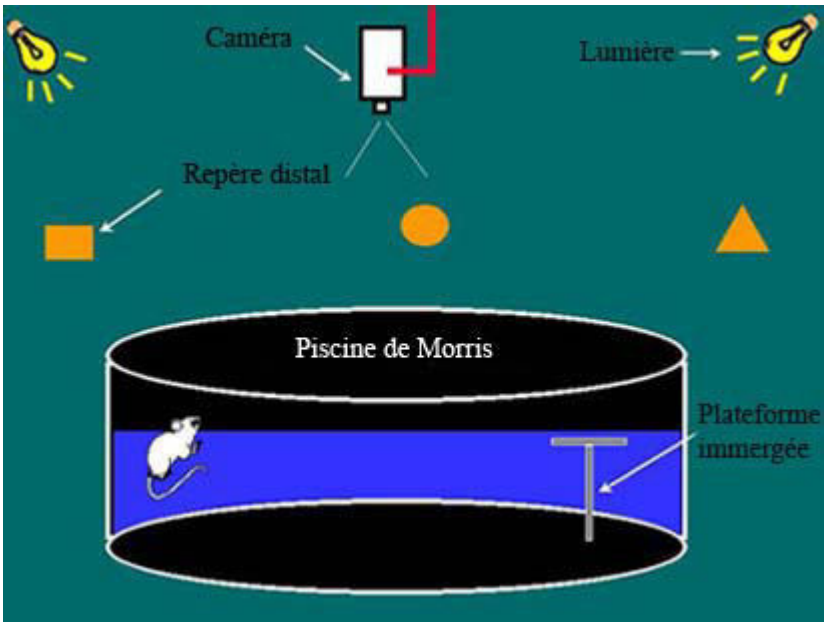


Figure 30 : Représentation schématique du dispositif de la piscine de Morris

Le test se déroule en 3 phases :

1. Phase de conditionnement (J+3 et J+4) : durant cette période, la plate-forme est déposée à dans la piscine et laissée émergée, donc visible pour l'animal. Cette étape vise à montrer à l'animal que la plate-forme est son seul refuge dans la piscine (Figure 31). Quatre passages sont organisés par jour, avec changement de l'emplacement de la plate-forme et de l'endroit de mise à l'eau de l'animal à chaque passage. Si l'animal ne parvient pas à se hisser sur la plate-forme au bout de 1min, l'expérimentateur l'y dépose délicatement et le laisse en place pendant 30 sec avant de le replacer dans sa cage. En plus du conditionnement, cette étape permet de

vérifier que les capacités motrices des animaux ne sont pas été atteintes après l'injection. Après cette première étape, les souris disposent de 2 jours de repos avant le test de la mémoire spatiale.

2. Test de la mémoire spatiale (J+7 à J+11) : il consiste, pour la souris, à localiser la plate-forme immergée, donc invisible, et dont la position reste inchangée au cours des 5 jours consécutifs du test. Chaque souris subit 4 passages quotidiens séparés d'au moins 45 min (Figure 31). A chaque passage, l'animal est déposé dans l'eau face à la paroi depuis un point de départ déterminé. L'essai se termine lorsque l'animal atteint la plate-forme, ou bien lorsque 60 sec se sont écoulées. Si la souris ne trouve pas la plate-forme durant les 60 sec de l'essai, elle y est amenée et laissée pendant 30 sec. Les différentes variables mesurées sont la latence d'atteinte de la plate-forme (maximum 60 sec), la distance parcourue et la vitesse de nage. La performance d'apprentissage est évaluée par la diminution de la latence d'atteinte de la plate-forme et de la distance parcourue au cours des 5 jours de mesure.

3. Test de rétention (ou « *Probe Test* ») : à J+14 de l'injection, la plate-forme est retirée du bassin (Figure 31). Le test de rétention consiste à subdiviser la surface du bassin en 4 quadrants (« Plateforme, anti-plateforme, Nord-Est et Sud-Ouest ») et à mesurer le temps passé par l'animal dans chaque quadrant pendant 60 sec.

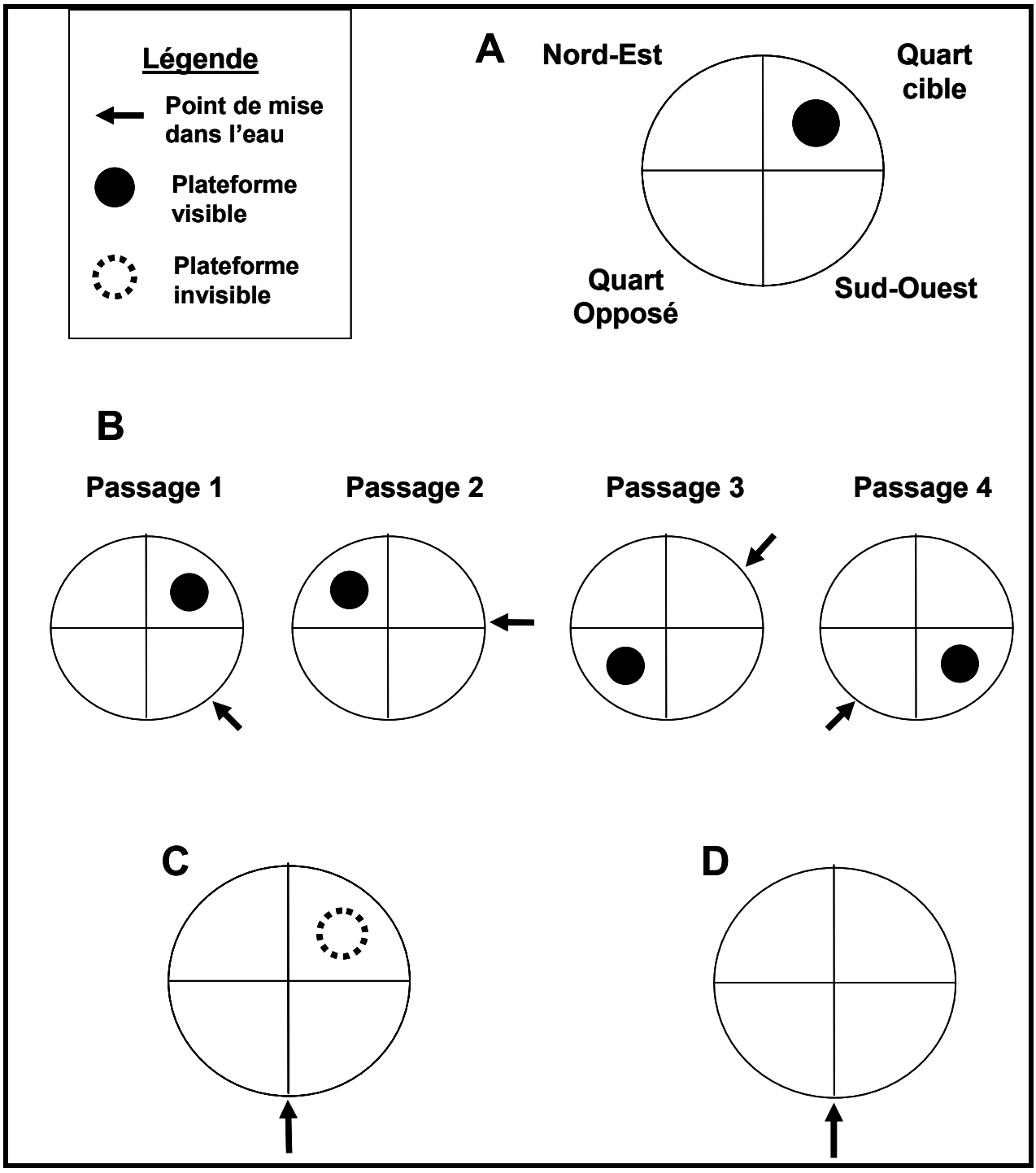


Figure 31 : Test de la piscine de Morris.

A : Différents quadrants virtuels du bassin et emplacements possibles de la plate-forme. B : Etape de conditionnement (2 jours). C : Test de la mémoire spatiale (5 jours). D : Test de rétention (1jour)

6.2.3. Analyses statistiques des données

Les données obtenues dans les différents tests en terme de **i)** latence d'atteinte de la plate-forme, de distance parcourue, de vitesse de nage ou de temps passé dans un quadrant (piscine de Morris) et **ii)** de pourcentage d'alternances effectuées par rapport au nombre total d'alternances possibles (labyrinthe en Y), sont traitées par des analyses de la variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs (traitement, quadrant, …), et éventuellement sur mesures répétées (périodes, min, essais, jours de test, séances de test). Lorsqu'une interaction est significative, un ANOVA à un seul facteur, suivi du test de Fisher (seuil de significativité : $p < 0,05$) sont utilisés pour comparer les différents groupes.

6.3. Etude du stress oxydant *in vivo*

6.3.1. Formation des espèces réactives dérivées de l'oxygène (EROs)

Principe.

La production des EROs est quantifiée par l'utilisation d'une sonde fluorescente, le 2',7'-dichlorofluoresceine diacétate (DCF-DA) qui subit une réaction de déacétylation par les estérases intracellulaires (Figure 32) donnant naissance à un composé intermédiaire non fluorescent, la 2',7'-dichloro-dihydrofluorescéine (DCFH). Ce dernier est ensuite oxydé par les EROs ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et $OH^{\cdot}$) en un composant fluorescent, la 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF).

Réactifs

- **Tampon d'homogénéisation** : KCl 140 mM ; Na_2HPO_4 10mM ; KH_2PO_4 1,7 mM ; EDTA 1mM dans H_2O ultrapure.
- **Solution DCF-DA 0,5 mM** : solution mère de DCF-DA 5mM dans DMSO diluée 10 fois dans le tampon d'homogénéisation.
- **Solution DCF 1mM** : solution mère de DCF 10mM dans DMSO diluée 10 fois dans le tampon d'homogénéisation.

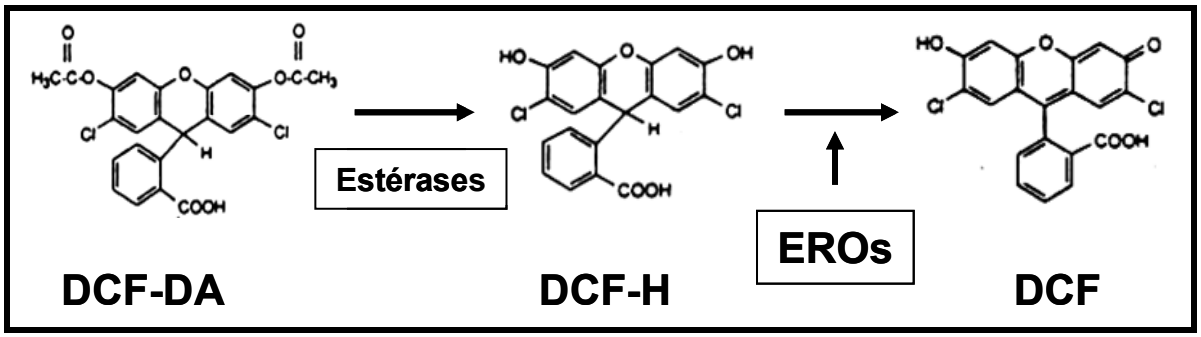


Figure 32 : Principe du test de mesure de la 2',7'-dichlorofluoresceine.

DCF-DA, 2',7'-dichlorofluoresceine diacétate ; DCFH, (2',7'-dichloro-dihydrofluoresceine) ; DCF, 2',7'-dichlorofluoresceine) ; EROs, Espèces Réactives Dérivées de l'Oxygène.

Protocole

Les animaux sont sacrifiés à J+2 et J+5 après l'injection de peptide Aβ par excès d'halothane et les cerveaux sont prélevés et disséqués. Les différentes structures (hippocampe, cortex, cervelet et bulbes olfactifs) sont isolées et directement placées dans l'azote liquide, puis stockées à -80°C. Les tissus sont ensuite broyés dans le tampon d'homogénéisation (50 mg de tissu frais/1ml de tampon) dans un broyeur de tissus de type *Dounce*. Les homogénats sont centrifugés 1000*g* à 4°C pendant 10 min et les surnageants sont dilués 10 fois dans le tampon d'homogénéisation puis aliquotés et conservés à – 80°C. Les homogénats sont incubés à 37°C dans une microplaque de 96 puits noire à fond clair (Nunc, USA) à raison de 80 µl d'homogénat/puits en présence de 20 µl de la solution de DCF-DA. Après 30 min, la fluorescence émise par le DCF formé est mesurée dans le lecteur de microplaques (Fluostar Galaxy, BMG-Labtechnologies, France) (λ_{Emi} = 485 nm, λ_{Exc} = 530nm) par rapport à une gamme étalon préparée à partir de la solution de DCF. Les résultats sont exprimés en pmoles de DCF par mg de protéines dans l'essai.

6.3.2. Mesure de la peroxydation lipidique

Principe

Parmi les aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, le marqueur le plus utilisé reste le malondialdéhyde (MDA). C'est le béta-dialdéhyde tricarboné le plus simple, produit lors de la coupure des acides gras polyinsaturés possédant au moins 3 doubles liaisons (acides arachidonique, eicosapentaénoïque, docosapentaénoïque et gamma-linolénique). La

réaction de dosage du MDA repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le MDA et 2 molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment absorbant à 532 nm (Figure 33). Le résultat d'un dosage du MDA par le TBA est la somme du MDA préexistant et de celui formé de manière artéfactuelle par décomposition thermique des peroxydes, et d'autres substances qui donnent naissance soit à du MDA soit à des molécules réagissant avec le TBA en milieu acide et à chaud (825). C'est pourquoi, à la notion initiale du dosage du MDA, s'est substituée la notion de « substances réagissant avec le TBA » (*thiobarbituric acid reactive substances* ou TBARS).

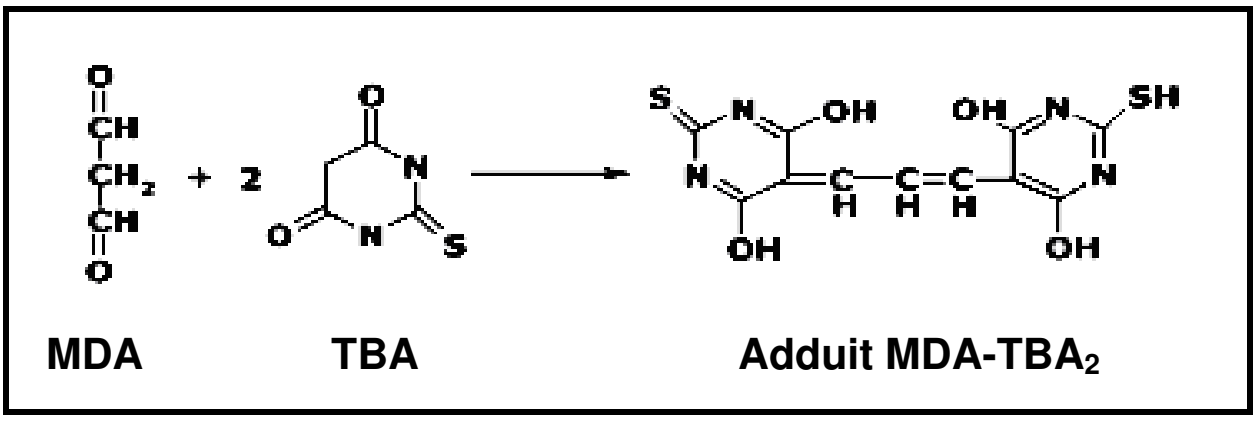


Figure 33 : La réaction de formation de l'adduit malondialdéhyde -acide thiobarbiturique.

MDA: malondialdéhyde; TBA: acide thiobarbiturique

Réactifs

- **Tampon d'homogénéisation** : KCl 140 mM ; Na_2HPO_4 10 mM ; KH_2PO_4 1,7 mM ; EDTA 1mM dans H_2O ultrapure.
- **HCl 0,25M** : HCl 37% à 2,5% (v/v) dans H_2O ultrapure
- **Réactif TBARS** : acide trichloracétique 15 % (m/v) ; TBA 0.38 % (m/v) et hydroxytoluène butylé 0,01% dans HCl 0,25M.
- **Solution de 1,1,3,3-tétramethoxypropane (TMP) 500 µM** : 8,21mg de TMP *qsp* 100 ml H_2O ultrapure.

La méthode utilisée est celle de Driver *et al.* (2000) (158) adaptée à nos conditions expérimentales. Dans des tubes Eppendorf, 200 µl d'homogénat cérébral sont incubés en présence de 400 µl de réactif TBARS pendant 15 min dans un bain marie bouillant. La réaction est stoppée par refroidissement des tubes dans la glace. Après une centrifugation à 1000 *g*, l'absorbance est lue à 535 nm (lecteur de microplaques Fluostar Galaxy, BMG-

Labtechnologies, France) contre une gamme étalon de TMP (0-50 µM). Les résultats sont exprimés en nanomoles de TBARS formés par mg de protéines.

6.3.3. Mesure de la concentration en protéines

Principe

La concentration en protéines dans les essais a été mesurée par la méthode colorimétrique à l'acide bicinchoninique (BCA). Cette méthode combine la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^{+} par les protéines en milieu alcalin (réaction du Biuret) à une détection colorimétrique d'une grande sensibilité de l'ion Cu^{+} en présence de BCA (694). La coloration rouge pourpre est obtenue par la chélation de de 2 molécules de BCA avec un ion Cu^{+} et est proportionnelle à la concentration en protéines dans l'échantillon, la réaction étant linéaire jusqu'à 2mg/ml. L'absorbance est lue à 570 nm.

Protocole

Nous avons utilisé le kit de dosage « *BCA Protein Assay Kit »* (Pierce , USA). Des aliquotes de 25 µl/puits provenant des échantillons à doser (solution initiale ou dilution) sont transférés dans une plaque 96 puits auxquels on a ajouté 200 µl/puits du réactif (Uptima, ETATS UNIS). Les plaques sont incubées pendant 30 min à 37 °C puis l'absorbance est mesurée à 570 nm dans le lecteur de microplaques. Les concentrations sont déterminées par rapport à une gamme étalon préparée à partir de la solution d'albumine bovine sérique à 2mg/ml.

7. Techniques d'histochimie et immunohistochimie

7.1. Fixation du cerveau par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde

Réactifs

- **Solution saline (NaCl 0,9%) : 9 g de NaCl dans** H_2O ultrapure *qsp* 1L.
- **Tampon PBS 1X** : NaCl 137mM ; KCl 2,68mM ; Na_2HPO_4 10,1 mM ; KH_2PO_4 1,76 mM ; dans H_2O ultrapure *qsp* 1L.
- **Solution de fixation-cryopréservation** : paraformaldéhyde (PAF) 4% ; saccharose 5% dans tampon PBS 1X à pH 7,4.

Protocole

Nous avons utilisé le système de perfusion commercialisé par AutoMate Scientific (USA) : après avoir rincé le circuit du système à l'eau distillée et chassé les bulles d'air présentes dans les cathéters, on remplit les réservoirs de solution saline et de solution de fixation-cryopréservation (Figure 34). L'animal anesthésié sous halothane est fixé sur une planche de dissection. Le thorax est ensuite incisé à l'aide de ciseaux de dissection pour accéder au cœur et aux principaux vaisseaux sanguins. L'aiguille émoussée est introduite dans l'aorte ascendante en passant par le ventricule gauche (Figure 34). Le coeur est ensuite clampé afin d'éviter la rétraction de l'aiguille et une incision est effectuée dans l'oreillette droite afin de permettre l'évacuation des solutions de perfusion. Dans un premier temps, on laisse s'écouler la solution saline jusqu'à ce que le liquide qui ressort de l'oreillette droite soit exempt de sang, puis dans une seconde étape, l'animal est perfusé avec la solution de fixation-cryopréservation. A la fin de la manipulation, le cerveau est prélevé puis placé dans la solution de fixation-cryopréservation sous agitation modérée pendant 3 à 12 h, selon le protocole d'immunomarquage effectué ultérieurement sur les coupes cérébrales. Les cerveaux sont conservés à -70° jusqu'au jour de coupe au cryostat.

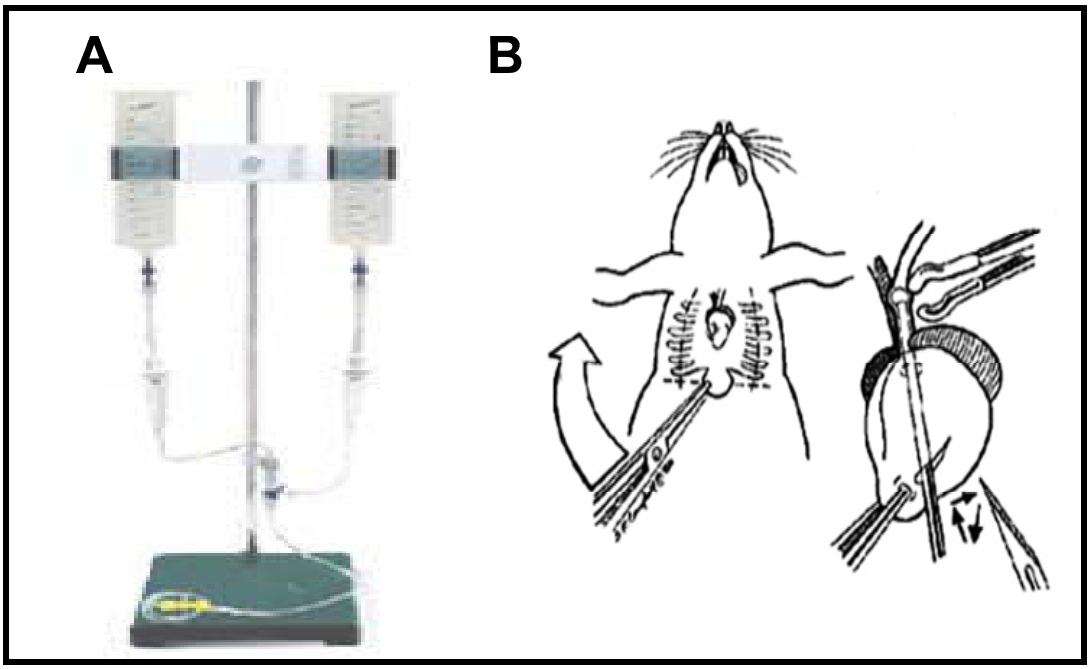


Figure 34 : Représentation schématique du dispositif de fixation par perfusion intracardiaque.

A, appareil de perfusion ; B, préparation de l'animal

7.2. Coupes des cerveaux au cryostat

Une heure avant la coupe, le cerveau est sorti du congélateur et placé dans la chambre thermostatée du cryostat (Microm HM550, Microm Microtech, France) à -20°C. Une goutte de milieu d'enrobage (carboxy-méthyl-cellulose 4% (m/v) dans H_2O distillée) est déposée sur la platine et le cerveau est fixé, puis enveloppé dans le milieu d'enrobage. La platine est ensuite montée sur le porte-objet réglé à une température de -15 °C. Les coupes sont débitées dans le sens postéro-antérieur en coupes frontales de 40 µm d'épaisseur. Une fois la zone d'intérêt atteinte, on active le mode « coupes fines » : des coupes d'une épaisseur de 20 µm sont alors récupérées sur des lames adhésives (StarFrost, Allemagne), puis laissées sécher à l'air libre pendant une heure avant d'être stockées à –70°C.

7.3. Marquages immunohistologiques

Principe

Après perméabilisation des cellules et blocage des sites aspécifiques, les coupes de tissus sont incubées en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine recherchée. Après lavage, une seconde incubation est effectuée avec un anticorps secondaire conjugué à une sonde fluorescente, reconnaissant les immunoglobulines de l'espèce productrice de l'anticorps primaire.

Réactifs

- **PBS 1X** : NaCl 137mM, KCl 2,68mM, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 1,76mM dans H_2O distillée
- **Solution de perméabilisation PBST** : Triton X-100 (Sigma Chemicals, France) 0,2% dans PBS 1X.
- **Solution de blocage** : sérum d'âne (Sérotec, France) 10% (v/v) dans PBST 1X.

Protocole

Sur les coupes sorties du congélateur et laissées séchées à l'air libre pendant 10 min, une zone de réaction est délimitée avec le liquide hydrofuge DakoPen (Dako, France). Le marquage immunohistochimique est effectué selon les étapes suivantes :

- incubation des coupes dans la solution de perméabilisation pendant 20 min à température ambiante,
- incubation en présence du premier anticorps dilué dans la solution de blocage pendant une nuit à 4° C dans un environnement humide, afin d'éviter l'évaporation des réactifs,
- 3 étapes de lavage successives de 5 min. dans du PBST,
- incubation avec le second anticorps dilué dans la solution de blocage pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière,
- 3 étapes de lavage successives de 5 min dans du PBST,
- incubation dans la solution de DAPI (DAPI 0,002% dans PBS 1X) pendant 15 min afin de permettre le repérage des différentes structures lors de l'observation avec le microscope,
- 3 lavages dans PBS1X suivis d'un lavage dans H_2O distillée
- Fixation des coupes par le dépôt d'une goutte de milieu de montage Gel Mount (Microm Microtech, France) avant de les recouvrir d'une lamelle d'histologie.

- séchage des préparations pendant une nuit à 4° C et à l'abri de la lumière.

Les coupes sont observées au microscope en fluorescence (Nikon E2000, Nikon, France) relié à une caméra CXM100 (Nikon, France). L'analyse des images est effectuée à l'aide du logiciel Lucia G V5.2 (Nikon, France).

Préparation des dilutions d'anticorps **:** la provenance et le taux de dilution des différents anticorps utilisés sont regroupés dans le Tableau 10 :

Tableau 10 : Anticorps primaires et secondaires utilisés dans les essais de marquages immunohistochimiques des coupes de cerveaux de souris.

Anticorps primaires	Dilution	Références	Anticorps secondaires	Dilution	Références
Anti-MBP (lapin)	1/200	Dako A0623	Anti-IgG Lapin Alexa-fluor 488	1/200	Molecular Probes A-21206
Anti-GFAP (lapin)	1/500	Dako Z0334	Anti-IgG Lapin Alexa-fluor 488	1/200	Molecular Probes A-21206
Anti-NeuN (souris)	1/200	Chemicon MAB377	Anti-IgG souris Alexa-fluor 488	1/200	Molecular Probes A-21202
Anti-PSD95 (souris)	1/200	Upstate # 05-494	Anti-IgG souris Alexa-fluor 488	1/200	Molecular Probes A-21202
Anti-SNAP25 (souris)	1/200	Stenberger SMI 81	Anti-IgG souris Alexa-fluor 488	1/200	Molecular Probes A-21202
Anti-CD11b (rat)	1/200	Serotec MCA711G	Anti-IgG rat Alexa-fluor 488	1/200	Molecular Probes A-21208

7.4. Coloration histologique à l'acétate de thionine

Principe

L'acétate de thionine est un colorant thiazinique, utilisé pour la mise en évidence des corps de Nissl spécifiques des neurones.

Réactifs

- Solution d'acétate de thionine : thionine (Sigma Chemicals, France) 0.15% (m/v) ; acétate de sodium (Sigma Chemicals, France) 0.82% (m/v) ; acide acétique glacial (Sigma Chemicals, France) 0,58 % (v/v) dans H_2O ultrapure. Avant son utilisation, la solution est filtrée sur papier filtre.

Protocole

Les coupes sont disposées dans le panier en verre et plongées successivement dans les bains n° 1 à 8 selon la procédure suivante :

Étape	Bain	Temps (min)
1 Réhydratation	Éthanol 95 %	10
2	Éthanol 70 %	5
3	H_2O ultrapure	3
4 Coloration	Acétate de thionine	10
5 Rinçage	H_2O ultrapure	1
6 Déshydratation	H_2O ultrapure	1
7	Éthanol 70 %	5
8	Éthanol 90 %	10

Après l'étape n°8, une goutte de milieu de montage « Ottix » (Microm Microtech, France) est déposée sur la coupe qui est ensuite recouverte d'une lamelle de verre en l'appuyant délicatement à l'aide d'une pincette afin de chasser les bulles d'air. Les lames sont laissées à sécher à l'air libre pendant 24h. Les coupes sont ensuite observées au microscope en contraste de phase (DMIL, Leica, France).

RESULTATS

RESULTATS - PREMIERE PARTIE

Etude des propriétés neurotoxiques des peptides amyloïdes tronqués dans leur domaine amino-terminal

1. Etude des propriétés neurotoxiques des peptides Aβ tronqués dans leur domaine amino-terminal.

1.1. Introduction

L'implication des oligomères solubles de peptide Aβ dans les phases précoces de neurodégénérescence associées à la MA ne fait à l'heure actuelle plus aucun doute (660). Notre équipe a largement contribué à cette avancée majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires associés (407 ; 704 ; 706).

Cependant, plusieurs questions restent encore sans réponse. Parmi celles-ci, l'impact des formes tronquées du peptide Aβ dans les altérations cellulaires et tissulaires conduisant au développement de la MA représente un aspect encore mal compris (pour revue, 756). Pourtant, l'existence de ces formes est connue depuis relativement longtemps et plusieurs travaux suggèrent leur importance (215 ; 583). Des peptides Aβ tronqués dans leur domaine amino-terminal (Aβx-40 et Aβx-42) sont connus pour s'accumuler de façon précoce dans les cerveaux de patients atteints de formes sporadiques de MA, dans des formes familiales (essentiellement chez des sujets présentant des mutations dans le gène codant la PS1) et dans le syndrome de Down (632 ; 637 ; 757). D'un point de vue clinique, l'augmentation des espèces moléculaires Aβx-40 et Aβx-42 est proportionnelle à la sévérité des symptômes cliniques en terme de temps et de précocité (632 ; 633). Plusieurs travaux relatent l'étude *in vitro* de la production de ces peptides tronqués. Par exemple, le milieu de culture de cellules N2a surexprimant l'APP_{swe} ou l'AP_{wt-695} contient une multitude de peptides, dont les peptides natifs Aβ1-40/42, mais aussi des peptides tronqués en leur extrémité carboxy-terminale, essentiellement Aβ1-13/39 et des peptides tronqués en leur extrémité amino-terminale essentiellement Aβ14-40/42, Aβ15-40 et le peptide P3 (802). De plus, l'analyse du milieu de culture de neurones corticaux de rat montre que les peptides tronqués en leur extrémité amino-terminale Aβ11-40/42 sont les espèces majoritaires de peptides Aβ produits.

Parmi ces espèces moléculaires, le peptide Aβ3(pE)-42, tronqué et pyroglutamylé en position Glu-3, peut être considéré comme un facteur important, car précocement et majoritairement présent dans les lésions pré-amyloïdes et les plaques séniles (263 ; 410 ; 502). L'origine de ces formes Aβx-40 et Aβx-42 demeure inconnue. Plusieurs hypothèses sont à l'étude dont la possibilité d'un clivage alternatif de la protéine APP par la β-sécretase (633 ;

783), bien que les peptides Aβ3(pE)-40 et Aβ3(pE)-42 n'aient pas été détectés en tant que produits issus de la maturation constitutive de l'APP (681). D'autres études montrent que des mutations des gènes codant la PS1 peuvent augmenter la production de ces peptides tronqués (725). Les peptides Aβ3(pE)-40 et Aβ3(pE)-42 pourraient bien évidemment dériver de la protéolyse des peptides Aβ(1-40) et Aβ(1-42) par des peptidases extracellulaires. Il s'en suivrait des phénomènes de pyroglutamylation par une glutaminyl cyclase générant des formes pyroglutamylées qui seraient plus résistantes à la protéolyse s'accumulant dans le cerveau (636 ; 681). De façon intéressante, la protéolyse du domaine amino-terminal cyclisé des formes Aβ3(pE)-40 et Aβ3(pE)-42 nécessite une métalloprotéase, nommée neprilysin, dont l'expression est fortement diminuée dans les cerveaux de patients atteints de MA (861).

1.2. Objectifs

Quelques publications rapportent des résultats contradictoires quant aux propriétés neurotoxiques des peptides Aβ3(pE)-40 et Aβ3(pE)-42 déterminées sur différents modèles. Ces aspects seront discutés de façon plus exhaustive page 176. Actuellement, aucune donnée concernant une éventuelle implication des oligomères solubles de peptides Aβ3(pE)-40 et/ou Aβ3(pE)-42 n'est disponible.

Cette partie de mon travail se focalise sur l'étude des propriétés neurotoxiques des oligomères solubles de peptide Aβ3(pE)-42. Ces études ont été réalisées *in vivo* afin de mettre en évidence l'impact de ces peptides tronqués sur les capacités cognitives (apprentissage et mémoire) dans un modèle animal de MA. Nous avons également étudié *in vitro* les mécanismes moléculaires de neurotoxicité du peptide Aβ3(pE)-42. J'ai de plus comparé les effets neurotoxiques *in vitro* et *in vivo* des oligomères de peptide Aβ3(pE)-42 avec ceux des peptides Aβ(1-40) et Aβ(1-42). L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'une publication soumise à *Neurobiology of Aging* présentée dans le paragraphe suivant.

1.3. Résultats - MANUSCRIT # 1

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

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

From Lipidomix, JE 2482, INPL, Laboratoire de Médecine et Thérapeutique Moléculaire, 15 rue du Bois de la Champelle, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Soumis à *Neurobiology of Aging*

(Assigned manuscript number: NBA-06-315)

ARTICLE TYPE: REGULAR PAPER

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

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

From Lipidomix, JE 2482, INPL, Laboratoire de Médecine et Thérapeutique Moléculaire, 15 rue du Bois de la Champelle, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Address correspondence to: Thierry Pillot, JE2482 Lipidomix, Laboratoire de Médecine et Thérapeutique Moléculaire, 15 rue du Bois de la Champelle, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, Tel: +33-3-83-67-82-18, Fax: +33-3-83-67-89-99. E-Mail: Thierry.Pillot@mtm.nancy.inserm.fr

The abbreviations used are: Aβ, amyloid-β peptide; AD, Alzheimer's disease; $cPLA_2$, cytosolic calcium-dependent phospholipase A_2; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; icv, intracerebroventricular; MAFP, methyl arachidonyl fluorophosphonate; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline.

Abstract

N-terminal-truncated forms of amyloid-β (Aβ) peptide have been recently suggested to play a pivotal role early in Alzheimer's disease (AD). Among them, Aβ3(pE)-42 peptide, starting with pyroglutamyl at residue Glu-3, is the dominant Aβ species in AD plaques and pre-amyloid lesions. So its predominance seems directly proportional to the severity of the clinical phenotype. The present study investigates the effects of soluble oligomeric Aβ3(pE)-42 after intracerebroventricular injection on mice learning capacities and the molecular mechanisms of *in vitro* neurotoxicity. Mice injected with soluble Aβ3(pE)-42 or Aβ(1-42) displayed impaired spatial working memory and delayed memory acquisition in Y-maze and Morris water maze tests, while soluble Aβ42-1 showed no effect. These cognitive alterations were associated with free radical overproduction in hippocampus and olfactory bulbs, but not in cerebral cortex and cerebellum. *In vitro*, Aβ3(pE)-42 oligomers induced a redox-sensitive neuronal apoptosis involving caspase activation and an arachidonic acid-dependent pro-inflammatory pathway. These data suggest that Aβ3(pE)-42 could mediate the neurodegenerative process and subsequent cognitive alteration occurring in preclinical AD stages.

Key words: Alzheimer's disease, soluble amyloid-β oligomers, N-truncated amyloid-β, apoptosis, cognition.

Running Title: *N-truncated Aβ-induced neurotoxicity*

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 [65]. The molecular basis for this specificity is unknown, but evidence favors the involvement of neurotoxins derived from the amyloid-β peptide (Aβ), a normal product of intracellular proteolysis of a precursor protein (βAPP) [19,66].

Accumulative evidence highlights the critical role played by N-terminal-truncated forms of Aβ in AD development [25,54,75]. N-terminal-truncated Aβ peptides are known to accumulate early in the brain of sporadic AD patients, in early onset familial AD patients, especially in PS1 mutation carriers, and in Down syndrome brain [59-63,76]. Among them, Aβ peptides starting with pyroglutamyl at residues Glu-3 or Glu-11, particularly Aβ3(pE)-42, have been suggested to be early aggregating species in AD [75] and considered as the dominant Aβ species in AD plaques [29,41,49,60]. They are also present in pre-amyloid lesions [43]. Most importantly, the increase of the N-terminal-truncated species is proportional to the severity of the disease in terms of course duration and early onset [59,60]. Consequently, the intensity of neuronal degeneration and the severity of the clinical phenotype seem directly proportional to the predominance of Aβ3(pE)-42 peptide. The origin of these N-terminal-truncated forms is still unknown. They may be created from the amyloid precursor protein through an alternative β-secretase cleavage [60], although Aβ3(pE)-40 and Aβ3(pE)-42 species were not observed as products of constitutive APP processing [67]. Alternatively, Aβ3(pE)-42 may be produced from the full-length 1-42 form by extracellular peptidases and then modified by glutaminyl cyclase to generate a pyroglutamylated form that might be more resistant to proteolytic degradation [62,67]. Interestingly, the proteolysis of N-terminal cyclized parts of Aβ requires neprylisin, a metalloprotease that is reduced is AD brains [86].

The original amyloid cascade hypothesis causally links AD clinico-pathological process and neuronal cell death to the aggregation and deposition of Aβ [2,20,28]. 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 [33]. 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 Aβ peptide [39,56,70,81,82]. Accordingly, it has been recently demonstrated using mouse cerebral slices that soluble

oligomers of Aβ are responsible for regiospecific toxicity to hippocampal CA1 neurons, a division involved in cognitive functions [35]. Moreover, the synaptic loss in AD brain has been correlated with the pool of soluble Aβ peptide rather than that of fibrillar Aβ [45,48,83]. Both neurodegeneration and specific spatial learning deficits associated with early Aβ oligomer accumulation occur without amyloid plaque formation in AD transgenic models [9,32,37,38]. These observations have been further corroborated by a recent elegant study showing the targeting of synaptic terminals by Aβ oligomers in AD brain [42]. In addition, increasing evidence suggests that oxidative damage is associated with the development of AD, including oxidative damage to protein, lipids, and nuclear and mitochondrial DNA [1,50,53,69]. Additionally, it has been clearly demonstrated that the generation of reactive oxygen species is involved in fibrillar as well as soluble Aβ peptide-induced neurotoxicity [5,6,22,70]. Taken together, these results give the "soluble Aβ" hypothesis substantial clinical support. However, it remains to understand the molecular mechanisms triggering soluble Aβ-mediated cell death.

Despite the amount of information describing pyroglutamate-modified N-terminal-truncated Aβ as molecules likely related to the amyloidogenic process and to the severity of the disease [44], little and contrasting data are available about the neurotoxicity of fibrillar aggregates of Aβ3(pE)-40 and Aβ3(pE)-42 peptides [30,77]. To date, the neurotoxicity of soluble oligomers of N-terminal-truncated Aβ has not been addressed, and no data are available concerning their *in vivo* effects. We therefore addressed the question of whether cognitive deficits associated with Aβ peptides may be directly caused by soluble Aβ3(pE)-42 oligomers. Additionally, we performed experiments aiming to precise the molecular mechanisms of neuronal cell death induced by soluble Aβ3(pE)-42 oligomers.

Materials and Methods

Materials

The caspase substrates (Ac-DEVD-AMC and Ac-LEHD-AMC) and inhibitor peptides (ZVAD-fmk, Ac-DEVD-fmk) were purchased from Bachem. Aβ(1-40), Aβ(40-1), Aβ(1-42) and Aβ3(pE)-42 were also obtained from Bachem and soluble oligomers of Aβ were prepared as previously described [39,56,70]. 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 Aβ

was detected by SDS-PAGE and immunoblot analysis. Oligomeric preparations of Aβ resolve to trimers and tetramers (10 to 15 kDa) after SDS-PAGE, as previously described [16,47,56]. Peptide solutions were then applied onto the cells. The specific $cPLA_2$ 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

Mice primary neurons were cultured as described and kept at 35°C in a humidified 6% CO_2 atmosphere [39,70]. After 6-7 days *in vitro* (DIV), neuronal population was determined to be at least 96% neuronal by immunostaining. All experiments were performed on 6-7 DIV neurons. Cells were treated with increasing concentrations of soluble Aβ oligomers for the indicated times. Alternatively, cells were preincubated for 2 h with the indicated concentrations of inhibitors before addition of Aβ.

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 [56,71]. Alternatively, cell viability was monitored using a LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity kit (Molecular Probes) according to the manufacturer's recommendations. Cell nuclei were visualized using 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) [70]. 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 [70]. Briefly, at the indicated time points after Aβ 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 $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, 10 µg/ml each of pepstatin and leupeptin, and 5 µg/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 x *g* and the protein concentration was assayed by the BCA Protein Assay kit (Pierce). Fifty µg of cellular proteins were incubated for 2 h with 100 µM 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).

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 ± SEM. Differences between control and treated groups were analyzed using Student's *t*-test (**, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$). Multiple pair-wise comparisons among the groups of data were performed using ANOVA followed by a Scheffe's post hoc test. Statistical differences were determined as $p < 0.05$.

Intracerebroventricular (icv) injection of soluble Aβ oligomers

Male C57BL/6 mice (12-week old, Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were housed five to six per cage with free access to food and water, and were kept in a constant environment (22 ± 2°C, 50 ± 5% humidity, 12-h light cycle). Soluble Aβ oligomers were prepared as described above as

stock solutions at the concentration of 0.5 mM in sterile 0.1 M phosphate-buffered saline (pH 7.4) and aliquots were stored at –20°C until used. Under anesthetization, soluble Aβ oligomers (0.5 nmol in 1 μL) or vehicle (saline) were injected into the right ventricle, with stereotaxic coordinates from the bregma being, in mm, AP –0.22, L –1.0 and D 2.5. Injections were made using a 10-μl Hamilton microsyringe fitted with a 26-gauge needle. Each group consisted of 12 animals. Learning and memory capacity was assessed using Y-maze and Morris water maze tests. The experimental schedule is shown in Fig.1.

Y-maze task

Immediate spatial working memory performance was assessed by recording spontaneous alternation behavior in a Y-maze as described previously [64]. The Y-maze task was carried out on day 4 after soluble Aβ oligomer administration. The maze was made of opaque Plexiglas and each arm was 40-cm long, 16-cm high, 9-cm wide and positioned at equal angles. Mice were placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during a 5-min session. The series of arm entries were recorded visually and arm entry was considered to be completed when the hind paws of the mouse were completely placed in the arm. Alternation was defined as successive entries into the three arms on overlapping triplet sets. The percentage alternation was calculated as the ratio of actual (total alternations) to possible alternations (defined as the number of arm entries minus two), multiplied by 100. Statistical comparisons were made by the Student's *t*-test. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) was carried out and followed by Fisher's *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The means of the data are presented together with SEM.

Water maze task

The Morris water maze was performed as described previously [52]. The experimental apparatus consisted of a circular water tank (diameter = 80 cm; height = 50 cm) containing water at 22°C to a depth of 25 cm and rendered opaque by adding an aqueous acrylic emulsion. A platform (diameter = 10 cm) was submerged 1 cm below the water surface and placed at the midpoint of one quadrant. The pool is placed in a test room homogenously illuminated at 100 lux and containing various prominent visual cues. The swimming paths of the animals are recorded using a video tracking system. At day 3 and 4, navigation to a visible platform is carried out before place-navigation in order to evaluate visual and motor abilities of the animals. Mice are submitted to 4 trials per day with 2 trials in the morning and 2 trials in the afternoon, and with an inter-trial interval of at least 45 min. There is no extra maze cue in the room. The platform position and starting points are randomly distributed over all four quadrants of the pool. Mice that fail to find the platform after 60 s are guided to its location.

Memory-acquisition trials (training) were performed four times daily on days 7 to 11 after injection of soluble Aβ oligomers to reach a steady state of escape latency. The mice were allowed to swim freely for 60 s, were left for an additional 30 s on the hidden platform and were then returned to the home cage during the inter-trial interval. The intra-trial intervals during four trials were 45 min. Start positions, set at each limit between quadrants, were randomly selected for each animal. In each trial, the time required to escape onto the hidden platform was recorded. Mice failing to find the platform within 60 s were placed on the platform for 10 s at the end of the trial.

Memory-retention tests (probe trials) were performed 3 days after the last training session. The platform was removed and each mouse was allowed a free 60-s swim. The number of crossing over a point where the platform had been and the time spent at each of the four quadrants were counted by replay using a video recorder.

Statistical comparisons were made by the Student's *t*-test. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) was carried out and followed by Fisher's *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The means of the data are presented together with SEM.

ROS formation

Animals were sacrificed two or five days following soluble Aβ oligomers injection. Hippocampus, cerebral cortex, cerebellum and olfactory bulbs were dissected out and instantaneously placed in liquid nitrogen and stored at –80°C until biochemical measurements. Tissues were homogenized in 10 volumes of ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 140 mM KCl and 1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged (4°C) at 960 x *g* for 10 min and the supernatant used. To assess the free radical levels, 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was used as a probe. An aliquot of the sample was incubated with 100 µM DCFH-DA at 37°C for 30 min. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively, using a fluorescence spectrophotometer (Fluostar Galaxy, BMG, France). The free radicals content was quantified using a DCF standard curve and results were expressed as pmol of DCF formed/mg protein. All procedures were performed in the dark, and blanks containing DCFH-DA (no homogenate) and homogenate (no DCFH-DA) were processed for measurement of autofluorescence [18,72].

RESULTS

Soluble oligomers of Aβ3(pE)-42 impair learning and memory in mice – In separate experiment series, mice were treated by soluble oligomers of Aβ3(pE)-42, Aβ(1-42) or Aβ(42-1) peptides using icv injection. The treatment protocols, as well as experimental follow-up analysis of behavioral performances, were described in Fig. 1. Spontaneous alternation behavior, which is regarded as a measure of immediate spatial working memory performance [64], was investigated using the Y-maze test. Mice injected with soluble Aβ3(pE)-42 oligomers displayed significantly impaired spatial working memory (17% decrease in alternation behavior), when measured on day 4 post-injection (Fig. 2A). Interestingly, treatment with soluble Aβ(1-42) oligomers resulted in similar impairment of spatial working memory. Injection of soluble Aβ(42-1), used as a negative control, had no effect on spontaneous alternation behavior (Fig. 2A). In contrast, the number of arm entries did not change significantly among all the experimental groups (Fig. 2B), indicating that changes in alternation behavior were not due to generalized exploratory, locomotor or motivational effects. Accordingly, the Morris water maze task with a visible platform performed on day 3 and 4 post-injection failed to reveal any difference in visual and motor abilities between control and treated groups (data not shown).

Mice were trained in the Morris water maze for 5 days starting at 7 days after icv administration of soluble Aβ oligomers (Fig. 3). Mice became more efficient at finding the

platform on successive trials. The main effect for day was statistically different ($p < 0.005$) (Fig. 3A). The post-hoc test for latencies in intra-group showed significant declines on days 2-5 for saline and Aβ(42-1) groups when compared to day 1. Interestingly, soluble Aβ3(pE)-42 as well as Aβ(1-42) impaired place learning and this change was significantly different from saline or Aβ(42-1) treated groups on days 1-4 of training (Fig. 3A). Significant differences among treatment groups were not detected after 5 days of training by repeated measured two-way ANOVA. However, icv injection of soluble Aβ3(pE)-42 and Aβ(1-42) resulted in significantly increased escape latency and total time in training days (Fig. 3B), suggesting a delay in memory acquisition.

Similarly, soluble Aβ3(pE)-42 oligomers adversely affected performance in the probe test (Fig. 4). The Aβ3(pE)-42- and Aβ(1-42)-treated groups displayed a 23.5 and 31% decrease ($p < 0.05$, as compared to Aβ(42-1)-treated group) in time percentage spent in the platform quadrant (Fig. 4A) and a concomitant increase of time in the opposite quadrant (Fig. 4B). In the retention test, the number of crossings over a platform position was significantly decreased in the Aβ3(pE)-42- and Aβ(1-42)-treated groups compared to the control groups (Fig. 4C), suggesting impaired memory.

Soluble Aβ oligomer-induced memory and learning alteration was associated with the generation of free radicals in the hippocampus and olfactory bulb homogenates of treated animals (Fig. 5). Two days after soluble Aβ(1-42) and Aβ(3-42) oligomer injection, free radical levels were 148 and 132% of control, respectively (Fig. 5). Interestingly, no production of free radicals has been detected in both cerebral cortex and cerebellum, whereas the higher increase of free radical production has been detected in the olfactory bulbs (Fig. 5). It is noteworthy that this increase in free radical production induced by soluble Aβ oligomers is transient. Indeed, no production of free radicals was detected in brain of mice 5 days after soluble Aβ oligomer injection (data not shown). These results suggest that there are regional differences in the vulnerability to soluble Aβ oligomers, probably depending on different antioxidant capacity and/or to the presence of variable activity of antioxidant enzymes in these areas, as previously reported [3,7,72].

Soluble oligomers of Aβ3(pE)-42 induce degeneration and cell death in primary cortical neurons - We next investigated the effects of soluble Aβ3(pE)-42 oligomers on *in vitro* neuronal viability. Neurotoxicity was first determined after 24 and 48 h of incubation with Aβ peptides by monitoring the mitochondrial reduction activity using the MTT assay (Fig. 6A). Treatment of neurons with 1 µM soluble Aβ3(pE)-42 induced a time-dependent decrease in

neuron viability (34.5 and 51.8% ($p < 0.05$) reductions relative to control cells after 24 and 48 h of treatment, respectively). Interestingly, soluble Aβ3(pE)-42 oligomers displayed similar level of neurotoxicity as compared to Aβ(1-42) oligomers, both exhibiting significantly higher toxicity than Aβ(1-40) oligomers after a 24-h incubation (Fig. 6A). These results have been confirmed by measurement of cell viability using the calcein assay (Fig. 6B) and measurement of LDH released (data not shown). Soluble Aβ3(pE)-42 neurotoxicity was also dose-dependent. Moreover, Fig. 6C displays a dose-dependent decrease in neuron viability after a 24-h exposure to increasing Aβ3(pE)-42 concentrations (15.2 and 41.6% ($p < 0.05$) reduction relative to control at 0.5 and 5.0 µM, respectively). We then investigated the neurotoxicity of fibrillar aggregates of Aβ3(pE)-42. Fibrillar Aβ3(pE)-42 peptide was prepared as previously described [70]. Under similar experimental conditions, fibrillar Aβ3(pE)-42 was less toxic than the soluble oligomeric form and required longer incubation times to induce similar level of cell death. Indeed, cells exposed for 24 and 48 h to 1 µM fibrillar Aβ3(pE)-42 exhibited a decrease in viability of 21.5% and 39.0%, respectively ($p < 0.05$, as compared to soluble Aβ3(pE)-42). Altogether, these data demonstrated that soluble Aβ3(pE)-42 oligomers exhibited similar kinetics and dose-dependent neurotoxicity than those described previously for soluble Aβ(1-42) oligomers (present data and in [56, 70]). In contrast, under the same experimental conditions, Aβ(42-1) peptide was not toxic to cortical neurons (data not shown). In accordance with this results, neurons exposed to 1 µM soluble Aβ3(pE)-42 oligomers for 24 and 48 h exhibited hallmarks of degeneration (Fig. 7), as did neurons treated under similar experimental conditions with soluble Aβ(1-42) or Aβ(1-40) oligomers. Cells treated with Aβ(42-1) were not different from control (not shown).

Soluble oligomers of Aβ3(pE)-42 induce an oxidative stress- and phospholipase A_2-dependent neuronal apoptosis - We next investigated the molecular mechanisms associated with soluble Aβ3(pE)-42-mediated cell death. We recently demonstrated the critical role of a redox-sensitive cytosolic calcium-dependent $cPLA_2$-arachidonic acid pathway in Aβ(1-42) oligomer-induced neuronal apoptosis [39,47]. Morphological examination of neuron nuclei stained with DAPI showed that cells exposed to 1 µM Aβ3(pE)-42 for 24 h presented a typical apoptotic morphology, with condensed chromatin and fragmentation of nuclei (Fig. 8). Neurons exposed to Aβ3(pE)-42 exhibited around 47.5% apoptotic nuclei, whereas at most 12% were found in control cells (Fig. 8). Similar results have been obtained when treating cells with either soluble Aβ(1-40) or Aβ(1-42) oligomers (Fig. 8), whereas Aβ(42-1) used as control had no effect.

Interestingly, the presence of 50 µM caspase inhibitor acetyl-ZVAD-fmk rescued mice

neurons from soluble Aβ3(pE)-42 oligomer-induced cell death (Fig. 9A) and apoptosis (Fig. 9B). We previously demonstrated that cell death mediated by Aβ(1-42) oligomers involved activation of both caspase-3 and caspase-9 [47,70]. It is worth to note here that a 6-h incubation of neurons with 1 μM soluble Aβ3(pE)-42 oligomers increased the caspase-3 and caspase-9 activities by 7.5 ± 1.3 and 8.3 ± 2.1 fold, respectively ($p < 0.005$ as compared to control cells). Moreover, a 2-h preincubation of cells with 1 mM Trolox, an antioxidant molecule, significantly reduced soluble Aβ3(pE)-42-induced toxicity to 9.5 ± 1.2% ($p < 0.05$, as compared to Aβ3(pE)-42 alone) (Fig. 9A). A similar antioxidant effect was also involved in the protection from Aβ3(pE)-42 neurotoxicity by N-acetyl-cysteine. Indeed, a 2-h preincubation with 0.5 mM N-acetyl-cysteine limited to only 12.8±1.9% the viability decrease upon Aβ3(pE)-42 exposure ($p < 0.05$, as compared to Aβ3(pE)-42 alone). Finally, the presence of the specific $cPLA_2$ inhibitor MAFP rescued cells from soluble Aβ3(pE)-42 oligomer-induced cell death (Fig. 9A) and apoptosis (Fig. 9B). These neuroprotective effects of both antioxidant molecules and MAFP were similar to those observed in our previous manuscripts describing the molecular mechanisms associated with soluble Aβ(1-42)-induced neurotoxicity [39,47]. Altogether, these results suggest that soluble Aβ3(pE)-42 oligomers are likely to induce a caspase- and oxidative stress-dependent neuronal apoptosis involving the activation of a $cPLA_2$-arachidonic acid pathway.

