



HAL
open science

Etude des effets des peptides amyloïdes : du fonctionnement de la synapse aux modifications du cytosquelette dans l'apoptose neuronale.

Nicolas Arbez

► **To cite this version:**

Nicolas Arbez. Etude des effets des peptides amyloïdes : du fonctionnement de la synapse aux modifications du cytosquelette dans l'apoptose neuronale.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université René Descartes - Paris V, 2005. Français. NNT: . tel-00069706v2

HAL Id: tel-00069706

<https://theses.hal.science/tel-00069706v2>

Submitted on 12 Jul 2006

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.

THESE de DOCTORAT de L'UNIVERSITE RENE DESCARTES

- Ecole Doctorale Génétique, Cellule, Immunologie, Infectiologie et Développement -

Présentée par

Nicolas ARBEZ

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université René Descartes, Paris V

Spécialité : Biologie du Vieillessement

**Etude des effets des peptides amyloïdes :
du fonctionnement de la synapse aux
modifications du cytosquelette dans
l'apoptose neuronale.**

Soutenu le 8 décembre 2005

Devant un jury composé de :

M. le Dr Jacques Epelbaum
M. le Pr Alain Buisson
M. le Dr Bernard Eddé
M. le Dr Jean-Marie Billard
M. le Pr Jean Mariani
Mme le Dr Catherine Rovira

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Co-Directrice de thèse

« To be honest, I don't know what I was looking for »
Pain of Salvation - 'This heart of mine'

à ceux qui ont cru en moi.....

Je tiens à remercier...

Une thèse est un chemin long, parfois périlleux, parfois plein de promesses, parfois rectiligne, parfois sinueux... C'est un chemin marqué par différentes étapes plus ou moins joyeuses. C'est un chemin dont on connaît l'issue puisque nombreux sont ceux qui l'ont déjà parcouru avant nous ; mais c'est un chemin unique pour chacun, un chemin personnel à nul autre pareil.

Puisque me voilà arrivé au bout de ce chemin, je tiens ici à remercier les personnes que j'ai pu rencontrer tout au long de ma route. Il est important de connaître et de remercier toutes ces personnes puisque, sans elles, rien n'aurait été possible. La thèse est un chemin dont l'aboutissement est aussi important que les expériences vécues (et bien sûr, dans le cas d'un biologiste, réalisées à la paillasse...) sur le parcours.

Tout d'abord, je voudrais remercier très chaleureusement Jean Mariani de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir dirigé ma thèse. Merci d'avoir été présent quand j'en avais besoin, merci de savoir prendre le temps qu'il faut (sur un planning pourtant bien chargé) quand il le faut. Le choix d'un laboratoire est toujours difficile pour un étudiant de maîtrise qui n'y connaît rien, mais je peux dire finalement que je n'aurais sans doute pas pu mieux tomber.

Parmi toutes les personnes rencontrées tout au long de cette thèse, deux ont eu plus particulièrement la lourde tâche de m'encadrer :

Merci à Catherine Rovira, pour m'avoir ainsi appris autant de choses sur l'approche électrophysiologique et en particulier le patch. Je n'oublierais jamais tout ce que tu as fait pour moi. Merci également de faire partie de ce jury.

Merci à Bernard Brugg, de m'avoir fait découvrir un autre versant de la biologie. J'aurais aimé pouvoir te remercier en allemand mais tout ce qu'il reste de ces longues années passées à essayer d'apprendre cette langue c'est « Er macht Runde mit seine Mofa... » ce qui, tu en conviendras, ne nous amène pas très loin. Donc, en français : « Merci pour tout ».

Je souhaite ensuite remercier les membres du jury :

Merci à Messieurs Alain Buisson et Bernard Eddé d'avoir si gentiment accepté d'être les rapporteurs de cette thèse malgré la petite difficulté posée par les deux approches techniques différentes. Je remercie tout aussi vivement M Jean Marie Billard pour avoir accepté d'examiner ce travail malgré la même difficulté.

Je n'oublie pas bien sûr M Jacques Epelbaum, le président du jury de cette thèse qui, par ce fait, a assisté à toutes les étapes primordiales de mon travail depuis le début de mon DEA.

Au cours de ce travail de thèse il m'a été donné l'occasion de collaborer avec des gens d'autres unités, ce qui m'a permis d'acquérir de nouvelles connaissances et compétences.

La première de ces collaborations a été effectuée avec Jean-Christophe Larcher de l'UMR 7098. Merci JC, je pense que je te dois la plus grande partie (pour ne pas dire tout) de ce que je sais en biochimie (même si c'est vrai que je partais de pas grand-chose). Je remercie également Will et Laila, membres de l'équipe tubuline, avec qui j'ai passé de très bons moments. Un grand merci à toi Will pour tout le temps que l'on a partagé et les soirées et les week-ends passés ensemble (au labo ou ailleurs, en France ou ailleurs).

Le travail sur la stathmine et sa famille n'aurait pas pu se faire sans une précieuse collaboration avec l'U706. Un grand merci donc à André Sobel ainsi qu'à Sylvie Ozon et Sylvie Lachkar pour leur accueil et leur gentillesse.

Merci beaucoup Neha d'être venue faire ton stage de M1 chez nous et ainsi m'avoir permis de faire beaucoup plus de choses que si j'avais été tout seul. Mon seul regret est que tout ce qu'on a fait ensemble n'apparaît pas dans ce manuscrit, j'aurais aimé pouvoir en montrer plus... Merci d'avoir insisté...

Je tiens également à remercier ici Marie-Christine Miquel, pour m'avoir aidé, écouté, poussé... et aussi pour avoir relu ma thèse avec attention et ainsi avoir pu faire rajouter toutes les virgules manquantes...

Merci à tous les membres des équipes dans lesquelles j'ai travaillé : merci donc aux membres de DVSN et de SNRG/DMN.

En particulier, je voudrais remercier :

Fatiha, qui a commencé en même temps que moi, et qui fini en même temps que moi... Merci d'avoir été là toi aussi pour me soutenir quand je doutais.

Vanessa, pour son aide précieuse et pour ses milliers de questions.

Sonja, Géraldine, Nathalie, Melina, Alexandra, Delphine, Vanessa

Mathieu, Jérémie, Pierre, Eric

Merci à tous pour toutes ces années passées ensemble.

J'ajouterais une mention spéciale à Ann et à Julie dont j'ai partagé les bureaux.

Merci à mes parents, mon frère, ma sœur... Cette fois c'est vraiment la fin, même si ça fait de longs mois que je l'annonce sans que vous en voyiez la couleur... Merci de vous être intéressé à ce que je faisais même si ce n'est pas toujours facile de comprendre ce dont je parle.

J'allais presque oublier l'inévitable remerciement : Merci aussi à Manu et Jean-fou pour toutes ces soirées bien arrosées...

Merci à mes amis : Estelle, Gael, Fabrice, Morgan, Karim et Fabien. Vous avez souvent eu à gérer et supporter mes mauvaises humeurs, mes éloignements, mes doutes, mes peines mais aussi mes joies, mes brillantes découvertes que je suis le seul à comprendre et tout ça. Sans vous je n'y serais sans doute pas arrivé.

Merci aux lyonnais, fidèles depuis si longtemps (malgré la petite interruption).

Dankjewel Sanne*, dankzij jou heb ik engels geleerd, Amsterdam ontdekt, en geleerd dat nootjes ook als ingrediënt in lasagne kunnen, nogmaals bedankt!

Merci à vous, membres de Pika Crew, et ça c'est rien de le dire...

Je tiens aussi à remercier Floor Jansen, Liv Kristin, Manda Orphuis, Simone Simons, Daniel Gildenlow, Matt Barlow, Peavy Wagner, André Matos, SAS de Largilière, Mickael Åkerfeld, Hansi Kürsch, Bruce Dickinson, Adam Duris, Dani Filth, Mike Terrana, Mike Portnoy, Jörg Michael, Jens Johanson ainsi que les groupes After Forever, Sentenced, Rammstein, Therion, Misanthrope, Rage, Moonspell, Pain of Salvation, Iced Earth, Mago de Oz, Counting crows, The Old Dead Tree, Kamelot et les quelques (centaines d') autres qui ont rythmé mon travail et m'ont fait bouger à tant de bons concerts ces dernières années.

Et enfin, merci à tous ceux que je n'ai pas cités et qui pourtant devrait être ici aussi...

Sommaire

Sommaire	7
Liste des abréviations	12
Liste des figures	13
Liste des tableaux	14
Avant Propos	15
Introduction	17
Chapitre I : La maladie d'Alzheimer	
I La maladie d'Alzheimer	19
1) Généralités	19
2) Histopathologie	20
a) <i>Les plaques séniles</i>	21
b) <i>Les dégénérescences neurofibrillaires</i>	22
3) Les facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer	23
4) les traitements	24
a) <i>Les inhibiteurs de l'AChE</i>	24
b) <i>Un antagoniste des récepteurs NMDA</i>	24
II Les acteurs moléculaires	25
1) L'APP	25
a) <i>Structure de l'APP</i>	25
b) <i>Maturation de l'APP</i>	27
2) Les sécrétases	29
a) <i>L'α-sécrétase</i>	30
b) <i>La β-sécrétase</i>	31
c) <i>La γ-sécrétase</i>	32
III La cascade amyloïde	33
Chapitre II : Les peptides amyloïdes	
I L'hétérogénéité des peptides amyloïdes	36
1) Les différents peptides amyloïdes	36
2) Les états d'agrégation des peptides amyloïdes	37
a) <i>L'$A\beta$ soluble</i>	38
b) <i>Les ADDL</i>	39

c) <i>Protofibrilles et fibrilles</i>	39
II Les récepteurs à l'A β	41
III L'A β et les canaux ioniques	42
1) Les canaux calciques	42
2) Les canaux cationiques non sélectifs.....	43
3) Les canaux potassiques	43
IV L'A β et la physiologie synaptique	44
1) A β et transmission synaptique	44
2) A β et plasticité synaptique	46
a) <i>LTP et LTD</i>	46
b) <i>Aβ et LTP</i>	48
c) <i>Mécanismes d'action de l'Aβ</i>	51
d) <i>Aβ et LTD</i>	52
e) <i>Effets sur l'apprentissage et la mémoire</i>	53
 Chapitre III L'A β et l'apoptose	
I L'apoptose neuronale	56
1) Définition	56
2) Décours temporel de modifications	57
II L'apoptose dans la maladie d'Alzheimer	59
III L'A β , un inducteur d'apoptose	60
 Chapitre IV : Inflammation dans la maladie d'Alzheimer	
I Les acteurs moléculaires de l'inflammation	63
1) le complément	63
2) Les cytokines et les chémokines	64
a) <i>L'IL1</i>	64
b) <i>L'IL6</i>	65
c) <i>Le TNFα</i>	66
d) <i>Le TGFβ</i>	66
e) <i>Les chémokines</i>	66
3) les cycloxygénases	67
4) Les radicaux libres	67

II Les acteurs cellulaires de l'inflammation	68
1) La microglie	68
2) Les astrocytes	69
3) Les neurones	69
 Chapitre V Le cytosquelette de tubuline	
I La tubuline	71
1) L'hétérogénéité de la tubuline	72
a) <i>L'hétérogénéité génétique</i>	72
b) <i>L'hétérogénéité post-traductionnelle</i>	73
2) Structure de la tubuline	75
3) Dimérisation	76
II Le microtubule	77
1) Organisation structurale des microtubules	77
2) La dynamique des microtubules	78
a) <i>La nucléation</i>	78
b) <i>Les modèles de dynamique in vitro</i>	79
c) <i>L'énergie de la dynamique</i>	79
3) Les protéines associées aux microtubules	80
a) <i>Les MAP structurales</i>	81
b) <i>Tau</i>	82
c) <i>Les MAP motrices</i>	83
4) Le contrôle pharmacologique des microtubules	84
 Chapitre VI : Stathmine et sa famille	
I La famille multigénique de la stathmine	86
1) La stathmine	86
2) Les autres membres de la famille	86
II Expression des membres de la famille	88
III La phosphorylation des protéines de la famille de la stathmine	89
IV Les fonctions de la famille de la stathmine	90
1) La stathmine lie les hétérodimères de tubulines	90
2) Rôle de la phosphorylation de la stathmine	91
3) Rôle fonctionnel de l'interaction stathmine/tubuline	92

Objectifs de l'étude	94
Résultats	96
Sujet I - Effets des peptides A β sur les courants calciques dans des tranches d'hippocampe de souris adultes	
Objectifs	98
Résultats	99
Article I : Rovira C., Arbez N. and Mariani J. "A β (25-35) and A β (1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons." <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 2002 Sep 6 ; 296(5):1317	
Conclusions	105
Sujet II – Effets des peptides A β sur l'activité synaptique excitatrice de la synapse fibres parallèles/cellule de Purkinje	
Objectifs	108
Résultats	109
Article II : Arbez N., Gautheron V., Brugg B., Mariani J. and Rovira C. "Beta-amyloid (1-42) induced postsynaptic reduction in the AMPA synaptic responses of cerebellar Purkinje cells: involvement pro-inflammatory processes." <i>J. Neurosci Res (soumis)</i>	
Conclusions	135
Sujet III – Modifications des tubulines dans l'apoptose neuronale induite par le peptide A β (25-35)	
Article III : Arbez N., Larcher J.C., Ozon S., Lachkar S., Mariani J., Miquel M.C. et Brugg B. "β-amyloid induces a cytoplasmic specific aggregation of class III β-tubulin <i>ex vivo</i> ." <i>en préparation</i>	
Objectifs	139
Procédures expérimentales	140
1) Cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires murins	140
2) Transfection du plasmide GFP à la Lipofectamine 2000	142
3) Traitements pro-apoptotiques	142
4) Immunocytochimie et marquage de la chromatine	143
5) Western blot	144
6) Electrophorèse bidimensionnelle	145
7) Filter assay	146
Résultats	147

1) Caractérisation des cultures primaires de neurones corticaux	147
2) Apoptose neuronale	147
3) Caractérisation morphologique de l'apoptose neuronale	149
a) Modifications cellulaires	151
b) Modifications biochimiques	151
4) Modifications des tubulines et des microtubules lors de l'apoptose	157
5) Caractérisation des agrégats de β -tubuline de classe III	160
a) Sensibilité au triton	161
b) Agrégats protéiques	162
c) Synthèse de protéines	163
d) Mise en évidence biochimique des agrégats	163
6) Implication de la famille de la stathmine	165
Discussion et perspectives	170
Discussion	176
Sujets annexes	180
Présentation	181
Article IV : Carimalo J., Cronier S., Petit G., Peyrin J.-M., Boukhtouche F., <u>Arbez N.</u> , Lemaigre-Dubreuil Y., Brugg B. and Miquel M.-C. "Activation of the JNK/c-Jun pathway during the early phase of neuronal apoptosis induced by PrP106-126 and prion infection." <i>European Journal of Neuroscience</i> 2005 May, 21 (9), 2311-2319	
Article V : Willaime-Moravek S., <u>Arbez N.</u> , Mariani J. and Brugg B. "IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis via activation of the PI-3K/Akt and ERK pathways; is this protection independent of CREB and Bcl-2 ?" <i>Sous presse pour Molecular Brain Research</i> 2005	
Références Bibliographiques	205

Liste des abréviations

A β	Peptide beta-amyloïde
AChE	Acétylcholine estérase
AChEI	Inhibiteur de l'acétylcholine estérase
APP	Précurseur du peptide amyloïde
Ara-C:	cytosine β -D-arabino-furanoside
BAPTA	N'-(1,2-ethanediybis(oxy-2,1-phenylene))bis(N-(carboxymethyl))-Glycine
EPSC	Courant post-synaptique excitateur
LTD	Long term depression
LTP	Long term potentiation
MAP	Microtubule associated protein
MAP Kinase	Mitogen activated protein kinase
mEPSC	miniature EPSC
nAChR	Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
PPF	Paired-pulse facilitation
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PS	Préséniline
TBS :	Tris Buffer Saline

Liste des figures

Figure 1 : Section de l'amygdale d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer	21
Figure 2 : Dégénérescences neurofibrillaires	23
Figure 3 : Représentation schématique de la structure de l'APP.	25
Figure 4 : Sites des principales mutations de l'APP.	26
Figure 5 : Représentation schématique de la voie non amyloïdogénique	28
Figure 6 : Représentation schématique de la voie amyloïdogénique	29
Figure 7 : Représentation schématique de la Préséniline 1	32
Figure 8 : La LTP hippocampique	49
Figure 9 : Morphologie d'une cellule apoptotique	57
Figure 10 : Structure du dimère de tubuline	75
Figure 11 : Symétrie des voies de conformation de l' α -tubuline et de la β -tubuline.	76
Figure 12 : Représentation schématique d'un microtubule	77
Figure 13 : Les différentes protéines de la famille de la stathmine	87
Figure 14 : Analyse de l'état de phosphorylation de la stathmine	89
Figure 15 : Modèle d'action de la stathmine	91
Figure 16 : Structure du complexe T2S	92
Figure 17 : Caractérisation des cultures de neurones corticaux	147
Figure 18 : Courbe dose-réponse de traitement au peptide A β (25-35)	148
Figure 19 : Cinétique de survie des neurones corticaux	149
Figure 20 : Transfection des neurones corticaux par la GFP	150
Figure 21 : Immunodétection de l' α -tubuline pendant l'apoptose	152
Figure 22 : Immunodétection de la β -tubuline pendant l'apoptose	153
Figure 23 : Immunodétection de la β -tubuline de classe III pendant l'apoptose	154

Figure 24 : Double marquage α -tubuline / β -tubuline	155
Figure 25 : Double marquage α -tubuline / β -tubuline de classe III	155
Figure 26 : Analyse des tubulines par microscopie confocale	156
Figure 27 : Western blot tubuline	157
Figure 28 : Profil d'expression bidimensionnel de la tubuline	158
Figure 29 : Electrophorèse bidimensionnelle α -tubuline pendant un traitement à l'A β	159
Figure 30 : Electrophorèse bidimensionnelle β -tubuline pendant un traitement à l'A β	159
Figure 31 : Electrophorèse bidimensionnelle α -tubuline pendant la carence	160
Figure 32 : Electrophorèse bidimensionnelle β -tubuline pendant la carence	160
Figure 33 : Electrophorèse bidimensionnelle GT335 pendant carence	161
Figure 34 : Traitement A β en présence de Triton	162
Figure 35 : Traitement A β en présence SDS	162
Figure 36 : Traitement A β en présence de cycloheximide	163
Figure 37 : Filter Assay	164
Figure 38 : Coimmunodétection de la stathmine et de la β -tubuline de classe III lors de l'apoptose neuronale induite par l'A β (25-35).	166
Figure 39 : Coimmunodétection de SCG10 et de la β -tubuline de classe III lors de l'apoptose neuronale induite par l'A β (25-35).	167
Figure 40 : Coimmunodétection de SCLIP et de la β -tubuline de classe III lors de l'apoptose neuronale induite par l'A β (25-35).	168
Figure 41 : Coimmunodétection de RB3 et de la β -tubuline de classe III lors de l'apoptose neuronale induite par l'A β (25-35).	169

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition du milieu N5	141
Tableau 2 : Composition du milieu L15	142

Avant propos

La maladie d'Alzheimer est une maladie complexe dont le développement s'opère sur plusieurs années et met en jeu de nombreux processus cellulaires et moléculaires différents. Comprendre l'évolution des mécanismes impliqués au cours des stades de la maladie pourrait permettre de mettre au point des thérapeutiques adaptées et plus efficaces.

Schématiquement, il est possible de décomposer l'évolution moléculaire et clinique de la maladie en 3 grandes phases :

Une première phase asymptomatique pendant laquelle les concentrations de peptides amyloïdes A β extracellulaires sont très faibles. Cette phase est marquée par des altérations sub-létales du fonctionnement des cellules, notamment au niveau de leur fonctionnement électrique. C'est une phase se développant très lentement, et qui n'est pas décelable sur le plan clinique en raison de l'absence de tout symptôme. Le déclenchement et la durée de cette phase ne sont pas connus.

Une deuxième phase intermédiaire lors de laquelle les dysfonctionnements cellulaires augmentent parallèlement aux concentrations de peptides. C'est au cours de cette phase que les plaques séniles se forment et que les synapses dégénèrent. A ce stade, les pertes neuronales ne sont pas encore prédominantes mais les premiers signes cliniques peuvent se déclarer. On peut relier cette phase à l'*amnestic Mild Cognitive Impairment* qui est un état de déficits cognitifs avec des troubles amnésiques précédant l'apparition des altérations profondes caractéristiques de la maladie.

Une troisième phase, clinique, qui est la plus tardive de la maladie, marquée par la présence de plaques séniles et de grandes quantités de peptides amyloïdes agrégés dont la toxicité tue les cellules et entretient une inflammation par l'activation des cellules gliales. Cette phase est également caractérisée par de l'apoptose neuronale, des pertes synaptiques et par de nombreux déficits cognitifs.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai abordé la question de la toxicité des peptides amyloïdes sur des modèles *ex vivo* et *in vitro*. Les différentes approches méthodologiques et techniques employées m'ont permis d'aborder le rôle des peptides amyloïdes au cours de ces

différentes phases de la maladie : depuis les effets très précoces de très faibles concentrations de peptides sur le fonctionnement de canaux ioniques jusqu'aux altérations du cytosquelette lors de l'apoptose induite par de fortes concentrations de peptides.

Dans une première partie, j'ai étudié, par des techniques électrophysiologiques, les changements induits par le peptide amyloïde dans l'activité électrique des neurones.

Je me suis tout d'abord intéressé à des événements intervenants de façon très précoce au cours des premières phases de la maladie. J'ai étudié les effets d'applications aiguës de faibles concentrations de deux formes d'A β solubles sur les courants calciques de neurones pyramidaux de l'hippocampe. Ces expériences sont rapportées dans l'article Rovira, Arbez et Mariani « A β (25–35) and A β (1–40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons » BBRC, 2002.

Je me suis également intéressé aux effets de l'application aiguë d'A β sur la transmission synaptique excitatrice de la synapse fibre parallèle/cellule de Purkinje du cervelet. Ce travail reflète les dysfonctionnements synaptiques induits par les formes longues de l'A β . Les résultats de cette étude sont rapportés dans l'article Arbez *et al* « β -amyloid (1-42) induces a postsynaptic reduction in the parallel fiber AMPA responses of Purkinje cells: involvement of pro-inflammatory processes. » soumis à J Neurosci Res.

Les résultats de cette première partie sont le reflet des événements les plus précoces de la maladie : ils reflètent des anomalies de fonctionnement des neurones n'entraînant pas la mort des cellules.

Dans une deuxième partie, à l'aide de techniques de biologie cellulaire et biochimiques, je me suis intéressé aux modifications intervenant dans le cytosquelette de microtubule lors de l'apoptose neuronale induite par le peptide A β . Cette partie vise à caractériser les modifications subies par les dimères de tubuline ainsi que les acteurs moléculaires mis en jeu dans ces processus. Les résultats de cette étude sont rapportés dans l'article Arbez *et al* « β -amyloid induces a cytoplasmic specific aggregation of class III β -tubulin *ex vivo*. » en préparation.

Les résultats de cette deuxième partie peuvent être considérés comme le reflet des événements tardifs de la maladie intervenant après la formation des plaques séniles quand les concentrations de peptides amyloïdes sont élevées dans le cerveau.

Introduction

Chapitre I :

La Maladie d'Alzheimer

De la pathologie aux protéines

Chapitre I : La Maladie d'Alzheimer

De la pathologie aux protéines

I La Maladie d'Alzheimer

1) Généralités

Les nombreux succès du siècle dernier dans le traitement des principales maladies fatales du jeune âge ont entraîné un allongement de la durée de vie non négligeable. De nombreux individus vivent maintenant bien au delà des soixante ans, âge à partir duquel les maladies neurodégénératives, en particulier la maladie d'Alzheimer, deviennent très prévalentes.

La maladie d'Alzheimer a été décrite pour la première fois en 1907 par Aloïs Alzheimer (Alzheimer, 1907 ; voir Alzheimer *et al.*, 1995 pour la traduction anglaise). Les symptômes cliniques de cette maladie comprennent des pertes de mémoire, en particulier des événements récents dans les phases précoces de la maladie, et des détériorations d'autres fonctions cognitives qui interfèrent avec l'humeur, le raisonnement, le jugement et le langage. Au stade final, les tâches les plus simples, comme le maintien d'une hygiène personnelle, ne sont plus possibles et le patient devient totalement dépendant. Le déroulement de la maladie est insidieux et les patients peuvent vivre jusqu'à 20 ans après le premier diagnostic bien que la moyenne de survie se situe entre 5 et 10 ans (Walsh *et al.*, 1990).

Cette pathologie est la maladie neurologique liée à l'âge la plus commune et représente la plus grande cause de démence dans la population âgée. Ainsi, aujourd'hui, de 15 à 20 millions de personnes souffrent de la maladie d'Alzheimer et en 2050 ce nombre devrait dépasser les 100 millions. Rien qu'aux Etats-Unis, les estimations prévoient plus de 13 millions de malades en 2050 au lieu des 4,5 millions actuels (Hebert *et al.*, 2003).

En France, l'étude PAQUID (Personnes Agées QUID) a pour objectif d'étudier le vieillissement cérébral après 65 ans, d'en distinguer les modalités normales et pathologiques, et d'identifier les sujets à hauts risques de détérioration physique ou intellectuelle chez lesquels une action préventive serait possible. Elle étudie une cohorte située en Gironde et en Dordogne depuis 1988. Les résultats montrent une prévalence de 17,8% de la démence chez les sujets âgés dont 80% de maladie d'Alzheimer (Ramaroson *et al.*, 2003). La prévalence

passer de 5% à 65 ans à plus de 20% après 85 ans (Anaes, 2001). L'incidence de la maladie est de l'ordre de 11,7 pour 1000 personnes/an chez les plus de 65 ans et augmente de façon exponentielle avec l'âge.

Cependant, les retards diagnostiques des cas de démences et la difficulté de diagnostic différentiel pour la maladie d'Alzheimer rendent peu aisée l'obtention de données chiffrées précises pour cette pathologie (Boustani *et al.*, 2003). A l'heure actuelle, son diagnostic repose uniquement sur l'observation de signes cliniques ; il n'existe pas de tests biochimiques ou biologiques de dépistage de la maladie (Delacourte *et al.*, 1998 ; Blennow et Hampel, 2003). Les premiers signes cliniques sont souvent ignorés ce qui retarde le diagnostic. La phase symptomatique de la maladie est précédée d'une longue phase de latence intermédiaire appelée MCIa (pour *amnestic Mild Cognitive Impairment*), de progression lente et insidieuse. L'état de MCI est un état « pré-sénile » distinct de la maladie d'Alzheimer mais dont l'évolution est majoritairement la maladie d'Alzheimer quand le MCI est d'une forme amnésique (Riley *et al.*, 2002).

Pour établir le diagnostic, il existe des tests cognitifs de référence comme le MMSE (Mini Mental State Examination). Les critères de démences caractérisant la maladie d'Alzheimer utilisés comme outils diagnostiques en clinique sont les critères du *Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders* (DSM-IV ; American Psychiatric association, 1994) et les critères du *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Strokes-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (McKhann *et al.*, 1984).

La plupart des maladies d'Alzheimer sont sporadiques avec une déclaration des symptômes à partir de 65 ans. Néanmoins, une petite proportion de cas (1%) montre une hérédité mendélienne et représente les formes familiales de la maladie d'Alzheimer (Dewachter et Van Leuven, 2002). Ces maladies sont dues à des mutations dans trois gènes : le précurseur des protéines amyloïdes (APP ou Amyloid Precursor Protein), et les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2) (Chartier-Harlin *et al.*, 1991 ; Goate *et al.*, 1991 ; Sherrington *et al.*, 1995), et sont caractérisées par un développement précoce des symptômes (avant 65 ans et voire vers 30-35 ans dans les cas les plus extrêmes).

2) Histopathologie

Au niveau macroscopique, à l'examen post-mortem, le cerveau des patients est atrophique et présente une hypertrophie ventriculaire. Un examen plus détaillé montre une

dégénérescence généralisée des neurones du cortex cérébral et de l'hippocampe. Les neurones cholinergiques sont les neurones les plus vulnérables. Les neurones sérotoninergiques et noradrénergiques afférents au cortex sont atteints de façon variable. Des altérations dans la transmission glutamatergique ont été également décrites (Cacabelos *et al.*, 1999). La neuropathologie des différentes formes de maladie d'Alzheimer - sporadiques et familiales - est très semblable et ces maladies sont caractérisées par deux types d'agrégats protéiques: les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires. Il est néanmoins possible d'observer certaines différences dans le profil des atteintes cérébrales. Ainsi, dans les formes familiales de la maladie, il est observé des atteintes cérébelleuses importantes aboutissant à une ataxie (Lemere *et al.*, 1996b ; Fukutani *et al.*, 1997 ; Mann *et al.*, 2001).

Du point de vue histopathologique, la maladie d'Alzheimer est donc caractérisée par deux principaux marqueurs : les plaques séniles qui sont des agrégats extracellulaires toxiques de peptides amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires qui sont des agrégats intracellulaires formés de paires de filaments en hélice dus à des agrégations de protéine Tau anormalement hyperphosphorylée.

a) *Les plaques séniles*

On distingue deux types de dépôts amyloïdes au sein du cerveau : les plaques diffuses et les plaques séniles proprement dites.

Les plaques amyloïdes sont des dépôts extracellulaires compacts et sphériques constitués principalement d'une petite protéine de 4 kDa appelée peptide amyloïde (A β) (Glennner et Wong, 1984).

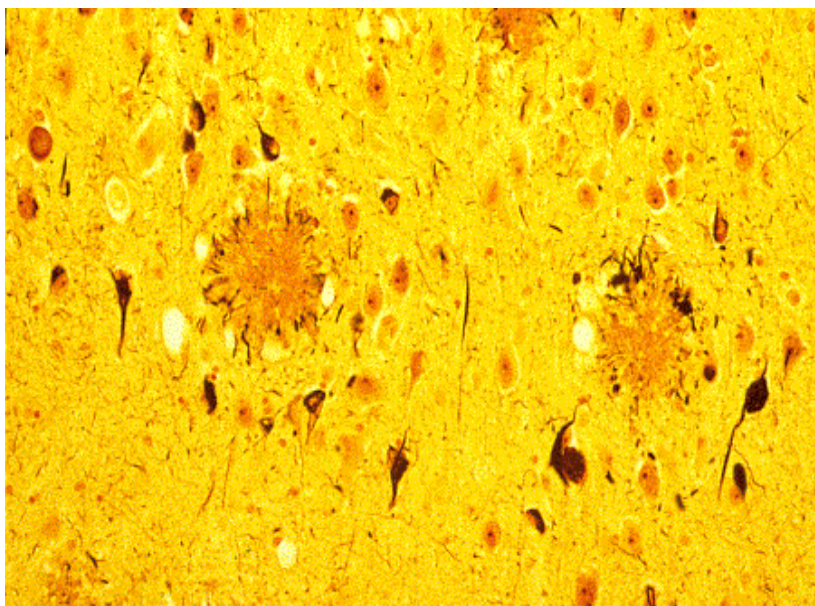


Figure 1 : Section de l'amygdale d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer illustrant les deux lésions histopathologiques de la maladie. Le marquage à l'argent de Bielschowsky montre deux plaques séniles. Ce sont des dépôts sphériques et compacts d'amyloïde entourés d'un halo de neurites dystrophiques qui contiennent des dégénérescences neurofibrillaires (d'après Selkoe, 1998).

Les plaques diffuses sont très largement composées de la forme longue du peptide amyloïde : l'A β (1-42) – composé de 42 acides aminés - et ne sont pas toxiques. Ces plaques sont retrouvées dans différentes structures du système nerveux central aussi bien chez les malades que chez les personnes saines. Elles représenteraient néanmoins les formes « préamyloïdes » qui donnent naissance aux plaques séniles (Iwatsubo *et al.*, 1995 ; Iwatsubo *et al.*, 1994).

Les plaques séniles quant à elles sont composées d'un mélange de peptide A β (1-40) et de peptide A β (1-42) agrégés sous forme de feuilletts plissés β . Elles sont toxiques pour les cellules qui les entourent et sont souvent accompagnées d'une gliose et d'une astrocytose réactionnelles. Elles sont spécifiques de cette pathologie et apparaissent selon une topographie particulière dans le cerveau au cours de son évolution. Ainsi, ces lésions extracellulaires, caractérisées par une réaction positive au rouge Congo, sont principalement retrouvées dans les régions limbiques comme l'hippocampe et l'amygdale (Figure 1) ainsi que dans d'autres régions corticales et sous-corticales spécifiques.

Il n'y a pas de corrélation directe entre la présence de plaques séniles dans des régions précises et les troubles cognitifs associés. Au contraire, les déficits mnésiques sont plus corrélés à l'importance des pertes synaptiques dans le cerveau des patients qu'à celle des dépôts amyloïdes. Les corrélations entre les quantités d'A β fibrillaires mesurées en post-mortem et les signes cliniques de démences sont faibles (Terry, 2000) alors qu'il y a de fortes corrélations entre les pertes synaptiques et les signes cliniques. Il est vraisemblable que les neurones atteints fonctionnent de façon anormale pendant une phase plus ou moins longue avant leur disparition ce qui entraîne, et de façon précoce, des anomalies du fonctionnement collectif de certains réseaux de neurones qui sous-tendent les déficits cognitifs.

b) *Les dégénérescences neurofibrillaires*

De nombreux neurones dans les régions touchées par la maladie d'Alzheimer présentent des amas de fibres anormales qui occupent la quasi-totalité du cytoplasme périnucléaire. Ces dégénérescences neurofibrillaires (DNF) sont constituées de fibres de paires de filaments en hélice (PFH). Ces amas ont été caractérisés comme étant constitués de la protéine Tau sous une forme hyperphosphorylée. Les DNF sont retrouvées dans d'autres maladies neurodégénératives que la maladie d'Alzheimer comme la maladie de Pick (Dickson,

1998) ou la FTDP-17 (Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17) (Spillantini et Goedert, 1998).

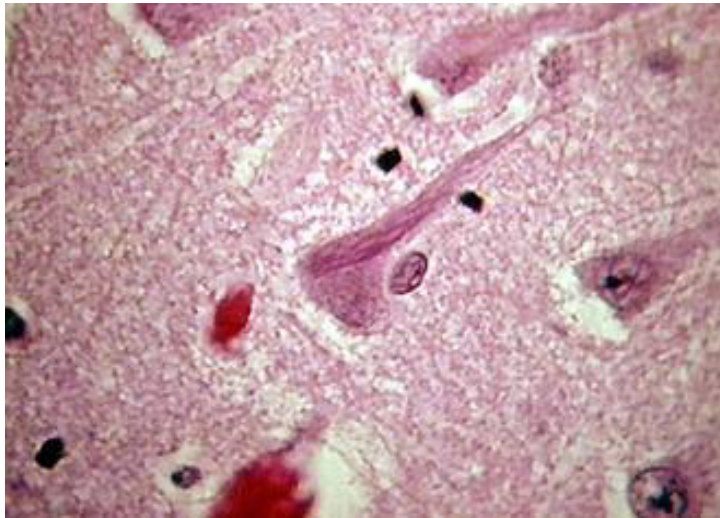


Figure 2 :

Dégénérescences neurofibrillaires

Les protéines tau hyperphosphorylées forment des paires de filaments hélicoïdaux.

(d'après Karolinska Institute Library)

3) Les facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer

L'âge est le premier facteur de risque de la maladie d'Alzheimer sporadique mais il existe d'autres facteurs qui en augmentent les risques, les deux principaux étant les antécédents familiaux de maladie et la présence de l'allèle E4 du gène de l'apolipoprotéine E (Selkoe, 2003).

En effet, en dehors des formes familiales qui résultent d'une transmission mendélienne de mutations bien particulières de gènes précis, les antécédents familiaux sont un des facteurs de risque : les risques de développer une maladie d'Alzheimer augmentent quand il y a des cas avérés de maladie dans la famille.

L'apolipoprotéine E est une des protéines présentes sur les vésicules lipidiques du sang et est impliquée dans le métabolisme des lipides. Les apolipoprotéines permettent de faire le lien entre les vésicules lipidiques et les cellules. La composition en apolipoprotéines des vésicules lipidiques définit leur type et leurs fonctions. L'apoE est retrouvée dans différentes classes de lipoprotéines et en particulier sur les lipoprotéines de très faible densité, les VLDL, où l'Apo E a été décrite en premier (Shore et Shore, 1973). Dans la population générale, il existe 3 allèles différents de l'apoE : E2, E3 et E4. La répartition des allèles dans la population n'est pas homogène et la grande majorité est E3/E3. Des études ont montré que la présence de l'allèle E4 – même à l'état hétérozygote - augmente les risques de maladie d'Alzheimer alors que la présence de l'allèle E2 les réduit (Corder *et al.*, 1993).

4) Les traitements

Actuellement, il n'existe que peu de traitements de la maladie d'Alzheimer et tous n'ont que des effets limités. Cinq molécules principales sont utilisées : quatre sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et la cinquième est un antagoniste des récepteurs NMDA.

a) *Les inhibiteurs de l'AChE*

Au cours du développement de la démence, le dysfonctionnement synaptique est un élément clé (Dekosky et Scheff, 1990 ; Terry *et al.*, 1991) et des études ont montré que le système cholinergique est particulièrement atteint dans la maladie d'Alzheimer (Coyle *et al.*, 1983). Le nombre de neurones cholinergiques est corrélé aux performances mnésiques chez les patients (Baskin *et al.*, 1999).

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase bloquent l'enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine en choline et acétate. Ces inhibiteurs entraînent une dégradation plus lente de l'acétylcholine dans la fente synaptique et donc une action prolongée du neurotransmetteur sur l'élément post-synaptique. Cela a pour rôle de pallier la baisse de l'apport synaptique d'acétylcholine dû à une défaillance modérée du neurone présynaptique. Ces traitements ne peuvent être efficaces que s'il y a encore synthèse et libération d'acétylcholine et finissent donc par se révéler inefficaces lorsque la dégénérescence parvient à un stade avancé (Ellis, 2005).

Il existe quatre AChEI utilisés en thérapeutique : la tacrine, un inhibiteur réversible non compétitif des cholinestérases ; le donézépil, un inhibiteur réversible non compétitif spécifique de l'AChE à longue demie-vie ; la rivastigmine qui permet la dégradation de l'AChE et la galantamine qui en plus de son activité d'inhibition de l'AChE a des propriétés agonistes des récepteurs nicotiniques.

b) *Un antagoniste des récepteurs NMDA*

Parallèlement aux AChEI, un autre type de molécule est utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer pour ses propriétés d'antagoniste des récepteurs NMDA : la mémantine. Cet antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA va pouvoir bloquer ces récepteurs lors de libérations faibles mais continues de glutamate comme il en existe lors de la mort

chronique de neurones. Le fonctionnement synaptique déclenchant l'activation des récepteurs n'est pas altéré car le glutamate à forte dose est capable de déplacer la mémantine. Ce médicament est le seul traitement pour les phases avancées et sévères de la maladie.

L'impossibilité de diagnostic précoce et l'absence de traitement véritablement efficace de la maladie renforcent la nécessité de l'étude des événements précoces de la maladie et des bases moléculaires de ces altérations.

II Les acteurs moléculaires

Les études génétiques des formes familiales de la maladie d'Alzheimer ont permis de mettre en évidence différents acteurs moléculaires de la maladie. En effet, les trois principaux gènes mutés dans ces formes de maladie - l'APP, la préséniline 1 et la préséniline 2 - jouent un rôle dans le métabolisme de l'APP et la production du peptide amyloïde, principal composant des plaques séniles.

1) L'APP

a) La structure de l'APP

L'APP est la protéine précurseur des peptides amyloïdes (« Amyloid Precursor Protein »). C'est une protéine ubiquitaire à un domaine transmembranaire codée par un gène porté par le chromosome 21 (Kang *et al.*, 1987) (Figure 3).

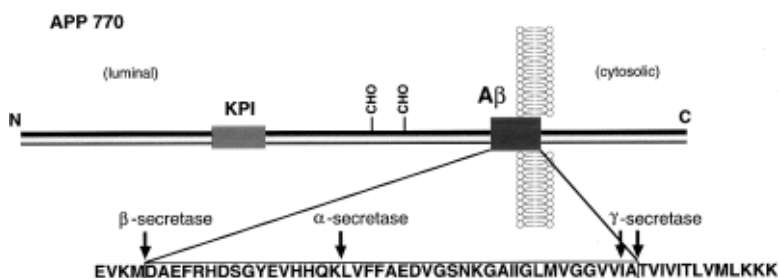


Figure 3 : Représentation schématique de la structure de l'APP. La séquence détaillée représente la séquence du peptide Aβ et ses régions flanquantes. (d'après Morishima-Kawashima et Ihara, 2002)

Cette localisation explique pourquoi les patients atteints de trisomie 21 sont très souvent touchés par la maladie d'Alzheimer ou par une démence vasculaire (due à des dépôts amyloïdes dans la paroi des vaisseaux) ; en effet, il y a un effet de dosage génique dû à la

présence d'une copie supplémentaire du gène de l'APP. Des mutations de l'APP sont responsables de formes familiales de la maladie d'Alzheimer : mutations « Dutch », « Flemish », « Arctic » (Figure 4)... Ces mutations humaines de l'APP ont été reproduites chez la souris et de nombreuses souches de souris transgéniques exprimant l'APP humaine normale ou l'APP porteuse d'une mutation sont maintenant disponibles.