DISCUSSION

Several findings, including ours, indicate that soluble, small and diffusible Aβ oligomers are the earliest and most toxic agents of AD [34,56,70,81]. In oligomeric form, Aβ produces functional and structural neuronal damages [21,39,45,47]. In brain from AD and Down syndrome patients, two major species of soluble Aβ have been identified: the full-length form, Aβ(1-42), and several N-terminal truncated Aβ forms, Aβ(3-42), (11-42) and (17-42) [40,54,59,63]. Among them, the pyroglutamate-containing isoform at position 3 represents the prominent form – approximatively 50% of the total Aβ amount – of the N-truncated Aβ from AD brain [25,29,49,51,62]. These N-truncated Aβ species are more prominent in familial AD patients carrying presenilin-1 mutations than in sporadic AD, strongly suggesting that the ratio of soluble Aβ species may dictate their relative toxicity and subsequent progression of AD pathology [54,74]. This evidence provides clues for a pivotal role of soluble Aβ3(pE)-42

oligomers in the early stages of AD pathogenesis [78]. However, relatively little is known about the molecular mechanisms of their neurotoxicity and to date, their *in vivo* effects have not been addressed. In the present paper, we demonstrated significant cognitive deficits that are directly attributable to soluble Aβ3(pE)-42 oligomers. Indeed, Aβ3(pE)-42 oligomers strongly impair learning and memory in mice when injected intracerebroventricularly, and their effects are characterized by rapid onset and high potency. Our combined biochemical and cognitive analysis provide the first direct behavioral data supporting the emerging hypothesis that diffusible oligomers of N-terminal-truncated Aβ are responsible for important components of neuronal dysfunction leading up to or associated with AD [54,78]. Accordingly, our *in vitro* data show that soluble Aβ3(pE)-42 oligomers induce a redox-sensitive apoptotic neuronal cell death involving the activation of caspases and a $cPLA_2$-arachidonic acid pathway.

The importance of apoptosis in AD pathogenesis has been strongly supported by evidence describing increased TUNEL staining and caspase activation in AD brain [24,26,31,68]. Alteration of synaptic activity, modifications of the neuronal cytoskeleton network and axonal transport, and subsequent neuronal loss (essentially by an apoptotic-like pathway) represent major cellular insults occurring at early stages of the disease [80]. 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 [46]. 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 [13,17]. Indeed, some experimental studies report the presence of activated forms of caspases and the accumulation of caspase-derived products in *post-mortem* AD brain tissue, similarly to what was observed in *in vitro* models of Aβ neurotoxicity [58,73].

Efforts to elucidate the molecular mechanisms of the N-truncated Aβ-induced neurodegeneration have been mainly conducted using fibrillar Aβ peptides and mainly focused on comparison between toxicity levels of N-truncated *vs.* full-length Aβ peptides [30,55]. These studies present heterogeneous results about the toxicity of fibrillar forms of N-truncated Aβ peptides, likely reflecting variations in the experimental procedures used. For instance, two previous reports on pyroglutamyl-Aβ presented contrasting conformational data by circular dichroism studies. The pyroglutamyl modification was described in [30] to induce an increase in β-sheet content faster than that detected in the full-length forms. By contrast, no significant differences were detected in β-sheet content between full-length and pyroglutamyl-Aβ in [77]. Interestingly, these authors also described similar toxicity levels between fibrillar Aβ3(pE)-42 and Aβ(1-42) peptides in neurons, while a more recent study emphasized a significant effect of

the pyroglutamyl modification in enhancing neuronal toxicity [61]. However, no information are yet available regarding the mechanism of neuronal cell death induced by Aβ3(pE)-42 peptide. Our present data strongly support the notion that Aβ3(pE)-42 and Aβ(1-42) induce similar intracellular pathways leading to neuronal apoptosis. Indeed, the neurotoxicity of both Aβ forms displays same kinetics and dose-dependence, and is similarly inhibited by either caspase inhibitors, antioxidant molecules or the $cPLA_2$ specific inhibitor MAFP (Fig. 8). As previously described for soluble Aβ(1-42) oligomers [39,47], it is likely that Aβ3(pE)-42 might affect neuronal viability by inducing a redox-sensitive $cPLA_2$-arachidonic acid pathway. The exact cellular target of soluble Aβ3(pE)-42 oligomers is yet unidentified. However, the highly pathogenic effect of Aβ3(pE)-42 oligomers as been recently ascribed to their ability to alter the membrane structure and permeability of liposomes [54]. Accordingly, we previously provided evidence that N-truncated Aβ(x-42), as well as Aβ(1-42), peptides displayed fusogenic and membrane perturbating properties in a conformation-dependent manner [57]. This is corroborated by a recent observation suggesting that soluble oligomers from many types of amyloidogenic proteins and peptides increase membrane conductance in a conformation-specific fashion [34].

Additionally, we provide evidence that soluble Aβ3(pE)-42 oligomers are more toxic to neurons than a fibrillar Aβ3(pE)-42 preparation, as previously described for Aβ(1-40) and Aβ(1-42) peptides [21,35,39,56]. These results emphasize our previous observations leading to consider that different molecular mechanisms and cellular targets are involved in the cell death induced by soluble oligomers *vs.* aggregates of Aβ peptide [47,70,71]. These data have recently been corroborated by studies underlying differential effects of soluble oligomeric and fibrillar Aβ on astrocyte-mediated inflammation as well as neuronal viability [16,84].

Mimicking the chronic *in vivo* accumulation of soluble N-truncated 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 the process of 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 [34,40]. Quantitative analysis of soluble Aβ demonstrated the presence of an average amount of 1.5 µg/g of tissue in frontal cortex of AD cases, while only 2 ng/g of tissue are detectable in normal brain [74]. One hypothesis may be that soluble Aβ oligomers can reach local micromolar concentration *via* biological processes that confine Aβ3(pE)-42 oligomers to discrete areas. Accordingly, in AD brain sections, oligomer-specific

antibodies have identified antigens at locations distinct from neuritic plaques [34], establishing the *in situ* presence of oligomers independent of fibrils. Indeed, it has been clearly demonstrated the selective accumulation of Aβ oligomers within dendritic arbors, targeting synapses [27,42]. Finally, Aβ oligomers extracted from AD brain were found indistinguishable from synthetic oligomeric preparations with respect to isoelectric point, recognition by conformation-sensitive antibody, and selective dendritic binding [27,42]. These will be important areas of investigation to fully understand the concentration of soluble Aβ3(pE)-42 oligomers needed to induce pathologic changes, which is unknown to date. It is therefore crucial to mimic this process in order to better characterize the signaling apoptotic pathway(s) involved in Aβ3(pE)-42 -mediated cell death.

Dysfunction of synaptic integrity and plasticity is indeed a typical and early function-related event in the AD pathogenesis [65]. Soluble Aβ3(pE)-42 oligomers have been hypothesized, but never directly proven, to mediate aspects of memory loss and cognitive impairment in transgenic mice models of AD, independently to senile plaque formation [8,75]. We demonstrated here for the first time that icv injection of a low dose of soluble Aβ3(pE)-42 oligomers impaired spatial working memory in the Y-maze tasks and retention of reference memory in the water-maze task. It is well known that the spatial memory in these learning paradigms requires integrative control function of the hippocampus. Our results suggest that soluble Aβ3(pE)-42 oligomers, and also the full-length 1-42 peptide, might cause impairments of hippocampal synaptic integrity and plasticity as well as cognitive functions. Our results are supported by recent findings that icv infusion of cultured cell-derived Aβ oligomers causes, by yet unknown mechanisms, acute suppression of long-term potentiation in the hippocampus *in vivo* and subsequent cognitive abnormality in the rat [11,12,36]. In previous studies, intracerebral injections in mice or rat of fibrillar or oligomeric forms of either Aβ(1-42), Aβ(1-40) or Aβ(25-35) exerted LTP-dependent deleterious effects on learning behavior [14,15,23,79,85]. Albeit these studies support the hypothesis of the involvement of cholinergic and inflammatory mechanisms in the biochemical and behavioral effects of soluble Aβ *in vivo* [4,10], the pathophysiological mechanisms of Aβ-induced deficit in LTP remain largely unknown. *In vitro*, we demonstrate here that soluble Aβ3(pE)-42 oligomers induced neuronal apoptosis by a mechanism involving an oxidative stress. In our experimental paradigm, it is thus necessary to consider in further studies whether soluble Aβ3(pE)-42 oligomers placed exogenously in ventricles diffuse sufficiently into hippocampal parenchyma and at which sites they act to influence synaptic and neuronal activities.

A central message of our data is that subtle brain dysfunction that occurs in presymptomatic

stages of AD might be related to early accumulation of Aβ3(pE)-42 oligomers and might therefore be reversible with appropriate interventions before widespread neuronal degeneration. Accordingly, preventing Aβ3(pE)-42 oligomers from accumulating by inhibiting their assembly, promoting their clearance or reducing monomer production, are all rational therapeutic goals.

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

Disclosure Statement: Authors of the present manuscript confirmed that no conflicts of interest exist.

REFERENCES

[1] Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. Neurosci Lett 2001;302:141-5.

[2] Anderson AJ, Su JH, Cotman CW. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. J Neurosci 1996;16:1710-9.

[3] Arnaiz SL, Travacio M, Llesuy S, Arnaiz GRL. Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. Neurochem Res 1998;23;1477-83.

[4] Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. Prog Neurobiol 2002;68:209-45.

[5] Butterfield DA. Amyloid β-peptide (1-42)-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences. Curr Med Chem 2003;10:2651-9.

[6] Butterfield DA, Boyd-Kimball D. The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid β-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. Biochim Biophys Acta 2005;1703:149-6.

[7] Cardoso-Pelaez F, Song S, Parthasarathy A, Hazzi C, Naidu K, Sanches-Ramos J.

Oxidative DNA damage in the aging mouse brain. Mov Disord 1999;14:972-80.

[8] Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdeux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Aβ42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. Am J Pathol 2004;165:1289-300.

[9] Chang L, Bakhos L, Wang Z, Venton DL, Klein WL. Femtomole immunodetection of synthetic and endogenous amyloid-β oligomers and its application to Alzheimer's disease drug candidate screening. J Mol Neurosci 2003;20:305-13.

[10] Chen L, Yamada K, Nabeshima T, Sokabe M. α7 Nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in β-amyloid infused rats. Neuropharmacol 2006;50:254-68.

[11] Cleary J, Hittner JM, Semotuk M, Mantyh P, O'Hare E. β-Amyloid(1-40) effects on behavior and memory. Brain Res 1995;682:69-74.

[12] Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. Natural oligomers of the amyloid-β protein specifically disrupt cognitive function. Nat Neurosci 2005;8:79-84.

[13] Cribbs DH, Poon WW, Rissman RA, Blurton-Jones M. Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease. Am J Pathol 2004;165:353-5.

[14] Cullen WK, Wu J, Anwyl R, Rowan MJ. β-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus. NeuroReport 1996;8:87-92.

[15] Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, Rowan MJ. Block of LTP in rat hippocampus *in vivo* by β-amyloid precursor protein fragments. NeuroReport 1997;8:3213-7.

[16] Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-β peptides differentially affect neuronal viability. J Biol Chem 2002;277:32046-53.

[17] Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? J Clin Invest 2004;114:23-7.

[18] Driver AS, Kodavanti PRS, Mundy WR. Age-related in reactive oxygen species

production in rat brain homogenates. Neurotoxicol Teratol 2000;22:175-81.

[19] Drouet B, Pinçon-Raymond M, Chambaz J, Pillot T. Molecular basis of Alzheimer's disease. Cell Mol Life Sci 2000;57:705-15.

[20] Estus S, Tucker HM, van Rooyen C, Wright S, Brigham EF, Wogulis M, Rydel RE. Aggregated amyloid-β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. J Neurosci 1997;17:7736-45.

[21] Fifre A, Sponne I, Koziel V, Kriem B, Yen Potin FT, Bihain BE, Olivier JL, Oster T, Pillot T. Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid β-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. J Biol Chem 2006;281:229-40.

[22] Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanyé MC, Fifre A, Sponne I, Leininger-Muller B, Olivier JL, Pillot T, Oster T. Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-β oligomers. J Neurochem 2006;96:385-95.

[23] Frautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME, Cole GM. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Aβ-induced cognitive deficit and neuropathology. Neurobiol Aging 2001;22:993-1005.

[24] Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, KhanK, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β-amyloid precursor protein. Nature 1995;373:523-7.

[25] Geddes JW, Tekirian TL, Mattson MP. N-terminus-truncated β-amyloid peptides and C-terminus-truncated secreted forms of amyloid precursor protein: distinct roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 1999;20:75-9.

[26] Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D, Rigby M, Shearman MS, Clarke EE, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Ruffolo SC, Thornberry NA, Xanthoudakis S, Zamboni RJ, Roy S, Nicholson DW. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-β precursor protein and

amyloidogenic Aβ peptide formation. Cell 1999;97:395-406.

[27] Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric Aβ ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:10417-22.

[28] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science 1992; 256:184-5.

[29] Harigaya Y, Saido TC, Eckman CB, Prada CM, Shoji M, Younkin SG. Amyloid β protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. Biochem Biophys Res Commun 2000;276:422-7.

[30] He W, Barrow CJ. The Aβ 3-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater β-sheet forming and aggregation propensities *in vitro* than full-length Aβ. Biochemistry 1999; 38:10871-7.

[31] Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. Nat Med 1998;4:97-100.

[32] Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:3228-33.

[33] Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with pre-served mental status and numerous neocortical plaques. Ann Neurol 1988;23:138-44.

[34] Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. J Biol Chem 2004;279:46363-6.

[35] Kim HJ, Chae SC, Lee DK, Chromy B, Lee SC, Park YC, Klein WL, Krafft GA, Hong ST. Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid β-protein.

FASEB J 2003;17:118-20.

[36] Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V, Spooner ET, Jiang L, Anwyl R, Selkoe DJ, Rowan MJ. Amyloid β protein immunotherapy neutralizes Aβ oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. Nat Med 2005;11:556-61.

[37] Koistinaho M, Kettunen MI, Goldsteins G, Keinanen R, Salminen A, Ort M, Bures J, Liu D, Kauppinen RA, Higgins LS, Koistinaho J β-Amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse Aβ deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:1610-5.

[38] Koistinaho M, Ort M, Cimadevilla JM, Vondrous R, Cordell B, Koistinaho J, Bures J, Higgins LS. 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 2001;98:14675-80.

[39] Kriem B, Sponne I, Fifre A, Malaplate-Armand C, Lozac'h-Pillot K, Koziel V, Yen-Potin FT, Bihain B, Oster T, Olivier JL, Pillot T. Cytosolic phospholipase A_2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-β peptide. FASEB J 2005;19:85-7.

[40] Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, Kasunic TC, Kirkpatrick JB, Murdoch GH, Ball MJ, Roher AE. Water-soluble Aβ (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. J Biol Chem 1996;271:4077-81.

[41] Kuo YM, Emmerling MR, Woods AS, Cotter RJ, Roher AE. Isolation, chemical characterization, and quantitation of Aβ 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. Biochem Biophys Res Commun 1997;237:188-91.

[42] Lacor P., Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid β oligomers. J Neurosci 2004;24:10191-200.

[43] Lalowski M, Golabeck A, Lemere CA, Selkoe DJ, Wisniewski HM, Beavis RC, Frangione B, Wisniewski T. The non amyloidogenic p3 fragment (amyloid β17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar pre-amyloid. J Biol Chem 1996;271:33623-31.

[44] Larner AJ. Truncated amyloid-β-peptides in AD. Neurobiol Aging 1999;20:87.

[45] Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change

in Alzheimer's disease. Am J Pathol 1999;155:853-62.

[46] Lukiw WJ. Gene expression profiling in fetal, aged, and Alzheimer hippocampus: a continuum of stress-related signaling. Neurochem Res 2004;29:1287-97.

[47] Malaplate-Armand C, Florent-Bechard S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier JL, Oster T, Pillot T. Soluble oligomers of amyloid-β peptide induce neuronal apoptosis by activating a $cPLA_2$-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. Neurobiol Dis 2006;23:178-89.

[48] McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. Soluble pool of β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. Ann Neurol 1999;46:860-6.

[49] Miravalle L, Calero M, Takao M, Roher AE, Ghetti B, Vidal R. Amino-terminally truncated Aβ peptide species are the main component of cotton wool plaques. Biochemistry 2005;44:10810-10821.

[50] Montine TJ, Morrow JD. Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Am J Pathol 2005;166:1283-9.

[51] Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe DJ. Mass spectrometry of purified amyloid β protein in Alzheimer's disease. J Biol Chem 1992;267:17082-6.

[52] Morris R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Meth 1984;11:47-60.

[53] Perry G, Nunomura A, Hirai K, Zhu X, Perez M, Avila J, Castellani RJ, Atwood CS, Aliev X, Sayre LM, Takeda A, Smith MA. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? Free Radical Biol Med 2002;33:1475-9.

[54] Piccini A, Russo C, Gliozzi A, Reline A, Vitali A, Borghi R, Giliberto L, Armirotti A, D'Arrigo C, Bachi A, Cattaneo A, Canale C, Torroassa S, Saido TC, Markesbery W, Gambetti P, Tabaton M. β-Amyloid is different in normal ageing and in Alzheimer disease. J Biol Chem 2005; 280:34186-92.

[55] Pike CJ, Overman MJ, Cotman CW. Amino-terminal deletions enhance aggregation of β-amyloid peptides in vitro. J Biol Chem 1995;270:23895-8.

[56] Pillot T, Drouet B, Queillé S, Labeur C, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Pinçon-

Raymond M, Chambaz J. The non-fibrillar amyloid β-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. J Neurochem 1999;73:1626-34.

[57] Pillot T, Goethals M, Vanloo B, Talussot C, Brasseur R, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Lins L. Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer β-amyloid peptide. J Biol Chem 1996;271:28757-65.

[58] Rohn TT, Head E, Su JH, Anderson AJ, Bahr BA, Cotman CW, Cribbs DH. Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. Am J Pathol 2001;158:189-98.

[59] Russo C, Saido TC, DeBusk LM, Tabaton M, Gambetti P, Teller JK. Heterogeneity of water-soluble amyloid β-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. FEBS Lett 1997;409:411-6.

[60] Russo C, Schettini G, Saido TC, Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M, Teller JK. Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. Nature 2000;405:531-532.

[61] Russo C, Violani E, Salis S, Venezia V, Dolcini V, Damonte G, Benatti U, D'Arrigo C, Patrone E, Carlo P, Schettini G. Pyroglutamate-modified amyloid β-peptides - AβN3(pE) - strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. J Neurochem 2002;82:1480-9.

[62] Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S. Dominant and differential deposition of distinct β-amyloid peptide species, Aβ N3(pE), in senile plaques. Neuron 1995;14:457-66.

[63] Saido TC, Yamao-Harigaya W, Iwatsubo T. Kawashima S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of β-amyloid peptides deposited in human brain. Neurosci Lett 1996;215:173-6.

[64] Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and agonist betacarbolines. Psychopharmacology 1988;94:491-5.

[65] Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science 2002;298:789-91.

[66] Selkoe DJ. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. Ann Intern Med 2004;140:627-38.

[67] Shirotani K, Tsubuki S, Lee HJ, Maruyama K, Saido TC. Generation of amyloid β peptide with pyroglutamate at position 3 in primary cortical neurons. Neurosci Lett 2002;327:25-8.

[68] Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE Jr. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. Exp Neurol 1995;133:225-30.

[69] Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N. Oxidative damage in Alzheimer's. Nature 1996;382:120-1.

[70] Sponne I, Fifre A, Drouet B, Klein C, Koziel V, Pinçon-Raymond M, Olivier JL, Chambaz J, Pillot T. Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-β peptide proceeds through an early ROS-dependent cytoskeleton perturbation. J Biol Chem 2003;278:3437-45.

[71] Sponne I, Fifre A, Koziel V, Oster T, Olivier JL, Pillot T. Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-β peptide. FASEB J 2004;18:836-8.

[72] Sriram K, Pai KS, Boyd MR, Ravindranath V. Evidence for generation of oxidative stress in the brain by MPTP: *in vitro* and *in vivo* studies in mice. Brain Res 1997;749:44-52.

[73] Su JH, Zhao M, Anderson AJ, Srinivasan A, Cotman CW. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. Brain Res 2001;898:350-7.

[74] Tabaton M, Piccini A. Role of water-soluble amyloid-β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Int J Exp Pathol 2005;86:139-45.

[75] Tekirian TL. Commentary: Aβ N-Terminal isoforms: critical contributors in the course of AD pathophysiology. J Alzheimer Dis 2001;3:241-8.

[76] Tekirian TL, Saido TC, Markesbery WR, Russell MJ, Wekstein DR, Patel E, Geddes JW. N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular Aβ deposits. J Neuropathol Exp Neurol 1998;57:76-94.

[77] Tekirian TL, Yang AY, Glabe C, Geddes JW. Toxicity of pyroglutaminated amyloid β-peptides 3(pE)-40 and -42 is similar to that of Aβ1-40 and -42. J Neurochem 1999;73:1584-9.

[78] Teplow DB. Truncating the amyloid cascade hypothesis: the role of C-terminal Aβ

peptides in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 1999;20:71-3.

[79] Tohda C, Tamura T, Komatsu K. Repair of amyloid β(25-35)-induced memory impairment and synaptic loss by a Kampo formula, Zokumei-to. Brain Res 2003;990:141-7.

[80] Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurosci 2003;4:365-75.

[81] Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibited hippocampal long-term potentiation *in vivo*. Nature 2002;416:535–9.

[82] Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, Trommer BL. Soluble oligomers of β amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate girus. Brain Res 2002;924:133–40.

[83] Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. The levels of soluble versus insoluble brain Aβ distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. Exp Neurol 1999;158:328–37.

[84] White JA, Manelli AM, Holmberg KH, Van Eldik LJ, Ladu MJ. Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-β 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. Neurobiol Dis 2005;18:459-65.

[85] Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, Suh HW, Kim YH, Song DK. Protection against β-amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. British J Pharmacol 2001;133:89-96.

[86] Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. Reduced neprilysin in high plaques areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of β-amyloid peptide. Neurosci Lett 2001;297:97-100.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Experimental schedule of behavioral performance follow-up

Fig. 2. Soluble Aβ oligomer-induced impairment in spatial memory in mice. After injection of soluble Aβ oligomers (500 pmol), Y-maze tests were performed as shown in Fig. 1. Spontaneous alternation behavior (*A*) and the number of arm entries (*B*) were measured during a 5-min session, as described in the Experimental Procedures. The data are presented as means ± SEM (n = 12). Control mice were injected with saline. $P < 0.05$ *vs.* Aβ(42-1)-treated mice.

Fig. 3. Soluble Aβ oligomer-induced impairment in learning in mice. After injection of soluble Aβ oligomers (500 pmol), Morris water-maze tests were performed as shown in Fig. 1. The training trials were carried out on days 7-11 after Aβ injection. Escape latency (*A*) and total latency in training (*B*) were measured. The latency showed the mean of a block of four trials per day. The data are presented as means ± SEM. (n = 12). Control mice were injected with saline. $P < 0.05$ *vs.* Aβ(42-1)-treated mice.

Fig. 4. Soluble Aβ oligomer-induced impairment in memory in mice. After injection of soluble Aβ oligomers (500 pmol), Morris water-maze tests were performed as shown in Fig. 1. The probe trial was carried out on day 14 after Aβ injection. The percentage of time spent in the platform quadrant (*A*), in the opposite quadrant (*B*), as well as the number of crossing of platform site (*C*) was recorded. The data are presented as means ± SEM (n = 12). Control mice were injected with saline. $P < 0.05$ *vs.* Aβ(42-1)-treated mice. All mice showed normal swimming performance and constant increases in body weight. Locomotor activity did not differ among groups.

Fig. 5. Soluble Aβ3(pE)-42 oligomer-induced a transient generation of free radicals *in vivo*. Mice (n = 4 per group) were icv injected with saline, soluble oligomers of Aβ(3-42) or Aβ(1-42) as described in Fig. 1. Two days after injection, the generation of free radicals was monitored in hippocampus (Hip), cerebral cortex (Cor), cerebellum (Cer) and olfactory bulb (Olf-bul) homogenates as described in the Experimental Procedures. Data are expressed as percentage ± SEM of control (saline) designed as 100%.

Fig. 6. Soluble Aβ3(pE)-42 oligomer-induced neuronal cell death. Neurons were treated for 24 or 48 h with 1 μM soluble Aβ oligomers. Cell survival was monitored by the MTT assay (*A*), as well as by the calcein assay (*B*) as described in the Experimental Procedures. Alternatively, cells were exposed for 24 h to increasing concentrations of soluble Aβ3(pE)-42 oligomers and cell viability was determined using the MTT assay (*C*). Data are means (± SEM) of three independent experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle, designated as 100%. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffe's post hoc test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. No significant differences were found between control and Aβ(42-1)-treated control cells (not shown).

Fig. 7. Neurodegenerative effects of soluble Aβ3(pE)-42 oligomers. Phase contrast micrographs of representative microscopic fields are shown. Mice neurons were incubated for the indicated time with 1 μM soluble Aβ oligomers.

Fig. 8. Soluble Aβ3(pE)-42 oligomer-induced neuronal apoptosis. Neurons were treated for

24 h as described in Fig. 5A. Apoptotic nuclei were visualized after DAPI staining (*A*) and quantified as described in the Experimental Procedures (*B*). Data are means (± SEM) of three independent experiments with four determinations each. Control cells were treated with vehicle in similar experimental conditions. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffe's post hoc test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. No significant differences were found between control and Aβ(42-1)-treated cells (not shown).

Fig. 9. Pharmacological modulation of soluble Aβ3(pE)-42 oligomer-induced neurotoxicity. Cells were preincubated for 2 h in the presence or absence of 1 mM Trolox, 50 μM ZVAD-fmk, or 1 μM MAFP and then exposed to 1 μM soluble Aβ3(pE)-42 oligomers. Soluble Aβ3(pE)-42-induced neurotoxicity was monitored after a 24-h incubation using the MTT assay (*A*), or the measurement of apoptotic nuclei after DAPI staining (*B*). Data are means (± SEM) of three independent experiments with four determinations each. Control cells were treated with vehicle under similar experimental conditions. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffe's post hoc test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

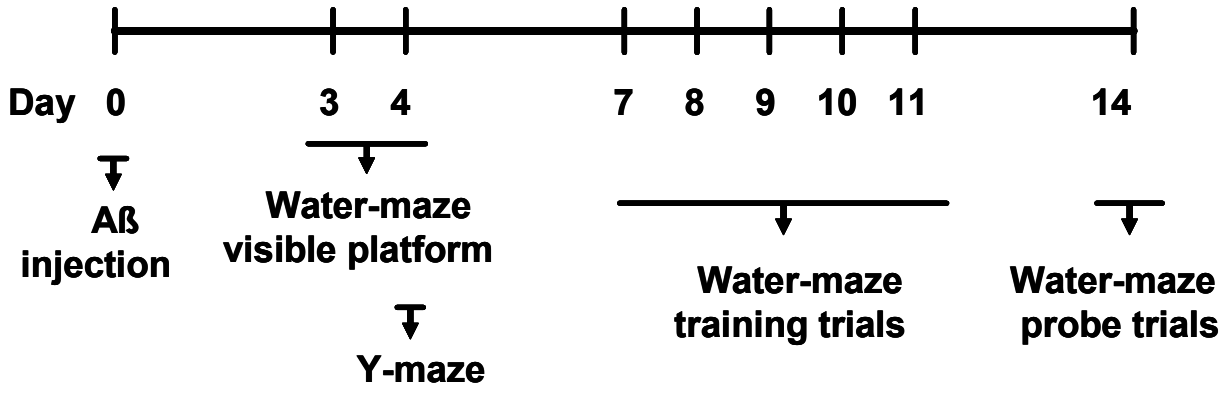

Day 0
3 4
7 8 9 10 11
14
Aß injection
Water-maze visible platform
Y-maze
Water-maze training trials
Water-maze probe trials

Figure 1

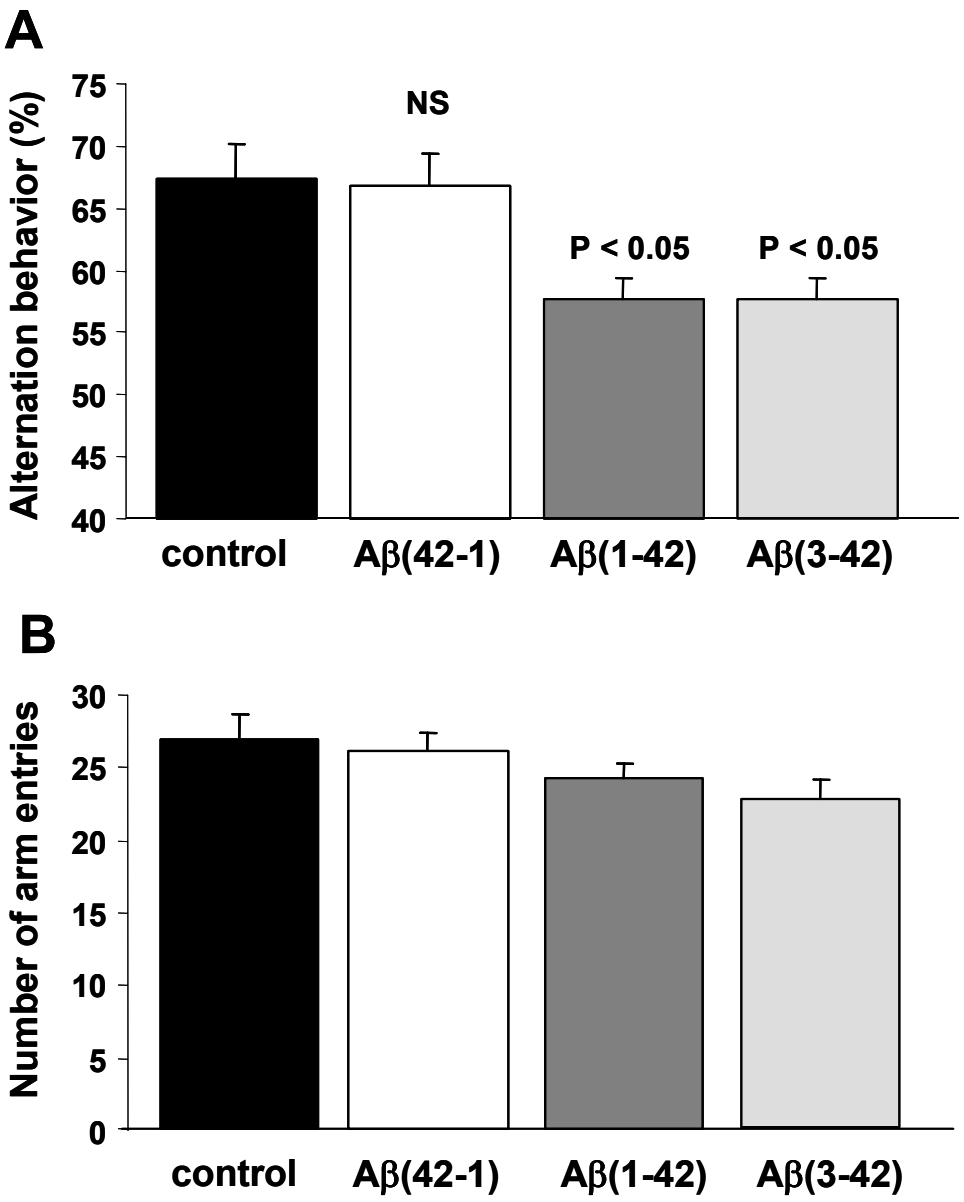

A
Alternation behavior (%)
75
70
65
60
55
50
45
40
NS
P < 0.05
P < 0.05
control
Aβ(42-1)
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
B
Number of arm entries
30
25
20
15
10
5
0
control
Aβ(42-1)
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)

Figure 2

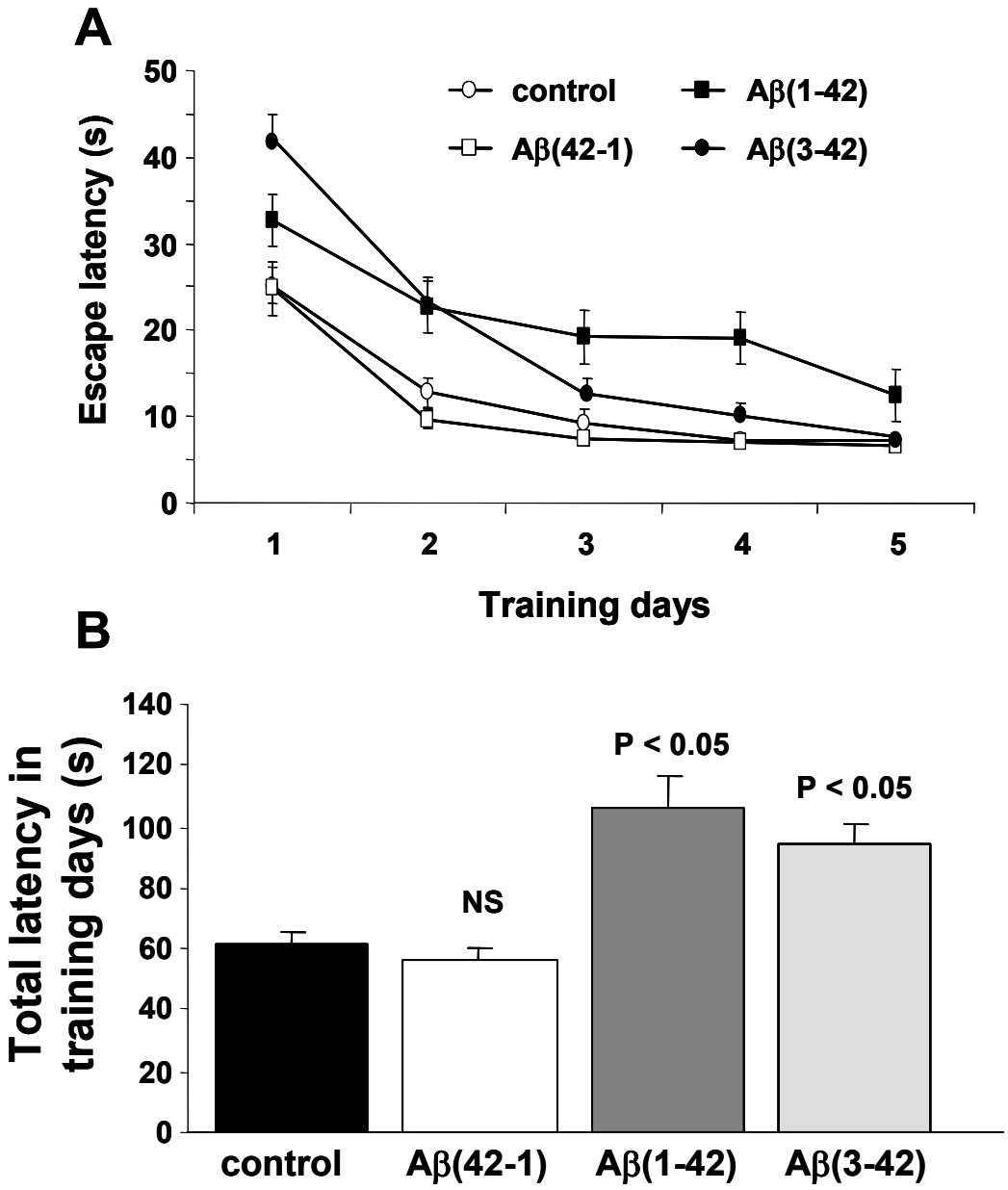

A
Escape latency (s)
50
40
30
20
10
0
control
Aβ(1-42)
Aβ(42-1)
Aβ(3-42)
1
2
3
4
5
Training days
B
Total latency in training days (s)
140
120
100
80
60
40
20
0
NS
P < 0.05
P < 0.05
control
Aβ(42-1)
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)

Figure 3

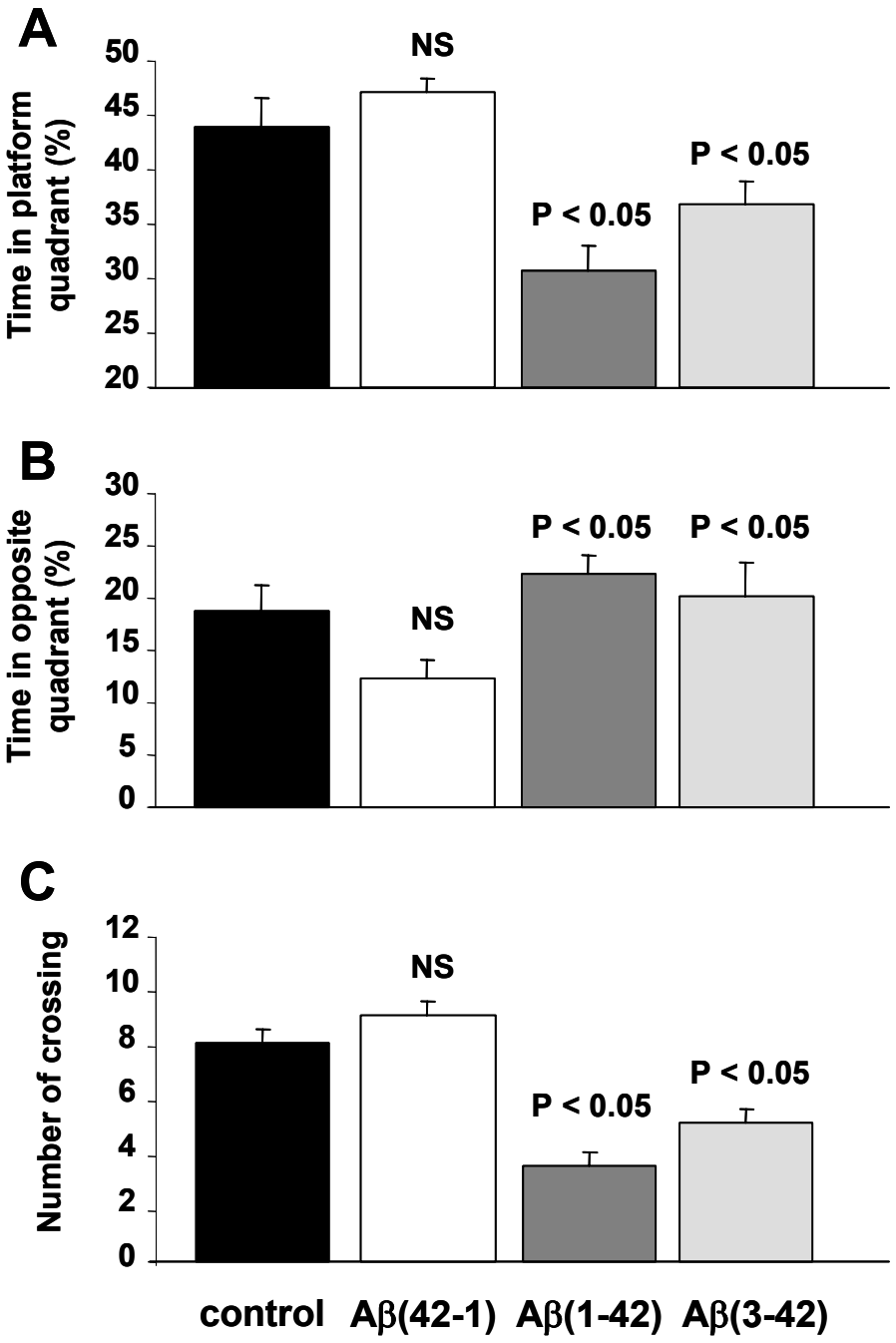

A
Time in platform quadrant (%)
50
45
40
35
30
25
20
NS
P < 0.05
P < 0.05
B
Time in opposite quadrant (%)
30
25
20
15
10
5
0
NS
P < 0.05
P < 0.05
C
Number of crossing
12
10
8
6
4
2
0
NS
P < 0.05
P < 0.05
control
Aβ(42-1)
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)

Figure 4

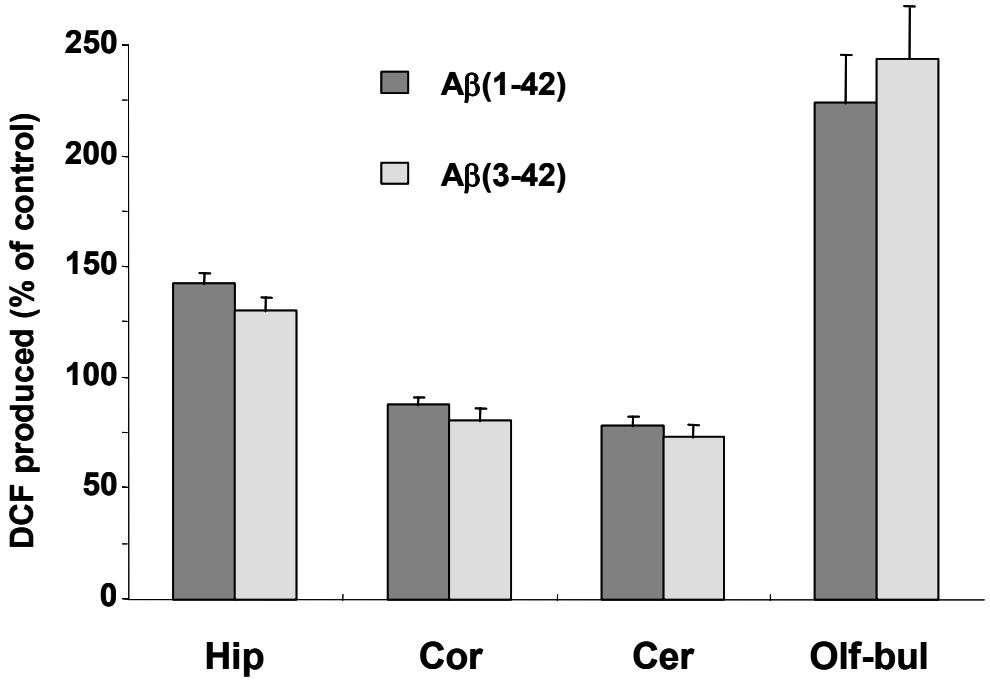

DCF produced (% of control)
250
200
150
100
50
0
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
Hip
Cor
Cer
Olf-bul

Figure 5

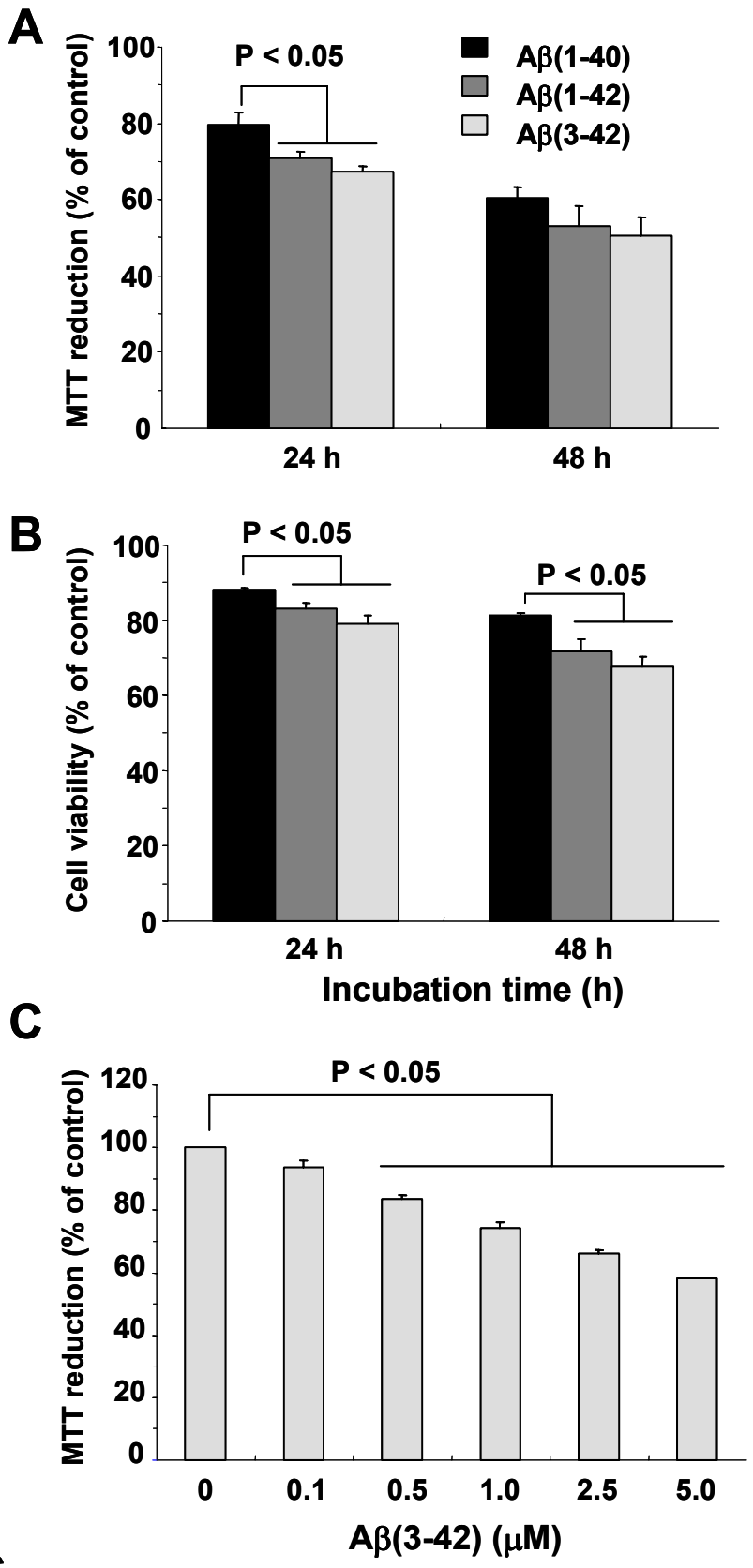

A
MTT reduction (% of control)
100
80
60
40
20
0
P < 0.05
Aβ(1-40)
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
24 h
48 h
B
Cell viability (% of control)
P < 0.05
P < 0.05
24 h
48 h
Incubation time (h)
C
MTT reduction (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
P < 0.05
0
0.1
0.5
1.0
2.5
5.0
Aβ(3-42) (μM)

Figure 6

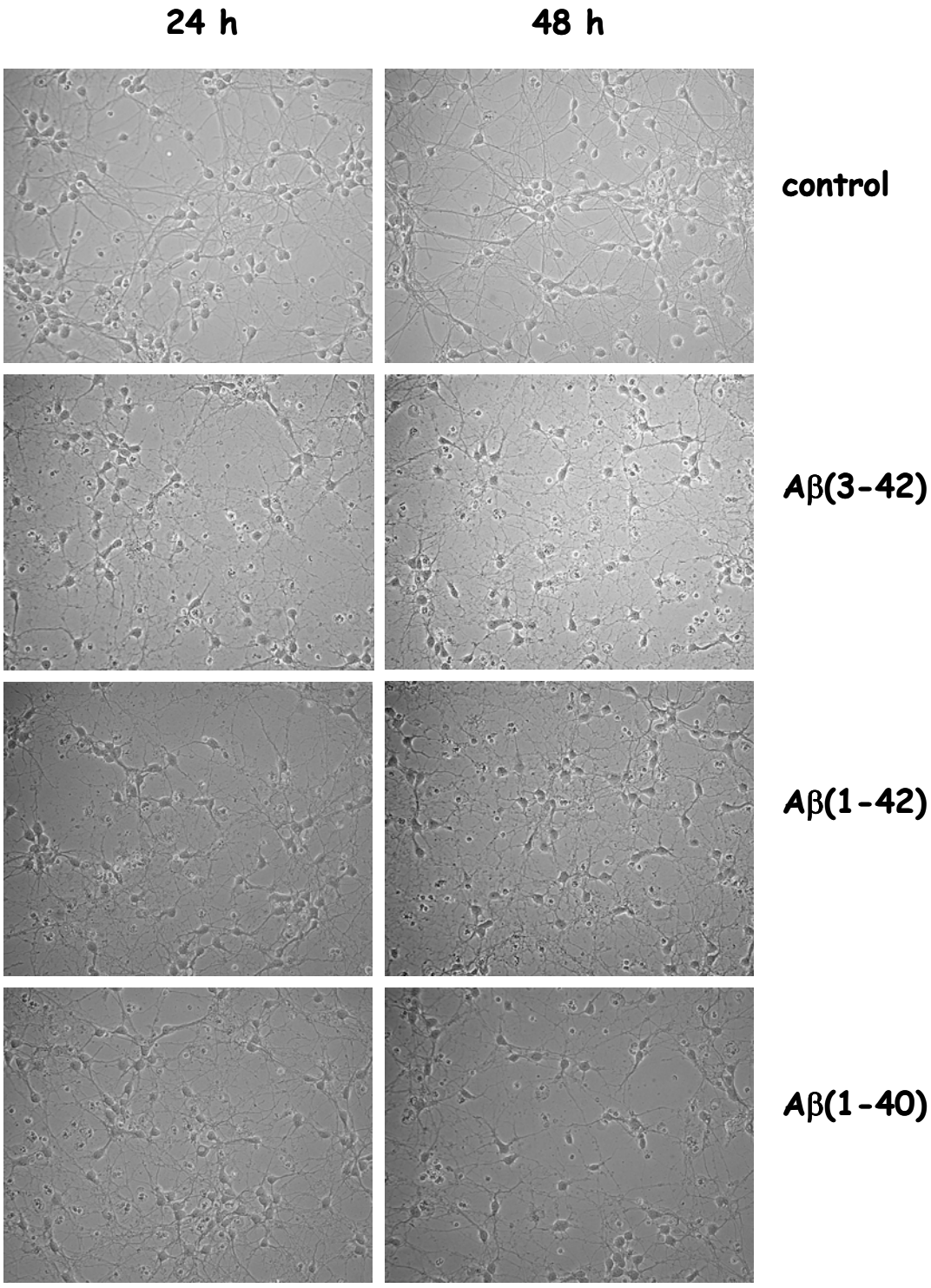


Figure 7

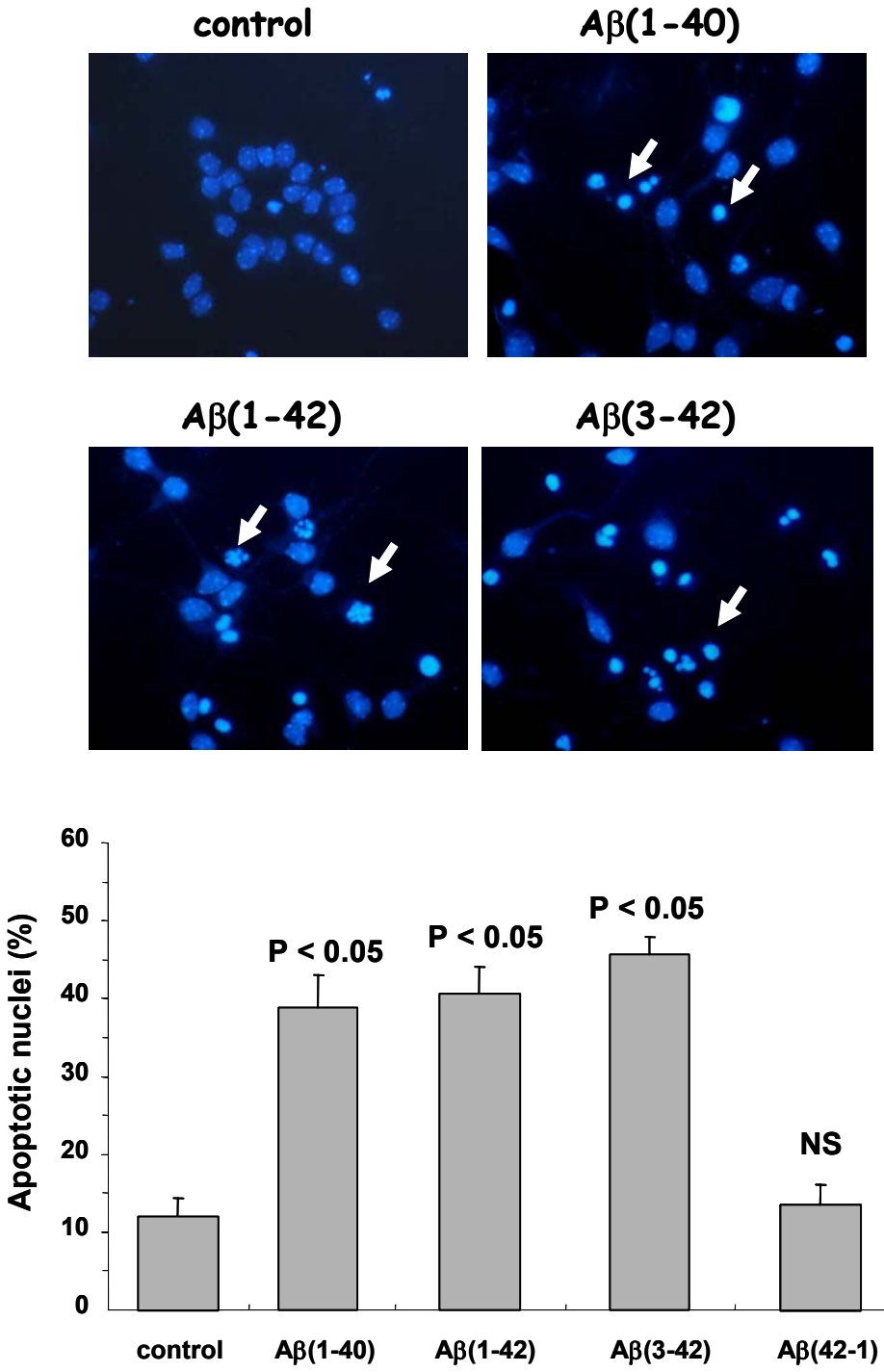

control
Aβ(1-40)
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
Apoptotic nuclei (%)
60
50
40
30
20
10
0
P < 0.05
P < 0.05
P < 0.05
NS
control
Aβ(1-40)
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
Aβ(42-1)

Figure 8

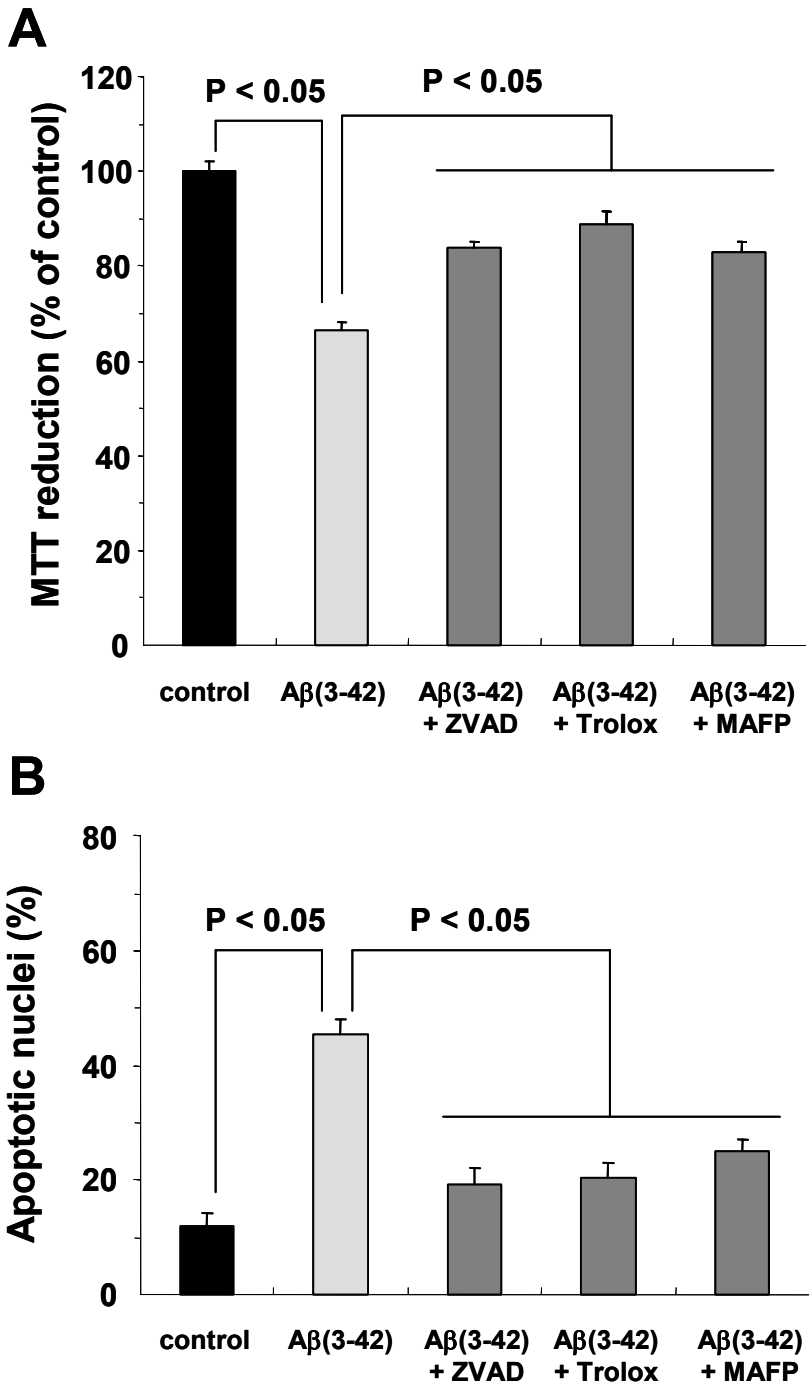

A
MTT reduction (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
P < 0.05
P < 0.05
control
Aβ(3-42)
Aβ(3-42) + ZVAD
Aβ(3-42) + Trolox
Aβ(3-42) + MAFP
B
Apoptotic nuclei (%)
80
60
40
20
0
P < 0.05
P < 0.05
control
Aβ(3-42)
Aβ(3-42) + ZVAD
Aβ(3-42) + Trolox
Aβ(3-42) + MAFP

Figure 9

1.4. Discussion

La compréhension des mécanismes moléculaires associés aux atteintes tissulaires et cellulaires précoces de la MA représente un enjeu majeur vers l'établissement de stratégies préventives et/ou curatives pour cette pathologie. Parmi les questions posées, celle de l'identification de facteurs moléculaires responsables des manisfestations pré-cliniques fait l'objet d'intenses recherches et représente un aspect essentiel à la progression de nos connaissances. Dans ce contexte, la plupart des études se sont focalisées sur les mécanismes moléculaires de neurotoxicité des peptides Aβ(1-40) et (1-42) (160).

Mise en évidence depuis de nombreuses années, la présence (dès les premières phases de la MA) de formes tronquées du peptide Aβ n'a fait l'objet que de peu de travaux, la plupart étant des études descriptives montrant l'hétérogénéité moléculaire au sein du pool de peptide Aβ dans les formes familiales, mais aussi sporadiques de la MA (215 ; 632 ; 637 ; 757). Pourtant, les données cliniques semblent converger vers l'hypothèse que ces formes tronquées, essentiellement des formes correspondant aux peptides Aβ(1-40) et (1-42) tronqués dans leur domaine amino-terminal, soient des acteurs moléculaires importants dans les phases précoces de la physiopathologie de la MA (583). Comme nous l'avons souligné dans notre introduction à ce travail, les mécanismes moléculaires complexes qui régulent la production de ces espèces moléculaires restent à l'heure actuelle mal compris (756). Cependant, ces formes (essentiellment les peptides Aβ3(pE)-40 and Aβ3(pE)-42) représentent une part importante du pool de peptides Aβ soluble, dont l'augmentation est corrélée avec la progression des symptômes cliniques (632 ; 633).

Dans le cadre de nos projets visant à étudier et comprendre les mécanismes neurodégénératifs impliquant les formes solubles et oligomériques de peptide Aβ, nous avons donc choisi de caractériser *in vitro* et *in vivo* la neurotoxicité des oligomères solubles de

peptide Aβ3(pE)-42. Ainsi, nous montrons pour la première fois que le peptide Aβ3(pE)-42) soluble induit des déficits cognitifs chez la souris. En effet, l'injection i.c.v. de faibles quantités d'oligomères solubles de peptides Aβ3(pE)-42 provoque de rapides et intenses perturbations des capacités d'apprentissage et de mémorisation à court terme. Ces travaux représentent la première preuve expérimentale d'une implication possible des formes tronquées de peptide Aβ dans les dysfonctionnements neuronaux induisant ou étant associés aux phases précoces de la MA. A l'aide des tests comportementaux mis en place, nous n'avons pas noté de différence significative entre les atteintes cognitives induites par les peptides Aβ3(pE)-42) et Aβ(1-42) solubles. De plus, la neurotoxicité *in vivo* de ces deux espèces moléculaires semble être associée à l'induction précoce d'un stress oxydant, suggérant des mécanismes moléculaires similaires. Cette hypothèse est partiellement confirmée par nos résultats *in vitro*. En effet, tout comme les oligomères solubles de peptide Aβ(1-42) (106 ; 185 ; 407 ; 587 ; 704), le peptide Aβ3(pE)-42) soluble présente une forte toxicité *in vitro*, induisant une mort neuronale apoptotique dépendante d'un stress oxydant et impliquant l'activation des caspases et de la $cPLA_2$. A l'heure actuelle, nos données cinétiques et d'étude de doses ne nous permettent pas de différencier la mort cellulaire induite par les oligomères solubles de peptides Aβ3(pE)-42) et Aβ(1-42), suggérant des cibles et des mécanismes moléculaires communs.

Les quelques études menées jusqu'alors sur la toxicité *in vitro* des peptides Aβ tronqués dans leur domaine amino-terminal se sont focalisées sur les formes fibrillaires et ont essentiellement eu pour but de comparer les formes Aβ(x-40) et Aβ(x-42) avec les peptides Aβ(1-40) et Aβ(1-42) (586). Les études publiées sont le plus souvent contradictoires, reflétant probablement l'utilisation de méthodes expérimentales différentes en terme de condition d'analyse et de préparation des peptides. Les premiers résultats obtenus tendaient à émettre l'hypothèse que les peptides tronqués présentaient des cinétiques d'agrégation et de cytotoxicité plus rapides que les formes longues. Par exemple, il a été suggéré que la

pyroglutamylation N-terminale du peptide Aβ3(pE)-42) induise une apparition de structures en feuillet β (associées à la fibrillation du peptide Aβ) plus rapide que pour le peptide Aβ(1-42). Une autre étude montre au contraire aucune différence dans le contenu en structure β entre les formes Aβ3(pE)-42) et Aβ(1-42). Ces mêmes auteurs ont montré des niveaux similaires de neurotoxicité entre ces deux formes de peptides Aβ, alors qu'une étude plus récente suggère que la pyroglutamylation N-terminale du peptide Aβ3(pE)-42) est responsable d'une toxicité accrue. Il est à noter que les mécanismes moléculaires impliqués dans la neurotoxicité des peptides Aβ tronqués n'ont pas été étudiés. Nos résultats montrent cependant que les oligomères solubles de peptide Aβ3(pE)-42) présentent une toxicité plus importante que les formes fibrillaires de ce même peptide. Ces résultats, qui sont à rapprocher de nos études prédédentes (185 ; 407 ; 587 ; 704), confortent notre hypothèse selon laquelle les mécanismes moléculaires et les cibles cellulaires impliqués dans la mort neuronale induite par les formes solubles et fibrillaires du peptide Aβ sont différents. D'autres travaux, dont ceux de notre équipe, confirment cette hypothèse (131 ; 374 ; 472 ; 706).

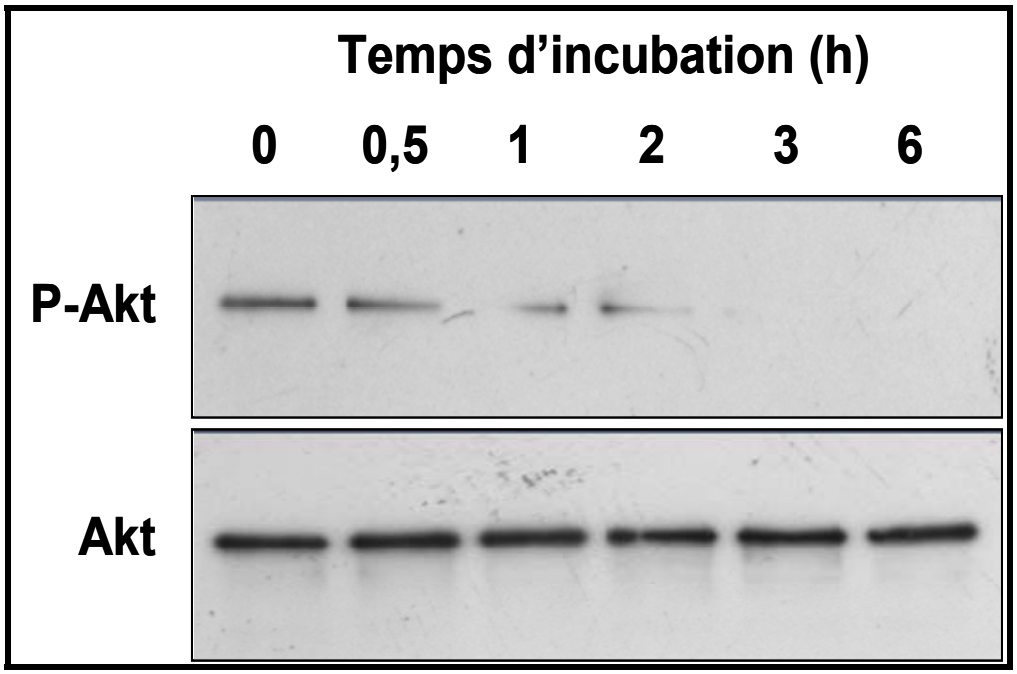
Les mécanismes moléculaires de neurotoxicité des oligomères solubles de peptide Aβ3(pE)-42) sont encore à préciser. Cependant, une étude récente suggère que les effets neurodégénératifs du peptide Aβ3(pE)-42) soluble pourraient être dus à leur capacité d'altérer la structure et le fonctionnement des membranes biologiques. Ainsi, il a été montré qu'*in vitro* le peptide Aβ3(pE)-42) modifie la structure et la perméabilité de liposomes (583). Ces résultats sont à rapprocher de ceux de nos études précédentes montrant que plusieurs peptides de type Aβ(x-42) ainsi que le peptide Aβ(1-42) possèdent des propriétés fusogènes de perturbation de structures membranaires *in vitro* (589). Ces propriétés particulières d'interaction avec les membranes biologiques seraient à l'origine de la cytotoxicité de ces peptides sous forme d'oligomères solubles (587) et suggèrent fortement que la phase lipidique de la membrane plasmique neuronale est la cible initiale. Ainsi, en accord avec nos travaux précédents (92 ;

588 ; 705), il a été montré que la conformation de type "oligomères solubles" de peptides provenant de protéines amyloïdogènes différentes serait une structure commune responsable de la cytotoxicité de ces oligomères *via* la perturbation du fonctionnement des membranes neuronales (226 ; 365).

Les efforts de notre équipe visant à caractériser les mécanismes moléculaires responsables de la neurotoxicité des oligomères solubles de peptide Aβ tendent à montrer qu'en aval de l'activation de la voie de la $cPLA_2$ et de l'acide arachidonique, les voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire sont altérées de façon précoce. Ainsi, nous avons pu montrer que les niveaux d'activation de voies impliquant les protéines p42/44-ERK, Akt/PKB et CREB sont fortement réduits après 6 h d'incubation avec les oligomères solubles de peptides Aβ(1-40) ou Aβ(1-42) (190 ; Malaplate-Armand *et al*., en préparation). Ainsi, nos derniers résultats montrent que les oligomères solubles de peptide Aβ3(pE)-42) induisent une inhibition rapide et pratiquement totale de la voie de signalisation de survie cellulaire impliquant la protéine Akt. Cette inhibition est visualisée sur la Figure 35, qui montre que dès 30 min d'incubation avec le peptide Aβ3(pE)-42) soluble, le taux de protéine Akt active et phosphorylée chute drastiquement. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle les oligomères solubles de peptide Aβ(x-42) possèdent des propriétés apoptotiques mettant en jeu des mécanismes et des cibles cellulaires identiques.

En conclusion de ce travail, nous proposons donc que l'accumulation précoce d'oligomères solubles de peptides Aβ, notamment de peptides Aβ3(pE)-42), pourrait être responsable des dysfonctionnements subtiles du cerveau au cours des phases pré-cliniques de la MA. Ainsi, intervenir afin d'inhiber la production de ces espèces moléculaires, de promouvoir leur élimination du système nerveux central sont des approches intéressantes dans le cadre du développement de thérapies contre la MA. Un autre aspect concerne la modulation directe de la neurodégénérescence induite par ces oligomères solubles. Cela peut concerner

directement l'inhibition des processus de mort neuronale par apoptose et/ou nécrose, ainsi qu'indirectement le maintien des interactions neurones/cellules gliales et l'inhibition des processus inflammatoires. Nous aborderons cet aspect dans la seconde partie de nos résultats.



<u>Figure 35</u> : Les oligomères solubles de peptide Aβ3(pE)-42 perturbent la voie de survie cellulaire impliquant la protéine Akt.

Les cellules ont été incubées avec 1 μM de peptide Aβ3(pE)-42 soluble durant les temps indiqués. Les quantités de protéine Akt totale et de protéine Akt phosphorylée (P-Akt) ont été analysées par immunoblot.

RESULTATS - DEUXIEME PARTIE

L'humanine, un peptide neuroprotecteur

Etude de ses effets *in vivo* et *in vitro*

2. L'humanine, un peptide neuroprotecteur : étude de ses effets *in vivo* et *in vitro*

2.1. Introduction

L'ADNc codant l'humanine (HN) a été isolé par l'équipe de Nishimoto en 2001 (280 ; 281). Ces auteurs ont utilisé une approche nommée *death trap screening* (790). Le principe est de cribler une banque d'expression d'ADNc dans le but d'identifier des fragments d'ADN dont l'expression entraîne une protection vis-à-vis de différents stimuli. Ils ont ainsi choisi de cribler cette banque d'ADNc sur un modèle d'induction de mort cellulaire par apoptose consistant en des cellules neuronales F11 exprimant de façon stable une forme mutée de la protéine APP (APP-V642I). Le choix de la banque d'expression a été tout à fait judicieux, car provenant du lobe occipital d'un cerveau de patient atteint de MA, zone connue pour être préservée au cours du développement de la pathologie (280). Ces travaux ont conduit à l'identification d'un ADNc contenant une phase de lecture ouverte et encodant l'HN, un peptide de 24 acides aminés dont la séquence primaire est la suivante : MAPRGFSCLLLLTSEIDLPVKRRA (538). Dans une série d'expériences similaires utilisant le même modèle cellulaire, ces auteurs ont montré l'effet protecteur de l'expression de l'HN envers différentes protéines mutées, associées à des formes familiales de MA, comme APP-A617G, APP-NL, APP-L648P, PS1-M146L, PS1-A246E, PS2-N141I ou PS2-M239V (280 ; 281). De façon intéressante, le milieu de culture de cellules transfectées avec l'ADNc-HN présente également des effets neuroprotecteurs, conséquence de la présence de peptide HN à des concentrations de l'ordre du micromolaire (280 ; 281). Ces résultats suggèrent que l'HN est un peptide sécrété. La sécrétion de l'HN est stimulée par un apport extracellulaire de potassium et par la forskoline, mais aussi par des signaux intracellulaires comme la mobilisation du calcium du réticulum endoplasmique et la production d'AMPc (280). Par contre, la bréfeldine inhibe cette sécrétion.

Par la suite, les mêmes auteurs ont montré que l'HN protège des neurones corticaux de la toxicité des différentes formes de peptide Aβ agrégé (Aβ25-35, 1-42 et 1-43) (277) mais aussi de l'anticorps anti-APP 22C11 dont les effets proapoptotiques ont été récemment démontrés (623; 724). L'HN a donc été présentée comme un facteur neuroprotecteur vis-à-vis de stimuli spécifiquement associés à la mort neuronale dans la MA.

Toutefois cette notion a dû être reconsidérée puisque plus récemment, plusieurs travaux dont les nôtres (705) ont montré que l'HN possède des propriétés protectrices vis-à-vis de modèles de mort cellulaire (neuronale et non-neuronale) induite par un fragment de la protéine du prion humain (705) et des peptides contenant des répétitions polyglutamine (359), par la déprivation de sérum sur cellules PC12 (361) et sur lymphocytes (360), mais aussi vis-à-vis de la toxicité du peptide Aβ25-35 fibrillaire sur des cellules musculaires lisses (352). Il est donc important de noter que l'HN possède des propriétés protectrices vis-à-vis d'agents proapoptotiques induisant des mécanismes moléculaires et dans des types cellulaires différents.

La séquence primaire de l'HN connue, ses effets neuroprotecteurs identifiés, plusieurs travaux ont permis d'établir des relations entre la structure du peptide et ses propriétés neuroprotectrices, mais aussi de découvrir des analogues plus actifs de l'HN (99 ; 277 ; 539). Ainsi, la séquence minimale pour une activité maximale correspond au domaine Pro^{3} à Pro^{19} (Tableau 11). Parmi ces 17 acides aminés, les résidus Pro^{3}, Cys^{8}, Leu^{9}, Leu^{12}, Thr^{13}, Ser^{14} et Ala^{19} sont essentiels. La Cys^{17} peut être remplacée par un résidu Arg ou Lys sans altérer les propriétés neuroprotectrices. Les propriétés de l'HN sont donc intimement liées à la structure primaire de ce peptide, car l'ensemble de ces critères conditionne les effets neuroprotecteurs vis-à-vis des différents stimuli proapoptotiques cités précédemment.

Tableau 11 : Etude structure-fonction de l'HN et de ses dérivés (539).

Peptide	Séquence	Dose
	8 14	
HN	MAPRGFSCLLLLTSEIDLPVKRRA	10 µM
HNG	MAPRGFSCLLLLTGEIDLPVKRRA	10 nM
HNA	MAPRGFSALLLLTGEIDLPVKRRA	>100 µM
AGA-HNG	MAPAGASCLLLLTGEIDLPVKRRA	100-300 pM
	3 19	
HN17	PRGFSCLLLLTSEIDLP	10 µM
HNG17	PRGFSCLLLLTGEIDLP	10 nM

Alors que la dose neuroprotectrice effective de l'HN est de 10 µM, des expériences de substitution d'acides aminés ont permis d'identifier des dérivés de l'HN plus actif (HNG) et inactif (HNA) (Tableau 11).

Une étude structurale et de modélisation moléculaire suggère que l'HN adopte, en milieu aqueux, une structure en hélice α dans sa partie Gly^{5}–Leu^{18} (42). La région centrale est relativement hydrophobe, alors que la région carboxy-terminale est polaire mais non structurée (Figure 36). Cette structure serait en partie responsable de l'interaction de l'HN avec différents partenaires cellulaires, mais permettrait également la formation d'homodimères d'HN (22). En fait, il a été montré que seule une structure homodimérique de l'HN est capable d'exercer des effets neuroprotecteurs (737). Le résidu Cys^{8} semble essentiel à cette dimérisation (283).

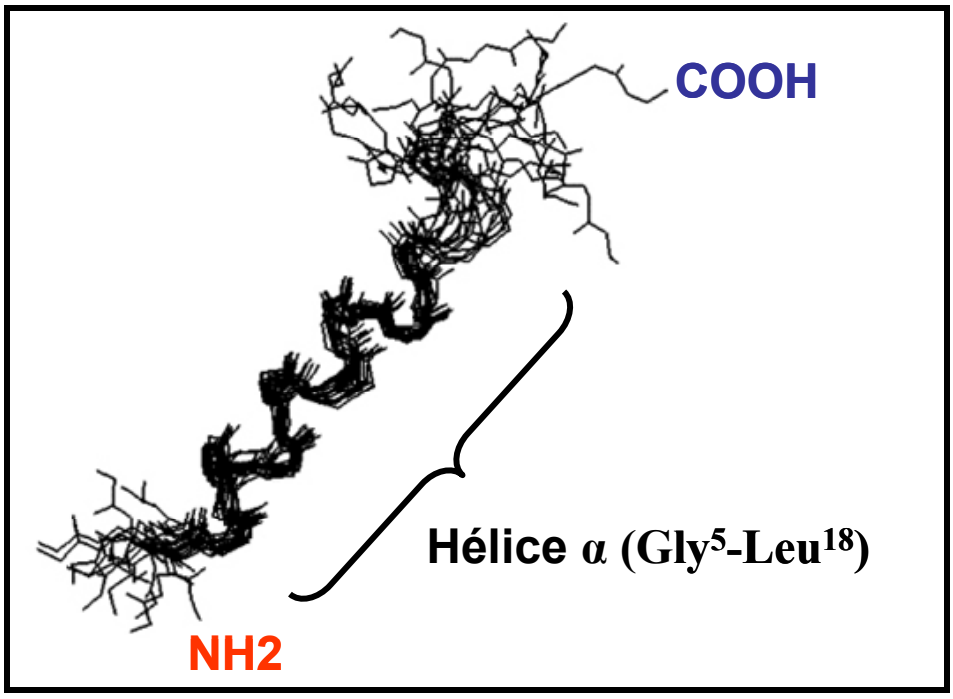


Figure 36 : Modélisation moléculaire de l'humanine (42)

In vivo, l'expression de l'HN et ses régulations ne font l'objet que de peu de travaux (pour revue, 539). Parmi les ADNc décrits, la séquence de l'ADNc le plus long encodant l'HN (1567 paires de bases incluant la queue poly-A) est identique à 99% à une partie du gène mitochondrial de l'ARN 16s (position 1680-3231). L'origine mitochondriale de l'HN est fortement controversée d'un point de vue physiologique en premier lieu, mais

également car l'ADNc le plus long encodant l'HN présente également 99% d'homologie avec l'ARNm FJL22981 (280 ; 737). Ces mêmes travaux montrent également que des séquences fortement homologues (92 à 95%) ont été localisées sur les chromosomes 5, 11 et X. L'HN aurait donc certainement une origine nucléaire. A l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre l'HN, il a été démontré que ce peptide est produit dans les testicules et le colon de souris âgées de trois semaines, l'immunoréactivité disparaissant après douze semaines. Au niveau du système nerveux central, l'HN est détectable dans les neurones intacts du lobe occipital d'un cerveau Alzheimer, alors qu'aucune immunoréactivité n'est détectée dans les autres zones du cerveau MA ou dans un cerveau contrôle de même âge (737). L'HN a été également localisée dans les cellules microgliales activées essentiellement dans l'hippocampe de cerveaux Alzheimer alors qu'elle n'est pas détectable dans cette zone de cerveaux provenant de patients de même âge et exempts de toute démence (737). Depuis, il a été montré que l'HN est produite dans différents types cellulaires tels que les cellules musculaires (359 ; 382), les cellules de Leydig (115), ainsi que les cellules intestinales (737).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité antiapoptotique de l'HN restent mal connus et des résultats contradictoires ont été publiés. Il semble que l'HN exerce ses effets neuroprotecteurs depuis le compartiment extracellulaire par l'intermédiaire de la fixation à un récepteur. L'activité neuroprotectrice de l'HN est sensible à la présence de toxine pertussique, suggérant l'implication d'un récepteur couplé aux protéines G_o/G_i (277). Plus récemment, il a été proposé que le récepteur couplé aux protéines G FPRL1 (*Formylpeptide Receptor-Like-1*) et son homologue murin FPR2 seraient responsable de la transduction d'un signal de survie cellulaire, impliquant l'hyperphosphorylation de p42/p44-ERK, après interaction avec l'HN ou ses dérivés les plus actifs (99 ; 257 ; 864). En contradiction avec ces résultats, il a été récemment démontré à l'aide d'une stratégie "ARN interférant" que l'inhibition de l'expression du récepteur FPR2 n'empêche en rien l'activité neuroprotectrice de l'HN (282). D'autres récepteurs pourraient donc être impliqués dans ces mécanismes de survie cellulaire. Par exemple, il a été montré que l'HN peut interagir avec l'*insulin-like growth factor-binding protein 3* (324). En aval de son interaction avec un ou plusieurs types de récepteurs, il semble que l'HN protège les cellules de différents types de stress en activant le facteur de transcription STAT-3, certaines tyrosine kinases, et JNK phosphatases (279 ; 282 ; 284). Enfin, l'HN protège les cellules K562 de l'apoptose induite par un retrait de sérum en modulant le niveau de phosphorylation de la protéine kinase p-38 (804).

Des arguments expérimentaux soutiennent l'hypothèse d'une action de l'HN à partir du milieu extracellulaire (539). La séquence primaire de l'HN satisfait en grande partie les critères de séquence consensus pour les peptides signaux des protéines sécrétées. Ainsi, la mutation Leu^9 en Arg^9 abroge ces critères et le peptide L9R-HN n'est pas sécrété dans le milieu de culture (277). Le peptide L9R-HN ajouté dans le milieu de culture préserve les cellules de l'apoptose induite de cellules exprimant la forme toxique APP-V642I (540). Par contre, l'expression intracellulaire de ce peptide non sécrété n'a aucun effet neuroprotecteur (277). Les fonctions physiologiques et/ou physiopathologiques de l'HN, ainsi que la régulation de son expression restant des questions sans réponse, un autre groupe de recherche a récemment publié d'excellents travaux faisant émerger une autre hypothèse quant aux propriétés antiapoptotiques de l'HN. Les auteurs de ces travaux ont montré que l'HN intracellulaire est capable d'inhiber l'apoptose de plusieurs types cellulaires en interagissant avec des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (249 ; 459 ; 870). Il semble donc que pour exercer ses activités cytoprotectrices, il soit nécessaire que l'HN accède au compartiment intracellulaire afin d'interagir avec des protéines régulant l'apoptose. A l'heure actuelle, aucune donnée expérimentale ne montre une internalisation de l'HN extracellulaire par un mécanisme actif, *via* un récepteur membranaire, ou passif.

Dans le cadre de la physiopathologie de la MA, l'HN n'exerce pas d'effet sur la production et l'agrégation du peptide Aβ, ni sur la régulation de l'expression, du trafic et de la localisation subcellulaire de la protéine APP (277 ; 280 ; 281). *In vitro*, les travaux s'intéressant aux effets antiapoptotiques de l'HN vis-à-vis de la neurotoxicité induites par le peptide Aβ ne sont à l'heure actuelle que descriptifs (Figure 36). Ainsi, les résultats du groupe de Nishimoto I. et collaborateurs ont abouti à la détermination des doses effectrices de l'HN et de ses dérivés sur la neurotoxicité des peptides Aβ(25-35), Aβ(1-43) fibrillaires (277 ; 280 ; 281). Les mécanismes moléculaires associés ne sont pas décrits, bien que récemment il ait été suggéré que l'HN pourrait inhiber l'apoptose neuronale en bloquant les influx de calcium induits par des fibrilles de peptide Aβ(1-40) (874). Parmi les questions restant sans réponse, la possibilité que l'HN protège les cellules neuronales d'une mort apoptotique induite par des formes oligomériques solubles de peptide Aβ n'a pas été testée (Figure 37). D'autre part, au début de mon travail de thèse, aucune donnée n'était disponible quant aux effets potentiels de l'HN dans des modèles *in vivo* de MA ou d'autres pathologies neurodégénératives. Seul un article décrivait un effet protecteur d'injections intracérébroventriculaires d'HN dans un modèle de trouble d'apprentissage et de mémorisation induit par la scopolamine (474).

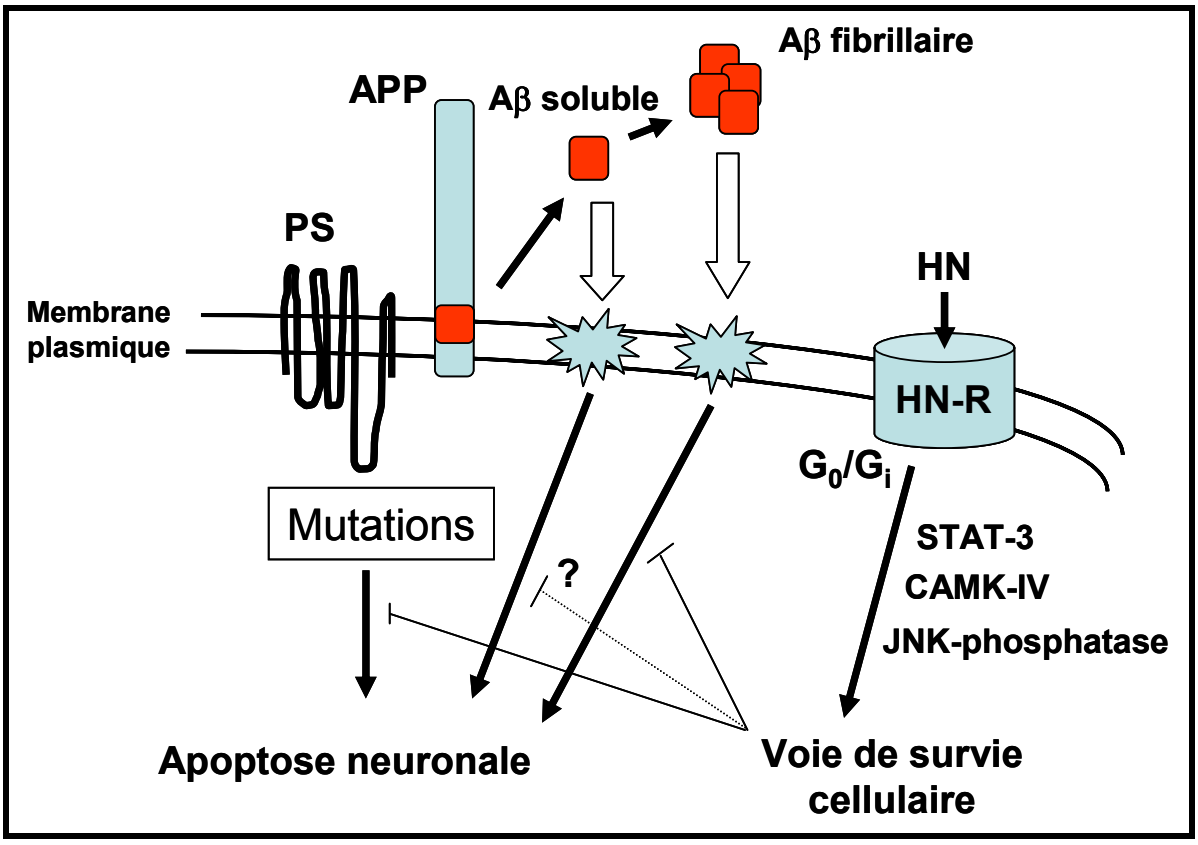


Figure 37 : Hypothèses sur les effets neuroprotecteurs de l'HN dans le cadre de la MA

2.2. Objectifs

La suppression de la mort neuronale est considérée à l'heure actuelle comme une stratégie thérapeutique prometteuse appliquée à la MA. Par exemple, plusieurs études ayant montré une activation précoce des caspases dans des cerveaux Alzheimer (216 ; 622), les premiers candidats pourraient être des inhibiteurs de ces protéases. Par ailleurs, l'utilisation de molécules antioxydantes comme la vitamine E fait l'objet d'études cliniques en cours.

Cependant, deux aspects importants des processus de mort cellulaire participant au développement de la MA doivent être pris en compte pour le développement de ce type de stratégie. Premièrement, il semble évident que plusieurs facteurs proapoptotiques et/ou pronécrotiques peuvent intervenir dans l'initiation des cascades d'évènements cellulaires conduisant à la mort neuronale (par exemple le stress oxydant, le peptide Aβ sous différentes formes, les fragments C-terminaux de l'APP). De plus, un même stimulus peut conduire à l'activation de voies indépendantes conduisant à la mort cellulaire. L'exemple du peptide Aβ est représentatif de cette problématique. En effet, l'utilisation de facteurs trophiques tels que l'*activity-dependent neurotrophic facteur* (ADNF, 69), le *basic fibroblast growth factor* (b-FGF, 476), et l'*insulin-like growth factor-I* (IGF-I, 157) permet de protéger des neurones en culture de la toxicité du peptide Aβ. Par contre, ces mêmes molécules n'ont pas d'effet significatif sur la mort cellulaire induite par l'expression de formes mutées de protéine APP ou PS1 (277 ; 538). Pour remédier à ces problèmes, une stratégie neuroprotectrice doit correspondre à une association de molécules ciblant différentes voies (et/ou cibles cellulaire) ou à un composé bloquant l'ensemble des voies mises en jeu. Dans cette dernière optique, l'humanine serait un candidat intéressant.

Cette seconde partie de mon travail de thèse s'inscrit dans un nouveau projet de notre équipe visant à faire la preuve du concept que la production continue d'humanine dans le cerveau de souris permettrait une neuroprotection à la fois dans un modèle de toxicité aiguë (notre modèle d'injection i.c.v de peptide Aβ soluble) et de toxicité chronique (souris Tg2576 d'âges différents). Pour ce faire, nous avons choisi la stratégie suivante : fabrication de microbilles d'alginate contenant des cellules recombinantes exprimant et sécrétant de façon stable l'humanine et implantation de ces billes dans le cerveau des animaux.

Les objectifs spécifiques de mon travail ont été de vérifier plusieurs paramètres afin d'éprouver la faisabilité d'un tel projet :

1 – Etudier et caractériser les effets neuroprotecteurs de l'humanine et de ses dérivés *in vitro* en utilisant des cultures primaires de neurones de souris,

2 – *In vivo*, tester l'effet protecteur de ces peptides sur les altérations de la mémoire et de l'apprentissage induites par les oligomères solubles de peptides Aβ.

L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'une publication en cours de préparation décrite dans le paragraphe suivant.

2.3. Résultats - MANUSCRIT # 2

Humanin, an endogenous peptide protects against soluble Aβ oligomers *in vivo* and *in vitro*

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

From Lipidomix, JE 2482, INPL, Laboratoire de Médecine et Thérapeutique Moléculaire, 15 rue du Bois de la Champelle, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

En préparation

Humanin, an endogenous peptide protects against soluble Aβ oligomers *in vivo* and *in vitro*

Ihsen Youssef[1], Sabrina Florent-Béchard[1], Catherine Malaplate-Armand, Violette Koziel, Jean-Luc Olivier, Thierry Oster, Brigitte Leininger-Muller, Badreddine Kriem, and Thierry Pillot[2]

From Lipidomix, JE 2482, INPL, Laboratoire de Médecine et Thérapeutique Moléculaire, 15 rue du Bois de la Champelle, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

[1]Contributed equally to this work

[2]Address correspondence to: Thierry Pillot, JE2482 Lipidomix, Laboratoire de Médecine et Thérapeutique Moléculaire, 15 rue du Bois de la Champelle, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, Tel: +33-3-83-67-82-18, Fax: +33-3-83-67-89-99. E-Mail: Thierry.Pillot@mtm.nancy.inserm.fr

ABSTRACT

Recent data have revealed that soluble oligomeric amyloid-β (Aβ) peptide may be the proximate effectors of neuronal injuries and death in Alzheimer's disease (AD), by mechanisms triggering synaptic dysfunction and subsequent neuronal apoptosis independently of Aβ aggregation. The apoptosis rescue endogenous peptide humanin (HN) has been shown to modulate *in vitro* the neuronal toxicity of various AD-relevant insults, including aggregated forms of Aβ by unknown molecular mechanisms. Here we report that HN and its variant HNG are rescuing factors *in vitro*, inhibiting neuronal death and apoptotic events resulting from soluble Aβ oligomer treatment. Most importantly, we provide evidence that HN peptides almost completely reverse soluble Aβ oligomer-induced memory dysfunction in mice, using an intracerebroventricular Aβ model (*e.g.* a unique intracerebroventricular injection of a low amount of soluble Aβ oligomers), recapitulating the functional abnormality of early AD. Indeed, HN peptides inhibit soluble Aβ oligomer-induced impairment of spatial working memory and delayed memory acquisition in Y-maze and Morris water maze tests. Finally, we show for the first time that HN peptides exhibit *in vitro* and *in vivo* protective effects against soluble oligomers of N-terminal truncated forms of Aβ (*e.g.* Aβ3(pE)-42), an Aβ species suspected to mediate aspects of memory loss and cognitive impairment in early AD. Thus, HN peptides might serve as drug candidates for treatment or prevention of cellular insults early involved in AD pathogenesis.

Key Words: Alzheimer's disease, soluble amyloid oligomers, humanin peptides, cognition, apoptosis, mice

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 (Aβ) (Drouet *et al*., 2000 ; Selkoe, 2004). The original amyloid cascade hypothesis causally links AD clinico-pathological process and neuronal cell death to the aggregation and deposition of Aβ (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 Aβ peptide (Pillot *et al*., 1999; Walsh *et al*., 2002; Wang *et al.,* 2002; Sponne *et al*., 2003; Kriem *et al*., 2005). Accordingly, it has been recently demonstrated using mouse cerebral slices that soluble oligomers of Aβ 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 Aβ peptide rather than that of fibrillar Aβ (Wang *et al*., 1999; McLean *et al*., 1999; Lue *et al*., 1999). Both neurodegeneration and specific spatial learning deficits associated with early Aβ 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 Aβ oligomers in AD brain (Lacor *et al.,* 2004; Kelly *et al*., 2005; Huang

et al., 2006). Taken together, these results give the "soluble Aβ" hypothesis substantial clinical support. Thus, it is crucial to better characterize the molecular mechanisms implicated in soluble Aβ oligomer-induced neurodegeneration together with physiological factors able to modulate Aβ neurotoxicity both *in vitro* and *in vivo*.

Direct suppression of synaptic dysfunction and subsequent neurodegeneration early involved in AD pathogenesis may represent a promising target for the development of anti-AD therapeutics. Recently, Nishimoto and coworkers (Hashimoto *et al*., 2001a, 2001b & 2001c) reported that a series of peptides termed humanin could effectively abolish neuronal cell death caused by a wide spectrum of familial AD genes, anti-APP antibodies and fibrillar forms of Aβ(1-43) or Aβ(25-35) peptides (for review, Niikura *et al*., 2002). The wild-type 24 amino-acid humanin peptide (HN) was encoded by a human gene screening from the occipital lobe of AD brain, which is well known to be maintained intact throughout the course of this devastating disease (Hashimoto *et al*., 2001c; Tajima *et al*., 2002). It has been shown that the rescuing activity of HN toward several proapoptotic agents required micromolar concentrations (Hashimoto *et al*., 2001a & c; Sponne *et al*., 2004). However, a S14G mutant (HNG) resulted in a fully active peptide at low nanomolar concentrations, whereas a C8A mutant (HNA) displayed no rescuing activity (Hashimoto *et al*., 2001c; Jung and VanNostrand, 2003; Sponne *et al*., 2004). It is noteworthy that HN peptides protect neuronal cells from familial AD genes or fibrillar Aβ peptides without affecting either Aβ peptide production or aggregation (Nishimoto *et al*., 2004; Hashimoto *et al*., 2001b). It was shown in follow-up studies, including ours, that HN peptides are not only protective against AD-related insults but are also effective in inhibiting other types of neuronal and non-neuronal cell death, such as serum-deprivation-induced cell death of PC12h cells (Kariya *et al*., 2002) and lymphocytes (Kariya *et al*., 2003), by fibrillar Aβ in human cerebrovascular smooth muscle cells (Jung and VanNostrand, 2003), and by prion-derived peptide (Sponne *et al.,* 2004).

Efforts toward the understanding of the molecular mechanisms underlying HN-mediated neuroprotection have been undertaken (Niikura *et al*., 2004). Recently, it has been reported that HN peptides inhibited fibrillar Aβ(1-42)-induced neuronal death by binding to pertussis toxin-sensitive G protein-coupled human formylpeptide receptor-like-1 FPRL-1 (Ying *et al*., 2004; Harada *et al*., 2004). Furthermore, Mamiya and Ukai (2001) reported that intracerebroventricular of HNG peptide prevented scopolamine-induced amnesia in mice. More recently, it has been shown that intracerebroventricular injection of HNG peptide reverses memory impairment of mice induced by a fibrillar form of Aβ(25-35) (Tajima *et al*., 2005).

However, the potential rescuing effects of HN peptides toward soluble Aβ oligomer-induced neurodegeneration remain to be established. We therefore addressed the question of whether cognitive deficits, as well as *in vitro* neuronal apoptosis, induced by soluble Aβ oligomers may be directly modulated by HN peptides.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The caspase substrates (Ac-DEVD-AMC and Ac-LEHD-AMC) were purchased from Bachem. Aβ(1-40), Aβ3(pE)-42 and Aβ(1-42) were also obtained from Bachem and soluble oligomers of Aβ 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 Aβ was detected by SDS-PAGE and immunoblot analysis. Oligomeric preparations of Aβ 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. HN peptides were purchased from Neosystem (France). The amino acid sequences of the HN peptides used in these study are the following (the substituting residues are underlined and shown in boldface): MAPRGFSCLLLLTSEIDLPVKRRA for HN, MAPRGFSCLLLLT**G**EIDLPVKRRA for HNG, and MAPRGFS**A**LLLLTSEIDLPVKRRA for HNA, as previously described (Niikura *et al*., 2002). HN peptides were initially dissolved at 1 mM in PBS, and aliquots were immediately stored at -70°C before used. 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

Mice primary neurons were cultured as described and kept at 35°C in a humidified 6% CO_2 atmosphere (Kriem *et al*., 2005). After 6-7 days *in vitro* (DIV), neuronal 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 µM soluble oligomers of Aβ(1-40), Aβ(1-42) or Aβ3(pE)-42 for the indicated times. Alternatively, cells were preincubated for 2 h with the indicated concentrations of HN peptides before and during Aβ treatment as previously described (Sponne *et al*., 2004).

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 (Kriem *et al*., 2005).

Measurement of caspase-like proteolytic activities

Caspase-3 and -9 activities were measured by following the cleavage of the fluorogenic substrates, Ac-DEVD-AMC and Ac-LEHD-AMC using previously described procedures (Sponne *et al.,* 2003). Briefly, neurons were washed 3 times with ice-cold PBS buffer and lysed on ice for 20 min in [25 mM Hepes buffer, pH 7.5, 1% (vol/vol) Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, 10 µg/mL pepstatin, 10 µg/mL leupeptine, 5 µg/mL aprotinin]. When lysis was complete, soluble proteins were assayed after 10-min centrifugation at 13,000 x *g* and 4°C. The caspase-related substrates were incubated at the final concentration of 100 µM for 2 h at 37°C with 50 µg proteins. Proteolytic cleavage was monitored by fluorescence emission at 460 nm after excitation at 360 nm, using a Fluostar microplate reader (BMG-Labtechnologies, France).

Immunocytochemistry

Neuronal cytoskeleton integrity was studied by immunofluorescence, using a monoclonal anti-β-tubulin antibody (1:250 dilution) and a 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 using a Nikon microscope using a PlanFluor X60/1.3 objective and captured by a Nikon DXM1200 digital camera.

Intracerebroventricular (icv) injection of soluble Aβ oligomers

Male C57BL/6 mice (12-week old, Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were housed five to six per cage with free access to food and water, and were kept in a constant environment (22 ± 2°C,

50 ± 5% humidity, 12-h light cycle). Soluble Aβ oligomers were prepared as described above as stock solutions at the concentration of 0.5 mM in sterile 0.1 M phosphate-buffered saline (pH 7.4) and aliquots were stored at –20°C until used. Under anesthetization, soluble Aβ oligomers (0.5 nmol in 1 μL) or vehicle (saline) were injected into the right ventricle, with stereotaxic coordinates from the bregma being, in mm, AP –0.22, L –1.0 and D 2.5. Injections were made using a 10-μl Hamilton microsyringe fitted with a 26-gauge needle. Each group consisted of 12 animals. Learning and memory capacities were assessed using Y-maze and Morris water maze tests. The experimental schedule is shown in Fig.1.

Y-maze task

Immediate spatial working memory performance was assessed by recording spontaneous alternation behavior in a Y-maze as described previously (Sarter *et al*., 1988). The Y-maze task was carried out on day 4 after soluble Aβ oligomer administration. The maze was made of opaque Plexiglas and each arm was 40-cm long, 16-cm high, 9-cm wide and positioned at equal angles. Mice were placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during a 5-min session. The series of arm entries were recorded visually and arm entry was considered to be completed when the hind paws of the mouse were completely placed in the arm. Alternation was defined as successive entries into the three arms on overlapping triplet sets. The percentage alternation was calculated as the ratio of actual (total alternations) to possible alternations (defined as the number of arm entries minus two), multiplied by 100.

Water maze task

The Morris water maze was performed as described previously (Morris, 1984). The experimental apparatus consisted of a circular water tank (diameter = 80 cm; height = 50 cm) containing water at 22°C to a depth of 25 cm and rendered opaque by adding an aqueous

acrylic emulsion. A platform (diameter = 10 cm) was submerged 1 cm below the water surface and placed at the midpoint of one quadrant. The pool is placed in a test room homogenously illuminated at 100 lux and containing various prominent visual cues. The swimming paths of the animals are recorded using a video tracking system. At day 3 and 4, navigation to a visible platform is carried out before place-navigation in order to evaluate visual and motor abilities of the animals. Mice are submitted to 4 trials per day with 2 trials in the morning and 2 trials in the afternoon, and with an inter-trial interval of at least 45 min. There is no extra maze cue in the room. The platform position and starting points are randomly distributed over all 4 quadrants of the pool. Mice that fail to find the platform after 60 s are guided to its location.

Memory-acquisition trials (training) were performed 4 times daily on days 7 to 11 after injection of soluble Aβ oligomers to reach a steady state of escape latency. The mice were allowed to swim freely for 60 s, were left for an additional 30 s on the hidden platform and were then returned to the home cage during the inter-trial interval. The intra-trial intervals during 4 trials were 45 min. Start positions, set at each limit between quadrants, were randomly selected for each animal. In each trial, the time required to escape onto the hidden platform was recorded. Mice failing to find the platform within 60 s were placed on the platform for 10 s at the end of the trial.

Memory-retention tests (probe trials) were performed 3 days after the last training session. The platform was removed and each mouse was allowed a free 60-s swim. The number of crossing over a point where the platform had been and the time spent at each of the 4 quadrants were counted by replay using a video recorder.

Statistical analysis

For *in vitro* data, STAT VIEW computer software was used for the statistical analysis. Data

were obtained from 3 to 4 separate experiments with 4 determinations each and expressed as means ± SEM. Differences between control and treated groups were analyzed using Student's *t*-test (**, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$). Multiple pair-wise comparisons among the groups of data were performed using ANOVA followed by a Scheffe's post hoc test. Statistical differences were determined as $p < 0.05$. For the analysis of data from *in vivo* experiments, statistical comparisons were made by the Student's *t*-test. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) was carried out and followed by Fisher's *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The means of the data are presented together with SEM.

RESULTS

HNG peptide prevents soluble Aß oligomer-induced deficits of spatial working memory.

In separate experiment series, mice were treated by soluble oligomers of Aβ3(pE)-42, Aβ(1-42) or Aβ(42-1) peptides using i.c.v. injection. The experimental follow-up analysis of behavioral performances, was described in Fig. 1. Spontaneous alternation behavior, which is regarded as a measure of immediate spatial working memory performance (Sarter *et al*., 1988), was investigated using the Y-maze test. Mice injected with soluble Aβ(1-42) or Aβ3(pE)-42 oligomers displayed significantly impaired spatial working memory (around 17% decrease in alternation behavior), when measured on day 4 post-injection (Fig. 2A). Injection of soluble Aβ(42-1), used as a negative control, had no effect on spontaneous alternation behavior (Fig. 2A). Furthermore, we did not find any significant difference between animals injected with 50 pmol of HNG peptide only and either control- or Aβ(42-1)-treated mice. Interestingly, injection of HNG peptide 5 min before soluble Aβ oligomers resulted in a total reversion of both Aβ3(pE)-42 and Aβ(1-42) oligomer-induced impairment of spatial working memory (Fig. 2A). It is noteworthy that the number of arm entries did not change significantly among all the

experimental groups (Fig. 2B), indicating that changes in alternation behavior were not due to generalized exploratory, locomotor or motivational effects (Sarter *et al*., 1988). Accordingly, the Morris water maze task with a visible platform performed on days 3 and 4 post-injection (Fig. 1) failed to reveal any difference in visual and motor abilities between control and treated groups (data not shown).

Protective effects of HNG peptide against soluble Aβ oligomer-induced learning and memory impairment.

Mice were trained in the Morris water maze for 5 days starting at 7 days after icv administration of soluble Aβ(1-42) oligomers in the absence or presence of 50 pmol of HNG peptide (Fig. 3). Mice became more efficient at finding the platform on successive trials. The main effect for day was statistically different ($p < 0.005$) (Fig. 3A). The post-hoc test for latencies in intra-group showed significant declines on days 2-5 for saline, HNG and Aβ(42-1) groups when compared to day 1. Interestingly, soluble Aβ(1-42) impaired place learning and this change was significantly different from saline, HNG or Aβ(42-1) treated groups on days 1-4 of training (Fig. 3A). After 5 days of training, significant differences among groups were detected only for the Aβ(1-42)-treated group by repeated measured two-way ANOVA. Importantly, the presence of HNG peptide rescued animals from Aβ(1-42)-induced impairment of place learning ($p < 0.05$ as compared to Aβ(1-42)-treated group) (Fig. 3A). Indeed, no significant difference was detected between control-, HNG-, Aβ(42-1)-injected groups and HNG + Aβ(1-42)-treated group. These results have been further confirmed by calculation of the total latency in training days (Fig. 3B). Although Aβ(1-42) oligomers induced an increase in the total latency, suggesting a delay in memory acquisition, no statistical differences were

found between control and HNG- or HNG + Aβ(1-42)-treated animals. Similar results have been obtained using Aβ(3-42) soluble oligomers (see supplementary data).

Similarly, soluble Aβ oligomers adversely affected performance in the probe test (Fig. 4). The Aβ3(pE)-42- and Aβ(1-42)-treated groups displayed a 23.5 and 31% decrease ($p < 0.05$, as compared to control-, HNG- or Aβ(42-1)-treated groups) in time percentage spent in the platform quadrant (Fig. 4A) and a concomitant increase of time in the opposite quadrant (Fig. 4B). In the retention test, the number of crossings over a platform position was significantly decreased in the Aβ3(pE)-42- and Aβ(1-42)-treated groups compared to the control groups (Fig. 4C), suggesting impaired memory. By contrast, the presence of HNG peptide completely restored memory capacity as no statistical differences were found between control groups and either [HNG + Aβ(1-42)] or [HNG + Aβ3(pE)-42]-treated groups in any of 3 parameters monitored (Fig. 4). Taken together, these data strongly suggest that HNG peptide suppresses soluble Aβ oligomer-induced dysfunction of the memory system.

HN peptides rescue primary neurons from soluble Aβ oligomer-induced toxicity.

We further investigated whether HN peptides might counteract the *in vitro* neurotoxicity of Aβ oligomers. Cells were incubated for 24 h with 1 μM Aβ(1-42) and Aβ3(pE)-42 soluble oligomers in the absence or presence of increasing concentrations of HN or HNG peptide (Fig. 5). The treatment of mice neurons in primary cultures with Aβ(1-42) and Aβ3(pE)-42 soluble oligomers resulted in a 41 and 46 % decrease in cell viability, respectively (Fig. 5A and 5B). Interestingly, the presence of 1 μM and more HN dramatically reduced the Aβ-induced cell death (Fig. 5A). In agreement with previous works including ours (Hashimoto *et al.*, 2001b; Sponne *et al.*, 2004), a strong neuroprotective effect was observed when cells were preincubated with HNG peptide at nanomolar concentrations (Fig. 5B). Indeed, HNG significantly protected primary neurons against Aβ(1-42) and Aβ3(pE)-42, when present at 1

nM and more. By contrast, the C8A HNA inactive mutant of HN failed to suppress soluble Aβ oligomer-induced cell death even at the concentration of 100 μM (see supplementary data).

Kinetics of HNG action on cell viability.

To get further insight into the neuroprotective properties of HN peptide, we decided to use HNG peptide at the concentration of 10 nM. HNG peptide significantly rescued neurons from Aβ(1-42) and Aβ3(pE)-42 oligomer-induced cell death even after a 48-h treatment (Fig. 6A). To determine the time point in the cell death pathway at which HNG action is required, time-course experiments were conducted. In this study, HNG was added to primary neurons along with Aβ(1-42) or Aβ3(pE)-42 oligomers, or at various time prior or after Aβ peptide addition, and cell viability was monitored after a 24-h treatment using the MTT assay. HNG protection decreased dramatically when HNG was added ≥30 min after Aβ peptide (Fig. 6B). Moreover, we observed no difference in the level of neuroprotection when HNG preincubated with cells for 2 h or added at the same time than Aβ (Fig. 5), or when HNG was preincubated for 30 min with Aβ peptide before addition to cells (not shown). Accordingly, it has been demonstrated that HN peptides have no effects on both Aβ production and aggregation (Hashimoto *et al*., 2001b). These results strongly suggest that, independently of a physical interaction between HNG and Aβ oligomers, HNG modulates early events in the neurotoxic pathways induced by Aβ oligomers.

HNG peptide exhibits antiapoptotic properties against soluble Aβ oligomer-induced cell death.

We have previously demonstrated that neuronal cell death induced by soluble Aβ oligomers proceeds through an apoptotic pathway involving an early cytoskeleton perturbation and

subsequent caspase activation (Pillot *et al*., 1999; Sponne *et al*., 2003; Fifre *et al*., 2006). The perturbation of the neuronal cytoskeleton induced by soluble Aβ(1-42) oligomers has been visualized after a 6-h Aβ treatment by immunocytochemistry using an anti-β-tubulin antibody (Fig. 7A). Interestingly, the presence of HNG almost completely prevented Aβ(1-42)-induced cytoskeleton breakdown. Moreover, the presence of 10 nM HNG peptide dramatically reduced the number of apoptotic nuclei following a 24-h treatment with 1 µM soluble Aβ(1-42) oligomers (Fig. 7B). Similar data were obtained when using Aβ3(pE)-42 oligomers to induce neuronal apoptosis (data not shown). Indeed, cultures exposed for 24 h to 1 µM soluble Aβ(1-42) and Aβ3(pE)-42 oligomers exhibited 42.5 and 48.2 % of apoptotic nuclei, respectively (Fig. 7C), whereas only around 12 % of apoptotic cells were detected in control cells, Aβ(42-1)- or HNG-treated cells. The presence of 10 nM HNG peptide resulted in an almost complete inhibition of Aβ oligomer-induced apoptosis. Indeed, only 21.4 and 18.7 % ($p < 0.05$) of apoptotic nuclei were detected in culture treated with Aβ(1-42) and Aβ3(pE)-42 in the presence of HNG, respectively (Fig. 7C). We therefore were able to demonstrate that HNG peptide significantly reduced the activation of both caspase-3 and -9 induced by soluble Aβ oligomers (Fig. 8).