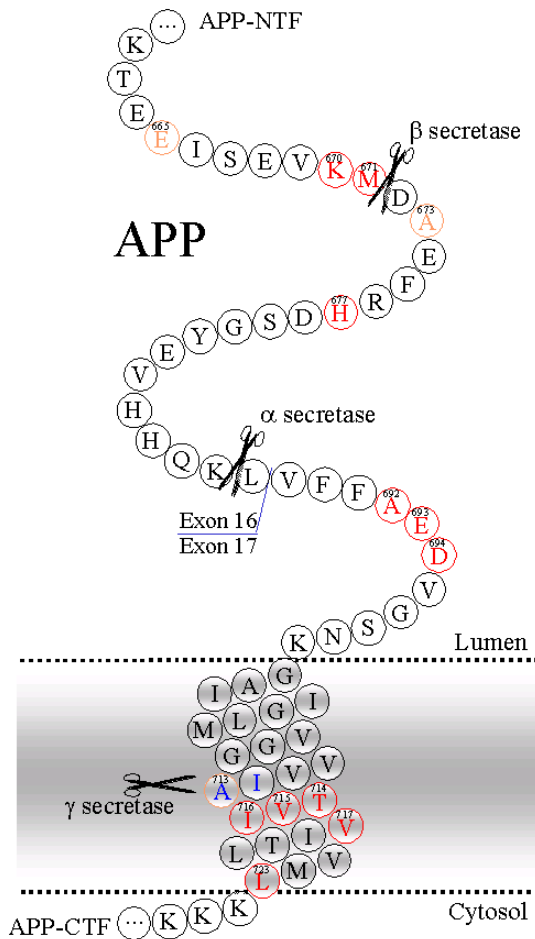


Figure 4 : Sites des principales mutations de l'APP. Il est à noter que la plupart des mutations sont retrouvées proches des sites d'action des sécrétases. (d'après le site <http://mayoresearch.mayo.edu>)

Le clonage de l'APP (Kang *et al.*, 1987) a été rendu possible par la purification et le séquençage de l'A β issus de dépôts amyloïdes de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou du syndrome de Down (trisomie 21). L'APP est exprimée de façon ubiquitaire et présente une grande hétérogénéité qui a pour origine des épissages alternatifs et des modifications post-traductionnelles (additions de sucres, de phosphates et de sulfates) d'un gène unique. En plus des variants d'épissage à 751 et 770 acides aminés exprimés par les cellules non-neuronales, les neurones expriment abondamment une isoforme de 695 acides aminés. La différence entre ces formes longues et courtes est un exon codant pour une région de 56 acides aminés homologue à un motif d'inhibiteur de sérine-protéase de type Kunitz (KPI)

(voir Figure 3), suggérant un rôle des formes longues de l'APP. En effet, les formes de l'APP contenant la séquence KPI servent notamment d'inhibiteur du facteur XIa, une sérine protéase de la coagulation (Smith *et al.*, 1990).

La séquence de l'APP est très conservée au cours de l'évolution chez les mammifères et des homologues (ne possédant pas toutefois la séquence de l'A β) ont été trouvés chez la drosophile et *C elegans*. Néanmoins, la délétion du gène chez la souris n'entraîne ni mortalité précoce ni morbidité bien qu'une gliose cérébrale et des changements locomoteurs se produisent au cours de la vie adulte (Zheng *et al.*, 1995a). Ce manque de conséquences vitales lié à la délétion de l'APP pourrait provenir du fait que les mammifères possèdent deux autres gènes codant pour des protéines homologues de l'APP (sans toutefois contenir la séquence du peptide A β), les APLP (Wasco *et al.*, 1992 ; Slunt *et al.*, 1994).

L'APP est détectée sur la membrane de certaines synapses ainsi que sur des membranes intracellulaires. Son rôle physiologique peu clair, n'est pas encore totalement établi et son expression ubiquitaire pose la question de la restriction des dépôts amyloïdes au niveau du cerveau et au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins.

b) *La maturation de l'APP*

L'APP est une protéine membranaire que l'on retrouve notamment au niveau des synapses. Elle est transportée le long de la voie de sécrétion du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi puis à la membrane plasmique. L'APP présente des distributions membranaires variables selon les régions du cerveau. Dans l'hippocampe, l'APP est retrouvé de façon spécifique sur les membranes présynaptiques « en miroir de la PS1 » qui se situe sur les membranes post-synaptiques. Dans le cervelet, en revanche, l'APP est localisé soit sur les membranes présynaptiques soit sur les membranes post-synaptiques, mais, là encore, toujours en miroir de la PS1 (Ribaut-Barassin *et al.*, 2000). La coexistence de ces deux types d'organisation au sein des synapses n'a pas de signification physiologique connue mais donne des indications sur une éventuelle fonction dans la maintenance structurale des synapses. La demie vie de l'APP est relativement courte (Weidemann *et al.*, 1989), la protéine étant rapidement clivée ou internalisée vers les endosomes. L'APP peut subir des clivages enzymatiques qui diffèrent selon le compartiment intracellulaire.

En effet, il existe deux grandes voies de clivages de l'APP : une voie, dite non-amyloïdogénique, qui ne produit pas de peptide amyloïde et une voie dite amyloïdogénique qui est à l'origine de la formation de peptides amyloïdes (Selkoe, 1994).

La voie non amyloïdogénique (Figure 5) débute par l'action de l' α -sécrétase qui clive l'APP au sein de la séquence de l'A β . Le clivage s'effectue entre la lysine16 et la leucine17 et génère deux fragments : le fragment N-terminal sAPP α et le fragment C-terminal C83. Comme aucun de ces fragments ne contient la séquence entière de l'A β , il ne peut plus y avoir production de peptides amyloïdes.

Le fragment sAPP α est, comme son nom l'indique, le fragment soluble sécrété de l'APP issu du clivage par l' α -sécrétase. Les fonctions de ce fragment ne sont pas très bien connues aujourd'hui mais il semblerait posséder des propriétés neurotrophiques (Araki *et al.*, 1991 ; Mattson *et al.*, 1993 ; Ohsawa *et al.*, 1995 ; Caille *et al.*, 2004). Il a été démontré que le sAPP α améliore la survie des neurones *in vitro* et protège de l'excitotoxicité.

Le fragment C83 est un fragment membranaire qui peut subir un clivage par la γ -sécrétase et donner ainsi deux nouveaux fragments, dont le fragment P3 qui contient les acides aminés 17 à 39/43 de l'A β . La fonction de ce petit fragment sécrété n'est pas bien connue (Nunan et Small, 2000).

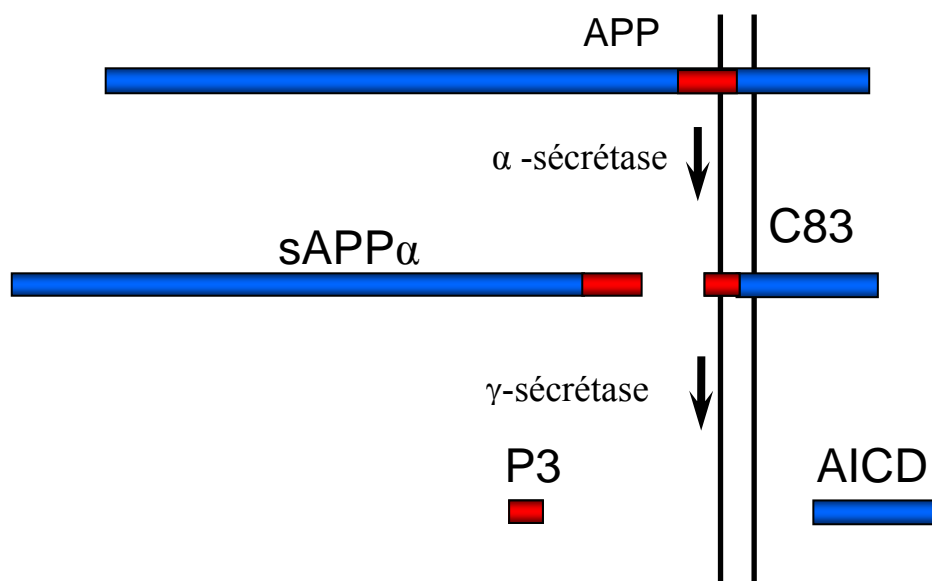


Figure 5 : La voie non-amyloïdogénique. L'action de l' α -sécrétase sur l'APP produit les fragments sAPP α et C83. L'action de la γ -sécrétase sur le fragment C93 produit le peptide P3 et un fragment C-terminal.

La voie amyloïdogénique (Figure 6) est caractérisée par l'action séquentielle de deux autres sécrétases qui clivent l'APP pour libérer le peptide amyloïde. Ces deux sécrétases sont la β -sécrétase et la γ -sécrétase. La première enzyme à agir est la β -sécrétase qui coupe l'APP

au niveau de l'Asp1 et produit ainsi du sAPP β , un autre fragment soluble de l'APP plus court que le sAPP α et un fragment appelé C99 (ou CT99) qui reste transmembranaire et contient toute la séquence de l'A β intacte.

Le fragment C99 peut alors subir le clivage par la γ -sécrétase qui va libérer le peptide amyloïde et un fragment C-terminal. Dans la maladie d'Alzheimer, il y a une surproduction de peptide amyloïde et un dérèglement de la balance entre les voies non-amyloïdogéniques et les voies amyloïdogéniques. C'est donc cette voie amyloïdogénique et en particulier l'activité de la γ -sécrétase qui fait une des cibles privilégiées des recherches thérapeutiques actuelles.

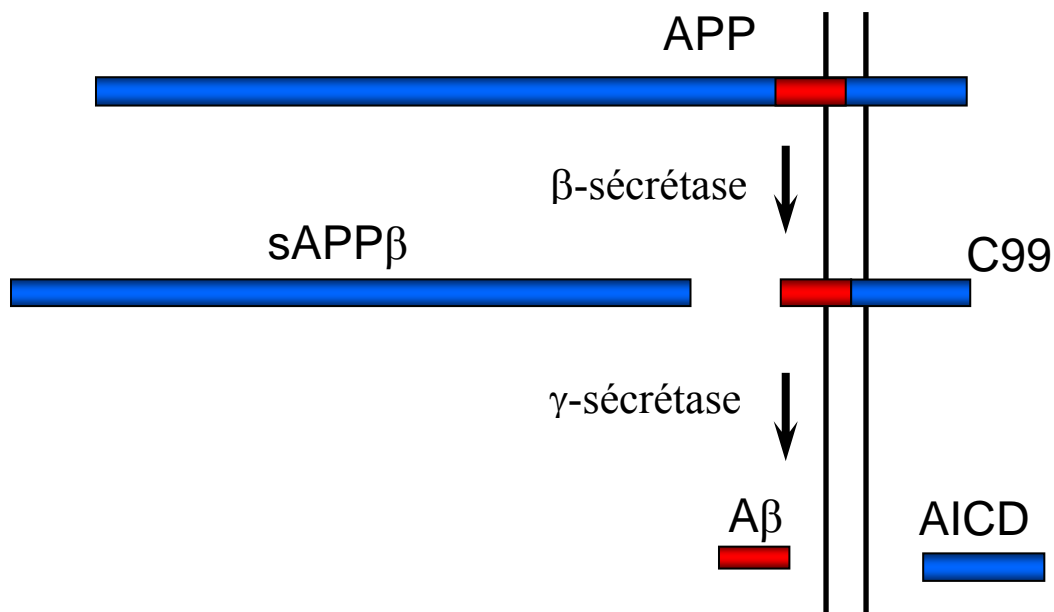


Figure 6 : La voie amyloïdogénique. L'action de la β -sécrétase sur l'APP produit les fragments sAPP β et C99. L'action de la γ -sécrétase sur le fragment C99 produit l'A β et un fragment C-terminal.

2) Les sécrétases

Il existe donc trois enzymes, ou trois complexes enzymatiques, clefs dans le métabolisme de l'APP. L'identification des différentes sécrétases et de leur mode d'action est une étape importante dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer mais également dans la compréhension dans la physiologie de l'APP et des peptides dérivés de l'APP.

a) L' α -sécrétase

Les premières études sur le clivage de l'APP ont montré que l' α -sécrétase clive l'APP dans l'espace extracellulaire à environ 12 acides aminés de la membrane et que le clivage est plus spécifique de la structure secondaire de l'APP que de sa structure primaire (Sisodia, 1992). D'autres études ont montré que cette activité α -sécrétase est due à une métalloendopeptidase transmembranaire et est inhibée par les inhibiteurs de protéases chélateurs d'ions (Roberts *et al.*, 1994). L'utilisation d'inhibiteurs de protéases plus spécifiquement chélateurs de zinc, comme le batimastat ou la marimastat, bloque la sécrétion de sAPP α (Parvathy *et al.*, 1998, 1999) et démontre que l' α -sécrétase est une protéase à zinc.

A ce jour, différentes enzymes ont été identifiées comme possédant l'activité α -sécrétase ; ce sont toutes de protéines de la famille ADAM (pour *A Disintegrin and A Metalloprotease*). Ce sont des protéines transmembranaires possédant un domaine de type « disintegrin » responsable de l'interaction de l'enzyme avec la matrice extra-cellulaire et qui sont impliquées dans le clivage et le relargage de protéines membranaires

Les trois ADAM qui sont porteuses de l'activité α -sécrétase sont : ADAM 17, ADAM 10 et ADAM 9. ADAM 17, ou TACE (pour TNF α converting enzyme) a été découverte comme étant l'enzyme qui active le TNF α par clivage de son prodomaine (Black *et al.*, 1997 ; Moss *et al.*, 1997a ; Moss *et al.*, 1997b). Des expériences ultérieures ont montré son implication dans la sécrétion constitutive et régulée du fragment sAPP α de l'APP (Buxbaum *et al.*, 1998 ; Merlos-Suarez *et al.*, 1998). Ces travaux ont montré également que l'activité de l' α -sécrétase d'ADAM 17 est inductible par les esters de phorbol, des activateurs de la PKC (Buxbaum *et al.*, 1998). Le site de clivage de TACE sur l'APP se trouve entre la lysine 16 et la leucine 17 du peptide A β (Buxbaum *et al.*, 1998).

ADAM 10 a également été montré comme étant impliquée dans la sécrétion du fragment sAPP α . En effet la transfection par ADAM 10 de cellules HEK augmente la sécrétion de sAPP α et la transfection d'un dominant-négatif inhibe cette sécrétion. De plus, ADAM 10 peut cliver des peptides synthétiques chimères au niveau du site de clivage de l' α -sécrétase (Lammich *et al.*, 1999).

L'implication d'ADAM 9 a également été démontrée (Koike *et al.*, 1999) mais son rôle exact reste à déterminer car elle semble couper l'APP entre l'histidine 14 et la glutamine 15, plutôt qu'au site régulier de clivage par l' α -sécrétase (Roghani *et al.*, 1999).

Toutes ces molécules sont localisées à la surface cellulaire et dans les compartiments intracellulaires (Moss *et al.*, 2001), mais ne sont présentes sous forme active - c'est-à-dire

après clivage du prodomaine - que dans le trans-Golgi, dans la membrane plasmique et dans les membranes périmoléaires (Black *et al.*, 1997 ; Lammich *et al.*, 1999). Ces localisations correspondent bien à celles auxquelles le clivage de l'APP par l' α -sécrétase a été décrit, à savoir la surface cellulaire (Sisodia, 1992 ; Parvathy *et al.*, 1999) ou le trans-Golgi (De Strooper *et al.*, 1993 ; Tomita *et al.*, 1998).

b) La β -sécrétase

Le clivage par la β -sécrétase est la première étape de synthèse de l'A β . En 1999, Vassar et ses collaborateurs purifient BACE1 (pour Beta-site APP-Cleaving Enzyme), une aspartate protéase de type 1 que l'on retrouve sur les membranes post-Golgi et sur la membrane plasmique et qui présente les caractéristiques de la β -sécrétase (Vassar *et al.*, 1999). Très vite, d'autres groupes confirmeront par différentes approches que BACE 1 est bien l'enzyme responsable de l'activité β -sécrétase (Hussain *et al.*, 1999 ; Sinha *et al.*, 1999 ; Yan, R. *et al.*, 1999 ; Lin *et al.*, 2000).

L'expression de la BACE 1 dans différents types cellulaires augmente la production de produits de clivage de la β -sécrétase et l'utilisation de séquences anti-sens diminue fortement la production de tels produits. BACE 1 clive l'APP en deux sites distincts :

- 1) au niveau de l'aspartate 1, qui est la coupure normale donnant les peptides amyloïdes « classiques » A β (1-X).
- 2) mais également au niveau du glutamate 11 donnant des peptides amyloïdes plus courts que l'on retrouve également dans les plaques séniles (Naslund *et al.*, 1994).

Par des recherches d'homologies de séquence, une autre BACE a été découverte. Cette BACE 2 est également capable de cliver l'APP (Acquati *et al.*, 2000). Elle est capable de cliver l'APP en position 1 de la séquence de l'A β comme BACE 1 mais peut également, et beaucoup plus efficacement, cliver l'APP sur la phénylalanine 19 ou sur la phénylalanine 20 (Farzan *et al.*, 2000). Ces sites de clivages alternatifs laissent penser que BACE 2 n'est pas la β -sécrétase usuelle et serait impliquée dans la maladie d'Alzheimer dans le cas de mutation « Flemish » de l'APP qui touche l'alanine 21 de l'A β (Farzan *et al.*, 2000). Ceci expliquerait l'absence de détection de peptide A β chez les souris KO pour le gène de BACE 1 (Cai *et al.*, 2001; John *et al.*, 2003).

BACE 1 est détectée sous sa forme active dans les vésicules golgiennes et les endosomes (Vassar *et al.*, 1999 ; Huse *et al.*, 2002), ce qui coïncide avec la localisation de l'activité β -sécrétase (Howlett *et al.*, 2000 ; Vassar, 2002).

c) La γ -sécrétase

Les premières protéines décrites comme ayant une activité γ -sécrétase sont les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2). Ce sont deux des protéines responsables des formes familiales de la maladie d'Alzheimer quand elles sont mutées - l'APP étant la troisième. Les présénilines sont des protéines à 8 domaines transmembranaires, exprimées de façon ubiquitaire et codées par des gènes situés sur les chromosomes 14 et 1 chez l'Homme (Nunan et Small, 2000) (Figure 7).

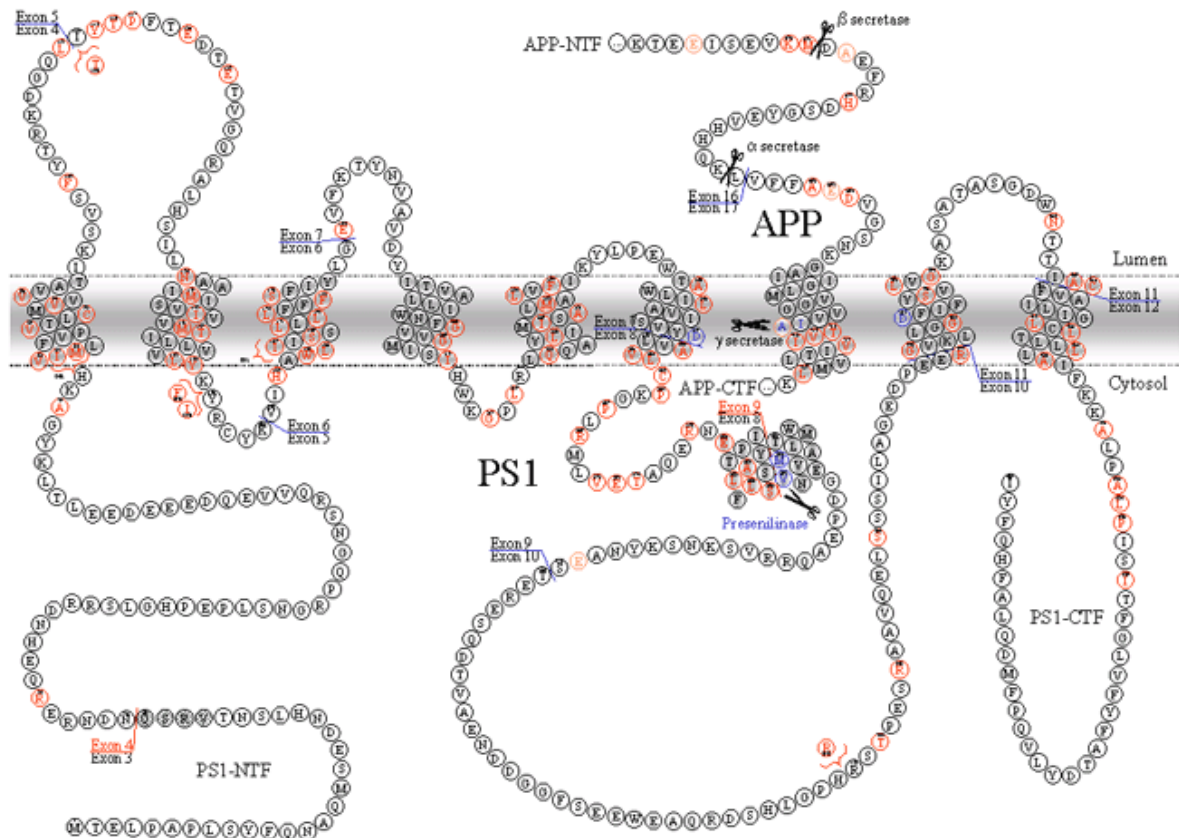


Figure 7 : Représentation schématique de la Préséniline 1 avec les principaux sites de mutations représentés en rouge. L'APP est représentée à son site supposé d'interaction avec la PS1. (d'après le site <http://mayoresearch.mayo.edu>)

La PS1 est particulièrement exprimée dans l'hippocampe et le cervelet. Au niveau cellulaire, la PS1 est présente essentiellement au niveau du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, des synapses (Ribaut-Barassin *et al.*, 2000) et faiblement au niveau de la membrane plasmique (Kovacs *et al.*, 1996). La PS1 est synthétisée sous forme immature et subit une endoprotéolyse qui génère un fragment N-terminal (NTF) et un fragment C-terminal (CTF). Des expériences *in vivo* ont montré que l'activité de la γ -sécrétase est très diminuée chez les souris KO pour la PS1 (De Strooper *et al.*, 1998 ; Wolfe *et al.*, 1999) ainsi que chez les souris KO pour la PS2 (Steiner *et al.*, 1999). Les souris doublement KO à la fois pour la

PS1 et pour la PS2 ont semblé ne pas présenter d'activité γ -sécrétase du tout (Herreman *et al.*, 2000), laissant ainsi penser que les présénilines étaient la γ -sécrétase. Cependant, des travaux sur des fibroblastes issus de souris doublement KO PS1/PS2 ont montré qu'il reste une très légère activité de la γ -sécrétase et qu'il y a production d'A β . Ces travaux ont permis d'arriver à la conclusion que si les présénilines sont bien responsables d'une partie de l'activité γ -sécrétase, il existe d'autres protéines associées qui portent également une activité γ -sécrétase (Armogida *et al.*, 2001). Si les deux présénilines portent une activité γ -sécrétase, la contribution de chacune à la production d'A β n'est cependant pas égale. En effet, il a été montré récemment par des expériences de complémentation sur des embryons déficients en PS1 et PS2, que ces deux protéines produisent des phénotypes différents et que la PS2 est peu responsable de la production d'A β (Mastrangelo *et al.*, 2005).

Depuis, les recherches ont montré que l'activité γ -sécrétase est supportée par un complexe protéique de haut poids moléculaire capable de cliver de nombreux substrats dont l'APP (Fraering *et al.*, 2004b) et d'autres protéines transmembranaires de type I comme la protéine Notch (Baulac *et al.*, 2003 ; De Strooper, 2003).

La PS1 serait la composante essentielle du complexe. En effet, l'identification de deux aspartates D257 et D385 essentiels conservés dans les domaines 6 et 7 lui confère une activité aspartyl protéase (Wolfe *et al.*, 1999). Les deux fragments de la PS1 s'associent à trois autres protéines pour former le complexe γ -sécrétase mature: la nicastrine, Aph-1 (Anterior Pharynx Defective) et Pen-2 (Presénilin Enhancer) (Fraering *et al.*, 2004a ; Takasugi *et al.*, 2003).

La nicastrine est une protéine transmembranaire qui est capable de lier à la fois la PS1 et l'APP (Yu *et al.*, 2000, Esler *et al.*, 2002). Elle aurait pour rôle de stabiliser les présénilines et ainsi favoriser le clivage de l'APP (Edbauer *et al.*, 2002). Il a été récemment montré que la nicastrine pourrait jouer un rôle de reconnaissance du substrat (Shah *et al.*, 2005).

Aph-1 et Pen-2 ont été identifiées plus récemment et auraient également pour rôle la stabilisation du complexe pour favoriser le clivage de l'APP (Francis *et al.*, 2002 ; Goutte *et al.*, 2002).

III La cascade amyloïde

Parmi toutes les hypothèses expliquant la maladie d'Alzheimer, l'hypothèse la plus communément acceptée est celle de la cascade amyloïde. Cette hypothèse amyloïde de la maladie d'Alzheimer considère le peptide A β comme l'initiateur d'une cascade pathologique

menant aux plaques amyloïdes, à la formation des dégénérescences neurofibrillaires, au dysfonctionnement neuronal, à des processus inflammatoires et finalement à la démence (Hardy, 1997 ; Selkoe, 1999).

Cette hypothèse est largement confirmée par les données expérimentales et l'étude des formes familiales de la maladie. Des études sur des fibroblastes de patients atteints de telles formes (Scheuner *et al.*, 1996) ont montré une augmentation de la production de la forme toxique agrégable A β (1-42) par rapport à la forme courte A β (1-40). D'autres mutations augmentent la production de tous les peptides amyloïdes ou changent les patrons d'expression des peptides (Ancolio *et al.*, 1999, Kumar-Singh *et al.*, 2000). Ces observations s'ajoutent à des arguments plus indirects (voir pour revue Selkoe, 1999) et montrent le rôle central joué par le peptide amyloïde dans la maladie. De plus, les mutations de la protéine Tau, retrouvées dans les dégénérescences neurofibrillaires qui constituent le deuxième marqueur histopathologique de la maladie d'Alzheimer, sont à l'origine de nombreuses maladies neurodégénératives mais jamais à l'origine de maladie d'Alzheimer, ce qui confirme l'importance de l'A β .

Depuis sa formulation, l'hypothèse de la cascade amyloïde a évolué. Par exemple, les effets toxiques des peptides amyloïdes qui étaient au départ attribués aux fibrilles insolubles des plaques séniles sont à présent plutôt attribués à des formes solubles oligomériques.

Il est important de noter que l'hypothèse de la cascade amyloïde reste encore controversée et qu'il existe de nombreuses autres hypothèses physiopathologiques qui cherchent à expliquer la maladie d'Alzheimer. Parmi toutes les autres théories qui ont été proposées, on peut citer notamment la théorie de la réentrée des neurones dans le cycle cellulaire. Cette théorie propose que la formation des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires soit due à la reprise du cycle cellulaire dans les neurones. Cette théorie semble pouvoir expliquer toutes les facettes de la maladie (pour revue voir Nagy, 2005). Cependant, cette théorie n'explique pas les phénomènes déclencheurs de telles réentrée dans le cycle cellulaire et n'explique pas non plus les formes familiales de la maladie d'Alzheimer.

Une autre théorie qui présente un intérêt particulier est la théorie du groupe de Goldstein selon laquelle la maladie d'Alzheimer est due à un défaut dans le transport axonal conduisant à un changement du métabolisme de l'APP et à l'accumulation de peptide amyloïde (Gunawardena et Goldstein, 2001 ; Stokin et al., 2005). Cette théorie repose principalement sur les formes familiales explique plus difficilement les formes sporadiques.

Chapitre II :

Les peptides amyloïdes

Chapitre II : Les peptides amyloïdes

I L'hétérogénéité des peptides amyloïdes

Les effets toxiques des peptides amyloïdes ont été très clairement montrés *in vitro* ainsi que les effets à long terme quand ils sont injectés directement dans le cerveau *in vivo* (Mckee *et al.*, 1998). Cependant, l'A β apparaît sous de nombreuses formes et états d'association et il est pratiquement impossible de quantifier ces diverses formes *in vivo*. De plus, l'A β est formé dans le métabolisme normal (Haass *et al.*, 1992), ce qui suggère un rôle dans la physiologie cellulaire (Kamenetz *et al.*, 2003). Il faut aussi prendre en compte le fait que l'A β peut avoir des effets différents selon sa localisation extracellulaire ou intracellulaire.

1) Les différents peptides amyloïdes

Les actions séquentielles de la β -sécrétase puis de la γ -sécrétase sur l'APP aboutissent à la formation du peptide amyloïde. Non seulement le peptide A β est sécrété constitutivement par les cellules en culture mais il est détecté dans le liquide céphalo-rachidien de tous les mammifères (Haass *et al.*, 1992 ; Shoji *et al.*, 1992 ; Seubert *et al.*, 1992) L'amyloïdogénèse est donc un phénomène physiologique, cependant la fonction de cette production de peptide n'est pas bien connue. Les peptides A β présents dans le LCR, le milieu de culture, et les plaques séniles des patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent à la fois une hétérogénéité C-terminale et une hétérogénéité N-terminale.

Il existe deux formes principales du peptide amyloïde : la forme courte A β (1-40) qui possède des capacités d'agrégation lentes et la forme longue A β (1-42) qui s'agrège rapidement et produit les principaux effets toxiques.

Le ratio de ces deux formes est très largement en faveur de la forme courte dans les conditions physiologiques et on observe un changement de ce ratio dans la maladie, en particulier dans les formes familiales.

L'hétérogénéité en N-terminal des peptides amyloïdes est représentée par des séries de peptides A β (x-40) et A β (x-42) dérivés des deux formes majoritaires. En effet, les peptides A β peuvent avoir comme point de départ non seulement l'aspartate 1 mais aussi, par exemple, les résidus glutamate 3, arginine 5 ou glutamate 11. Ces espèces peuvent provenir de

modifications de l'extrémité N-terminale après une coupure initiale en Asp1 par la β -sécrétase, mais aussi d'une endoprotéolyse directe de ces résidus par des protéases. La signification de cette hétérogénéité N-terminale dans la pathogénie et la formation des plaques n'est pas claire puisqu'elle ne semble pas provoquer de changements dans la toxicité ou le mode d'action des peptides.

En revanche, l'hétérogénéité de l'extrémité C-terminal des peptides amyloïdes - c'est-à-dire 40 vs 42 acides aminés - est responsable des effets toxiques des peptides. Cette différence de deux acides aminés est très importante pour la pathogénicité et la formation des plaques séniles. Par des techniques immunocytochimiques, utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques des extrémités finissant par la valine 40 ou par l'alanine 42, il a été montré que les premiers peptides à se déposer dans les tissus de patients atteints de maladie d'Alzheimer ou du syndrome de Down se terminent en 42. En d'autres termes, les plaques diffuses qui sont les premiers symptômes de dépôt d'A β dans le cerveau sont presque exclusivement composées d'A β terminant en 42 (Iwatsubo *et al.*, 1995; Lemere *et al.*, 1996a). Les études de la progression temporelle des dépôts amyloïdes chez les trisomiques 21 montrent que des plaques d'A β (1-42) peuvent apparaître dès l'âge de 12 ans, alors que les premiers dépôts d'A β (1-40) ne sont détectés dans les plaques que deux décennies plus tard (Lemere *et al.*, 1996a). Ces études cadrent bien avec les études biochimiques qui montrent que l'A β (1-42), avec ses deux résidus hydrophobes (isoleucine et alanine), s'agrège en fibrilles plus vite que l'A β (1-40) (Jarrett *et al.*, 1993 ; Snyder *et al.*, 1994).

2) Les états d'agrégation des peptides amyloïdes

Si les effets des peptides amyloïdes sont différents selon leur longueur, ils le sont également selon leur état d'agrégation. En effet, l'A β existe sous différentes formes allant du monomère et des petits oligomères solubles à des formes fibrillaires insolubles.

Les formes solubles sont des monomères, dimères, trimères et de plus grands oligomères (Walsh *et al.*, 2000) ; une agrégation prolongée produit les formes insolubles : protofibrilles puis des fibrilles proprement dites qui vont former les corps des plaques amyloïdes au sein du cerveau (Walsh *et al.*, 1999). On distingue également un troisième état intermédiaire d'agrégation : les ADDL (pour A β -Derived-Diffusible-Ligands) qui possèdent des structures globulaires particulières (Oda *et al.*, 1994).

a) L'A β soluble

Différentes études ont montré que des dimères d'A β sont produits intracellulairement et sécrétés (Walsh *et al.*, 2000 ; Podlisny *et al.*, 1995). Ces dimères sont très stables et résistants à de fortes dénaturations par le SDS ou l'urée. Pourquoi les cellules qui expriment de hauts niveaux d'APP libèrent-elles de telles formes d'A β qui sont déjà sur des voies de l'agrégation ? Le niveau basal d'A β n'est peut être normalement pas suffisant pour permettre une telle agrégation ou peut être que l'A β joue un rôle physiologique sous une forme faiblement agrégée plutôt que d'être un simple produit de dégradation toxique (Campbell, 2001).

Le terme d'A β soluble s'applique à ces espèces qui restent en solution après une centrifugation à haute vitesse d'extraits de cerveaux. La plupart des études mesurant les taux d'A β soluble dans le cerveau ont employé l'ELISA qui ne peut pas distinguer l'état d'agrégation des espèces détectées. McLean et coll (McLean *et al.*, 1999) ont utilisé le western-blot et ont mis en évidence la forme monomérique de 4 kDa ainsi que les oligomères SDS-insensibles de 8 et 12 kDa. Ces dimères et trimères issus de cerveaux de patients sont semblables aux oligomères stables trouvés dans le lysat ou le milieu conditionné de différentes variétés de cellules en culture (Podlisny *et al.*, 1995 ; Walsh *et al.*, 2000). Ces oligomères migrent sur des gels dénaturants comme dimères, trimères et parfois tétramères. L'implication de ces espèces dans la pathologie est confirmée par le fait que la formation d'oligomères est augmentée par l'expression de formes mutées de l'APP ou des présénilines (Xia *et al.*, 1997b). Des oligomères solubles ont été impliqués dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (El-Agnaf et Irvine, 2000, Conway *et al.*, 2000) ou la maladie de Huntington (Scherzinger *et al.*, 1997), laissant penser que les espèces formées précocement dans les processus d'agrégation pourraient être un médiateur commun des symptômes précoces de ces maladies.

Chez les souris APP transgéniques, on observe des pertes synaptiques qui sont corrélées à une élévation de l'A β soluble (Mucke *et al.*, 2000). De façon intéressante, une comparaison des cerveaux de patients qui présentent une profusion de plaques amyloïdes et de protéine Tau hyperphosphorylée, mais pas de démences, avec ceux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer montre qu'il existe une corrélation entre l'état de démence et un niveau élevé d'A β soluble (Lue *et al.*, 1999).

b) *Les ADDL*

Des études avec des peptides A β synthétiques ont montré que les formes fibrillaires apparentées à celles présentes dans les plaques sont neurotoxiques *in vitro* (Pike *et al.*, 1991 ; Lorenzo et Yankner, 1994 ; Iversen *et al.*, 1995). Ces études soutiennent l'idée que les fibrilles amyloïdes sont responsables des dysfonctionnements et pertes neuronales observées dans la maladie. Néanmoins, la corrélation entre plaque amyloïdes et symptômes de démence est faible (Pike *et al.*, 1994). Les pertes synaptiques sont plus corrélées avec les taux d'A β solubles, plutôt qu'avec les taux d'A β insolubles (Lue *et al.*, 1999).

Le groupe de Finch en 1994 propose l'hypothèse des ADDL : l'A β forme des oligomères globulaires solubles qui sont responsables des déficits mnésiques précoces des maladies d'Alzheimer et des pertes neuronales et synaptiques.

Finch et ses collaborateurs ont observé qu'une protéine gliale, l'ApoJ ou clusterine, bloque la formation d'agrégats d'A β sans bloquer sa toxicité. Ces préparations de peptide associé à de l'ApoJ contiennent essentiellement la forme globulaire de l'A β . Les cellules sont très sensibles et sont tuées par des ADDLs à une concentration de l'ordre de 50 nM (Lambert *et al.*, 1998). Cette toxicité des ADDL semble spécifique de certaines régions du cerveau ; en effet *in vivo* les ADDL entraînent la mort des neurones de l'hippocampe mais pas des neurones du cervelet. Cette spécificité marque une différence notoire avec l'A β fibrillaire qui semble toxique pour tous les types cellulaires.

Les ADDL sont des oligomères d'un nombre variable de molécules d'A β allant de 3 à 24. *In vitro*, les ADDL peuvent être obtenus sans adjonction d'ApoJ. Les ADDL qui se forment à partir d'A β (1-40) sont instables et seuls ceux formés à partir d'A β (1-42) sont stables. Les ADDL pourraient être considérés comme les précurseurs des protofibrilles. Les tétramères sont cependant remplacés par des polymères de 12 à 24 monomères. L'A β à 4°C et à basse concentration forme des ADDL en quelques minutes.

c) *Les protofibrilles et les fibrilles*

Des expériences *in vitro* ont montré que l'agrégation en fibrilles est dépendante à la fois du temps et de la concentration de peptide (pour revue voir Harper et Lansbury, 1997). Ces caractéristiques sont en accord avec les facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer : l'âge et l'augmentation de l'A β (1-42) fibrillogène dans les formes familiales de la maladie

(Younkin, 1995). La dépendance au temps serait due à une phase de latence durant laquelle il n'y a pas d'agrégation détectable et après laquelle l'agrégation est très rapide. Cette phase de latence peut être supprimée en incubant les monomères d'A β avec de l'A β pré-agrégé (Jarrett *et al.*, 1993).

Des similarités entre l'agrégation de l'A β et la conversion de la protéine prion en son conformère pathogénique ont été suggérés précédemment (Forloni, 1996) impliquant que les bases de ces deux altérations pathologiques sont les mêmes : un passage d'une conformation en hélices- α à une conformation en feuillets β .

Les protofibrilles (PF) ont essentiellement été étudiées par le laboratoire de Denis Selkoe (Hartley *et al.*, 1999) avec l'A β (1-40). Sur des cultures primaires de neurones corticaux, ils ont montré que les espèces de faible poids moléculaire (LMW) et les protofibrilles induisent une mort cellulaire équivalente aux fibrilles. En électrophysiologie (patch clamp sur les cultures), on observe une augmentation des EPCS avec les fibrilles et PF (3 μ M) que l'on n'observe pas avec des LMW. Il y a également une augmentation des dépolarisations membranaires et des potentiels d'action.

Il est intéressant de noter que la mutation « Artic » de l'APP (Nilsberth *et al.*, 2001), qui intervient dans la région de l'A β proche du site de clivage de l' α -sécrétase (E293G) s'accompagne d'une augmentation de la formation de PF. Cette mutation, comme la mutation « italian » ou la « dutch », s'accompagne contrairement aux autres mutations de l'APP et de la préséniline d'une baisse de sécrétion de l'A β .

Il est également important de se rappeler que l'A β est généré intracellulairement et que les neurones accumulent préférentiellement l'A β (1-42) à l'A β (1-40) (Gouras *et al.*, 2000). De même, l'exposition de cellules à l'A β (1-42) provoque l'accumulation intracellulaire d'A β (x-42). Sur des macrophages, cette internalisation de l'A β se fait par un transporteur couplé à une protéine G (FPRL1) et conduit à la formation intracellulaire d'agrégats fibrillaires. On peut donc se demander si la baisse de sécrétion d'A β ne s'accompagne pas d'une accumulation intracellulaire d'A β . De même les PF joueraient un rôle dans les formes précoces de maladies de Parkinson en plus d'un rôle dans les maladies à corps de Lewy et d'Alzheimer car les formes mutées de l' α -synucléine provoquent la formation de PF (Conway *et al.*, 1998).

II Les récepteurs à l'A β

L'identification de récepteurs capables de lier l'A β a fait l'objet de nombreuses études. En effet, il était important de connaître le ou les récepteurs responsables de la transmission du message pathologique ou physiologique du peptide A β .

Il n'existe pas à l'heure actuelle de récepteur spécifique du peptide amyloïde identifié. Néanmoins, en cherchant les protéines qui peuvent lier l'A β , plusieurs partenaires ont été découverts.

Un de ces partenaires est l'apoE, qui peut lier différents fragments de l'APP (Barger et Harmon, 1997; Ohm *et al.*, 1999). Il n'est pas certain que cette liaison ait seulement pour but de supprimer l'A β du milieu extracellulaire ou qu'il y ait de plus un rôle physiologique de l'internalisation qui suit la liaison. Néanmoins, l'A β entre en compétition avec les lipides pour la liaison à l'ApoE, laissant penser que l'A β pourrait altérer l'homéostasie du cholestérol (Ohm *et al.*, 1999).