DISCUSSION

Several findings, including ours, indicate that soluble, small and diffusible Aβ oligomers are the earliest and most toxic agents of AD (Pillot *et al*., 1999; Walsh *et al*., 2002; Sponne *et al*., 2003; Kayed *et al*., 2004). In oligomeric form, Aβ produces functional and structural neuronal damages (Lue *et al*., 1999; Kriem *et al*., 2005; Fifre *et al*., 2006; Malaplate-Armand *et al*., 2006). It is thus crucial to characterize the molecular mechanisms involved in

soluble Aβ oligomer-mediated neurotoxicity, as well as to identify factors able to interfere with the neuronal insults associated with this oligomeric conformation of Aβ peptide.

In the present paper, we demonstrate that HN and its variant HNG are rescuing factors for soluble Aβ oligomer-induced neuronal apoptosis *in vitro*, inhibiting cell death and apoptotic events resulting from soluble Aβ oligomer treatment. In agreement with previous studies including ours (Sponne *et al*., 2004; Hashimoto *et al*., 2001b), we showed that a micromolar of HN concentration is required for neuroprotective effects, whereas a nanomolar concentration allows for HNG peptide-associated neuroprotective effects. The protective effects of HN peptides do not require a direct interaction between HN and Aβ oligomers, but seem to involve an interaction of HN with the plasma membrane of neurons. Accordingly, we showed that delaying the addition of HN to cells after the incubation with Aβ dramatically abrogated the neuroprotective effects of HN. By contrast with other compounds like caspase inhibitors or antioxidant molecules able to partly modulate the neurotoxicity of soluble Aβ oligomers (Sponne *et al*., 2003; Kriem *et al*., 2005; Malaplate-Armand *et al*., 2006), HN peptides inhibit almost completely soluble Aβ-mediated cell death even after prolonged incubation time. These observations strongly suggest that HN peptides interfere early in the cascade of events leading to apoptosis.

The molecular mechanisms involved in HN neuroprotection remain to be clarified. Efforts to elucidate the molecular mechanisms of neuroprotection associated with HN peptides have been mainly conducted using fibrillar Aβ peptides. In the context of AD physiopathology, it has been demonstrated that HN neuroprotective effects did not involve modulation of Aβ production and aggregation, as well as expression, trafficking and subcellular localization of APP (Hashimoto *et al*., 2001a, b & c; Niikura *et al*., 2004). Precedent studies using fibrillar preparations suggest that only secreted HN protects neuronal cells against aggregated Aβ(1-42), Aβ(1-43) or Aβ(25-35) peptides (Hashimoto *et al*., 2001b;

Niikura *et al*., 2004), through an interaction with the pertussis toxin-sensitive G protein-coupled human formylpeptide receptor-like-1 (FPRL-1) (Ying *et al*., 2004; Harada *et al*., 2004). However, these results have been partially challenged by a study showing that siRNA-mediated disruption of FPR2 expression, the mouse counterpart of FPRL-1, did not result in attenuation of HN-mediated rescue of neuronal cell death induced by fibrillar Aβ peptide (Hashimoto *et al*., 2005). This suggests that receptor(s) other than FPRL-1 might mediate HN neuroprotection as well. These mechanisms of HN neuroprotection might involve the activation of several tyrosine kinases, the STAT3 transcription factor (Hashimoto *et al*., 2005), as well as the decrease of calcium influx mediated by aggregated form of Aβ (Zou *et al*., 2003). More recently, it has been suggested that internalized HN peptides might exert their anti-apoptotic effects by interacting with pro- and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family (Zhai *et al*., 2005; Luciano *et al*., 2005; Guo *et al*., 2003). These results have not been confirmed in *in vivo* experiments.

More importantly, we examined the *in vivo* effects of HN peptides on soluble Aβ oligomer-induced behavioral deficits. We thus used a soluble Aβ oligomer intracerebroventricular model, consisting of a unique i.c.v. injection of a low amount of soluble Aβ. In order to recapitulate the functional and hippocampal abnormality of early AD and according to previous works (Cleary *et al*., 2005; Sweeney *et al*., 1997), this model was used primarily to detect impairment in spatial working memory and in retention of reference memory. Here, we clearly showed that HN peptides are able to completely prevent soluble Aβ oligomer-induced memory dysfunction in mice. Only few reports describe neuroprotective effects of HN peptides *in vivo* and the molecular mechanisms involved are not determined yet. Indeed, it has been demonstrated that i.c.v. injection of 1 nmol of HNG attenuated spatial working memory impairment induced by scopolamine in mice (Mamiya & Ukai, 2001) or by 3-quinuclidinyl benzilate in rat (Krejcova *et al*., 2004). These results strongly suggest that HN peptides might act

through the modulation of the cholinergic system. Moreover, i.c.v. injection of 1 nmol HNG per week for 3 weeks attenuated toxicity induced by a single i.c.v. injection of fibrillar Aβ(25-35) (Tajima *et al*., 2005). Finally, it has been demonstrated that another HN derivative, named colivelin, suppress impairment of spatial working memory induced by repetitive i.c.v. injection of fibrillar Aβ(25-35) and Aβ(1-42) peptides (Chiba *et al*., 2005), but also prolongs survival of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (Chiba *et al*., 2006).

Another important and novel aspect of our work is that HN peptides exert *in vitro* and *in vivo* a cytoprotective activity against the N-truncated Aβ3(pE)-42 peptide-induced neurodegeneration and associated learning alterations. Accumulative evidence highlights the critical role played by N-terminal-truncated forms of Aβ in AD development (Geddes *et al*., 1999; Piccini *et al*., 2005; Tekirian, 2001). N-terminal-truncated Aβ peptides are known to accumulate early in the brain of sporadic AD patients, in early onset familial AD patients, especially in PS1 mutation carriers, and in Down's syndrome brain (Russo *et al*., 1997; Russo *et al*., 2000; Saido *et al*., 1996; Tekirian *et al*., 1998). Among them, Aβ peptides starting with pyroglutamyl at residues Glu-3 or Glu-11, particularly Aβ3(pE)-42, have been suggested to be early aggregating species in AD (Tekirian, 2001) and considered as the dominant Aβ species in AD plaques (Harigaya *et al*., 2000; Kuo *et al*., 1997; Miravalle *et al*., 2005; Russo *et al*., 2000). They are also present in pre-amyloid lesions (Lalowski *et al*., 1996). Most importantly, the increase of soluble N-terminal-truncated species is proportional to the severity of the disease in terms of course duration and early onset (Russo *et al.,* 1997 & 2000). Consequently, the intensity of neuronal degeneration and the severity of the clinical phenotype seem directly proportional to the predominance of soluble Aβ3(pE)-42 peptide. This evidence provides clues for a pivotal role of soluble Aβ3(pE)-42 oligomers in the early stages of AD pathogenesis (Teplow, 1999), and oligomeric Aβ3(pE)-42 has been hypothesized, though never proven directly, to mediate aspects of memory loss in AD as well as in APP transgenic model. Indeed, relatively little is known

about the molecular mechanisms of their neurotoxicity and to date, their *in vivo* effects have not been addressed. Here we clearly show that like Aβ(1-42), soluble Aβ3(pE)-42 oligomers induced neuronal apoptosis *in vitro* as well as cognitive deficits *in vivo*. More importantly, we demonstrate for the first time that HN peptides are able to abolish not only the cellular insults leading to soluble Aβ3(pE)-42 oligomer-induced neurotoxicity and apoptosis *in vitro*, but also *in vivo* deleterious effects of these oligomers on mice learning performances.

Being an endogenous substance (Tajima *et al*., 2002; Niikura *et al*., 2002), HN might play a role in the actual AD progression and probably be partly responsible for the area selective cell loss observed in the brain of AD patients. CNS areas with highest HN content were found to be unaffected in AD (Hashimoto *et al*., 2001c; Tajima *et al*., 2002). Indeed, HN was detected in some of the intact large neurons in the occipital lobes from AD brain, but not from age-matched control brains (Tajima *et al*., 2002), whereas no HN immunoreactivity was detected in AD hippocampal neurons. To date, only a few endogenous molecules have been reported or presumed to have protective effects against fibrillar forms of Aβ peptides only (Louzada *et al*., 2004; Savvateeva *et al*., 1999; Szegedi *et al*., 2006). The novel neuroprotective properties of HN against the soluble Aβ oligomeric structure, including that of N-truncated Aβ species, described in our present work prone HN peptides to be very promising candidate for future therapeutics in AD. In agreement with evidence showing that soluble Aβ oligomers represent early and crucial factors involved in AD progression, a recent report underlies the risk of approaches designed to modulate the formation of Aβ fibrils only (Malmo *et al*., 2006). Consequently, soluble as well as fibrillar oligomers of Aβ species should be considered as essential targets in AD therapeutic strategies. HN peptides have this advantage to prevent both *in vitro* and *in vivo* neurodegenerative processes linked to various AD-relevant insults, including fibrils of Aβ peptides (Hashimoto *et al*., 2001c; Chiba *et al*., 2005; Tajima *et al*., 2005), but also soluble oligomers of various Aβ species (our present data).

Accordingly, approaches aimed to increase HN concentration in the brain, especially in hippocampal tissues, in order to prevent synaptic loss and cell death would presumably offer rational treatment for AD.

Acknowledgements

This work was supported in part by Inserm, and by grants from Sanofi-Aventis (Vitry-sur-Seine, France), the *Région Lorraine* and the *Communauté Urbaine du Grand Nancy*.

REFERENCES

Anderson A.J, Su J.H., and 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**, 1710-9

Chang L., Bakhos L., Wang Z., Venton D.L., and Klein W.L. (2003) Femtomole immunodetection of synthetic and endogenous amyloid-β oligomers and its application to Alzheimer's disease drug candidate screening. *J. Mol. Neurosci*. **20**, 305-313

Chiba T., Yamada M., Hashimoto Y., Sato M., Sasabe J., Kita Y., Terashita K., Aiso S., Nishimoto I., and Matsuoka M. (2005) Development of a femtomolar-acting humanin derivative named colivelin by attaching activity-dependent neurotrophic factor to its N terminus: characterization of colivelin-mediated neuroprotection against Alzheimer's disease-relevant insults *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci*. **25**, 10252-61

Chiba T., Yamada M., Sasabe J., Terashita K., Aiso S., Matsuoka M., and Nishimoto I. (2006) Colivelin prolongs survival of an ALS model mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **343**, 793-8

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

Dahlgren K.N., Manelli A.M., Stine W.B. Jr, Baker L.K., Krafft G.A., and LaDu M.J. (2002) Oligomeric and fibrillar species of amyloid-β peptides differentially affect neuronal viability. *J. Biol. Chem*. **277**, 32046-53

Drouet B., Pincon-Raymond M., Chambaz J., and Pillot T. (2000) Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life. Sci*. **57**, 705-15

Estus S., Tucker H.M., van Rooyen C., Wright S., Brigham E.F., Wogulis M., and Rydel R.E. (1997) Aggregated amyloid-β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J. Neurosci*. **17**, 7736-45

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 neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. *J. Biol*. *Chem*. **281**, 229-40

Geddes J.W., Tekirian T.L., and Mattson M.P. (1999) N-terminus truncated β-amyloid peptides and C-terminus truncated secreted forms of amyloid precursor protein: distinct roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol*. *Aging* **20**, 75-9

Guo B., Zhai D., Cabezas E., Welsh K., Nouraini S., Satterthwait A.C., and Reed J.C. (2003) Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* **423**, 456-61

Harada M., Habata Y., Hosoya M., Nishi K., Fujii R., Kobayashi M., and Hinuma S. (2004) N-Formylated humanin activates both formyl peptide receptor-like 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **324**, 255-61

Hardy J.A., and Higgins G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. **256**, 184-5

Harigaya Y., Saido T.C., Eckman C.B., Prada C.M., Shoji M., and Younkin S.G. (2000) Amyloid β protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 422-7

Hashimoto Y., Niikura T., Tajima H., Yasukawa T., Sudo H., Ito Y., Kita Y., Kawasumi M., Kouyama K., Doyu M., Sobue G., Koide T., Tsuji S., Lang J., Kurokawa K., and Nishimoto I. (2001a) A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Aβ. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **98**, 6336-41

Hashimoto Y., Ito Y., Niikura T., Shao Z., Hata M., Oyama F., and Nishimoto I. (2001b) Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 460-8

Hashimoto Y., Niikura T., Ito Y., Sudo H., Hata M., Arakawa E., Abe Y., Kita Y., and Nishimoto I. (2001c) Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J. Neurosci.* **21**, 9235-45

Hashimoto Y., Suzuki H., Aiso S., Niikura T., Nishimoto I., and Matsuoka M. (2005) Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in Humanin-mediated neuroprotection. *Life Sci.* **77**, 3092-104

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. USA* **96**, 3228-33

Huang S.M., Mouri A., Kokubo H., Nakajima R., Suemoto T., Higuchi M., Staufenbiel M., Noda Y., Yamaguchi H., Nabeshima T., Saido T.C., and Iwata N. (2006) Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-β peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function.
J. Biol. Chem. **281**, 17941-51

Jung S.S., and Van Nostrand W.E. (2003) Humanin rescues human cerebrovascular smooth muscle cells from Aβ-induced toxicity. *J. Neurochem.* **84**, 266-72

Kariya S., Takahashi N., Ooba N., Kawahara M., Nakayama H., and Ueno S. (2002) Humanin inhibits cell death of serum-deprived PC12h cells. *Neuroreport*. **13**, 903-7

Kariya S., Takahashi N., Hirano M., and Ueno S. (2003) Humanin improves impaired metabolic activity and prolongs survival of serum-deprived human lymphocytes. *Mol. Cell Biochem.* **254**, 83-9

Katzman R., Terry R., DeTeresa R., Brown T., Davies P., Fuld P., Renbing X., and Peck A. (1988) Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol*. **23**, 138-44

Kayed R., Sokolov Y., Edmonds B., McIntire T.M., Milton S.C., Hall J.E., and Glabe C.G. (2004) Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J. Biol. Chem*. **279**, 46363-6

Kelly B.L., Vassar R., and Ferreira A. (2005) Beta-amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons. A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem*. **280**, 31746-53

Kim H.J., Chae S.C., Lee D.K., Chromy B., Lee S.C., Park Y.C., Klein W.L., Krafft G.A., and Hong S.T. (2003) Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid β-protein. *FASEB J*. **17**, 118-20

Koistinaho M., Ort M., Cimadevilla J.M., Vondrous R., Cordell B., Koistinaho 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**, 14675-80

Koistinaho M., Kettunen M.I., Goldsteins G., Keinanen R., Salminen A., Ort M., Bures J., Liu D., Kauppinen R.A., Higgins L.S., and Koistinaho J. (2002) β-Amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse Aβ deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 1610-15

Krejcova G., Patocka J., and Slaninova J. (2004) Effect of humanin analogues on experimentally induced impairment of spatial memory in rats. *J. Pept. Sci.* **10**, 636-9

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**, 85-7

Kuo Y.M., Emmerling M.R., Woods A.S., Cotter R.J., and Roher A.E. (1997) Isolation, chemical characterization, and quantitation of Aβ 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 188-91

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

Lalowski M., Golabek A., Lemere C.A., Selkoe D.J., Wisniewski H.M., Beavis R.C., Frangione B., and Wisniewski T. (1996) The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid beta17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *J. Biol. Chem.* **271**, 33623-31

Louzada P.R., Lima A.C., Mendonca-Silva D.L., Noel F., De Mello F.G., and Ferreira S.T. (2004) Taurine prevents the neurotoxicity of β-amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders. *FASEB J.* **18**, 511-8

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

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– 62

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 $cPLA_2$-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol*. *Dis*. **23**, 178-89

Malmo C., Vilasi S., Iannuzzi C., Tacchi S., Cametti C., Irace G. and Sirangelo I. (2006) Tetracycline inhibits W7FW14F apomyoglobin fibril extension and keeps the amyloid protein in a pre-fibrillar, highly cytotoxic state. *FASEB J*. **20**, 346-7

Mamiya T., and Ukai M. (2001) [Gly^{14}]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine *in vivo*. *Br. J. Pharmacol*. **134**, 1597-9

McLean C.A., Cherny R.A., Fraser F.W., Fuller S.J., Smith M.J., Beyreuther K., Bush A.I., and Masters C.L. (1999) Soluble pool of β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol*. **46**, 860-66

Miravalle L., Calero M., Takao M., Roher A.E., Ghetti B., and Vidal R. (2005) Amino-terminally truncated Aβ peptide species are the main component of cotton wool plaques. *Biochemistry* **44**, 10810-21

Morris R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci*. *Methods*. **11**, 47-60

Niikura T., Hashimoto Y., Tajima H., and Nishimoto I. (2002) Death and survival of neuronal cells exposed to Alzheimer's insults. *J. Neurosci. Res*. **70**, 380-91

Niikura T., Chiba T., Aiso S., Matsuoka M., and Nishimoto I. (2004) Humanin: after the discovery. *Mol. Neurobiol*. **30**, 327-40

Nishimoto I., Matsuoka M., and Niikura T. (2004) Unravelling the role of humanin. *Trends Mol. Med*. **10**, 102-5

Piccini A., Russo C., Gliozzi A., Relini A., Vitali A., Borghi R., Giliberto L., Armirotti A., D'Arrigo C., Bachi A., Cattaneo A., Canale C., Torrassa S., Saido T.C., Markesbery W.,

Gambetti P., and Tabaton M. (2005) β-Amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem*. **280**, 34186-92

Pillot T., Drouet B., Queille S., Labeur C., Vandekerchkhove J., Rosseneu M., Pincon-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**, 1626-34

Russo C., Saido T.C., DeBusk L.M., Tabaton M., Gambetti P., and Teller J.K. (1997) Heterogeneity of water-soluble amyloid β-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett*. **409**, 411-6

Russo C., Schettini G., Saido T.C., Hulette C., Lippa C., Lannfelt L., Ghetti B., Gambetti P., Tabaton M., and Teller J.K. (2000) Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature* **405**, 531-2

Saido T.C., Yamao-Harigaya W., Iwatsubo T., and Kawashima S. (1996) Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of β-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett*. **215**, 173-6

Sarter M., Bodewitz G., and Stephens D.N. (1988) Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. *Psychopharmacology (Berl.)*. **94**, 491-5

Savvateeva E.V., Popov A.V., Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V., Heisenberg M., Kornhuber J., and Riederer P. (1999) Age-dependent changes in memory and mushroom bodies in the Drosophila mutant vermilion deficient in the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. *Ross. Fiziol. Zh Im I M Sechenova*. **85**, 167-83

Selkoe D.J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. **298**, 789-91

Selkoe D.J. (2004) Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med*. **140**, 627-38

Sponne I., Fifre A., Drouet B., Klein C., Koziel V., Pincon-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**, 3437-45

Sponne I., Fifre A., Koziel V., Kriem B., Oster T., and Pillot T. (2004) Humanin rescues cortical neurons from prion-peptide-induced apoptosis. *Mol. Cell. Neurosci*. **25**, 95-102

Sweeney W.A., Luedtke J, McDonald M.P., and Overmier J.B. (1997) Intrahippocampal injections of exogenous beta-amyloid induce postdelay errors in an eight-arm radial maze. *Neurobiol*. *Learn*. *Mem*. **68**, 97-101

Szegedi V., Juhasz G., Rozsa E., Juhasz-Vedres G., Datki Z., Fulop L., Bozso Z., Lakatos A., Laczko I., Farkas T., Kis Z., Toth G., Soos K., Zarandi M., Budai D., Toldi J., and Penke B. (2006) Endomorphin-2, an endogenous tetrapeptide, protects against Aβ1-42 *in vitro* and *in vivo*. *FASEB J*. **20**, 1191-3

Tajima H., Niikura T., Hashimoto Y., Ito Y., Kita Y., Terashita K., Yamazaki K., Koto A., Aiso S., and Nishimoto I. (2002) Evidence for *in vivo* production of humanin peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults. *Neurosci. Lett.* **324**, 227-31

Tajima H., Kawasumi M., Chiba T., Yamada M., Yamashita K., Nawa M., Kita Y., Kouyama K., Aiso S., Matsuoka M., Niikura T., and Nishimoto I. (2005) A humanin derivative, S14G-HN, prevents amyloid-β-induced memory impairment in mice. *Neurosci. Res.* **79**, 714-23

Tekirian T.L. (2001) Commentary: Aβ N- terminal isoforms: critical contributors in the course of AD pathophysiology. *J*. *Alzheimers Dis*. **3**, 241-8

Tekirian T.L., Saido T.C., Markesbery W.R., Russell M.J., Wekstein D.R., Patel E., and Geddes J.W. (1998) N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular Aβ deposits. *J*. *Neuropathol*. *Exp*. *Neurol*. **57**, 76-94

Teplow D.B. (1999) Truncating the amyloid cascade hypothesis: the role of C-terminal Aβ peptides in Alzheimer's disease. *Neurobiol*. *Aging* **20**, 71-3

Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., and Selkoe D.J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid-β protein potently inhibited hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* **416**, 535– 39

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., and Trommer B.L. (2002) Soluble oligomers of β amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate girus. *Brain Res*. **924**, 133–40

Wang J., Dickson D.W., Trojanowski J.Q., and Lee V.M. (1999) The levels of soluble versus insoluble brain Aβ distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp. Neurol*. **158**, 328–37

Ying G., Iribarren P., Zhou Y., Gong W., Zhang N., Yu Z.X., Le Y., Cui Y., and Wang J.M. (2004) Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J. Immunol*. **172**, 7078-85

Zhai D., Luciano F., Zhu X., Guo B., Satterthwait A.C., and Reed J.C. (2005) Humanin binds and nullifies Bid activity by blocking its activation of Bax and Bak. *J. Biol. Chem*. **280**, 15815-24

Zou P., Ding Y., Sha Y., Hu B., and Nie S. (2003) Humanin peptides block calcium influx of rat hippocampal neurons by altering fibrogenesis of Aβ(1-40). *Peptides* **24**, 679-85

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Experimental schedule of behavioral performance follow-up. HNG peptide and the different Aβ oligomer preparations were successively administrated by i.c.v. injection as described in the *Experimental Procedures*.

Fig. 2. HNG peptide rescues soluble Aβ oligomer-induced impairment of spatial memory in mice. After successive injection of HNG (50 pmol) and soluble Aβ oligomers (500 pmol), Y-maze tests were performed as shown in Fig. 1. Spontaneous alternation behavior (*A*) and the number of arm entries (*B*) were measured during a 5-min session, as described in the *Experimental Procedures*. The data are presented as means ± SEM (n = 12). Control mice were injected with saline. $P < 0.05$ control *vs.* treated mice. No significant difference has been found between control, HNG and Aβ(42-1)-treated mice.

Fig. 3. HNG peptide protects mice from soluble Aβ oligomer-induced impairment of learning. After injection of soluble Aβ(1-42) oligomers in the presence or absence of HNG peptide, Morris water-maze tests were performed as shown in Fig. 1. The training trials were carried out on days 7-11 after injection. Escape latency (*A*) and total latency in training (*B*) were measured. The latency showed the mean of a block of 4 trials per day. Control mice were injected with saline. $P < 0.05$ control *vs.* treated mice. No significant difference has been found between control, HNG and Aβ(42-1)-treated mice. Similar data were obtained with soluble Aβ3(pE)-42 oligomers (additional data).

Fig. 4. HNG peptide rescues soluble Aβ oligomer-induced impairment of memory. After injection of soluble Aβ oligomers in the presence or absence of HNG peptide, Morris water-

maze tests were performed as shown in Fig. 1. The probe trial was carried out on day 14 after Aβ injection. The percentage of time spent in the platform quadrant (*A*), in the opposite quadrant (*B*), as well as the number of crossing of platform site (*C*) was recorded. The data are presented as means ± SEM (n = 12). Control mice were injected with saline. $P < 0.05$ control *vs.* treated mice. No significant difference has been found between control, HNG and Aβ(42-1)-treated mice. All mice showed normal swimming performance and constant increases in body weight. Locomotor activity did not differ among groups.

Fig. 5. HN peptides protect neurons from soluble Aβ oligomer-induced cell death. Neurons were treated for 24 h with 1 μM soluble Aβ oligomers in the absence or presence of indicated concentration of HN (*A*) or HNG (*B*) peptides. Cell survival was monitored by the MTT assay as described in the *Experimental Procedures*. Data are means (± SEM) of 3 independent experiments with 4 determinations each, normalized to the effect of vehicle, designated as 100%. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffe's post hoc test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. No significant differences were found between control and HN peptide-treated cells.

Fig. 6. Kinetics of HNG peptide neuroprotective effects. *A*, Neurons were incubated for the indicated time with 1 μM soluble Aβ oligomers in the absence or presence of 10 nM HNG peptide. *B*, Alternatively, cells were treated for 24 h with 1 μM soluble Aβ oligomers in the presence of 10 nM HNG peptide added 2 h before or up to 3 h after the addition of Aβ oligomers. Cell survival was monitored by the MTT assay as described in the *Experimental Procedures*. Data are means (± SEM) of 3 independent experiments with 4 determinations each, normalized to the effect of vehicle, designated as 100%. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffe's post

hoc test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. No significant differences were found between control and HNG-treated cells.

Fig. 7. HNG peptide rescues neurons from soluble Aβ oligomer-induced apoptosis. Cells were treated with 1 μM soluble Aβ oligomers in the absence or presence of 10 nM HNG peptide. After 6 and 24 h of Aβ treatment, neuronal cytoskeleton (*A*) and apoptotic nuclei (*B*) were visualized by immunocytochemistry with an anti-β-tubulin antibody and DAPI staining, respectively. Apoptotic nuclei were quantified (*C*) as described in the *Experimental Procedures*. Data are means (± SEM) of 2 independent experiments with 4 determinations each. Control cells were treated with vehicle in similar experimental conditions. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffe's post hoc test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. No significant differences were found between control and Aβ(42-1)-treated cells.

Fig. 8. HNG peptide inhibits soluble Aβ oligomer-induced activation of caspases. Cells were incubated for 6 h with 1 μM soluble Aβ oligomers in the absence or presence of 10 nM HNG peptide. Caspase-3 and caspase-9 activation was measured as described in the *Experimental Procedures*. Data are means (± SEM) of 2 independent experiments with 4 determinations each. Control cells were treated with vehicle in similar experimental conditions. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffe's post hoc test. Values of $p < 0.05$ (different from HNG-treated cells) were considered significant. No significant differences were found between control and Aβ(42-1)-treated cells.

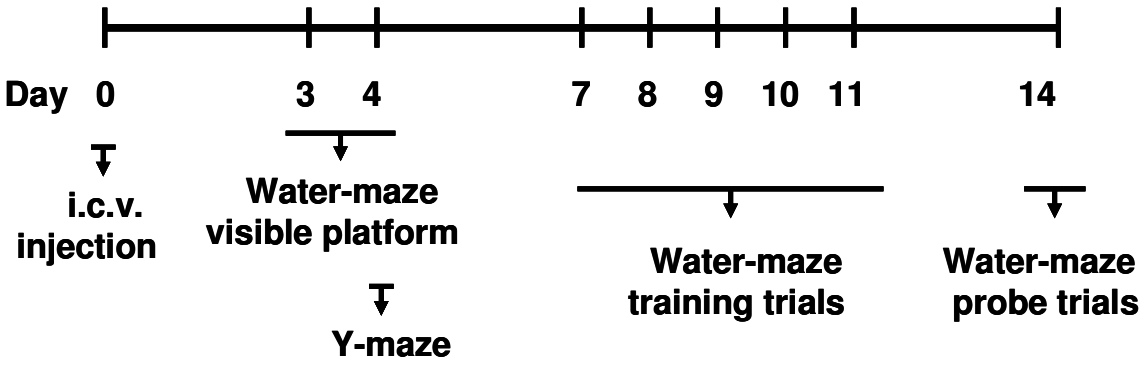

Day 0
3 4
7 8 9 10 11
14
i.c.v. injection
Water-maze visible platform
Y-maze
Water-maze training trials
Water-maze probe trials

Figure 1

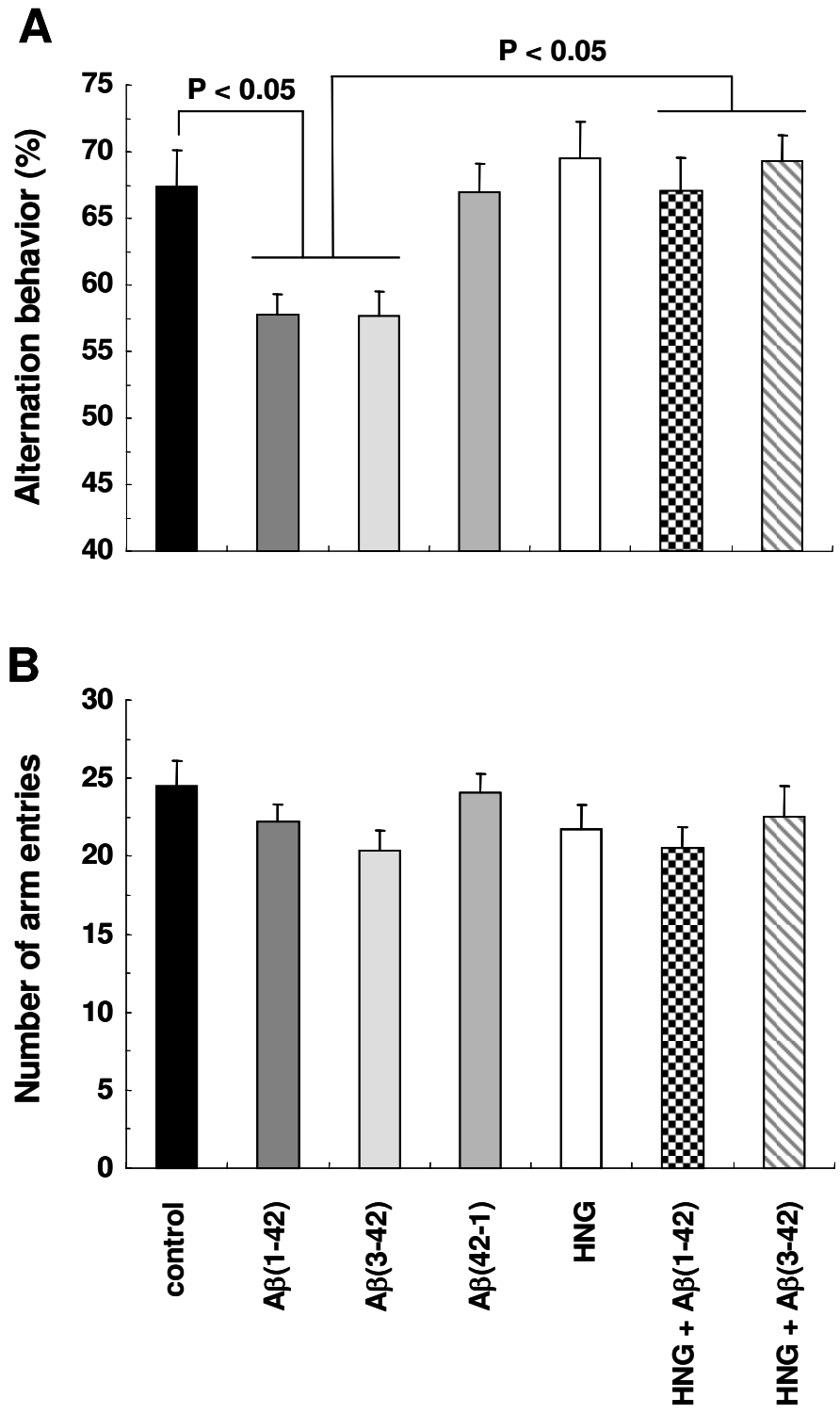

A
P < 0.05
P < 0.05
Alternation behavior (%)
75
70
65
60
55
50
45
40
B
Number of arm entries
30
25
20
15
10
5
0
control
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
Aβ(42-1)
HNG
HNG + Aβ(1-42)
HNG + Aβ(3-42)

Figure 2

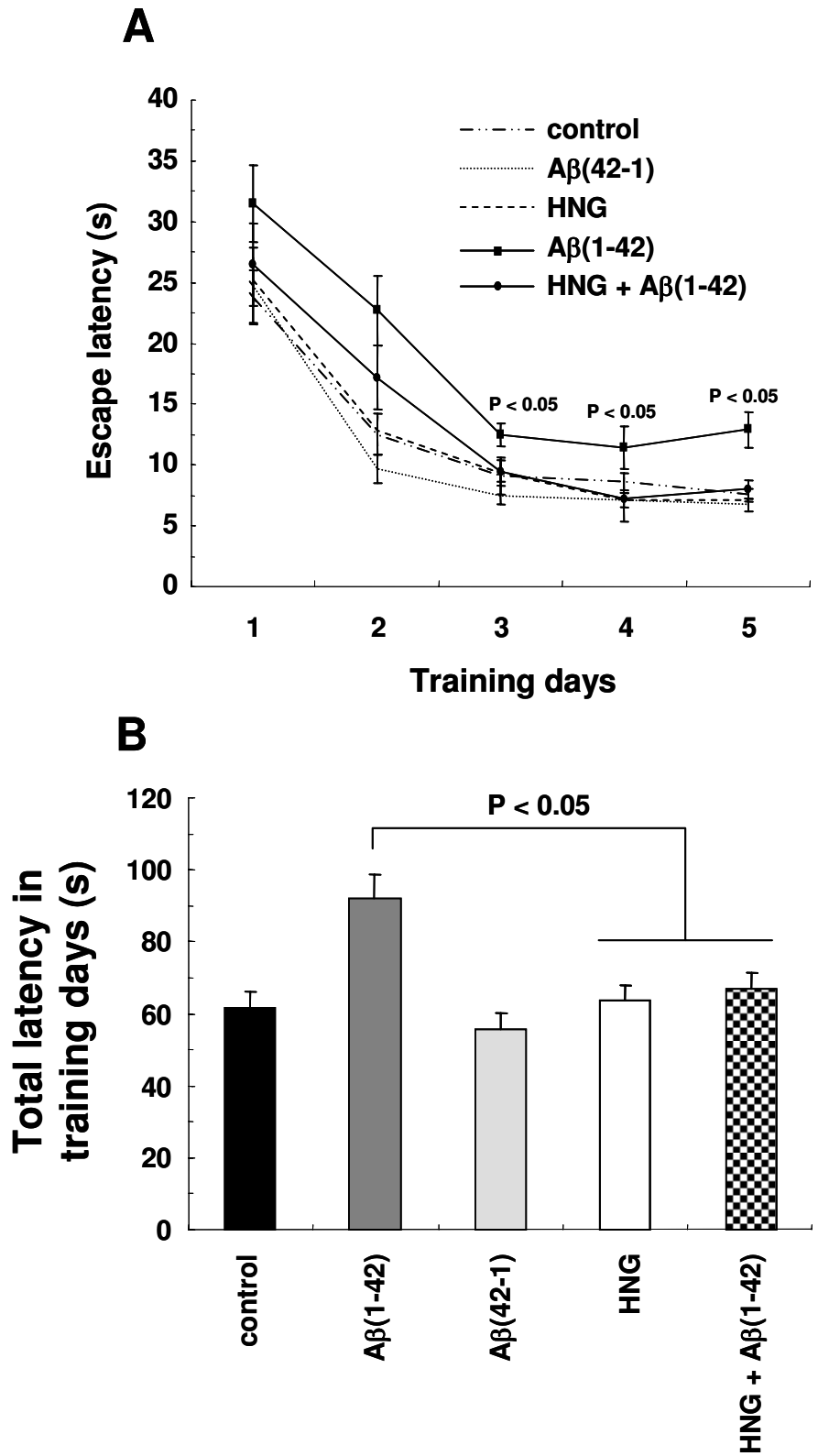

A
Escape latency (s)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
control
Aβ(42-1)
HNG
Aβ(1-42)
HNG + Aβ(1-42)
P < 0.05
P < 0.05
P < 0.05
1
2
3
4
5
Training days
B
Total latency in training days (s)
120
100
80
60
40
20
0
P < 0.05
control
Aβ(1-42)
Aβ(42-1)
HNG
HNG + Aβ(1-42)

Figure 3

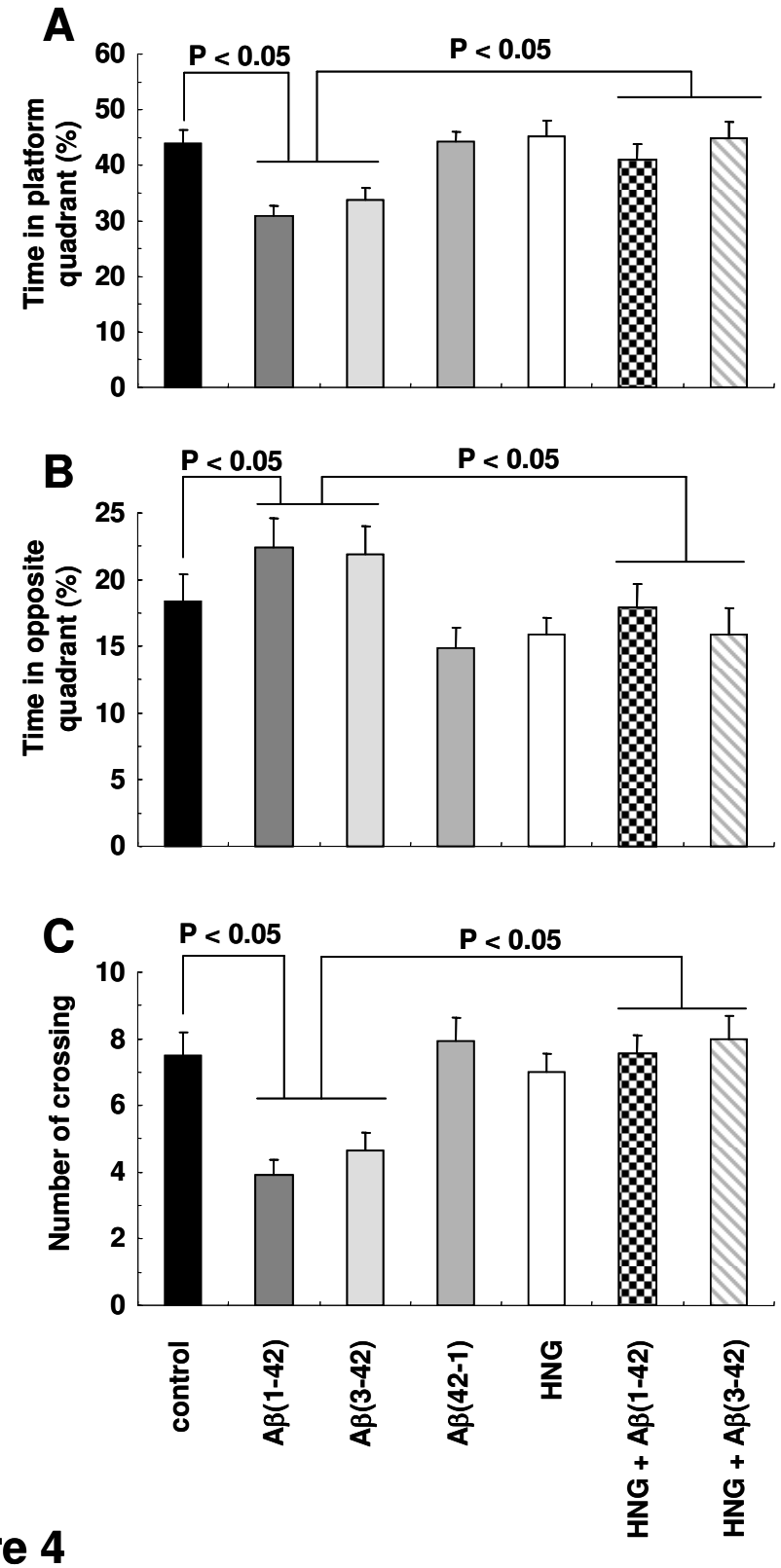

A
P < 0.05
P < 0.05
Time in platform quadrant (%)
60
50
40
30
20
10
0
B
P < 0.05
P < 0.05
Time in opposite quadrant (%)
25
20
15
10
5
0
C
P < 0.05
P < 0.05
Number of crossing
10
8
6
4
2
0
control
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
Aβ(42-1)
HNG
HNG + Aβ(1-42)
HNG + Aβ(3-42)

Figure 4

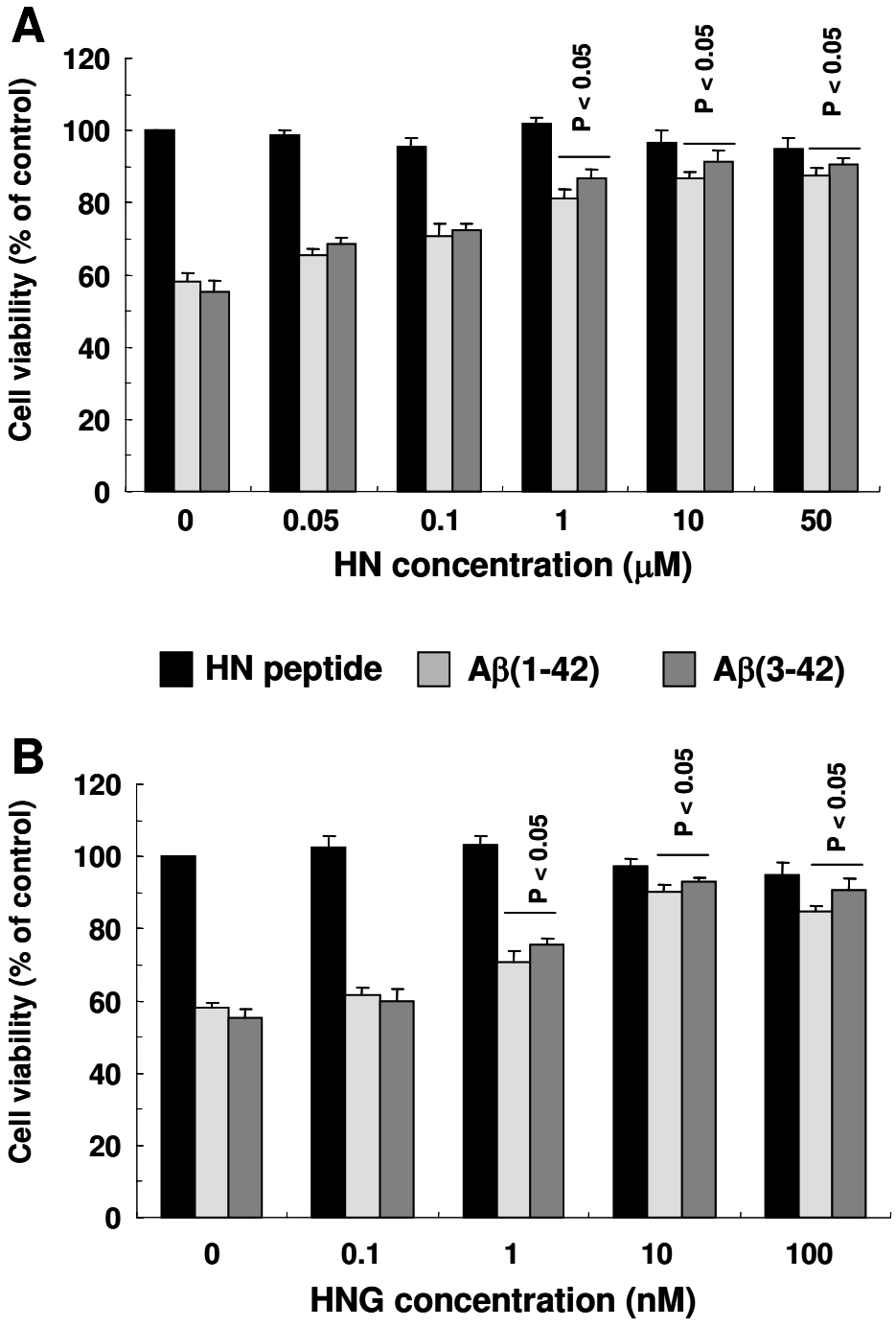

A
Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
P < 0.05
P < 0.05
P < 0.05
0
0.05
0.1
1
10
50
HN concentration (μM)
HN peptide
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
B
Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
P < 0.05
P < 0.05
P < 0.05
0
0.1
1
10
100
HNG concentration (nM)

Figure 5

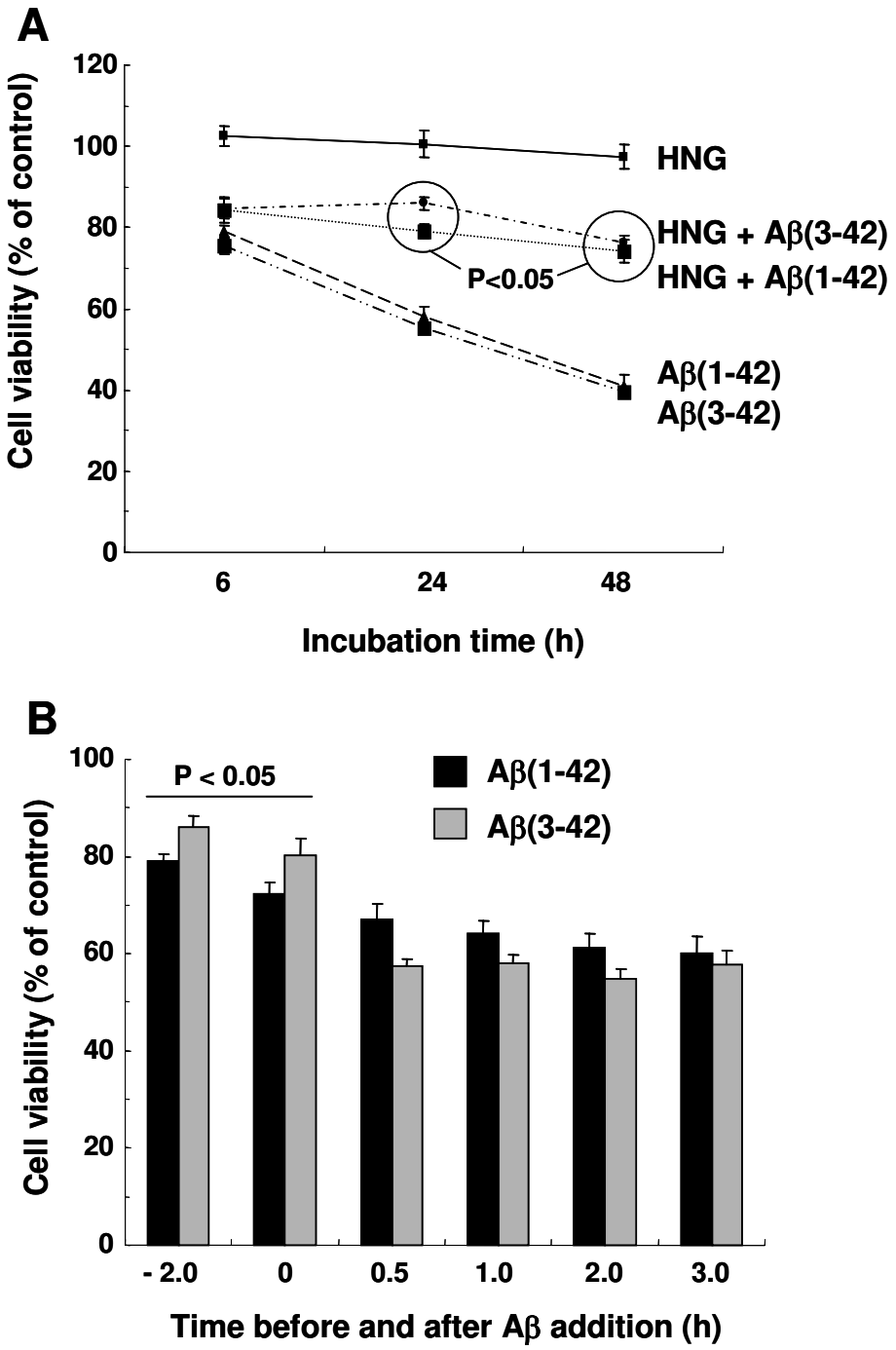
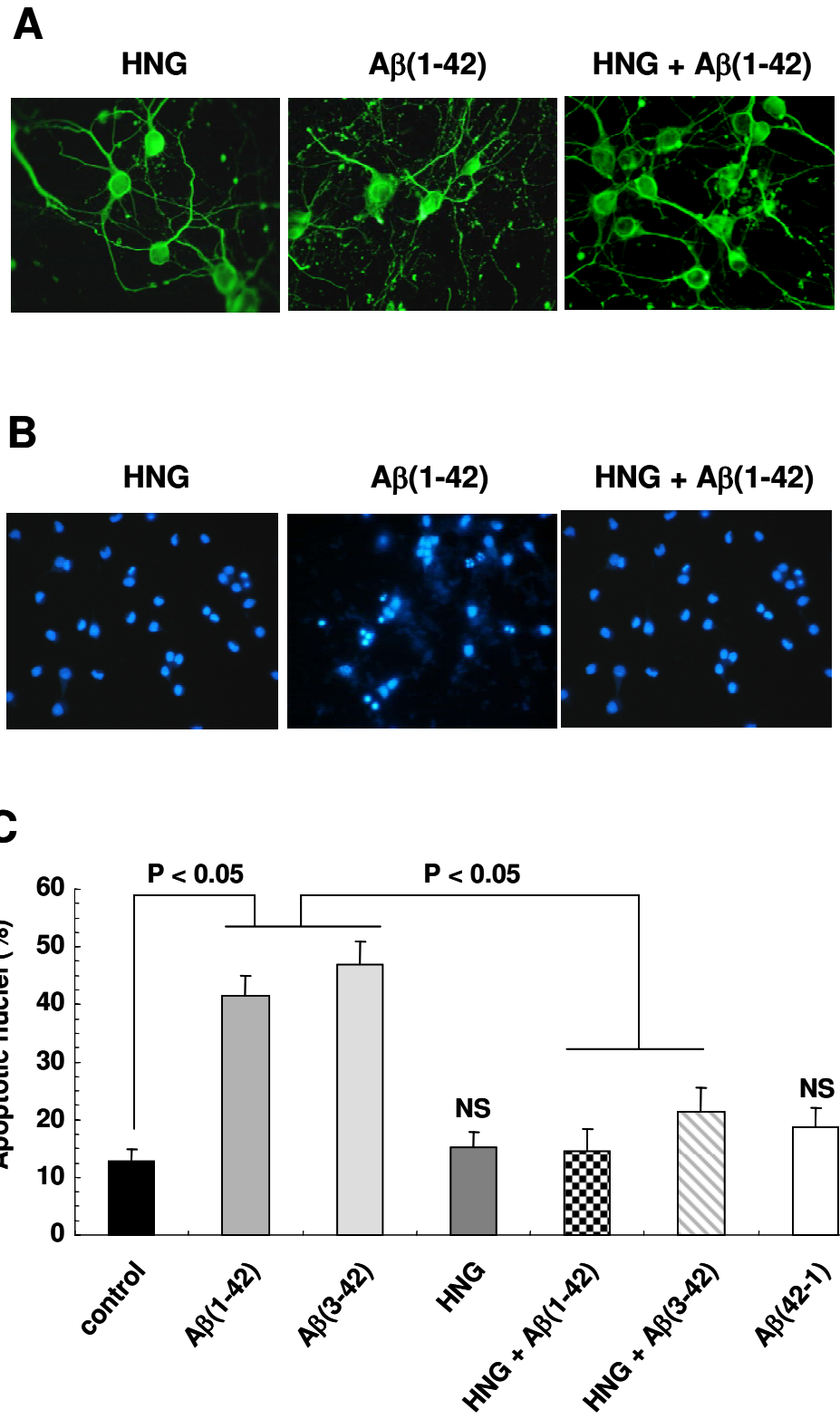

A
Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
6
24
48
Incubation time (h)
HNG
HNG + Aβ(3-42)
HNG + Aβ(1-42)
P<0.05
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
B
Cell viability (% of control)
100
80
60
40
20
0
P < 0.05
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
- 2.0
0
0.5
1.0
2.0
3.0
Time before and after Aβ addition (h)

Figure 6

Figure 7


A
HNG
Aβ(1-42)
HNG + Aβ(1-42)
B
HNG
Aβ(1-42)
HNG + Aβ(1-42)
C
P < 0.05
P < 0.05
Apoptotic nuclei (%)
60
50
40
30
20
10
0
NS
NS
control
Aβ(1-42)
Aβ(3-42)
HNG
HNG + Aβ(1-42)
HNG + Aβ(3-42)
Aβ(42-1)

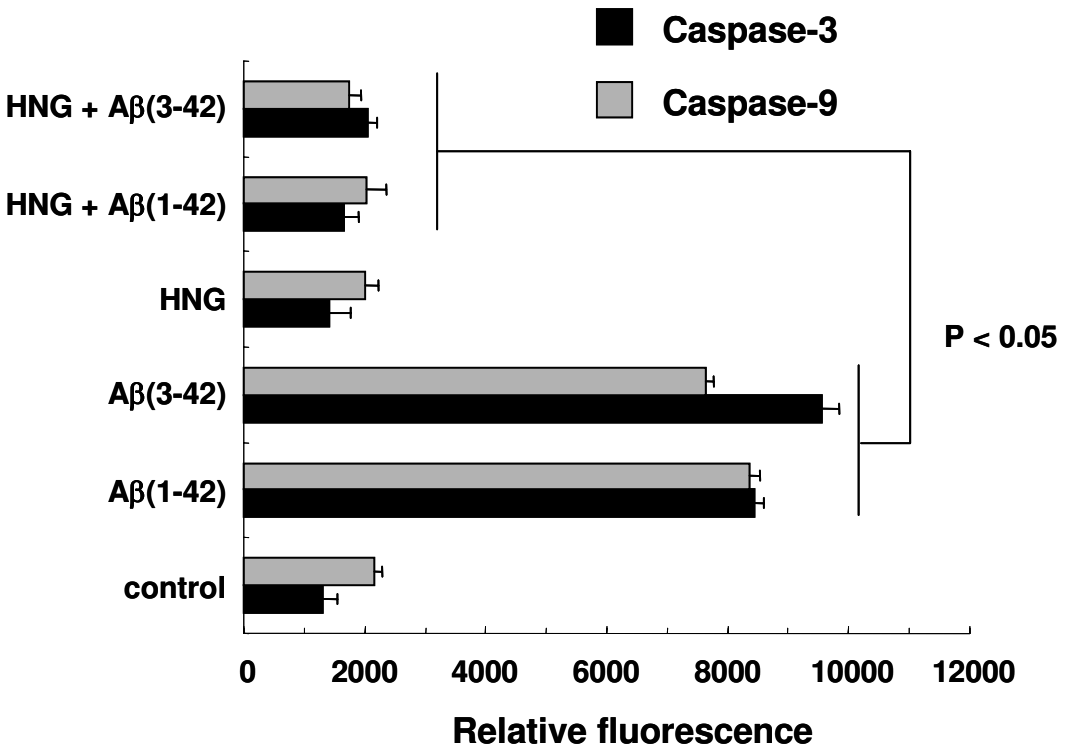
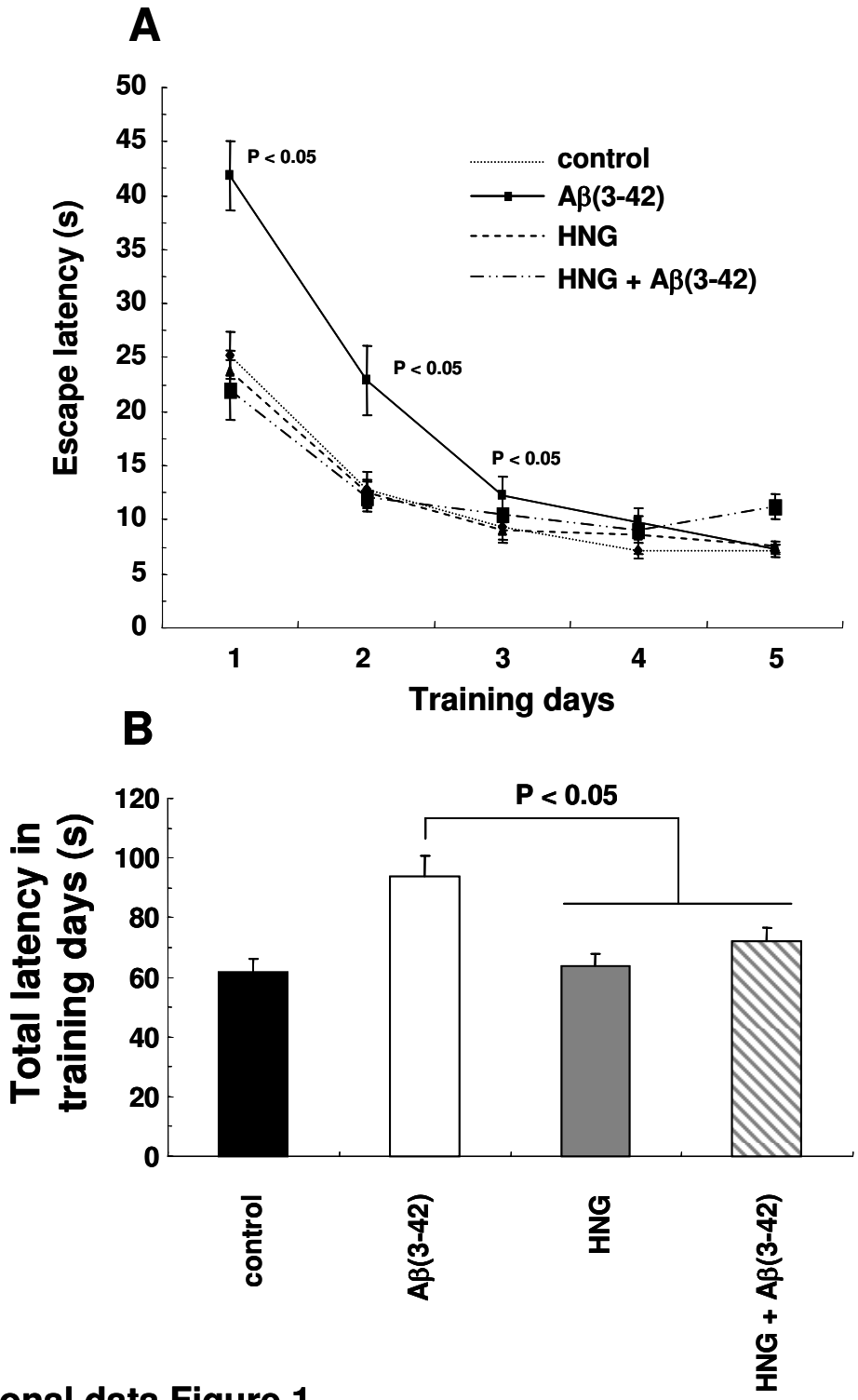

Caspase-3
Caspase-9
HNG + Aβ(3-42)
HNG + Aβ(1-42)
HNG
Aβ(3-42)
Aβ(1-42)
control
P < 0.05
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
Relative fluorescence

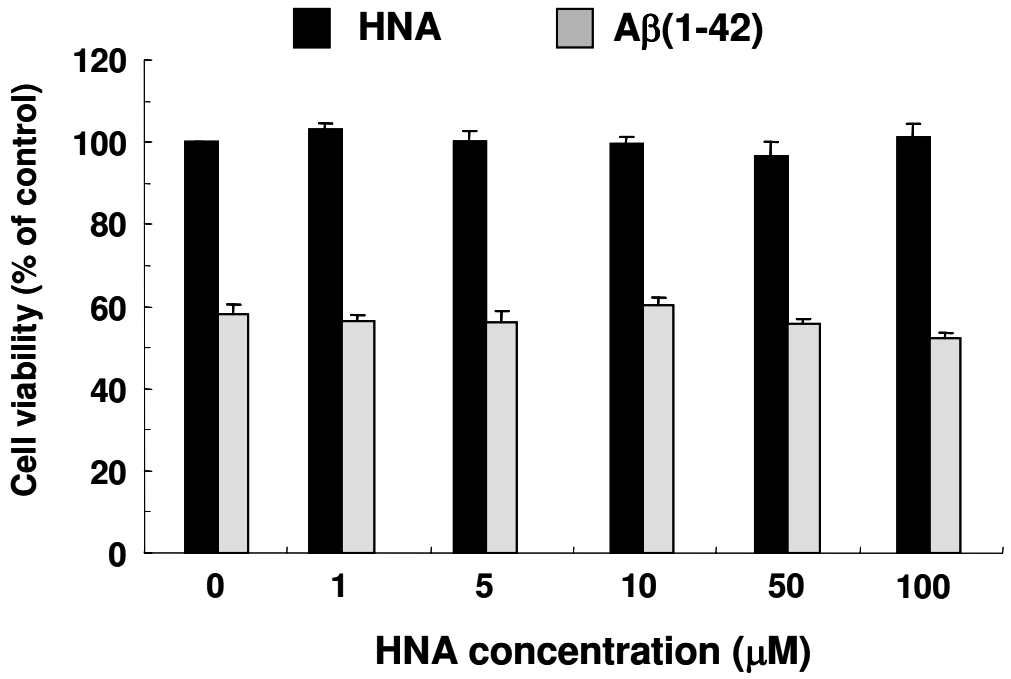
Figure 8



Additional data Figure 1

HNG peptide protects mice from soluble Aβ3(pE)-42 oligomer-induced impairment of learning.

After injection of soluble Aβ3(pE)-42 oligomers in the presence or absence of HNG peptide, Morris water-maze tests were performed as shown in Fig. 1. The training trials were carried out on days 7-11 after injection. Escape latency (*A*) and total latency in training (*B*) were measured. The latency showed the mean of a block of four trials per day. Control mice were injected with saline. $P < 0.05$ control *vs.* treated mice . No significant difference has been found between control, HNG and Aβ(42-1)-treated mice.



Additional data Figure 2

The C8A HN variant did not protect neurons from soluble Aβ oligomer-induced cell death.
Neurons were treated for 24 h with 1 μM soluble Aβ(1-42) oligomers in the absence or presence of increasing concentration of HNA.
Cell survival was monitored by the MTT assay as described in the *Experimental Procedures*.
Data are means (± SEM) of 3 independent experiments with 4 determinations each, normalized to the effect of vehicle, designated as 100%. Statistical differences among the subgroups for each condition were performed by ANOVA followed by a Scheffe's post hoc test. No significant differences were found between control and HNA peptide-treated cells.

2.4. Discussion

Les phénomènes de dysfonctionnement synaptique, de perturbation du transport axonal et de neurodégénérescence sont impliqués dans les phases précliniques et les phases cliniques précoces de la MA (660 ; 718). La suppression de ces atteintes cellulaires et tissulaires représente donc une approche thérapeutique prometteuse. Dans ce contexte, une des cibles à prendre en compte est représentée par le peptide Aβ sous forme d'oligomères solubles (160). Nous nous sommes donc intéressés à l'HN (un peptide de 24 acides aminés) et à certains de ses variants, décrits récemment comme peptides neuroprotecteurs vis-à-vis de stress cellulaires spécifiquement impliqués dans les formes familiales de MA (539).

Ce travail original nous a permis de montrer pour la première fois que l'HN, et un de ses variant HNG, possèdent des propriétés protectrices *in vitro* contre la neurotoxicité induite par les oligomères solubles de peptides Aβ. En effet, l'HN et l'HNG inhibent pratiquement totalement l'apoptose neuronale induite par le peptide Aβ soluble, ainsi que les évènements cellulaires impliqués (activation des caspases et perturbation du cytosquelette neuronal). Indépendamment d'une interaction avec le peptide Aβ soluble, nos résultats suggèrent fortement que l'HN interfère précocément dans la cascade d'évènements cellulaires conduisant à l'apoptose.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la neuroprotection de l'HN ne sont pas clairs. Toutes les études publiées à ce jour prennent en compte des formes fibrillaires de peptides Aβ(25-35), Aβ(1-42) et Aβ(1-43) ou des modèles cellulaires surexprimant des formes mutées de protéines APP, PS1 ou PS2 (277 ; 280 ; 281 ; 540). Dans le contexte de la MA, ces mêmes travaux révèlent que l'HN exerce ses effets neuroprotecteurs *in vitro* indépendamment d'un effet sur l'agrégation et la production de peptide Aβ. Il semble que l'HN exerce ses effets neuroprotecteurs *via* l'interaction avec un récepteur membranaire couplé aux protéines G_o comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette deuxième partie de résultats. En effet, la

neuroprotection est inhibée par la présence de toxine pertussique (257 ; 277 ; 864). Nous avons également montré dans l'équipe que l'HN ne protège pas des neurones corticaux de la toxicité des oligomères solubles de peptide Aβ(1-42) lorsque ceux-ci sont cultivés en présence de toxine pertussique (Figure 38). L'implication d'un (de) récepteur(s) couplé(s) aux protéines G_o semble être essentielle aux propriétés neuroprotectrices de l'HN. En effet, l'HN possède des activités neuroprotectrices dans d'autres modèles d'induction d'apoptose faisant intervenir des mécanismes similaires. Il s'agit par exemple de l'apoptose neuronale induite par l'anticorps anti-APP 22C11 (623 ; 724) ou de modèles cellulaires surexprimant l'APP-V642I (850).

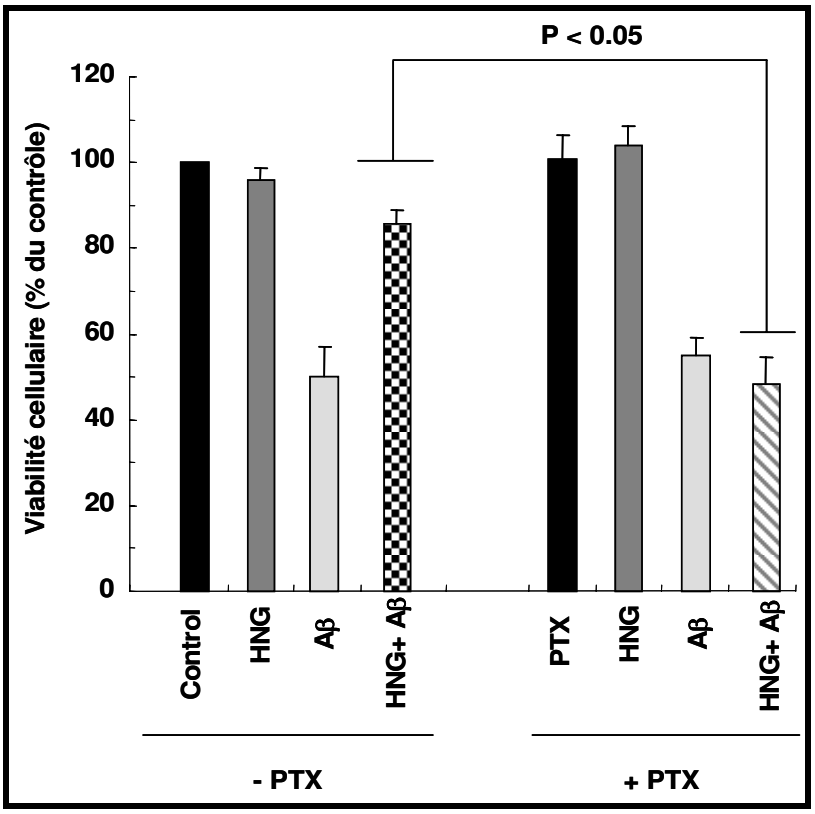


Figure 38 : Inhibition de l'activité neuroprotectrice de l'HNG par la toxine pertussique.

De façon importante, nous avons également montré au cours de ce travail que

l'HNG inhibe *in vivo* les déficits comportementaux induits par les oligomères solubles de peptide Aβ. En utilisant notre modèle d'injection i.c.v. d'une faible dose de peptide Aβ soluble, nous avons clairement établi que la présence d'HNG prévient complètement des dysfonctionnements de l'apprentissage et de la mémoire induits par le peptide Aβ soluble. Peu de travaux relatent les effets neuroprotecteurs de l'HN *in vivo*. Il a été montré par exemple que l'injection i.c.v. d'1 nmol d'HNG atténue les perturbations de la mémoire de travail spatiale induit par la scopolamine chez la souris (474) ou par le 3-quinuclidinyl benzilate chez le rat (406). Ces résultats suggèrent fortement que l'HGN agit en modulant le système cholinergique. De plus, l'injection i.c.v. de HNG (1 nmol par semaine durant 3 semaines) protège de l'injection i.c.v. de peptide Aβ(25-35) fibrillaire (736). Les mécanismes moléculaires associés ne sont absolument pas décrits.

Enfin, un dernier aspect important et nouveau de ce travail est la démonstration que l'HN et l'HNG sont capables d'inhiber *in vitro* et *in vivo* la neurotoxicité des oligomères solubles de peptide Aβ3(pE)-42. Compte tenu de l'importance physiopathologique de ces formes tronquées de peptide Aβ (cf. première partie de nos résultats), il est intéressant de constater que l'HN et ses dérivés sont des agents modulant l'action de nombreux stress cellulaires impliqués dans le développement de la MA, dont les plus précoces tels que les oligomères solubles de différentes formes de peptide Aβ.

L'étude des propriétés antiapoptotiques de l'HN est un sujet passionnant ! L'HN est une substance endogène produite dans de nombreux tissus dont le système nerveux central (115 ; 539 ; 737). Ses rôles physiologiques et/ou physiopathologiques restent cependant inconnus. De façon intéressante, il a été récemment montré que l'expression de l'HN est fortement augmentée dans le muscle squelettique de patients atteints d'encéphalomyopathie mitochondriale associée à une acidose lactique et à des épisodes de type infarctus (359). Un

travail plus récent montre une augmentation similaire de l'expression de l'HN dans les cellules musculaires de patients atteints de formes chroniques et progressives d'ophtalmoplégie externe (382). De ces quelques études, il émerge l'hypothèse selon laquelle l'expression de l'HN pourrait représenter un mécanisme adaptatif des tissus en réponse à des déficiences du métabolisme mitochondrial. En effet, l'HN est capable d'augmenter les niveaux cellulaires d'ATP (359). De plus, l'HN inhibe les processus apoptotiques mettant en jeu les mitochondries en interagissant avec les protéines de la famille Bcl-2/Bax (459 ; 870). L'HN peut donc être considéré comme un facteur antiapoptotique puissant qui pourrait moduler, dans différents types cellulaires, la mort cellulaire programmée induite par des stimuli différents. Trois questions intéressantes demeurent cependant sans réponse : l'origine nucléaire ou mitochondriale de l'expression de l'HN reste un mystère, le mode de régulation de l'expression de ce peptide antiapototique n'a pas été étudié, mais surtout les mécanismes cellulaires impliqués dans l'activité cytoprotectrice de l'HN ne sont à l'heure actuelle que peu décrits. L'absence de spécificité cellulaire dans les effets de l'HN, son activité cytoprotectrice vis-à-vis de nombreux types de stress (539) peuvent laisser supposer que l'HN est capable de contrôler les mécanismes fondamentaux conduisant à la mort cellulaire par apoptose. D'un point de vue des mécanismes, il est clair que seule une forme sécrétée de l'HN exerce des effets antiapoptotiques *via* le compartiment extracellulaire et l'interaction avec un récepteur membranaire (277 ; 540). L'internalisation de l'HN dans le compartiment cytoplasmique, bien que non démontrée, semble nécessaire à son interaction avec les protéines de la famille Bcl-2/Bax (249). Ainsi, il est tout à fait possible que les effets antiapoptotiques de l'HN soient le reflet d'activités différentes, mais complémentaires, de ce peptide, certaines impliquant le contrôle intracellulaire des étapes de la cascade apoptotique faisant intervenir la mitochondrie, d'autres résultant de la modulation des voies de transduction de signaux de survie cellulaire (*via* l'interaction avec un récepteur membranaire).

L'ensemble de ces travaux souligne l'importance que peuvent avoir l'HN et ses dérivés dans la conception de stratégies thérapeutiques appliquées à des pathologies dans lesquelles des phénomènes apoptotiques et de dégénérescence cellulaire sont impliqués. Dans le contexte de la MA, l'HN pourrait jouer un rôle dans la modulation de la progression de cette pathologie neurodégénérative, en particulier dans la spécificité tissulaire des atteintes du système nerveux central observées dans les cerveaux de patients atteints de MA. Pour des raisons encore inconnues, les zones non affectées dans la MA sont celles qui contiennent les quantités les plus élevées d'HN (539 ; 737). Ainsi, l'immunoréactivité de l'HN est très intense dans les neurones intacts des lobes occipitaux de cerveaux provenant de patients atteints de MA (737), alors qu'aucune immunoréactivité n'est détectée dans les neurones hippocampaux. Actuellement, peu de molécules endogènes ont été décrites comme pouvant moduler la neurodégénérescence liée à la MA. Deux d'entre elles, la taurine et l'acide kynurénique, possèdent des propriétés neuroprotectrices vis-à-vis du peptide Aβ fibrillaire. La substance la plus intéressante semble être l'endomorphine-2, un tetrapeptide qui présente *in vitro* et *in vivo* des activités neuroprotectrices vis-à-vis du peptide Aβ fibrillaire par des mécanismes encore mal connus. A l'heure actuelle, aucun travail n'a permis de découvrir des molécules endogènes modulant *in vivo* la neurodégénérescence induite par le peptide Aβ sous forme d'oligomères solubles. Dans ce sens, nos résultats démontrant des effets neuroprotecteurs de l'HN vis-à-vis de la toxicité des oligomères solubles de peptide Aβ, y compris des formes tronquées dans le domaine amino-terminal, nous paraissent essentiels et suggèrent fortement que l'HN et ses dérivés peuvent être considérés comme des candidats prometteurs pour de futures stratégies thérapeutiques préventives pour la MA. En effet, des résultats récents soulignent le risque de développer des stratégies thérapeutiques visant uniquement à moduler l'agrégation du peptide Aβ et induisant par conséquent une augmentation de formes oligomériques solubles fortement neurotoxiques.

L'HN et ses dérivés possèdent l'avantage d'exercer leurs effets neuroprotecteurs à la fois sur les formes solubles et fibrillaires du peptide Aβ, indépendamment d'une interaction avec les oligomères solubles ou les fibrilles. Ainsi, le développement d'approches thérapeutiques ayant pour but de prévenir la perte synaptique et la mort neuronale en augmentant la quantité d'HN dans le cerveau représente une perspective intéressante. C'est dans cette optique que nous avons réalisé ce travail. En effet, nous avons le projet de faire la preuve du concept que la synthèse continue d'HN dans le cerveau peut représenter une stratégie neuroprotectrice vis-à-vis de dommages spécifiques associés à la MA. Pour y parvenir, nous avons choisi d'implanter dans le cerveau de souris des cellules recombinantes sécrétant l'HN (ou son dérivé HNG) et inclues dans des billes d'alginate. Les effets protecteurs de la présence d'HN *in vivo* seront étudiés d'un point de vue des atteintes cellulaires et tissulaires mais aussi sur les capacités mnésiques et cognitives des animaux. Ce travail se fait actuellement dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. R. Bjerkvig et le Dr. S. Niclou (NorLux Laboratory for Neuroscience Research, CRP-Santé, Luxembourg). Deux modèles animaux seront testés : un modèle d'exposition aiguë aux oligomères solubles de peptides Aβ (le modèle d'injection i.c.v. développé au cours de ce travail de thèse) et un modèle d'exposition chronique (souris transgéniques Tg2576). Réalisés avec succès, nos travaux *in vitro* et *in vivo* constituent la première phase de ce projet.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les recherches ménées ces trois dernières décennies sur la MA ont abouti à une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires responsables de la production et de l'agrégation du peptide Aβ (259). Il reste cependant à déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires régulant ces phénomènes, mais également savoir *quand et comment* ils sont perturbés au cours de la physiopathologie de la MA. En effet, considérant le peptide Aβ comme un acteur essentiel de la pathologie et donc une cible thérapeutique potentielle, plusieurs molécules "anti-Aβ" ont été développées, certaines sont encore en développement, d'autres en essais clinique de phase II (pour revue, 53). Ces stratégies thérapeutiques ont été construites sur la base de la cascade amyloïde en utilisant des modèles de souris transgéniques surexprimant des protéines mutées et identifiées dans des cas familiaux de MA (195). Le succès éventuel de ces approches appliquées aux formes sporadiques de MA dépend essentiellement de deux aspects : 1) l'impact réel de la cascade amyloïde : l'agrégation et l'accumulation du peptide Aβ dans le cerveau des patients atteints de MA sont-elles les causes ou les conséquences de la neurodégénérescence ? , 2) les modèles de souris transgéniques sont-ils représentatifs des formes sporadiques de MA ?

Les causes des formes sporadiques de la MA demeurent inconnues, probablement parce que cette pathologie est hétérogène (certains parlent d'un syndrome de type Alzheimer !), liée au vieillissement et à des interactions complexes entre facteurs génétiques et environnementaux. En absence de cause, les nombreuses similarités entre les formes familiales et sporadiques, tant d'un point de vue clinique qu'histopathologique, permettent de lier le développement des formes sporadiques de MA avec une perturbation du métabolisme de la protéine APP. Parmi les évènements découlant du métabolisme "amyloïdogène" de la protéine APP, l'accumulation d'oligomères solubles de peptide Aβ pourrait être le plus précoce commun aux formes sporadiques et familiales de la MA. Plusieurs travaux récents dont ceux de notre équipe supportent cette hypothèse (160 ; 660 ; 735 ; 799). De nombreux arguments, issus d'observations cliniques et histopathologiques, de travaux utilisant des modèles animaux et des systèmes *in vitro*, s'accumulent en faveur de l'hypothèse "amyloïde soluble" pour expliquer les perturbations précoces du fonctionnement neuronal dans la MA.

De façon intéressante, ces arguments sont à rapprocher d'observations récentes. En

effet, il est suggéré que les pertes de mémoire caractéristiques de la mise en place d'une MA soient associées à des perturbations subtiles de la plasticité et du fonctionnement des synapses hippocampiques (330 ; 461 ; 481 ; 499 ; 629 ; 630 ; 663 ; 796 ; 808). De plus, plusieurs observations suggèrent que ces dysfonctionnements synaptiques soient associés à des déficits de transport axonal apparaissant précocément dans les neurones hippocampiques des patients développant une MA (90 ; 608 ; 718). Bien évidemment, ces perturbations synaptiques et ces altérations du transport axonal précèdent la formation des plaques amyloïdes (718), mais peuvent être associées à l'accumulation d'oligomères solubles de peptide Aβ (317 ; 411).

Dans ce contexte, l'équipe de Thierry Pillot développe son programme de recherche en considérant la MA comme une "axonopathie" dépendante d'altération de structure et de fonctionnement de la synapse induite par les oligomères solubles de peptide Aβ. Ainsi, nous avons montré qu'une des cibles cellulaires les plus précocément atteintes par ces oligomères est le cytosquelette neuronal (185 ; 704). Ces altérations sont modulées par le statut lipidique des membranes neuronales (190 ; 706) et impliquent une signalisation cellulaire faisant intervenir des médiateurs lipidiques (407 ; 472).

Les objectifs que nous nous étions fixés au début de ce travail de thèse ont été atteints.

1 - Nous disposons désormais au laboratoire d'un modèle animal de neurotoxicité des oligomères solubles de peptides Aβ. Ce modèle nous permet d'aborder l'étude des altérations de la mémoire et de l'apprentissage induites *in vivo* par ces oligomères solubles et d'étudier leur modulation par différents facteurs. Bien évidemment, il reste à caractériser ce modèle d'un point de vue histologique et biochimique. Nos premières expériences ne montrent pas de mort cellulaire massive suite à une injection i.c.v. unique de faibles doses d'oligomères solubles de peptide Aβ. Nous comptons donc aborder des altérations plus subtiles, qui concernent la structure et le fonctionnement synaptique, ainsi que le transport axonal. Bien que dans notre modèle *in vivo* nous ayons montré que les déficits mnésiques induit par une injection i.c.v. d'oligomères solubles de peptide Aβ soient accompagnés d'un stress oxydant éphémère, nous n'avons constaté ni mort cellulaire massive, ni induction de processus inflammatoires. Afin de poursuivre ces études, il sera nécessaire de développer des modèles animaux associant cette fois mort cellulaire et inflammation. Pour cela, nous comptons réaliser des expériences d'injections multiples (après implantation de canules à demeure) ou continues (à l'aide de minipompes).

2 – Nos résultats suggèrent de plus que les oligomères solubles de peptides Aβ tronqués dans leur domaine amino-terminal représentent des acteurs moléculaires impliqués de façon précoce dans les altérations du fonctionnement du SNC au cours de la MA. Les travaux de notre équipe montre que l'apoptose neuronale induite par les formes solubles des peptides Aβ implique une séquence d'altérations cellulaires comme la perturbation de la fluidité membranaire, la perturbation de l'homéostasie calcique, la production d'ERO, l'activation de plusieurs classes de protéases et la perturbation du réseau de MTs, pour lesquelles nous avons déterminé une chronologie (185 ; 407 ; 587 ; 704). De plus, nos différents résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les formes fibrillaires et oligomériques des peptides Aβ induisent la mort neuronale par l'activation de voies de signalisation différentes (131 ; 704). De façon intéressante, nous n'avons pas observé de différence significative dans les propriétés neurotoxiques des formes tronquées de peptides Aβ, comparées à celles des formes 1-40 et 1-42. Ceci rejoint l'hypothèse du groupe de Glabe *et al*. selon laquelle la formation d'oligomères solubles est un mécanisme commun à de nombreux peptides et protéines. Ces formes pourraient représenter les espèces toxiques majeures du développement précoce de plusieurs maladies neurodégénératives (226). Cette structure commune des oligomères solubles dérivés de protéines ou peptides différents implique un mécanisme neurotoxique commun, basé sur la perturbation de la membrane plasmique et la perturbation de l'homéostasie calcique (365). En effet, une augmentation de l'oligomérisation, mais pas de la fibrillation, caractérise les formes toxiques de l'α-synuclein liées aux formes familiales précoces de la maladie de Parkinson (119). De plus, la diminution du nombre d'agrégats intraneuronaux constitués par la protéine Huntingtin, impliquée dans la maladie de Huntington, ne réduit pas pour autant la neurodégénérescence neuronale (651). Ces résultats sont à rapprocher de nos études montrant que des oligomères solubles d'un peptide dérivé de la protéine du prion humain possèdent des propriétés physico-chimiques et neurotoxiques semblables à celles des oligomères de peptides Aβ (588 ; 92 ; 705).

3 – Enfin, nous avons montré pour la première fois que l'humanine, un peptide endogène, est un facteur neuroprotecteur puissant vis-à-vis de la neurotoxicité *in vivo* et *in vit*ro des oligomères solubles de peptide Aβ. Ce dernier point est crucial pour le projet de notre équipe, car il pose les bases d'un programme de recherche développé en collaboration avec le laboratoire NorLux (Luxembourg) et qui a pour but de faire la preuve du concept que la production continue d'humanine dans le SNC est un moyen de combattre la neurodégénérescence associée à l'accumulation d'oligomères solubles de peptide Aβ.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1) Abad-Rodriguez J, Ledesma MD, Craessaerts K, *et al.* Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. 2004, J Cell Biol., 167(5):953-60.

2) Abe E, Casamenti F, Giovannelli L, *et al.* Administration of amyloid beta-peptides into the medial septum of rats decreases acetylcholine release from hippocampus in vivo. 1994, Brain Res., 636(1):162-4.

3) Aisen PS, Schafer KA, Grundman M, *et al.* Alzheimer's Disease Cooperative Study. Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. 2003, JAMA., 289(21):2819-26.

4) Akiyama H, Arai T, Kondo H, *et al.* Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. 2000, Alzheimer Dis Assoc Disord., 14 Suppl 1:S47-53.

5) Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, *et al.* Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. 2001, Neuroscience, 103(2):373-83.

6) Alafuzoff I, Helisalmi S, Heinonen EH, *et al.* Selegiline treatment and the extent of degenerative changes in brain tissue of patients with Alzheimer's disease. 2000, Eur J Clin Pharmacol., 55(11-12):815-9.

7) Aleksandrova IY, Kuvichkin VV, Kashparov IA, *et al.* Increased level of beta-amyloid in the brain of bulbectomized mice. 2004, Biochemistry (Mosc), 69(2):176-80.

8) Aleshkov SB, Li X, Lavrentiadou SN, *et al.* Contribution of cysteine 158, the glycosylation site threonine 194, the amino- and carboxy-terminal domains of apolipoprotein E in the binding to amyloid peptide beta (1-40). 1999, Biochemistry, 38(28):8918-25.

9) Allen JW, Eldadah BA, Huang X, *et al.* Multiple caspases are involved in beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. 2001, J Neurosci Res., 65(1):45-53.

10) Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, *et al.* ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. 2003, J Neurosci Res., 74(3):342-52.

11) Altman FP. Tetrazolium salts: a consumer's guide. 1976, Histochem J., 8(5):471-85.

12) Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, *et al.* Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. 2003, J Cell Biol., 161(1):41-54.

13) Anderson AJ, Pike CJ, Cotman CW. Differential induction of immediate early gene proteins in cultured neurons by beta-amyloid (A beta): association of c-Jun with A beta-induced apoptosis. 1995, J Neurochem., 65(4):1487-98.

14) Anderson AJ, Su JH, Cotman CW. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. 1996, J Neurosci., 16(5):1710-9.

15) Anderson R, Barnes JC, Bliss TV, *et al.* Behavioural, physiological and morphological analysis of a line of apolipoprotein E knockout mouse. 1998, Neuroscience, 85: 93–110.

16) Ando K, Iijima KI, Elliott JI, *et al.* Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of beta-amyloid. 2001, J Biol Chem., 276(43):40353-61.

17) Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. 1992, Biochemistry, 31(43):10626-33.

18) Andren PE, Levin ED, Liminga U, *et al.* Behavioral and neurochemical consequences of ibotenic acid lesion in the subthalamic nucleus of the common marmoset. 1995, Brain Res Bull., 36(3):301-7.

19) Annaert WG, Esselens C, Baert V, *et al.* Interaction with telencephalin and the amyloid precursor protein predicts a ring structure for presenilins. 2001, Neuron, 32(4):579-89.

20) Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K, *et al.* Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. 1999, J Cell Biol., 147(2):277-94.

21) Arai H, Kosaka K, Iizuka R. Changes of biogenic amines and their metabolites in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. 1984, J Neurochem., 43(2):388-93.

22) Arakawa T, Niikura T, Tajima H, *et al.* The secondary structure analysis of a potent Ser14Gly analog of antiAlzheimer peptide, Humanin, by circular dichroism. 2006, J Pept Sci. Jul 11.

23) Arbuckle TY, Maag U, Pushkar D, *et al.* Individual differences in trajectory of intellectual development over 45 years of adulthood. 1998, Psychol Aging., 13(4):663-75.

24) Arelin K, Kinoshita A, Whelan CM, *et al.* LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes. 2002, Brain Res Mol Brain Res., 104(1):38-46.

25) Arendt T, Holzer M, Stobe A, *et al.* Activated mitogenic signaling induces a process of dedifferentiation in Alzheimer's disease that eventually results in cell death. 2000, Ann N Y Acad Sci., 920:249-55.

26) Areosa SA, Sherriff F, McShane R. Memantine for dementia. 2005, Cochrane Database Syst Rev., (3):CD003154.

27) Arispe N. Architecture of the Alzheimer's A beta P ion channel pore. 2004, J Membr Biol., 197(1):33-48.

28) Arispe N, Doh M. Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease AbetaP (1-40) and (1-42) peptides. 2002, FASEB J. Oct;16(12):1526-36.

29) Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. 1992, Neurology, 42(3 Pt 1):631-9.

30) Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. 2005, FEBS Lett., 579(15):3287-96.

31) Atwood CS, Meethal SV, Liu T, *et al.* Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis with menopause and andropause promotes neurodegenerative senescence. 2005, J Neuropathol Exp Neurol., 64(2):93-103.

32) Bahr BA, Hoffman KB, Yang AJ, *et al.* Amyloid beta protein is internalized selectively by hippocampal field CA1 and causes neurons to accumulate amyloidogenic carboxyterminal fragments of the amyloid precursor protein. 1998, J Comp Neurol., 397(1):139-47.

33) Banks WA, Robinson SM, Verma S, *et al.* Efflux of human and mouse amyloid beta proteins 1-40 and 1-42

from brain: impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. 2003, Neuroscience, 121(2):487-92.
34) Barberger-Gateau P, Letenneur L, Deschamps V, *et al.* Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. 2002, BMJ., 325(7370):932-3.
35) Barra V, Boire JV. A general framework for the fusion of anatomical and functional medical images. 2001, Neuroimage., 13(3):410-24.
36) Beher D, Hesse L, Masters CL, Multhaup G. Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. 1996, J Biol Chem., 271(3):1613-20.
37) Behl C. Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. 1997, Cell Tissue Res., 290(3):471-80.
38) Behl C. Apoptosis and Alzheimer's disease. 2000, J Neural Transm., 107(11):1325-44.
39) Behl C, Davis JB, Klier FG, Schubert D. Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. 1994, Brain Res., 645(1-2):253-64.
40) Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. 1995, Biochem Biophys Res Commun., 216(2):473-82.
41) Belcher AM, Harrington RA, Malkova L, Mishkin M. Effects of hippocampal lesions on the monkey's ability to learn large sets of object-place associations. 2006, Hippocampus., 16(4):361-7.
42) Benaki D, Zikos C, Evangelou A, Livaniou E, *et al.* Solution structure of humanin, a peptide against Alzheimer's disease-related neurotoxicity. 2005, Biochem Biophys Res Commun., 329(1):152-60.
43) Benn SC, Woolf CJ. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. 2004, Nat Rev Neurosci., 5(9):686-700.
44) Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, *et al.* Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. 2000, J Biol Chem., 275(27):20647-51.
45) Berkman LF, Glass T, Brissette I, Seeman TE. From social integration to health: Durkheim in the new millennium. 2000, Soc Sci Med., 51(6):843-57.
46) Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, *et al.* Deterioration threshold of synaptic morphology in aging and senile dementia of Alzheimer's type. 1996, Anal Quant Cytol Histol., 18(3):209-13.
47) Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, *et al.* CSF diagnosis of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. 2006, J Neural Transm., [Epub ahead of print]
48) Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, *et al.* Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. 1995, J Neurochem., 64(2):749-60.
49) Billings LM, Oddo S, Green KN, *et al.* Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. 2005, Neuron, 45(5):675-88.
50) Bitan G, Lomakin A, Teplow DB. Amyloid beta-protein oligomerization: prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. 2001, J Biol Chem., 276(37):35176-84.
51) Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. 1997, Nature, 385(6618):729-33.
52) Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, *et al.* Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. 2003, Exp Neurol., 184(1):247-63.
53) Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. 2006, Lancet, 368(9533):387-403.
54) Bodendorf U, Danner S, Fischer F, *et al.* Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid. 2002, J Neurochem., 80(5):799-806.
55) Bodovitz S & Klein WL. Cholesterol Modulates a-Secretase Cleavage of Amyloid Precursor Protein. J.B.C. 1996; 271:4436–4440.
56) Bohr IJ. Does cholesterol act as a protector of cholinergic projections in Alzheimer's disease? 2005, Lipids Health Dis., 4:13.
57) Boland K, Behrens M, Choi D, *et al.* The serpin-enzyme complex receptor recognizes soluble, nontoxic amyloid-beta peptide but not aggregated, cytotoxic amyloid-beta peptide. 1996, J Biol Chem., 271(30):18032-44.
58) Boland K, Manias K, Perlmutter DH. Specificity in recognition of amyloid-beta peptide by the serpin-enzyme complex receptor in hepatoma cells and neuronal cells. 1995, J Biol Chem., 270(47):28022-8.
59) Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, *et al.* and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. 1995, Proc Natl Acad Sci U S A., 92(16):7162-6.
60) Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, *et al.* Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. 1997, Neuron., 19(4):939-45.
61) Borroni B, Anchisi D, Paghera B, *et al.* Combined 99mTc-ECD SPECT and neuropsychological studies in MCI for the assessment of conversion to AD. 2006, Neurobiol Aging., 27(1):24-31.
62) Bouras C, Hof PR, Morrison JH. Neurofibrillary tangle densities in the hippocampal formation in a non-demented population define subgroups of patients with differential early pathologic changes. 1993, Neurosci Lett., 153(2):131-5.
63) Bowerman B. Cell biology. Oxidative stress and cancer: a beta-catenin convergence. 2005, Science, 308(5725):1119-20.
64) Boxer AL, Garbutt S, Rankin KP, *et al.* Medial versus lateral frontal lobe contributions to voluntary saccade control as revealed by the study of patients with frontal lobe degeneration. 2006, J Neurosci., 26(23):6354-63.
65) Boyd-Kimball D, Sultana R, Poon HF, *et al.* Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid beta-peptide (1-42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease. 2005, Neuroscience, 132(2):313-24.
66) Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. 1991, Acta Neuropathol (Berl), 82(4):239-59.
67) Braak H, de Vos RA, Jansen EN, Bratzke H, Braak E. Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. 1998, Prog Brain Res., 117:267-85.
68) Breen KC, Bruce M, Anderton BH. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. 1991, J Neurosci Res., 28(1):90-100.
69) Brenneman DE, Gozes I. A femtomolar-acting neuroprotective peptide. 1996, J Clin Invest., 97(10):2299-307.

70) Brion JP, Flament-Durand J, Dustin P. Alzheimer's disease and tau proteins. 1986, Lancet, 2(8515):1098.
71) Broe M, Shepherd CE, Milward EA, Halliday GM. Relationship between DNA fragmentation, morphological changes and neuronal loss in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. 2001, Acta Neuropathol (Berl)., 101(6):616-24.
72) Brouillet E, Trembleau A, Galanaud D, et al. The amyloid precursor protein interacts with Go heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction. 1999, J Neurosci., 19(5):1717-27.
73) Brunkan AL, Goate AM. Presenilin function and gamma-secretase activity. 2005, J Neurochem., 93(4):769-92.
74) Buchert R, Wilke F, Chakrabarti B, *et al.* Adjusted scaling of FDG positron emission tomography images for statistical evaluation in patients with suspected Alzheimer's disease. 2005, J Neuroimaging., 15(4):348-55.
75) Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. 1993, Arch Pathol Lab Med., 117(12):1208-14.
76) Bullock R. Efficacy and safety of memantine in moderate-to-severe Alzheimer disease: the evidence to date. 2006, Alzheimer Dis Assoc Disord., 20(1):23-9.
77) Burr GO, Burr MM. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. 1929, JBC, 86, 345-367.
78) Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA. Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. 1993, Proc Natl Acad Sci U S A., 90(5):2092-6.
79) Butterfield DA, Lauderback CM. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. 2002, Free Radic Biol Med., 32(11):1050-60.
80) Buxbaum JD, Koo EH, Greengard P. Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide. 1993, Proc Natl Acad Sci U S A., 90(19):9195-8.
81) Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, *et al.* Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. 1998, J Biol Chem., 273(43):27765-7.
82) Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, *et al.* BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. 2001, Nat Neurosci., 4(3):233-4.
83) Calingasan NY, Uchida K, Gibson GE. Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. 1999, J Neurochem., 72(2):751-6.
84) Cao X, Sudhof TC. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. 2001, Science, 293(5527):115-20.
85) Cao X, Sudhof TC. Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. 2004, J Biol Chem., 279(23):24601-11.
86) Caporaso GL, Takei K, Gandy SE, *et al.* Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. 1994, J Neurosci., 14(5 Pt 2):3122-38.
87) Caputo CB, Sygowski LA, Scott CW, Sobel IR. Role of tau in the polymerization of peptides from beta-amyloid precursor protein. 1992, Brain Res., 597(2):227-32.
88) Carter BD, Medzihradsky F. Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. 1993, Proc Natl Acad Sci U S A., 90(9):4062-6.
89) Calenda A, Jallageas V, Silhol S, *et al*. Identification of a unique apolipoprotein E allele in Microcebus murinus; ApoE brain distribution and co-localization with beta-amyloid and tau proteins. 1995, Neurobiol Dis., 2(3):169-76.
90) Cash AD, Aliev G, Siedlak SL, *et al*. Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. 2003, Am J Pathol., 162(5):1623-7.
91) Caughey B, Lansbury PT. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. 2003, Annu Rev Neurosci., 26:267-98.
92) Chabry J, Ratsimanohatra C, Sponne I, *et al*. In vivo and in vitro neurotoxicity of the human prion protein (PrP) fragment P118-135 independently of PrP expression. 2003, J Neurosci., 23(2):462-9.
93) Chacon MA, Barria MI, Soto C, Inestrosa NC. Beta-sheet breaker peptide prevents Abeta-induced spatial memory impairments with partial reduction of amyloid deposits. 2004, Mol Psychiatry., 9(10):953-961.
94) Chang L, Bakhos L, Wang Z, Venton DL, Klein WL. Femtomole immunodetection of synthetic and endogenous amyloid-beta oligomers and its application to Alzheimer's disease drug candidate screening. 2003, J Mol Neurosci., 20(3):305-13.
95) Chauhan NB, Lichtor T, Siegel GJ. Aging potentiates Abeta-induced depletion of SNAP-25 in mouse hippocampus. 2003, Brain Res., 982(2):219-227.
96) Chen F, Yu G, Arawaka S, *et al.* Nicastrin binds to membrane-tethered Notch. 2001, Nat Cell Biol., 3(8):751-4.
97) Chen M, Yankner BA. An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. 1991, Neurosci Lett., 125(2):223-6.
98) Chen SY, Wright JW, Barnes CD. The neurochemical and behavioral effects of beta-amyloid peptide(25-35). 1996, Brain Res., 720(1-2):54-60.
99) Chiba T, Yamada M, Hashimoto Y, *et al.* Development of a femtomolar-acting humanin derivative named colivelin by attaching activity-dependent neurotrophic factor to its N terminus: characterization of colivelin-mediated neuroprotection against Alzheimer's disease-relevant insults in vitro and in vivo. 2005, J Neurosci., 25(44):10252-61.
100) Chishti MA, Yang DS, Janus C, *et al.* Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. 2001, J Biol Chem., 276(24):21562-70.
101) Choi EK, Zaidi NF, Miller JS, *et al.* Calsenilin is a substrate for caspase-3 that preferentially interacts with the familial Alzheimer's disease-associated C-terminal fragment of presenilin 2. 2001, J Biol Chem., 276(22):19197-204.
102) Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. 2000, Am J Clin Nutr., 71(2):621S-629S.
103) Christie G, Markwell RE, Gray CW, *et al.* Alzheimer's disease: correlation of the suppression of beta-amyloid peptide secretion from cultured cells with

inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. 1999, J Neurochem., 73(1):195-204.
104) Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, *et al.* Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. 1999, Nat Med., 5(5):560-4.
105) Chyung JH, Raper DM, Selkoe DJ. Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. 2005, J Biol Chem., 280(6):4383-92.
106) Clark JD, Lin LL, Kriz RW, *et al.* A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. 1991, Cell., 65(6):1043-51.
107) Cleary J, Hittner JM, Semotuk M, *et al.* Beta-amyloid(1-40) effects on behavior and memory. 1995, Brain Res. 682:69-74.
108) Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, *et al.* Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. 2005, Nat Neurosci., 8(1):79-84.
109) Clemens JA, Stephenson DT. Implants containing beta-amyloid protein are not neurotoxic to young and old rat brain. 1992, Neurobiol Aging. 13:581-6.
110) Clippingdale AB, Wade JD, Barrow CJ. The amyloid-beta peptide and its role in Alzheimer's disease. 2001, J Pept Sci., 7(5):227-49.
111) Cochran E, Bacci B, Chen Y, *et al.* Amyloid precursor protein and ubiquitin immunoreactivity in dystrophic axons is not unique to Alzheimer's disease. 1991, Am J Pathol., 139(3):485-9.
112) Colciaghi F, Borroni B, Zimmermann M, *et al.* Amyloid precursor protein metabolism is regulated toward alpha-secretase pathway by Ginkgo biloba extracts. 2004, Neurobiol Dis., 16(2):454-60.
113) Cole GM, Lim GP, Yang F, *et al.* Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. 2005, Neurobiol Aging., 26 Suppl 1:133-6.
114) Coles M, Bicknell W, Watson AA, *et al.* Solution structure of amyloid beta-peptide(1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is? 1998, Biochemistry, 37(31):11064-77.
115) Colon E, Strand ML, Carlsson-Skwirut C, Wahlgren A, *et al.* Anti-apoptotic factor humanin is expressed in the testis and prevents cell-death in leydig cells during the first wave of spermatogenesis. 2006, J Cell Physiol., 208(2):373-85.
116) Combrinck M, Williams J, De Berardinis MA, *et al.* Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline, and survival in Alzheimer's disease. 2006, J Neurol Neurosurg Psychiatry., 77(1):85-8.
117) Conquer JA, Tierney MC, Zecevic J, *et al.* Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. 2000, Lipids, 35(12):1305-12.
118) Conte V, Uryu K, Fujimoto S, *et al.* Vitamin E reduces amyloidosis and improves cognitive function in Tg2576 mice following repetitive concussive brain injury. 2004, J Neurochem., 90(3):758-64.
119) Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, *et al*. Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants. 2000, Ann N Y Acad Sci., 920:42-5.
120) Cook DG, Forman MS, Sung JC, *et al.* Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. 1997, Nat Med., 3(9):1021-3.
121) Cook DG, Forman MS, Sung JC, *et al.* Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. 1997, Nat Med., 3(9):1021-3.
122) Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. 1993, Science., 261(5123):921-3.
123) Corey-Bloom J, Anand R, Veach J. A randomized trial evaluating the efficacity and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. 1998, Int J Geriatr Psychopharmacol., 1 : 55-65.
124) Craft JM, Watterson DM, Frautschy SA, Van Eldik LJ. Aminopyridazines inhibit beta-amyloid-induced glial activation and neuronal damage in vivo. 2004, Neurobiol Aging., 25(10):1283-92.
125) Craft JM, Watterson DM, Marks A, Van Eldik LJ. Enhanced susceptibility of S-100B transgenic mice to neuroinflammation and neuronal dysfunction induced by intracerebroventricular infusion of human beta-amyloid. 2005, Glia., 51(3):209-216.
126) Craft JM, Watterson DM, Van Eldik LJ. Human amyloid beta-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. 2006, Glia, 53(5):484-90.
127) Crystal AS, Morais VA, Pierson TC, *et al.* Membrane topology of gamma-secretase component PEN-2. 2003, J Biol Chem., 278(22):20117-23.
128) Cuadra G, Summers K, Giacobini E. Cholinesterase inhibitor effects on neurotransmitters in rat cortex in vivo. 1994, J Pharmacol Exp Ther., 270(1):277-84.
129) Cummings JL. Alzheimer's disease. 2004, N Engl J Med., 351(1):56-67.
130) Cupers P, Orlans I, Craessaerts K, *et al.* The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. 2001, J Neurochem., 78(5):1168-78.
131) Dahlgren KN, Manelli AM, *et al.* Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. 2002, J Biol Chem., 277(35):32046-53.
132) Daigle I, Li C. apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. 1993, Proc Natl Acad Sci U S A., 90(24):12045-9.
133) Dantoine T, Auriacombe S, Sarazin M, *et al.* Rivastigmine monotherapy and combination therapy with memantine in patients with moderately severe Alzheimer's disease who failed to benefit from previous cholinesterase inhibitor treatment. 2006, Int J Clin Pract., 60(1):110-8.
134) Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. 2003, Int J Geriatr Psychiatry., 18(Suppl 1):S23-32.
135) Davies JR, Rudd JH, Fryer TD, *et al.* Identification of culprit lesions after transient ischemic attack by combined 18F fluorodeoxyglucose positron-emission tomography and high-resolution magnetic resonance imaging. 2005, Stroke., 36(12):2642-7.
136) Davis J, Cribbs DH, Cotman CW, Van Nostrand WE. Pathogenic amyloid beta-protein induces apoptosis

in cultured human cerebrovascular smooth muscle cells. 1999, Amyloid., 6(3):157-64.
137) Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, *et al.*. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. 1999, Neuroscience, 90(1):1-13.
138) De Sauvage F, Octave JN. A novel mRNA of the A4 amyloid precursor gene coding for a possibly secreted protein. 1989, Science, 245(4918):651-3.
139) De Strooper B, Annaert W, Cupers P, *et al.* A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. 1999, Nature, 398(6727) :518-22.
140) De Strooper B, Beullens M, Contreras B, *et al.* Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. 1997, J Biol Chem., 272(6):3590-8.
141) Dei R, Takeda A, Niwa H, Li M, *et al.* Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. 2002, Acta Neuropathol (Berl)., 104(2):113-22.
142) DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. 1990, Ann Neurol., 27(5):457-64.
143) Delacourte A, Buee L. Normal and pathological Tau proteins as factors for microtubule assembly. 1997, Int Rev Cytol., 171:167-224.
144) Delacourte A, David JP, Sergeant N, *et al.* The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. 1999, Neurology, 52(6):1158-65.
145) Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, *et al.* Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. 1998, Ann Neurol., 43(2):193-204.
146) Delaere P, He Y, Fayet G, Duyckaerts C, Hauw JJ. Beta A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians. 1993, Neurobiol Aging., 14(2):191-4.
147) Della Sala S, Spinnler H, Venneri A. Walking difficulties in patients with Alzheimer's disease might originate from gait apraxia. 2004, J Neurol Neurosurg Psychiatry., 75(2):196-201.
148) Delobette S, Privat A, Maurice T. In vitro aggregation facilities beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat. 1997, Eur J Pharmacol., 319(1):1-4.
149) Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, *et al.* Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. 2002, J Neurosci., 22(9):3445-53.
150) Dewachter I, Van Dorpe J, Smeijers L, *et al.* Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1. 2000, J Neurosci., 20(17):6452-8.
151) Dewji NN, Singer SJ. Cell surface expression of the Alzheimer disease-related presenilin proteins. 1997, Proc Natl Acad Sci U S A., 94(18):9926-31.
152) Dingwall C. Spotlight on BACE: the secretases as targets for treatment in Alzheimer disease. 2001, Clin Invest., 108(9):1243-6.
153) Ditaranto K, Tekirian TL, Yang AJ. Lysosomal membrane damage in soluble Abeta-mediated cell death in Alzheimer's disease. 2001, Neurobiol Dis., 8(1):19-31.
154) Dodart JC, Mathis C, Saura J, Bales KR, *et al.* Neuroanatomical abnormalities in behaviorally characterized APP(V717F) transgenic mice. 2000, Neurobiol Dis., 7(2):71-85.
155) Dodart JC, Meziane H, Mathis C, *et al.* Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. 1999, Behav Neurosci., 113(5):982-990.
156) Doraiswamy PM, Xiong GL. Pharmacological strategies for the prevention of Alzheimer's disease. 2006, Expert Opin Pharmacother., 7(1):1-10.
157) Dore S, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid- and human amylin-induced toxicity. 1997, Proc Natl Acad Sci U S A., 94(9):4772-7.
158) Driver AS, Kodavanti PR, Mundy WR. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. 2000, Neurotoxicol Teratol., 22(2):175-81.
159) Drouet B, Fifre A, Pincon-Raymond M, *et al.* ApoE protects cortical neurones against neurotoxicity induced by the non-fibrillar C-terminal domain of the amyloid-beta peptide. 2001, J Neurochem., 76(1):117-27.
160) Drouet B, Pincon-Raymond M, Chambaz J, Pillot T. Molecular basis of Alzheimer's disease. 2000, Cell Mol Life Sci., 57(5):705-15.
161) Dubois B, Touchon J, Portet F, *et al.* "The 5 words": a simple and sensitive test for the diagnosis of Alzheimer's disease. 2002, Presse Med., 31(36):1696-9.
162) Dudkin KN, Chueva V, Makarov FN, Bich TG, Roer AE. Impairments in working memory and decision-taking processes in monkeys in a model of Alzheimer's disease. 2005, Neurosci Behav Physiol., 35(3):281-9.
163) Duff K, Eckman C, Zehr C, *et al.* Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. 1996, Nature, 383(6602):710-713.
164) Dulubova I, Ho A, Huryeva I, *et al.*. Three-dimensional structure of an independently folded extracellular domain of human amyloid-beta precursor protein. 2004, Biochemistry, 43(30):9583-8.
165) Durell SR, Guy HR, Arispe N, *et al.* Theoretical models of the ion channel structure of amyloid beta-protein. 1994, Biophys J., 67(6):2137-45.
166) Duyckaerts C, Bennecib M, Grignon Y, *et al.* Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. 1997, Acta Neuropathol (Berl)., 93(5):501-507.
167) Duyckaerts C, Delaere P, Poulain V, *et al.* Does amyloid precede paired helical filaments in the senile plaque? A study of 15 cases with graded intellectual status in aging and Alzheimer disease. 1988, Neurosci Lett., 91(3):354-9.
168) Duyckaerts C, Hauw JJ, Bastenaire F, *et al.* Laminar distribution of neocortical senile plaques in senile dementia of the Alzheimer type. 1986, Acta Neuropathol (Berl)., 70(3-4):249-256.
169) Ebinger G, Bruyland M, Martin JJ, *et al.* Distribution of biogenic amines and their catabolites in brains from patients with Alzheimer's disease. 1987, J Neurol Sci., 77(2-3):267-83.
170) Edbauer D, Winkler E, Haass C, Steiner H. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation. 2002, Proc Natl Acad Sci U S A., 99(13):8666-71.