Les récepteurs qui lient l'A β ayant fait l'objet du plus d'attention en raison des conséquences attendues d'un tel type de liaison sont les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR). En effet, l'A β (1-42) se lie aux récepteurs nicotiques notamment les récepteurs contenant la sous-unité $\alpha 7$ et les récepteurs $\alpha 4/\beta 2$ (Wang *et al.*, 2000a ; Wang *et al.*, 2000b) avec une affinité de l'ordre du picomolaire et de bloque leur conductance. Sur des membranes isolées, l'A β (1-42) montre une plus forte affinité pour les récepteurs $\alpha 7$ -nAChR (Wang *et al.*, 2000a) mais des études fonctionnelles ont montré qu'*in vivo* l'effet du peptide est plus grand sur les récepteurs ne contenant pas l' $\alpha 7$ (Pettit *et al.*, 2001).

Parmi les autres récepteurs pouvant lier l'A β on trouve :

- les récepteurs scavengers de classe A (SR-A, El Khoury *et al.*, 1996), de classe B1 (SR-B1, Husemann *et al.*, 2001) et le CD36, un autre récepteur SR-B (Coraci *et al.*, 2002).

- le récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycosylation Endproducts) qui est exprimé sur les neurones de l'hippocampe et sur la microglie (Yan *et al.*, 1996).

- le SEC-R (serpin-enzyme complex receptor) qui semble internaliser et dégrader l'A β (25-35) et l'A β (1-40) plutôt que jouer un rôle dans des mécanismes de transduction du signal (Boland *et al.*, 1996). Les formes insolubles agrégées de l'A β ne se lient pas au SEC-R et donc suggèrent un rôle du récepteur dans la suppression de l'A β soluble du cytosol.

- le FRP (Formyl peptide chemotactic receptor ; Lorton *et al.*, 2000) qui est un récepteur de molécules chémotactiques.

- les protéoglycans à héparanes sulfates (Scharnagl *et al.*, 1999).

- l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Matter *et al.*, 1998) qui a un effet anti-apoptotique.

III L'A β et les canaux ioniques

1) Les canaux calciques

L'application d'A β (1-42) sur des cultures de neurones corticaux humains ou sur des cellules de neuroblastome SH-SY-5Y provoque une augmentation de la phosphorylation et de l'ouverture des canaux calciques de type L. Ce processus implique les MAP kinases. Ainsi l'augmentation de phosphorylation et de l'influx de calcium sont réduits en présence de PD98059, un inhibiteur de la voie ERK (Ekinici *et al.*, 1999). L'augmentation de l'influx calcique semble spécifique des canaux de type L car l'utilisation de nimodipine réduit la toxicité due au calcium, induite par l'A β , ainsi que la formation de radicaux libres sur des neurones hippocampiques en culture alors que les antagonistes des canaux N et des canaux P/Q n'ont pas d'effet (Ueda *et al.*, 1997). L'augmentation de l'influx calcique pourrait avoir pour conséquence l'augmentation d'une ou plusieurs formes de plasticité synaptique qui sont dépendantes du calcium. Cependant, une trop grande augmentation de calcium peut diminuer les phénomènes de plasticité puisque les canaux calciques et les récepteurs NMDA sont sujets à une inhibition par le calcium lui-même.

Il a été montré que l'incubation avec de l'A β (1-40) augmente l'activité des canaux calciques de type N des grains du cervelet (Price *et al.*, 1998) et des canaux de type N et P mais pas de type L dans les neurones corticaux (Macmanus *et al.*, 2000). Cependant,

l'incubation de cellules de neuroblastome avec de l'A β (1-40) agrégé ou de l'A β (25-35) induit la phosphorylation des canaux de type L (Ekinici *et al.*, 1999). L'effet des peptides amyloïdes sur les canaux de types L semble donc dépendant de l'état d'agrégation et du type cellulaire.

2) Les canaux cationiques non sélectifs

Parmi les mécanismes d'action de l'A β a été proposé la formation de canaux ioniques perméables au calcium par le peptide lui-même. En effet, Arispe et ses collaborateurs (Arispe *et al.*, 1993a ; Arispe *et al.*, 1993b) ont démontré que les oligomères d'A β , dans des bicouches lipidiques planes, ne précipitent pas en amyloïde mais produisent des canaux ioniques. Ces canaux sont non-sélectifs voltage-sensibles, et conduisent le calcium, le potassium et le sodium. Ces canaux peuvent être bloqués par l'aluminium et sont sensibles au Tris. (Pollard *et al.*, 1993 ; Arispe *et al.*, 1996).

3) Les canaux potassiques

Les études électrophysiologiques réalisées sur les effets de l'A β sur les courants potassiques s'accordent pour montrer que des applications aiguës provoquent un blocage des conductances potassiques. Il a été montré que les conductances potassiques de 113 pS de fibroblastes de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer étaient réduites (Etcheberrigaray *et al.*, 1994). Ces canaux potassiques étaient également bloqués par de faibles concentrations d'A β (10nM). Sur des neurones hippocampiques, l'A β bloque des courants potassiques qui s'inactivent rapidement (I_A - I_D) (Good *et al.*, 1996b). Au niveau des neurones corticaux, les protofibrilles d'A β qui dépolarisent les neurones induisent un blocage de I_A et I_D . Au niveau des neurones cholinergiques de la bande diagonale de Broca, Jhamandas et al (Jhamandas *et al.*, 2001) ont observé un blocage des conductances potassiques de type I_C , I_K et I_A sans variation de courants calciques et sodiques. Le blocage de ces conductances potassiques a pour conséquences de dépolariser la membrane et de faciliter la genèse des potentiels calciques et l'excitotoxicité. En revanche, des traitements à plus long terme par l'A β qui induisent l'apoptose des neurones provoquent une augmentation des courants potassiques (Pannaccione *et al.*, 2005 ; Yu *et al.*, 1998).

IV L'A β et la physiologie synaptique

1) A β et transmission synaptique

L'A β n'a que peu d'effets sur le potentiel de membrane des neurones du cervelet (Hartell et Suh, 2000), ni sur ceux de l'hippocampe (Dutar *et al.*, 1994), il a cependant été observé que l'application d'A β (25-35) sur des neurones du septum latéral dépolarise les neurones et augmente les réponses des récepteurs AMPA et NMDA (Carette *et al.*, 1993). Il n'est pas clair que cet effet soit dû à une augmentation de la libération de transmetteurs excitateurs. Cet effet dépolarisant est observé également sur les neurones corticaux (Gu *et al.*, 2003) et il peut dépendre de l'état d'agrégation du peptide (Hartley *et al.*, 1999). Il est possible que certaines structures soient plus sensibles que d'autres aux effets toxiques de l'A β : ainsi qu'un courant entrant irréversible non-spécifique du à une exposition à de l'A β a été observé dans des neurones corticaux en culture (Furukawa *et al.*, 1994).

Les fragments solubles de l'A β en applications aiguës ne semblent pas exercer d'effet sur la transmission synaptique glutamatergique médiée par les récepteurs AMPA dans l'hippocampe aussi bien dans le champ CA1 que dans le gyrus denté (Cullen *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 2000) tant par des techniques *in vivo* que sur des tranches. L'administration aiguë d'A β n'a pas d'effets sur la PPF (paired-pulse facilitation) qui est un paramètre qui reflète la probabilité de libération présynaptique de neurotransmetteur (Wang *et al.*, 2002a) ni sur les courants évoqués par le glutamate, qui sont une mesure du fonctionnement des récepteurs post-synaptiques.

En revanche, au niveau de l'hippocampe une infusion intracérébroventriculaire d'A β à des concentrations de l'ordre du nanomolaire peut provoquer un lent déclin des EPSCs qui n'apparaît qu'après 48 heures (Holscher, 1998 ; Cullen *et al.*, 1996). L'application d'A β sur de longues périodes ou l'utilisation de formes agrégées entraîne des changements dans la transmission synaptique, ces effets semblant être le résultat des dommages neurotoxiques des neurones (Dutar *et al.*, 1994 ; Cullen *et al.*, 1996 ; Stephan *et al.*, 2001). La souris KO conditionnelle pour la préséniline 1, avec des niveaux très diminués d'A β dans le cortex, ne présente pas de variations dans la transmission synaptique de base ou dans la PPF dans l'hippocampe (Yu *et al.*, 2001 ; Feng *et al.*, 2001). Cependant une action physiologique

dépressive des EPSCs a pu être mise en évidence par le laboratoire de Malinow (Kamenetz *et al.*, 2003). Sur des cultures organotypiques d'hippocampe transfectées avec de l'APP porteur de la mutation « swedish » ou de l'APP sauvage, ils ont mis en évidence une sécrétion d'A β dépendante de l'activité électrique des neurones. Cette sécrétion exerce une dépression tonique des EPSC dépendante des récepteurs NMDA.

Au niveau du cervelet une application d'A β (1-42) à 1 μ M induit une diminution des EPSCs des cellules de Purkinje évoqués par stimulation des fibres parallèles. Cette baisse des EPSCs intervient sans variation de la PPF (paired pulse facilitation) (Hartell et Suh, 2000). Dans cette étude, Hartell et Suh n'ont pas observé d'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire dans les cellules de Purkinje contrairement à ce qui avait été observé précédemment dans les neurones des ganglions dorsaux (He *et al.*, 2002).

Les effets sur les récepteurs NMDA sont plus controversés. Une étude ancienne a montré qu'une application dans le bain ou intracellulaire de 200 nM d'A β (1-40) sur des tranches de gyrus denté de rat induit une rapide augmentation des courants des récepteurs NMDA (Wu *et al.*, 1995 ; voir aussi Hsia *et al.*, 1999). Des doses plus élevées d'A β (25-35) (1 μ M) amplifient la dépolarisation induite par les récepteurs NMDA dans les neurones du septum latéral de cochon d'inde (Carette *et al.*, 1993). Cependant, de fortes doses d'A β (25-35) inhibent la liaison du glutamate et de la glycine aux membranes de neurones corticaux de rat (Cowburn *et al.*, 1995), et une étude plus récente a montré une légère inhibition réversible des potentiels de champs médiés par les récepteurs NMDA en présence de 200 nM d'A β (1-40) (Raymond *et al.*, 2003). A faibles doses l'A β (1-42) peut inhiber les courants des récepteurs NMDA des cellules du gyrus denté (Chen *et al.*, 2002), contrairement à ce qu'avaient montré Wu et al. (Wu *et al.*, 1995). Une étude récente réalisée sur des neurones néocorticaux par le groupe de Greengard (Snyder *et al.*, 2005) montre que l'A β induit l'endocytose des récepteurs NMDA, un effet qui implique les récepteurs α 7-nicotiniques, la protéine phosphatase 2B et la tyrosine phosphatase STEP.

Au total, ces nombreuses études montrent une action de dépression des peptides A β sur les récepteurs NMDA mais cet effet pourrait dépendre du type cellulaire et ainsi que de la concentration de peptide amyloïde.

Le peptide amyloïde se lie sur les récepteurs nicotinique α 7 avec une affinité de l'ordre du picomolaire (Wang *et al.*, 2000a). En effet, la liaison de l'A β sur les nAChR entraîne une inhibition significative des courants des récepteurs dans les cellules pyramidales de

l'hippocampe (Pettit *et al.*, 2001). L'A β bloque ainsi l'augmentation des mEPSCs induite par la nicotine (Liu *et al.*, 2001). Au niveau des terminaisons synaptiques du cortex et de l'hippocampe, il a été montré que l'A β provoque une augmentation de calcium en se fixant sur les récepteurs nicotiques, provoquant ainsi une occlusion des nAChR (Dougherty *et al.*, 2003). Les effets de l'A β sur les récepteurs nicotiques semblent dépendre de sa localisation, l'A β pouvant se comporter tantôt comme un agoniste tantôt comme un antagoniste. Il est donc possible que l'A β se comporte comme un agoniste inverse.

Les mêmes paradoxes ont été observés pour les effets toxiques de l'interaction A β -récepteur nicotinique. Un effet neuroprotecteur a été observé sur des tranches d'hippocampe dans des conditions où la désensibilisation du récepteur était empêchée. En effet, l'A β active les récepteurs nicotiques et la cascade de signalisation de la MAP kinase ERK, y compris la phosphorylation de CREB (cAMP-dependent response element binding protein) (Dineley *et al.*, 2001), et déclenche ainsi des voies anti-apoptotiques. Par contre, l'A β bloque également l'activation neuroprotectrice de la kinase Janus kinase2 par les nAChR $\alpha 7$.

Il a été récemment montré que la fixation de l'A β sur les récepteurs nicotiques provoque une endocytose des récepteurs NMDA qui pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la plasticité synaptique (Snyder *et al.*, 2005). En revanche, la nicotine - en agoniste des récepteurs - peut exercer une action neuroprotectrice contre les effets délétères de l'A β (Kihara *et al.*, 2001 ; Shimohama et Kihara, 2001 ; Liu et Zhao, 2004).

A plus long terme, les récepteurs nicotiques pourraient jouer un rôle dans l'internalisation de l'A β par les neurones et par cette action participer à la formation de plaques (Nagele *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2002b).

Toutes ces données montrent que l'A β régule la transmission synaptique par des actions sur l'activité présynaptique et par des actions sur l'activité postsynaptique. Du fait de la diversité de la répartition des projections des neurones cholinergiques, les actions de l'A β peuvent donc avoir lieu sur de nombreux circuits corticaux et sous-corticaux.

2) A β et plasticité synaptique

a) LTP et LTD

La potentialisation à long terme ou LTP (pour Long Term Potentiation) est un processus de renforcement synaptique qui correspond à une augmentation d'amplitude de la

réponse post-synaptique à la suite d'une intense activation pré-synaptique. Celle-ci est généralement courte (< 1 seconde) mais de fréquence élevée (100 Hz).

En 1973, Bliss et ses collègues ont montré qu'une stimulation à haute fréquence de la voie perforante entraînait une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique dans le gyrus denté (Bliss et Gardner-Medwin, 1973 ; Bliss et Lomo, 1973). Elle a également été mise en évidence au niveau des connexions entre les collatérales de Schaffer et les épines dendritiques du CA1 (Andersen *et al.*, 1977), ainsi que dans beaucoup d'autres régions du système nerveux (par exemple, dans les ganglions des racines dorsales de la moelle, voir Pockett et Figurov, 1993).

La LTP est considéré comme un des mécanismes participant dans l'hippocampe au stockage d'informations et à l'apprentissage. La LTP peut persister plusieurs jours, voire jusqu'à deux mois lorsqu'elle est induite artificiellement *in vivo* (Douglas et Goddard, 1975) et sa modulation induit une modification correspondante des capacités d'apprentissage. En effet, diverses études montrent qu'une inhibition de la LTP affecte différentes tâches de mémorisation faisant intervenir l'hippocampe chez le rat (Morris *et al.*, 1986 ; Staubli *et al.*, 1989). Augmenter l'expression de la LTP est presque toujours suivi d'une amélioration des performances des souris dans différentes tâches d'apprentissage (Madani *et al.*, 1999, Yang *et al.*, 1999, mais voir aussi Migaud *et al.*, 1998).

Le déclenchement de la LTP dépend d'une entrée post-synaptique de calcium. En effet, des chélateurs du calcium, ou la réduction de sa concentration extracellulaire, empêchent l'induction de la LTP (Lynch *et al.*, 1983). Les récepteurs NMDA sont les principaux récepteurs responsables de l'entrée de calcium provoquant la LTP (Collingridge *et al.*, 1983) mais il existe des structures dans laquelle la LTP, alors dite NMDA-indépendante, est provoquée par le fonctionnement de canaux calciques voltages dépendants (Morgan et Teyler, 1999) ou des récepteurs métabotropiques mGluR1 et mGluR5 (Bashir *et al.*, 1993). L'entrée de calcium déclencherait l'activation de voies de transduction aboutissant à la potentialisation des récepteurs AMPA, par phosphorylation et par l'augmentation du nombre de récepteurs à la membrane.

La LTP comporte deux phases : l'induction et la consolidation. La première phase peut être induite expérimentalement par une unique stimulation à haute fréquence. L'induction de

la seconde phase nécessite pour sa part la succession de plusieurs stimulations à haute fréquence. Contrairement à la phase d'induction, elle requiert la synthèse de nouvelles protéines. Il s'agit par exemple de celles formant les récepteurs et celles qui vont contribuer à la croissance de nouvelles synapses, autre phénomène se déroulant durant la phase de maintien de la LTP.

Il existe un phénomène inverse de la LTP, la dépression à long terme (LTD), qui est une baisse persistante de l'efficacité synaptique (Bear et Abraham, 1996). La LTD, contrairement à la LTP qui est induite par une stimulation électrique à haute fréquence et dépend d'une forte entrée de calcium dans l'épine dendritique à travers le canal NMDA et l'activation de protéine kinases, est induite par une stimulation à basse fréquence, dépend d'une entrée plus faible de calcium (Malenka et Nicoll, 1993) et fait intervenir des phosphatases (Mulkey *et al.*, 1994) ainsi qu'une diminution du nombre de récepteurs AMPA à la surface de l'épine (Carroll *et al.*, 1999).

b) $A\beta$ et LTP

Malgré une étude initiale qui démontrait le contraire, de nombreuses études ont montré que l'administration de peptides amyloïdes solubles, dont l' $A\beta$ (1-40), l' $A\beta$ (1-42) et l' $A\beta$ (25-35), pendant les 20 minutes qui précèdent le protocole d'induction de la LTP - par stimulation à haute fréquence ou HFS - inhibe la LTP dans l'hippocampe, aussi bien dans le champ CA1 que dans le gyrus denté (Cullen *et al.*, 1997 ; Lambert *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 2000 ; Freir *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2002a ; Raymond *et al.*, 2003). Cependant, tous les peptides $A\beta$ n'ont pas la même efficacité sur la LTP. En effet, Cullen et al ont montré *in vivo* que l' $A\beta$ (1-40) inhibe la LTP de façon dose-dépendante avec un seuil d'action d'environ 0,4 nmol alors que l' $A\beta$ (1-42) est quarante fois plus puissant avec un seuil d'environ 0,01 nmol (Cullen *et al.*, 1997).

De plus, l'administration d' $A\beta$ (1-42) après la HFS empêche le développement de la phase tardive de la LTP dépendant de la synthèse de protéines, suggérant que l' $A\beta$ peut affecter à la fois les phases d'induction et de consolidation de la LTP (Chen *et al.*, 2002).

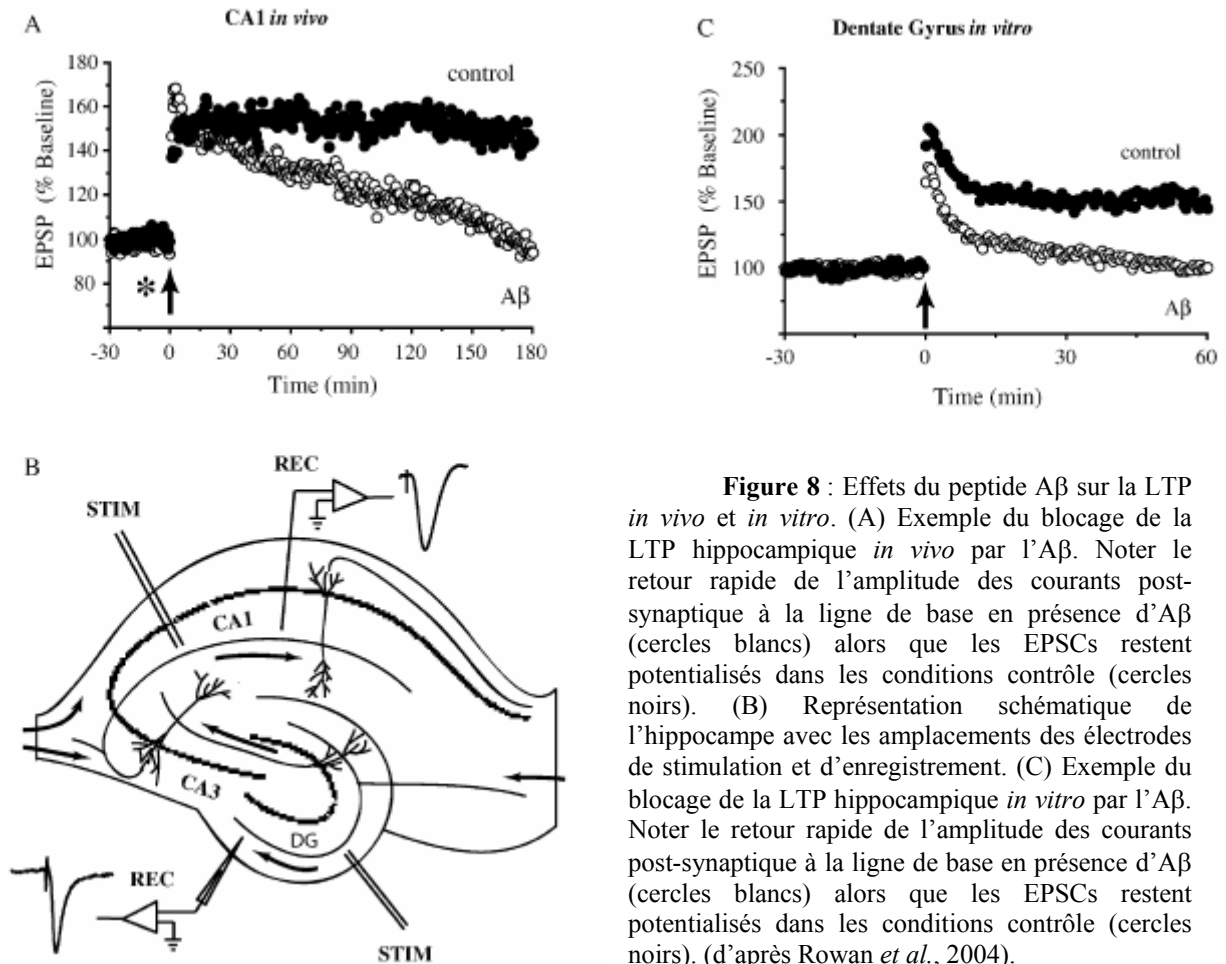


Figure 8 : Effets du peptide A β sur la LTP *in vivo* et *in vitro*. (A) Exemple du blocage de la LTP hippocampique *in vivo* par l'A β . Noter le retour rapide de l'amplitude des courants post-synaptique à la ligne de base en présence d'A β (cercles blancs) alors que les EPSCs restent potentialisés dans les conditions contrôle (cercles noirs). (B) Représentation schématique de l'hippocampe avec les emplacements des électrodes de stimulation et d'enregistrement. (C) Exemple du blocage de la LTP hippocampique *in vitro* par l'A β . Noter le retour rapide de l'amplitude des courants post-synaptique à la ligne de base en présence d'A β (cercles blancs) alors que les EPSCs restent potentialisés dans les conditions contrôle (cercles noirs). (d'après Rowan *et al.*, 2004).

L'inhibition de la LTP peut être aussi observée avec l'utilisation d'oligomères d'A β naturellement sécrétés (Walsh *et al.*, 2002). L'absence d'effet, ou l'effet réduit, sur la LTP des peptides inverses et de l'A β (15-25) (Freir *et al.*, 2001) indique que la séquence active est dans la partie membranaire de l'A β . La région précise à l'origine du phénomène reste encore controversée, une étude ayant montré l'effet du peptide A β (31-35) (Ye et Qiao, 1999) alors qu'une autre ne trouve pas d'effet de l'A β (25-35) (Chen *et al.*, 2000). L'inhibition de la LTP n'est pas due à une agrégation en fibrilles des peptides solubles car quand des solutions de peptides sans fibrilles sont préparées dans des solvants organiques et caractérisées par microscopie à force atomique, le pouvoir d'inhibition est le même que pour des solutions de peptides préparées avec moins de soins (Lambert *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002a). De plus, la substitution de la méthionine 35 par la nor-leucine, prévient l'agrégation mais l'inhibition de la LTP reste complète (Chen *et al.*, 2000). Enfin, l'inhibition de la LTP est dépendante de la formation d'oligomères car les monomères d'A β seuls sont inactifs sur la LTP (Walsh *et al.*, 2002).

Bien que de nombreux travaux sur la toxicité de l'A β se soient focalisés sur les effets des fibrilles amyloïdes insolubles, d'autres travaux ont montré que les agrégats solubles pré-fibrillaires de l'A β peuvent aussi posséder une toxicité *in vitro* sur des neurones en culture (Roher *et al.*, 1996 ; Lambert *et al.*, 1998 ; Walsh *et al.*, 1999 ; Hartley *et al.*, 1999 ; Ward *et al.*, 2000). De plus, la présence de déficits chez les souris transgéniques qui produisent des formes oligomériques d'A β et pas de plaques séniles suggère un rôle pathologique pour les fortes concentrations d'espèces oligomériques. Ainsi, les souris qui expriment le gène humain de l'APP présentent des pertes synaptiques sans avoir de dépôts amyloïdes détectables (Mucke *et al.*, 2000).

La plupart des études de toxicité de l'A β ont utilisé des concentrations supraphysiologiques d'une espèce unique définie d'A β synthétique. Par contre, Walsh et coll (Walsh *et al.*, 2002) ont utilisé du milieu conditionné de cellules exprimant l'APP pour faire des injections *in vivo*. Ce milieu conditionné présente différentes formes de l'A β - dont de l'A β (1-42) - dans des concentrations faibles - et des injections intracérébroventriculaires inhibent la phase tardive de la LTP dans l'hippocampe de rat (Walsh *et al.*, 2002). L'injection de milieu conditionné de cellules sauvages ne provoque pas d'inhibition de la LTP. L'implication des formes oligomériques dans le blocage de la LTP est démontrée par l'immunodépression des milieux conditionnés par des anticorps spécifiques de l'A β . Le traitement des milieux par l'*Insulinodegrading Enzyme* (IDE) - qui dégrade les monomères d'A β mais pas les oligomères - n'abolit pas le blocage de la LTP. L'utilisation d'inhibiteurs de la γ -sécrétase à des doses qui inhibent la formation d'oligomères sans inhiber la production de monomères permet également d'abolir le blocage de la LTP. Enfin des inhibiteurs de l'agrégation de l'A β bloquent son effet inhibiteur sur la LTP (Walsh. *et al.*, 2005) et l'immunothérapie qui neutralise l'A β oligomérique bloque les effets inhibiteurs de l'A β sur la LTP (Klyubin *et al.*, 2005).

Des modèles de souris transgéniques ont été utilisés pour savoir si l'accumulation d'A β inhibe la LTP. Dans ces expériences, l'accumulation d'A β se produit sur une période de temps prolongée, par contraste avec les cinétiques aiguës d'administration d'A β utilisées sur les tranches. Néanmoins, des études montrent que le peptide amyloïde soluble peut affecter la transmission synaptique et la plasticité. Des souris transgéniques APP695SWE âgées qui surexpriment l'APP humain avec la mutation « swedish » (K670N et M671L) montrent une LTP réduite. Cet effet est attribué aux effets directs de l'A β sur les cellules puisque ces souris ne présentent pas ou très peu de plaques séniles aux âges testés et qu'aucune perte cellulaire

n'a été observée (Chapman *et al.*, 1999). Cependant, dans ce modèle, la réduction de la LTP n'est pas observée dans toutes les conditions (Fitzjohn *et al.*, 2001). Dans un autre modèle utilisant des souris PDAPP porteuses de la mutation V717F, la LTP dans la région CA1 d'animaux de 4-5 mois est plus difficilement induite et moins persistante que la LTP des animaux contrôles (Larson *et al.*, 1999 ; Giacchino *et al.*, 2000). Cela est également attribué aux effets du peptide non agrégé puisque, là encore, aucune plaque n'est observée chez les animaux utilisés. Une autre étude utilisant la même mutation de l'APP dans des souris différentes, i.e. des souris PDAPP, montre une perte de terminaisons synaptiques dans l'hippocampe de souris de 2-3 mois avec une transmission basale réduite dans la région CA1 (Hsia *et al.*, 1999). La LTP n'est pas diminuée à ces temps, ce qui peut être relié à une augmentation du ratio de récepteurs NMDA/AMPA dans les conditions basales. Malheureusement, alors que ces études suggèrent des diminutions de la LTP dues au peptide amyloïde, la nature des mutations utilisées rend incertain le fait que ce soit le peptide A β lui-même plutôt que d'autres fragments de l'APP qui soit en jeu. Cependant, l'utilisation d'une double mutation (V717F et la mutation « Swedish »), qui amplifie la production d'A β tout en réduisant le taux moyen d'expression de l'APP, amplifie aussi les déficits de transmission synaptique, suggérant que c'est effectivement l'A β qui joue un rôle régulateur de la transmission synaptique et de la plasticité (Hsia *et al.*, 1999).

Néanmoins, certains modèles sont contradictoires. Les souris transgéniques surexprimant une forme mutée de la PS1 (A246E) pour lesquelles une accumulation de peptide est attendue, ne présentent aucun signe pathologique et montrent, de façon inattendue, une facilitation de la LTP à 4-5 mois (Parent *et al.*, 1999).

c) Mécanismes d'action de l'A β

Les mécanismes par lesquels l'A β inhibe la LTP ne sont pas clairement compris. Une inhibition de la dépolarisation induite par les récepteurs NMDA semble à exclure car l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA, à une dose qui inhibe les récepteurs à un même niveau que l'A β , n'influence pas la LTP (Raymond *et al.*, 2003 ; voir aussi Ye et Qiao, 1999). Il a cependant été clairement montré que seule la LTP NMDA dépendante est inhibée par l'A β (Wang *et al.*, 2004a). Il se pourrait que les mécanismes de transduction associés à la baisse des réponses NMDA et à l'endocytose de ces récepteurs jouent un rôle dans l'inhibition de la LTP par l'A β (Snyder *et al.*, 2005) et la genèse des déficits cognitifs qui lui sont associés (Stéphan *et al.*, 2001).

Les effets de l'A β semblent indépendants de l'inhibition médiée par les récepteurs GABA_A car la LTP reste inhibée par l'A β même en présence de fortes doses de picrotoxine, un antagoniste des récepteurs GABA_A (Raymond *et al.*, 2003).

L'inhibition de la LTP par l'A β semble opérer par l'action conjuguée de plusieurs voies de transduction et de récepteurs. Le stress oxydatif pourrait jouer un rôle important dans la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer, impliquant des radicaux libres et des médiateurs inflammatoires (Akiyama *et al.*, 2000 ; Barnham *et al.*, 2004). La microglie est la source majeure de ces facteurs incluant les cytokines, l'oxyde nitrique, et les radicaux libres qui peuvent altérer l'intégrité cellulaire. De nombreuses microglies entourent les plaques dans le cerveau de patients souffrant d'Alzheimer (Mcgeer et Mcgeer, 2004 ; Mcgeer et Mcgeer, 1995). De façon intéressante, il a été montré que l'IL1 joue un rôle dans le blocage de la LTP par l'A β (Minogue *et al.*, 2003) et la minocycline, un inhibiteur de la glie réactive bloque l'effet inhibiteur de l'A β sur la LTP (Wang *et al.*, 2004a). Ces derniers auteurs montrent que cette réaction gliale s'accompagne d'une stimulation de la NO synthase inductible (iNOS) et de la production de radicaux libres. Ces effets s'accompagnent d'une activation des MAP kinase p38 et JNK (Wang *et al.*, 2004b voir aussi Saleshando et O'connor, 2000). L'équipe d'Anwyl (Wang *et al.*, 2004b) a aussi montré que l'effet de l'A β était bloqué par des antagonistes de la Cdk5, une Ser-Thr kinase qui joue un rôle important dans la phosphorylation des protéines du cycle cellulaire et du cytosquelette. De plus, une implication des récepteurs métabotropiques mGluR5 mais pas des récepteurs à l'acétylcholine a été montrée (Wang *et al.*, 2004b). Il a également été montré que l'A β inhibe directement la PKC (Lee *et al.*, 2004) et ainsi inhibe les réponses des mGluR du groupe I et II (Tyszkiewicz et Yan, 2005).

Un des autres effets de l'A β est d'inhiber l'activité de la PKA et la phosphorylation de CREB (Vitolo *et al.*, 2002). Ces deux protéines sont impliquées dans l'induction d'une LTP persistante et l'élévation de l'AMPc associée à une activation de la PKA protège contre l'inhibition de la LTP par l'A β (Vitolo *et al.*, 2002).

d) A β et LTD

Alors que l'inhibition de la LTP a été décrite de façon répétée, le consensus est moins affirmé sur les effets aigus de l'A β sur la LTD. Deux études n'ont trouvé aucun effet de l'A β

soluble sur la LTD ni dans l'aire CA1 avec de l'A β (1-40) (Raymond *et al.*, 2003) ni dans le gyrus denté par l'A β (1-42) (Wang *et al.*, 2002a). En revanche, Kim et al (Kim *et al.*, 2001) ont rapporté qu'une injection icv d'A β (1-42) facilite l'induction de la LTD dans l'aire CA1 d'animaux anesthésiés. Ils ont également démontré que le fragment CT105 (qui contient la séquence de l'A β) amplifie la LTD et dépotentialise la LTP quand il est injecté 10 minutes après l'induction de la LTP. Cette dépotentialisation de la LTP n'est pas observée si l'injection est réalisée 60 minutes après induction. Le moyen de concilier ces résultats apparemment divergents est de considérer que l'A β et CT105 agissent *in vivo* en régulant des voies modulatrices afférentes à l'hippocampe - comme par exemple l'activité des neurones cholinergiques - qui ne sont plus présentes dans les tranches d'hippocampe.

En résumé, l'A β exogène montre clairement un effet inhibiteur sur l'induction de la LTP et pourrait faciliter la LTD. Cependant, il apparaît que l'A β n'agirait pas directement par l'inhibition des mécanismes inducteurs initiaux comme l'activation des récepteurs NMDA mais plutôt par la régulation de voies de transduction en aval.

Dans les animaux invalidés pour la PS1 de façon spécifique, où les niveaux de peptide amyloïde sont très réduits, la LTP et la LTD ne sont pas altérés (Feng *et al.*, 2001 ; Yu *et al.*, 2001) suggérant que le peptide n'exerce pas de régulation constitutive de la plasticité synaptique, soit parce qu'il n'est pas produit en quantité suffisante soit parce qu'il n'a pas accès aux voies de régulation.

e) Effets sur l'apprentissage et la mémoire

Puisque l'A β soluble exerce un puissant effet d'inhibition de la LTP aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, l'A β devrait aussi avoir des effets inhibiteurs sur la mémoire et l'apprentissage dépendant de l'hippocampe quand il est injecté en intracérébroventriculaire ou directement dans l'hippocampe.

Il n'existe pas beaucoup d'études sur les effets aigus de l'A β soluble sur l'apprentissage, bien que les effets délétères de longues exposition d'A β exogène sur la mémoire sont bien démontrés (Oka *et al.*, 2000 ; Malin *et al.*, 2001 ; Nag et Tang, 2001 ; Stéphan *et al.*, 2001). Cependant, Flood et ses collaborateurs ont apporté la confirmation que l'apport d'A β exogène comme l'A β endogène peut réguler l'apprentissage et la rétention d'une tâche d'évitement actif. Dans la première série d'expériences, de l'A β soluble était injecté en icv peu de temps après un apprentissage d'évitement motivé par des chocs

électriques. La rétention de l'apprentissage était testée une semaine après. Ces expériences permettent de comprendre les effets de l'A β sur la consolidation de la mémoire. Une injection immédiate d'A β est amnésiante alors qu'une injection retardée de 24 heures ne l'est pas (Flood *et al.*, 1991), ce qui est en accord avec les résultats de Kim et al sur les effets du fragment CT105 sur la LTP (Kim *et al.*, 2001). Différents fragments de l'A β sont efficaces et causent une baisse de la rétention de la mémoire de façon dose dépendante : l'A β (12-28), l'A β (18-28) et l'A β (12-20) (Flood *et al.*, 1991) et une injection de peptide dans différentes structures limbiques, dont l'hippocampe, est également amnésiante (Flood *et al.*, 1994a). L'analyse de l'activité des différents fragments suggère que les résidus 17-20 jouent un rôle crucial dans l'effet amnésique (Flood *et al.*, 1994b).

Cette conclusion est en désaccord avec d'autres études montrant que c'est la partie 25-35 du peptide qui joue un rôle clé dans l'inhibition de la LTP et la neurotoxicité et qu'elle suffit pour dégrader l'apprentissage dans le water maze trois jours après injection (Sun et Alkon, 2002).

Plus récemment, une étude a démontré que les oligomères naturels d'A β sécrétés par des cellules exprimant une forme mutée de l'APP injectés en icv provoquent des déficits dans le test ALCR (pour *Alternating Lever Cyclic Ratio*), un test comportemental pouvant mesurer des changements cognitifs transitoires. Ces effets de l'A β sont 4 à 5 fois plus puissants que ceux de la scopolamine et sont spécifiques des oligomères puisque les monomères d'A β ne provoquent pas ces déficits (Cleary *et al.*, 2005).

L'utilisation d'une approche inverse consistant à réduire les niveaux d'A β dans des souris exprimant naturellement de haut taux de peptide a également été utilisée pour comprendre les effets des peptides amyloïdes sur la mémoire. Les souris SAMP8, qui sont des souris dont le vieillissement est accéléré et qui surexpriment l'APP muté, présentent des déficits dans les tâches aversives. Les déficits observés chez ces souris à 12 mois sont levés par une injection icv d'anticorps anti-A β 24 heures avant l'apprentissage (Morley *et al.*, 2000), ou par des injections dans l'hippocampe 1 à 14 jours avant (Morley *et al.*, 2000 ; Morley *et al.*, 2002). De même, l'injection d'oligonucléotides anti-sens de la région centrale de l'A β améliorent les performances des souris SAMP8 (Kumar *et al.*, 2000). Comme les plaques amyloïdes ne sont pas encore présentes à 12 mois dans le cerveau des souris SAMP8, ces résultats suggèrent que l'effet comportemental observé est dû au niveau élevé de peptide soluble (Kumar *et al.*, 2000).

Chapitre III :

L'apoptose dans la maladie d'Alzheimer

Chapitre III : L'apoptose dans la maladie d'Alzheimer

I L'apoptose

1) Définition

En 1972, Kerr emploie pour la première fois le terme « apoptose » d'après le mot grec qui signifie « chute des feuilles d'un arbre », pour décrire un programme intrinsèque à la cellule, impliqué dans le renouvellement normal des hépatocytes (Kerr *et al.*, 1972).

La découverte de la mort cellulaire au cours du développement de l'organisme a fait naître la notion de mort programmée, puisque cette mort est contrôlée dans le temps et l'espace. L'identification, chez *Caenorhabditis elegans* (Ellis, H. M. et Horvitz, 1986) puis chez les mammifères, de gènes nécessaires à la mort de certaines cellules au cours de son développement fut l'une des premières démonstrations de cette hypothèse. La découverte des homologues de ces gènes chez les mammifères a renforcé ensuite l'idée qu'il existe au sein même des cellules un programme génétique menant à la mort, programme conservé au cours de l'évolution. Le terme de mort cellulaire programmée a pris alors un autre sens : il concerne tout type de mort mettant en jeu un programme au sein de la cellule, comme par exemple l'apoptose.

Une grande diversité de mort cellulaire est observée. On distingue trois principaux types de mort cellulaire selon des critères morphologiques (Clarke, 1990) : l'autophagie, caractérisée par la présence de nombreuses vacuoles autophagiques, la mort cytoplasmique ou nécrose, caractérisée notamment par une dilatation du réticulum endoplasmique rugueux, de l'appareil de Golgi, de l'enveloppe nucléaire et un gonflement des mitochondries, et l'apoptose. Il existe également des morphologies mixtes dans certains cas de mort cellulaire.

L'apoptose est une autodestruction de la cellule. Une cellule apoptotique peut être définie par des critères morphologiques (figure 9) tels que la condensation de la chromatine et du cytoplasme, la rupture de la membrane nucléaire et une fragmentation du noyau, le bourgeonnement des membranes et la formation de corps apoptotiques, petites vésicules qui sont ensuite phagocytées et dégradées par les cellules voisines (Wyllie *et al.*, 1980 ; Wyllie *et al.*, 1984). L'intégrité des organelles de la cellule est généralement maintenue jusqu'à la

phagocytose des corps apoptotiques. Le cytosol et les protéines intracellulaires ne sont pas libérés dans l'espace intercellulaire, ce qui permet d'éviter le déclenchement d'un processus inflammatoire.