171) Efange SM. In vivo imaging of the vesicular acetylcholine transporter and the vesicular monoamine transporter. 2000, FASEB J., 14(15):2401-13.
172) Einstein G, Buranosky R, Crain BJ. Dendritic pathology of granule cells in Alzheimer's disease is unrelated to neuritic plaques. 1994, J Neurosci., 14(8):5077-88.
173) El Khoury JB, Moore KJ, Means TK, *et al.* CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. 2003, J Exp Med., 197(12):1657-66.
174) Emre M, Geula C, Ransil BJ, Mesulam MM. The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected beta-amyloid in the rat brain. 1992, Neurobiol Aging., 13(5):553-9.
175) Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, *et al.* Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. 2002, JAMA., 287(24):3223-9.
176) Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. 1986, Prog Neurobiol., 27(1):63-100.
177) Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, *et al.*NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Aβ 42 *in vivo*. 2003, J Clin Invest., 112(3):440-9.
178) Esch FS, Keim PS, Beattie EC, *et al.* Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. 1990, Science, 248(4959):1122-4.
179) Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, *et al.*. Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma - secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. 2002, Proc Natl Acad Sci U S A., 99(5):2720-5
180) Evin G, Weidemann A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. 2002, Peptides, 23(7):1285-97.
181) Farooqui AA, Horrocks LA. Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia. 2001, Neuroscientist, 7(3):232-45.
182) Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, *et al.* BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. 2000, Proc Natl Acad Sci U S A., 97(17):9712-7.
183) Fetler L, Amigorena S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. 2005, Science, 309(5733):392-3.
184) Fiala M, Zhang L, Gan X, *et al.* Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood--brain barrier model. 1998, Mol Med., 4(7):480-9.
185) Fifre A, Sponne I, Koziel V, *et al.* Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. 2006, J Biol Chem., 281(1):229-40.
186) Fink JK, Jones SM, Esposito C, Wilkowski J. Human microtubule-associated protein 1a (MAP1A) gene: genomic organization, cDNA sequence, and developmental- and tissue-specific expression. 1996, Genomics., 35(3):577-85.
187) Firuzi O, Pratico D. Coxibs and Alzheimer's disease: should they stay or should they go? 2006, Ann Neurol., 59(2):219-28.
188) Flament S, Delacourte A, Hemon B, Defossez A. Direct demonstration of abnormal phosphorylation of Tau microtubular proteins in Alzheimer's disease. 1989, C R Acad Sci III., 308(3) :77-82.
189) Flood JF, Morley JE, Roberts E. Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease. 1991, PNAS USA. 88:3363-6.
190) Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, *et al.* Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-b oligomers. 2006, J Neurochem. 96(2):385-95.
191) Fortna RR, Crystal AS, Morais VA, *et al.* Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the gamma-secretase complex. 2004, J Biol Chem., 279(5):3685-93.
192) Francis PT. Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. 2003, Int J Geriatr Psychiatry., 18(Suppl 1):S15-21.
193) Francis PT, Nordberg A, Arnold SE. A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease? 2005, Trends Pharmacol Sci., 26(2):104-11.
194) Francis R, McGrath G, Zhang J, *et al.* Aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. 2002, Dev Cell., 3(1):85-97.
195) Francotte P, Graindorge E, Boverie S, *et al*. New trends in the design of drugs against Alzheimer's disease. 2004, Curr Med Chem., 11(13):1757-78.
196) Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Ionic effects of the Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein and its metabolic fragments. 1997, Trends Neurosci., 20(2):67-72.
197) Fratiglioni L, Paillard-Borg S, Winblad B. An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. 2004, Lancet Neurol., 3(6):343-53.
198) Fratiglioni L, Viitanen M, von Strauss E, *et al.* Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm. 1997, Neurology, 48(1):132-8.
199) Frautschy SA, Cole GM, Baird A. Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. 1992, Am J Pathol., 140(6):1389-99.
200) Frautschy SA, Yang F, Calderon L, Cole GM. Rodent models of Alzheimer's disease: rat A beta infusion approaches to amyloid deposits. 1996, Neurobiol Aging., 17(2):311-21.
201) Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, *et al.* Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. 1998, Am J Pathol., 152(1):307-17.
202) Freir DB, Holscher C, Herron CE. Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. 2001, J Neurophysiol., 85(2):708-13.
203) Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, *et al.* Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. 2004, Am J Pathol., 164(2):719-25.
204) Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. 2001, Science, 294(5548):1871-5.
205) Furukawa K, Abe Y, Akaike N. Amyloid beta protein-induced irreversible current in rat cortical neurones. 1994, Neuroreport, 5(16):2016-8.
206) Gabuzda D, Busciglio J, Yankner BA. Inhibition of beta-amyloid production by activation of protein kinase C. 1993, J Neurochem., 61(6):2326-9.
207) Gallez C. Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées. 1995, Assemblée Nationale, N°2454. (http://www.assemblee-nationale.fr).

208) Games D, Adams D, Alessandrini R, *et al.* Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. 1995, Nature., 373(6514):523-7.
209) Games D, Khan KM, Soriano FG, *et al.* Lack of Alzheimer pathology after beta-amyloid protein injections in rat brain. 1992, Neurobiol Aging, 13:569-576.
210) Gartner U, Bruckner MK, Krug S, *et al.*. Amyloid deposition in APP23 mice is associated with the expression of cyclins in astrocytes but not in neurons. 2003, Acta Neuropathol (Berl)., 106(6):535-44.
211) Gearing M, Mori H, Mirra SS. Abeta-peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. 1996, Ann Neurol., 39(3):395-9.
212) Gearing M, Rebeck GW, Hyman BT, *et al.* Neuropathology and apolipoprotein E profile of aged chimpanzees: implications for Alzheimer disease. 1994, Proc Natl Acad Sci U S A., 91(20):9382-6.
213) Gearing M, Tigges J, Mori H, Mirra SS. A beta40 is a major form of beta-amyloid in nonhuman primates. 1996, Neurobiol Aging., 17(6):903-8.
214) Gearing M, Tigges J, Mori H, Mirra SS. beta-Amyloid (A beta) deposition in the brains of aged orangutans. 1997, Neurobiol Aging., 18(2):139-46.
215) Geddes JW, Tekirian TL, Mattson MP. N-terminus truncated beta-amyloid peptides and C-terminus truncated secreted forms of amyloid precursor protein: distinct roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. 1999, Neurobiol Aging., 20(1):75-9.
216) Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, *et al.* Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. 1999, Cell., 97(3):395-406.
217) Geula C, Mesulam MM. Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. 1995, Alzheimer Dis Assoc Disord., 9 Suppl 2:23-8.
218) Geula C, Nagykery N, Wu CK. Amyloid-beta deposits in the cerebral cortex of the aged common marmoset (Callithrix jacchus): incidence and chemical composition. 2002, Acta Neuropathol (Berl)., 103(1):48-58.
219) Giacobini E, Mori F, Lai CC. The effect of cholinesterase inhibitors on the secretion of APPS from rat brain cortex. 1996, Ann N Y Acad Sci., 777:393-8.
220) Gibson GE, Huang HM. Mitochondrial enzymes and endoplasmic reticulum calcium stores as targets of oxidative stress in neurodegenerative diseases. 2004, J Bioenerg Biomembr., 36(4):335-40.
221) Gibson GE, Vestling M, Zhang H, *et al.* Abnormalities in Alzheimer's disease fibroblasts bearing the APP670/671 mutation. 1997, Neurobiol Aging., 18(6):573-80.
222) Gibson GE, Zhang H, Toral-Barza L, *et al.* Calcium stores in cultured fibroblasts and their changes with Alzheimer's disease. 1996, Biochim Biophys Acta., 1316(2):71-7.
223) Giovannelli L, Casamenti F, Scali C, *et al.* Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis. 1995, Neuroscience, 66(4):781-92.
224) Giovanni A, Keramaris E, Morris EJ, *et al.* E2F1 mediates death of B-amyloid-treated cortical neurons in a manner independent of p53 and dependent on Bax and caspase 3. 2000, J Biol Chem., 275(16):11553-60.
225) Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, *et al.* Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. 2002, Neurobiol Dis., 11(2):257-74.
226) Glabe CG. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. 2006, Neurobiol Aging., 27(4):570-5.
227) Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. 1984, Biochem Biophys Res Commun., 120(3):885-90.
228) Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. 1991, Nature, 349(6311):704-6.
229) Goate AM. Monogenetic determinants of Alzheimer's disease: APP mutations. 1998, Cell Mol Life Sci., 54(9):897-901.
230) Goldgaber D, Lerman MI, McBride WO, *et al.* Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging. 1987, J Neural Transm. Suppl., 24:23-8.
231) Gong Y, Chang L, Viola KL, *et al.* Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. 2003, Proc Natl Acad Sci U S A., 100(18):10417-22.
232) Gonzalez-Billault C, Jimenez-Mateos EM, Caceres A, *et al.* Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system. 2004, J Neurobiol., 58(1):48-59.
233) Gonzalo-Ruiz A, Gonzalez I, Sanz-Anquela JM. Effects of beta-amyloid protein on serotoninergic, noradrenergic, and cholinergic markers in neurons of the pontomesencephalic tegmentum in the rat. 2003, J Chem Neuroanat., 26(3):153-169.
234) Gonzalo-Ruiz A, Sanz JM, Arevalo J, *et al.* Amyloid beta peptide-induced cholinergic fibres loss in the cerebral cortex of the rat is modified by diet high in lipids and by age. 2005, J Chem Neuroanat., 29:31-48.
235) Gooch MD, Stennett DJ. Molecular basis of Alzheimer's disease. 1996, Am J Health Syst Pharm., 53(13):1545-57; quiz 1603-4.
236) Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW. Protein nitration in Parkinson's disease. 1998, J Neuropathol Exp Neurol., 57(4):338-42.
237) Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. 1996, Neurochem., 66(5):1836-44.
238) Gordon I, Grauer E, Genis I, Sehayek E, Michaelson DM. Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. 1995, Neurosci Lett., 199(1):1-4.
239) Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH. Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. 2005, Neurobiol Aging., 26(9):1235-44.
240) Goutte C, Tsunozaki M, Hale VA, Priess JR. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in Caenorhabditis elegans embryos. 2002, Proc Natl Acad Sci U S A., 99(2):775-9.

241) Gralle M, Botelho MM, de Oliveira CL, *et al.* Solution studies and structural model of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein. 2002, Biophys J., 83(6):3513-24.
242) Graves AB, Larson EB, Edland SD, *et al.*. Prevalence of dementia and its subtypes in the Japanese American population of King County, Washington state. The Kame Project. 1996, Am J Epidemiol., 144(8):760-71.
243) Gray CW, Patel AJ. Regulation of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs by transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta in astrocytes. 1993, Brain Res Mol Brain Res., 19(3):251-6.
244) Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, *et al.* Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. 1999, Proc Natl Acad Sci U S A., 96(2):742-7.
245) Griffith HR, Netson KL, Harrell LE, *et al.* Amnestic mild cognitive impairment: diagnostic outcomes and clinical prediction over a two-year time period. 2006, J Int Neuropsychol Soc., 12(2):166-75.
246) Grootendorst J, Bour A, Vogel E, *et al.* Human apoE targeted replacement mouse lines: h-apoE4 and h-apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior. 2005, Behav Brain Res., 159(1):1-14.
247) Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. 1986, Proc Natl Acad Sci U S A., 83(13):4913-7.
248) Gu Y, Chen F, Sanjo N, Kawarai T, *et al.* APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes. 2003, Biol Chem., 278(9):7374-80.
249) Guo B, Zhai D, Cabezas E, *et al.* Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. 2003, Nature., 423(6938):456-61.
250) Guo H, Albrecht S, Bourdeau M, *et al.* Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. 2004, Am J Pathol., 165(2):523-31.
251) Guo JT, Yu J, Grass D, *et al.* Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid a protein in a mouse model of amyloidosis. 2002, J Neurosci., 22(14):5900-9.
252) Guzowski JF. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. 2002, Hippocampus., 12(1):86-104.
253) Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, *et al.* Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. 1992, Nature, 359(6393):322-5.
254) Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. 2002, Glia, 40(2):140-55.
255) Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. 1989, J Immunol Methods., 119(2):203-10.
256) Harada J, Sugimoto M. Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. 1999, Brain Res., 842(2):311-23.
257) Harada M, Habata Y, Hosoya M, *et al.* N-Formylated humanin activates both formyl peptide receptor-like 1 and 2. 2004, Biochem Biophys Res Commun., 324(1):255-61.
258) Harder JA, Baker HF, Ridley RM. The role of the central cholinergic projections in cognition: implications of the effects of scopolamine on discrimination learning by monkeys. 1998, Brain Res Bull., 45(3):319-26.
259) Hardy J. Toward Alzheimer therapies based on genetic knowledge. 2004, Ann Rev Med., 55:15-25.
260) Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. 1997, Trends Neurosci., 20(4):154-9.
261) Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. 1992, Science, 256(5054):184-5.
262) Hardy JA, Mann DM, Wester P, Winblad B. An integrative hypothesis concerning the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. 1986, Neurobiol Aging., 7(6):489-502.
263) Harigaya Y, Saido TC, Eckman CB, *et al.* Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. 2000, Biochem Biophys Res Commun., 276(2):422-7.
264) Harigaya Y, Shoji M, Kawarabayashi T, *et al.* Modified amyloid beta protein ending at 42 or 40 with different solubility accumulates in the brain of Alzheimer's disease. 1995, Biochem Biophys Res Commun., 211(3):1015-22.
265) Harkany T, De Jong GI, Soos K, *et al.*. Beta-amyloid (1-42) affects cholinergic but not parvalbumin-containing neurons in the septal complex of the rat. 1995a, Brain Res., 698(1-2):270-4.
266) Harkany T, Lengyel Z, Soos K, *et al.* Cholinotoxic effects of beta-amyloid (1-42) peptide on cortical projections of the rat nucleus basalis magnocellularis. 1995b, Brain Res., 695(1):71-5.
267) Harkany T, Mulder J, Sasvari M, *et al.* N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against beta-amyloid neurotoxicity. 1999, Neurobiol Dis., 6(2):109-21.
268) Harkany T, O'Mahony S, Keijser J, *et al.*. Beta-amyloid(1-42)-induced cholinergic lesions in rat nucleus basalis bidirectionally modulate serotonergic innervation of the basal forebrain and cerebral cortex. 2001, Neurobiol Dis., 8(4):667-78.
269) Harkany T, O'Mahony S, Kelly JP, *et al.* Beta-amyloid(Phe(SO3H)24)25-35 in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation. 1998, Behav Brain Res., 90(2):133-45.
270) Harper JD, Lansbury PT Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. 1997, Annu Rev Biochem., 66:385-407.
271) Harrison SM, Harper AJ, Hawkins J, *et al.* BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes. 2003, Mol Cell Neurosci., 24(3):646-655.
272) Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, *et al.* Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. 1999, J Neurosci., 19(20):8876-84.
273) Hartman RE, Wozniak DF, Nardi A, *et al.* Behavioral phenotyping of GFAP-apoE3 and -apoE4 transgenic mice: apoE4 mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology. 2001, Exp Neurol., 170(2):326-44.

274) Hartman T. Cholesterol and Alzheimer's disease: statins, cholesterol depletion in APP processing and Abeta generation. 2005, Subcell Biochem., 38:365-80.
275) Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, *et al.* Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. 1997, Nat Med., 3(9):1016-20.
276) Hashimoto M, Hossain S, Agdul H, Shido O. Docosahexaenoic acid-induced amelioration on impairment of memory learning in amyloid beta-infused rats relates to the decreases of amyloid beta and cholesterol levels in detergent-insoluble membrane fractions. 2005, Biochim Biophys Acta., 1738(1-3):91-98.
277) Hashimoto Y, Ito Y, Niikura T, *et al.* Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. 2001c, Biochem Biophys Res Commun., 283(2):460-8.
278) Hashimoto Y, Nawa M, Chiba T, *et al.* Transforming growth factor beta2 autocrinally mediates neuronal cell death induced by amyloid-beta. 2006, J Neurosci Res., 83(6):1039-47.
279) Hashimoto Y, Niikura T, Chiba T, *et al.* The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor causes sustained apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun NH2-terminal kinase-mediated neurotoxic signal via dimerization. 2003b, J Pharmacol Exp Ther., 306(3):889-902.
280) Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, *et al.* Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. 2001a, J Neurosci., 21(23):9235-45.
281) Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, *et al.* A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. 2001b, Proc Natl Acad Sci U S A., 98(11):6336-41.
282) Hashimoto Y, Suzuki H, Aiso S, *et al.* Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in Humanin-mediated neuroprotection. 2005, Life Sci., 77(24):3092-104.
283) Hashimoto Y, Terashita K, Niikura T, *et al.* Humanin antagonists: mutants that interfere with dimerization inhibit neuroprotection by Humanin. 2004, Eur J Neurosci., 19(9):2356-64.
284) Hashimoto Y, Tsuji O, Niikura T, *et al.* Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. 2003a, J Neurochem., 84(4):864-77.
285) Hass MR, Yankner BA. A {gamma}-secretase-independent mechanism of signal transduction by the amyloid precursor protein. 2005, J Biol Chem., 280(44):36895-904.
286) Hauw JJ, Vignolo P, Duyckaerts C, *et al.* Neuropathological study of 12 centenarians: the incidence of Alzheimer type senile dementia is not particularly increased in this group of very old patients. 1986, Rev Neurol (Paris)., 142(2):107-15.
287) Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, *et al.* A seed for Alzheimer amyloid in the brain. 2004, J Neurosci., 24(20):4894-902.
288) Heber S, Herms J, Gajic V, *et al.* Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. 2000, J Neurosci., 20(21):7951-63.
289) Hendrie HC, Hall KS, *et al.* Apolipoprotein E genotypes and Alzheimer's disease in a community study of elderly African Americans. 1995, Ann Neurol., 37(1):118-20.
290) Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, *et al*. Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. 2005, Brain, 128(Pt 6):1442-53.
291) Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, *et al.* Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. 2005, J Neuroinflammation., 2:22.
292) Heneka MT, Wiesinger H, Dumitrescu-Ozimek L, *et al.* Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. 2001, J Neuropathol Exp Neurol., 60(9):906-16.
293) Herholz K, Weisenbach S, Zundorf G, *et al.* In vivo study of acetylcholine esterase in basal forebrain, amygdala, and cortex in mild to moderate Alzheimer disease. 2004, Neuroimage., 21(1):136-43.
294) Herregodts P, Bruyland M, De Keyser J, *et al.* Monoaminergic neurotransmitters in Alzheimer's disease. An HPLC study comparing presenile familial and sporadic senile cases. 1989, J Neurol Sci., 92(1):101-16.
295) Herreman A, Hartmann D, Annaert W, *et al.* Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. 1999, Proc Natl Acad Sci U S A., 96(21):11872-7.
296) Herreman A, Serneels L, Annaert W, *et al.* Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. 2000, Nat Cell Biol., 2(7):461-2.
297) Herreman A, Van Gassen G, Bentahir M, *et al.*. gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. 2003, J Cell Sci., 116(Pt 6):1127-36.
298) Hertel C, Terzi E, Hauser N, *et al.* Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. 1997, Proc Natl Acad Sci U S A., 94(17):9412-6.
299) Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G. The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. 1987, Nature, 325(6103):445-7.
300) Higgins LS, Holtzman DM, Rabin J, *et al.* Transgenic mouse brain histopathology resembles early Alzheimer's disease. 1994, Ann Neurol., 35(5):598-607.
301) Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, *et al.* Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. 1991, J Mol Biol., 218(1):149-63.
302) Hirakura Y, Lin MC, Kagan BL. Alzheimer amyloid abeta1-42 channels: effects of solvent, pH, and Congo Red. 1999, J Neurosci Res., 57(4):458-66.
303) Hirayama A, Horikoshi Y, Maeda M, *et al.* Characteristic developmental expression of amyloid beta40, 42 and 43 in patients with Down syndrome. 2003, Brain Dev., 25(3):180-5.
304) Ho GJ, Drego R, Hakimian E, Masliah E. Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. 2005, Curr Drug Targets Inflamm Allergy., 4(2):247-56.
305) Ho L, Purohit D, Haroutunian V, *et al.* Neuronal cyclooxygenase 2 expression in the hippocampal formation as a function of the clinical progression of Alzheimer disease. 2001, Arch Neurol., 58(3):487-92.

306) Hof PR, Bouras C, Perl DP, Sparks DL, *et al.* Age-related distribution of neuropathologic changes in the cerebral cortex of patients with Down's syndrome. Quantitative regional analysis and comparison with Alzheimer's disease. 1995, Arch Neurol., 52(4):379-91.
307) Hof PR, Charpiot A, Delacourte A, *et al.* Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. 1992, Neurosci Lett., 139(1):10-4.
308) Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, *et al.*. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. 1998, Nat Med., 4(1):97-100.
309) Holscher C. Possible causes of Alzheimer's disease: amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis. 1998, Neurobiol Dis., 5(3):129-41.
310) Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, *et al.* Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. 2000, Proc Natl Acad Sci USA., 97(6):2892-2897.
311) Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller JM, Eikelenboom P. Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. 2006, Int J Dev Neurosci., 24(2-3):157-65.
312) Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). 1999, Pharmacol Res., 40(3):211-25.
313) House JS, Lantz PM, Herd P. Continuity and change in the social stratification of aging and health over the life course: evidence from a nationally representative longitudinal study from 1986 to 2001/2002 (Americans' Changing Lives Study). 2005, J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci., 60 Spec No 2:15-26.
314) Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, *et al.* Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. 1999, Proc Natl Acad Sci U S A., 96(6):3228-33.
315) Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, *et al.* Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. 1996, Science., 274(5284):99-102.
316) Hu Y, Fortini ME. Different cofactor activities in gamma-secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex. 2003, J Cell Biol., 161(4):685-90.
317) Huang SM, Mouri A, Kokubo H, *et al*. Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. 2006, Biol Chem., 281(26):17941-51.
318) Huang XG, Yee BK, Nag S, *et al.*. Behavioral and neurochemical characterization of transgenic mice carrying the human presenilin-1 gene with or without the leucine-to-proline mutation at codon 235. 2003, Exp Neurol., 183(2):673-81.
319) Hung AY, Selkoe DJ. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. 1994, EMBO J., 13(3):534-42.
320) Huse JT, Doms RW. Closing in on the amyloid cascade: recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease. 2000, Mol Neurobiol., 22(1-3):81-98.
321) Hussain I, Powell D, Howlett DR, *et al.* Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. 1999, Mol Cell Neurosci., 14(6):419-27.
322) Hwang DY, Chae KR, Kang TS, *et al.* Alterations in behavior, amyloid beta-42, caspase-3, and Cox-2 in mutant PS2 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 2002, FASEB J., 16(8):805-13.
323) Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. 1986, J Biochem (Tokyo)., 99(6):1807-10.
324) Ikonen M, Liu B, Hashimoto Y, *et al.* Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. 2003, Proc Natl Acad Sci U S A., 100(22):13042-7.
325) Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, *et al.* Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. 2005, Biochim Biophys Acta., 1739(2-3):198-210.
326) Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Wisniewski HM, Terry RD. On neurofilament and neurotubule proteins from human autopsy tissue. 1977, J Neurochem., 29(3):417-24.
327) Irie K, Murakami K, Masuda Y, *et al.* Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. 2005, J Biosci Bioeng., 99(5):437-47.
328) Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, *et al.* APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. 1997, Neuropathol Exp Neurol., 56(9):965-73.
329) Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, *et al.* Internal Ca2+ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. 1994, Proc Natl Acad Sci U S A., 91(2):534-8.
330) Itoh A., Akaike T., Sokabe M. *et al*., Impairment of long term potentiation in hippocampal slices of β-amyloid infused rat. 1999, Eur J Pharmacol. 3: 167-75.
331) Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ, *et al.*. The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. 1995, Biochem J., 311 (Pt 1):1-16.
332) Ivins KJ, Thornton PL, Rohn TT, Cotman CW. Neuronal apoptosis induced by beta-amyloid is mediated by caspase-8. 1999, Neurobiol Dis., 6(5):440-9.
333) Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, *et al.* 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). 1994, Neuron, 13(1):45-53.
334) Jack CR Jr, Shiung MM, Weigand SD, *et al.* Brain atrophy rates predict subsequent clinical conversion in normal elderly and amnestic MCI. 2005, Neurology., 65(8):1227-31.
335) Jacobs RW, Duong T, Scheibel AB. Immunohistochemical analysis of the basal forebrain in Alzheimer's disease. 1992, Mol Chem Neuropathol., 17(1):1-20.
336) Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, *et al.* Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. 2006, Proc Natl Acad Sci U S A., 103(13):5161-6.
337) Jagust W, Gitcho A, Sun F, Kuczynski B, *et al.* Brain imaging evidence of preclinical Alzheimer's disease in normal aging. 2006, Ann Neurol., 59(4):673-81.
338) Jang JH, Surh YJ. Beta-amyloid-induced apoptosis is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the mitogen-activated protein kinase-NF-kappaB signaling pathway. 2005, Free Radic Biol Med., 38(12):1604-13.
339) Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, *et al.* Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. 2001, Biomol Eng., 17(6):157-65.

340) Jantaratnotai N, Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. Amyloid beta peptide-induced corpus callosum damage and glial activation in vivo. 2003, Neuroreport, 14(11):1429-33.
341) Jhamandas JH, MacTavish D. Antagonist of the amylin receptor blocks beta-amyloid toxicity in rat cholinergic basal forebrain neurons. 2004, J Neurosci., 24(24):5579-84.
342) Jhoo JH, Kim HC, Nabeshima T, *et al.* Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. 2004, Behav Brain Res., 155(2):185-196.
343) Ji Y, Gong Y, Gan W, Beach T, *et al.* Apolipoprotein E isoform-specific regulation of dendritic spine morphology in apolipoprotein E transgenic mice and Alzheimer's disease patients. 2003, Neuroscience, 122(2):305-15.
344) Ji Y, Permanne B, Sigurdsson EM, Holtzman DM, Wisniewski T. Amyloid beta40/42 clearance across the blood-brain barrier following intra-ventricular injections in wild-type, apoE knock-out and human apoE3 or E4 expressing transgenic mice. 2001, J Alzheimers Dis., 3(1):23-30
345) Jicha GA, Parisi JE, Dickson DW, *et al.* Neuropathologic outcome of mild cognitive impairment following progression to clinical dementia. 2006, Arch Neurol., 63(5):647-8.
346) Joachim CL, Morris JH, Selkoe DJ. Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease. 1989, Am J Pathol., 135(2):309-19.
347) Johnson-Wood K, Lee M, Motter R, *et al.* Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. 1997, Proc Natl Acad Sci U S A., 94(4):1550-1555.
348) Joo Y, Kim HS, Woo RS, *et al.* Mefenamic acid shows neuroprotective effects and improves cognitive impairment in in vitro and in vivo Alzheimer's disease models. 2006, Mol Pharmacol., 69(1):76-84.
349) Jordan BD, Relkin NR, Ravdin LD, *et al.* Apolipoprotein E epsilon4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing. 1997, JAMA., 278(2):136-40.
350) Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. 2005, Am J Clin Nutr., 81(1 Suppl):313S-316S.
351) Joslin G, Krause JE, Hershey AD, Adams SP, *et al.* Amyloid-beta peptide, substance P, and bombesin bind to the serpin-enzyme complex receptor. 1991, J Biol Chem., 266(32):21897-902.
352) Jung SS, Van Nostrand WE. Humanin rescues human cerebrovascular smooth muscle cells from Abeta-induced toxicity. 2003, J Neurochem., 84(2):266-72.
353) Kaether C, Lammich S, Edbauer D, *et al.* Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. 2002, J Cell Biol., 158(3):551-61.
354) Kagan BL, Azimov R, Azimova R. Amyloid peptide channels. 2004, J Membr Biol., 202(1):1-10.
355) Kalaria RN. Microglia and Alzheimer's disease. 1999, Curr Opin Hematol., 6(1):15-24.
356) Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, *et al.* Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. 1997, Ann Neurol., 42(5):776-82.
357) Kalmijn S, van Boxtel MP, Ocke M, *et al.*. Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. 2004, Neurology, 62(2):275-80.
358) kamoto T, Takeda S, Murayama Y, *et al.* Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. 1995, J Biol Chem., 270(9):4205-8.
359) Kariya S, Hirano M, Nagai Y, *et al.*. Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches. 2005, Mol Neurosci., 25(2):165-9.
360) Kariya S, Takahashi N, Hirano M, Ueno S. Humanin improves impaired metabolic activity and prolongs survival of serum-deprived human lymphocytes. 2003, Mol Cell Biochem., 254(1-2):83-9.
361) Kariya S, Takahashi N, Ooba N, *et al.* Humanin inhibits cell death of serum-deprived PC12h cells. 2002, Neuroreport., 13(6):903-7.
362) Katzman R, Brown T, Thal LJ, *et al.* Comparison of rate of annual change of mental status score in four independent studies of patients with Alzheimer's disease. 1988, Ann Neurol., 24(3):384-9.
363) Kawahara M, Arispe N, Kuroda Y, Rojas E. Alzheimer's disease amyloid beta-protein forms Zn(2+)-sensitive, cation-selective channels across excised membrane patches from hypothalamic neurons. 1997, Biophys J., 73(1):67-75.
364) Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, *et al.* Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 2001, J Neurosci., 21(2):372-81.
365) Kayed R, Head E, Thompson JL, *et al*. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. 2003, Science, 300(5618):486-9.
366) Keil U, Bonert A, Marques CA, *et al.*. Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. 2004, J Biol Chem., 279(48):50310-20.
367) Kelly PH, Bondolfi L, Hunziker D, *et al*. Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. 2003, Neurobiol Aging., 24(2):365-78.
368) Kelly MP, Deadwyler SA. Experience-dependent regulation of the immediate-early gene arc differs across brain regions. 2003, J Neurosci., 23(16):6443-51.
369) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. 1972, Br J Cancer., 26(4):239-57.
370) Kibbey MC, Jucker M, Weeks BS, *et al.* beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. 1993, Proc Natl Acad Sci U S A., 90(21):10150-3.
371) Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. 1963, Nature, 197:192-3.
372) Kihara M, Chatani E, Sakai M, *et al.* seeding-dependent maturation of beta2-microglobulin amyloid fibrils at neutral pH. 2005, Biol Chem., 280(12):12012-8.
373) Kihiko ME, Tucker HM, Rydel RE, Estus S. c-Jun contributes to amyloid beta-induced neuronal apoptosis but is not necessary for amyloid beta-induced c-jun induction. 1999, J Neurochem., 73(6):2609-12.

374) Kim HJ, Chae SC, Lee DK, *et al.* Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein. 2003, FASEB J., 17(1):118-20.
375) Kim HS, Cho JY, Kim DH, *et al.* Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on microglial activation induced by intracerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1-42) in mice. 2004, Biol Pharm Bull., 27(1):120-131.
376) Kim HS, Lee JH, Lee JP, *et al.* Amyloid beta peptide induces cytochrome C release from isolated mitochondria. 2002, Neuroreport., 13(15):1989-93.
377) Kim SH, Leem JY, Lah JJ, *et al.* Multiple effects of aspartate mutant presenilin 1 on the processing and trafficking of amyloid precursor protein. 2001, J Biol Chem., 276(46):43343-50.
378) Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, *et al.*. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. 2003, Proc Natl Acad Sci U S A., 100(11):6382-7.
379) Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, *et al.* Complex N-linked glycosylated nicastrin associates with active gamma-secretase and undergoes tight cellular regulation. 2002, J Biol Chem., 277(38):35113-7.
380) Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. 2001, J Biol Chem., 276(43):40288-92.
381) Kimura N, Nakamura SI, Honda T, *et al.* Age-related changes in the localization of presenilin-1 in cynomolgus monkey brain. 2001, Brain Res., 922(1):30-41.
382) Kin T, Sugie K, Hirano M, *et al.* Humanin expression in skeletal muscles of patients with chronic progressive external ophthalmoplegia. 2006, J Hum Genet., 51(6):555-8.
383) Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, *et al.* Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. 1988, Nature, 331(6156):530-2.
384) Klein WL, Krafft GA, Finch CE. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? 2001, Trends Neurosci., 24(4):219-24.
385) Klein WL, Stine WB Jr, Teplow DB. Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. 2004, Neurobiol Aging., 25(5):569-80
386) Klunk WE, Lopresti BJ, Ikonomovic MD, *et al.* Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain. 2005, J Neurosci., 25(46):10598-606.
387) Klyubin I, Walsh DM, Cullen WK, *et al.* Soluble Arctic amyloid beta protein inhibits hippocampal long-term potentiation in vivo. 2004, Eur J Neurosci., 19(10):2839-46.
388) Knibb JA, Xuereb JH, Patterson K, Hodges JR. Clinical and pathological characterization of progressive aphasia. 2006, Ann Neurol., 59(1):156-65.
389) Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, *et al.* Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. 2001, Neurology, 56(9):1143-53.
390) Knott V, Mohr E, Mahoney C, Engeland C, Ilivitsky V. Effects of acute nicotine administration on cognitive event-related potentials in tacrine-treated and non-treated patients with Alzheimer's disease. 2002, Neuropsychobiology., 45(3):156-60.
391) Koistinaho M, Kettunen MI, Goldsteins G, *et al.* Beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse A beta deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation. 2002, Proc Natl Acad Sci U S A., 99(3):1610-5.
392) Koistinaho M, Ort M, Cimadevilla JM, *et al.* 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. 2001, Proc Natl Acad Sci U S A., 98(25):14675-80.
393) Kokubo H, Kayed R, Glabe CG, Yamaguchi H. Soluble Abeta oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain. 2005, Brain Res., 1031(2):222-8.
394) Kong LN, Zuo PP, Mu L, Liu YY, Yang N. Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. 2005, Acta Pharmacol Sin., 26(6):666-72.
395) Koo EH, Squazzo SL. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. 1994, J Biol Chem., 269(26):17386-9.
396) Kopan R, Goate A. A common enzyme connects notch signaling and Alzheimer's disease. 2000, Genes Dev., 14(22):2799-806.
397) Kopan R, Ilagan MX. Gamma-secretase: proteasome of the membrane? 2004, Nat Rev Mol Cell Biol., 5(6):499-504.
398) Kornhuber J, Bormann J, Retz W, Hubers M, Riederer P. Memantine displaces [3H]MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex. 1989, Eur J Pharmacol., 166(3):589-90.
399) Kornilova AY, Bihel F, Das C, Wolfe MS. The initial substrate-binding site of gamma-secretase is located on presenilin near the active site. 2005, Proc Natl Acad Sci U S A., 102(9):3230-5.
400) Kosik KS, Duffy LK, Dowling MM, *et al.*. Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles. 1984, Proc Natl Acad Sci U S A., 81(24):7941-5.
401) Kosik KS, Qiu WQ, Greenberg S. Cellular signaling pathways and cytoskeletal organization. 1996, Ann N Y Acad Sci., 777:114-20.
402) Kourie JI, Henry CL, Farrelly P. Diversity of amyloid beta protein fragment [1-40]-formed channels. 2001, Cell Mol Neurobiol., 21(3):255-84.
403) Kowa H, Sakakura T, Matsuura Y, *et al.* Mostly separate distributions of CLAC- versus Abeta40- or thioflavin S-reactivities in senile plaques reveal two distinct subpopulations of beta-amyloid deposits. 2004, Am J Pathol., 165(1):273-81.
404) Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, *et al.* An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. 1991, Proc Natl Acad Sci USA., 88(16):7247-51.
405) Kramer JM, Beatty JA, Plowey ED, Waldrop TG. Exercise and hypertension: a model for central neural plasticity. 2002, Clin Exp Pharmacol Physiol., 29(1-2):122-6.
406) Krejcova G, Patocka J, Slaninova J. Effect of humanin analogues on experimentally induced

impairment of spatial memory in rats. 2004, J Pept Sci., 10(10):636-9.
407) Kriem B, Sponne I, Fifre A, *et al.* Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide. 2005, FASEB J., 19(1):85-7.
408) Kukar T, Murphy MP, Eriksen JL, S *et al.* Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production. 2005, Nat Med., 11(5):545-50.
409) Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, *et al.* Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. 1996, J Biol Chem., 271(8):4077-81.
410) Kuo YM, Emmerling MR, Woods AS, *et al.* Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. 1997, Biochem Biophys Res Commun., 237(1):188-91.
411) Lacor PN, Buniel MC, Chang L, *et al.* Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. 2004, J Neurosci., 24(45):10191-200.
412) LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, *et al.* Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. 1994, J Biol Chem., 269(38):23403-6.
413) LaDu MJ, Lukens JR, Reardon CA, Getz GS. Association of human, rat, and rabbit apolipoprotein E with beta-amyloid. 1997, J Neurosci Res., 49(1):9-18.
414) Lemere CA, Beierschmitt A, Iglesias M, *et al*. Alzheimer's disease abeta vaccine reduces central nervous system abeta levels in a non-human primate, the Caribbean vervet. 2004, Am J Pathol., 165(1):283-97.
415) Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. 1998, Proc Natl Acad Sci U S A., 95(11):6448-53.
416) Lampl Y, Lorberboym M, Blankenberg FG, *et al.* Annexin V SPECT imaging of phosphatidylserine expression in patients with dementia. 2006, Neurology., 66(8):1253-4.
417) Langui D, Girardot N, El Hachimi KH, *et al.* Subcellular topography of neuronal Abeta peptide in APPxPS1 transgenic mice. 2004, Am J Pathol., 165(5):1465-77.
418) Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, *et al.* Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. 1995, Acta Neuropathol (Berl)., 89(1):35-41.
419) Launer LJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease: what's next? 2003, JAMA., 289(21):2865-7.
420) Launer LJ. Diabetes and brain aging: epidemiologic evidence. 2005, Curr Diab Rep., 5(1):59 63.
421) LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, *et al.* Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. 2003, J Biol Chem., 278(39):37213-22.
422) Lazarov O, Robinson J, Tang YP, *et al.* Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. 2005, Cell, 120(5):701-13.
423) Le Carret N, Auriacombe S, Letenneur L, *et al.* Influence of education on the pattern of cognitive deterioration in AD patients: the cognitive reserve hypothesis. 2005, Brain Cogn., 57(2):120-6.
424) Le DA, Wu Y, Huang Z, Matsushita K, *et al.* Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. 2002, Proc Natl Acad Sci U S A., 99(23):15188-93.
425) Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, *et al.*. Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. 2001, J Neurosci., 21(2):RC123.
426) Lebert F. Inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et dépression de la maladie d'Alzheimer. 2003, Presse Med., 25 : 1153-1200.
427) LeBlanc A, Liu H, Goodyer C, *et al.* Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. 1999, J Biol Chem., 274(33):23426-23436.
428) LeBlanc AC. The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death. 2005, Curr Alzheimer Res., 2(4):389-402.
429) Lee EB, Zhang B, Liu K, Greenbaum EA, *et al.* BACE overexpression alters the subcellular processing of APP and inhibits Abeta deposition in vivo. 2005, J Cell Biol., 168(2):291-302.
430) Lee JY, Mook-Jung I, Koh JY. Histochemically reactive zinc in plaques of the Swedish mutant beta-amyloid precursor protein transgenic mice. 1999, J Neurosci., 19(11):RC10.
431) Lee SF, Shah S, Li H, Yu C, Han W, Yu G. Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch. 2002, J Biol Chem., 277(47):45013-9.
432) Leem JY, Vijayan S, Han P, *et al.* Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. 2002, J Biol Chem., 277(21):19236-40.
433) Leininger-Muller B, Jolivalt C, Bertrand P, Siest G. Oxidation of human apolipoprotein E: isoform susceptibility and protection with Ginkgo biloba extract (EGb 761). 1998, Advances in Ginkgo biloba Extract Research, 7 : 57-68.
434) Leissring MA, Yamasaki TR, Wasco W, *et al.* Calsenilin reverses presenilin-mediated enhancement of calcium signaling. 2000, Proc Natl Acad Sci U S A., 97(15):8590-3.
435) Lendon CL, Ashall F, Goate AM. Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. 1997, JAMA., 277(10):825-31.
436) Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, *et al.* A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature. 2006 Mar 16;440(7082):352-7.
437) Levi O, Jongen-Relo AL, Feldon J, *et al.* ApoE4 impairs hippocampal plasticity isoform-specifically and blocks the environmental stimulation of synaptogenesis and memory. 2003, Neurobiol Dis., 13(3):273-282.
438) Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, *et al.* Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. 1995, Science, 269(5226):973-7.
439) Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, *et al.* Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. 2001, Science., 293(5534):1487-91.
440) Lewis J, McGowan E, Rockwood J, *et al.* Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. 2000, Nat Genet., 25(4):402-5.
441) Li J, Xu M, Zhou H, Ma J, Potter H. Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase

kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. 1997, Cell., 90(5):917-27.
442) Li R, Lindholm K, Yang LB, *et al.* Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. 2004, Proc Natl Acad Sci U S A., 101(10):3632-7.
443) Li X, Greenwald I. Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for Caenorhabditis elegans and human presenilins. 1998, Proc Natl Acad Sci U S A., 95(12):7109-14.
444) Li X, Greenwald I. Membrane topology of the C. elegans SEL-12 presenilin. 1996, Neuron, 17(5):1015-21.
445) Lim GP, Chu T, Yang F, *et al.* The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. 2001, J Neurosci., 21(21):8370-7.
446) Lim GP, Yang F, Chu T, *et al.* Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. 2000, J Neurosci., 20(15):5709-14.
447) Lim S, Suzuki H. Changes in maze behavior of mice occur after sufficient accumulation of docosahexaenoic acid in brain. 2001, J Nutr., 131(2):319-24.
448) Lin H, Bhatia R, Lal R. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. 2001, FASEB J., 15(13):2433-44.
449) Ling X, Martins RN, Racchi M, *et al.* Amyloid beta antagonizes insulin promoted secretion of the amyloid beta protein precursor. 2002, J Alzheimers Dis., 4(5):369-74.
450) Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. 2003, Int J Biochem Cell Biol., 35(11):1505-35.
451) Liston DR, Nielsen JA, Villalobos A, *et al.* Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. 2004, Eur J Pharmacol., 486(1):9-17.
452) Liu L, Li Y, Van Eldik LJ, Griffin WS, Barger SW. S100B-induced microglial and neuronal IL-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors. 2005, J Neurochem., 92(3):546-53.
453) Liu ML, Hong ST. Early phase of amyloid beta42-induced cytotoxicity in neuronal cells is associated with vacuole formation and enhancement of exocytosis. 2005, Exp Mol Med., 37(6):559-66.
454) Liu Y, Dargusch R, Schubert D. Beta amyloid toxicity does not require RAGE protein. 1997, Biochem Biophys Res Commun., 237(1):37-40.
455) Lleo A, Greenberg SM, Growdon JH. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. 2005, Annu Rev Med., 57 : 513.
456) Lorenzo A, Yankner BA. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. 1994, Proc Natl Acad Sci U S A., 91(25):12243-7.
457) Loy R, Tariot PN. Neuroprotective properties of valproate: potential benefit for AD and tauopathies. 2002, J Mol Neurosci., 19(3):303-7.
458) Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. 2002, Arch Neurol., 59(8):1258-63.
459) Luciano F, Zhai D, Zhu X, *et al.* Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL. 2005, J Biol Chem., 280(16):15825-35.
460) Lue LF, Kuo YM, Roher AE, *et al.* Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. 1999, Am J Pathol., 155(3):853-62.
461) Lue LF, Kuo YM, Roher AE, *et al.*. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. 1999, Am J Pathol., 155(3):853-62.
462) Lue LF, Walker DG, Brachova L, *et al.* Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. 2001, Exp Neurol., 171(1):29-45.
463) Luiten PG, de Jong GI, Schuurman T. Cerebrovascular, neuronal, and behavioral effects of long-term Ca2+ channel blockade in aging normotensive and hypertensive rat strains. 1994, Ann N Y Acad Sci., 747:431-51.
464) Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, *et al.*. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. 2005, J Clin Invest., 115(10):2774-83.
465) Lukiw WJ, Pappolla M, Pelaez RP, Bazan NG. Alzheimer's disease: a dysfunction in cholesterol and lipid metabolism. 2005, Cell Mol Neurobiol., 25(3-4):475-83.
466) Luo X, Weber GA, Zheng J, Gendelman HE, Ikezu T. C1q-calreticulin induced oxidative neurotoxicity: relevance for the neuropathogenesis of Alzheimer's disease. 2003, J Neuroimmunol., 135(1-2):62-71.
467) Luo Y, Bolon B, Damore MA, *et al.* BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. 2003, Neurobiol Dis., 14(1):81-88.
468) Luo Y, Bolon B, Kahn S, *et al.* Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. 2001, Nat Neurosci., 4(3):231-2.
469) Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. 1997, J Neurochem., 68(5):2061-9.
470) Maat-Schieman ML, Yamaguchi H, Hegeman-Kleinn IM, *et al.* Glial reactions and the clearance of amyloid beta protein in the brains of patients with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. 2004, Acta Neuropathol (Berl)., 107(5):389-98.
471) Magrane J, Smith RC, Walsh K, Querfurth HW. Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. 2004, J Neurosci., 24(7):1700-6.
472) Malaplate-Armand C, Florent-Bechard S, Youssef I, *et al.* Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. 2006, Neurobiol Dis., 23(1):178-89.
473) Malin DH, Crothers MK, Lake JR, *et al.* Hippocampal injections of amyloid beta-peptide 1-40 impair subsequent one-trial/day reward learning. 2001, Neurobiol Learn Mem., 76(2):125-37.
474) Mamiya T, Ukai M. [Gly(14)]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. 2001, Br J Pharmacol., 134(8):1597-9.
475) Marchesi VT. An alternative interpretation of the amyloid Abeta hypothesis with regard to the pathogenesis of Alzheimer's disease. 2005, Proc Natl Acad Sci U S A., 102(26):9093-8.

476) Mark RJ, Keller JN, Kruman I, Mattson MP. Basic FGF attenuates amyloid beta-peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na+/K+-ATPase activity in hippocampal neurons. 1997, Brain Res., 756(1-2):205-14.
477) Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. 1997, Free Radic Biol Med., 23(1):134-47.
478) Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. 1999, Brain Pathol., 9(1):133-46.
479) Marr RA, Guan H, Rockenstein E, *et al.* Neprilysin regulates amyloid Beta peptide levels. 2004, J Mol Neurosci., 22(1-2):5-11.
480) Masliah E, Mallory M, Ge N, Alford M, *et al.* Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. 1995, Exp Neurol., 136(2):107-22.
481) Masliah E, Sisk A, Mallory M, Games D. Neurofibrillary pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. 2001, J Neuropathol Exp Neurol., 60(4):357-68.
482) Matter ML, Zhang Z, Nordstedt C, Ruoslahti E. The alpha5beta1 integrin mediates elimination of amyloid-beta peptide and protects against apoptosis. 1998, J Cell Biol., 141(4):1019-30.
483) Mattson MP. Untangling the pathophysiochemistry of beta-amyloid. 1995, Nat Struct Biol., 2(11):926-8.
484) Mattson MP. Existing data suggest that Alzheimer's disease is preventable. 2000, Ann N Y Acad Sci., 924:153-9.
485) Mattson MP, Cheng B, Davis D, *et al.* beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. 1992, J. Neurosci., 12: 376-389.
486) Mattson MP, Cutler RG, Jo DG. Alzheimer peptides perturb lipid-regulating enzymes. Nat 2005, Cell Biol., 7(11):1045-7.
487) Mattson MP, Gleichmann M. The neuronal death protein par-4 mediates dopaminergic synaptic plasticity. 2005, Mol Interv., 5(5):278-81.
488) Mattson MP, Tomaselli KJ, Rydel RE. Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF. 1993, Brain Res., 621(1):35-49.
489) Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. 1996, Brain Res., 706(2):181-93.
490) Maurice T, Su TP, Privat A. Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. 1998, Neuroscience, 83(2):413-28.
491) Mazzola C, Micale V, Drago F. Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. 2003, Eur J Pharmacol., 477(3):219-25.
492) McClure RJ, Kanfer JN, Panchalingam K, *et al.* Alzheimer's disease: membrane-associated metabolic changes. 1994, Ann N Y Acad Sci., 747:110-24.
493) McDaid DG, Kim EM, Reid RE, *et al.* Parenteral antioxidant treatment preserves temporal discrimination following intrahippocampal aggregated Abeta(1-42) injections. 2005, Behav Pharmacol., 16(4):237-42.
494) McDonald MP, Dahl EE, Overmier JB, *et al.* Effects of an exogenous beta-amyloid peptide on retention for spatial learning. 1994, Behav Neural Biol., 62(1):60-7.
495) McDonald MP, Overmier JB. Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease. 1998, Neurosci Biobehav Rev., 22(1):99-120.
496) McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: Epidemiological, animal model and clinical studies. 2006, Neurobiol Aging., [Epub ahead of print].
497) McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. 1996, Neurology, 47(2):425-32.
498) McLaurin J, Chakrabartty A. Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity. 1996, J Biol Chem., 271(43):26482-9.
499) McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, *et al.* Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. 1999, Ann Neurol., 46(6):860-6.
500) Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). 2002, Brain Res., 958(1):210-21.
501) Miguel-Hidalgo JJ, Cacabelos R. Beta-amyloid(1-40)-induced neurodegeneration in the rat hippocampal neurons of the CA1 subfield. 1998, Acta Neuropathol (Berl)., 95(5):455-65.
502) Miravalle L, Calero M, Takao M, *et al.* Amino-terminally truncated Abeta peptide species are the main component of cotton wool plaques. 2005, Biochemistry, 44(32):10810-21.
503) Mitkovski S, Villemagne VL, Novakovic KE, *et al.* Simplified quantification of nicotinic receptors with 2[18F]F-A-85380 PET. 2005, Nucl Med Biol., 32 (6): 585-91.
504) Moechars D, Dewachter I, Lorent K, *et al.* Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. J 1999, Biol Chem., 274(10):6483-92.
505) Mohajeri MH, Saini KD, Nitsch RM. Transgenic BACE expression in mouse neurons accelerates amyloid plaque pathology. 2004, J Neural Transm., 111(3):413-25.
506) Mok SS, Sberna G, Heffernan D, *et al.* Expression and analysis of heparin-binding regions of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. 1997, FEBS Lett., 415(3):303-7.
507) Morais VA, Crystal AS, Pijak DS, *et al.* Transmembrane domain region of nicastrin mediates direct interactions with APH-1 and the gamma-secretase complex. 2003, J Biol Chem., 278(44):43284-91.
508) Moran PM, Higgins LS, Cordell B, Moser PC. Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. 1995, Proc Natl Acad Sci U S A., 92(12):5341-5.
509) Moreira PI, Zhu X, Nunomura A, Smith MA, Perry G. Therapeutic options in Alzheimer's disease. 2006, Expert Rev Neurother., 6(6):897-910.
510) Morelli L, Wei L, Amorim A, McDermid J, *et al.* Cerebrovascular amyloidosis in squirrel monkeys and rhesus monkeys: apolipoprotein E genotype. 1996, FEBS Lett., 379(2):132-4.
511) Morgan C, Colombres M, Nunez MT, *et al.* Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. 2004, Prog Neurobiol., 74(6):323-49.
512) Moriarty TM, Padrell E, Carty DJ, *et al.* protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive

phosphatidylinositol pathway. 1990, Nature, 343(6253):79-82.
513) Morimoto Y, Wu B, Bart RD, *et al.* Effects of NMDA receptor glycine recognition site antagonism on cerebral metabolic rate for glucose and cerebral blood flow in the conscious rat. Brain Res. 1998 Jan 1;779(1-2):170-6.
514) Morris MC, Evans DA, Bienias JL, *et al.* Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. 2003, Arch Neurol., 60(7):940-6.
515) Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J 1984, Neurosci Methods., 11(1):47-60.
516) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. 1983, J Immunol Methods., 65(1-2):55-63.
517) Moss ML, Jin SL, Becherer JD, *et al.* Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). 1997, J Neuroimmunol., 72(2):127-9.
518) Mousseau N, Derreumaux P. Exploring the early steps of amyloid peptide aggregation by computers. 2005, Acc Chem Res., 38(11):885-91.
519) Mucke L, Masliah E, Yu GQ, *et al.* High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. 2000, Neurosci., 20(11):4050-8.
520) Mucke L, Masliah E, Johnson WB, *et al*. Synaptotrophic effects of human amyloid beta protein precursors in the cortex of transgenic mice. 1994, Brain Res., 666(2):151-67.
521) Mullan M, Crawford F, Axelman K, *et al.*. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. 1992, Nat Genet., 1(5):345-7.
522) Muller WE, Eckert GP, Scheuer K, *et al.* Effects of beta-amyloid peptides on the fluidity of membranes from frontal and parietal lobes of human brain. High potencies of A beta 1-42 and A beta 1-43. 1998, Amyloid, 5(1):10-5.
523) Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, *et al.* Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. 1997, Biochem Pharmacol., 54(5):533-9.
524) Mushegian A. Refining structural and functional predictions for secretasome components by comparative sequence analysis. 2002, Proteins, 47(1):69-74.
525) Myers TM, Galbicka G, Sipos ML, *et al.* Effects of anticholinergics on serial-probe recognition accuracy of rhesus macaques (Macaca mulatta). 2002, Pharmacol Biochem Behav., 73(4):829-34.
526) Nag S, Tang F. The effect of age on the response of the rat brains to continuous beta-amyloid infusion. 2001, Brain Res., 889(1-2):303-7.
527) Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, *et al.* Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. 2004, Neurobiol Aging., 25(5):663-74.
528) Naiki H, Gejyo F, Nakakuki K. Concentration-dependent inhibitory effects of apolipoprotein E on Alzheimer's beta-amyloid fibril formation in vitro. 1997, Biochemistry, 36(20):6243-50.
529) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. 2000, Nature, 403(6765):98-103.
530) Nakagawa Y, Yuzuriha T, Iwaki T. Active clearance of human amyloid beta 1-42 peptide aggregates from the rat ventricular system. 2004, Neuropathology., 24(3):194-200.
531) Nakamura S, Murayama N, Noshita T, *et al.* Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. 2001, Brain Res., 912(2):128-36.
532) Nakashima H, Ishihara T, Yokota O, *et al.* Effects of alpha-tocopherol on an animal model of tauopathies. 2004, Free Radic Biol Med., 37(2):176-86.
533) Narayanan S, Beusterien KM, Thomas SK, *et al.*. Antipsychotic drug use among nursing home residents taking rivastigmine. 2006, J Am Med Dir Assoc., 7(1):12-6.
534) Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, *et al.* Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. 2000, JAMA., 283(12):1571-7.
535) Naslund J, Thyberg J, Tjernberg LO, *et al.*. Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease brain. 1995, Neuron, 15(1):219-28.
536) Nelson LM. Epidemiology of ALS. 1995, Clin Neurosci., 3(6):327-31.
537) Nicotera P, Leist M, Manzo L. Neuronal cell death: a demise with different shapes. 1999, Trends Pharmacol Sci., 20(2):46-51.
538) Niikura T, Hashimoto Y, Okamoto T, *et al.* Insulin-like growth factor I (IGF-I) protects cells from apoptosis by Alzheimer's V642I mutant amyloid precursor protein through IGF-I receptor in an IGF-binding protein-sensitive manner. 2001, J Neurosci., 21(6):1902-10.
539) Niikura T, Hashimoto Y, Tajima H, Nishimoto I. Death and survival of neuronal cells exposed to Alzheimer's insults. 2002, J Neurosci Res., 70(3):380-91.
540) Niikura T, Yamada M, Chiba T, *et al.* Characterization of V642I-AbetaPP-induced cytotoxicity in primary neurons. 2004, J Neurosci Res., 77(1):54-62.
541) Nilsberth C, Kostyszyn B, Luthman J. Changes in APP, PS1 and other factors related to Alzheimer's disease pathophysiology after trimethyltin-induced brain lesion in the rat. 2002, Neurotox Res., 4(7-8):625-636.
542) Ninomiya H, Roch JM, Sundsmo MP, *et al.* Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. 1993, J Cell Biol., 121(4):879-86.
543) Nishimura M, Yu G, Levesque G, *et al.* Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of beta-catenin, a component of the presenilin protein complex. 1999, Nat Med., 5(2):164-9.
544) Nitta A, Itoh A, Hasegawa T and Nabeshima T. β-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. 1994, Neurosci. Lett. 170:63.
545) Nixon RA. Niemann-Pick Type C disease and Alzheimer's disease: the APP-endosome connection fattens up. 2004, Am J Pathol., 164(3):757-61.
546) Nourhashemi F, Ousset PJ, Reyes G, *et al.* NSAID in Alzheimer disease. 1998, Presse Med., 27(1):25-8.
547) Nowotny P, Gorski SM, Han SW, *et al.* Posttranslational modification and plasma membrane localization of the Drosophila melanogaster presenilin. 2000, Mol Cell Neurosci., 15(1):88-98.