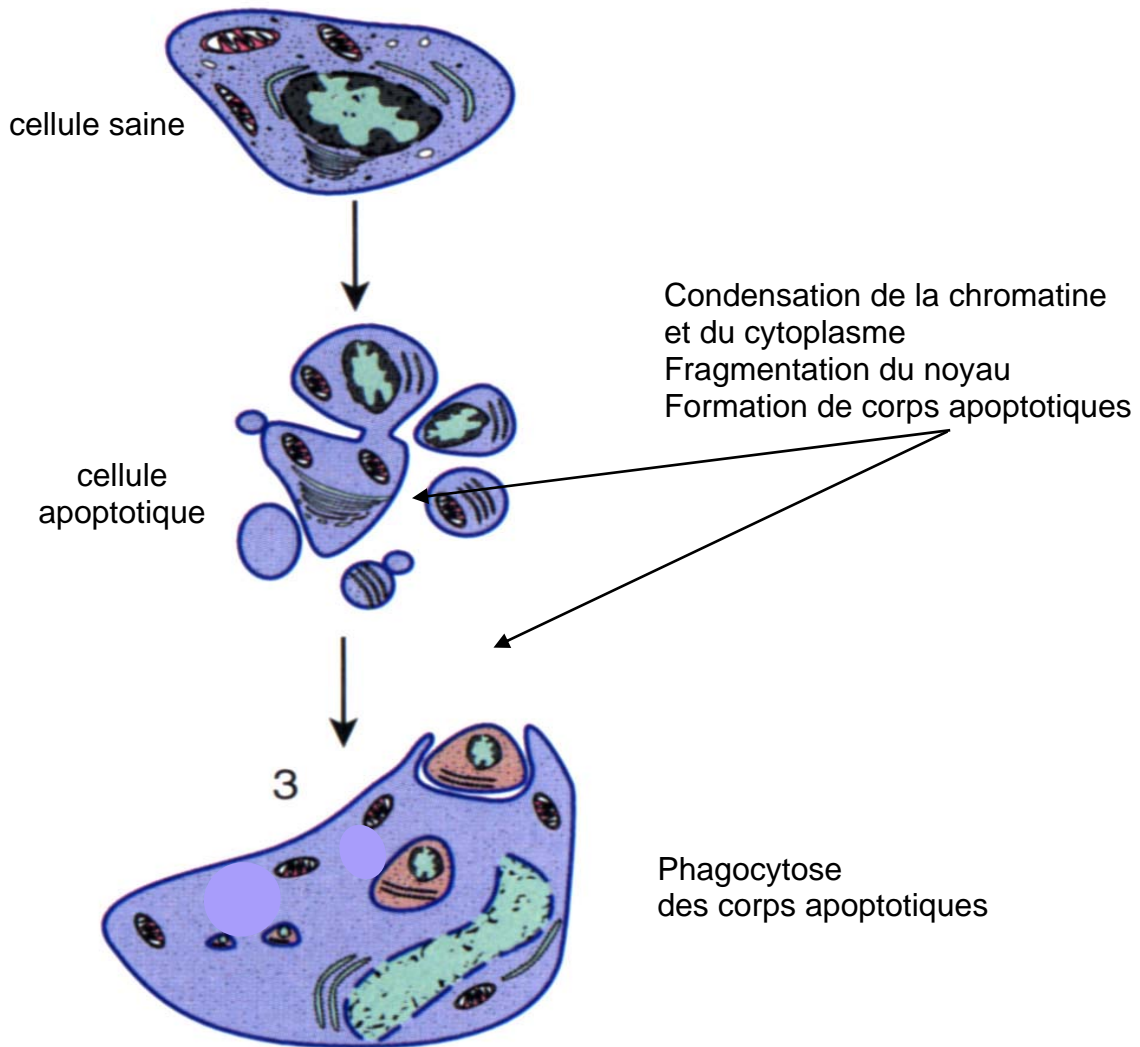


Figure 9 : Morphologie d'une cellule en apoptose (d'après Schwartz et Osborne, 1995)

2) Décours temporel des événements moléculaires et cellulaires de l'apoptose

L'étude du décours temporel des événements moléculaires lors de l'apoptose permet de mieux comprendre ce processus complexe. Le processus apoptotique peut être divisé en quatre phases successives : une phase d'induction, une phase effectrice, une phase d'exécution et une phase de dégradation.

La phase d'induction peut être caractérisée par l'arrivée d'un signal apoptotique sur la cellule.

La phase effectrice permet la transmission du signal apoptotique jusqu'au noyau de la cellule, lieu de la transcription des gènes. Dans certains types cellulaires, la mort des cellules peut être bloquée par l'inhibition de la synthèse d'ARN et de protéine (Tata, 1966 ; Lockshin, 1969), ce qui suggère que la transcription de gènes et la synthèse de protéines sont indispensables au déroulement du programme de mort dans ces cellules. La régulation de gènes s'effectue avant la mise en place du programme apoptotique, grâce à la transduction du signal apoptotique vers le noyau de la cellule. La phase effectrice est réversible.

Au cours de la phase d'exécution, le programme apoptotique proprement dit a lieu, avec une cascade d'événements moléculaires conduisant à la destruction de la cellule: chute du potentiel membranaire et arrêt de la synthèse d'ATP (pour revue voir Mignotte et Vayssiere, 1998), perméabilisation de la membrane mitochondriale et libération du cytochrome c (Liu, X. *et al.*, 1996) et SMAC/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases / Direct IAP Binding with Low pI ; Du *et al.*, 2000 ; Verhagen *et al.*, 2000). Le cytochrome c peut alors former un complexe appelé apoptosome qui recrute la caspase 9, capable de s'autoactiver et d'activer des caspases effectrices telles que la caspase 3. La protéine SMAC/DIABLO, quant à elle, agit en faveur de l'apoptose en inhibant des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) qui agissent en inhibant les caspases 3 et 9 notamment (pour revue voir Green, 2000 ; Verhagen et Vaux, 2002). Les caspases sont des protéases à cystéine, qui hydrolysent spécifiquement les liaisons peptidiques au niveau du carboxyle d'un aspartate. On distingue les caspases initiatrices (comme les caspase 8 et 9) et les caspases effectrices (comme la caspase 3).

Les caspases effectrices sont directement impliquées dans la destruction de la cellule, puisqu'elles ont, entre autres, comme substrat, des constituants du cytosquelette et du noyau, ainsi que des protéines de signalisation cellulaire (Nicholson et Thornberry, 1997 ; Los *et al.*, 1999). Les caspases, une fois activées, déclenchent le programme de destruction de la cellule, avec notamment l'activation de nucléases et la fragmentation de l'ADN (Dipasquale *et al.*, 1991 ; Steller, 1995).

La phase de dégradation est caractérisée par la dégradation de la cellule et la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules avoisinantes.

II L'apoptose neuronale dans la maladie d'Alzheimer

L'apoptose physiologique au cours du développement du cerveau et l'apoptose pathologique dans le cerveau adulte partagent les mêmes mécanismes lors de la phase d'exécution. Cependant, des différences existent dans les mécanismes qui déclenchent l'apoptose. Alors que la carence en facteurs trophiques a un rôle prééminent lors de l'apoptose au cours du développement, les événements toxiques résultant d'accidents biochimiques ou génétiques semblent être responsables des phénomènes apoptotiques associés au déclenchement des maladies neurodégénératives. En effet, l'apoptose neuronale est un mécanisme de neurodégénérescence qui intervient au cours des maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington. Une hypothèse générale actuelle concernant la cause des maladies neurodégénératives est la toxicité d'agrégats protéiques anormaux, qui déclencherait un processus apoptotique. Ces derniers semblent importants dans la pathogenèse des maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou d'Huntington (pour revue voir Yuan et Yankner, 2000).

La théorie neurotrophique n'est cependant pas exclue, puisqu'il a été montré que plusieurs populations de neurones dans le système nerveux central adulte nécessitent la présence de facteurs trophiques pour maintenir leur fonction et leur phénotype (Acheson *et al.*, 1995). Le degré de dépendance des neurones matures envers leur support trophique n'est cependant pas établi. S'il s'avère important, une diminution de l'expression de facteurs trophiques pourrait mener à une atrophie neuronale, observée au cours du vieillissement normal ou à une perte neuronale comme dans la maladie d'Alzheimer. En effet, il a également été proposé que la maladie d'Alzheimer pourrait être due à un déficit de facteurs trophiques et/ou une diminution de l'expression des récepteurs correspondants (Rabizadeh *et al.*, 1994 ; Yaar *et al.*, 1997 ; Kuner *et al.*, 1998).

Dans la maladie d'Alzheimer, il a été très largement suggéré que la mort des neurones est de type apoptotique. En effet, des études de coupes post-mortem de cerveaux de patients a montré qu'il y a une activation des caspases (Cotman et Anderson, 1995 ; Rohn *et al.*, 2001a ; Rohn *et al.*, 2001b) et que l'on retrouve des accumulations de produits de dégradation des caspases comme des fragments de fodrine, d'actine ou d'APP -dont l'A β (Yang *et al.*, 1998 ; Gervais *et al.*, 1999 ; Colurso *et al.*, 2003).

L'état physiologique général du cerveau des patients est fortement favorable à l'apoptose puisque des phénomènes comme le stress oxydant, un faible métabolisme

énergétique, des carences en facteurs trophiques et des dysfonctions mitochondriales y est observé.

III Le peptide A β , un inducteur d'apoptose

Chez l'animal et *in vitro*, il a été montré à de nombreuses reprises que le peptide amyloïde pouvait induire l'apoptose. Les premières études montraient que l'A β pouvait être stimuler la croissance neuronale mais que son passage dans un état fibrillaire lui conférait des capacités dégénératives (Whitson *et al.*, 1989 ; Yankner *et al.*, 1989 ; Pike *et al.*, 1991 ; Pike *et al.*, 1993). Des 40/42 acides aminés du peptide amyloïde a été identifiée une séquence de 10 acides aminés, la séquence 25-35, qui est la séquence minimale nécessaire pour induire la mort cellulaire *in vitro* (Yankner *et al.*, 1990). Il a été ensuite démontré que l'A β fibrillaire provoque l'apoptose sur différents types de neurones en culture et notamment les neurones hippocampiques (Loo *et al.*, 1993 ; Watt *et al.*, 1994).

Depuis, un grand nombre d'études ont montré la toxicité associée à un traitement de neurones en culture par de l'A β agrégé (Yankner, 1996) ou par d'autres protéines amyloïdogéniques (Caughey et Lansbury, 2003). *In vivo*, l'injection de peptide dans le cerveau de rat adulte provoque également une dégénérescence neuronale (Kowall *et al.*, 1991 ; Inestrosa *et al.*, 2002 ; Reyes *et al.*, 2004). La toxicité du peptide amyloïde semble être corrélée à la présence de fibrilles ou de feuillet β (Simmons *et al.*, 1994 ; Howlett *et al.*, 1995 ; Seilheimer *et al.*, 1997), cependant, les mécanismes par lesquels l'agrégation de l'A β entraîne la mort neuronale ne sont pas connus.

Une étude récente montre que la mort cellulaire induite par le peptide amyloïde dépend de la nucléation et l'agrégation du peptide sur les cellules (Wogulis *et al.*, 2005). Dans cette étude les auteurs démontrent l'absence de toxicité de solutions d'A β soluble qui ne contiennent pas de fibrilles. Les solutions d'A β fibrillaire ne contenant pas d'A β libre sont également non toxiques et c'est le mélange des deux types d'A β , soluble et fibrillaire, qui serait à l'origine de la mort cellulaire (Wogulis *et al.*, 2005).

Il est intéressant de noter également que les oligomères solubles d'A β partagent les mêmes propriétés toxiques *in vitro* que d'autres oligomères amyloïdes solubles comme des oligomères d'IAPP, d' α -synucléine ou bien encore de PrP106-126, mettant en évidence un rôle de la structure des oligomères autant que de la nature du peptide (Kayed *et al.*, 2003).

La toxicité de l'A β dans l'apoptose a été associée à de nombreux mécanismes. L'A β provoque une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique p53, un indicateur de dommages de l'ADN. Cet effet peut déclencher la mort cellulaire par la réentrée des cellules dans le cycle ou par l'altération de l'équilibre entre protéines pro- et anti-apoptotiques (Caricasole *et al.*, 2003). Des études ont montré que l'A β augmente l'expression de bax et réduit l'expression de bcl-2, des molécules respectivement pro- et anti-apoptotiques (Paradis *et al.*, 1996). Le groupe de Tamagno a montré que l'A β induit une apoptose neuronale classique par l'activation de la caspase 3, le recrutement de p53 et la libération de cytochrome C dans le cytosol Tamagno *et al.*, 2003).

L'apoptose induite par le peptide A β implique également l'activation des voies de transduction des MAP kinases p38 et JNK, probablement par la phosphorylation et l'inactivation de bcl-2 (Shoji *et al.*, 2000).

Il est intéressant de noter que le cytosquelette semblerait impliqué dans la mise en place de l'apoptose neuronale induite par le peptide A β . En effet, lors de l'apoptose induite par l'A β il a été observé des modifications du cytosquelette (Yankner *et al.*, 1990 ; Grace *et al.*, 2002). Ce phénomène serait dû à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau induite par l'A β (Grace *et al.*, 2002). En effet, les formes hyperphosphorylées de la protéines Tau perdent leur capacité à se lier aux microtubules et s'agrègent entre elles pour former les dégénérescences neurofibrillaires (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Le rôle exact de ces modifications au cours de l'apoptose n'est pas connu néanmoins il semblerait que ce phénomène est un rôle important dans l'apoptose puisque des études ont montré que l'apoptose neuronale induite par l'A β peut être bloquée par du taxol ou d'autres agents stabilisateurs des microtubules (Sponne *et al.*, 2003 ; Michaelis *et al.*, 2005).

Chapitre IV :

L'inflammation dans la maladie d'Alzheimer

Chapitre IV : L'inflammation dans la maladie d'Alzheimer

Pendant les 15 dernières années, il a été découvert de nombreux médiateurs de l'inflammation dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer. L'implication de l'inflammation dans la maladie d'Alzheimer a ouvert un nouveau champ de recherche avec l'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). En thérapeutique, ils ralentiraient la progression de la maladie (Mcgeer *et al.*, 1996) bien que ces résultats restent toutefois controversés.

L'inflammation au cours de la maladie d'Alzheimer présente un caractère particulier puisqu'elle se situe au sein du système nerveux central et n'implique que très peu les lymphocytes et les monocytes. Ainsi les études immunologiques dans la maladie d'Alzheimer se sont concentrées sur les réponses humorales.

A l'aide de techniques immunocytochimiques, biochimiques et moléculaires de nombreuses voies inflammatoires ont été décrites comme activées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et il est impossible de décrire les phénomènes activés de façon linéaire.

I Les acteurs moléculaires de l'inflammation

1) le complément

La voie classique du complément est composée de nombreuses protéines, des sérines protéases pour la plupart, qui s'activent en cascade. Cette cascade commence par la fixation de C1q et finit par la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM) composé des protéines C5b et C6 à C9. Le CAM forme un canal dans la membrane qui l'a fixé ce qui entraîne la lyse de la cellule.

L'A β fibrillaire (Afagh *et al.*, 1996 ; Webster *et al.*, 1997 ; Jiang *et al.*, 1994) active directement la voie classique du complément *in vitro*, et ce, en l'absence d'anticorps. L'A β se lie à une séquence de C1q « collagen like » (Jiang *et al.*, 1994) qui est connue pour lier les activateurs du complément anticorps-indépendants (Gewurz *et al.*, 1993). Les différences

humain/rongeur font que cette activation n'existe pas naturellement chez la souris et est plus faible chez les animaux transgéniques exprimant l'A β humaine mais C1q de souris (Webster *et al.*, 1999). En plus de l'A β fibrillaire d'autres produits de la neurodégénérescence peuvent activer le complément dans le cerveau de malade comme par exemple l'ADN (Gewurz *et al.*, 1993).

La voie alternative d'activation du complément est elle aussi activable par l'A β fibrillaire (Strohmeyer *et al.*, 2000 ; Bradt *et al.*, 1998).

Ces mécanismes semblent activés *in vivo* également puisque de nombreuses protéines - C1q, C4, C3 et toutes les protéines du CAM - sont colocalisées avec les dépôts amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (Rogers *et al.*, 1992 ; Shen *et al.*, 1997) ainsi que les molécules produites lors de l'activation du complément comme les anaphylatoxines, opsonines et récepteurs du complément (Rogers, J. *et al.*, 1992 ; Shen *et al.*, 1997 ; Ishii et Haga, 1984).

Il y a trois sources de protéines du complément dans le cerveau : la microglie (Walker, 1998), les astrocytes (Gasque *et al.*, 1995) et les neurones (Terai *et al.*, 1997 ; Shen *et al.*, 1997).

Toutes les protéines et tous les ARNm des protéines du complément ont été retrouvées dans le cerveau et certaines sont augmentées dans le cerveau des patients. Par exemple l'ARNm de C1q est augmenté de 11 à 80 fois dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et les protéines C4d, C3d et le complexe C5b-9 sont élevés à des niveaux détectables par ELISA et western blot (Yasojima *et al.*, 1999).

2) Les cytokines et les chemokines

a) L'IL1

L'IL1 est surexprimée dans les régions corticales touchées dans la maladie d'Alzheimer et la microglie réactive pour l'IL1 augmente autour des plaques séniles (Griffin *et al.*, 1995). Cette augmentation de l'IL1 est très précoce et est même retrouvée sur les plaques diffuses ou également dans le cerveau de fœtus atteints du syndrome de Down (Griffin *et al.*, 1989 ; Griffin *et al.*, 1995).

Les effets de l'IL1 dans la maladie d'Alzheimer sont nombreux. L'IL1 augmente la synthèse et le clivage de l'APP (Goldgaber *et al.*, 1989 ; Buxbaum *et al.*, 1992). L'IL1 active les astrocytes (Giulian *et al.*, 1988).

De plus l'IL1 serait responsable de l'activation de JNK par l'A β et de la baisse de la LTP qui s'en suit (Minogue *et al.*, 2003).

L'IL1 pourrait aussi avoir une influence sur la pharmacologie de la maladie d'Alzheimer par sa capacité à moduler l'activité et l'expression de l'acétylcholinestérase. En effet, l'IL1 sécrétée par la microglie activée induit l'expression de l'ARNm et de la protéine de l'AChE (Li *et al.*, 2000). Cet effet de l'IL1 doit exacerber le déclin cholinergique et les dysfonctionnements dans la maladie.

L'A β (25-35) augmente l'IL1 mais pas l'IL6 dans les astrocytes (Meda *et al.*, 1999) et les ARNm de l'IL-1 β , IL-1Ra et MIP-1 α (mais pas IL-6, IL-10 ou TGF- β 1) dans des cultures de monocytes humain ou de microglie murine (Del Bo *et al.*, 1995). L'induction d'une inflammation périphérique par l'injection de LPS *in vivo* chez la souris induit l'augmentation des ARNm de l'IL1 et de l'IL6 dans le cervelet - mais pas dans le cortex - mais également induit un changement de l'expression de l'APP. La forme APP 695 diminue au profit des formes longues contenant la séquence KPI (Brugg *et al.*, 1995).

b) L'IL6

Des niveaux élevés d'IL6 ont été trouvés dans les cerveaux de patients et la réactivité de l'IL6 se retrouve colocalisée avec d'autres protéines de la phase aiguë comme l' α -macroglobuline (Strauss *et al.*, 1992). Comme l'IL1, l'IL6 pourrait moduler la synthèse d'APP (Vandenabeele et Fiers, 1991, Ringheim *et al.*, 1998). L'expression de l'IL6 et de ses différents récepteurs a été détectée aussi bien dans les astrocytes que dans les neurones (Hampel *et al.*, 2005).

L'immunoréactivité de l'IL6 colocalise avec les plaques diffuses dans le cortex et l'hippocampe. Cette immunoréactivité est rare dans les plaques séniles proprement dites (Bauer *et al.*, 1991 ; Hull *et al.*, 1996). L'IL6 apparaîtrait donc avant le passage des plaques diffuses aux plaques séniles.

c) *Le TNF α*

Le TNF α est élevé chez les malades dans le sérum (Fillit *et al.*, 1991), le LCR et la cortex (Tarkowski *et al.*, 1999). Des excès de TNF α sont décrits comme étant toxiques pour les cellules (Mogi *et al.*, 1994 ; Good, P. F. *et al.*, 1996a) mais le TNF α peut aussi être neurotrophique pour les neurones hippocampiques et protège les neurones en culture du glutamate, des radicaux libres et de la toxicité de l'A β (Barger *et al.*, 1995).

d) *Le TGF β*

Comme pour le TNF α ou les interleukines, le TGF β a été détecté dans les plaques (Van Der Wal *et al.*, 1993) et les niveaux dans le LCR (Chao *et al.*, 1994b) et le sérum sont élevés (Chao *et al.*, 1994a).

De plus, un rôle du TGF β 1 dans l'accumulation de l'A β a été suggéré sur un modèle de rats injectés icv par de l'A β qui ne forment des plaques que si les animaux reçoivent aussi une injection de TGF β (Frautschy *et al.*, 1996) et sur un modèle de tranches d'hippocampe dans lequel l'application de TGF β provoque le dépôt et l'accumulation d'A β (Harris-White *et al.*, 1998). Dans ces deux modèles la microglie réactive pour l'A β est associée aux plaques diffuses dans la matrice extra-cellulaire (Frautschy *et al.*, 1996 ; Harris-White *et al.*, 1998). Néanmoins, dans un autre modèle de souris surexprimant l'APP humaine, l'expression par les cellules gliales de TGF β entraîne une réduction des dépôts amyloïdes (Wyss-Coray *et al.*, 2001). Toutes ces données suggèrent que l'expression locale de TGF β pourrait avoir un rôle dans l'accumulation et la clairance de l'A β dans le cerveau.

e) *Les chémokines*

Contrairement à beaucoup de maladies neurologiques, il n'y a pas d'infiltration des leucocytes ou de migration anormale de cellules inflammatoires dans le système nerveux central dans la maladie d'Alzheimer.

Néanmoins, il y a une augmentation de l'expression des chémokines et de leur récepteurs dans le cerveau des patients (pour revue voir Xia et Hyman, 1999). CXCR2 a été observé près de plaques séniles (Xia *et al.*, 1997a). CCR3, CCR5 et MIP-1 β sont surexprimés dans la glie activée (Xia *et al.*, 2000).

In vitro, l'A β stimule la production d'IL8, MCP-1 et MIP-1 α par la microglie de façon dose dépendante (Lue *et al.*, 2001).

3) les cycloxygénases

Les cycloxygénases (COX) sont des enzymes qui jouent un rôle clé dans la production de prostaglandines et donc dans l'inflammation. Ce sont les enzymes cibles des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS).

Deux isoformes partageant 80 % d'homologie et ayant des capacités spécifiques ont été décrites (O'banion *et al.*, 1991 ; O'banion *et al.*, 1992). COX 1 produit des prostaglandines pro-inflammatoires mais également des prostaglandines anti-inflammatoires. COX 2 ne produit que des prostaglandines pro-inflammatoires et est fortement augmentée pendant l'inflammation. La quantité de COX 2 est augmentée chez les malades et l'augmentation serait corrélée aux niveaux de peptide A β dans le cortex (Pasinetti et Aisen, 1998) et dans certains neurones de l'hippocampe (Ho *et al.*, 1999). Cette élévation de COX influence de nombreux mécanismes inflammatoires en aval.

L'utilisation d'anti-inflammatoires comme traitement pour la maladie d'Alzheimer n'est pas encore reconnue du fait de l'effet ambigu qu'ils peuvent avoir par leur action à la fois sur COX 1 et sur COX 2.

4) Les radicaux libres

De nombreux effets du stress oxydant et des radicaux libres dans la maladie ont été décrits (Behl, 1999 ; Markesbery et Carney, 1999). Les données immunohistochimiques montrent de nombreuses modifications caractéristiques de dommages oxydants (Markesbery et Carney, 1999 ; Takeda *et al.*, 1998 ; Good *et al.*, 1996a). Les espèces dérivées de l'oxygène (ROS) ne donnent pas seulement des effets toxiques directs sur la cellule mais peuvent aussi déclencher la transcription de gènes pro-inflammatoires ou pro-apoptotiques par l'activation de NF κ B (Kaltschmidt *et al.*, 1997).

Bien que la majorité des recherches sur le stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer se soit concentrée sur la possibilité de production de radicaux libres par les neurones (Behl, 1999 ; Mattson et Pedersen, 1998) due à un mauvais fonctionnement de la chaîne respiratoire (Behl, 1999) le concept de radicaux libres tire sa source dans la biologie inflammatoire, dans

laquelle la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote par les cellules inflammatoires est un mécanisme majeur d'attaque des cibles opsonisées.

Les sources de radicaux libres dans la maladie d'Alzheimer doivent donc inclure la microglie activée via l'activation du complexe NADPH oxydase. Il a été montré que les peptides A β peuvent directement activer la NADPH oxydase dans les microglies activées (Bianca *et al.*, 1999; Klegeris et McGeer, 1997; Van Muiswinkel *et al.*, 1999).

D'autre part ; il a été également montré que l'A β peut potentialiser la production de ROS par les cellules phagocytaires activées par d'autres agents (Klegeris et McGeer, 1997). Il reste toute fois un doute quant à la région de l'A β qui active la NADPH oxydase. Diverses études ont montré que le peptide A β (25-35) a les mêmes effets que le peptide entier alors que d'autres études montrent que l'A β (1-16) est nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase (Van Muiswinkel *et al.*, 1999).

En plus des ROS, le monoxyde d'azote (NO) a été montré comme étant impliqué dans les processus physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Les traces visibles d'excès de NO observées dans les tissus de patients sont les quantités de protéines nitrotyrosinées (Good *et al.*, 1996a). Cela est expliqué par l'augmentation de formation de peroxy-nitrite – qui provient de l'interaction entre le NO et l'ion superoxyde – qui est très toxique pour les cellules.

La source du NO dans la maladie reste indéterminée. De grandes quantités de NO peuvent être produites par les astrocytes et la microglie activée après induction du gène de la iNOS mais la controverse réside dans le fait que les facteurs activateurs de la synthèse de NO et de l'activation de la iNOS chez l'homme et chez les rongeurs sont différents. L'induction de la iNOS a été observée dans les réponses inflammatoires déclenchées par l'A β (Combs *et al.*, 2001 ; Giovannini *et al.*, 2002). La iNOs est détectée dans les astrocytes entourant les plaques séniles mais pas dans la microglie (Lee *et al.*, 1993).

II Les acteurs cellulaires de l'inflammation

1) La microglie

La microglie activée se regroupe aux sites de dépôts de l'A β . De nombreux critères sont utilisés pour décrire l'activation de la microglie : morphologie altérée, augmentation d'expression du CMH de classe II, de cytokines et du complément (Streit *et al.*, 1999). La microglie activée dans la maladie d'Alzheimer sécrète de nombreux facteurs neurotoxiques

comme l'IL1, l'IL6, des protéases ou du NO (Sawada *et al.*, 1989 ; Griffin *et al.*, 1995) et est retrouvée autour des plaques séniles. Elle exprime également les récepteurs scavenger (El Khoury *et al.*, 1996) et RAGE (Yan *et al.*, 1996). Les cellules microgliales activées présentent un taux de phosphotyrosines élevé (Wood et Zinsmeister, 1991) reflétant un fort taux d'activation des voies de transduction intracellulaires. Les principales voies de transduction activées sont les voies de MAP kinases p38 et ERK qui aboutissent à la synthèse de protéines pro-inflammatoires (McDonald *et al.*, 1998). L'inhibition des MAP kinases stoppe la synthèse de ces composés (Combs *et al.*, 1999).

Ces données suggèrent que l'activation de la microglie par l'A β pourrait être une étape clé de l'initiation de l'inflammation dans le cerveau. En outre, les protéines du système immunitaire d'autres sources qui colocalisent avec les plaques séniles pourraient attirer et stimuler les cellules microgliales.

2) Les astrocytes

Comme la microglie, les astrocytes sont également retrouvés autour des plaques. Quelques uns sont présents autour des plaques diffuses mais la plus grande concentration est autour des plaques denses (Mrak *et al.*, 1996).

Les astrocytes *in vitro* ou *in situ* subissent un processus d'activation et sont alors capables de sécréter de nombreux agents pro-inflammatoires tels que des protéines du complément (Gasque *et al.*, 1995 ; Levi-Strauss et Mallat, 1987), l'IL1 (Del Bo *et al.*, 1995), l'IL6 (Van Wagoner *et al.*, 1999), des prostaglandines et COX2 (Minghetti *et al.*, 1996) ou bien encore la iNOS (Lee *et al.*, 1993).

3) Les neurones

De façon un peu plus surprenante, les neurones également sont un type cellulaire source de molécules pro-inflammatoires. Les neurones eux-mêmes produisent les agents qui vont mener à leur mort. En effet, il a été montré que les neurones produisent des protéines du complément (Shen *et al.*, 1997 ; Terai *et al.*, 1997), les COX (Nogawa *et al.*, 1997; Tocco *et al.*, 1997), de l'IL1 de l'IL6 et du TNF α (Good *et al.*, 1996a ; Breder *et al.*, 1993 ; Botchkina *et al.*, 1997). Comme on l'a vu, toutes ces molécules sont fortement augmentées dans la maladie d'Alzheimer.

Chapitre V :

Le cytosquelette de tubuline

Du monomère de tubuline aux microtubules

Chapitre V : Le cytosquelette de tubuline

Du monomère de tubuline aux microtubules

Le cytosquelette des cellules eucaryotes est composé de trois réseaux distincts de filaments protéiques : les filaments d'actine ou microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules. Chacun de ces trois réseaux possède des propriétés et des fonctions différentes.

Les microtubules sont les constituants majeurs du cytosquelette qui régissent l'organisation intracellulaire de la cellule eucaryote. Ils sont essentiels à la vie de la cellule car ils interviennent dans de nombreux processus (Mandelkow et Mandelkow, 1995) tels que l'acquisition et le maintien de la morphologie et de la polarité cellulaire, la migration des chromosomes aux pôles des fuseaux mitotiques et méiotiques, la motilité cellulaire par le battement des cils et des flagelles, l'organisation du cytoplasme par la distribution topologique et dynamique des structures membranaires et des macromolécules, le trafic intracellulaire, le transport vésiculaire ... Ce sont des structures tubulaires, constituées de l'assemblage non covalent d'hétérodimères de tubuline. La dynamique des microtubules est très active, ils sont capables de s'assembler et de se désassembler rapidement pour répondre aux besoins de la cellule. Cette dynamique est coûteuse en énergie. L'importance du rôle des microtubules dans les cellules a pour corollaire une étroite régulation de cette dynamique.

I la tubuline

Le microtubule est une structure cylindrique creuse de 25 nm de diamètre généralement formé de treize protofilaments qui sont eux-mêmes des polymères d'hétérodimères de tubuline. Ces derniers sont constitués de sous-unités de tubuline α et β et forment l'unité fondamentale du microtubule. Les protéines α -tubuline et β -tubuline sont donc très importantes dans la physiologie cellulaire et font partie des protéines les plus abondantes dans les cellules eucaryotes. Par exemple, les tubulines représentent 10 à 15% des protéines neuronales.

1) L'hétérogénéité de la tubuline

Une des caractéristiques majeures de la tubuline est son haut niveau d'hétérogénéité. L'origine de ce polymorphisme est à la fois génétique, avec l'existence de nombreux gènes, et post-traductionnelle, avec l'existence de nombreuses modifications connues à ce jour.

a) *L'hétérogénéité génétique : les isotypes de tubuline*

La famille tubuline contient un grand nombre de membres, mais les plus abondantes sont l' α - et la β -tubuline. Les gènes codant les tubulines α et β sont retrouvés chez tous les eucaryotes et le nombre d'isotypes de tubuline varie en fonction de la sous-unité et de l'espèce étudiées. Chez les vertébrés, 5 à 7 isotypes ont été mis en évidence (Luduena, 1998). Les différents gènes de tubuline ont dérivé par des phénomènes de duplication et de divergence à partir d'un gène ancestral commun. L'expression des différents isotypes de tubuline est variable selon les tissus. Le niveau d'expression des différents isotypes d'une sous-unité est indépendant de celui des isotypes de l'autre sous-unité. Dans le système nerveux central de souris, les isoformes de tubulines les plus exprimées sont les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ pour l' α -tubuline et l'isoforme β II pour la β -tubuline (Sullivan, 1988). Il faut noter que les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ proviennent de la duplication récente d'un gène unique et possèdent exactement la même séquence protéique. La diversité des hétérodimères de tubulines dans le cerveau se retrouve donc pratiquement restreinte à la diversité des β -tubulines puisque l' α -tubuline est quasiment constante.

Chez les vertébrés, les tubulines α ont environ 40% d'identité avec les tubulines β . Le rôle des différentes isotypes de tubulines β a été particulièrement étudié. Ces isotypes ne diffèrent les unes des autres que par 4-16% de leur séquence en acides aminés. La majorité des différences se situe dans les 15 derniers acides aminés. En se basant sur cette différence de la région C-terminale, Sullivan et Cleveland (Sullivan et Cleveland, 1986) ont proposé une classification des isotypes. Ces isotypes ont des profils d'expression spécifiques. Par exemple la classe β II est celle la plus exprimée dans le système nerveux. La répartition dans un extrait protéique de cerveau de bœuf, qui est classiquement utilisé pour les expériences *in vitro*, est de 3% de classe I, 58% de classe II, 25% de classe III et 13% de classe IV. Chez le poulet, les

microtubules des cellules neuronales sont constitués préférentiellement de β -tubuline de classe II, alors que, dans les érythrocytes, c'est majoritairement la classe VI qui est représentée (Cleveland *et al.*, 1990). Les β -tubulines de classe III et IVa sont spécifiques quand à elles des neurones.

Le polymorphisme génétique de la tubuline est impliqué dans les propriétés dynamiques des microtubules, dans leur stabilité et dans leur labilité. Il a été montré que ces classes, lorsqu'elles sont « pures », ont des propriétés d'assemblage variable et également des aptitudes différentes à interagir avec des protéines de stabilisation des microtubules comme les protéines tau ou d'autres MAP (Lu et Luduena, 1994). La dynamique des microtubules dépend de la composition en isotypes des microtubules (Panda *et al.*, 1994). Ainsi, les microtubules polymérisés à partir de β -tubuline de classe VI, présentes dans les érythrocytes, sont moins dynamiques que ceux qui sont polymérisés à partir d'autres classes (Trinczek *et al.*, 1993 ; pour revue Burkhart *et al.*, 2001).

b) *L'hétérogénéité moléculaire : les modifications post-traductionnelles des tubulines*

Les modifications post-traductionnelles que peuvent subir les tubulines sont nombreuses. Elles sont variables selon la sous-unité, l'isotype et le tissu étudié. Les modifications post-traductionnelles peuvent également varier au cours du développement et du vieillissement au sein d'un même tissu.

Les principales modifications post-traductionnelles sont : l'acétylation (Ledizet et Piperno, 1987), la détyrosylation/retyrosylation de la tyrosine 451 (Barra *et al.*, 1988), la polyglycylation (Redeker *et al.*, 1994), la polyglutamylolation (Eddé *et al.*, 1990 ; Redeker *et al.*, 1992), la phosphorylation (Alexander *et al.*, 1991), la palmytation (Ozols et Caron, 1997 ; Zambito et Wolff, 1997) et l'excision du glutamate 450 (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1991).

Certaines de ces modifications peuvent intervenir spécifiquement sur l' α -tubuline ou bien sur la β -tubuline comme l'acétylation qui est spécifique de la première alors que d'autres interviennent sur les deux types de tubuline comme la polyglutamylolation. De plus, les différents isotypes de tubuline ne sont pas soumis aux modifications post-traductionnelles de façon identique.

L'exemple de la polyglutamylation

La polyglutamylation, découverte en 1990 (Eddé *et al.*, 1990), est une modification majeure des tubulines neuronales. Elle consiste en l'addition de un à 6-7 groupements glutamyles sur un glutamate proche de l'extrémité C-terminale de la tubuline. Un anticorps monoclonal spécifique (GT335) permet d'identifier les α -tubulines et les β -tubulines polyglutamylés quel que soit leur degré de polyglutamylation (Wolff *et al.*, 1992). Le niveau de polyglutamylation des α -tubulines est élevé dans les neurones juvéniles alors qu'il est faible pour les β -tubulines. Le niveau maximal de polyglutamylation pour la β -tubuline est atteint au cours de la différenciation après la naissance (Audebert *et al.*, 1994). Les tubulines sont progressivement glutamylées par une tubuline polyglutamylase (Regnard *et al.*, 1999). La déglutamylation se déroule selon un processus cinétique complexe dépendant de la longueur de la chaîne de glutamyles (Audebert *et al.*, 1993). La déglutamylation intervient à la fois sur la tubuline libre et sur les microtubules, alors la glutamylation se déroule préférentiellement sur les microtubules (Audebert *et al.*, 1993).

Les modifications post-traductionnelles des tubulines ont pour effet de moduler les fonctions des tubulines agissant par exemple sur les capacités des tubulines, et donc des microtubules, à interagir avec leurs protéines associées (MAPs).

Trois modifications post-traductionnelles ont un rôle avéré dans la régulation des interactions des microtubules et des MAPs. Il s'agit de la polyglutamylation, de la détyrosylation/tyrosylation et de la polyglycylation (pour revue voir Rosenbaum, 2000).

Ainsi, il a été montré que la polyglutamylation servait de régulateur progressif de la liaison des MAPs, en modulant la conformation du domaine C-terminal de la tubuline (Boucher *et al.*, 1994 ; Larcher *et al.*, 1996 ; Bonnet *et al.*, 2001). De même, les protéines Tau ne se lient pas de façon identique à toutes les isoformes de la tubuline et leur liaison varie en fonction de la longueur de la chaîne polyglutamylée (Boucher *et al.*, 1994). Les tubulines non modifiées ont une affinité minimale qui s'accroît à mesure que la chaîne polyglutamylée s'allonge de 1 à 3 résidus, passe par une valeur maximale et décroît progressivement à mesure que la chaîne s'allonge encore jusqu'à 6/7 résidus. Des expériences parallèles ont montré que MAP2 et la kinésine ont également une liaison dépendante de la longueur de la chaîne polyglutamylée (Larcher *et al.*, 1996). Il en est de même pour les protéines MAP1A et MAP1B (Bonnet *et al.*, 2001) mais pas pour les protéines STOPS (Bonnet *et al.*, 2002).

2) La structure de la tubuline

La structure du dimère de tubuline au sein du protofilament a été analysée par diffraction électronique à partir de tubuline polymérisée et stabilisée par le taxol (Nogales *et al.*, 1998). Alors que les tubulines α et β ne présentent que 40% d'identité, ces expériences ont mis en évidence que leurs repliements sont très proches. La structure tertiaire de la tubuline est globulaire en raison de la présence de 10 brins β entourés de 12 hélices α (Figure 10). Les régions les plus conservées entre les deux sous-unités concernent des structures secondaires qui permettent les contacts latéraux et longitudinaux au sein du microtubule. Les variations de séquence sont principalement retrouvées dans la partie C-terminale de la tubuline qui est impliquée dans la liaison avec d'autres protéines.

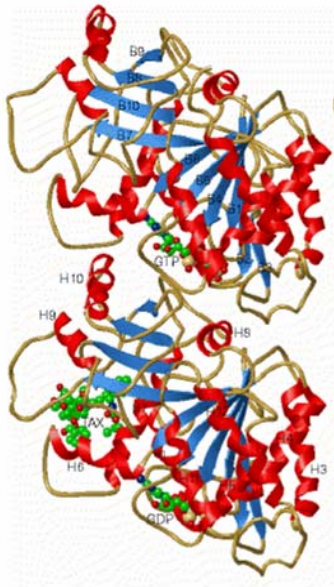


Figure 10 : Structure de l'hétérodimère de tubuline : représentation tridimensionnelle obtenue par cristallographie (D'après Nogales *et al.*, 1998)

La tubuline est organisée en trois domaines fonctionnels (Nogales *et al.*, 1998) : le domaine N-terminal constitué des 205 premiers acides aminés et qui est le site de liaison du GTP, le domaine central des acides aminés 206 à 381 qui contient le site de liaison de certaines drogues et enfin le domaine C-terminal (382-440) qui correspond au site d'interaction de protéines associées aux microtubules.

A chaque monomère de tubuline est lié un nucléotide GTP. Le GTP de l' α -tubuline est à l'interface avec la β -tubuline et il n'est ni hydrolysable ni échangeable. En revanche, le GTP associé à la β -tubuline est exposé à la surface du dimère et peut être hydrolysé en GDP puis échangé. On appelle tubuline-GTP ou tubuline-GDP, l'hétérodimère $\alpha\beta$ de tubuline dont la β -tubuline porte respectivement un GTP ou un GDP.

3) Dimérisation et repliement de la tubuline : rôle des cofacteurs

Pendant leur synthèse, les protéines naissantes sont prises en charge par une protéine chaperon qui va permettre un repliement correct. Dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, la plupart des protéines sont prises en charge par la protéine chaperon de type I (Hsp70). Pour la tubuline et l'actine, la chaperonne spécifique de leur repliement est la Hsp60 (Lewis *et al.*, 1996). Avant de pouvoir former les microtubules, les tubulines doivent former les hétérodimères α/β . Cette formation est un processus complexe mettant en jeu une famille de protéines : les « tubulin cofactors ».

Cinq cofacteurs de la tubuline permettant son repliement et la formation du dimère $\alpha\beta$ natif sont actuellement connus (Feierbach *et al.*, 1999). Une fois que les α - et β -tubulines ont acquis leur conformation, les protéines chaperons sont échangées contre un premier cofacteur (Nogales, 2000), le cofacteur F_B pour l' α -tubuline et le cofacteur F_A pour la β -tubuline. Ces deux cofacteurs peuvent alors s'échanger avec les cofacteurs F_D et F_E pour former ainsi les complexes cofacteur F_E/α -tubuline et cofacteur F_D/β -tubuline.

La dimérisation finale de la tubuline se fait à la suite de la fixation d'un cinquième cofacteur, le cofacteur F_C , qui permet la formation d'un super-complexe cofacteur F_E/α -tubuline/ cofacteur F_D/β -tubuline/cofacteur F_C . Le dimère natif est libéré à la suite de l'hydrolyse du GTP lié à β -tubuline (Tian *et al.*, 1997) (Figure 11). Par ailleurs, les cofacteurs constituent un bon moyen de régulation du ratio α/β , les cofacteurs A et B servant respectivement de réservoirs de β et α (Melki *et al.*, 1996). Enfin, ces complexes ayant été trouvés associés aux microtubules *in vitro*, il est également possible que ces cofacteurs jouent un rôle directement en relation avec l'assemblage des microtubules ou leur fonction (Hirata *et al.*, 1998).

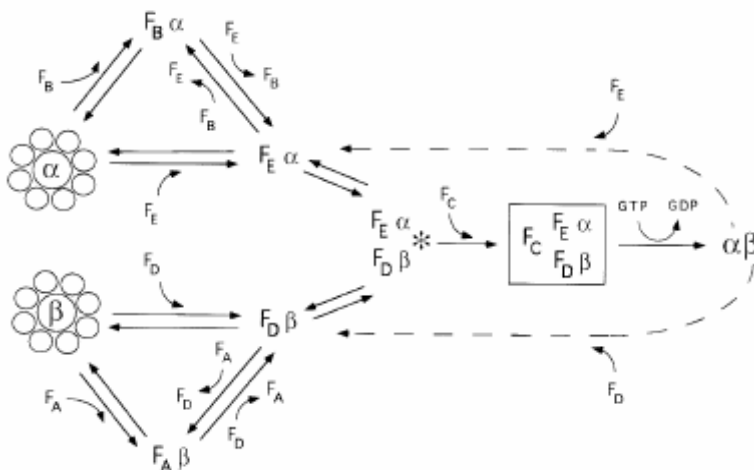


Figure 11 : Symétrie des voies de conformation de l' α -tubuline et de la β -tubuline. Les monomères de tubuline nouvellement formés interagissent avec une série de cofacteurs protéiques (F_A , F_B , F_C , F_D , et F_E), qui seraient des protéines chaperons, pour converger vers la formation d'un complexe qui, libère l'hétérodimère natif de tubulines. (d'après Tian *et al.*, 1997)

II Les microtubules

1) Organisation structurale des microtubules

Un microtubule est un assemblage de protofilaments qui interagissent latéralement entre-eux et qui sont tous orientés selon la même polarité. Ils sont formés de l'assemblage ordonné d'hétérodimères de tubuline. L'enchaînement longitudinal des hétérodimères est de type tête-à-queue et il permet la formation d'un protofilament. Les microtubules apparaissent comme des cylindres creux de 25 nm de diamètre (Figure 12).

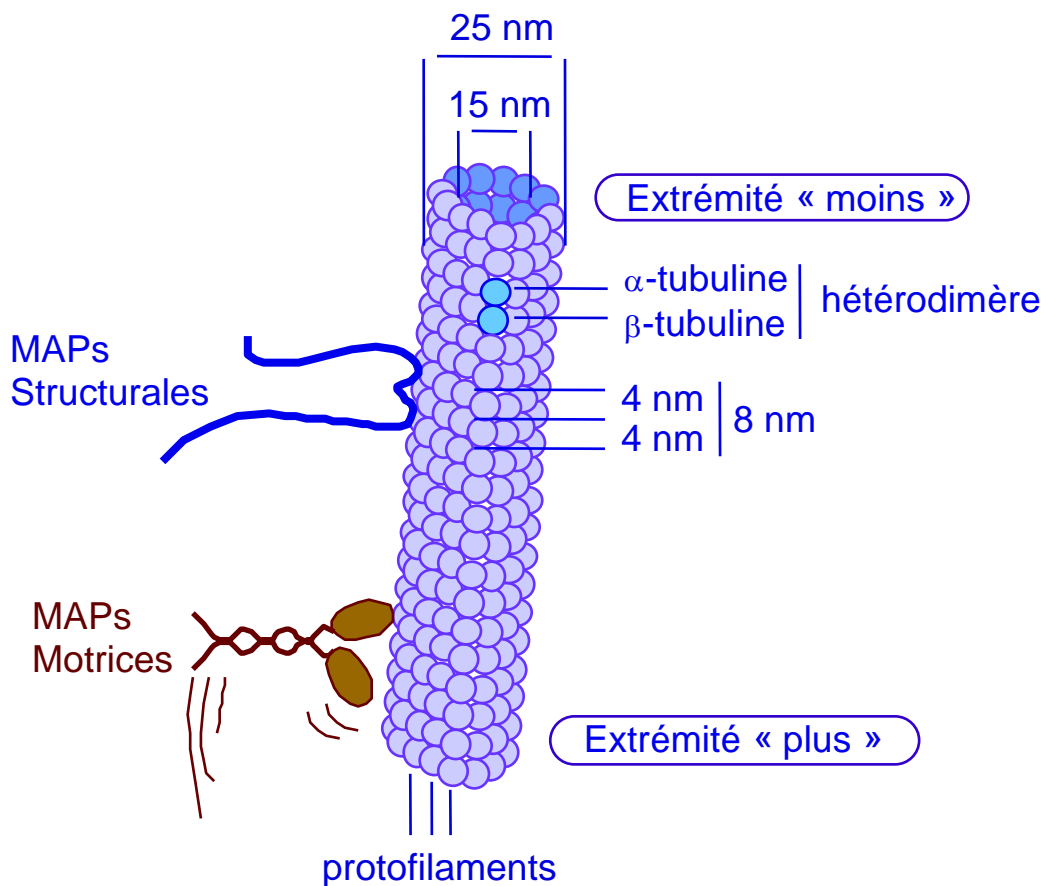


Figure 12 : Représentation schématique d'un microtubule

In vivo, un microtubule contient en général 13 protofilaments mais *in vitro* ce nombre peut varier entre 9 et 16 (Chrétien et Wade, 1991). Les microtubules *in vivo* et *in vitro* semblent adopter deux types d'organisation (« lattice accomodated model »), un premier dans lequel les monomères de même type sont latéralement alternés d'un protofilament à ses plus proches voisins (α - β - α - β - α ...) et un deuxième dans lequel les liaisons latérales se font entre

sous-unités homologues (α - α ou β - β) (Amos, 1995 ; Mandelkow *et al.*, 1995). En fait, le modèle de liaison homologue semble être le plus répandu dans les cellules.

Les interactions latérales entre monomères forment un trajet en forme d'hélice qui parcourt la surface du microtubule. Dans le cas d'un microtubule à 13 protofilaments, le pas de l'hélice correspond à une hauteur de 3 monomères de tubuline. Trois hélices parallèles sont donc nécessaires pour couvrir complètement le microtubule, cela correspond donc à une hélice à 3 départs (Hyman, 1995).

Du fait de cette alternance ordonnée de dimères de tubuline, le microtubule présente à une extrémité des sous-unités α -tubuline et à l'autre des sous-unités β -tubuline. Cette différence dans la nature des tubulines confère à chaque extrémité des propriétés dynamiques différentes. L'extrémité la moins dynamique (-) est celle présentant les sous-unités α , par opposition à l'extrémité (+) qui présente les sous-unités β (Nogales, 1999). *In vivo*, l'extrémité (+) est dirigée vers la périphérie cellulaire et l'extrémité (-) est ancrée au niveau du centrosome (Raff *et al.*, 1997). Les microtubules sont donc des structures polarisées (Wade et Hyman, 1997).

2) La dynamique des microtubules

a) La nucléation

La nucléation est l'étape initiale de la formation du microtubule. *In vitro*, la base du microtubule est formée de l'agrégation spontanée de 6 à 12 dimères de tubuline-GTP, qui s'associent latéralement et rapidement selon un premier modèle (Caudron *et al.*, 2000, Caudron *et al.*, 2002) et lentement en long oligomères longitudinaux selon un deuxième modèle (Job *et al.*, 2003).

In vivo, la nucléation a lieu au niveau des centres organisateurs de microtubules (MTOC) où une machinerie protéique favorise la formation des premiers oligomères de tubuline. Le centrosome est le principal MTOC des cellules animales. Il est composé d'une paire de centrioles contenant 9 triplets de microtubules et d'une matrice péricentriolaire au sein de laquelle se trouve γ -TuRC (« γ -tubulin ring complex »), un complexe en anneau de 25 nm de diamètre (Moritz *et al.*, 1995) formé de 10 à 13 molécules de γ -tubuline et d'au moins 8 autres protéines (Zheng *et al.*, 1995b).

b) *Les modèles de dynamique in vitro*

Les microtubules sont des structures labiles qui peuvent présenter deux comportements dynamiques mécanistiquement différents :

- le phénomène de « tapis roulant » ou « treadmilling » qui se caractérise par une croissance des microtubules par leur extrémité (+) et une dépolymérisation au niveau de l'extrémité (-), ce qui génère un flux de sous-unités de tubuline au sein du polymère, de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-). Ainsi, la concentration de tubuline libre ou concentration critique est différente aux deux extrémités (Margolis et Wilson, 1978).

- l'instabilité dynamique qui se caractérise par une alternance de phases de polymérisation lente et de dépolymérisation rapide aux deux extrémités du microtubule (Mitchison et Kirschner, 1984). Le terme de catastrophe caractérise la transition entre polymérisation et dépolymérisation alors que celui de sauvetage recouvre la transition inverse.

Après nucléation à partir d'un axonème, le microtubule s'allonge pendant un temps variable avant de subir une catastrophe qui entraîne un raccourcissement rapide. Le microtubule peut alors soit se dépolymériser complètement, soit être « sauvé » et recommencer à croître. Les phénomènes de catastrophe et de sauvetage correspondent à des transitions brutales et stochastiques. Il est en effet impossible de les prévoir, ni même d'établir une corrélation avec un processus cellulaire ou bien la distance avec un site (Walker *et al.*, 1988). L'instabilité dynamique peut donc être décrite par quatre paramètres : la vitesse de polymérisation, la vitesse de dépolymérisation, la fréquence des catastrophes et la fréquence des sauvetages. Ces paramètres dépendent tous de la concentration critique en tubuline libre en-dessous de laquelle la polymérisation de la tubuline n'est pas observée (Walker *et al.*, 1988).

c) *L'énergie de la dynamique*

La dynamique des microtubules est un processus qui nécessite un apport continu d'énergie. Cette énergie est présente sous forme de GTP dans les sous-unités de tubuline. Seul un hétérodimère $\alpha\beta$ de tubuline dont la sous-unité β est associée à un GTP est capable de s'assembler en microtubule (Carlier *et al.*, 1987). Peu après l'incorporation d'un dimère de

tubuline dans le microtubule en élongation, son GTP est hydrolysé en GDP. Pourtant l'hydrolyse du GTP n'est pas nécessaire en elle-même pour observer une polymérisation. En effet, la substitution du GTP par un analogue non hydrolysable ne modifie pas les propriétés d'assemblage de la tubuline. En revanche, les microtubules se dépolymérisent très lentement (environ 0,1 dimère par sec contre 1000 pour les microtubules GDP) et apparaissent plus stables (Hyman *et al.*, 1992). En fait, l'hydrolyse du GTP provoque un changement conformationnel du protofilament en élongation et favorise sa dépolymérisation ultérieure qui se traduit par un aspect frangé caractéristique du microtubule en cours de dépolymérisation (Vale *et al.*, 1994). Une fois la tubuline GDP libérée du microtubule, le GDP va être échangé contre un GTP afin que la tubuline puisse à nouveau s'assembler au niveau d'un microtubule.

L'étude *in vitro* de l'instabilité dynamique se faisant à partir de tubuline purifiée, ses propriétés sont essentiellement liées à celles de la tubuline elle-même. Dans les cellules, les microtubules apparaissent plus dynamiques qu'*in vitro*, avec des vitesses de polymérisation et des fréquences de catastrophe ou de sauvetage plus élevées. Par ailleurs, les paramètres de l'instabilité dynamique peuvent changer de façon considérable en réponse à des signaux intra- et extra-cellulaire divers (Howell *et al.*, 1997), ainsi qu'en fonction des stades de prolifération (Zhai *et al.*, 1996) ou de différenciation de la cellule (Laferriere *et al.*, 1997). Ces données témoignent de l'existence de facteurs capables de contrôler la dynamique et donc le renouvellement des microtubules *in vivo*.

3) Les protéines associées aux microtubules

Dans la cellule, les microtubules interagissent avec de nombreuses protéines. On regroupe sous le terme de MAPs l'ensemble de ces protéines. Deux familles de MAPs peuvent être distinguées selon leur fonction :

- les MAPs structurales (MAP1A, MAP1B, MAP2, MAP4, Tau, ...)
- les MAPs motrices ou moteurs moléculaires (kinésine et moteurs apparentés, dynéines)

Il existe de nombreuses autres protéines qui copurifient avec la tubuline mais qui ne sont pas directement impliquées dans le fonctionnement des microtubules : certaines enzymes glycolytiques (glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase, aldolase), des virus, des kinases (PKA, c-mos, ...), des protéines G et des ribonucléoprotéines, ...

a) *Les MAP structurales*

Les MAPs structurales ont pour principale fonction de stabiliser les microtubules et de permettre leur organisation en réseau. Elles présentent une grande diversité de par leur nombre mais aussi de par l'existence de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou la O-glycosylation (Arnold *et al.*, 1996).

La famille MAP1 se compose de trois protéines de masse moléculaire élevée (> 300 kDa) - MAP1A, MAP1B et MAP1C - codées par 3 gènes différents.

MAP1A est une longue molécule filamenteuse de 100 à 150 nm de long (Shiomura et Hirokawa, 1987). Avec une masse moléculaire apparente de 350 kDa, MAP1A est la plus grande des MAPs et la plus abondante des MAP1 chez l'adulte. MAP1A est largement distribuée dans tous les types cellulaires. Dans les neurones, elle est présente aussi bien dans les dendrites que dans les axones (Shiomura et Hirokawa, 1987). L'expression de MAP1A augmente de la naissance jusqu'au 20^{ème} jour post-natal et demeure élevée pendant la vie adulte.

MAP1B est essentiellement localisée dans les axones pendant les premières étapes du développement, ce qui suggère un rôle dans la axogénèse. MAP1B est la MAP la plus abondante du cerveau embryonnaire. Après la naissance, son niveau d'expression diminue fortement et elle est remplacée par MAP1A au cours du développement. Cependant, une forme phosphorylée de MAP1B persiste chez l'adulte dans certaines zones encore prolifératives du système nerveux central telles que le septum, l'hypothalamus ou les tubercules olfactifs (Nothias *et al.*, 1996).

La famille MAP2 contient quatre protéines issues d'un gène unique : MAP2A, MAP2B, MAP2C et MAP2D (Garner et Matus, 1988 ; Chung *et al.*, 1996). Les grandes MAP2 (MAP2A et MAP2B) sont des protéines très allongées, flexibles et thermostables ayant une masse moléculaire apparente de 280 kDa. Ces protéines sont essentiellement présentes dans les dendrites et les corps cellulaires des neurones adultes où elles sont retrouvées associées avec des filaments intermédiaires. L'expression de MAP2B est constante au cours du développement tandis que celle de MAP2A est plus tardive. MAP2C, identifiée par l'équipe de Matus (Doll *et al.*, 1993), possède une masse moléculaire apparente d'environ

70 kDa et s'exprime au cours de la vie embryonnaire dans les neurones en croissance. MAP2D (65-70 kDa) s'exprime préférentiellement dans les cellules gliales mais est également présente dans le corps cellulaire des neurones adultes (Ferhat *et al.*, 1998).

MAP4 est une protéine thermostable d'environ 210 kDa, exprimée ubiquitairement dans les cellules non neuronales (Bulinski et Borisy, 1980 ; Parysek *et al.*, 1984). Elle semble jouer un rôle dans la régulation de l'assemblage des microtubules et dans la synthèse de la tubuline (Nguyen *et al.*, 1999).

b) *Tau*

Tau, qui appartient également à la famille des MAPs structurales, est la protéine qui est présente sous une forme hyperphosphorylée dans les dégénérescences neurofibrillaires.

Tau est codée par un gène unique, situé sur le chromosome 17 chez l'homme, et son ARN pré-messager subit plusieurs épissages alternatifs au niveau des exons 2, 3 et 10 qui génèrent six isoformes majeures de 352 à 441 acides aminés. L'hétérogénéité des Tau augmente fortement au cours du développement : plus de 60 isoformes peuvent être mises en évidence par électrophorèse bidimensionnelle dans le cerveau d'une souris adulte (Larcher *et al.*, 1992). Cette hétérogénéité protéique repose sur l'épissage alternatif du gène unique et de nombreuses phosphorylations. Ces isoformes sont différenciellement exprimées au cours du développement et dans différents neurones chez l'adulte (Buée *et al.*, 2000 ; Lee, V. M. *et al.*, 2001). L'interaction entre les protéines Tau et la tubuline est réalisée par trois à quatre domaines répétitifs imparfaits codés par les exons 9-12. L'épissage alternatif de l'exon 10 génère des isoformes contenant 3 ou 4 domaines de liaison (3R ou 4R) qui sont présentes dans le cerveau adulte avec une stœchiométrie 1:1.

Les protéines Tau présentent de très nombreux sites de phosphorylation qui sont presque tous localisés dans le domaine de projection. Beaucoup de kinases sont impliquées dans la phosphorylation des Tau : les MAP kinases, la GSK-3 β , cdk2 et cdk5 ou bien encore la CAM Kinase II, les PKA ou la caséine kinase II. D'un autre côté les protéines phosphatase PP1, PP2A, PP2B déphosphorylent les protéines Tau.

Cependant, si de nombreuses kinases phosphorylent *in vitro* les Tau au niveau de sites retrouvés dans la maladie d'Alzheimer, seules deux kinases ont été copurifiées avec les

microtubules sur des homogénats de cerveaux (Flaherty *et al.*, 2000) : la GSK3 β (Grimes et Jope, 2001) et cdk5 (Maccioni *et al.*, 2001).

L'hyperphosphorylation des Tau pourrait également impliquer une inhibition des phosphatases comme la PP2A, ce qui serait à rapprocher des études qui ont montré que la quantité d'ARN messager de PP2A diminue dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Vogelsberg-Ragaglia *et al.*, 2001). De même, des souris transgéniques pour une forme dominante négative de la sous-unité catalytique de PP2A présente une hyperphosphorylation des protéines Tau (Kins *et al.*, 2001).

c) *Les MAP motrices*

Il existe deux grandes familles de protéines motrices dont l'activité d'hydrolyse de l'ATP permet des changements de conformations aboutissant à un déplacement sur le microtubule. Par l'interaction des protéines motrices avec d'autres protéines le mouvement des moteurs moléculaires permet le déplacement de vésicules et d'organites le long des microtubules (Hirokawa, 1998).

Les kinésines sont les moteurs moléculaires qui parcourent les microtubules de leur extrémité (-) vers leur extrémité (+). Les kinésines sont par exemple responsables du transport des vésicules jusqu'à leur lieu de sécrétion. Elles sont également impliquées dans le transport des organelles (Coy et Howard, 1994), de complexes protéiques (Hirokawa, 1998) et d'ARN messagers (Brendza *et al.*, 2000). Elles interviennent également dans la migration des chromosomes et les mouvements du fuseau lors de la mitose et de la méiose (Rogers. *et al.*, 2000 ; Walczak et Mitchison, 1996 ; Sperry et Zhao, 1996).

Les dynéines sont les moteurs moléculaires qui se déplacent sur les microtubules depuis l'extrémité (+) vers l'extrémité (-). Les dynéines forment d'importants complexes macromoléculaires qui résultent de l'association entre plusieurs chaînes lourdes, des chaînes intermédiaires et des chaînes légères (Pour revue voir Holzbaur et Vallée, 1994 ; Asai et Koonce, 2001). Les chaînes lourdes portent l'activité motrice et contiennent le site d'hydrolyse de l'ATP. Les chaînes légères seraient impliquées dans l'assemblage du complexe moteur et cibleraient les molécules à transporter (Barbar *et al.*, 2001). Quant aux chaînes intermédiaires, elles lient le complexe dynactine qui est indispensable au transport des vésicules par les dynéines (Karki et Holzbaur, 1995).

4) Le contrôle pharmacologique des microtubules

Les microtubules sont sensibles à l'action de certaines drogues (colchicine, nocodazole, vinblastine, taxol, ...) qui perturbent leur dynamique.

La colchicine se fixe sur les hétérodimères de tubuline libres, empêchant ainsi leur incorporation dans les microtubules.

Le nocodazole, un agent antimitotique, fixe la tubuline libre et catalyse l'hydrolyse du GTP au site E tout en empêchant l'incorporation des dimères dans les microtubules, bloquant ainsi leur polymérisation.

La vinblastine, à forte concentration, induit la formation d'agrégats de tubuline et provoque ainsi la dépolymérisation des microtubules. A faible concentration, aucune dépolymérisation des microtubules n'est observée (Jordan et Wilson, 1998).

Le taxol, qui se fixe sur la sous-unité β de la tubuline (Nogales, 1999), stimule la polymérisation des microtubules cytoplasmiques *in vitro* et *in vivo*. Il déplace ainsi l'équilibre vers le polymère. Le taxol mime les effets des MAPs, mais n'inhibe pas leur association avec les microtubules. A ce jour, aucune compétition entre le taxol et les MAPs n'a été montrée, même à des concentrations élevées de taxol (100 μ M). Le taxol et les MAPs occuperaient donc des sites distincts sur les microtubules (Vallée, 1982).

Chapitre VI :

La stathmine et sa famille

Chapitre VI : La stathmine et sa famille

I La famille multigénique de la stathmine

1) Stathmine

La stathmine est une petite phosphoprotéine de 17 kDa ubiquitaire dont l'expression et la phosphorylation sont régulées en réponse à des signaux extracellulaires et qui sert donc de relais (« stathmos » en grec) dans les voies de transduction intracellulaires.

Deux études distinctes ont permis en même temps d'identifier la stathmine au début des années 80 (Schubart, 1982 ; Sobel et Tashjian, 1983). De nombreuses autres études ont suivi, et la stathmine reçu de nombreux noms : P19 (Pasmantier *et al.*, 1986) pp20/pp21/pp23 (Peyron *et al.*, 1989), prosoline (Cooper *et al.*, 1989), Oncoprotéine 18 (Op18) (Hailat *et al.*, 1990), métablastine (Schubart *et al.*, 1992) et Lap18 (Mock *et al.*, 1993).

La stathmine est une protéine de 149 acides aminés dont 47% de résidus chargé lui conférant des propriétés de solubilité et de résistance à l'ébullition. (Sobel *et al.*, 1989).

Du point de vue structural, la stathmine peut être découpée en grandes régions : une région N-terminale, une région riche en proline et deux hélices alpha séparées par une courte séquence (Redeker *et al.*, 2000 ; Steinmetz *et al.*, 2000).

2) Les autres membres de la famille

La stathmine est le premier membre d'une famille multigénique de protéines apparentées. Le gène STMN1 code pour la stathmine. Le gène STMN2 code pour SCG10 qui est la première protéine identifiée comme apparentée à la stathmine (Schubart *et al.*, 1989) et a été impliquée dans la différenciation neuronale (Stein *et al.*, 1988). Le gène STMN3 code pour SCLIP qui a été découvert dans les EST de souris (Ozon *et al.*, 1998). Enfin le gène STMN4 code pour des variants d'épissage RB3/RB3'/RB3'' (Maucuer *et al.*, 1993 ; Ozon *et al.*, 2002). Toutes ces protéines apparentées à stathmine présentent des caractéristiques communes mais divergent par la présence d'extensions N-terminales diverses (Figure 13).

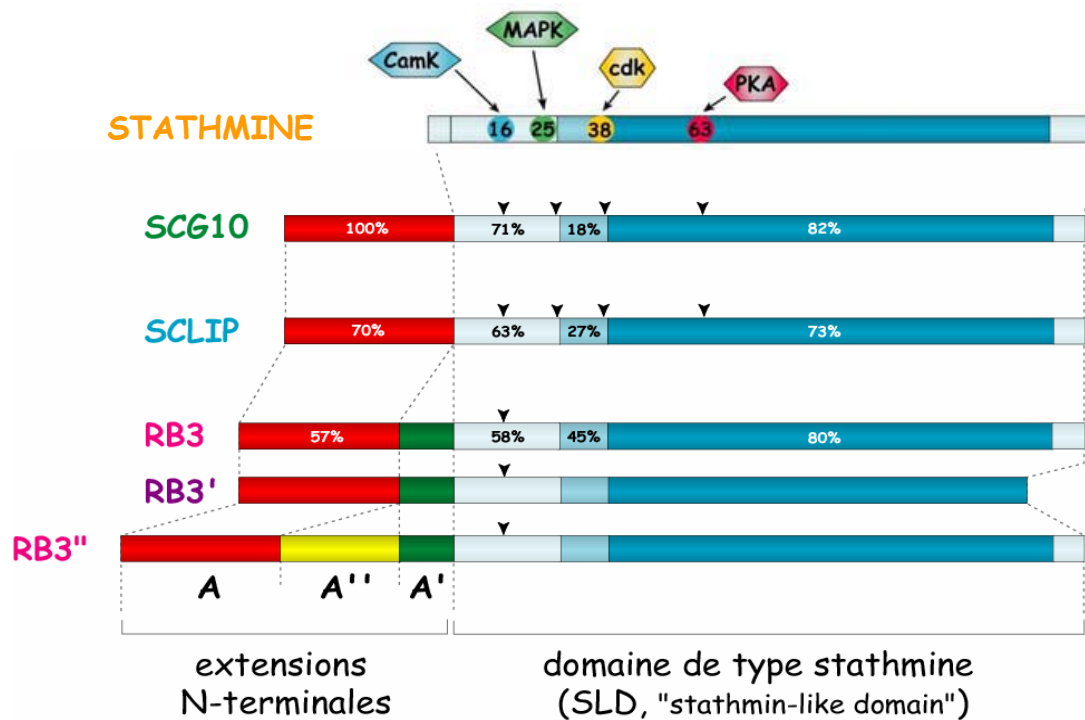


Figure 13 : Les différentes protéines de la famille de la stathmine chez les mammifères. Il existe dans le domaine de type stathmine un domaine régulateur contrôlé par phosphorylation et un domaine d'interaction. Les extensions N-terminales sont responsables d'une localisation membranaire des différentes protéines. (d'après Gavet *et al.*, 1998)

Chez les mammifères, toutes les protéines de la famille ont un domaine de type stathmine ou SLD (Stathmin like domain) plus une région N-terminale variable (Gavet *et al.*, 1998). Le domaine SLD présente de 66 à 73% d'identité avec la stathmine (Ozon *et al.*, 1997). Au sein du SLD on peut distinguer différents sous-domaines qui présentent eux aussi des pourcentages d'homologie variables par rapport à la stathmine. Les divergences et les homologies de ces sous-domaines des membres de la famille de la stathmine ont vraisemblablement des conséquences structurales et fonctionnelles.

Les extensions N-terminales des protéines apparentées à la stathmine possèdent également des sous-domaines ayant des homologies entre elles. La présence de nombreux acides aminés hydrophobes et de deux cystéines palmitoylables (Di Paolo *et al.*, 1997) en font des protéines liées à la membrane, facilement agrégeables, insolubles et difficilement purifiables (Antonsson *et al.*, 1997).

II Expression des membres de la famille

La stathmine est une protéine d'expression ubiquitaire qui est particulièrement abondante dans le système nerveux et les testicules (Schubart *et al.*, 1989 ; Guillaume *et al.*, 2001). Des analyses par RT-PCR quantitative, hybridation in situ et Northern-blot des transcrits des autres membres de la famille ont montré que SCG10 RB3 et SCLIP sont exclusivement exprimés dans le système nerveux (Ozon *et al.*, 1998 ; Bieche *et al.*, 2003), bien que pour SCLIP cette restriction au système nerveux ait été remise en question et cette protéine présenterait un profil plus proche de celui de stathmine (Bieche *et al.*, 2003).

L'expression des protéines de la famille de la stathmine augmente progressivement dans l'embryogenèse pour atteindre un pic à la naissance. Alors que SCLIP et RB3 restent inchangés tout au long de la vie, les taux de SCG10 et de stathmine diminuent au cours du temps (Ozon *et al.*, 1998).

Dans le cerveau, le niveau d'expression des membres de la famille de la stathmine montre des différences d'expression au sein des différentes régions du cerveau. Le cervelet, le colliculus et le striatum présentent de fortes quantités de protéines des membres de la famille de stathmine. De façon plus spécifique, stathmine est particulièrement abondante dans le cortex, le bulbe olfactif et la zone sous-ventriculaire (Peschanski *et al.*, 1993 ; Jin, K. *et al.*, 2004). SCG10 est retrouvé principalement dans l'hippocampe et le cervelet, tout comme SCLIP dont l'expression est très similaire. RB3 et ses variants d'épissage présentent une distribution plus particulière avec un fort taux dans l'hippocampe et une très faible expression corticale (Ozon *et al.*, 1999). De façon intéressante, l'expression de stathmine et de SCG10 au sein du cerveau semble correspondre aux régions où la plasticité neuronale est forte et où il a été observé de la régénérescence neuronale adulte (Camoletto *et al.*, 2001). Les taux de SCG10 semblent diminuer avec la plasticité neuronale et il a été montré que l'ARNm de RB3 augmente dans le gyrus denté pendant la LTP (Beilharz *et al.*, 1998 ; Mori et Morii, 2002).

Ce sont exclusivement des neurones qui expriment SCLIP et SCG10 mais RB3 et stathmine s'expriment également dans les cellules gliales (Chneiweiss *et al.*, 1989 ; Peschanski *et al.*, 1993 ; Ozon *et al.*, 1999).

De toutes les protéines de la famille seule la stathmine est cytoplasmique (Gavet *et al.*, 1998). Les autres protéines sont associées aux membranes (Ozon *et al.*, 1997) principalement au niveau de l'appareil de Golgi et autour du noyau mais également le long de l'axone et dans

les cônes de croissance. Cet adressage est sans doute régulé par la partie N-terminale comme cela a été montré pour SCG10 par la palmitoylation de deux cystéines (Di Paolo *et al.*, 1997).

III La phosphorylation des protéines de la famille de stathmine

Il existe 4 sites de phosphorylation de stathmine dans la moitié N-terminale. La phosphorylation de ces différents sites se fait de manière combinatoire par l'action de différentes kinases en réponse à des stimuli extracellulaires (Sobel, 1991).

L'électrophorèse bidimensionnelle a montré que les 4 sérines 16, 25, 38 et 63 sont phosphorylables *in vivo* et que toutes les combinaisons de phosphorylation existent (Beretta *et al.*, 1993) (Figure 14).

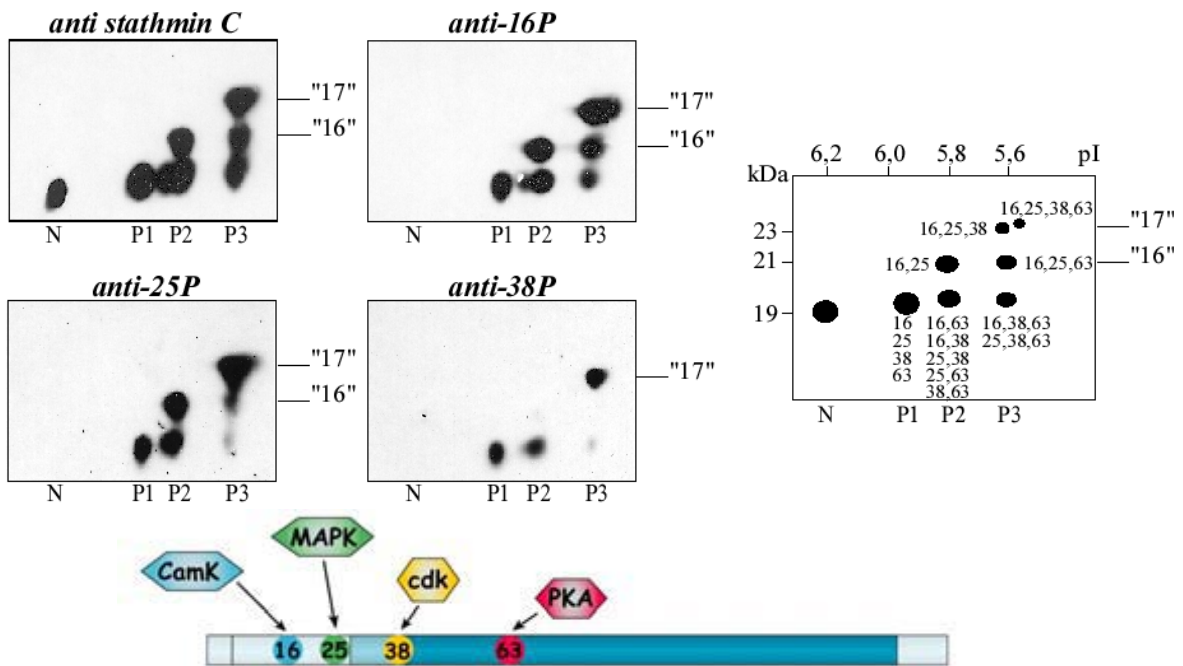


Figure 14 : Analyse par électrophorèse sur gel à 2 dimensions de l'état de phosphorylation de la stathmine. Les formes de point isoélectrique décroissant sont des formes de plus en plus phosphorylées comme cela est montré avec des anticorps spécifiques des sites de phosphorylation. Le schéma de droite récapitule le profil de migration de la stathmine en fonction de son état de phosphorylation sur ses différentes sérines.

La phosphorylation de la sérine 16 peut être due à des protéines kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline comme la CaMK IV et la CaMK II (Marklund *et al.*, 1994 ; Melander Gradin *et al.*, 1997 ; Le Gouvello *et al.*, 1998). Cette phosphorylation en position 16 entraîne une dégradation rapide de la stathmine ; en effet l'activation constitutive de la CaMK IV entraîne une forte baisse de sa demie-vie (Melander Gradin *et al.*, 1997). La sérine 25 est la cible préférentielle des MAP Kinases *in vitro* et *in vivo* (Marklund *et al.*, 1993 ; Le

Gouvello *et al.*, 1998) en réponse à de nombreux stimuli de stress. La sérine 38 est un site qui semble être phosphorylé de façon basale et peut être phosphorylée par cdc2 (Beretta *et al.*, 1993 ; Marklund *et al.*, 1993).

La sérine 63 est la cible de la protéine kinase A (PKA). Ainsi, les 4 sites de phosphorylation de stathmine sont activés par différentes kinases permettant une grande variété de régulations de l'activité de la protéine.

SCG10 possède également un profil de phosphorylation complexe sur 4 sites (Antonsson *et al.*, 1998). Les principales kinases phosphorylant SCG10 sont la PKA, les MAP kinases - dont JNK3 qui présente une spécificité pour SCG10 - cdc2 et la CaMK II *in vitro* (Antonsson *et al.*, 1998). Récemment, il a été montré que la phosphorylation de la sérine 50 ne module pas la capacité de liaison de SCG10 aux hétérodimères contrairement à la sérine 97 (Togano *et al.*, 2005).

La phosphorylation de SCLIP et de RB3/RB3'/RB3'' n'a pas été étudiée à ce jour et les seules hypothèses existantes se basent sur les homologues de séquences mais une régulation par phosphorylation n'est pas à exclure. La sérine 63 de stathmine est remplacée par une thréonine dans SCLIP et par une tyrosine dans RB3. Les sérines 25 et 38 de stathmine n'ont pas d'équivalent bien conservé dans SCLIP et RB3.

Seule la sérine 16 présente une conservation dans le SLD de tous les membres de la famille de stathmine et suggère un rôle de régulation commune de toutes les formes par la phosphorylation dans cette position.

IV Les fonctions de la famille de stathmine

1) La Stathmine lie les hétérodimères de tubuline

En 1996, la stathmine a été purifiée comme étant une protéine capable d'induire des catastrophes *in vitro* (Belmont et Mitchison, 1996). Les auteurs ont proposé que la stathmine soit un promoteur de catastrophes et qu'elle soit directement impliquée dans la dynamique des microtubules par sa liaison aux tubulines.

Il a été depuis proposé que stathmine provoque des catastrophes par la séquestration de la tubuline (Curmi *et al.*, 1997). En effet, stathmine agirait directement sur la tubuline libre et non sur les microtubules. Des expériences d'ultracentrifugation analytique (Jourdain *et al.*, 1997), de résonance plasmonique de surface (Curmi *et al.*, 1997), ou encore de radio-

cristallographie du complexe (Gigant *et al.*, 2000) ont montré l'existence d'une interaction directe tubuline/stathmine. Il est désormais accepté que la stathmine séquestre la tubuline dans un complexe non polymérisable formé d'une molécule de stathmine et de deux hétérodimères de tubuline (complexe T₂S) (Curmi *et al.*, 1997 ; Jourdain *et al.*, 1997)

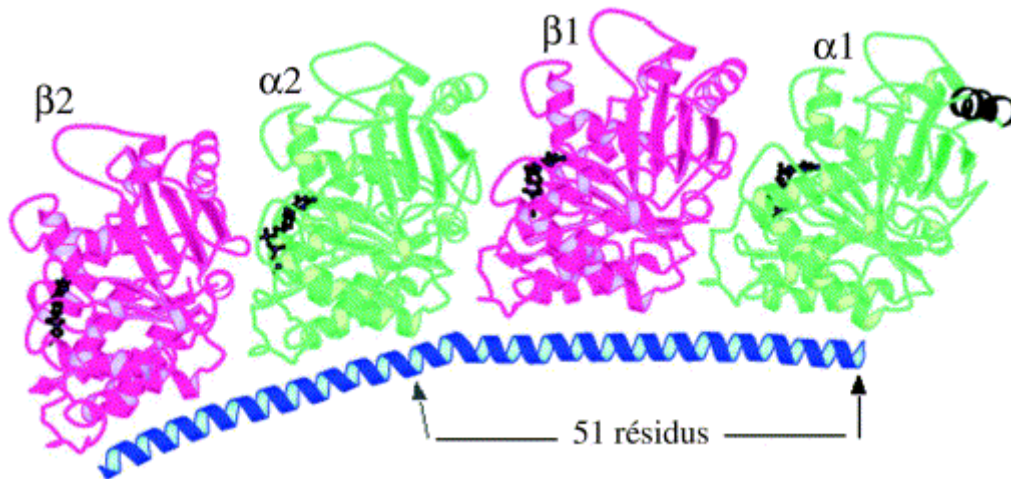


Figure 15 : Structure obtenue par radio-cristallographie du complexe T₂S (D'après Gigant *et al.*, 2000).

Comme la stathmine, les autres protéines de la famille ont la capacité de lier les hétérodimères de tubuline et ainsi de déstabiliser les microtubules. La surexpression de SCLIP, SCG10, RB3, RB3' et RB3'' dans les cellules Hela induit la dépolymérisation des microtubules proportionnellement au niveau de surexpression (Gavet *et al.*, 1998).

2) Le rôle de la phosphorylation de stathmine sur sa fonction

Les études du rôle de la phosphorylation de la stathmine ont été réalisées par phosphorylation *in vitro* ou par l'utilisation de mutants constitutivement phosphorylés ou non-phosphorylables. Des expériences de pontage ont montré que la stathmine phosphorylée sur ses quatre sites n'interagit plus avec la tubuline (Larsson *et al.*, 1997). La recherche des sites important pour cette perte de fonction a montré que la phosphorylation simultanée des sites 25 et 38 n'altère que peu l'interaction avec la tubuline alors que la phosphorylation des sérines 16 et 63 l'inhibe presque totalement (Larsson *et al.*, 1997 ; Melander Gradin *et al.*, 1998). Les tests de polymérisation *in vitro* de la tubuline montrent que la phosphorylation de la stathmine inhibe sa capacité à limiter la polymérisation. Le fait que chacune des

phosphoformes inhibe l'action de la stathmine sur la polymérisation de la tubuline constitue un argument de plus en faveur de la séquestration de la tubuline.

La phosphorylation de la stathmine altère donc sa capacité à séquestrer la tubuline et constitue un moyen de régulation de l'action de stathmine sur les microtubules.

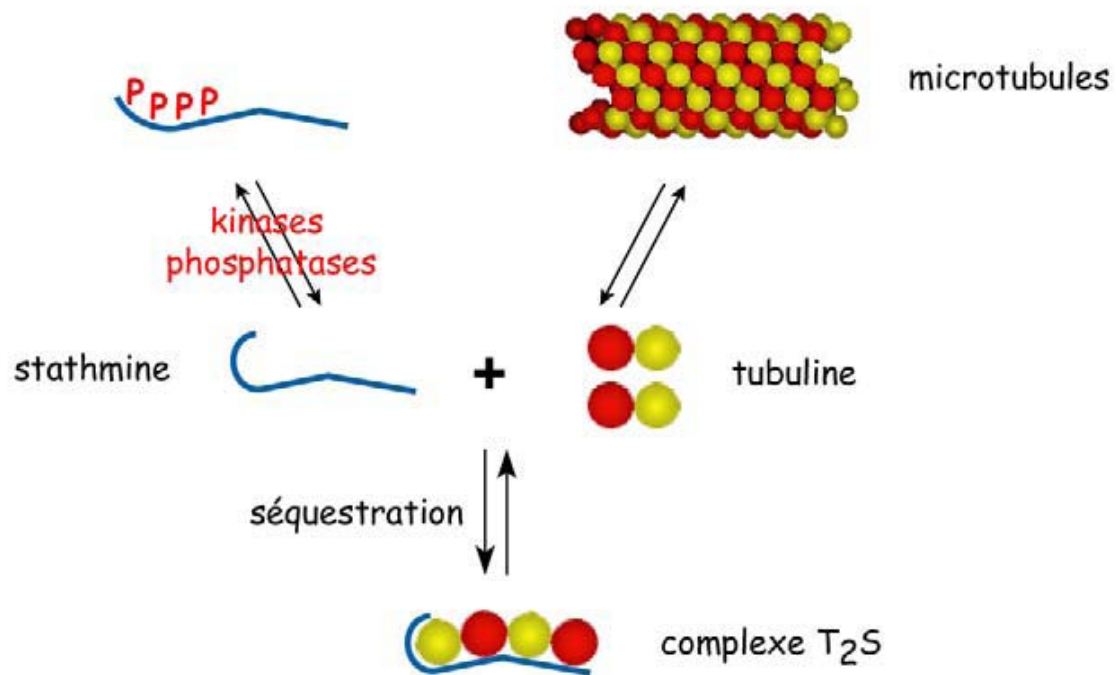


Figure 16 : Modèle d'action de la stathmine par interaction avec la tubuline libre : le domaine de type stathmine lie deux dimères de tubuline ce qui par séquestration entraîne la dépolymérisation des microtubules. Quand la stathmine est hyperphosphorylée elle interagit moins fortement avec la tubuline et ne joue plus de rôle sur le pool de tubuline libre.