548) Nunan J, Small DH. Proteolytic processing of the amyloid-beta protein precursor of Alzheimer's disease. 2002, Essays Biochem., 38:37-49.
549) Nunomura A, Perry G, Aliev G, *et al.* Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. 2001, J Neuropathol Exp Neurol., 60(8):759-67.
550) Obadia Y, Rotily M, Degrand-Guillaud A, *et al.* The PREMAP Study: prevalence and risk factors of dementia and clinically diagnosed Alzheimer's disease in Provence, France. 1997, Eur J Epidemiol., 13(3):247-53
551) Obadia Y, Rotily M, Degrand-Guillaud A, *et al.* The PREMAP Study: prevalence and risk factors of dementia and clinically diagnosed Alzheimer's disease in Provence, France. 1997, Eur J Epidemiol., 13(3):247-53.
552) Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, *et al.* Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. 1995, Exp Neurol., 136(1):22-31.
553) Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. 2004, Neuron, 43(3):321-32.
554) Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. 2003a, Neurobiol Aging., 24(8):1063-70.
555) Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. 2003b, Neuron., 39(3):409-421.
556) Oddo S, Caccamo A, Tran L, *et al.*. Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. 2006, J Biol Chem., 281(3):1599-604.
557) Ohm TG, Braak H. Olfactory bulb changes in Alzheimer's disease. 1987, Acta Neuropathol (Berl).;73(4):365-369.
558) Okamoto T, Takeda S, Giambarella U, *et al.* Intrinsic signaling function of APP as a novel target of three V642 mutations linked to familial Alzheimer's disease. 1996, EMBO J., 15(15):3769-77.
559) Olariu A, Yamada K, Mamiya T, *et al.* Memory impairment induced by chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1-40) involves downregulation of protein kinase C. 2002, Brain Res., 957(2):278-86.
560) Olson MI, Shaw CM. Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. 1969, Brain, 92(1):147-56.
561) Olton DS. Spatial memory. 1977, Sci Am., 236(6):82-4, 89-94, 96, 98.
562) O'Mahony S, Harkany T, Rensink AA, *et al.* Beta-amyloid-induced cholinergic denervation correlates with enhanced nitric oxide synthase activity in rat cerebral cortex: reversal by NMDA receptor blockade. 1998, Brain Res Bull., 45(4):405-11.
563) Palacino JJ, Berechid BE, Alexander P, *et al.* Regulation of amyloid precursor protein processing by presenilin 1 (PS1) and PS2 in PS1 knockout cells. 2000, J Biol Chem., 275(1):215-22.
564) Palop JJ, Jones B, Kekonius L, *et al.* Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. 2003, Proc Natl Acad Sci U S A., 100(16):9572-7.
565) Pangalos MN, Jacobsen SJ, Reinhart PH. Disease modifying strategies for the treatment of Alzheimer's disease targeted at modulating levels of the beta-amyloid peptide. 2005, Biochem Soc Trans., 33(Pt 4):553-8.
566) Pantel J, Schonknecht P, Essig M, Schroder J. Distribution of cerebral atrophy assessed by magnetic resonance imaging reflects patterns of neuropsychological deficits in Alzheimer's dementia. 2004, Neurosci Lett., 361(1-3):17-20.
567) Panza F, Solfrizzi V, Colacicco AM, *et al.* Mediterranean diet and cognitive decline. 2004, Public Health Nutr., 7(7):959-63.
568) Papasozomenos SC. Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type : II. Electron microscopy and pathogenetic implications. Effects of fixation on the morphology of the Alzheimer's abnormal filaments. 1989, Lab Invest., 60(3):375-89.
569) Pappolla MA, Omar RA, Kim KS, Robakis NK. Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease. 1992, Am J Pathol., 140(3):621-8.
570) Patel NS, Paris D, Mathura V, *et al.* Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. 2005, J Neuroinflammation., 2(1):9.
571) Patel NV, Gordon MN, Connor KE, *et al.* Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models. 2005, Neurobiol Aging., 26(7):995-1000.
572) Paul CA, Boegle AK, Maue RA. Before the loss: neuronal dysfunction in Niemann-Pick Type C disease. 2004, Biochim Biophys Acta., 1685(1-3):63-76.
573) Paxinos G and Franklin K. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second Edition. 2001, ACADEMIC PRESS.
574) Pena LA, Brecher CW, Marshak DR. beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures. 1995, Brain Res Mol Brain Res., 34(1):118-26.
575) Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LH, Koo EH. The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. 1997, J Neurosci., 17(24):9407-14.
576) Perez-Severiano F, Salvatierra-Sanchez R, Rodriguez-Perez M, *et al.* S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. 2004, Eur J Pharmacol., 489(3):197-202.
577) Perini G, Della-Bianca V, Politi V, *et al.*. Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by beta-amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines. 2002, J Exp Med., 195(7):907-918.
578) Permanne B, Adessi C, Saborio GP, *et al.*. Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. 2002, FASEB J., 16(8):860-2.
579) Perry RH. Recent advances in neuropathology. 1986, Br Med Bull., 42(1):34-41.
580) Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, *et al.*. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. 2002, Proc Natl Acad Sci U S A., 99(26):16742-7.
581) Petosa C, Collier RJ, Klimpel KR, *et al*. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. 1997, Nature, 385(6619):833-8.
582) Pettegrew JW, Klunk WE, Kanal E, *et al.* Changes in brain membrane phospholipid and high-energy

phosphate metabolism precede dementia. 1995, Neurobiol Aging., 16(6):973-5.
583) Piccini A, Russo C, Gliozzi A, *et al.* beta-amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. 2005, J Biol Chem., 280(40):34186-92.
584) Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, *et al.* Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. 1993, Neurosci., 13(4):1676-87.
585) Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. 1991, Brain Res., 563(1-2):311-4.
586) Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, *et al.* Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. 1995, J Neurochem., 64(1):253-65.
587) Pillot T, Drouet B, Queille S, *et al.* The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. 1999, J Neurochem., 73(4):1626-34.
588) Pillot T, Goethals M, Vanloo B, *et al.* Specific modulation of the fusogenic properties of the Alzheimer beta-amyloid peptide by apolipoprotein E isoforms. 1997, Eur J Biochem., 243(3):650-9.
589) Pillot T, Goethals M, Vanloo B, *et al.* Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. 1996, J Biol Chem., 271(46):28757-65.
590) Podlisny MB, Citron M, Amarante P, *et al.*. Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. 1997, Neurobiol Dis., 3(4):325-37.
591) Podlisny MB, Tolan DR, Selkoe DJ. Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. 1991, Am J Pathol., 138(6):1423-35.
592) Poirier J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. 2000, Ann N Y Acad Sci., 924:81-90.
593) Postuma RB, He W, Nunan J, *et al.* Substrate-bound beta-amyloid peptides inhibit cell adhesion and neurite outgrowth in primary neuronal cultures. 2000, J Neurochem., 74(3):1122-30.
594) Pradignac A, Schlienger JL, Velten M, Mejean L. Relationships between macronutrient intake, handicaps, and cognitive impairments in free living elderly people. 1995, Aging (Milano)., 7(1):67-74.
595) Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanoswki JQ, Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. 2001, Neurosci., 21(12):4183-7.
596) Pyo G, Elble RJ, Ala T, Markwell SJ. The characteristics of patients with uncertain/mild cognitive impairment on the Alzheimer disease assessment scale-cognitive subscale. 2006, Alzheimer Dis Assoc Disord., 20(1):16-22.
597) Qi JS, Qiao JT. Amyloid beta-protein fragment 31-35 forms ion channels in membrane patches excised from rat hippocampal neurons. 2001, Neuroscience., 105(4):845-52.
598) Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, *et al.* Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. 1998, J Biol Chem., 273(49):32730-8.
599) Qiu WQ, Ye Z, Kholodenko D, *et al.* Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. 1997, J Biol Chem., 272(10):6641-6.
600) Quon D, Wang Y, Catalano R, *et al.*. Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. 1991, Nature., 352(6332):239-41.
601) Raber J, Wong D, Yu GQ, *et al.* Apolipoprotein E and cognitive performance. 2000, Nature, 404(6776):352-4.
602) Ramelot TA, Gentile LN, Nicholson LK. Transient structure of the amyloid precursor protein cytoplasmic tail indicates preordering of structure for binding to cytosolic factors. 2000, Biochemistry, 39(10):2714-25.
603) Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, *et al.* Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. 2000, Nat Neurosci., 3(3):238-44.
604) Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, *et al.* Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). 2005, J Neurosci., 25(46):10637-47.
605) Raskind MA, Peskind ER, Wessel T, *et al*. Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group. 2000, Neurology, 54(12):2261-8.
606) Ray WJ, Yao M, Mumm J, Schroeter EH, *et al.* Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch. 1999, J Biol Chem., 274(51):36801-7.
607) Reddy PH. Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease. 2006, Neurochem., 96(1):1-13.
608) Redwine JM, Kosofsky B, Jacobs RE, *et al*. Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in PDAPP mice: a magnetic resonance microscopy and stereologic analysis. 2003, Proc Natl Acad Sci U S A., 100(3):1381-6.
609) Reeves RH, Robakis NK, Oster-Granite ML, *et al.* Genetic linkage in the mouse of genes involved in Down syndrome and Alzheimer's disease in man. 1987, Brain Res., 388(3):215-21.
610) Reinhard C, Hebert SS, De Strooper B. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. 2005, EMBO J., 24(23):3996-4006.
611) Rhee SK, Quist AP, Lal R. Amyloid beta protein-(1-42) forms calcium-permeable, Zn2+-sensitive channel. 1998, J Biol Chem., 273(22):13379-82.
612) Ricciarelli R, D'Abramo C, Zingg JM, *et al.* CD36 overexpression in human brain correlates with beta-amyloid deposition but not with Alzheimer's disease. 2004, Free Radic Biol Med., 36(8):1018-24.
613) Richards JG, Higgins GA, Ouagazzal AM, *et al.* PS2APP transgenic mice, coexpressing hPS2mut and hAPPswe, show age-related cognitive deficits associated with discrete brain amyloid deposition and inflammation. 2003, J Neurosci., 23(26):8989-9003.
614) Richardson RL, Kim EM, Shephard RA, *et al.* Behavioural and histopathological analyses of ibuprofen treatment on the effect of aggregated Abeta(1-42) injections in the rat. 2002, Brain Res., 954(1):1-10.
615) Ridley RM, Baker HF, Leow-Dyke A, Cummings RM. Further analysis of the effects of immunotoxic lesions of the basal nucleus of Meynert reveals

substantial impairment on visual discrimination learning in monkeys. 2005, Brain Res Bull., 65(5):433-42.
616) Ridley RM, Pugh P, Maclean CJ, Baker HF. Severe learning impairment caused by combined immunotoxic lesion of the cholinergic projections to the cortex and hippocampus in monkeys. 1999, Brain Res., 836(1-2):120-38.
617) Ringheim GE. Glial modulating and neurotrophic properties of propentofylline and its application to Alzheimer's disease and vascular dementia. 2000, Ann N Y Acad Sci., 903:529-34.
618) Robakis NK, Wisniewski HM, Jenkins EC, *et al.* Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. 1987, Lancet, 1(8529):384-5.
619) Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, *et al.* Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. 1995, Nature., 376(6543):775-8.
620) Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, *et al.* A 24-week, double-bind, placebo-controlled trial of donepezil Study Group. 1998, Neurology, 50 :136-145.
621) Roher AE, Palmer KC, Capodilupo J, *et al.* New biochemical insights to unravel the pathogenesis of Alzheimer's lesions. 1991, Can J Neurol Sci., 18(3 Suppl):408-10.
622) Rohn TT, Head E, Nesse WH, *et al.* Activation of caspase-8 in the Alzheimer's disease brain. 2001, Neurobiol Dis., 8(6):1006-16.
623) Rohn TT, Ivins KJ, Bahr BA, Cotman CW, Cribbs DH. A monoclonal antibody to amyloid precursor protein induces neuronal apoptosis. 2000, J Neurochem., 74(6):2331-42.
624) Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ, *et al.* Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid-beta onto the hippocampus in vivo. 2004, J Neuroimmunol., 150 (1-2) : 20-8.
625) Rossjohn J, Cappai R, Feil SC, *et al.* Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. 1999, Nat Struct Biol., 6(4):327-31.
626) Rossner S, Lange-Dohna C, Zeitschel U, Perez-Polo JR. Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. 2005, J Neurochem., 92(2):226-34.
627) Rossor MN, Iversen LL, Johnson AJ, *et al.* Cholinergic deficit in frontal cerebral cortex in Alzheimer's disease is age dependent. 1981, Lancet., 2(8260-61):1422.
628) Roudier M, Marcie P, Grancher AS, *et al.* Discrimination of facial identity and of emotions in Alzheimer's disease. 1998, J Neurol Sci., 154(2):151-8.
629) Rowan MJ, Klyubin I, Cullen WK, *et al*. Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer's disease. 2003, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 358(1432):821-8.
630) Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Anwyl R. Synaptic plasticity disruption by amyloid beta protein: modulation by potential Alzheimer's disease modifying therapies. 2005, Biochem Soc Trans., 33(Pt 4):563-7.
631) Rumble B, Retallack R, Hilbich C, *et al.* Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. 1989, N Engl J Med., 320(22):1446-52.
632) Russo C, Saido TC, DeBusk LM, *et al.* Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. 1997, FEBS Lett., 409(3):411-6.
633) Russo C, Schettini G, Saido TC, *et al.* Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. 2000, Nature, 405(6786):531-2.
634) Ryu JK, Franciosi S, Sattayaprasert P, *et al.* Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by beta-amyloid peptide in rat hippocampus. 2004, Glia, 48(1):85-90.
635) Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P. The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. 2001, J Cell Biol., 153(7):1403-14.
636) Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, *et al.* Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. 1995, Neuron, 14(2):457-66.
637) Saido TC, Yamao-Harigaya W, Iwatsubo T, Kawashima S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. 1996, Neurosci Lett., 215(3):173-6.
638) Samuel W, Masliah E, Hill LR, *et al.* Hippocampal connectivity and Alzheimer's dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two-component model. 1994, Neurology, 44(11):2081-8.
639) Sanan DA, Weisgraber KH, Russell SJ, *et al.* Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. 1994, J Clin Invest., 94(2):860-9.
640) Sanderson KL, Butler L, Ingram VM. Aggregates of a beta-amyloid peptide are required to induce calcium currents in neuron-like human teratocarcinoma cells: relation to Alzheimer's disease. 1997, Brain Res., 744(1):7-14.
641) Sani S, Traul D, Klink A, *et al.* Distribution, progression and chemical composition of cortical amyloid-beta deposits in aged rhesus monkeys: similarities to the human. 2003, Acta Neuropathol (Berl)., 105(2):145-56.
642) Sano M, Ernesto C, Thomas RG, *et al.* A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. 1997, N Engl J Med., 336(17):1216-22.
643) SantaCruz K, Lewis J, Spires T, *et al.* Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. 2005, Science, 309(5733):476-81.
644) Sarazin M, Dubois B. Démarche et circonstances diagnostiques dans la maladie d'Azheimer. 2005, Rev Prat., 55(17):1879-90.
645) Sarazin M, Lehéricy S. Imagerie par résonance magnétique et maladie d'Alzheimer. 2002, Expressions santé editions, 15-27
646) Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. 1988, Psychopharmacology (Berl)., 94(4):491-5.
647) Sarter M, Bruno JP. Developmental origins of the age-related decline in cortical cholinergic function and associated cognitive abilities. 2004, Neurobiol Aging., 25(9):1127-39.

648) Sasaki N, Toki S, Chowei H, *et al.* Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. 2001, Brain Res., 888(2):256-262.
649) Sastre M, Dewachter I, Landreth GE, *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. 2003, J Neurosci., 23(30):9796-804.
650) Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. 2006, Int J Dev Neurosci., 24(2-3):167-76.
651) Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, *et al*. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. 1998, Cell, 95(1):55-66.
652) Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, *et al.* Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. 1993, Neurology, Aug;43(8):1467-72.
653) Scarmeas N, Albert M, Brandt J, *et al.* Motor signs predict poor outcomes in Alzheimer disease. 2005, Neurology, 64(10):1696-703.
654) Schenk D. Alzheimer's disease. A partner for presenilin. 2000, Nature, 407(6800):34-5.
655) Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al., Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. 1996, Nat Med., 2(8):864-70.
656) Schipper HM, Bennett DA, Liberman A, *et al.* Glial heme oxygenase-1 expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. 2006, Neurobiol Aging., 27(2):252-61.
657) Schmaljohann J, Minnerop M, Karwath P, *et al.* Imaging of central nAChReceptors with 2-[18F]F-A85380: optimized synthesis and in vitro evaluation in Alzheimer's disease. 2004, Appl Radiat Isot., 61(6):1235-40.
658) Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. 1973, Teratology, 7(3):253-66.
659) Selkoe DJ. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. 2001, J Alzheimers Dis., 3(1):75-80.
660) Selkoe DJ. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. 2004, Ann Intern Med., 140(8):627-38.
661) Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. 1991, Neuron, 6(4):487-98.
662) Selkoe DJ. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. 1994, J Neuropathol Exp Neurol., 53(5):438-47.
663) Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. 2002, Science, 298(5594):789-91.
664) Selkoe DJ, Bell DS, Podlisny MB, *et al.* Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. 1987, Science, 235(4791):873-7.
665) Serpell LC. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. 2000, Biochim Biophys Acta., 1502(1):16-30.
666) Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, *et al.* Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. 1992, Nature, 359(6393):325-7.
667) Shah S, Lee SF, Tabuchi K, *et al.* Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. 2005, Cell, 122(3):435-47.
668) Shao H, Jao S, Ma K, Zagorski MG. Solution structures of micelle-bound amyloid beta-(1-40) and beta-(1-42) peptides of Alzheimer's disease. 1999, J Mol Biol., 285(2):755-73.
669) Shearman MS, Beher D, Clarke EE, *et al.* L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. 2000, Biochemistry, 39(30):8698-704.
670) Shemer I, Holmgren C, Min R, *et al.* Non-fibrillar beta-amyloid abates spike-timing-dependent synaptic potentiation at excitatory synapses in layer 2/3 of the neocortex by targeting postsynaptic AMPA receptors. 2006, Eur J Neurosci., 23(8):2035-47.
671) Shen YX, Xu SY, Wei W, *et al.* The protective effects of melatonin from oxidative damage induced by amyloid beta-peptide 25-35 in middle-aged rats. 2002 , J Pineal Res., 32(2):85-9.
672) Sheng JG, Ito K, Skinner RD, *et al.*. In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. 1996, Neurobiol Aging., 17(5):761-6.
673) Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. Glial-neuronal interactions in Alzheimer disease: progressive association of IL-1alpha+ microglia and S100beta+ astrocytes with neurofibrillary tangle stages. 1997, J Neuropathol Exp Neurol., 56(3):285-90.
674) Shepherd CE, Gregory GC, Vickers JC, Halliday GM. Novel 'inflammatory plaque' pathology in presenilin-1 Alzheimer's disease. 2005, Neuropathol Appl Neurobiol., 31(5):503-11.
675) Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, *et al.*. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. 1995, Nature, 375(6534):754-60.
676) Shibata M, Yamada S, Kumar SR, *et al.* Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. 2000, J Clin Invest., 106(12):1489-99.
677) Shimizu S, Hanyu H, Iwamoto T, *et al.* SPECT follow-up study of cerebral blood flow changes during Donepezil therapy in patients with Alzheimer's disease. 2006, J Neuroimaging., 16(1):16-23.
678) Shin RW, Ogino K, Kondo A, Saido TC, *et al.* Amyloid beta-protein (Abeta) 1-40 but not Abeta1-42 contributes to the experimental formation of Alzheimer disease amyloid fibrils in rat brain. 1997, J Neurosci., 17(21):8187-93.
679) Shirazi SK, Wood JG. The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology. 1993, Neuroreport, 4(4):435-7.
680) Shirotani K, Edbauer D, Capell A, *et al.* Gamma-secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. 2003, J Biol Chem., 278(19):16474-7.
681) Shirotani K, Tsubuki S, Lee HJ, *et al.* Generation of amyloid beta peptide with pyroglutamate at position 3 in primary cortical neurons. 2002, Neurosci Lett., 327(1):25-8.
682) Shoghi-Jadid K, Barrio JR, Kepe V, *et al.* beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease: a critical analysis through simulation of amyloid fibril polymerization. 2005, Nucl Med Biol., 32(4):337-51.

683) Sigurdsson EM, Lee JM, Dong XW, *et al.* Bilateral injections of amyloid-beta 25-35 into the amygdala of young Fischer rats: behavioral, neurochemical, and time dependent histopathological effects. 1997, Neurobiol Aging., 18(6):591-608.
684) Siman R, Reaume AG, Savage MJ, *et al.* Presenilin-1 P264L knock-in mutation: differential effects on abeta production, amyloid deposition, and neuronal vulnerability. 2000, J Neurosci., 20(23):8717-26.
685) Simard AR, Soulet D, Gowing G, *et al.* Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. 2006, Neuron., 49(4):489-502.
686) Simons M, Keller P, De Strooper B, *et al.* Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. 1998, Proc Natl Acad Sci U S A., 95(11):6460-4.
687) Skuza G, Rogoz Z. The synergistic effect of selective sigma receptor agonists and uncompetitive NMDA receptor antagonists in the forced swim test in rats. 2006, J Physiol Pharmacol., 57(2):217-29.
688) Sloane JA, Pietropaolo MF, Rosene DL, *et al.* Lack of correlation between plaque burden and cognition in the aged monkey. 1997, Acta Neuropathol (Berl)., 94(5):471-8.
689) Slunt HH, Thinakaran G, Von Koch C, *et al.* Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). 1994, J Biol Chem., 269(4):2637-44.
690) Small DH, Mok SS, Bornstein JC. Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. 2001, Nat Rev Neurosci., 2(8):595-8.
691) Smine A, Xu X, Nishiyama K, *et al.* Regulation of brain G-protein go by Alzheimer's disease gene presenilin-1. 1998, J Biol Chem., 273(26):16281-8.
692) Smith DE, Rapp PR, McKay HM, *et al.*. Memory impairment in aged primates is associated with focal death of cortical neurons and atrophy of subcortical neurons. 2004, J Neurosci., 24(18):4373-81.
693) Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. 1997, Proc Natl Acad Sci U S A., 94(18):9866-8.
694) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. 1985, Anal Biochem., 150(1):76-85.
695) Soderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. 1991, Lipids, 26(6):421-5.
696) Soininen H, Lehtovirta M, Helisalmi S, *et al.* Increased acetylcholinesterase activity in the CSF of Alzheimer patients carrying apolipoprotein epsilon4 allele. 1995, Neuroreport., 6(18):2518-20.
697) Solfrizzi V, Panza F, Capurso A. The role of diet in cognitive decline. 2003, J Neural Transm., 110(1):95-110.
698) Solfrizzi V, Panza F, Torres F, Mastroianni F, *et al.* High monounsaturated fatty acids intake protects against age-related cognitive decline. 1999, Neurology, 52(8):1563-9.
699) Song DK, Im YB, Jung JS, *et al.* Central beta-amyloid peptide-induced peripheral interleukin-6 responses in mice. 2001, J Neurochem., 76(5):1326-35.
700) Song L, Hobaugh MR, Shustak C, *et al.* Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. 1996, Science, 274(5294):1859-66.
701) Song MS, Saavedra L, de Chaves EI. Apoptosis is secondary to non-apoptotic axonal degeneration in neurons exposed to Abeta in distal axons. 2006, Neurobiol Aging., 27(9):1224-38.
702) Spinelli S, Ballard T, Feldon J, *et al.* Enhancing effects of nicotine and impairing effects of scopolamine on distinct aspects of performance in computerized attention and working memory tasks in marmoset monkeys. 2006, Neuropharmacology, 51(2):238-50.
703) Spires TL, Orne JD, SantaCruz K, *et al.* Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. 2006, Am J Pathol., 168(5):1598-607.
704) Sponne I, Fifre A, Drouet B, *et al.* Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation. 2003, J Biol Chem., 278(5):3437-3445.
705) Sponne I, Fifre A, Koziel V, *et al.* Humanin rescues cortical neurons from prion-peptide-induced apoptosis. 2004, Mol Cell Neurosci., 25(1):95-102.
706) Sponne I, Fifre A, Koziel V, *et al.* Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide. 2004, FASEB J., 18(7):836-8.
707) Steiner H, Capell A, Pesold B, *et al.* Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. 1998, J Biol Chem., 273(48):32322-31.
708) Steiner H, Romig H, Grim MG, *et al.* The biological and pathological function of the presenilin-1 Deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. 1999, Biol Chem., 274(12):7615-8.
709) Stepanichev MY, Moiseeva YV, Lazareva NA, *et al.* Studies of the effects of fragment (25-35) of beta-amyloid peptide on the behavior of rats in a radial maze. 2005, Neurosci Behav Physiol., 35(5):511-8.
710) Stepanichev MY, Moiseeva YV, Lazareva NA, *et al.* Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25-35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. 2003, Brain Res Bull., 61(2):197-205.
711) Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, *et al.* Studies of the Effects of Central Administration of beta-Amyloid Peptide (25-35): Pathomorphological Changes in the Hippocampus and Impairment of Spatial Memory. 2006, Neurosci Behav Physiol., 36(1):101-6.
712) Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, *et al.* Amyloid-beta (25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. 2004, Physiol Behav., 80(5):647-655.
713) Stephan A, Laroche S, Davis S. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. 2001, J Neurosci., 21(15):5703-5714.
714) Stephan A, Laroche S, Davis S. Learning deficits and dysfunctional synaptic plasticity induced by aggregated amyloid deposits in the dentate gyrus are rescued by chronic treatment with indomethacin. 2003, Eur J Neurosci., 17(9):1921-7.
715) Stephan A, Phillips AG. A case for a non-transgenic animal model of Alzheimer's disease. 2005, Genes Brain Behav., 4(3):157-72.
716) Stern Y, Alexander GE, Prohovnik I, Mayeux R. Inverse relationship between education and

parietotemporal perfusion deficit in Alzheimer's disease. 1992, Ann Neurol., 32(3):371-5.
717) Sticht H, Bayer P, Willbold D, *et al.* Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease. 1995, Eur J Biochem., 233(1):293-8.
718) Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, *et al.* Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. 2005, Science, 307(5713):1282-8.
719) Storey E, Beyreuther K, Masters CL. Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. 1996, Brain Res., 735(2):217-31.
720) Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, *et al.* Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. 1993, Proc Natl Acad Sci U S A., 90(5):1977-81.
721) Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, *et al.* Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. 1997, Proc Natl Acad Sci U S A., 94(24):13287-92.
722) Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, *et al*. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. 1994, Neuroreport, 5(18):2529-33.
723) Su JH, Zhao M, Anderson AJ, *et al*. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. 2001, Brain Res., 898(2):350-7.
724) Sudo H, Jiang H, Yasukawa T, *et al.*. Antibody-regulated neurotoxic function of cell-surface beta-amyloid precursor protein. 2000, Mol Cell Neurosci., 16(6):708-23.
725) Sudoh S, Kawamura Y, Sato S, *et al*. Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid beta-protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites. 1998, J Neurochem., 71(4):1535-43.
726) Sugimoto Y, Taga C, Nishiga M, *et al.* Effect of docosahexaenoic acid-fortified Chlorella vulgaris strain CK22 on the radial maze performance in aged mice. 2002, Biol Pharm Bull., 25(8):1090-2.
727) Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. 2002, Pharmacol Rev., 54(3):469-525.
728) Sung S, Yao Y, Uryu K, *et al.* Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces Abeta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. 2004, FASEB J., 18(2):323-5.
729) Suo Z, Fang C, Crawford F, Mullan M. Superoxide free radical and intracellular calcium mediate A beta(1-42) induced endothelial toxicity. 1997, Brain Res., 762(1-2):144-152.
730) Susen K, Blochl A. Low concentrations of aggregated beta-amyloid induce neurite formation via the neurotrophin receptor p75. 2005, J Mol Med., 83(9):720-735.
731) Suzuki A. Amyloid beta-protein induces necrotic cell death mediated by ICE cascade in PC12 cells. 1997, Exp Cell Res., 234(2):507-11.
732) Suzuki H, Park SJ, Tamura M, Ando S. 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. 1998, Mech Ageing Dev., 101(1-2):119-28.
733) Sweeney WA, Luedtke J, McDonald MP, Overmier JB. Intrahippocampal injections of exogenous beta-amyloid induce postdelay errors in an eight-arm radial maze. 1997, Neurobiol Learn Mem., 68(1):97-101.
734) Tabaton M, Nunzi MG, Xue R, *et al.* Soluble amyloid beta-protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. 1994, Biochem Biophys Res Commun., 200(3):1598-603.
735) Tabaton M, Piccini A. Role of water-soluble amyloid-beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. 2005, Int J Exp Pathol., 86(3):139-45.
736) Tajima H, Kawasumi M, Chiba T, *et al.* A humanin derivative, S14G-HN, prevents amyloid-beta-induced memory impairment in mice. 2005, Neurosci Res., 79(5):714-23.
737) Tajima H, Niikura T, Hashimoto Y, *et al.* Evidence for in vivo production of Humanin peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults. 2002, Neurosci Lett., 324(3):227-31.
738) Takahashi RH, Milner TA, Li F, *et al.* Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. 2002, Am J Pathol., 161(5):1869-79.
739) Takasugi N, Takahashi Y, Morohashi Y, *et al.* The mechanism of gamma-secretase activities through high molecular weight complex formation of presenilins is conserved in Drosophila melanogaster and mammals. 2002, J Biol Chem., 277(51):50198-205.
740) Takeda A., Loveman E., Clegg A. *et al.* A systematic review of the clinical effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine on cognition, quality of life and adverse events in Alzheimer's disease. 2006, Int J Geriatr Psych, 21 : 17-28.
741) Takemura R, Kanai Y, Hirokawa N. *In situ* localization of tau mRNA in developing rat brain. 1991, Neuroscience, 44(2):393-407.
742) Takeuchi A, Irizarry MC, Duff K, *et al.* Age-related amyloid beta deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid beta precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss. 2000, Am J Pathol., 157(1):331-9.
743) Takuma H, Tomiyama T, Kuida K, Mori H. Amyloid beta peptide-induced cerebral neuronal loss is mediated by caspase-3 in vivo. 2004, J Neuropathol Exp Neurol., 63(3):255-61.
744) Tamagno E, Bardini P, Obbili A, *et al.* Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. 2002, Neurobiol Dis., 10(3):279-88.
745) Tamagno E, Parola M, Guglielmotto M, *et al.* Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. 2003, Free Radic Biol Med., 35(1):45-58.
746) Tamaoka A, Kondo T, Odaka A, *et al.*. Biochemical evidence for the long-tail form (A beta 1-42/43) of amyloid beta protein as a seed molecule in cerebral deposits of Alzheimer's disease. 1994, Biochem Biophys Res Commun., 205(1):834-42.
747) Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, *et al.* Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. 1989, Biochem Biophys Res Commun., 165(3):1406-14.
748) Tang F, Nag S, Shiu SY, Pang SF. The effects of melatonin and Ginkgo biloba extract on memory loss and

choline acetyltransferase activities in the brain of rats infused intracerebroventricularly with beta-amyloid 1-40. 2002, Life Sci., 71(22):2625-31.
749) Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, *et al.* Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. 1996, Nat Med., 2(8):864-70.
750) Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, *et al.* Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. 1988, Nature, 331(6156):528-30.
751) Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. 2004, Neuron, 43(5):605-8.
752) Tariot PN, Erb R, Podgorski CA, *et al.* Efficacy and tolerability of carbamazepine for agitation and aggression in dementia. 1998, Am J Psychiatry., 155(1):54-61.
753) Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, *et al.* Memantine Study Group. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. 2004, JAMA., 291(3):317-24.
754) Tariot PN, Loy R, Ryan JM, *et al.* Mood stabilizers in Alzheimer's disease: symptomatic and neuroprotective rationales. 2002, Adv Drug Deliv Rev., 54(12):1567-77.
755) Teipel SJ, Flatz WH, Heinsen H, *et al.*. Measurement of basal forebrain atrophy in Alzheimer's disease using MRI. 2005, Brain, 128(Pt 11):2626-44.
756) Tekirian TL. Commentary: Abeta N- Terminal Isoforms: Critical contributors in the course of AD pathophysiology. 2001, J Alzheimers Dis., 3(2):241-248.
757) Tekirian TL, Saido TC, Markesbery WR, *et al.* N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular Abeta deposits. 1998, J Neuropathol Exp Neurol., 57(1):76-94.
758) Teplow DB. Structural and kinetic features of amyloid beta-protein fibrillogenesis. 1998, Amyloid, 5(2):121-42.
759) Terry RD, Katzman R. Senile dementia of the Alzheimer type. 1983, Ann Neurol., 14(5):497-506.
760) Terry RD, Masliah E, Salmon DP, *et al.* Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. 1991, Ann Neurol., 30(4):572-80.
761) Terry RD, Peck A, DeTeresa R, *et al.* Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. 1981, Ann Neurol. Aug;10(2):184-92.
762) Thal LJ, Kantarci K, Reiman EM, *et al.* The role of biomarkers in clinical trials for Alzheimer disease. 2006, Alzheimer Dis Assoc Disord., 20(1):6-15.
763) Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, *et al.* Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. 1996, Neuron, 17(1):181-90.
764) Thinakaran G, Harris CL, Ratovitski T, *et al.* Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. 1997, J Biol Chem., 272(45):28415-22.
765) Tiffany HL, Lavigne MC, Cui YH, *et al.* Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. 2001, J Biol Chem., 276(26):23645-52.
766) Tohda C, Matsumoto N, Zou K, *et al.* Abeta(25-35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, A metabolite of protopanaxadiol-type saponins. 2004, Neuropsychopharmacology, 29(5):860-8.
767) Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, *et al.* Ultrastructural localization of amyloid protein precursor in the normal and postischemic gerbil brain. 1995, Brain Res., 672(1-2):187-95.
768) Tomita T, Katayama R, Takikawa R, Iwatsubo T. Complex N-glycosylated form of nicastrin is stabilized and selectively bound to presenilin fragments. 2002, FEBS Lett., 520(1-3):117-21.
769) Tomita T, Maruyama K, Saido TC, *et al.* The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. 1997, Proc Natl Acad Sci U S A., 94(5):2025-30.
770) Touchon J, Portet F. Mild cognitive impairment: imaging data. 2002, Rev Neurol (Paris)., 158(10 Suppl):S21-9.
771) Trabace L, Cassano T, Steardo L, *et al.* Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. 2000, Pharmacol Exp Ther., 294(1):187-94.
772) Trommer BL, Shah C, Yun SH, *et al.* ApoE isoform affects LTP in human targeted replacement mice. 2004, Neuroreport, 15(17):2655-8.
773) Troy CM, Rabacchi SA, Friedman WJ, *et al.* Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. 2000, J Neurosci., 20(4):1386-92.
774) Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. 2003, Prog Neurobiol., 70(1):1-32.
775) Ueda K, Fukui Y, Kageyama H. Amyloid beta protein-induced neuronal cell death: neurotoxic properties of aggregated amyloid beta protein. 1994, Brain Res., 639(2):240-4.
776) Urani A, Romieu P, Portales-Casamar E, Roman FJ, Maurice T. The antidepressant-like effect induced by the sigma(1) (sigma(1)) receptor agonist igmesine involves modulation of intracellular calcium mobilization. 2002, Psychopharmacology (Berl)., 163(1):26-35.
777) Urani A, Romieu P, Roman FJ, Yamada K, *et al.* Enhanced antidepressant efficacy of sigma1 receptor agonists in rats after chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid-(1-40) protein. 2004, Eur J Pharmacol., 486(2):151-61.
778) Van de Pol LA, Hensel A, Barkhof F, *et al.* Hippocampal atrophy in Alzheimer disease: age matters. 2006, Neurology, 66(2):236-8.
779) Van Gool WA, Aisen PS, Eikelenboom P. Anti-inflammatory therapy in Alzheimer's disease: is hope still alive? 2003, Neurol., 250(7):788-92.
780) Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. 2000, Nat Rev Neurosci., 1(3):191-8.
781) Vandenberghe RR, Vandenbulcke M, Weintraub S, *et al.* Paradoxical features of word finding difficulty in primary progressive aphasia. 2005, Ann Neurol., 57(2):204-9.
782) Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. 2003, Thromb Res., 110(5-6):255 8.
783) Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, *et al.* Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. 1999, Science, 286(5440):735-41.

784) Verdier Y, Zarandi M, Penke B. Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. 2004, J Pept Sci., 10(5):229-48.
785) Verdile G, Martins RN, Duthie M, *et al.* Inhibiting amyloid precursor protein C-terminal cleavage promotes an interaction with presenilin 1. 2000, J Biol Chem., 275(27):20794-8.
786) Vermersch P, David JP, Frigard B, *et al.* Cortical mapping of Alzheimer pathology in brains of aged non-demented subjects. 1995, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry., 19(6):1035-47.
787) Vermersch P, Frigard B, Delacourte A. Mapping of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease: evaluation of heterogeneity using the quantification of abnormal tau proteins. 1992, Acta Neuropathol (Berl), 85(1):48-54.
788) Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, *et al.* Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. 2004, J Biol Chem., 279(43):44945-54.
789) Vetrivel KS, Thinakaran G. Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. 2006, Neurology, 66(2 Suppl 1):S69-73.
790) Vito P, Lacana E, D'Adamio L. Interfering with apoptosis: Ca(2+)-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. 1996, Science., 271(5248):521-5.
791) Vito P, Wolozin B, Ganjei JK, Iwasaki K, *et al.* Requirement of the familial Alzheimer's disease gene PS2 for apoptosis. Opposing effect of ALG-3. 1996, J Biol Chem., 271(49):31025-8.
792) von Koch CS, Zheng H, Chen H, *et al.* Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. 1997, Neurobiol Aging., 18(6):661-9.
793) von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, *et al.*. The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. 2004, J Cell Sci., 117(Pt 19):4435-48.
794) Vonsattel JP, Myers RH, Hedley-Whyte ET, *et al.* Amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study. 1991, Ann Neurol., 30(5):637-49.
795) Walker DG, Kim SU, McGeer PL. Complement and cytokine gene expression in cultured microglial derived from postmortem human brains. 1995, J Neurosci Res., 40(4):478-93.
796) Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, *et al.* Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo.2002, Nature, 416(6880):535-9.
797) Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, *et al.* Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. 2002, Biochem Soc Trans., 30(4):552-7.
798) Walsh DM, Selkoe DJ. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. 2004, Protein Pept Lett., 11(3):213-28.
799) Walsh DM, Townsend M, Podlisny MB, *et al.* Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (Abeta) fibrillogenesis block oligomerization of natural Abeta and thereby rescue long-term potentiation. 2005, J Neurosci., 25(10):2455-62.
800) Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, *et al*. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. 2000, Biochemistry, 39(35):10831-9.
801) Walsh DT, Montero RM, Bresciani LG, *et al.*. Amyloid-beta peptide is toxic to neurons in vivo via indirect mechanisms. 2002, Neurobiol Dis., 10(1):20-7.
802) Wang R, Sweeney D, Gandy SE, *et al*. The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. 1996, J Biol Chem., 271(50):31894-902.
803) Wang C, Wilson WA, Moore SD, *et al.* Human apoE4-targeted replacement mice display synaptic deficits in the absence of neuropathology. 2005, Neurobiol Dis., 18(2):390-8.
804) Wang D, Li H, Yuan H, Zheng M, *et al.* Humanin delays apoptosis in K562 cells by downregulation of P38 MAP kinase. 2005, Apoptosis., 10(5):963-71.
805) Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, *et al.* beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. 2000, Biol Chem., 275(8):5626-32.
806) Wang HY, Li W, Benedetti NJ, Lee DH. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. 2003, J Biol Chem., 278(34):31547-53.
807) Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. 1999, Exp Neurol., 158(2):328-37.
808) Wang QS, Zhou JN. Retrieval and encoding of episodic memory in normal aging and patients with mild cognitive impairment. 2002, Brain Res., 924(1):113-5.
809) Wang Y, Ha Y. The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. 2004, Mol Cell., 15(3):343-53.
810) Wasco W, Brook JD, Tanzi RE. The amyloid precursor-like protein (APLP) gene maps to the long arm of human chromosome 19. 1993, Genomics, 15(1):237-9.
811) Webster MT, Groome N, Francis PT, *et al.* A novel protein, amyloid precursor-like protein 2, is present in human brain, cerebrospinal fluid and conditioned media. 1995, Biochem J., 310 (Pt 1):95-9.
812) Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. 2001, Nature, 414(6860):212-6.
813) Weinberger NM, Miasnikov AA, Chen JC. The level of cholinergic nucleus basalis activation controls the specificity of auditory associative memory. 2006, Neurobiol Learn Mem., [Epub ahead of print]
814) Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. 1996, FASEB J., 10(13):1485-94.
815) Weiss JH, Pike CJ, Cotman CW. Ca2+ channel blockers attenuate beta-amyloid peptide toxicity to cortical neurons in culture. 1994, J Neurochem., 62(1):372-5.
816) Weldon DT, Rogers SD, Ghilardi JR, *et al.* Fibrillar β-Amyloid Induces Microglial Phagocytosis, Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase, and Loss of a Select Population of Neurons in the Rat CNS In Vivo. 1998, The Journal of Neuroscience, 18(6):2161–2173.
817) Wellington CL. Cholesterol at the crossroads: Alzheimer's disease and lipid metabolism. 2004, Clin Genet., 66(1):1-16.

818) Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, *et al.* The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. 2002, J Neurosci., 22(5):1858-67.
819) Westphalen RI, Scott HL, Dodd PR. Synaptic vesicle transport and synaptic membrane transporter sites in excitatory amino acid nerve terminals in Alzheimer disease. 2003, J Neural Transm., 110(9):1013-27.
820) White L, Petrovitch H, Ross GW, *et al.* Prevalence of dementia in older Japanese-American men in Hawaii: The Honolulu-Asia Aging Study. 1996, JAMA., 276(12):955-60.
821) Whitehead SN, Hachinski VC, Cechetto DF. Interaction between a rat model of cerebral ischemia and beta-amyloid toxicity: inflammatory responses. 2005, Stroke, 36(1):107-12.
822) Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, *et al.* Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. 1981, Ann Neurol., 10(2) :122-6.
823) Whitson JS, Glabe CG, Shintani E, *et al.* Beta-amyloid protein promotes neuritic branching in hippocampal cultures. 1990, Neurosci Lett., 110(3):319-24.
824) Wieraszko A, Li G, Kornecki E, *et al.* Long-term potentiation in the hippocampus induced by platelet-activating factor. 1993, Neuron., 10(3):553-7.
825) Wilbur KM, Bernheim F, Shapiro OW. The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. 1949, Arch Biochem., 24(2):305-13.
826) Wild-Bode C, Yamazaki T, Capell A, *et al.* Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. 1997, J Biol Chem., 272(26):16085-8.
827) Willem M, Dewachter I, Smyth N, *et al.* beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] double-transgenic mice. 2004, Am J Pathol., 165(5):1621-31.
828) William K. Cullen, Jianqun Wu, *et al.* β-Amyloid produces a delayed NMDA receptordependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus. 1996, NeuroReport, 8:87–92.
829) Wilton T. Cyclooxygenase-2 inhibitors: do they have a role in emergency department prescribing? 2004, Emerg Med Australas., 16(1):65-73.
830) Wirths O, Multhaup G, Bayer TA. A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. 2004, J Neurochem., 91(3):513-20.
831) Wirths O, Multhaup G, Czech C, *et al.* Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. 2001, Neurosci Lett., 306 (1-2) :116-20.
832) Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, *et al.* Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. 1999, Nature, 398(6727):513-7.
833) Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, *et al.* Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. 1996, Science, 274(5293):1710-3.
834) Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P *et al.* Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methyglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. 2000, Arch Neurol., 57(10):1439-43.
835) Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, *et al.* Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? 2004, Neurol Neurosurg Psychiatry., 75(4):637-9.
836) Wu CK, Thal L, Pizzo D, Hansen L, *et al.* Apoptotic signals within the basal forebrain cholinergic neurons in Alzheimer's disease. 2005, Exp Neurol., 195(2):484-96.
837) Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, *et al.* Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. 2002, J Neurosci., 22(5):1763-71.
838) Wujek JR, Dority MD, Frederickson RC, *et al.* Deposits of A beta fibrils are not toxic to cortical and hippocampal neurons in vitro. 1996, Neurobiol Aging., 17(1):107-13.
839) Xia W, Ostaszewski BL, Kimberly WT, *et al.* FAD mutations in presenilin-1 or amyloid precursor protein decrease the efficacy of a gamma-secretase inhibitor: evidence for direct involvement of PS1 in the gamma-secretase cleavage complex. 2000, Neurobiol Dis., 7(6 Pt B):673-81.
840) Xia W, Ray WJ, Ostaszewski BL, *et al.* Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the sites of amyloid beta-protein generation. 2000, Proc Natl Acad Sci U S A., 97(16):9299-304.
841) Xia W, Zhang J, Kholodenko D, *et al.* Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. 1997, J Biol Chem., 272(12):7977-82.
842) Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, *et al.* Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. 2002, J Neurosci., 22(10):RC221.
843) Xu H, Sweeney D, Wang R, *et al.* Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. 1997, Proc Natl Acad Sci U S A., 94(8):3748-52.
844) Xu PT, Schmechel D, Rothrock-Christian T, *et al.* Human apolipoprotein E2, E3, and E4 isoform-specific transgenic mice: human-like pattern of glial and neuronal immunoreactivity in central nervous system not observed in wild-type mice. 1996, Neurobiol Dis., 3(3):229-45.
845) Yaar M, Zhai S, Fine RE, *et al.* Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. 2002, J Biol Chem., 277(10):7720-5.
846) Yaar M, Zhai S, Pilch PF, *et al.* Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. 1997, J Clin Invest., 100(9):2333-40.
847) Yamada K, Tanaka T, Han D, *et al.* Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. 1999, Eur J Neurosci., 11(1):83-90.
848) Yamada K, Tanaka T, Senzaki K, *et al.* Propentofylline improves learning and memory deficits in rats induced by beta-amyloid protein-(1-40). 1998, Eur J Pharmacol., 349(1):15-22.
849) Yamada M, Chiba T, Sasabe J, *et al.* Implanted cannula-mediated repetitive administration of Abeta25-35 into the mouse cerebral ventricle effectively impairs spatial working memory. 2005, Behav Brain Res., 164(2):139-46.

850) Yamatsuji T, Okamoto T, Takeda S, *et al.* Expression of V642 APP mutant causes cellular apoptosis as Alzheimer trait-linked phenotype. 1996, EMBO J., 15(3):498-509.
851) Yan JJ, Cho JY, Kim HS, *et al.* Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. 2001, Br J Pharmacol., 133(1):89-96.
852) Yan JJ, Kim DH, Moon YS, *et al.* Protection against beta-amyloid peptide-induced memory impairment with long-term administration of extract of Angelica gigas or decursinol in mice. 2004, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry., 28(1):25-30.
853) Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, *et al.* Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. 1999, Nature, 402(6761):533-7.
854) Yan SD, Fu J, Soto C, *et al.* An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. 1997, Nature, 389(6652):689-95.
855) Yan SD, Yan SF, Chen X, *et al.* Non-enzymatically glycated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. 1995, Nat Med., 1(7):693-9.
856) Yanagisawa K. GM1 ganglioside and the seeding of amyloid in Alzheimer's disease: endogenous seed for Alzheimer amyloid. 2005, Neuroscientist, 11(3):250-60.
857) Yang Y, Turner RS, Gaut JR. The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Abeta40 and Abeta42 secretion. 1998, J Biol Chem., 273(40):25552-5.
858) Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. 1996, Neuron, 16(5):921-32.
859) Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, *et al.*. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. 1989, Science., 245(4916):417-20.
860) Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. 1990, Science, 250(4978):279-82.
861) Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL. Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. 2001, Brain Res., 919(1):115-21.
862) Yatin SM, Varadarajan S, Link CD, Butterfield DA. In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). 1999, Neurobiol Aging., 20(3):325-30
863) Yavin E, Yavin Z. Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. 1974, J Cell Biol., 62(2):540-6.
864) Ying G, Iribarren P, Zhou Y, *et al.* Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. 2004, J Immunol., 172(11):7078-85.
865) Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, *et al.* Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. 1998, Proc Natl Acad Sci U S A., 95(26):15769-74.
866) Yu G, Chen F, Nishimura M, *et al.* Mutation of conserved aspartates affects maturation of both aspartate mutant and endogenous presenilin 1 and presenilin 2 complexes. 2000, J Biol Chem., 275(35):27348-53.
867) Yuan J, Lipinski M, Degterev A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. 2003, Neuron, 40(2):401-13.
868) Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, *et al.* Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. 2004, Arch Neurol., 61(1):82-8.
869) Zemlan FP, Thienhaus OJ, Bosmann HB. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. 1989, Brain Res., 476(1):160-2.
870) Zhai D, Luciano F, Zhu X, *et al.* Humanin binds and nullifies Bid activity by blocking its activation of Bax and Bak. 2005, J Biol Chem., 280(16):15815-24.
871) Zhang Y, Champagne N, Beitel LK, *et al.* Estrogen and androgen protection of human neurons against intracellular amyloid beta1-42 toxicity through heat shock protein 70. 2004, J Neurosci., 24(23):5315-21.
872) Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, *et al.* Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. 2002, J Cell Biol., 156(3):519-29.
873) Zhou Z, Smith JD, Greengard P, *et al.* Alzheimer amyloid-beta peptide forms denaturant-resistant complex with type epsilon 3 but not type epsilon 4 isoform of native apolipoprotein E. 1996, Mol Med., 2(2):175-80.
874) Zou P, Ding Y, Sha Y, *et al.*. Humanin peptides block calcium influx of rat hippocampal neurons by altering fibrogenesis of Abeta(1-40). 2003, Peptides., 24(5):679-85.
875) Zweig RM, Ross CA, Hedreen JC, *et al.*. Neuropathology of aminergic nuclei in Alzheimer's disease. 1989, Prog Clin Biol Res., 317:353-65.