3) Rôle fonctionnel de l'interaction stathmine tubuline

La fonction de séquestration de la tubuline par les protéines de la famille de la stathmine confère un rôle à ces protéines dans différentes fonctions physiologiques et pathologiques. Un certain nombre de données indiquent que la stathmine est impliquée dans le bon déroulement du cycle cellulaire. En effet, des tentatives d'inhibition de l'expression de la stathmine à l'aide de nucléotides anti-sens ont un effet anti-prolifératif dû à un blocage en phase G2/M (Jeha *et al.*, 1996).

Chez l'homme, la surexpression de stathmine est retrouvée dans de nombreux cancers (leucémies (Hanash *et al.*, 1988), carcinomes, lymphomes, neuroblastomes, ...). A ce jour, on ne connaît ni les raisons ni les conséquences de ces modifications.

Afin d'explorer les fonctions de stathmine, son gène a été invalidé chez la souris. De façon surprenante, les animaux ne présentent pas de phénotype particulier. Les souris se développent sans retard de croissance, sont fertiles, n'ont pas de défauts neurologiques et ne développent pas plus de tumeurs que les animaux sauvages (Schubart *et al.*, 1996). Il est possible que l'absence de phénotype soit due à une compensation par d'autres membres de la famille cependant SCG10 ne semble pas surexprimé chez ces animaux (Schubart *et al.*, 1996).

Un phénotype apparaît pourtant chez ces souris quand elles sont âgées. Elles développent une axonopathie dans les systèmes nerveux central et périphérique, ce qui suggère un rôle de la stathmine dans l'intégrité axonale (Liedtke *et al.*, 2002).

L'inactivation du gène de la stathmine dans l'embryon de drosophile provoque en revanche des phénotypes beaucoup plus délétères, probablement en raison de l'absence de redondance. Les mouches présentent un défaut de migration des cellules germinales et d'importantes anomalies du système nerveux associées à des défauts de migration et de guidage axonal (Ozon *et al.*, 2002).

Dans la maladie d'Alzheimer, la concentration de stathmine diminue alors que la quantité de son ARNm augmente (Jin *et al.*, 1996 ; Cheon *et al.*, 2001). Ce phénomène est sans doute dû à une diminution de l'activité traductionnelle. La diminution de la stathmine semble inversement proportionnelle à la quantité de dégénérescences neurofibrillaires, mais pas au nombre de plaques séniles. A l'inverse, les niveaux de SCG10 augmentent avec la quantité de dégénérescences neurofibrillaires (Okazaki *et al.*, 1995). Bien que les mécanismes moléculaires restent inconnus, ces résultats suggèrent un rôle de protéines de la famille de stathmine dans la formation des dégénérescences neurofibrillaires.

Objectifs de l'étude

Le dérèglement du métabolisme de l'APP et l'accumulation de peptide amyloïde dans le cerveau entraîne des perturbations cellulaires aboutissant à des pertes synaptiques et des pertes neuronales évoluant vers la maladie d'Alzheimer.

L'élucidation des effets et des mécanismes d'action du peptide A β dans des modèles des différents stades de la maladie est nécessaire pour la compréhension de la pathologie.

Le but de mon travail de thèse est de caractériser différents effets des peptides amyloïdes et de comprendre leurs mécanismes d'action à l'aide de différentes approches expérimentales. Cette étude comprend trois travaux différents :

Dans un premier temps, l'objectif est de comparer par des techniques électrophysiologiques les effets de deux formes de peptides amyloïdes, le peptide A β (1-40) et le peptide A β (25-35), sur les courants des canaux calciques voltage-dépendants des neurones pyramidaux du champ CA1 de l'hippocampe de souris adultes. Ce travail a pour but de séparer les effets pathologiques des peptides amyloïdes représentés ici par le peptide A β (25-35) des éventuels effets physiologiques du peptide A β (1-40) utilisé à de faibles concentrations.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets aigus d'une application de peptide A β (1-42) soluble sur la transmission synaptique excitatrice dans le cervelet de souris. Le but principal de ce travail est de montrer les effets d'une application courte de peptide A β (1-42) sous forme soluble sur l'activité de la synapse fibre parallèle/cellule de Purkinje dans une préparation de tranches de cervelet de souris. L'étude porte aussi bien sur l'activité évoquée que l'activité spontanée. Les voies moléculaires mises en jeu sont également étudiées avec l'utilisation d'agents pharmacologiques.

Dans un troisième temps, l'objectif est de caractériser les modifications du cytosquelette de tubuline au cours de l'apoptose neuronale induite par le peptide A β (25-35) aussi bien au niveau cellulaire par des techniques d'immunocytochimie qu'au niveau moléculaire par des techniques biochimiques.

Résultats

Sujet 1 :

Effets des peptides A β sur les courants calciques dans des tranches d'hippocampe de souris adultes

Article I : "A β (25-35) and A β (1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons."

Rovira C., Arbez N. and Mariani J. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Sep 6; 296(5):1317

Sujet 2 :

Effets des peptides A β sur l'activité synaptique excitatrice de la synapse fibres parallèles/cellule de Purkinje

Article II : " β -amyloid (1-42) induced postsynaptic reduction in the AMPA synaptic responses of cerebellar Purkinje cells: involvement of pro-inflammatory processes."

Arbez N., Gautheron V., Brugg B., Mariani J. and Rovira C. Soumis à J Neurosci Res

Sujet 3 :

Modifications des tubulines dans l'apoptose neuronale induite par le peptide A β (25-35)

Article III : " β -amyloid induces a cytoplasmic specific aggregation of class III β -tubulin *ex vivo*."

Arbez N., Larcher J.C., Ozon S., Lachkar S., Mariani J., Miquel M.C. et Brugg B. *En préparation*

Sujet Annexe 1 :

Apoptose induite par le peptide Prion PrP106-126

Article IV : "Activation of the JNK/c-Jun pathway during the early phase of neuronal apoptosis induced by PrP106-126 and prion infection."

Carimalo J., Cronier S., Petit G., Peyrin J.-M., Boukhtouche F., Arbez N., Lemaigre-Dubreuil Y., Brugg B. and Miquel M.-C. European Journal of Neuroscience 2005 May, 21 (9), 2311-2319

Sujet Annexe 2 :

Protection par l'IGF-1 contre la mort neuronale induite par le céramide.

Article V : "IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis via activation of the PI-3K/Akt pathway, independent of CREB/Bcl-2."

Willaime-Moraveck S., Arbez N., Mariani J. and Brugg B. Sous presse pour Molecular Brain Research 2005

Sujet 1 :

Effets des peptides A β sur les
courants calciques dans des
tranches d'hippocampe de souris
adultes

Rovira C., Arbez N. and Mariani J.

“A β (25-35) and A β (1-40) act on different calcium channels
in CA1 hippocampal neurons.”

Biochem Biophys Res Commun. 2002 Sep 6 ; 296(5):1317

Sujet I –

Effets aigus des peptides amyloïdes sur les courants calciques de cellules pyramidales de l'hippocampe

I Objectifs

Les oligomères de peptide A β peuvent avoir une toxicité directe sur les neurones aussi bien que des effets indirects comme par exemple la déstabilisation de l'homéostasie calcique. Ils représentent les premières formes toxiques retrouvées dans le cerveau avant même l'apparition des plaques séniles.

De nombreux groupes ont déjà montré que le peptide peut avoir des effets sur les courants calciques mais les résultats observés diffèrent d'une étude à l'autre.

La grande diversité d'effets déjà décrits des peptides amyloïdes sur les courants de canaux calciques vient du fait que les peptides utilisés, la concentration, l'état d'agrégation ainsi que le type de préparation utilisés changent d'une étude à l'autre. Ainsi, le peptide A β (1-40) a pour effet d'augmenter les courants des canaux de type N et P sur des neurones corticaux (Macmanus *et al.*, 2000) mais n'augmente que les courants des canaux N sur les grains (Price *et al.*, 1998) et des canaux L sur les cellules de neuroblastome (Ekinici *et al.*, 1999). Les autres formes du peptides ont également été décrites comme pouvant avoir des effets différents voir contradictoires selon la préparation utilisée. La concentration de peptide utilisée amène aussi à des résultats divergents.

L'objectif de ce premier travail est de comparer les effets de deux formes de peptides amyloïdes, le peptide A β (1-40) et le peptide A β (25-35), sur les courants des canaux calciques voltage-dépendants des neurones pyramidaux du champ CA1 de l'hippocampe de souris adultes.

L'intérêt majeur de ce travail repose sur différents facteurs :

- la comparaison des effets de deux types de peptides ayant des propriétés pathologiques différentes. Nous avons étudié les effets des formes solubles de l'A β (25-35) d'une part et de l'A β (1-40) d'autre part. En effet, aucun protocole d'agrégation n'étant

effectué, les formes utilisées sont des formes solubles oligomériques. Cette forme d'A β (1-40) est retrouvée de façon physiologique dans le cerveau et le liquide céphalo-rachidien. En revanche, le peptide A β (25-35) est un peptide synthétique qui est très toxique quelque soit son état d'agrégation. Nous avons donc comparé ici un peptide non toxique et un peptide toxique sur le même type de préparation. Nous pouvons ainsi séparer les effets pathologiques des peptides amyloïdes représentés ici par le peptide A β (25-35) des éventuels effets physiologiques du peptide A β (1-40).

- la concentration de peptide utilisée est faible et proche des concentrations physiologiques. En effet, la concentration d'A β dans le LCR est de l'ordre de la dizaine de nanomolaire (Schoonenboom *et al.*, 2005) et de quelques dizaines de microgrammes par grammes de tissus (McLean *et al.*, 1999). Là encore, les études précédentes décrivant les effets des peptides amyloïdes sur les courants calciques utilisaient des concentration de peptide nettement plus élevées.

- l'utilisation de tranches d'hippocampes de souris adultes plutôt que de nouveaux-nés. En effet, de nombreuses études utilisent soit des cellules en culture primaire soit des tranches de cerveau de souris nouveau-nées ou très jeunes. Dans le développement post-natal, en plus des changements dans la taille des structures, il existe entre autre des modifications structurales et fonctionnelles de canaux ioniques, il est donc important d'étudier les effets des peptides amyloïdes dans un contexte adulte.

II Résultats

Les résultats de ce travail expérimental sont présentés dans l'article « A β (25-35) and A β (1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons » Rovira C., **Arbez N.** and Mariani J. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Sep 6; 296(5):1317



A β (25–35) and A β (1–40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons

Catherine Rovira,* Nicolas Arbez, and Jean Mariani

*Neurobiologie des Processus Adaptatifs, UMR 7102, CNRS et Université Pierre et Marie Curie,
Lab. Développement et Vieillessement du Système
Nerveux, 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France*

Received 26 July 2002

Abstract

The acute effects of β -amyloid (25–35) and (1–40) on high voltage activated calcium channels were compared in CA1 pyramidal cells of adult mouse hippocampal slices using the whole-cell patch-clamp recording. Bath application of oligomeric β -amyloid (25–35) reversibly increased the barium current (I_{Ba}) to 1.61 (normalized amplitude), while oligomeric β -amyloid (1–40) reversibly enhanced the I_{Ba} to 1.74. Reverse-sequence β -amyloid [(35–25) and (40–1)] had no effect. The effect of β -amyloid (25–35) was blocked by nifedipine, a selective antagonist of L-type calcium channels. In contrast, the effect of β -amyloid (1–40) was not blocked by nifedipine and I_{Ba} was enhanced to 4.96. It is concluded that these oligomeric peptides may act through different types of calcium channels and/or receptors. The toxicity of A β (25–35) implicates a potentiation of L-type calcium channels while the one of A β (1–40) is related to an increase of non-L-type calcium channels, which may involve an increase in transmitter release. © 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: β -Amyloid; Calcium channels; Hippocampus; Alzheimer

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder that affects cognitive brain function of the brain. Pathological changes in Alzheimer's disease include the formation of amyloid plaques and neurofibrillar tangles and extensive neuronal loss, especially in the cortex and hippocampus [1,2]. Amyloid plaques, which accumulate extracellularly, are composed of aggregated β -amyloid peptides [3,4]. These 40–43 amino acid peptides are generated by alternate cleavage from the larger "amyloid precursor protein" [5,6]. Increased secretion of β -amyloid peptides (A β) has been associated with Alzheimer's disease [1] and it has been shown that in cell cultures A β in the micromolar range may be cytotoxic [7,8]. A β (25–35) is toxic in both the aggregated and soluble states [7]. Moreover, oligomeric A β (1–40) or A β (1–42) induces neuronal cell death in the nanomolar range [9,10]. Interestingly, A β oligomers were found to be naturally secreted and they inhibit long-term potentiation in the hippocampus [11]. A β peptides may be

directly toxic to neurones in culture or potentiate neuronal vulnerability to excitatory neurotoxins (e.g., [12,13] and destabilize calcium homeostasis [13,14]. These effects may derive from the formation of ion channels within the cell membrane by A β , fostering direct leakage of calcium into cells [15,16]. Additional studies indicate a role for calcium channels in mediating A β actions on neurons, as A β induced neurodegeneration can be prevented by the application of L-type calcium channel blockers ([17,18] see however [19]) or Co²⁺, a non-selective calcium channel blocker [18,20]. Electrophysiological studies in cultured cells have shown that a 24 h incubation with micromolar doses of aggregated A β (1–40) and A β (25–35) increased the L-type calcium channel activity [21,22], whereas in cerebellar granule cells and neocortical neurons a 24 h incubation with soluble A β (1–40) increased the non-L-type calcium channel activity [23,24]. The goal of the present experiments was to compare the acute effect on calcium channel activity of the oligomeric β -amyloid peptides, A β (25–35) and A β (1–40), in the nanomolar range, in CA1 adult mouse hippocampal cells. We find that the

* Corresponding author. Fax: +33-1-44-27-22-80.

E-mail address: catherine.rovira@snv.jussieu.fr (C. Rovira).

effect of A β (25–35) but not the effect of A β (1–40) was blocked by nifedipine, a selective blocker of L-type calcium channels.

Methods

SDS-PAGE. To determine whether the A β peptides were oligomeric or monomeric, we performed SDS-PAGE. Aliquot of each chromatographic fraction (20 μ l) was mixed with Tris-HCl SDS sample buffer (10 μ l) and boiled for 10 min, immediately prior electrophoresis (\approx 1 nmol/lane was electrophoresed; [25]) on 4–20% gradient acrylamide/bis-acrylamide gel (BioRad) at 125 V for 1 h. Proteins were visualized by silver staining. Image analysis was performed using Photomat (Microvision Instrument).

Slice preparation. High voltage activated calcium currents were whole-cell recorded from CA1 pyramidal cells in hippocampal slices according to previously published methods [26]. Briefly, hippocampal slices (300 μ m thick) from 2- to 3-month-old mice were cut on a vibratome in cold (4 °C) sucrose saline containing (mM): 3 KCl, 7 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 252 sucrose, and 10 D-glucose. Slices were incubated in a warm (32 °C) oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) normal saline (124 NaCl, 3 KCl, 1.15 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 D-glucose) for 1 h before electrophysiological recordings. A slice was then transferred to the glass bottom of a recording chamber on an upright microscope and superfused with saline at 2 ml min⁻¹. All experiments were performed at room temperature (22 °C).

The whole-cell recording pipettes (2–5 M Ω) were tip-filled with (in mM): 135 CH₃SO₄Cs, 10 Hepes, 5 BAPTA, 5 NaCl, 0.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 4 Mg₂ATP, and 0.2 GTP (pH adjusted to 7.3 with CsOH, 280 mosm). The pipettes were then back-filled with an "ATP regenerating" solution (in mM): 100 CH₃SO₄Cs, 10 Hepes, 5 BAPTA, 5 NaCl, 0.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 4 Mg₂ATP, 0.2 GTP, 12.5 creatine-phosphate, and 25 U ml⁻¹ creatine phosphokinase (pH adjusted to 7.3 with CsOH). The "ATP regenerating" solution was designed to minimize the run-down of the currents. These solutions were aliquoted and kept at –20 °C. An aliquot was used only for one experiment and fresh solutions were made every week. Barium was used as the external charge carrier and barium currents (I_{Ba}) were recorded in the presence of an extracellular recording solution, designed to maximize calcium conductances and inhibit other ionic currents. This solution contained (mM): 100 NaCl, 3 KCl, 1.15 MgCl₂, 2 BaCl₂, 20 TEA, 0.5 4-aminopyridine, 0.001 tetrodotoxin (TTX), 5 CsCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 glucose.

Electrophysiology. CA1 cells lying in the pyramidal cell layer were identified by infrared microscopy. Membrane current was filtered at 1 kHz and recorded using an Axopatch-1D amplifier (Axon Instruments). The holding potential was set to –60 mV and the whole-cell configuration was obtained once a high-resistance seal (>1 G Ω) had been established. At least 70% of the series resistance (R_s) was compensated. R_s tended to increase during the experiments, although compensation was adjusted. The present results include only cells with an initial R_s not exceeding 15 M Ω and no more than 20% increase in R_s was tolerated.

Data were digitized and analyzed using Acquis1 software (CNRS, France). I_{Ba} was evoked by a 150 ms depolarizing step to 0 mV (from a holding potential of –60 mV), at 0.033 Hz. The amplitude was measured at the end of the depolarizing step (steady-state current) and plotted versus time. I_{Ba} was corrected for leakage by subtraction of an appropriately scaled current from a 20 mV hyperpolarizing step.

The current/voltage (I/V) relationship was obtained by stepping from a holding potential of –60 mV to test pulses varying from –80 to +60 mV (150 ms). The maximum I_{Ba} in our conditions was obtained at a test potential of 0 mV. I_{Ba} was normalized to the maximum current amplitude and plotted against the test potential (V_c).

The results are expressed as means \pm SEM differences. Statistical analysis has been done using the Wilcoxon test. $p < 0.05$ was considered indicative of a statistically significant difference.

Drugs. A β (25–35) and A β (1–40) were purchased from Bachem. They were dissolved in distilled water at a concentration of 200 μ M and aliquoted before freezing at –20 °C. The reverse sequences (A β (35–25) and A β (40–1)) obtained from Bachem were prepared in the same way. During the experiment, A β was dissolved in saline at the concentration of 200 nM. Because of lot-to-lot variability, each new batch of A β was tested on the barium current before use. Nifedipine (Sigma) was dissolved in DMSO. The final concentration of DMSO was 0.3% and this concentration when applied alone (data not shown) did not affect I_{Ba} amplitude. TTX was obtained from Latoxan.

Results

SDS-PAGE analysis performed on the 200 μ M stock solution revealed that A β (1–40) and A β (25–35) were oligomeric (4–6 mers for A β (1–40) and 6–8 mers for A β (25–35)). Moreover DMSO, the solvent used in the nifedipine experiments, when added to the stock solution at the concentration of 5‰ (a dilution factor five times superior to that used in the experiment) did not change the oligomeric structure of the A β peptides (data not shown).

A β increased barium current in slices

Depolarizing cells to +20 mV from a holding potential of –60 mV evoked an inward I_{Ba} , which resulted mainly from the activation of high voltage activated calcium channels. Two separate batches of each A β peptide were used in independent experiments and similar results were obtained. Data from both batches were then pooled. No variation in the holding current and input resistance was observed ($p < 0.02$). Regression fits of the data for each cell gave a mean resting conductance of 5.70 ± 0.01 nS for control cells ($n = 56$) and 5.15 ± 0.02 nS for A β treated cells ($n = 53$).

Bath application of A β (25–35) (200 nM) caused an increase in the amplitude of I_{Ba} evoked at +20 mV in 6 out of 10 cells (Fig. 1). This increase (1.61 ± 0.03 , $p = 0.036$, $n = 6$) reversed upon the drug wash-out. However, the increase in I_{Ba} developed slowly and 20 min of bath application was necessary before reaching a steady state, an effect which may be attributed to the slow penetration of A β in the slice or into the cells. A β (1–40) (200 nM) also reversibly increased I_{Ba} evoked at +20 mV (Fig. 2). This increase was observed for 6 of 11 cells and reached 1.74 ± 0.06 ($p = 0.032$, $n = 6$). The activation curves (Figs. 1 and 2) show that A β (25–35) and A β (1–40) caused an apparent voltage-dependent increase in I_{Ba} , with an enhancement of I_{Ba} at the test potentials between 0 and +30 mV. The reverse sequences of A β (A β (35–25), $n = 5$ and A β (40–1), $n = 5$) had no effect on I_{Ba} amplitude (data not shown).

Nifedipine blocked the effect of A β (25–35) but not the effect of A β (1–40)

Nifedipine, a selective blocker of L-type calcium channels, reduced the I_{Ba} amplitude by $20 \pm 2\%$ ($n = 22$,

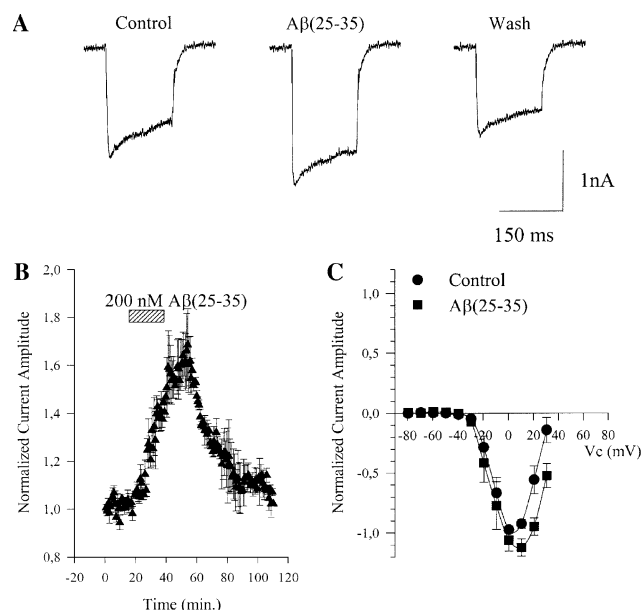


Fig. 1. Effect of A β (25–35) on I_{Ba} amplitude. (A) Individual I_{Ba} traces elicited by a 150 ms depolarizing step to 20 mV from a holding potential of -60 mV before, during, and after a 20 min bath exposure to 200 nM A β (25–35). The traces shown were obtained from the same cell. Tail currents were truncated, since we were interested only in the steady-state current. (B) Time course of the potentiation by A β (25–35) of I_{Ba} amplitude elicited by a depolarizing step to 20 mV. Amplitudes were normalized relative to the 10 min control period, prior to drug application. (C) Current/voltage (I/V) relationships obtained before (filled circles) at the end (filled squares) of exposure to A β (25–35).

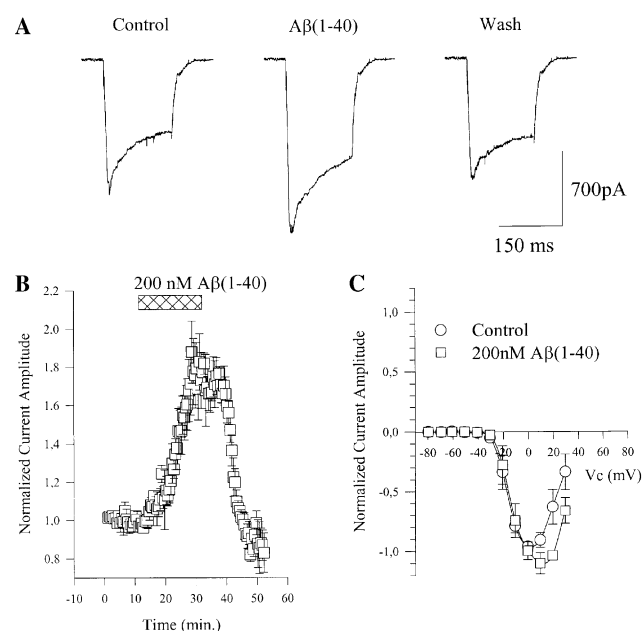


Fig. 2. Effect of A β (1–40) on I_{Ba} amplitude. (A) Individual I_{Ba} traces elicited by a 150 ms depolarizing step to 20 mV from a holding potential of -60 mV before, during, and after a 20 min bath exposure to 200 nM A β (1–40). Traces shown are from the same cell. (B) Time course of the potentiation by A β (1–40) of I_{Ba} amplitude elicited by a depolarizing step to 20 mV. Amplitudes were normalized relative to the 10 min control period, prior to the drug application. (C) I/V relationships obtained before (open circles) and at the end (open squares) of exposure to A β (1–40).

$p < 0.01$, Figs. 3 and 4). In the presence of $10 \mu\text{M}$ nifedipine, A β (25–35) failed to increase the I_{Ba} amplitude (Fig. 3). In contrast, A β (1–40) in the presence of nifedipine caused a large increase in I_{Ba} evoked at $+20$ mV (Fig. 4, 4.96 ± 0.03 , $p = 0.03$) in 8 out of 16 cells. However, this enhancement did not reverse upon A β (1–40) wash-out. The activation curve (Fig. 3) shows that A β (25–35) in the presence of nifedipine did not increase I_{Ba} . On the contrary, A β (1–40) enhanced I_{Ba} at the test potentials between 0 and $+30$ mV (Fig. 4).

Discussion

The main finding of this paper is that adult CA1 hippocampal cells acutely exposed to nanomolar doses of A β peptides (25–35) or (1–40) exhibit an increase in the activity of different calcium channel types. In contrast to previous works [21,23,24,27,28], we have tested the A β peptides in its oligomeric form, a state of aggregation, which precedes the formation of fibrillar A β and plaques. An interesting issue, since the best pathological correlate of dementia is loss of synaptic terminals, which correlate poorly with amyloid load (see [29], for review). Our findings agree with previous work on cultured neurons either incubated with A β peptides in

the micromolar range for 24 h [21,23,24] or acutely exposed to $1 \mu\text{M}$ A β (1–40) [27]. The fact that the cell input conductance did not vary and the absence of increased linear leak current excluded changes in the activity of non-calcium channels, or insertion of non-selective cation channels into the cell membrane, as it has been proposed [15]. However, a zinc-sensitive calcium entry through the calcium channels cannot be excluded [28].

In agreement with previous work [21,23], this increase in I_{Ba} appears voltage-dependent, the increase being obvious only at potentials more positive than 0 mV. These effects could be attributed to electrostatic interaction of A β peptide with the membrane [30] or a decrease in membrane fluidity [31]. The observation that not every cell exhibited an increase to A β peptides suggests that either not every cell was sensitive to A β or those sensitive to one of the peptides (e.g., A β (25–35)) were not affected by the other (e.g., A β (1–40)). Interestingly, it has been shown that A β induces the phosphorylation of calcium channels [22] and an involvement of Go protein has been proposed ([32], see however [12]), suggesting the activation of an unknown receptor.

We also show that the A β (25–35) effect on calcium channels was blocked by nifedipine, a selective blocker of L-type calcium channels, suggesting A β (25–35) increased the L-type calcium channels. In contrast to

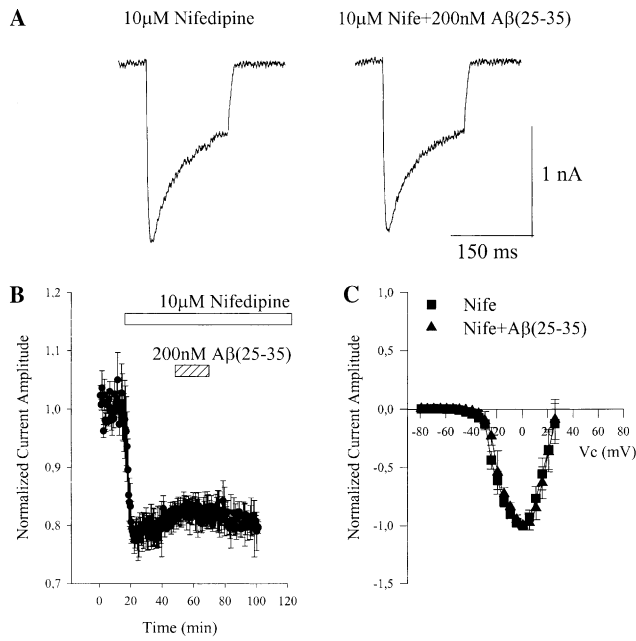


Fig. 3. Effect of A β (25–35) on I_{Ba} amplitude after the blockage of L-type calcium channels by 10 μ M nifedipine. (A) Individual I_{Ba} traces elicited by a 150 ms depolarizing step to 20 mV from a holding potential of -60 mV during exposure to 10 μ M nifedipine and after a 20 min bath exposure to 200 nM A β (25–35) plus 10 μ M nifedipine. Traces are from the same cell. (B) Time course of the effect of nifedipine and of bath exposure to 200 nM A β (25–35) under nifedipine on I_{Ba} amplitude elicited by step depolarization to 20 mV. (C) Current/voltage (I/V) relationships obtained with 10 μ M nifedipine (filled squares) and during exposure to 200 nM A β (25–35) plus 10 μ M nifedipine (filled triangles).

A β (25–35), the A β (1–40) effect was significantly increased by nifedipine, suggesting that A β (1–40) acts on non-L-type calcium channels. It is thus possible that A β (1–40) and A β (25–35) act through different types of receptors. Interestingly, it has been shown that incubation of cerebellar granule cells with soluble A β (1–40) increased the N-type calcium channel activity [23] and the N- and P-type calcium channel activity but not the L-type calcium channel activity in neocortical neurons [24]. However, incubation of neuroblastoma cells either with aggregated A β (1–40) or A β (25–35) induces the phosphorylation of L-type calcium channels [22], suggesting that the increase in L-type channel activity may depend on cell type and the aggregation state of A β peptides. The toxicity of A β , which is particularly attributed to the peptide (25–35) [8,13], is blocked by L-type calcium channel blockers [18], see however [17,19]. Our results raise the possibility that A β (1–40) toxicity would be mediated by an increase in transmitter release [12,13,33,34], since non-L-type calcium channels are involved in transmitter release.

In summary, these results show that in adult CA1 hippocampal pyramidal cells, oligomeric A β (25–35) and A β (1–40) acutely increase in the nanomolar concentra-

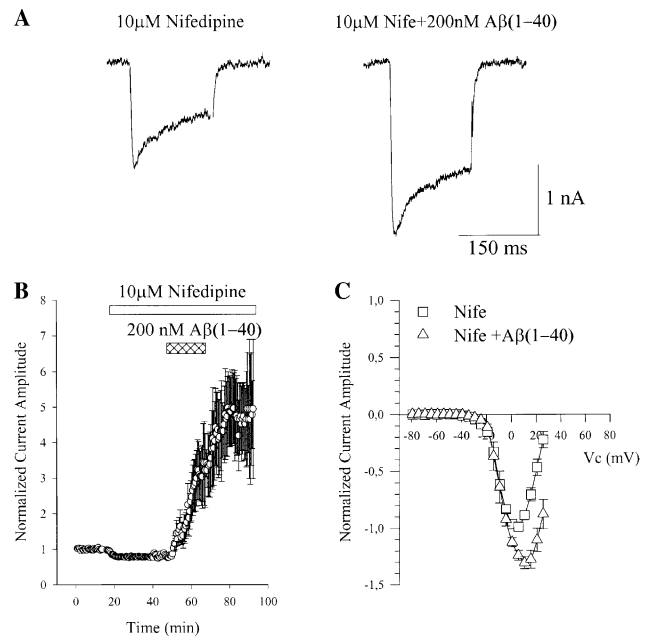


Fig. 4. Effect of A β (1–40) on I_{Ba} amplitude after the blockage of L-type calcium channels by 10 μ M nifedipine. (A) Individual I_{Ba} traces elicited by a 150 ms depolarizing step to 20 mV from a holding potential of -60 mV with 10 μ M nifedipine and after a 20 min bath exposure to 200 nM A β (1–40) plus 10 μ M nifedipine. Traces are obtained from the same cell. (B) Time course of the effect of nifedipine and of 200 nM A β (1–40) plus nifedipine on I_{Ba} amplitude elicited by step depolarization to 20 mV. (C) I/V relationships obtained with 10 μ M nifedipine (open squares) and after exposure to A β (1–40) plus 10 μ M nifedipine (open triangles).

tion for different types of calcium channel activity. The toxic fragment, A β (25–35), increases the L-type calcium channel activity while A β (1–40) increases the non-L-type calcium channels. These data suggest that the mechanism of the destabilization of calcium homeostasis may be different for the two peptides, an action, which could be mediated through different types of receptors.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Ann Lohof for critical reading of the paper. This work has been supported by a grant by Fondation pour la Recherche Medicale.

References

- [1] J. Hardy, D. Allsop, Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease, *TIPS* 12 (1991) 383–388.
- [2] D.J. Selkoe, Normal and abnormal biology of the β -amyloid precursor protein, *Annu. Rev. Neurosci.* 17 (1994) 489–517.
- [3] H. Mori, K. Takio, M. Ogawara, D.J. Selkoe, Mass spectrometry of purified amyloid β -protein in Alzheimer's disease, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 17082–17086.

- [4] F. Prelli, E. Castano, G.G. Glenner, B. Frangione, Differences between vascular and plaque core amyloid in Alzheimer' disease, *J. Neurochem.* 51 (1988) 648–651.
- [5] C. Hass, M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, D.J. Selkoe, Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism, *Nature* 359 (1992) 322–325.
- [6] P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schlossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst, R. McCormack, R. Wolfert, D.J. Selkoe, I. Lieberburg, D. Schenk, Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids, *Nature* 359 (1992) 325–327.
- [7] C.J. Pike, A.J. Walencewicz, C.G. Glabe, C.W. Cotman, In vitro aging of β -amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity, *Brain Res.* 53 (1991) 311–314.
- [8] B.A. Yankner, L.K. Duffy, D.A. Kischner, Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachylin neuropeptides, *Science* 250 (1990) 279–282.
- [9] D.M. Hartley, D.M. Walsh, C.P. Ye, T. Diehl, S. Vasquez, P.M. Vassilev, D.B. Teplow, D.J. Selkoe, Protofibrillar intermediate induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons, *J. Neurosci.* 19 (1999) 8876–8884.
- [10] M.P. Lambert, A.K. Barlow, B.A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T.E. Morgan, I. Rosovsky, B. Trommer, K.L. Voila, P. Wals, C. Zhang, C.E. Finch, G.A. Krafft, W.L. Klein, Diffusible, nonfibrillar ligands derived from $A\beta_{1-42}$ are potent central nervous system neurotoxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 6448–6453.
- [11] D.M. Walsh, I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.C. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, D.J. Selkoe, Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, *Nature* 416 (2002) 535–539.
- [12] J.R. Brorson, V.P. Bindokas, T. Iwama, C.J. Marcuccilli, J.C. Chisholm, R.J. Miller, The Ca^{2+} influx induced by β -amyloid peptide 25–35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation, *J. Neurobiol.* 26 (1995) 325–338.
- [13] M.P. Mattson, B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg, R.E. Rydel, β -Amyloid peptides destabilized calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity, *J. Neurosci.* 12 (1992) 376–389.
- [14] S.W. Barger, V.L. Smith-Swintosky, R.E. Rydel, M.P. Mattson, β -Amyloid precursor protein mismetabolism and loss of calcium homeostasis in Alzheimer's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695 (1993) 158–164.
- [15] N. Arispe, H.B. Pollard, E. Rojas, Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid β -protein [A β -(1–40)] in bilayer membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 10573–10577.
- [16] S.K. Rhee, A.P. Quist, R. Lal, Amyloid β protein-(1–42) forms calcium permeable, Zn^{2+} -sensitive channel, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13379–13882.
- [17] K. Ueda, S. Shinohara, T. Yagami, K. Asakura, K. Kawasaki, Amyloid β protein potentiates Ca^{2+} channels: a possible involvement of free radicals, *J. Neurochem.* 68 (1997) 265–271.
- [18] J.H. Weiss, C.J. Pike, C.W. Cotman, Ca^{2+} channel blockers attenuate β -amyloid peptide toxicity to cortical neurons in culture, *J. Neurochem.* 62 (1994) 372–375.
- [19] J.S. Whitson, S.H. Appel, Neurotoxicity of A β amyloid protein in vitro is not altered by calcium channel blockade, *Neurobiol. Aging* 16 (1995) 5–10.
- [20] A. Copani, V. Bruno, G. Battaglia, G. Leanza, R. Pelliteri, A. Russo, S. Stanzani, F. Nicolletti, Activation of metabotropic glutamate receptors protects cultured neurons against apoptosis induced by β -amyloid peptide, *Mol. Pharmacol.* 47 (1995) 890–897.
- [21] R.M. Davidson, L. Shajenko, T.S. Donta, Amyloid β -peptide (A β P) potentiates animodipine-sensitive L-type barium conductances in N1E-115 neuroblastoma cells, *Brain Res.* 643 (1994) 324–327.
- [22] F.J. Elkinici, K.U. Malik, T.B. Shea, Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to β -amyloid. MAP kinase mediates β -amyloid-induced neurodegeneration, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 30322–30327.
- [23] S.A. Price, B. Held, H.A. Pearson, Amyloid β protein increases Ca^{2+} currents in rat cerebellar granule neurones, *Neuroreport* 9 (1998) 539–545.
- [24] A. MacManus, M. Ramsden, M. Murray, Z. Henderson, H.A. Pearson, V.A. Campbell, Enhancement of $^{45}Ca^{2+}$ influx and voltage-dependent Ca^{2+} channel activity by β -amyloid (1–40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. Modulation by the proinflammatory cytokine interleukin-1 β , *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 4713–4718.
- [25] C. Zhang, M.P. Lambert, C. Bunch, K. Barber, W.S. Wade, G.A. Krafft, W.L. Klein, Focal adhesion kinase expressed in nerve cell lines shows increased tyrosine phosphorylation in response to Alzheimer's A β peptide, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 25247–25250.
- [26] P. Lipton, P.G. Aitken, F.E. Dudek, M.T. Eskessen, P.A. Espanol, J.B. Ferchmin, J.B. Kelly, N.R. Kreisman, P.W. Landfield, P.M. Larckman, L. Laybaert, G.C. Newman, K.L. Panizzon, R.S. Payne, P. Phillips, K.M. Raley-Susman, M.E. Rice, R. Santamaria, J.M. Sarvey, A. Schurr, M. Segal, C.P. Sejer, C.P. Taylor, T.J. Teyler, V.Y. Vasilenko, S. Veregge, S.R. Wu, R. Wallis, Making the best slices: comparing preparative methods, *J. Neurosci. Methods* 59 (1995) 151–156.
- [27] W.Y. Li, J.P. Butler, J.E. Hale, D.B. McClure, S.P. Little, D.L. Czilli, L.K. Simmons, Suppression of an amyloid β peptide-mediated calcium channel response by a secreted β -amyloid precursor protein, *Neuroscience* 95 (2000) 1–4.
- [28] L.-M. He, L.-Y. Chen, X.L. Lou, A.-L. Qu, Z. Zhou, T. Xu, Evaluation of β -amyloid peptide 25–35 on calcium homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons, *Brain Res.* 939 (2002) 65–75.
- [29] W.L. Klein, G.A. Krafft, C.E. Finch, Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?, *TINS* 24 (2001) 219–224.
- [30] C. Hertel, E. Terzi, N. Hauser, R. Jakob-Rotne, J. Seelig, J.A. Kemp, Inhibition of electrostatic interaction between β -amyloid peptide and membranes prevents β -amyloid-induced toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 9412–9416.
- [31] W.E. Muller, S. Koch, A. Eckert, H. Hartmann, W.E. Muller, β -Amyloid peptide decrease membrane fluidity, *Brain Res.* 674 (1995) 133–136.
- [32] L.K. Simmons, W.Y. Li, D.L. Czilli, A G protein dependant mechanism is involved in the potentiation of neuronal calcium channel currents mediated by amyloid peptide, in: 25th Annual Meeting for the Society of Neuroscience Abstracts, vol. 21, 1995, p. 478.
- [33] C. Arias, I. Arrieta, R. Tapia, β -Amyloid peptide fragment 25–35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices, *J. Neurosci. Res.* 41 (1995) 561–566.
- [34] T. Harkany, I. Abraham, W. Timmerman, G. Laskay, B. Toth, M. Sasvari, C. Konya, J.B. Sebens, J. Korf, C. Nyakas, M. Zanrandi, K. Soos, B. Penke, P.G. Luiten, β -Amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis, *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 2735–2745.

III Conclusions

Au cours de ce premier travail nous avons pu mettre en évidence que dans les cellules pyramidales de l'hippocampe les peptides A β (1-40) et A β (25-35), appliqués à des concentrations nanomolaires et sous leur forme oligomériques, induisent de façon aiguë une augmentation de l'activité de différents types de canaux calciques voltage-dépendants.