ANNEXES

ANNEXES

PUBLICATIONS ASSOCIEES AU TRAVAIL

PUBLICATION # 1

ELSEVIER

Neurobiology of Disease

www.elsevier.com/locate/ynbdi
Neurobiology of Disease 23 (2006) 178 – 189

Soluble oligomers of amyloid-β peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA$_2$-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway

Catherine Malaplate-Armand, Sabrina Florent-Béchard, 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

ELSEVIER

Neurobiology of Disease

www.elsevier.com/locate/ynbdi
Neurobiology of Disease 23 (2006) 178 – 189

Soluble oligomers of amyloid-β peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA$_2$-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway

Catherine Malaplate-Armand, Sabrina Florent-Béchard, 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 (Aβ) 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 A$_2$ (cPLA$_2$)-arachidonic acid (AA) pathway in Aβ 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 Aβ-induced apoptosis. Soluble Aβ 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 Aβ-mediated activation of SMases and subsequent cell death were found to be inhibited by antioxidant molecules and a cPLA$_2$-specific inhibitor or antisense oligonucleotide. We also demonstrate that sphingosine-1-phosphate is a potent neuroprotective factor against soluble Aβ oligomer-induced cell death and apoptosis by inhibiting soluble Aβ-induced activation of acidic sphingomyelinase. These results suggest that Aβ oligomers induce neuronal death by activating neutral and acidic SMases in a redox-sensitive cPLA$_2$-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 (Aβ) (Selkoe, 2004; Drouet et al., 2000). The original amyloid cascade hypothesis causally links AD clinico-pathological process and neuronal cell death to the aggregation and deposition of Aβ (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 Aβ 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 Aβ 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 Aβ peptide rather than that of fibrillar Aβ (Wang et al., 1999; McLean et al., 1999; Lue et al., 1999). Both neurodegeneration and specific spatial learning deficits associated with early Aβ 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 Aβ oligomers in AD brain (Lacor et al., 2004). Taken together, these results give the "soluble Aβ" hypothesis substantial clinical

Abbreviations: Aβ, amyloid-β peptide; AD, Alzheimer's disease; AA, arachidonic acid; A-SMase, acidic sphingomyelinase; cPLA$_2$, cytosolic calcium-dependent phospholipase A$_2$; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; MAFP, 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 Aβ-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 Aβ oligomers triggered neuronal apoptosis by early activation of a $cPLA_2$-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 Aβ 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 Aβ oligomer-mediated neuronal apoptosis. In the present study, we report that soluble Aβ1–40 and 1–42 oligomers induce the activation of both N-SMase and A-SMase resulting in apoptotic cell death through a redox-sensitive $cPLA_2$-AA-dependent pathway. Interestingly, sphingosine-1-phosphate significantly inhibited Aβ-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-cmk, and H-GEGFLGDFL-OH) were purchased from Bachem. Aβ(1–40), Aβ(40-1) and Aβ(1–42) were also obtained from Bachem, and soluble oligomers of Aβ 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 Aβ was detected by SDS-PAGE and immunoblot analysis. Oligomeric preparations of Aβ 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 $cPLA_2$ 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% CO_2 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 μM soluble oligomers of Aβ(1–40) or Aβ(1–42) for the indicated times. Alternatively, cells were preincubated for 2 h with the indicated concentrations of inhibitors before addition of Aβ. 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 Aβ 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 $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, 10 μg/ml each of pepstatin and leupeptin, and 5 μg/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 × *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 μM 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

$cPLA_2$ 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 Aβ-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 μM of the various sense or antisense ODNs for 48 h prior to and during Aβ 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 ± 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 Scheffe'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 μM 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 μM AA for 24 h and 48 h, respectively (data not shown). We next investigated whether AA exposure might result in SMase activation. The

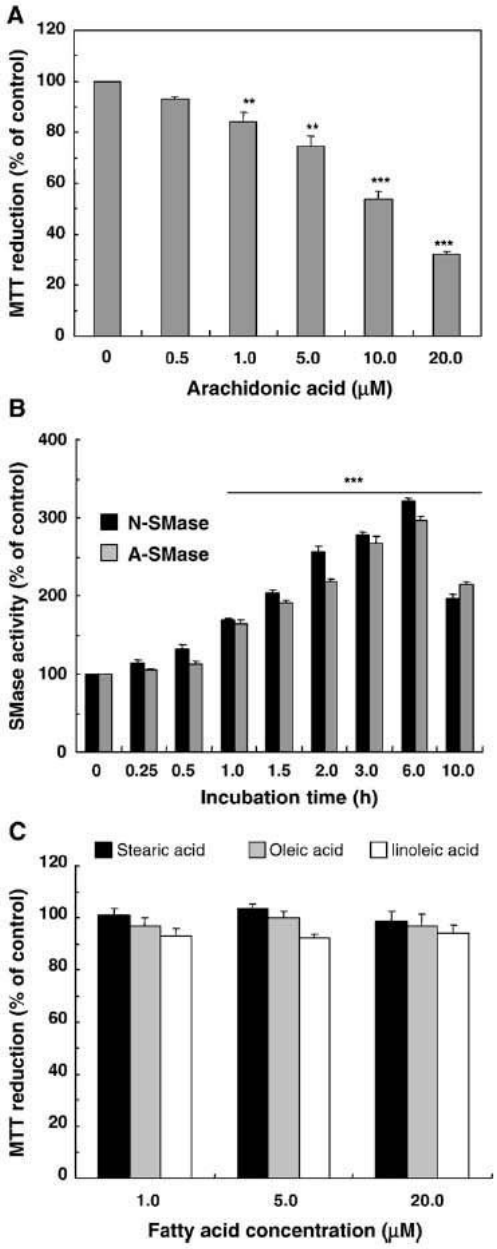


Fig. 1. Arachidonic acid-induced neuronal cell death and activation of both acidic and neutral sphingomyelinases. (A and C) Cortical neurons were treated for 24 h with increasing concentrations of indicated fatty acids, and cell survival was monitored by the MTT assay. (B) N-SMase and A-SMase activities in cortical neurons treated for 1 to 10 h with 5 μM arachidonic acid. Data are means (±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 μM 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 Aβ oligomer exposure might result in SMase activation, ceramide production, and subsequent cell death.

Soluble Aβ oligomers induce the activation of SMases in cortical neurons

We next investigated whether soluble Aβ 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 μM Aβ(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 Aβ(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 Aβ 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 Aβ-induced cell death (Figs. 2B and 3A and B). Similar results were obtained using LDH release to monitor soluble Aβ-mediated cell death (data not shown). Interestingly, 3OMeSM and desipramine acted synergistically to modulate Aβ 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 myriosin had no effect on Aβ 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 Aβ oligomers (Fig. 3C). We have previously shown that soluble Aβ(1–42) oligomers also induced a $cPLA_2$-arachidonic acid pathway (Kriem et al., 2005). Similarly, soluble Aβ(1–42) oligomers induced the activation of both N-SMase and A-SMase. Soluble Aβ(1–42) oligomers induced a 51% ($P < 0.001$) decrease in neuronal viability upon 24-h exposure at 1 μM, while 3OMeSM and desipramine reduced soluble Aβ(1–42) neurotoxicity to 75 and 81% ($P < 0.001$), respectively (data not shown). Confirming the effects of SMase inhibitors on soluble Aβ oligomer-mediated cell death, an almost complete reduction in N-SMase and A-SMase activation was observed in neurons treated with 1 μM Aβ(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 Aβ-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 μM Aβ(1–40), respectively (Fig. 5A).

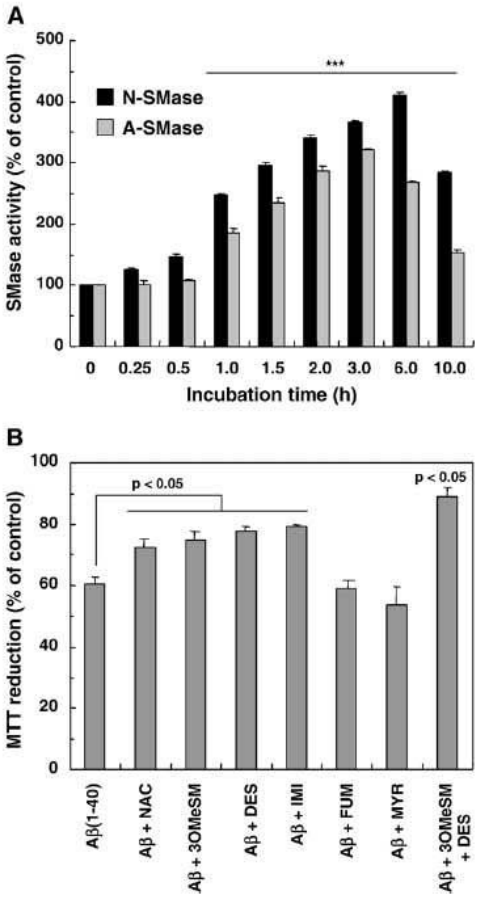


Fig. 2. Sphingomyelinase in soluble Aβ oligomer-induced cell death. (A) Cortical neurons were incubated for the indicated incubation times with 1 μM soluble Aβ(1–40), followed by determination of N-SMase or A-SMase activities. (B) Alternatively, cells were preincubated for 2 h in the presence or absence of 0.5 mM NAC, 10 μM 3OMeSM, 10 μM desipramine (DES), 50 μM imipramine (IMI), 50 μM fumosin B1 (FUM) or 1 μM myriocin (MYR), and then treated with 1 μM soluble Aβ(1–40). Neurotoxic effects of soluble oligomers of Aβ were monitored after 24 h using the MTT assay. 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 Scheffe'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 Aβ(1–40)-induced cell death (Fig. 5B) as well as neuronal apoptosis (Fig. 5C). Similar results have been obtained using soluble Aβ(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 Aβ

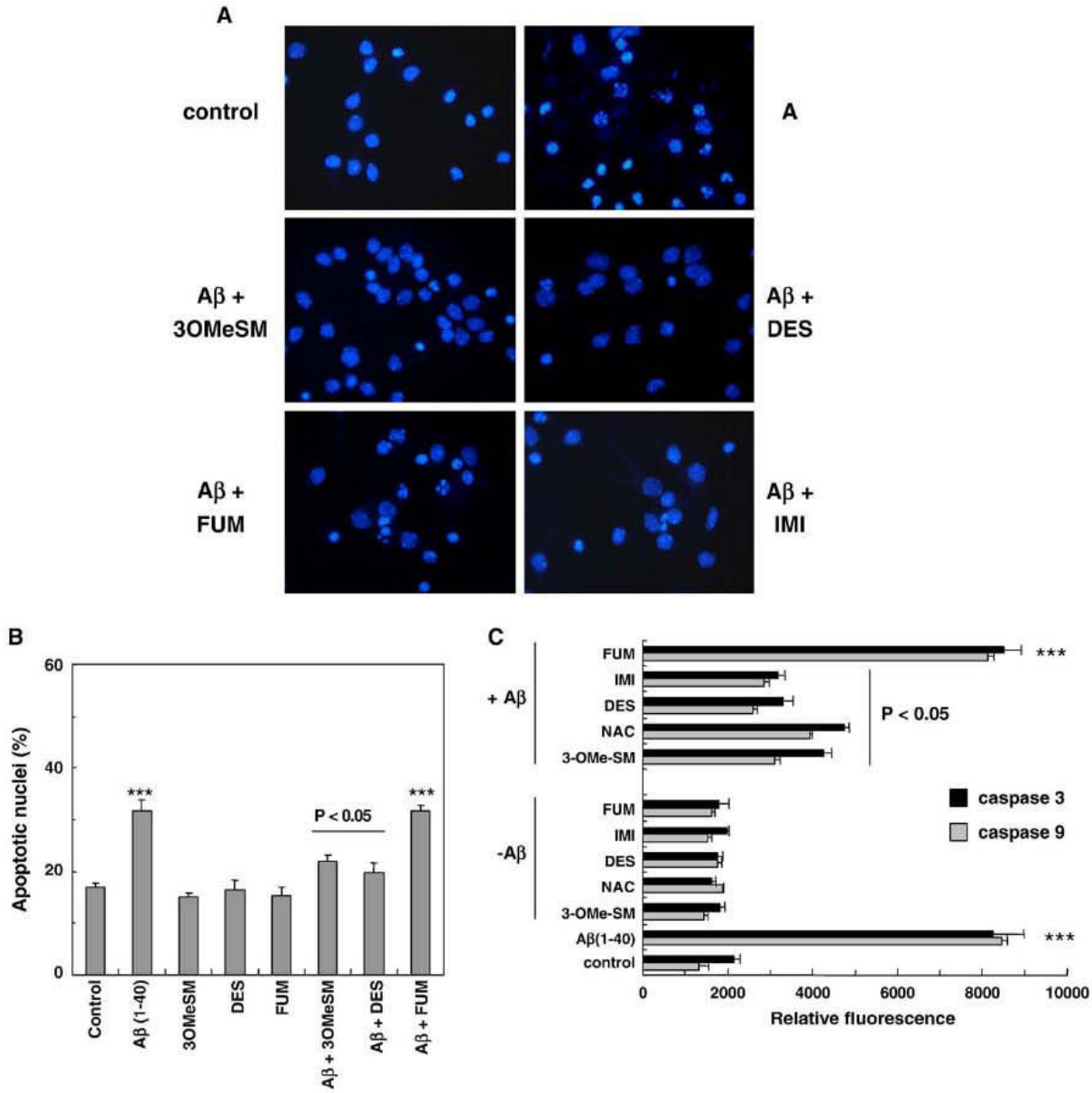


Fig. 3. Sphingomyelinase in soluble Aβ oligomer-induced neuronal apoptosis. Cortical neurons were treated as described in Fig. 2B. Apoptotic nuclei were visualized after DAPI staining (A) and quantified as described in the Materials and methods (B). Additionally, the measurement of caspase-3 and caspase-9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

Involvement of reactive oxygen species and cPLA$_2$ pathway in soluble Aβ-induced activation of SMases

We next investigated the mechanisms by which soluble Aβ oligomers induced the activation of SMases and subsequent neuronal death. By using the MTT assay in order to monitor Aβ neurotoxicity, a 2-h preincubation of neurons with 1 mM Trolox, an antioxidant molecule, significantly reduced soluble Aβ(1–40)-induced viability decrease to 15.5% ($P < 0.05$, as compared to Aβ(1–40) alone) (Fig. 7A). Interestingly, these neuroprotective effects of Trolox were associated with its inhibitory effects on soluble Aβ-mediated activation of both N-SMase and A-SMase (Fig. 7A). A similar antioxidant effect could also be involved in the protection from Aβ(1–40) neurotoxicity by NAC as depicted by Fig. 2B.

We previously demonstrated that both cPLA$_2$ antisense oligonucleotides and MAFP, a specific cPLA$_2$ inhibitor, rescued cortical neurons from soluble Aβ-mediated apoptosis by preventing soluble Aβ-mediated cPLA$_2$ activation and subsequent production of arachidonic acid (Kriem et al., 2005). Fig. 7B

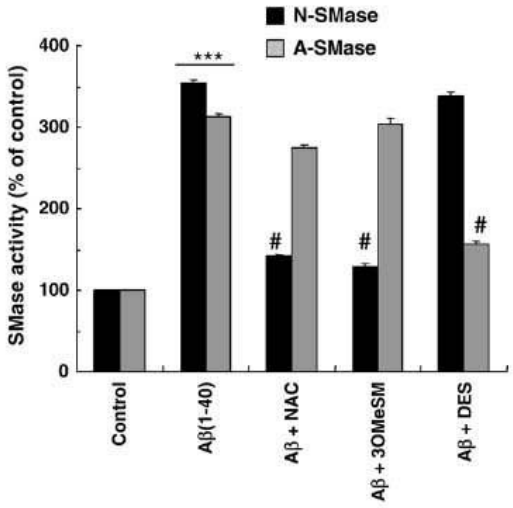


Fig. 4. Effects of SMase inhibitors on soluble Aβ-induced SMase activation. Cortical neurons were incubated for 2 h in the presence or absence of 0.5 mM NAC, 10 μM 3OMeSM, or 10 μM DES and then treated with 1 μM soluble Aβ(1–40). A-SMase and N-SMase activities were measured after 3 and 6 h of incubation 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 Scheffe's post hoc test ($^{\#}P < 0.05$).

shows that $cPLA_2$ 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 $cPLA_2$-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 $cPLA_2$ 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 activation and subsequent cell death. Interestingly, S1P significant protected cortical neurons from soluble Aβ-mediated cell dea monitored by the MTT assay (Fig. 8A), as well as from apoptos as quantified after DAPI staining (Fig. 8B). Similar results ha been obtained using soluble Aβ(1–42) oligomers (data n shown). Furthermore, we observed that S1P also markedly reduc the activation of A-SMase, but not N-SMase, induced by solub Aβ(1–40) peptide (Fig. 8C). Although the exact molecul

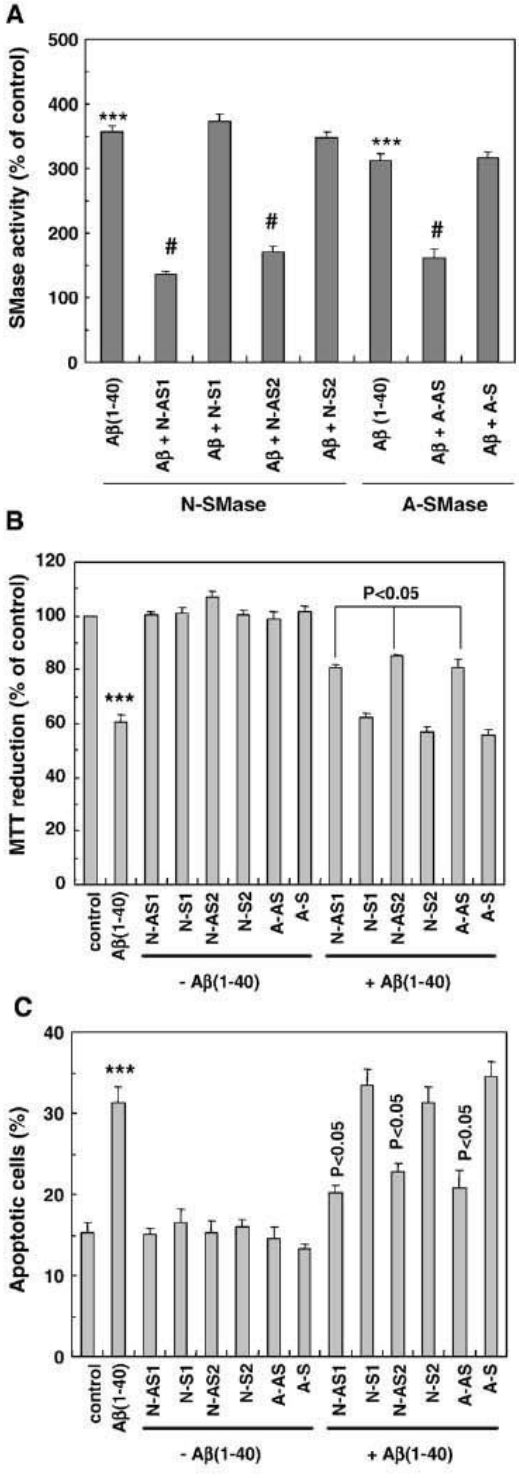


Fig. 5. Effects of SMase antisense oligonucleotides on soluble Aβ-treated cells. Cortical neurons were preincubated for 48 h in the absence or in the presence of 4 μM sense (S) or antisense (AS) oligonucleotides specific for N- or A-SMase. Two different sense or antisense oligonucleotides were used for 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 Scheffe's post hoc test ($^{\#}P < 0.05$).

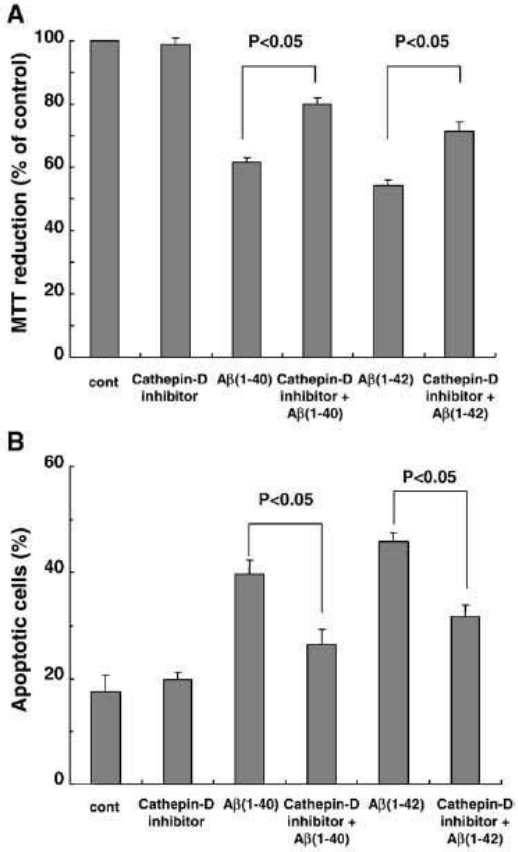


Fig. 6. A selective cathepsin-D inhibitor protects cortical neurons from soluble Aβ oligomer-mediated cell death and apoptosis. Cortical neurons were preincubated for 2 h with 10 μM cathepsin-D inhibitor octapeptide and then exposed to 1 μM soluble Aβ(1–40) or (1–42). Soluble Aβ-induced neurotoxicity 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 (±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 Scheffe's post hoc test ($^{\#}P < 0.05$).

mechanisms responsible for the rescuing effects of S1P remain to be clarified, our data strongly suggest that it occurs in part by inhibiting soluble Aβ-activation of A-SMase.

Discussion

Despite extensive studies aiming to characterize the ubiquitous acid lysosomal SMase (A-SMase) and the neutral Mg^{2+}-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 Aβ(1–40) and Aβ(1–42), but not Aβ(40-1) induce neuronal apoptosis mainly through the activation of both N-SMase and A-SMase. First, soluble oligomers of Aβ 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 Aβ-induced apoptosis and cell death. Third, a pharmacological inhibition of ceramide synthase has no effect on soluble Aβ-mediated cell death. This supports the notion that soluble Aβ-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 Aβ 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).

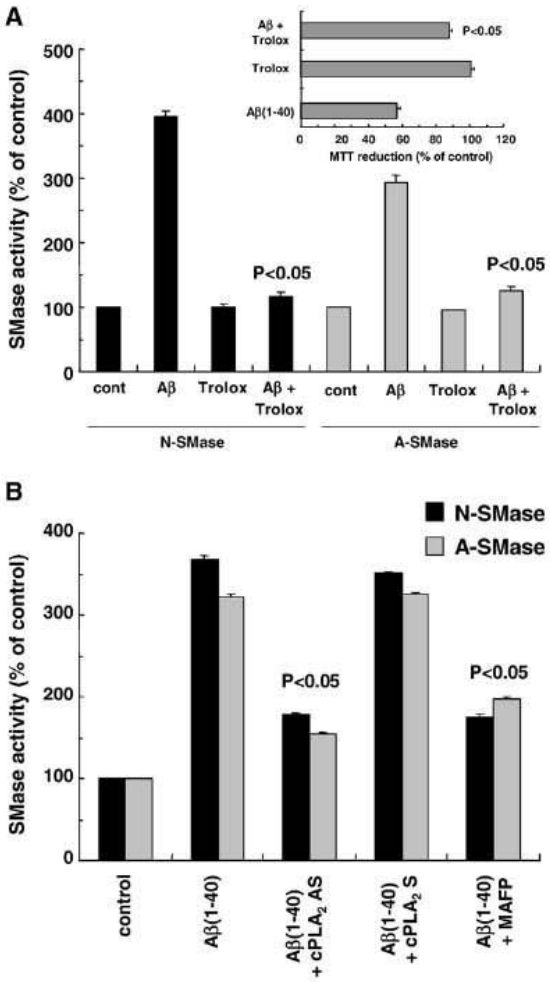


Fig. 7. $cPLA_2$ inhibitor and antisense oligonucleotide effects on soluble Aβ-induced SMase activation. (A) Cortical neurons were preincubated for 2 h with 1 mM Trolox and then exposed to 1 μM soluble Aβ(1–40). Cell viability was monitored after 24-h incubation with Aβ using the MTT assay. A-SMase and N-SMase activities were measured after 3 and 6 h of incubation with 1 μM Aβ, respectively. (B) Alternatively, cells were preincubated for 48 h in the presence or absence of 4 μM $cPLA_2$ sense or antisense oligonucleotide as previously described (Kriem et al., 2005). Another set of cells were pretreated for 2 h with 1 μM MAFP. Then all cells were incubated with 1 μM soluble oligomers of 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 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 Scheffe's post hoc test ($^{\#}P < 0.05$).

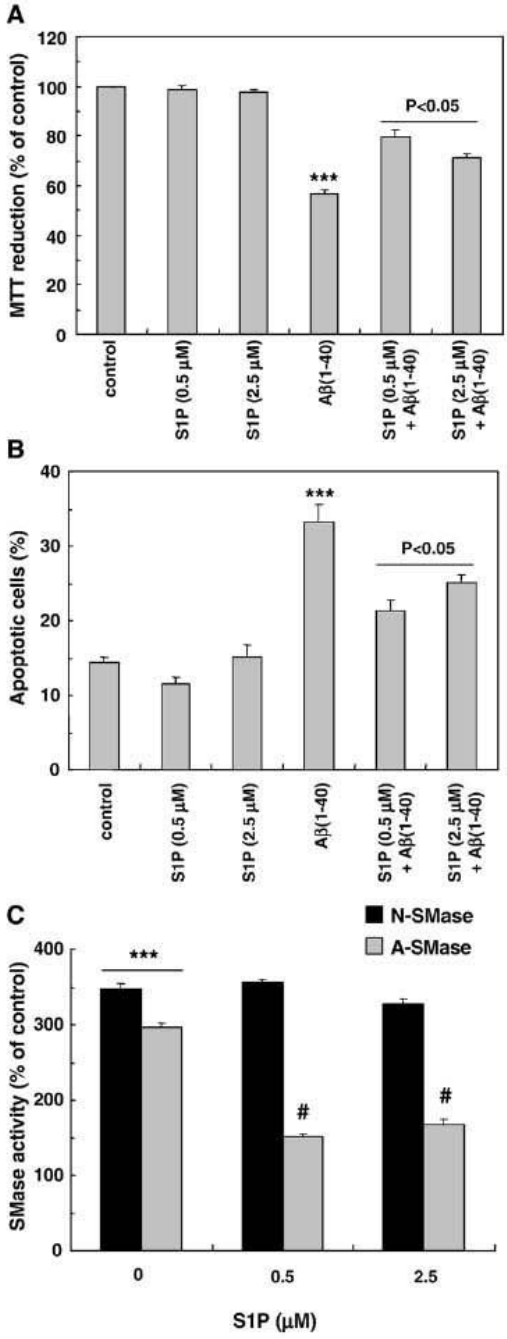


Fig. 8. Neuroprotective effects of sphingosine-1-phosphate. Cortical neurons were treated in the absence or presence of indicated concentrations of S1P added concomitantly to 1 µM soluble Aβ(1–40). The neurotoxicity of Aβ was monitored after 24 h by the MTT assay (A) and the quantification of apoptotic 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 Scheffe'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; Kayed et al., 2003). Quantitative analysis of soluble

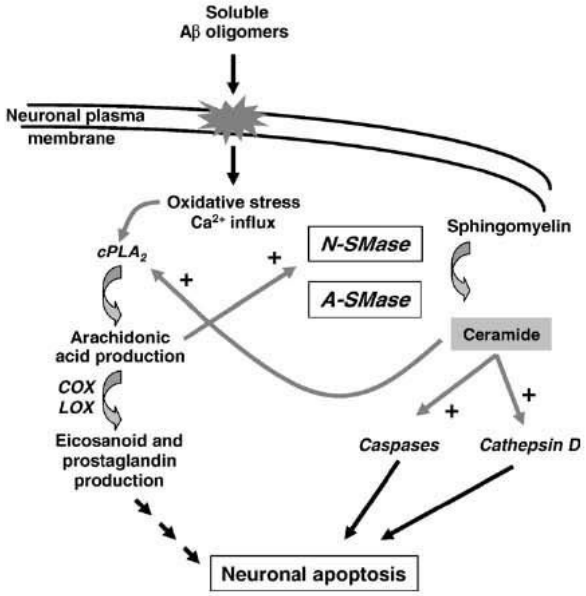


Fig. 9. Proposed mechanism of soluble Aβ oligomers induced SMase activation and subsequent cell death. After interaction with the plasma membrane of neurons (Sponne et al., 2003), soluble Aβ oligomers induce a rapid calcium- and ROS-sensitive activation of $cPLA_2$, resulting in the production of arachidonic 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.

Aβ demonstrated the presence of an average amount of 1.5 μg/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 Aβ oligomers can reach local micromolar concentration via biological processes that confine Aβ 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 Aβ oligomers within dendritic arbors, targeting synapses (Gong et al., 2003; Lacor et al., 2004). Finally, Aβ 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 Aβ 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 Aβ-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 Aβ-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 Aβ 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 oligomers versus aggregates of Aβ 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 Aβ on astrocyte-mediated inflammation (White et al., 2005). Here, we show that soluble Aβ 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 Aβ oligomer-induced cell death (Kriem et al., 2005). The results from the present study strongly support the contention that soluble Aβ-mediated activation of SMases results from both the generation of reactive oxygen species and arachidonic acid in neurons exposed to soluble Aβ oligomers. First, the presence of an antioxidant molecule such as Trolox inhibited soluble Aβ-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 Aβ 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 Aβ-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 Aβ 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 Aβ 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 Aβ 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 Aβ exposure. Interestingly, our results suggest that caspases act downstream of SMases in the soluble Aβ-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 Aβ 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 Aβ neurotoxicity.

Finally, we demonstrate here for the first time that sphingosine-1-phosphate is a potent neuroprotective factor against soluble Aβ oligomer-induced cell death and apoptosis. Interestingly, our data strongly suggest that this neuroprotective effect of S1P might occur in part through the inhibition of A-SMase activation induced by soluble Aβ oligomers. In agreement with our results is a study showing that S1P is able to inhibit A-SMase activation during apoptosis of macrophages (Gomez-Munoz et al., 2003). The exact molecular mechanism responsible for S1P neuroprotective effects remains, however, to be clarified. S1P 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 S1P signaling might counteract the inhibition of ERK phosphorylation and caspase-3 activation primarily resulting from soluble Aβ 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 Aβ-mediated cell death (Kriem et al., 2005). In contrast, it has been proposed that the pro-survival mechanisms of S1P are mediated via a S1P receptor/$G_{\alpha i}$/ERK pathway (Lee et al., 1999; An et al., 2000).

In conclusion, this work identifies a novel mechanism for soluble Aβ oligomer-induced neuronal apoptosis. Regardless of the molecular pathways involved, our results reveal a causal relationship between soluble Aβ exposure and the activation of both A-SMase and N-SMase, which is likely to result from soluble Aβ oligomer-induced oxidative stress and arachidonic acid production (Fig. 9). Taken together, these results support the model in which soluble Aβ oligomers induce neuronal apoptosis and cell death in part via the $cPLA_2$-AA-SMase pathway. Although the local concentration of soluble Aβ 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.
Dbaibo, 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.
Drouet, 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., Sponne, 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.
Goldkorn, 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 Aβ 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. TNFalpha-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 Mg^{2+}-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 Aβ 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., Cimadevilla, J.M., Vondrous, 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., Keinanen, 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., Sponne, I., Fifre, A., et al., 2005. Cytosolic phospholipase A_2 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 Aβ (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. J. Biol. Chem. 271, 4077–4081.
Lacor, P.N., Buniel, 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. 95, 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., Fifre, 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., Fifre, 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 Abeta 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-β1–42 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.

PUBLICATION # 2

Journal of Neurochemistry, 2006, **96**, 385–395 doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03541.x

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

Journal of Neurochemistry, 2006, **96**, 385–395 doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03541.x

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 (Aβ) 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 Aβ oligomers. DHA pre-treatment was observed to significantly increase neuronal survival upon Aβ 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 Aβ 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 (Aβ) 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 Aβ (Drouet *et al.* 2000). Indeed, studies from both our group and others have demonstrated that exposure of cells to soluble Aβ 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 Aβ 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 Aβ 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; Aβ, 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.

© 2005 The Authors
Journal Compilation © 2005 International Society for Neurochemistry,

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 Farooqui 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 Aβ 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 Aβ. DHA enrichment of plasma membrane is shown to protect neurones from Aβ-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 Aβ(1–40) and Aβ(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-^{3}H]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 μg/mL poly-L-ornithine. After 6 days *in vitro*, neurones were treated with 1 or 5 μM soluble Aβ(1–40) or Aβ(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 A_2 activity, cells were pre-incubated for 2 h with methyl arachidonyl fluorophosphonate (0.1 μM) and then incubated with 1 μM Aβ(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 μM for 24 h and 5 μM 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 Aβ 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 μL of methanol : chloroform (2 : 1) and diluted in 2 mL of methanol : dichloromethane (3 : 1). Acetyl chloride (200 μL) 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 μL of hexane. Fatty acids were separated as methyl esters on a fused silica capillary column (30 × 0.32 m i.d. × 0.25 μm film thickness) and analyses were performed on a gas chromatograph (Chromopack CP 9001; Chromopack, Middleburg, the Netherlands) equipped with a

© 2005 The Authors

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 μL 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 μCi/mL [^{3}H]AA 24 h prior to Aβ 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 μM soluble Aβ(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 Aβ, while the neurones were lysed with 0.5 M NaOH. Scintillant solution (Pico-Fluor™ 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 μg) 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 ×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 $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 10 μg/mL pepstatin, 10 μg/mL leupeptine and 5 μg/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 μM for 2 h at 37°C with 50 μg 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 μg) 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 ± SEM. Multiple pair-wise comparisons among the groups of data were performed using ANOVA followed by a Scheffe's post-hoc test. Statistical differences were determined as $p < 0.05$.

© 2005 The Authors

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 μM 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 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 μM soluble Aβ(1–40) oligomers. As expected from our previous reports (Pillot *et al.* 1999; Sponne *et al.* 2003, 2004; Kriem *et al.* 2005), Aβ 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 Aβ cytotoxic effects. A higher level of neuroprotection ($p = 0.015$) was obtained for DHA, leading to 85% survival at 0.5 μM (Fig. 1a), while EPA protected up to 77% of the cells (Fig. 1b). We also noticed that the neurones pre-treated with 5 μM of either *n*-3 PUFA were almost unprotected from soluble Aβ 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 μM was selected.

Docosahexaenoic acid was observed to sustain survival of neurones exposed to soluble oligomers of Aβ(1–40) as well as Aβ(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 Aβ 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 Aβ oligomers and suggests

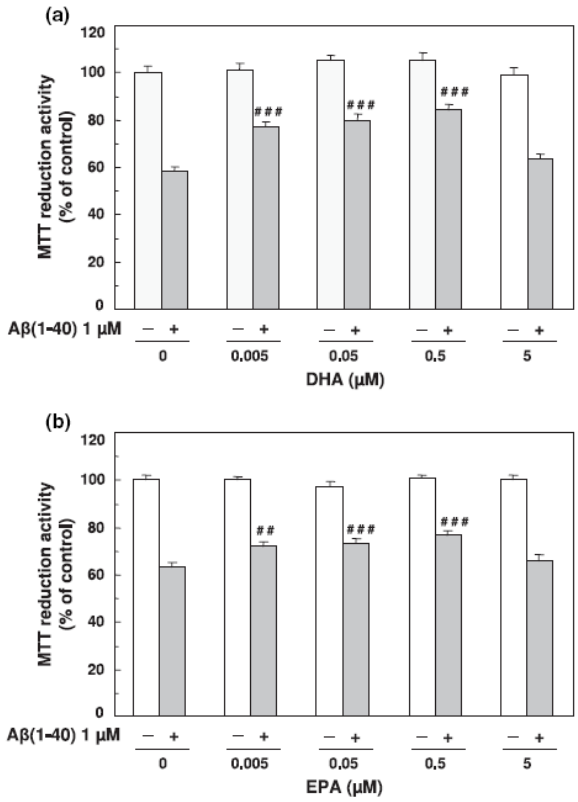


Fig. 1 Pre-incubation with *n*-3 polyunsaturated fatty acid protects neurones from soluble amyloid-β (Aβ) cytotoxicity. Cortical neurones were cultured for 48 h in medium enriched with docosahexaenoic acid (DHA) (a) or eicosapentaenoic acid (EPA) (b) prior to exposure to non-fibrillar Aβ for 24 h. Cell viability was then monitored using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Data are expressed as means ± 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 Aβ(1–40)-treated cells.

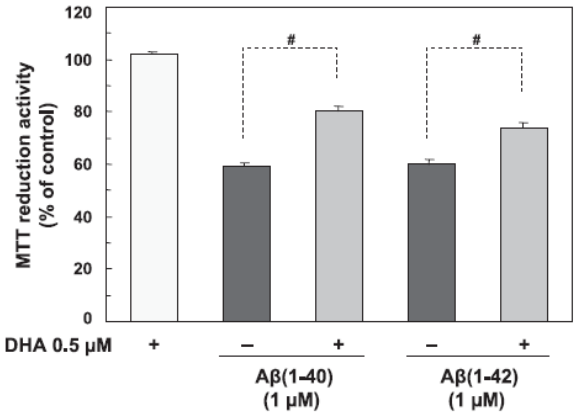


Fig. 2 Docosahexaenoic acid (DHA) pre-incubation protects neurones from amyloid-β (Aβ)(1–40) as well as Aβ(1–42) oligomers. Treatments with DHA and Aβ were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. Cell viability was monitored using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Data are expressed as means ± SEM, calculated from at least three independent experiments with four determinations each, normalized to the effect of vehicle designated as 100%. #$p < 0.05$.

© 2005 The Authors
Journal Compilation © 2005 International Society for Neurochemistry,

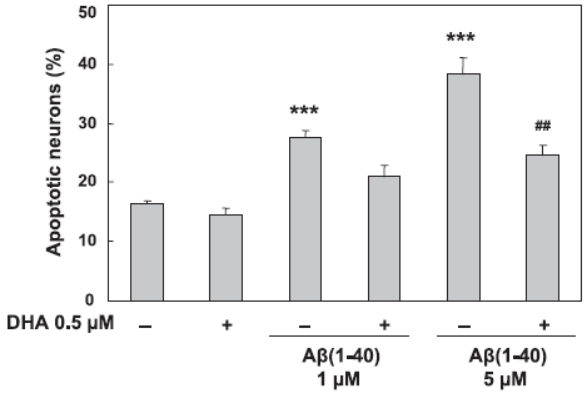


Fig. 3 Protective effects of docosahexaenoic acid (DHA) on neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-β (Aβ)(1–40). Treatments with DHA and Aβ were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. Apoptotic nuclei in cells were visualized by 4,6-diamidino-2-phenylindole staining and quantified from 10 individual fields per coverslip. Data are expressed as means ± 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 Aβ(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 µM 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 Aβ(1–40) induced an apoptotic cell death of cortical neurones as already reported (Sponne *et al.* 2003). Here we found that Aβ-mediated neuronal apoptosis was inhibited by DHA pre-treatment, as indicated by the decreased apoptotic nuclei (Fig. 3).

We previously reported that the soluble Aβ-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 Aβ oligomers.

Docosahexaenoic acid does not inhibit activation of cytosolic phospholipase A_2 in amyloid-β-treated neurones

We have recently reported that the pro-apoptotic pathways induced by non-fibrillar Aβ peptides include an enhancement in AA release and pro-inflammatory cascade subsequent to an early activation of cytosolic phospholipase A_2 (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 Aβ-induced cell death. We first measured the release of AA upon exposure to soluble Aβ(1–40) oligomers (Fig. 4a). After 10 min, [^{3}H]AA release was 1.8-fold higher in Aβ-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 Aβ-treated neurones, leading us to conclude that DHA pre-treatment neither inhibits nor delays cytosolic phospholipase A_2 activation upon non-fibrillar Aβ treatment.

We also compared the protective effects of DHA with those of methyl arachidonyl fluorophosphonate, a cytosolic phospholipase A_2 inhibitor that prevents non-fibrillar Aβ-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 Aβ(1–40) oligomers, protecting 51 and 76% of neurones, respectively, as calculated after assaying MTT activity (Fig. 4b). Cumulative effects were observed when Aβ-exposed neurones were pre-treated with both agents, leading to complete protection from Aβ-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 Aβ 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 Aβ(1–40) oligomers decreased the GSH content, with a significant loss of 35% in neurones exposed to 5 µM soluble Aβ 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-

© 2005 The Authors

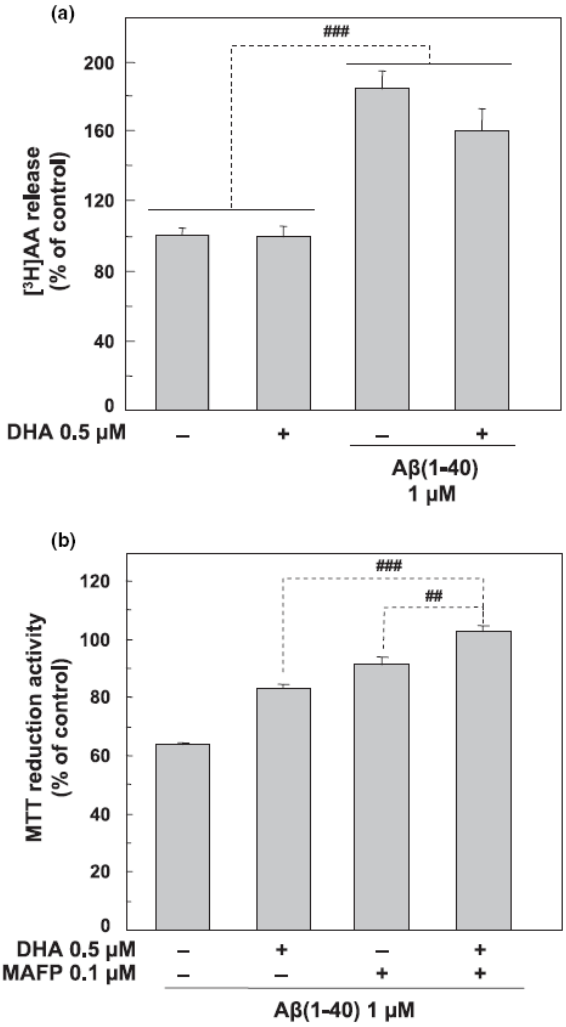


Fig. 4 Docosahexaenoic acid (DHA) protection from soluble amyloid-β (Aβ)(1–40) toxicity does not rely on cytosolic phospholipase A_2 inhibition. Treatments with DHA and Aβ were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. (a) [^{3}H]arachidonic acid (AA) release was measured by counting the percentage of tritium β-particle activity released into the culture medium after 10 min exposure to Aβ. (b) Neuronal viability was monitored after 24 h exposure to Aβ 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 ± 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 ###$p < 0.001$.

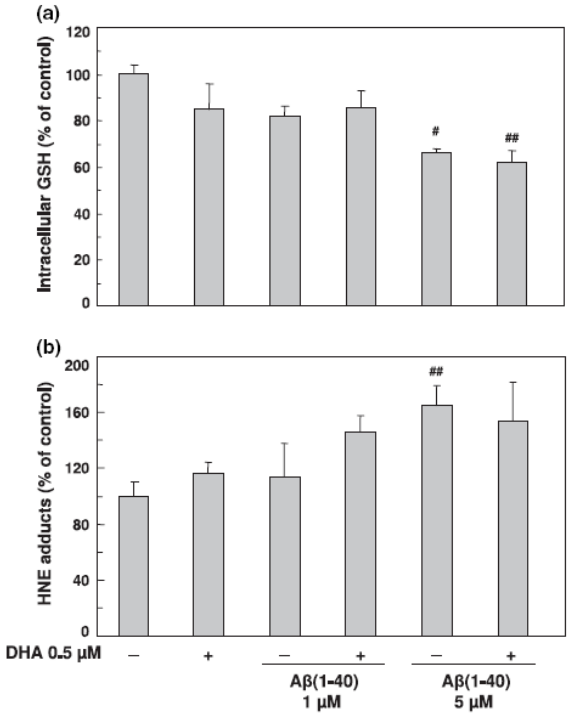


Fig. 5 Docosahexaenoic acid (DHA) does not prevent oxidative stress induced by soluble amyloid-β (Aβ)(1–40) oligomers. Treatments with DHA and Aβ were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. Neuronal GSH content was recovered by acidic lysis. (a) GSH concentration was measured by fluorometric 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 ± 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.

tion of 0.5 µM 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 forms of glutathione after exposure to 5 µM Aβ (data not shown), which suggests that GSH not only underwent oxidation but was either utilized by or released from the neurones upon Aβ 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 Aβ-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 Aβ 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 Aβ undergo an oxidative stress that is not prevented by DHA overloading.

© 2005 The Authors
Journal Compilation © 2005 International Society for Neurochemistry,

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 Aβ soluble oligomers (Sponne *et al.* 2003). Therefore, we examined the effects of DHA on the Aβ-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 Aβ(1–40) oligomers (Fig. 6a), the ratio of neurones with perturbed cytoskeleton being more dramatically increased upon exposure to 5 μM amyloid peptides (Fig. 6b). DHA pre-treatment significantly protected the cells from these Aβ-mediated alterations and preserved 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 Aβ 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 Aβ(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 μM Aβ(1–40). Indeed, Aβ led to simultaneous activation of caspase 3 and 9 (Fig. 7a) and we could clearly demonstrate that DHA pre-treatment protects neurones from Aβ-induced

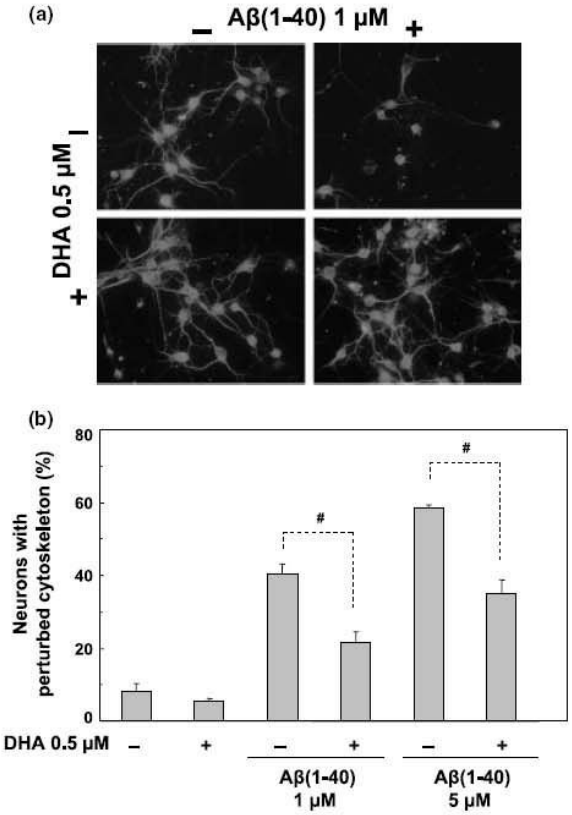


Fig. 6 Protection by docosahexaenoic acid (DHA) from cytoskeleton perturbation induced by soluble amyloid-β (Aβ)(1–40). Treatments with DHA and Aβ were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. (a) β-Tubulin labelling was used to study cytoskeleton integrity by immunocytochemistry. Data are indicative of identical effects observed in at least three separate experiments. Magnification: ×60. (b) Cells with perturbed neurones were counted from 10 individual fields per coverslip. Data are expressed as means ± SEM, calculated from two separate experiments with two independent coverslips each. #$p < 0.05$.

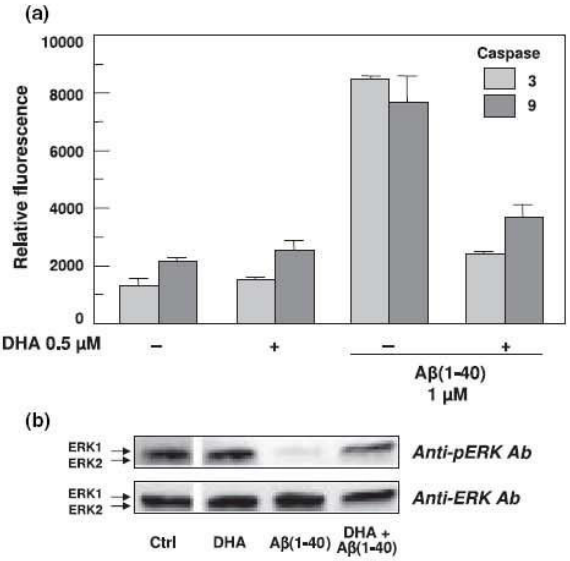


Fig. 7 Docosahexaenoic acid (DHA) prevents caspase induction and ERK dephosphorylation upon exposure to soluble amyloid-β (Aβ)(1–40). Treatments with DHA and Aβ were performed on cortical neurones as described in Fig. 1. (a) Caspase 3 and 9 activation in cortical neurones was monitored by measuring the relative increase in fluorescence due to the cleavage of the fluorogenic substrates in the presence of cell extracts. Data are expressed as means ± SEM, calculated from three different experiments with four determinations each. (b) Immunoblot analysis of the phosphorylated and non-phosphorylated forms of ERK.

© 2005 The Authors
Journal Compilation © 2005 International Society for Neurochemistry,

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 Aβ 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 Aβ-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 Aβ(1–40)-mediated cytotoxicity under *in vitro* conditions comparable to those imposed on primary neurones, leading to MTT activity decreased by 40–50% in Aβ-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 μM DHA (Fig. 8). Such pre-treatment allowed around 80% cell viability among cells exposed to non-fibrillar Aβ, 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.

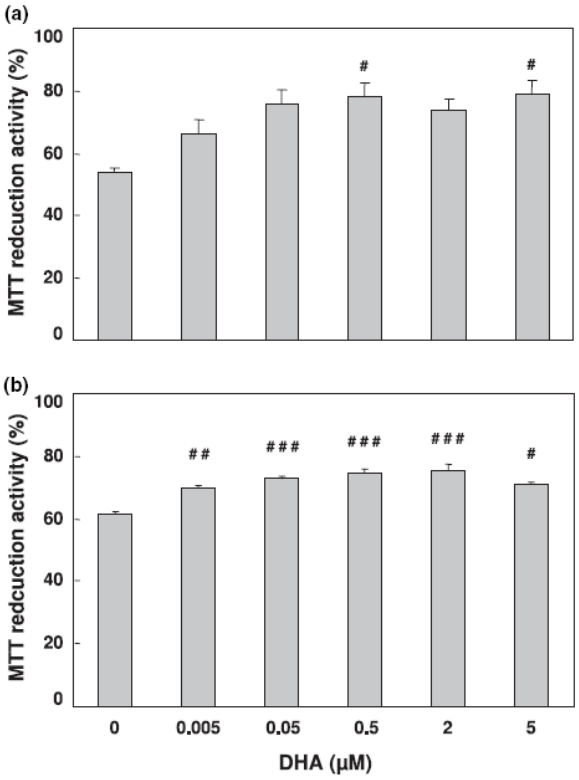


Fig. 8 Docosahexaenoic acid (DHA) protects Neuro2A neuroblastoma cells from soluble amyloid-β (Aβ)(1–40)-induced cytotoxic effects. (a) Cells were cultured for 48 h in medium enriched with DHA prior to exposure to 0.1 μM non-fibrillar Aβ for 24 h. (b) Cells were allowed to differentiate into neurones in retinoic acid (RA)-containing media before and during DHA and Aβ treatments. Cell viability was monitored using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Data are expressed as means ± 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 Aβ(1–40)-treated 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 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

© 2005 The Authors
Journal Compilation © 2005 International Society for Neurochemistry,

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 Aβ 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 Aβ 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 Aβ 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 Aβ 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 μM 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 Aβ oligomers. An even more pronounced oxidative stress as evaluated by lower GSH contents (data not shown) could have resulted from Aβ treatment after overloading with 5 μM PUFA, which could at least partly explain the lack of neuroprotection from Aβ 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 Aβ 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 Aβ 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 μM, lower than the concentrations reported to protect either rat hippocampal neurones from glutamate cytotoxicity (15 μM, Wang *et al*. 2003), human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells exposed to oxidative stress (6.7 μM, Mukherjee *et al*. 2004) or Neuro2A cells from staurosporine cytotoxicity (25 μM, Akbar and Kim 2002). The efficacy and level of protection from soluble Aβ 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 Aβ-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

© 2005 The Authors

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 Aβ 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 Aβ-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 Aβ oligomers. This is the first time that such protective properties have been reported at the cellular level with respect to the neurotoxicity of soluble Aβ 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., Tierney 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.

Drouet B., Pinçon-Raymond M., Chambaz J. and Pillot T. (1999) Laminin 1 attenuates β-amyloid peptide Aβ(1–40) neurotoxicity of cultured fetal rat cortical neurons. *J. Neurochem.* **73**, 742–749.

Drouet 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 Aβ40 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 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.

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., Fifre A. *et al.* (2005) Cytosolic phospholipase A_2 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.

© 2005 The Authors
Journal Compilation © 2005 International Society for Neurochemistry,

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, 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.

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., Vandekerchkhove 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., Sögüt 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., 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-dependent cytoskeleton perturbation. *J. Biol. Chem.* **278**, 3437–3445.

Sponne I., Fifre 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 cholesteryl 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.

© 2005 The Authors
Journal Compilation © 2005 International Society for Neurochemistry,

Résumé
Le vieillissement des populations est corrélé à l'augmentation des pathologies neurodégénératives liées à l'âge, plus particulièrement la maladie d'Alzheimer. La recherche de marqueurs précoces de la maladie ainsi que l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques constituent un enjeu de taille. Parmi les mécanismes moléculaires de la formation des plaques amyloïdes actuellement explorés, les formes oligomériques tronquées de peptide amyloïde (Aβ), notamment le peptide Aβ3(pE) 42 retrouvé à des stades précoces de la maladie, joueraient un rôle déterminant. Ces travaux de thèse ont permis de montrer, dans un premier temps, que l'injection intracérébrale de ce peptide chez la souris entraîne des altérations de la mémoire de travail et des capacités d'apprentissage, associées à une accumulation d'espèces réactives dérivées de l'oxygène dans des régions cérébrales spécifiques (hippocampe et bulbes olfactifs) de ces animaux. Des essais menés *in vitro* sur des cultures primaires de neurones de souris montrent leur implication dans les voies apoptotiques impliquant l'activation des caspases et la cascade métabolique de l'acide arachidonique. La seconde étape de ces travaux a constitué en l'étude des effets protecteurs d'un peptide antiapoptotique d'origine endogène, l'humanine (HN) et son variant S14G (HNG). *In vitro*, un effet protecteur de ces peptides a été mesuré après traitement de neurones en culture par le peptide Aβ3(pE) 42. Les résultats les plus marquants résident dans les observations faites *in vivo* : en effet, ces peptides inhibent l'effet délétère de l'injection intracérébroventriculaire du peptide Aβ3(pE) 42, en restaurant les performances mnésiques des animaux dans les tests comportementaux. A la lumière de ces résultats, les peptides HN pourraient constituer de nouveaux outils thérapeutiques dans le traitement ou la prévention des dommages cellulaires précoces liés à la présence des oligomères solubles du peptide Aβ.

Title: Molecular mechanisms involved in neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of β-amyloid peptide: identification and functional validation of cellular targets.

Abstract
Aging of population is correlated to the increase of neurodegenerative disease, more particularly Alzheimer disease. Defining early diagnostic markers and new therapeutic strategies are highly relevant. Among the molecular pathways which are currently developed, N-terminal-truncated forms of amyloid-β (Aβ) peptide have been recently suggested to play a pivotal role in the disease. Among them, Aβ3(pE) 42 peptide is the dominant Aβ species in amyloid plaques. We first investigated the effects of soluble oligomeric Aβ3(pE) 42 after intracerebroventricular injection on mice learning capacities and the molecular mechanisms of *in vitro* neurotoxicity. Mice injected with soluble Aβ3(pE) 42 displayed impaired spatial working memory and delayed memory acquisition. These cognitive alterations were associated with free radical overproduction in hippocampus and olfactory bulbs. *In vitro*, Aβ3(pE) 42 oligomers induced a redox-sensitive neuronal apoptosis involving caspase activation and an arachidonic acid-dependent pathway. The second goal of this work was to investigate the protective effects of the apoptosis rescue endogenous peptide humanin (HN) and its S14G mutant (HNG). *In vitro*, we measured their inhibitory effect on neuronal death and apoptotic events resulting from soluble Ab oligomer treatment. What's of particular interest is the *in vivo* restoration of soluble Aβ3(pE) 42 oligomer-induced mnesic impairment. Thus, HN peptides might serve as new drug candidates for treatment or prevention of early cellular damages linked to soluble Aβ oligomers.

Mots-clés : maladie d'Alzheimer, peptide β-amyloïde, oligomères solubles, neurodégénérescence, apoptose, transduction du signal, neurotoxicité, comportement, mémoire, apprentissage, humanine, stratégies thérapeutique.

Discipline : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Intitulé et adresse du laboratoire : JE2482 Lipidomix, Institut National Polytechnique de Lorraine, 15 rue du Bois de la Champelle, 54500 VANDOEUVRE

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Jean-Paul FUCHS, Chargé de Recherche, Centre de Neurochimie, Strasbourg

Madame Bernadette ALLINQUANT, Directeur de Recherche, Centre Paul Broca, Paris

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur YOUSSEF Ihsen

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort neuronale induite par le peptide ß-amyloïde soluble : recherche et validation fonctionnelle de cibles cellulaires"

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 18 octobre 2006

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55