En effet, nous avons mis en évidence que l'application aiguë de 200 nM d'A β (1-40) ou 200 nM d'A β (25-35) provoque l'augmentation des courants calciques des cellules pyramidales. Cette augmentation est réversible et sensible au potentiel de membrane. Cependant, le fragment toxique A β (25-35) provoque l'augmentation de l'activité des canaux calciques de types L puisque son effet peut être bloqué par la nifédipine alors que le fragment A β (1-40) augmente l'activité de canaux de types non-L.

1) Caractérisation des formes de peptide par SDS-PAGE

Par SDS-PAGE sur des échantillons de peptides dilués nous avons pu mettre en évidence les formes de peptide présentes. Par migration des échantillons sur des gels en gradient 4/20 % d'acrylamide afin de visualiser la plus grande gamme de poids moléculaires possible et coloration des protéines à l'argent nous avons mis en évidence la présence dans la solution de petits oligomères de peptides : du monomère à un oligomère de 6 molécules d'A β pour l'A β (1-40) avec une forte proportion d'oligomères de 4 à 6 unités et des oligomères d'A β (25-35) allant de 6 à 8 monomères.

2) Modulation de l'activité synaptique par l'A β (1-40)

Nous avons montré que l'application d'A β (1-40) sur des tranches d'hippocampe de souris adultes provoque l'augmentation des courants des canaux calciques de type non-L. Cette action de l'A β (1-40) sur les canaux de types non-L, c'est-à-dire les canaux de type N, P, Q ou R, pourrait avoir pour effet de moduler la libération pré-synaptique de neurotransmetteur. En effet, ces types de canaux calciques voltage-dépendants ont été décrits comme participant à la libération de transmetteur dans de nombreux types de synapses (Reid *et al.*, 1998 ; Qian et Noebels, 2001 ; Mintz *et al.*, 1995 ; Wu *et al.*, 1999). On peut donc penser que l'A β (1-40)

soluble peut contrôler directement l'activité synaptique par une augmentation des courants des canaux responsables de la libération de neurotransmetteur.

3) Modulation de l'activité cellulaire par l'A β (25-35)

Par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique des canaux calciques voltage dépendants de type L, nous avons bloqué les effets de l'A β (25-35) sur notre préparation. Ces résultats confirment d'autres données obtenues sur la toxicité du peptide A β (25-35) sur des neurones corticaux en culture (Weiss *et al.*, 1994).

Les effets du peptide A β (25-35) qui passent par les canaux de type L ne toucheraient donc pas directement la libération de neurotransmetteur mais pourrait affecter d'autres fonctions variées comme la plasticité synaptique (Christie *et al.*, 1997, Thibault *et al.*, 2001), l'expression de gènes, dont le gène de l'AChR (De Koninck et Cooper, 1995), la phosphorylation de CREB (Deisseroth *et al.*, 1998), ou bien la régulation des stocks intracellulaires du calcium (Ouardouz *et al.*, 2003). De façon intéressante, les canaux calciques de type L sont impliqués dans la plasticité synaptique (Thibault *et al.*, 2001). Les effets observés des peptides amyloïdes sur la plasticité pourraient aussi en partie être médiés par ces canaux.

Ces données montrent que les différentes formes de peptides amyloïdes peuvent agir de façon différentes sur une même préparation. Le mécanisme de déstabilisation de l'homéostasie calcique est différent selon le type de peptide impliqué pouvant ainsi soulever la question du rôle physiologique du peptide amyloïde « naturel » qu'est l'A β (1-40) non agrégé.

Sujet 2 :

Effets des peptides $A\beta$ sur
l'activité synaptique excitatrice de
la synapse fibres parallèles/cellule
de Purkinje

Arbez N., Gautheron V., Brugg B., Mariani J. and Rovira C.
“Beta-amyloïd (1-42) induced postsynaptic reduction in the
AMPA synaptic responses of cerebellar Purkinje cells:
involvement of pro-inflammatory processes.”

Sujet II –

Modifications des activités synaptiques évoquées et spontanées par le peptide amyloïde A β (1-42) sur la synapse fibres parallèles/cellule de Purkinje du cervelet

I Objectifs

Dans ce travail, nous avons étudié les effets aigus d'une application de peptide A β (1-42) soluble sur les courants post-synaptiques excitateurs de cellules de Purkinje dans des tranches de cervelet de souris. La neurodégénérescence des formes familiales de la maladie d'Alzheimer touchent aussi bien le cerveau que le cervelet (Fukutani *et al.*, 1989, Lemere *et al.*, 1996b, Fukutani *et al.*, 1997, Mann *et al.*, 2001). L'atteinte cérébelleuse implique un dépôt de peptide amyloïde, une atrophie de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje et une augmentation de la microglie (Delacourte et Buée, 1989; Lemere *et al.*, 1996b). De plus, il a été montré par Hartell et ses collaborateurs que sur les cellules de Purkinje l'application de peptide amyloïde ou d'autres dérivés de l'APP entraîne une dépression des EPSCs des fibres parallèles sans provoquer d'augmentation importante de la concentration de calcium intracellulaire (Hartell et Suh, 2000).

Le but principal de ce travail est de montrer les effets d'une application courte de peptide A β (1-42) sous forme soluble sur l'activité synaptique de la synapse fibre parallèle/cellule de Purkinje sur des tranches de cervelet de souris. L'étude porte aussi bien sur l'activité évoquée que l'activité spontanée.

Les processus mis en jeu dans les effets de l'A β (1-42) sur la physiologie synaptique ont été décrit comme pouvant faire appel à des voies pro-inflammatoires. Nous avons étudié l'implication de ces voies dans les effets du peptide A β (1-42) sur l'activité synaptique en présence d'anti-inflammatoires. Dans un deuxième temps, pour approfondir les résultats obtenus en présence d'anti-inflammatoires, nous avons également essayé de déterminer l'implication éventuelles de certaines voies de signalisation telles que la voie du NO et les voies pro-apoptotiques des MAP Kinases JNK et p38.

II Résultats

Les résultats de ce travail expérimental sont présentés dans l'article « β -amyloïd (1-42) induced postsynaptic reduction in the AMPA synaptic responses of cerebellar Purkinje cells: involvement of pro-inflammatory processes », Arbez N., Gautheron V., Brugg B., Mariani J. and Rovira C. *Soumis à J. Neurosci. Res.*

β -amyloid(1-42) induces a reduction in the parallel fiber AMPA responses of Purkinje cells: involvement of pro-inflammatory processes.

Nicolas ARBEZ, Vanessa GAUTHERON, Bernard BRUGG*, Jean MARIANI, Catherine ROVIRA.

UMR 7102, NPA, Equipe Développement et Vieillessement du Système Nerveux, Université Pierre et Marie Curie-CNRS, 9 quai St Bernard, 75005 Paris, France.

* Equipe Dégénérescence et Mort Neuronales

A β reduces Purkinje cell AMPA responses

Correspondence: Dr Catherine ROVIRA
UMR 7102, UPMC-CNRS, Lab DVSN
Case 14
9, quai St Bernard
75005 Paris, France
Tel: (33 1) 44 27 32 43
Fax: (33 1) 44 27 22 80
catherine.rovira@snv.jussieu.fr

N Arbez was supported by a grant from France Alzheimer Foundation. This work was supported by a grant from “Institut de la Longévité et du Vieillessement” (France).

SUMMARY

In Alzheimer's disease there is an increased production of the toxic β -amyloid peptides ($A\beta$), especially the longer forms such as $A\beta(1-42)$. Using the patch-clamp technique we have studied the contribution of pro-inflammatory processes to the acute effects of $1\mu\text{M}$ $A\beta(1-42)$ on the parallel fiber EPSC (PF-EPSC) of Purkinje cells in cerebellar slices. $A\beta(1-42)$ induces a decrease in the PF-EPSC amplitude without changes in the paired-pulse facilitation. This decrease is accompanied by a decrease in the frequency and amplitude of the mEPSCs, suggesting that $A\beta$ acts at a pre- and post-synaptic site. The nicotinic receptor antagonist (MLA) failed to block the effects of $A\beta$ on the mEPSCs frequency and amplitude. In the presence of L-NAME, a Nitric Oxide Synthase inhibitor, the effects of $A\beta$ were partially blocked. The frequency of mEPSCs was unchanged while $A\beta$ still reduced the mEPSCs amplitude. The anti-inflammatory agent flurbiprofen blocks the depressant action of $A\beta$ on the mEPSCs. Both a p38 inhibitor (SB203580) and a JNK inhibitor (SP600125) reverse the effects of $A\beta$, as an increase in the mEPSCs frequency and amplitude was observed.

This study provides evidence that the $A\beta$ induced depression of the PF-EPSCs was mediated via a pro-inflammatory process involving NO, JNK and p38.

Key words: Alzheimer, $A\beta$, inflammation, p38, JNK, NO.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder involving impaired cognitive brain function associated with increased production of β -amyloid ($A\beta$) leading to plaque formation and neurodegeneration (Selkoe 2001). The well-established neurotoxic effect of $A\beta$ (Hardy and Selkoe 2002; Yankner et al. 1989) may be responsible for synaptic dysfunction and cognitive impairment in Alzheimer's disease (Mucke et al. 2000; Selkoe 2002). There is only a weak correlation between amyloid plaques and cognitive dysfunction (Lue et al. 1999). However the severity of dementia does correlate with the degree of loss of presynaptic terminals (Sze et al. 1997; Terry et al. 1991) which may occur before plaque formation and neurodegeneration (Irizarry et al. 1997; Kotilinek et al. 2002; Westerman et al. 2002). Early synaptic dysfunction could contribute significantly to cognitive impairments which are not accompanied by massive neurodegeneration. In transgenic mice (Tg2576) where $A\beta$ levels are elevated without plaque formation or neuronal loss, learning and memory deficits are nonetheless evident (Irizarry et al. 1997; Kotilinek et al. 2002; Westerman et al. 2002). In the hippocampus, $A\beta$ has been shown to cause severe impairments in excitatory synaptic transmission (Cullen et al. 1996; Fitzjohn et al. 2001; Itoh et al. 1999; Kamenetz et al. 2003) and LTP (Selkoe 2002; Stephan et al. 2001).

Considerable evidence from studies on postmortem Alzheimer's disease brain tissue, as well as those on transgenic mouse models, provide evidence that inflammatory processes may play a key role in Alzheimer's disease (Akiyama et al. 2000; Benzing et al. 1999; Brugg et al. 1995; Wyss-Coray and Mucke 2002). There is as yet little evidence for a relationship between inflammatory processes and $A\beta$ induced synaptotoxicity. Inflammatory processes have been shown to result from microglial activation which in turn releases cytokines such as tumor necrosis factors and interleukins (Griffin and Mrak 2002; Lue et al. 2001). Activation of microglia by $A\beta$ was shown to induce neuronal apoptosis (Combs et al. 2001). However little is known about the early consequences of an inflammatory response on synaptic events.

In the present study, we investigated the acute effect of $A\beta(1-42)$ on excitatory postsynaptic currents in Purkinje cells in cerebellar slices. Neurodegeneration in familial Alzheimer's disease affect the cerebrum but also the cerebellum (Fukutani et al. 1997; Fukutani et al. 1989; Hu et al. 2000; Lemere et al. 1996; Mann et al. 2001). Cerebellar pathology may involve β -amyloid deposits, atrophy of Purkinje cell dendritic trees and increased microglia

(Delacourte and Buee 1989; Lemere et al. 1996; Mann et al. 1996; Wang et al. 2002). In addition, β -amyloid (1-42) was shown to cause an acute depression in the parallel fiber EPSC (Hartell and Suh 2000).

The principal aim of this study was to determine whether a short application of A β affected synaptic function through inflammatory processes. In addition, we investigated the transduction pathways activated during inflammation, such as NO and the proapoptotic MAP kinases p38 and JNK.

METHODS

Slice preparation.

Experiments complied with guidelines of the French Animal Care Committee. Male C57Bl6 mice 15-25 days old were anesthetized with halothane before decapitation. The cerebellum was rapidly dissected and 250 μm sagittal slices were cut with a vibratome (Leica). Slices were incubated at 33°C in saline solution bubbled with 95% O₂-5% CO₂ for at least 1 hour. All experiments were performed at room temperature.

Electrophysiology.

After an hour of recovery, slices were transferred to the recording chamber and perfused at a rate of 2 ml.min⁻¹ with oxygenated saline containing (mM): NaCl, 125; KCl, 2.5; NaHCO₃, 25; NaH₂PO₄, 1.25; MgSO₄, 1; CaCl₂, 2; glucose, 10; and the GABA_A antagonist picrotoxin (100 μM); osmolarity 320 mOsmol.l⁻¹, final pH 7.35 at 25°C. In order to reach full block when using antagonists the slices were superfused for one hour before recording with saline containing the various antagonist (MLA 50 nM, Flurbiprofen 100 μM , L-NAME 1mM, SB203580 1 μM , SP600125 20 μM). Purkinje cells were visualized with Nomarski optics through a 60x water immersion objective on an upright microscope (Olympus).

Patch-clamp recordings of Purkinje cell somata were made using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments). Extracellular stimulation of parallel fibers was performed using a monopolar saline-filled electrode. Patch pipettes were filled with a solution containing (mM): potassium gluconate, 130; NaCl, 8; Hepes, 10; EGTA, 0.5; ATP-Mg, 4; GTP-Na, 0.4; pH 7.35 with KOH; 300 mOsmol l⁻¹. For experiments using a high BAPTA concentration, the internal solution contained (mM): potassium gluconate, 110; NaCl, 8; Hepes, 10; BAPTA, 30; CaCl₂, 3; ATP-Mg, 4; GTP-Na, 0.4; pH 7.35 with KOH; 300 mosmol.l⁻¹. For miniature EPSC recordings, the internal solution contained (mM): cesium gluconate, 120; TEACl, 3; Hepes, 10; BAPTA, 10; MgATP, 4; GTP-Na, 0.4; Phosphocreatine, 10; pH 7.35 with CsOH; 300 mosmol.l⁻¹. All internal solutions components were purchased from Sigma Aldrich.

In cells retained for analysis, access resistance (usually 5-10 MOHMS) was partially compensated (70%). Cells were held at membrane potential of -70 mV for EPSCs and glutamate currents recordings and at -90 mV for miniatures EPSC (mEPSC) recordings. Parallel fibers were stimulated every 3 seconds and parallel fiber EPSCs were preceded by a 10 mV

hyperpolarizing voltage step that allowed monitoring of passive electrical properties of recorded cells throughout the experiment.

The inter-stimulus interval for paired pulse facilitation (PPF) was 50 ms. PPF was measured by calculating the ratio of the second EPSC to the first EPSC. Glutamate (50 μ M, 10-20 ms, 20 PSI) pressure ejection was performed through a small patch pipette using a PV 801 pneumatic micropump (WPI, GB). The ejection duration and the position of the ejection pipette in the dendritic field of the recorded Purkinje cell were adjusted to evoke a clear and stable inward current with a fast kinetic.

For analysis, synaptic currents were filtered at 5 kHz and digitized on line at 20 kHz. EPSCs and glutamate responses were acquired and analyzed with Elphy software (G. Sadoc, CNRS, France) and statistical analysis was done with the Wilcoxon test. Each point in the graphs represents the average of 20 PF-EPSCs. Results are expressed as mean \pm SEM unless otherwise stated.

mEPSCs were digitized at 5000 kHz and analyzed off-line with the MiniAnalysis program (J. Lee, Synaptosoft, USA). The sampling duration was 300 s in control and 600 s after A β . Threshold detection was three times the rms (root mean square) noise which averaged 2.208 \pm 0.039 pA (n= 103). Statistical analysis of mEPSCs was performed using the Kolmogorov-Smirnov 2-sample test. Data were considered as significantly different at P < 0.05.

Drugs.

β -amyloid (1-42) (Bachem, France) was dissolved in DMSO at a concentration of 500 μ M, aliquoted and stored at -20° C. The non-steroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen (Calbiochem) was prepared as a 100 mM stock solution in DMSO. The NOS inhibitor L-NAME (Tocris) was prepared as a 1 M stock solution. Methyllycaconitine (MLA), a preferential α 7 nicotinic receptor antagonist, was purchased from Sigma Aldrich and dissolved in water at the stock concentration of 50 mM. SB203580, a p38 MAP kinase inhibitor, and SP600125, a JNK MAP kinase inhibitor, were purchased from Calbiochem and dissolved in DMSO as 1 mM and 20 mM stock solutions, respectively. All other chemicals were purchased from Sigma Aldrich.

RESULTS

A β reduces PF-EPSCs amplitude

Parallel fiber stimulation evoked EPSCs with an average amplitude of 849.2 ± 10 pA ($n = 9$). The EPSCs could be recorded during at least 80 min with no run-down in the amplitude ($n=4$, Fig 1A). In all cells tested ($n = 9$), bath application of $1 \mu\text{M}$ A β (1-42) reduced the PF-EPSC to 68 ± 1.6 % of control ($P < 0.001$) (Fig. 1A). The decrease in the EPSC amplitude was slow, reaching its maximum within an hour after A β washout. No reversal was observed within the recording time. This reduction in the PF-EPSC amplitude was not associated with any variation in the holding current or in the cell input resistance (13.64 ± 0.49 nS for control; 13.32 ± 0.62 nS for A β ; $P < 0.02$). Figure 1A shows that paired pulse facilitation (PPF) was not changed by A β (1-42); this is indicative of an absence of changes in the probability of release.

As A β has been shown to cause a destabilization of calcium homeostasis (Mark et al. 1995), we tested the effect of A β after loading the PC with 30 mM BAPTA, a calcium chelator. BAPTA was allowed to diffuse into the cell for 45 min before the A β (1-42) bath application. 30 mM BAPTA failed to block the effect of A β (1-42) on PF-EPSCs; the maximal reduction in the PF-EPSC amplitude was observed within an hour after A β wash-out, and the PF-EPSC was reduced to 61 ± 1.4 % ($n = 6$, $P < 0.01$) (Fig. 1B). The effect of A β (1-42) was tested on the glutamate evoked inward current in order to determine whether A β could reduce AMPA receptor-mediated currents. Purkinje cells have no functional NMDA receptors at this age (15-25 days) (Crepel et al. 1982). Pressure ejection of glutamate ($50 \mu\text{M}$, 10-20 ms) caused an inward current with an average amplitude of 895 ± 67.48 pA ($n = 16$). Like the amplitude of PF-EPSCs, the amplitude of the glutamate current exhibited no run-down, remaining constant during at least 80 min (data not shown). A β (1-42) reduced the glutamate current to 61.8 ± 3.5 % of control amplitude ($n = 13$, $P < 0.001$) (Fig 1C). Similar to the effect on EPSCs, the evoked glutamate current declined progressively after A β wash-out and reached its minimal amplitude within an hour. No reversal of the effect could be observed during the recording time. The fact that glutamate response was reduced suggests that the effect of A β had a postsynaptic site of origin.

A β modulates spontaneous synaptic activity

We next examined effects of A β on spontaneous glutamate release, in the presence of $1 \mu\text{M}$ TTX (mEPSCs). Similar to its inhibitory action on the glutamate current, A β (1-42) caused a

14% reduction in mEPSC amplitude from 13.66 ± 0.10 pA (mean \pm SEM) in controls to 11.75 ± 0.13 pA at 45 min - 1h after A β exposure (Fig 2, n = 15, P < 0,001). The decrease in mEPSC amplitude was accompanied by an approximately two-fold reduction in the mEPSCs frequency (Fig 2, n = 15, P < 0.002): the inter-event interval averaged 1378.15 ± 43.10 ms in the control and 2690.87 ± 138.90 ms after A β administration.

In cerebellar Purkinje cells, mEPSCs recorded in the presence of calcium are mediated by glutamate released from both parallel fibers and climbing fibers. Substituting calcium by an equimolar concentration of strontium causes a selective and enhanced asynchronous release of glutamate (Dodge et al. 1969; Oliet et al. 1996) which probably originates mainly from parallel fibers (Levenes et al. 1998). As shown in Figure 3, in the presence of strontium A β induced a 17% reduction in PF-mEPSC amplitude, which averaged 15.32 ± 0.19 pA in the control and 12.79 ± 0.26 pA after A β (mean \pm SEM; n = 11, P < 0,001). A β still caused a greater than two – fold decrease in the mEPSC frequency: the inter-event interval averaged 1839.78 ± 49.28 ms in control and 5033.52 ± 294.82 ms after A β (n =11, P < 0.002). Therefore, A β reduces PF-mEPSCs.

All subsequent experiments were carried out in the presence of 2 mM calcium in order to evaluate the role of calcium in the transduction pathways.

mEPSC modifications are not due to an action of A β on the α 7 nicotinic receptor

The α 7 nicotinic receptor has been reported to bind A β (Wang et al. 2000) with an affinity in the picomolar range. A β activates ERK associated with this receptor in hippocampal slices (Dineley et al. 2001). We studied the effects of A β after blocking the nicotinic receptor with MLA (methyllycaconitine; 50 nM), an antagonist which preferentially blocks α 7 nicotinic receptors. MLA caused a significant increase (22,5%) in the mEPSCs amplitude (13.66 ± 0.10 pA in control and 16.74 ± 0.2 pA in MLA, P < 0.001) and a 43% decrease the frequency (inter-event interval : 1378.15 ± 43.10 ms in control and 1979 ± 48 ms in MLA, P<0.003). In the presence of 50 nM MLA the A β induced reduction in the mEPSCs amplitude and frequency was not blocked: mEPSCs amplitudes were 16.74 ± 0.2 pA under MLA and 14.093 ± 0.14 pA after A β and MLA (n = 17, P < 0.001, Fig.4A). Similarly, inter-event intervals were still increased by

A β in the presence of MLA (1493.9 ± 53.2 ms under MLA versus 1979.53 ± 48.17 ms after A β and MLA; $n = 17$, $P < 0.002$; Fig.4A).

A β -induced modifications of mEPSCs involve inflammatory pathways

Inflammation appears to be increased in AD brains and senile plaques are surrounded by activated glial cells. To assess the implication of inflammation in A β induced effects, we tested a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), flurbiprofen. Flurbiprofen is a potent cyclooxygenase-2 inhibitor which inhibits the production of prostaglandin (Reichel et al. 1985). Flurbiprofen caused a 13% decrease in the mEPSCs amplitude (13.66 ± 0.10 pA in control and 11.92 ± 0.14 pA in Flurbiprofen, $P < 0.002$) and decreased the frequency by 59% (the inter-event interval increased from 1378.15 ± 48 ms in control and 2298 ± 62 ms in flurbiprofen, $P < 0.001$) In the presence of $100\mu\text{M}$ flurbiprofen (Fig.4B), A β failed to reduce mEPSC amplitudes, which averaged 11.92 ± 0.14 pA in flurbiprofen and 11.75 ± 0.13 pA after A β and flurbiprofen ($n = 13$, $P = 0.52$). In addition, flurbiprofen actually reversed the effect of A β on the mEPSCs frequency, as a 21% increase was observed (inter-event interval was 2298 ± 62.29 msec under flurbiprofen and 1835 ± 54.15 msec after A β and flurbiprofen ($n = 13$, $P < 0.001$)).

Nitric oxide is a second messenger implicated in the cerebellar LTD; in addition, NO may give rise to reactive oxygen species. We therefore tested the effects of A β (1-42) on mEPSCs in the presence of L-NAME (1 mM), a well known NO synthase inhibitor. L-NAME caused a 7% increase in the mEPSC amplitude (13.66 ± 0.10 pA in control and 14.79 ± 0.12 pA in L-NAME, $P < 0.001$) and increased the frequency by 17% (inter-event interval: 1378.15 ± 43.10 ms in control and 1143 ± 24.66 in L-NAME, $P < 0.002$). In the presence of L-NAME, A β still reduced the mEPSCs amplitude (14.79 ± 0.12 pA in L-NAME and 13.65 ± 0.11 pA after A β and L-NAME, $n = 16$, $P < 0.001$, Fig 4C). On the other hand, the action of A β on the mEPSCs frequency was fully blocked by L-NAME (inter-event interval was 1143.69 ± 24.66 ms in L-NAME and 1048.19 ms after A β and L-NAME, $n = 16$, $P = 0.07$, Fig 4C), demonstrating an involvement of NO in the postsynaptic effects of A β .

Downstream activated pathways

MAP kinase activation may occur during inflammation (Xie et al. 2004). We therefore tested the effects of A β on mEPSCs in the presence of MAP kinases inhibitors.

We tested the effects of A β (1-42) on the mEPSC in the presence of the highly-selective p38 inhibitor SB203580 (1 μ M), which has an IC₅₀ of 34 nM (Lee et al. 1994). SB203580 caused a small increase in the mEPSC amplitude (13.66 ± 0.10 pA in control and 13.97 ± 0.13 pA in SB203580, $P = 0.001$) and a decrease in the mEPSC frequency (inter-event interval: 1378 ± 43.10 ms in control and 1214 ± 35.26 ms in SB203580, $P = 0.420$). In the presence of 1 μ M SB203580 (Fig 5A), A β (1-42) caused an increase in the mEPSC amplitude (13.97 ± 0.13 pA in SB203580 and 15.2 ± 0.16 pA after SB203580 and A β ; $n = 11$; $P = 0.0005$). The inter-event intervals were decreased in the presence of A β (1214 ± 35.26 ms under SB203580 and 986.79 ± 22.87 ms after SB203580 and A β , $n = 11$, $P = 0.008$). Therefore the p38 inhibitor blocked the depressant action of A β on mEPSC frequency and amplitude, and in fact reversed the A β effects as the mEPSCs amplitude and frequency increased rather than decreased.

We next tested the effect of the JNK inhibitor SP600125 (Fig 5B). This reagent is a potent ATP-competitive JNK inhibitor with a >20 fold selectivity over a range of other kinases, including ERK, p38, PKA and PKC (Bennett et al. 2001). SP600125 caused an increase in the mEPSCs amplitude (13.66 ± 0.10 pA in control and 13.97 ± 0.13 pA in SP600125, $P = 0.003$) and a decrease in the frequency (inter-event interval: 1378.15 ± 43.10 ms in control and 1680.37 ± 40 in SP600125, $P < 0.001$). Compared to control, in the presence of 20 μ M SP600125 A β caused an opposite action on both the amplitude and inter-event interval. A β (1-42) increased rather than decreased the mEPSC amplitude (by 8,8% : 13.97 ± 0.13 pA in SP600125; 15.2 ± 0.16 pA after SP600125 and A β ; $n = 20$, $P < 0,002$) and increased the frequency by 32% (inter-event interval: 1680.37 ± 40.40 ms in SP600125 and 1149.68 ± 34.69 ms after A β and SP600125; $n = 20$, $P < 0,001$). Thus, the JNK inhibitor blocked the inhibitory action of A β , and in fact reversed the A β action like the p38 inhibitor.

In summary, the effects of A β on the mEPSC amplitude and frequency involve nitric oxide, and MAP kinases inhibitors such as the JNK inhibitor (SP600125) and the p38 inhibitor (SB203580) block the depressant action of A β on glutamatergic currents in Purkinje cells. In the presence of the MAP kinase inhibitors the A β effects were reversed, increasing rather than decreasing mEPSC amplitude and frequency.

DISCUSSION

In this study, we have examined the effects of acute A β application on evoked and miniature excitatory synaptic activity. We showed that 1 μ M A β (1-42) induced a reduction in PF-EPSCs of Purkinje cells. The effects of A β seem to be mediated by a pro-inflammatory process likely associated with pro-inflammatory cytokine release and activation of the MAP kinases JNK and p38.

A β induces a decrease in the glutamate responses and mEPSC amplitude which is indicative of a postsynaptic site of action. The decrease in the PF-EPSC was accompanied by a decrease in the mEPSC frequency and by no change in the paired pulse facilitation (PPF). The PPF data indicate that there is no change in the probability of transmitter release. The decrease in mEPSC frequency may indicate either a presynaptic modification which were not detected using the PPF essay or a decrease in functional synapse number (Carroll et al. 2001; Liao et al. 2001). The fact that A β in the presence of NO Synthase inhibitor, L-NAME or Flurbiprofen had different effects on mEPSC amplitude and frequency suggests that A β could have multiple sites of action. Therefore we suggest that A β would have a pre- and postsynaptic site of action.

The observed decrease in the evoked PF-EPSCs in the presence of intracellular BAPTA suggests that this reduction occurs independently of an A β -induced increase in the calcium level in the Purkinje cells. Hartell and Suh (2000) also showed a decrease in PF-EPSCs and failed to observe a consistent increase in the intracellular calcium concentration in Purkinje cells (Hartell and Suh 2000) in contrast to dorsal root ganglion neurons (He et al. 2002). In addition, the fact that PF-EPSCs could be reduced by A β after intracellular injection of 30mM BAPTA shows that transduction pathways involved in the postsynaptic reduction of AMPA responses can operate at low postsynaptic calcium concentrations.

A β has been shown to bind to nicotinic receptors with a picomolar affinity and to block the nicotinic receptor conductance (Wang et al. 2000). However MLA, an α 7 nicotinic receptor antagonist, could not block the decrease in the mEPSCs frequency and amplitude in our neurons. Similarly, MLA did not block the effect of A β on hippocampal LTP (Wang et al. 2004b) suggesting that other prominent factors such as pro-inflammatory processes are involved in the A β toxicity. The fact that the internalization of A β into cells involves nicotinic receptors (Nagele

et al. 2002; Wang et al. 2002) suggests that nicotinic receptors may rather play a role in the long term cytotoxic action of A β .

We used a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), flurbiprofen, to evaluate the possible role of pro-inflammatory cytokine release in the A β -induced reduction of mEPSC amplitude and frequency. We observed that flurbiprofen blocks the postsynaptic depressant action of A β and increased the mEPSCs frequency. This suggests that COX-2 is activated by an acute application of A β and that flurbiprofen prevented the production of prostaglandins, raising the possibility that a pro-inflammatory cytokine such as interleukin 1 β , which activates COX-2, is released (Akiyama et al. 2000; Bazan 2001). Further studies will be necessary to clarify this issue. Interestingly, there is evidence that the release of interleukin-1 plays a role in A β -induced impairment of hippocampal LTP (Minogue et al. 2003).

However, an additional action of A β was revealed, since in the presence of flurbiprofen an increase in the mEPSCs frequency was observed. It remains to be determined whether this effect was due to the release of pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1 β . In addition, further experiments would be necessary in order to determine which receptor complex is responsible for the different effects of A β on AMPA receptor in the presence of flurbiprofen. As a whole, the prominent depressant action of A β seems be mediated by release of pro-inflammatory cytokines and prostaglandins, which could involved activated glia and neurons (Wang et al. 2004a).

To further investigate the signaling pathways activated during the pro-inflammatory reaction we used chemical inhibitors of these pathways. In the presence of NOS inhibitor we observed that most of the postsynaptic action of A β was blocked, leaving only a reduction in the mEPSC amplitude. Induction of iNOS has also been observed in inflammatory reactions after A β exposure (Combs et al. 2001; Giovannini et al. 2002). Interestingly, Wang et al. (2004) have shown that A β -induced impairment of LTP in the hippocampus was blocked in iNOS knock-out transgenic mice, and that NO would give rise to peroxynitrite (Wang et al. 2004a). In addition, it was shown that ROS may participate in MAP kinase activation (Combs et al. 1999). However, only part of the effect of A β was blocked since the postsynaptic action was only reduced. It is possible that pro-inflammatory cytokines would be responsible for the remaining action of A β at the postsynaptic level.

MAP kinases are active in signaling cascades involved in inflammation (Xie et al. 2004). They are also involved in the A β (1-42)-induced inhibition of mEPSCs. Inhibitors of JNK and of p38 fully block the depressant action of A β on mEPSC amplitude and frequency. These MAP kinases are activated in the brains of Alzheimer's disease patients (Anderson et al. 1994; Hensley et al. 1999; Shoji et al. 2000; Zhu et al. 2001). A β -induced neuronal apoptosis is also associated with an activation of JNK and p38 (Behrens et al. 1999; Morishima et al. 2001; Troy et al. 2001). Recently, it was shown that JNK and p38 inhibitors block the inhibitory effect of A β on hippocampal LTP (Costello and Herron 2004; Saleshando and O'Connor 2000; Wang et al. 2004b). At the postsynaptic site, p38 is involved in the endocytosis of AMPA receptors during LTD (Zhu et al. 2002) by an unknown effect on the trafficking machinery. Therefore the activation of p38 by A β likely induces a similar AMPA receptor endocytosis. JNK action on AMPA receptor trafficking has not been previously reported, but the fact that JNK is implicated in the reduction of mEPSC amplitude and frequency suggests that JNK could also reduce the synaptic AMPA receptor density. Further experiments will be necessary in order to determine whether JNK alone is able to reduce the AMPA receptor density or potentiate the effects of p38.

An interesting finding is that the JNK and p38 inhibitors reverse the effects of A β on mEPSCs; these inhibitors actually increase the amplitude and frequency of mEPSCs. The exact mechanism of this effect is unknown. It is possible that this block reveals an activation of ERK, which is associated with the insertion of AMPA receptor subunits at the synapse (Zhu et al. 2002). Although p38 and JNK seem to be the prominent MAP kinases activated by A β , in some instances, and especially in glial cells, ERK is activated (Combs et al. 1999; Combs et al. 2001; Koistinaho and Koistinaho 2002; McDonald et al. 1998). It remains to be determined whether ERK can also be activated in neurons in conjunction with p38 and JNK, and whether their inactivation upregulates ERK1/2 activity.

In conclusion, this study shows that A β -induced reductions in mEPSC frequency and amplitude occur mainly due to pro-inflammatory processes. These processes include the NO pathway and downstream activation of JNK and p38 MAP kinases. This pro-inflammatory reaction is very fast, since a ten-minute treatment with 1 μ M A β treatment is sufficient. Although the participation of other receptors cannot be excluded, receptors involved in the inflammatory reaction would seem to be of special relevance. These receptors include a microglial multi-

receptor complex containing scavenger receptors, integrin (Bamberger et al, 2003) and RAGE (Arancio et al, 2004). The multiplicity of A β effects must be more fully studied in order to design potential therapeutic strategies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Ann Lohof for her critical reading of the paper. N. Arbez was supported by a grant from France Alzheimer Foundation. This work was supported by a grant from “l’Institut de la Longévité et du Vieillissement” (France).

REFERENCES

- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Stromeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, and Wyss-Coray T.** Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21: 383-421, 2000.
- Anderson AJ, Cummings BJ, and Cotman CW.** Increased immunoreactivity for Jun- and Fos-related proteins in Alzheimer's disease: association with pathology. *Exp Neurol* 125: 286-295, 1994.
- Bazan NG.** COX-2 as a multifunctional neuronal modulator. *Nat Med* 7: 414-415, 2001.
- Behrens MM, Strasser U, Koh JY, Gwag BJ, and Choi DW.** Prevention of neuronal apoptosis by phorbol ester-induced activation of protein kinase C: blockade of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience* 94: 917-927, 1999.
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, and Anderson DW.** SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13681-13686, 2001.
- Benzing WC, Wujek JR, Ward EK, Shaffer D, Ashe KH, Younkin SG, and Brunden KR.** Evidence for glial-mediated inflammation in aged APP(SW) transgenic mice. *Neurobiol Aging* 20: 581-589, 1999.
- Brugg B, Dubreuil YL, Huber G, Wollman EE, Delhaye-Bouchaud N, and Mariani J.** Inflammatory processes induce beta-amyloid precursor protein changes in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3032-3035, 1995.
- Carroll RC, Beattie EC, von Zastrow M, and Malenka RC.** Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2: 315-324, 2001.
- Combs CK, Johnson DE, Cannady SB, Lehman TM, and Landreth GE.** Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *J Neurosci* 19: 928-939, 1999.

Combs CK, Karlo JC, Kao SC, and Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21: 1179-1188, 2001.

Costello DA and Herron CE. The role of c-Jun N-terminal kinase in the A beta-mediated impairment of LTP and regulation of synaptic transmission in the hippocampus. *Neuropharmacology* 46: 655-662, 2004.

Crepel F, Dhanjal SS, and Sears TA. Effect of glutamate, aspartate and related derivatives on cerebellar purkinje cell dendrites in the rat: an in vitro study. *J Physiol* 329: 297-317, 1982.

Cullen WK, Wu J, Anwyl R, and Rowan MJ. beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport* 8: 87-92, 1996.

Delacourte A and Buee L. [Alzheimer's disease: the glial reaction is general and severe in all areas of the central nervous system]. *C R Acad Sci III* 308: 359-365, 1989.

Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, and Sweatt JD. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21: 4125-4133, 2001.

Dodge FA, Jr., Miledi R, and Rahamimoff R. Strontium and quantal release of transmitter at the neuromuscular junction. *J Physiol* 200: 267-283, 1969.

Fitzjohn SM, Morton RA, Kuenzi F, Rosahl TW, Shearman M, Lewis H, Smith D, Reynolds DS, Davies CH, Collingridge GL, and Seabrook GR. Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein. *J Neurosci* 21: 4691-4698, 2001.

Fukutani Y, Cairns NJ, Rossor MN, and Lantos PL. Cerebellar pathology in sporadic and familial Alzheimer's disease including APP 717 (Val-->Ile) mutation cases: a morphometric investigation. *J Neurol Sci* 149: 177-184, 1997.

Fukutani Y, Nakamura I, Kobayashi K, Yamaguchi N, and Matsubara R. An autopsy case of familial juvenile Alzheimer's disease with extensive involvement of the subcortical gray and white matters. *Acta Neuropathol (Berl)* 77: 329-332, 1989.

Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Vannucchi MG, Rosi S, Pepeu G, and Casamenti F. Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis* 11: 257-274, 2002.

- Griffin WS and Mrak RE.** Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol* 72: 233-238, 2002.
- Hardy J and Selkoe DJ.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356, 2002.
- Hartell NA and Suh YH.** Peptide fragments of beta-amyloid precursor protein: effects on parallel fiber-Purkinje cell synaptic transmission in rat cerebellum. *J Neurochem* 74: 1112-1121, 2000.
- He LM, Chen LY, Lou XL, Qu AL, Zhou Z, and Xu T.** Evaluation of beta-amyloid peptide 25-35 on calcium homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 939: 65-75, 2002.
- Hensley K, Floyd RA, Zheng NY, Nael R, Robinson KA, Nguyen X, Pye QN, Stewart CA, Geddes J, Markesbery WR, Patel E, Johnson GV, and Bing G.** p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 72: 2053-2058, 1999.
- Hu Q, Jin LW, Starbuck MY, and Martin GM.** Broadly altered expression of the mRNA isoforms of FE65, a facilitator of beta amyloidogenesis, in Alzheimer cerebellum and other brain regions. *J Neurosci Res* 60: 73-86, 2000.
- Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, and Hyman BT.** APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 965-973, 1997.
- Itoh A, Akaike T, Sokabe M, Nitta A, Iida R, Olariu A, Yamada K, and Nabeshima T.** Impairments of long-term potentiation in hippocampal slices of beta-amyloid-infused rats. *Eur J Pharmacol* 382: 167-175, 1999.
- Koistinaho M and Koistinaho J.** Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia* 40: 175-183, 2002.
- Kotilinek LA, Bacsikai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT, Younkin S, and Ashe KH.** Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22: 6331-6335, 2002.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, and et al.** A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372: 739-746, 1994.
- Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, and**

Selkoe DJ. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med* 2: 1146-1150, 1996.

Levenes C, Daniel H, Soubrie P, and Crepel F. Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 510 (Pt 3): 867-879, 1998.

Liao D, Scannevin RH, and Huganir R. Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors. *J Neurosci* 21: 6008-6017, 2001.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, and Rogers J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155: 853-862, 1999.

Lue LF, Walker DG, and Rogers J. Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiol Aging* 22: 945-956, 2001.

Mann DM, Iwatsubo T, and Snowden JS. Atypical amyloid (A beta) deposition in the cerebellum in Alzheimer's disease: an immunohistochemical study using end-specific A beta monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 91: 647-653, 1996.

Mann DM, Takeuchi A, Sato S, Cairns NJ, Lantos PL, Rossor MN, Haltia M, Kalimo H, and Iwatsubo T. Cases of Alzheimer's disease due to deletion of exon 9 of the presenilin-1 gene show an unusual but characteristic beta-amyloid pathology known as 'cotton wool' plaques. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27: 189-196, 2001.

Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA, and Mattson MP. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurosci* 15: 6239-6249, 1995.

McDonald DR, Bamberger ME, Combs CK, and Landreth GE. beta-Amyloid fibrils activate parallel mitogen-activated protein kinase pathways in microglia and THP1 monocytes. *J Neurosci* 18: 4451-4460, 1998.

Minogue AM, Schmid AW, Fogarty MP, Moore AC, Campbell VA, Herron CE, and Lynch MA. Activation of the c-Jun N-terminal kinase signaling cascade mediates the effect of amyloid-beta on long term potentiation and cell death in hippocampus: a role for interleukin-1beta? *J Biol Chem* 278: 27971-27980, 2003.

Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, and Greenberg ME. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21: 7551-7560, 2001.

Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, and McConlogue L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20: 4050-4058, 2000.

Nagele RG, D'Andrea MR, Anderson WJ, and Wang HY. Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 110: 199-211, 2002.

Oliet SH, Malenka RC, and Nicoll RA. Bidirectional control of quantal size by synaptic activity in the hippocampus. *Science* 271: 1294-1297, 1996.

Reichel P, Cohen LA, Karmali RA, Schuessler GJ, and Rose DP. Modulation of growth, prostaglandin synthesis, and prolactin-binding in two cultured rat mammary carcinoma cell lines by flurbiprofen. *Prostaglandins Leukot Med* 20: 223-236, 1985.

Saleshando G and O'Connor JJ. SB203580, the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor blocks the inhibitory effect of beta-amyloid on long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 288: 119-122, 2000.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298: 789-791, 2002.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766, 2001.

Shoji M, Iwakami N, Takeuchi S, Waragai M, Suzuki M, Kanazawa I, Lippa CF, Ono S, and Okazawa H. JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation. *Brain Res Mol Brain Res* 85: 221-233, 2000.

Stephan A, Laroche S, and Davis S. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci* 21: 5703-5714, 2001.

Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, and Martin LJ. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 933-944, 1997.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, and Katzman R. physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major cognitive impairment. *Ann Neurol* 30: 572-580, 1991.

Troy CM, Rabacchi SA, Xu Z, Maroney AC, Connors TJ, Shelanski ML, and Greene LA. beta-Amyloid-induced neuronal apoptosis requires c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurochem* 77: 157-164, 2001.

Wang HY, D'Andrea MR, and Nagele RG. Cerebellar diffuse amyloid plaques are derived from dendritic Abeta42 accumulations in Purkinje cells. *Neurobiol Aging* 23: 213-223, 2002.

Wang HY, Lee DHS, Davies CB, and Shank RP. Amyloid peptide A β ₁₋₄₂ binds selectively and with picomolar affinity to α 7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 75: 1155-1161, 2000.

Wang Q, Rowan MJ, and Anwyl R. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J Neurosci* 24: 6049-6056, 2004a.

Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, and Anwyl R. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-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, 2004b.

Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, and Ashe KH. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22: 1858-1867, 2002.

Wyss-Coray T and Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35: 419-432, 2002.

Xie Z, Smith CJ, and Van Eldik LJ. Activated glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38. *Glia* 45: 170-179, 2004.

Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, and Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 245: 417-420, 1989.

Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, and Malinow R. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110: 443-455, 2002.

Zhu X, Rottkamp CA, Hartzler A, Sun Z, Takeda A, Boux H, Shimohama S, Perry G, and Smith MA. Activation of MKK6, an upstream activator of p38, in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 79: 311-318, 2001.

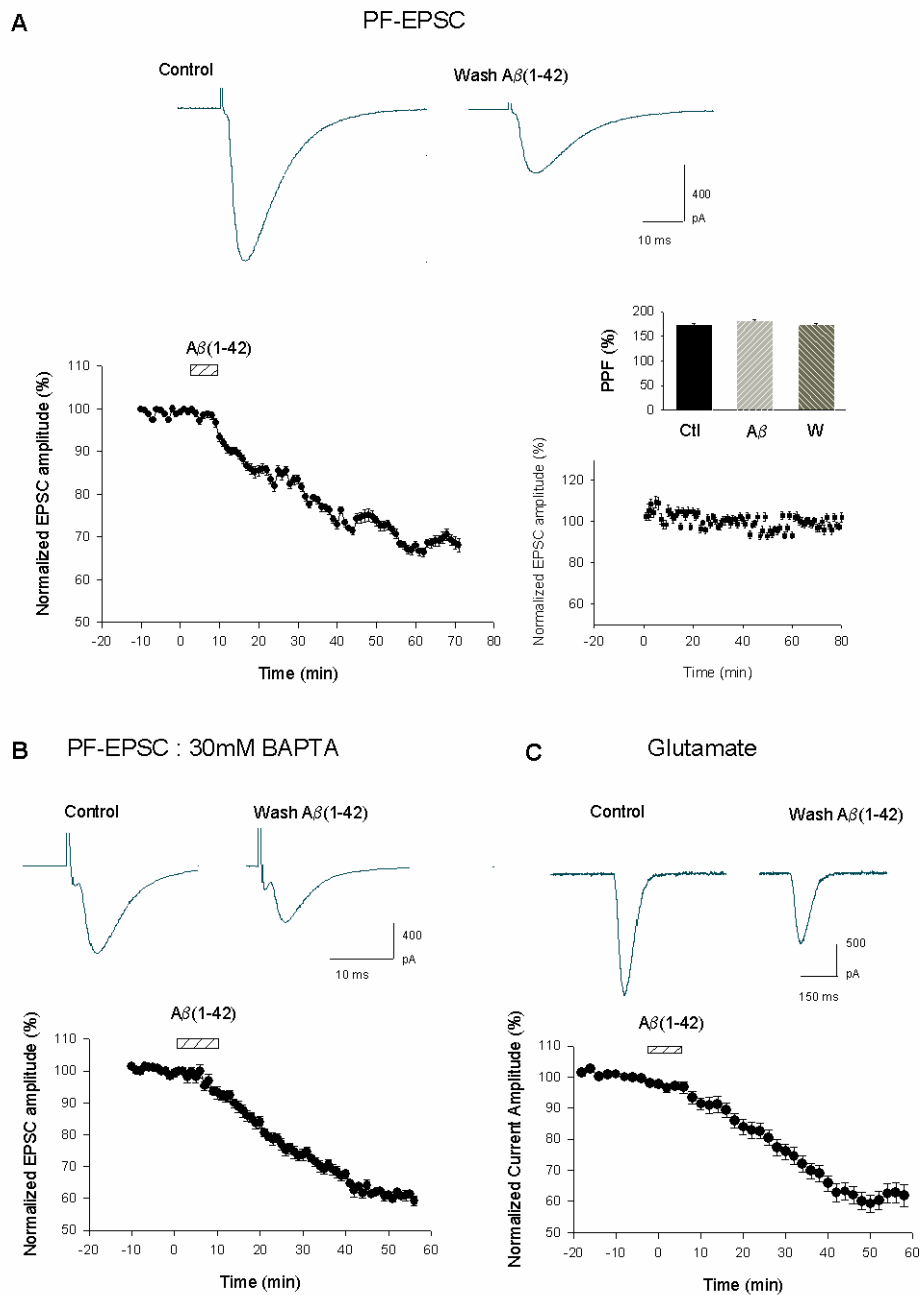


Figure 1:

(A) Effect of A β (1-42) on EPSC amplitude.

EPSC traces (average of 20 individual EPSCs) evoked by a parallel fiber stimulation before and after a 10 mn bath exposure to 1 μ M A β (1-42). Traces shown are from the same cell.

Time course of the depression by A β (1-42) of the parallel-fiber evoked EPSC amplitude. Amplitudes were normalized relative to the 10 mn control period, prior to the drug application. Histogram shows paired-pulse facilitation (PPF) before (Ctl), during (Ab) and after (W) A β (1-42) application. Percentage of PPF is the ratio of the second EPSC over the first EPSC, normalized to the first EPSC. The graph on the right shows the variations of the EPSC amplitude over time in control conditions. Note the absence of a decrease in the EPSC.

(B) Effects of A β (1-42) on EPSC amplitude in the presence of 30 mM BAPTA.

Average traces of 20 EPSCs evoked by parallel fiber stimulation before (left) and after (right) a 10 mn bath exposure to 1 μ M A β (1-42) in the presence of 30 mM intracellular BAPTA (applied via the recording pipette). Traces shown are from the same cell.

Time course of the depression by A β (1-42) of the parallel-fiber evoked EPSC amplitude in the presence of 30 mM intracellular BAPTA. Amplitudes were normalized relative to the 10 mn control period, prior to the drug application.

(C) Effects of A β (1-42) on glutamate evoked inward currents.

Individual glutamate current traces evoked by glutamate puffs (50 μ M; 10-20 ms) before and after a 10 mn bath exposure to 1 μ M A β (1-42). Traces shown are from the same cell.

Time course of the A β (1-42) effect on the amplitude of currents evoked by glutamate puffs (50 μ M; 10-20 ms). Amplitudes were normalized relative to the 10 mn control period, prior to the drug application.

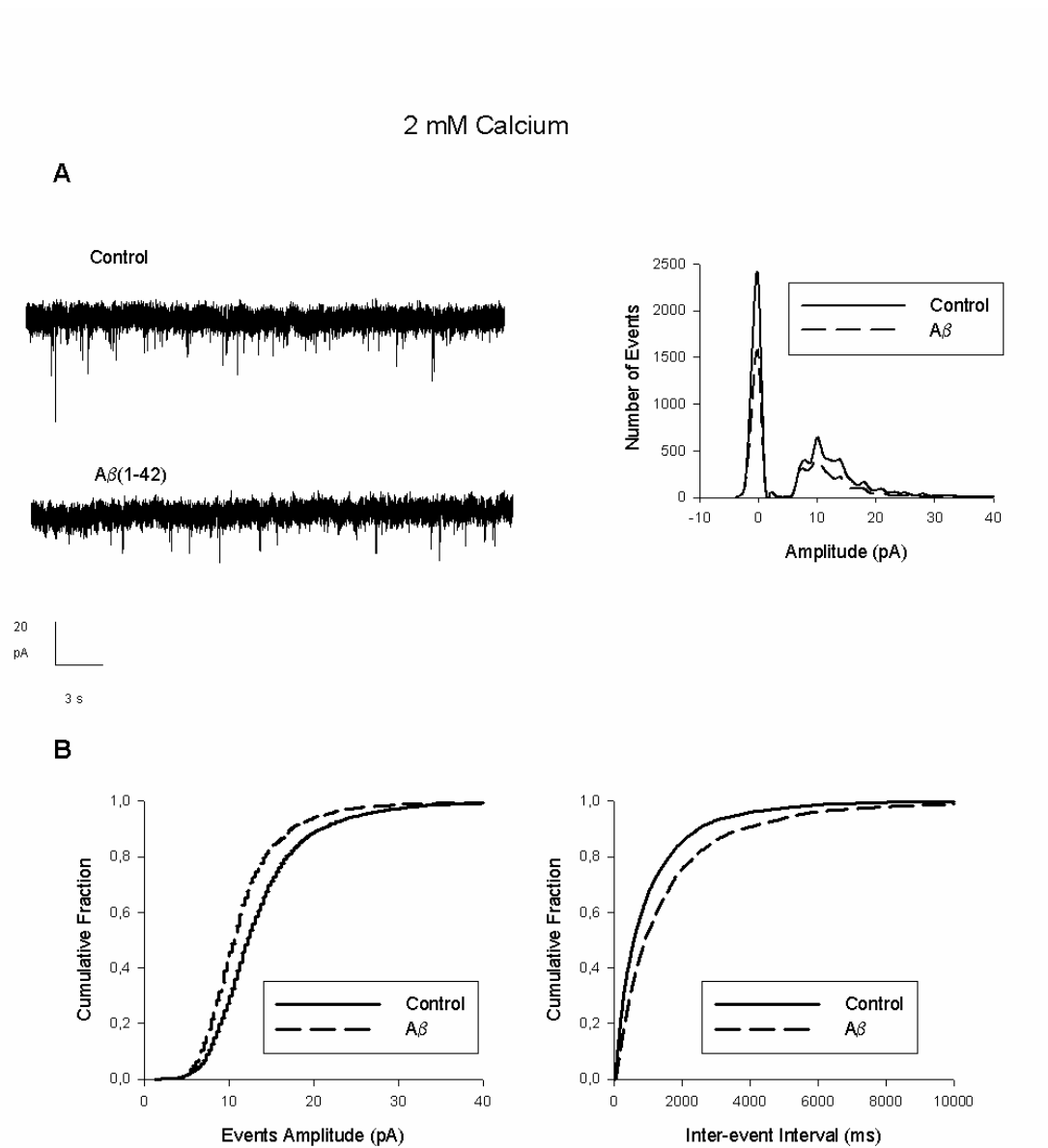


Figure 2 :

Effects of A β (1-42) on mEPSC amplitude and frequency.

(A) Individual mEPSC traces before and after a 10 mn bath exposure to 1 μ M A β (1-42). Traces shown are from the same cell. The right panel shows the line plot of the mEPSC amplitude histogram before and after A β (1-42) exposure.

(B) Cumulative fraction plots of amplitude and inter-event interval of mEPSC before (full line) and after (dotted line) A β (1-42) exposure.

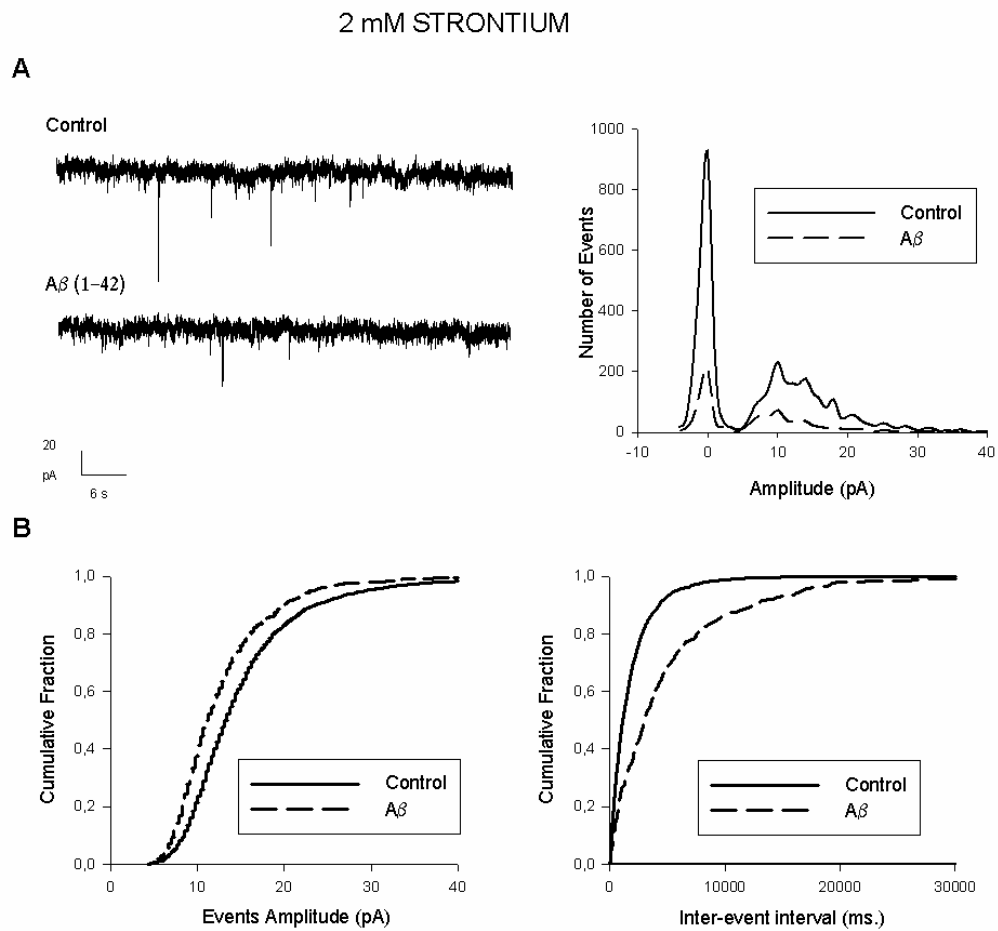


Figure 3 :

Effects of A β (1-42) on mEPSCs in presence of 2mM strontium.

(A) Individual mEPSC traces before and after a 10 mn bath exposure to 1 μ M A β (1-42) in presence of 2mM strontium. Traces shown are from the same cell. The right panel shows the line plot mEPSC amplitude histogram before and after A β (1-42) exposure.

(B) Cumulative fraction plots of mEPSC amplitude and inter-event interval before (solid line) and after (dotted line) A β (1-42) exposure in the presence of 2mM strontium.

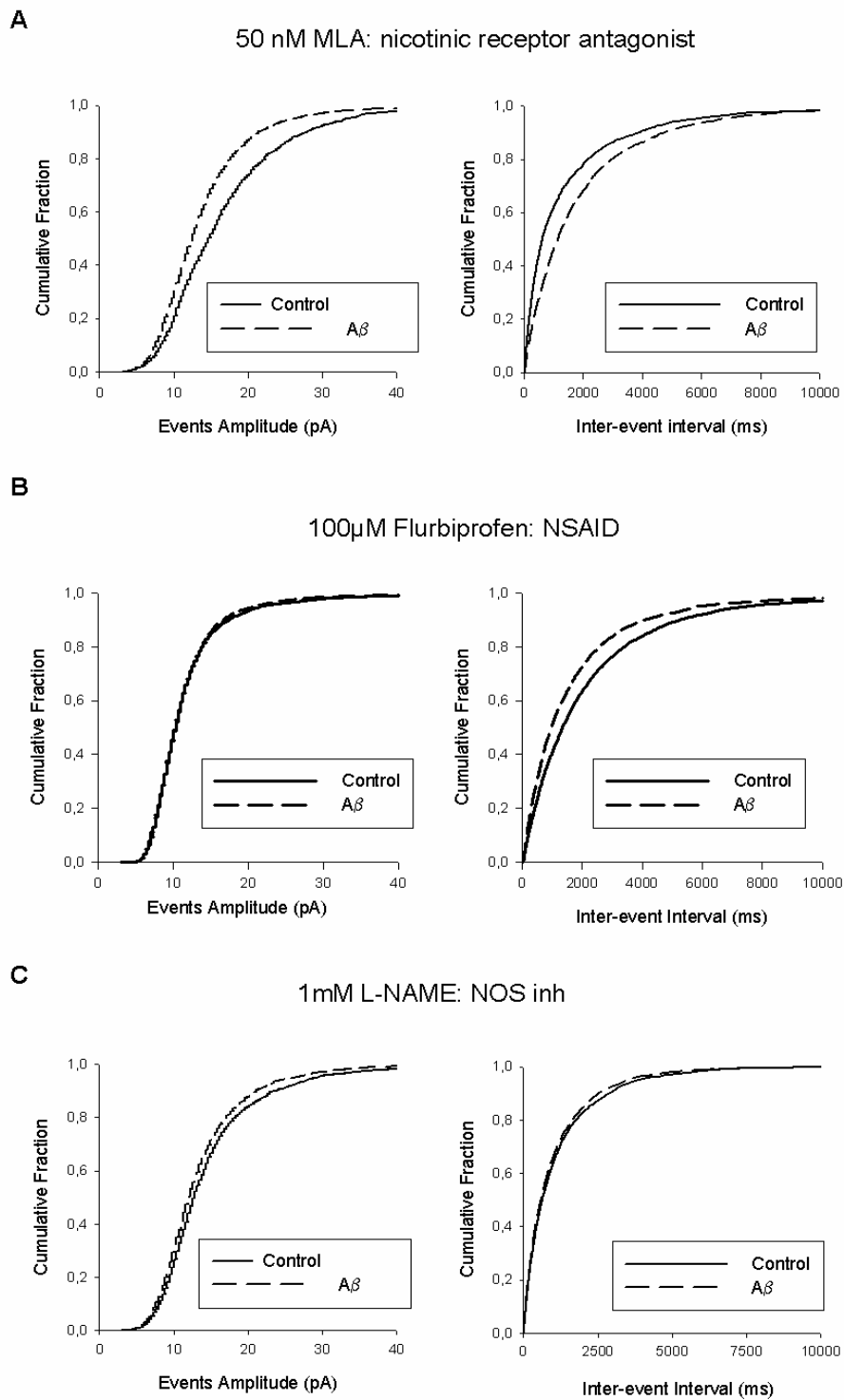


Figure 4:

Effects of A β (1-42) on mEPSCs in the presence of inhibitors

(A) Cumulative fraction plots of mEPSC amplitude and inter-event interval before (solid line) and after (dotted line) A β (1-42) exposure in presence of 50 nM MLA, a preferential $\alpha 7$ nicotinic receptor antagonist. Note that the depressant effects of A β were not blocked by MLA.

(B) Cumulative fraction plots of amplitude and inter-event interval of mEPSCs before (solid line) and after (dotted line) A β (1-42) exposure in presence of 100 μ M flurbiprofen. Note that flurbiprofen blocks the postsynaptic action of A β and reverses its presynaptic action.

(C) Cumulative fraction plots of amplitude and inter-event interval of mEPSC before (solid line) and after (dotted line) A β (1-42) exposure in the presence of 1mM L-NAME, a NOS inhibitor. Note that L-NAME blocks the presynaptic action of A β but not its postsynaptic action.

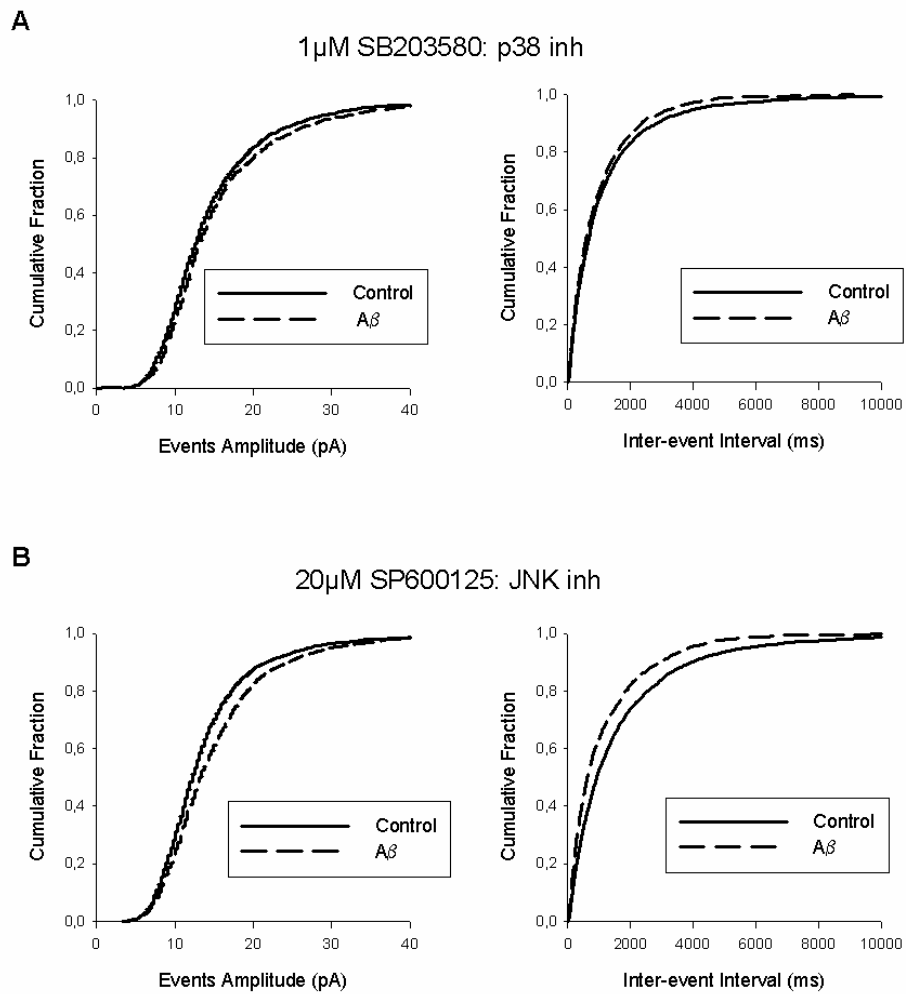


Figure 5:

Effect of A β (1-42) on EPSC amplitude in the presence of MAP kinase inhibitors

(A) Cumulative fraction plots of mEPSC amplitude and inter-event intervals before (solid line) and after (dotted line) A β exposure in the presence of 1 μ M SB203580, a p38 MAP kinase inhibitor. Note that SB203580 reverses the effects of Ab.

(B) Cumulative fraction plots of amplitude and inter-event interval of mEPSC before (solid line) and after (dotted line) A β (1-42) exposure in presence of 20 μ M SP600125, a JNK MAP kinase inhibitor. Note that SP600125 reverses the effects of Ab.

III Conclusions

Dans ce travail nous avons montré les effets de l'A β (1-42) sur la transmission synaptique de la synapse fibre parallèle/cellule de Purkinje du cervelet.

1) Transmission synaptique évoquée

Une application de 1 μ M d'A β (1-42) soluble provoque une baisse progressive et irréversible de l'amplitude des EPSCs des fibres parallèles.

Cette baisse des EPSCs est indépendante du calcium post-synaptique puisque l'application d'A β en présence de BAPTA dans le bain, un chélateur du calcium, provoque également une baisse des EPSCs.

La baisse des EPSC est due à un effet post-synaptique de l'A β : si l'on remplace de la stimulation électrique par une stimulation des cellules de Purkinje avec du glutamate agissant directement sur l'élément post-synaptique on obtient des courants entrants médiés par les récepteurs AMPA qui sont également réduits par une application d'A β (1-42). De plus, la Paired Pulse Facilitation (PPF) n'est pas affectée par le traitement à l'A β , suggérant une action post-synaptique du peptide. La PPF est une forme de plasticité à court terme qui se caractérise par l'augmentation de l'amplitude du deuxième EPSC quand on effectue deux stimulations présynaptiques rapprochées de même amplitude. Cette plasticité est le reflet de la libération pré-synaptique de neurotransmetteur et donc sa stabilité lors du traitement par l'A β démontre la nature post-synaptique de l'effet.

2) Transmission synaptique spontanée

a) L'A β diminue la transmission synaptique spontanée

L'application d'1 μ M d'A β (1-42) sur des tranches de cervelet provoque une diminution à la fois de la fréquence et de l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs miniatures (mEPSC). En association avec les résultats sur la transmission évoquée, ces résultats suggèrent que l'A β provoque une endocytose des récepteurs AMPA post-synaptiques, ce qui expliquerait aussi la baisse observée dans l'amplitude et la fréquence des mEPSCs et la baisse des EPSC sans baisse de la PPF (Carroll *et al.*, 2001 ; Liao *et al.*, 2001).

b) *L'action de l'A β ne dépend pas du récepteur $\alpha 7$ nicotinique de l'acétylcholine*

L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs nicotiques ne bloque pas les effets de l'A β . Les antagonistes des récepteurs nicotiques ne bloquent pas non plus les effets de l'A β sur la LTP (Wang *et al.*, 2004b). Le fait que les récepteurs nicotiques semblent impliqués dans l'internalisation de l'A β (Wang *et al.*, 2002b) plutôt que dans ses effets sur la plasticité synaptique laisse penser que ces récepteurs jouent un rôle dans la toxicité à long terme du peptide plutôt que dans la toxicité aiguë.

c) *Implication de processus pro-inflammatoires*

L'utilisation d'un anti-inflammatoire non stéroïdien bloque les effets de l'A β suggérant ainsi que l'action de l'A β sur l'activité synaptique est due à la production de prostaglandines.

Le mécanisme par lequel l'A β agit sur la production de prostaglandines reste à déterminer mais il est raisonnable de penser que l'activation des COX passerait par la production de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL1 β . En effet, il a déjà été montré que l'IL1 est impliquée dans la réduction de la LTP induite par l'A β (Minogue *et al.*, 2003).

Il reste à confirmer l'implication de cytokines pro-inflammatoires dans notre système et à déterminer le site de production de ces médiateurs. Il n'est pas clair si l'effet de l'A β observé est un effet direct ou bien si il y a un relais cellulaire entre le peptide et la cellule post-synaptique. Les cellules gliales semblent les candidats idéals pour la sécrétion des cytokines inflammatoires (Griffin *et al.*, 1995 ; Del Bo *et al.*, 1995). Ainsi, les cellules gliales, activées dans la maladie d'Alzheimer, pourraient être l'intermédiaire de l'action de l'A β (Akiyama *et al.*, 2000).

d) *Les voies de transduction activées*

Par une approche pharmacologique nous avons mis en évidence les voies de transduction impliquées dans les effets de l'A β . Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur de la iNOS inhibe les effets de l'A β sur les mEPSCs. Ce résultat est intéressant car il confirme les

résultats de Wang et al qui ont montré que la baisse de la LTP provoquée par l'A β est bloquée chez les animaux dont le gène de la iNOS est invalidé (Wang *et al.*, 2004a). Le NO et les radicaux libres qui dérivent de sa production sont donc impliqués dans les effets de l'A β sur la physiologie synaptique.

Comme les voies des MAP Kinases sont activées dans l'inflammation - notamment par l'activation de Ras par le NO (Lander *et al.*, 1995) - nous avons également étudié les effets d'inhibiteurs des voies de MAP Kinases sur les effets de l'A β . L'utilisation de SP600125, un inhibiteur de la voie JNK/c-Jun, comme l'utilisation de SB 203580, un inhibiteur de la voie p38, bloquent l'effet de l'A β sur les mEPSCs.

En conclusion, nous avons mis en évidence un effet de dépression de l'application aigue de 1 μ M d'A β (1-42) soluble sur la transmission synaptique évoquée et spontanée de la synapse fibres parallèles/cellule de Purkinje du cervelet. L'A β réduit à la fois les EPSCs et les mEPSCs par des mécanismes inflammatoires mettant en jeu les voies de signalisation du NO, et des MAP kinases JNK et p38.

Sujet 3 :

Modifications des tubulines dans
l'apoptose neuronale induite par le
peptide A β (25-35)

Arbez N., Larcher J.C., Ozon S., Lachkar S., Mariani J.,
Miquel M.C. et Brugg B.

“ β -amyloid induces a cytoplasmic specific aggregation of
class III β -tubulin *ex vivo*.”

Sujet III – Modifications des tubulines dans l’apoptose neuronale induite par le peptide A β (25-35)

I Objectifs

Une des caractéristiques majeures du neurone est sa compartimentalisation structurale et fonctionnelle en soma, dendrites et axone. Le cytosquelette, composé principalement de microtubules et de leurs protéines associées (également appelées MAPs pour "microtubule-associated proteins"), de microfilaments d’actine ainsi que des neurofilaments qui appartiennent à la famille des filaments intermédiaires, est l’acteur principal de cette compartimentalisation très développée dans les neurones. De ce fait, son intégrité est critique pour le bon fonctionnement du neurone, voire, dans certaines situations, pour sa survie.

Néanmoins, si des changements du cytosquelette, impliquant des phénomènes de modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la glycosylation, la glycation, la racémisation, l’ubiquitination, la nitration, ... ont été mis en évidence, leur place dans le processus de mort neuronale est peu connue. Par exemple, nous ne savons toujours pas si ces modifications représentent la (une des) cause(s) ou bien une des conséquences, voire un épiphénomène, de la dégénérescence neuronale. Cet état de fait est d’autant plus regrettable qu’un des principaux intérêts de l’étude de ces modifications est le but thérapeutique qui peut lui être associé. En effet, les changements concernant la nature moléculaire de certaines protéines constitutives du cytosquelette ainsi que les modifications structurales de ce dernier apparaissent le plus souvent préalablement aux modifications nucléaires qui représentent plutôt la phase terminale de l’apoptose. Dès lors, l’étude des mécanismes impliqués pourrait permettre l’identification des intermédiaires dont on peut espérer inhiber le fonctionnement pendant la phase encore réversible du processus délétère.

L’objectif de ce travail est de caractériser les modifications du cytosquelette de tubuline au cours de l’apoptose neuronale induite par le peptide A β (25-35) aussi bien à un niveau cellulaire par des techniques d’immunocytochimie qu’au niveau moléculaire par des techniques biochimiques.

II Procédures expérimentales

1) Culture primaire de neurones corticaux embryonnaires murins

Les embryons sont prélevés au 14^{ème} jour de gestation sur des souris de fond génétique Swiss (Elevages Janvier). Les souris sont anesthésiées à l'halothane puis sacrifiées par dislocation cervicale. Les embryons sont rapidement prélevés et les cortex disséqués et maintenus dans du milieu L15 (pour composition voir tableau 1) conservé dans la glace. Les cellules des cortex sont dissociées mécaniquement et l'homogénat est déposé 5 min dans la glace pour permettre la sédimentation des débris cellulaires. Le surnageant est ensuite prélevé et centrifugé 5 minutes à 1000 rpm. Le culot de cellules obtenu est resuspendu dans du milieu L15. La densité des cellules est ensuite déterminée par un comptage au bleu Trypan sur lame de Malassez observée au microscope optique. Les cellules sont ensuiteensemencées à la densité de 7.10^5 cellules/cm² sur des plaques de 6 ou 24 puits recouvertes la veille d'une solution de Polyéthylène Imine (1 mg/mL) et rincées 3 fois avec un tapon phosphate (Phosphate Buffered Saline, PBS) le jour même. Les cellules sont cultivées dans milieu de Eagle (Basal Eagle Medium, BME, Eurobio) additionné de 5% de sérum de cheval (HS, Eurobio), de 2,5% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio) de 2 mM de L-Glutamine, de 100 Ui/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine et conservées dans un incubateur à 37°C, 90% d'humidité et 5% de CO₂. Les sérums ont été préalablement décomplémentés 30 min à 56°C.

Après 2 jours de culture le milieu est remplacé au par un milieu N5 (Kamamoto et Barrett, 1986 ; pour composition voir tableau 2) additionné de 5% HS, 1% SVF, 3 μ M de cytosine β -D-arabino-furanoside (AraC, Sigma) et de 1 μ M de 5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maléate (MK801, Research Biochemicals International). L'AraC bloque la réplication empêchant ainsi la prolifération cellulaire, le MK801 permet de prévenir l'éventuelle excitotoxicité du glutamate susceptible de se produire par blocage des récepteurs NMDA.

Acides Aminés	mg/l
DL-α-alanine	150
L-arginine HCl	150
L-cystine HCl H ₂ O	10
L-histidine	10
DL-isoleucine	40
L-leucine	40
L-lysine HCl	70
DL-méthionine	10
DL-phénylalanine	2
L-proline	40
L-sérine	40
DL-thréonine	40
L-tryptophane	2
L-tyrosine 2Na ⁺	20
DL-valine	50
Sels inorganiques	mg/L
CaCl ₂ , 2H ₂ O	397
KCl	200
MgCl ₂ , 6H ₂ O	640
MgSO ₂ , 7H ₂ O	12
NaCl	5400
NaHCO ₃	3370
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	100
acide citrique	20

Composés organiques	mg/L
D-fructose	100
D-galactose	200
D-glucose	40
αβ glycérophosphate	100
D-mannose	50
D-sorbitol	100
acide succinique	10
rouge phénol	5,5
pénicilline G	61
streptomycine sulfate	100

Vitamines	mg/l
acide para-aminobenzoïque	1
d-biotine (vit H)	0,2
DL-carnitine	1
choline HCl	6
acide folique	4
myoinositol	30
niacinamide	8
DL-panthothénate Ca (vit B5)	1
pyridoxal HCl (vit B6)	4
pyridoxamine 2HCl	0,5
riboflavin-5'-phosphate	0,6
thiamine monophosphate HCl	4
cyanocobalamine (vit B12)	1

Tableau 1 : Composition du milieu N5

Produit	mg/l
L15 medium	
L-aspartic acid	15
L-glutamic acid	15
L-cystine HCL H2O ds NaOH 1N	15
acide parz-aminobenzoique	5
choline HCl	10
myoinositol	10
cyanocobalamine (vit B12) +4°C	2
β -alanine	5
imidazole	60
DL-6,8-thioctic acid	0,5
Fumaric acid	25
penicilline G	74,6
streptomycine sulfate +4°C	123
NaHCO ₃	0,3M

Tableau 2 : Composition du milieu L15

2) Transfection du plasmide GFP à la lipofectAMINE 2000

La transfection est réalisée au 4^{ème} jour *in vitro* (JIV 4). Pour chaque puits, 1 μ g de plasmide pEGFP-N3 est dilué dans 50 μ l de milieu OPTI-MEM (Life Technologies). Parallèlement 3 μ l de LipofectAMIN 2000 (Life Technologies) sont ajoutés à 50 μ L d'OPTIMEM. Les deux solutions sont mélangées au bout de 5 minutes. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante pour permettre la formation des complexes plasmide-lipofectamine, 100 μ L de solution sont ajoutés dans les puits de culture contenant 400 μ l de milieu OPTIMEM I. Après 4 à 6 heures d'incubation dans un incubateur à 37°C, 90% d'humidité et 5% de CO₂, le milieu est remplacé par du milieu N5 5%. L'expression de la GFP est observable sous microscope inversé à émission de fluorescence dès 24 heures après la transfection.

3) Traitements pro-apoptotiques

A JIV 6, les cellules sont soumises à 2 types de traitements, la carence en sérum ou l'application de peptide amyloïde A β (25-35).

La carence est effectuée en plaçant les cellules dans un milieu N5 sans sérum. Afin d'éliminer toute trace de sérum les cellules sont rincées trois fois avec le milieu sans sérum au début de la carence. Le traitement au peptide A β se fait à une concentration de 60 μ M dans du milieu N5 5%. La durée des traitements s'échelonne entre 2 heures et 24 heures. Les cellules sont alors fixées à l'aide d'une solution contenant 4% Paraformaldéhyde + MES + PEG + EGTA, puis rincées 3 fois 5 min au PBS.

4) Immunocytochimie et marquage de la chromatine

Les membranes cellulaires sont perméabilisées pour permettre l'entrée des anticorps dans les cellules fixées avec du PBS + 0.2% Triton X100 durant 10 min.

La saturation des sites de fixations non-spécifiques des anticorps est ensuite réalisée par incubation dans une solution de PBS + 1% BSA (bovine serum albumin) + 10% SVF durant une heure.

L'incubation avec les anticorps primaires est réalisée dans une solution de PBS + 1% BSA pendant 12h à 4°C. Les anticorps dirigés contre la β -tubuline ou la β -tubuline de classe III sont dilués au 10000^{ème}. Cette étape est suivie par trois rinçages au PBS. L'anticorps secondaire couplé au CY3 (chèvre anti-souris polyclonal CY3, 1/2000^{ème}; Sigma) est dilué dans du PBS + 1% BSA. Après 2h d'incubation à température ambiante, les puits sont rincés 3 fois au PBS.

Tous les anticorps dirigés contre les différentes isoformes de la tubuline dont nous disposons étant des anticorps monoclonaux, pour réaliser un double marquage sur les mêmes cellules nous avons utilisé un anticorps anti α -tubuline directement couplé au FITC (anti-alpha tubuline FITC, 1/5000 Sigma). L'incubation avec cet anticorps dure 4heures et aucun anticorps secondaire n'est nécessaire.

Après 3 rinçages avec du PBS, les cellules sont incubées pendant 10 minutes à température ambiante avec de la bisbenzimidazole -ou Hoechst - diluée au 1/50 000 dans une solution de PBS contenant 0,005% de Triton X-100. Le Hoechst est un agent intercalant de l'ADN qui permet de visualiser les noyaux. Les cellules sont ensuite montées dans leur puits sous lamelle de verre de 14 mm de diamètre avec une goutte de Mowiol (milieu de montage qui préserve la fluorescence). Les plaques sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

Les cellules sont directement analysées dans leurs puits à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence.

5) Western blot

Les western blot sont réalisés à partir d'extraits protéiques de neurones ayant subi les mêmes traitements précédemment. Ils sont cultivés dans des plaques de 6 puits (diamètre des puits : 30 mm) pour permettre l'extraction d'une quantité suffisante de protéines. Les cellules sont grattées manuellement à l'aide d'un grattoir stérile dans 150 μ l de tampon Frackelton (Fr+) qui contient des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Willaime *et al.* 2001). Les protéines sont rapidement congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Les échantillons sont placés dans un sonicateur pendant un cycle de 5 minutes composé de 4 phases d'ultrasons de 30 secondes séparées de phases de repos d'1 minute. La concentration en protéine de chaque extrait cellulaire est ensuite dosée en utilisant le kit Biorad qui utilise la méthode de Lowry permettant d'obtenir une coloration dans le visible proportionnelle à la quantité de protéine. La mesure des densités optiques des différents échantillons est effectuée en parallèle de celle d'une gamme étalon de blot. Les densités optiques sont directement mesurées par un lecteur spectrophotomètre automatique, et les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Microsoft Excel.

Les protéines sont séparées sur gels de poly-acrylamide selon le protocole classique (Laemmli, 1970). Les protéines sont d'abord concentrées dans un gel contenant 5 % de acrylamide/bisacrylamide (37.5/1), 0.125 M Tris pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.1 % Persulfate d'ammonium, 0.01% Temed puis la résolution se fait dans le gel de séparation. Pour la séparation des tubulines des gels à 10 % d'acrylamide sont utilisés.

Les protéines sont transférées sur des membranes de PVDF (Polyvinylidène difluoride, Hydond P, Amersham) par transfert semi-sec pendant 1h 30 à 15 V dans un appareil de transfert (Transblot SD, Biorad). Le tampon de transfert est composé de 40 mM Glycine, 25 mM Tris et 20 % éthanol.

Le transfert et l'homogénéité de la charge sont vérifiés par marquage des protéines au rouge ponceau. Les membranes sont ensuite saturées pendant 1h avec une solution de TBS (Tris Buffered Saline) + Tween 20 + Lait 2%, puis rincées et incubées pendant 12 heures avec une solution de TBS + Tween 20 + anticorps primaire. Dans ces expériences nous avons utilisé séquentiellement un anticorps anti β -tubuline de classe III spécifique (1/2000, Sigma), un anticorps β -tubuline marquant toutes les isoformes (1/2000, Sigma), et un anticorps anti α -tubuline (1/1000, Sigma).

Les membranes sont lavées 3 fois 5 minutes au TBS + Tween sous agitation et l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (anticorps anti-souris HRP, 1/20000, Sigma) est ensuite hybridé à la membrane dans une solution de TBS + Tween 20 durant 1 heure.

Après 3 nouveaux rinçages au TBS + Tween 20 l'immunodétection se fait par Electro Chimio Luminescence. Par réaction enzymatique avec la HRP liée à l'anticorps secondaire, de la lumière est émise et impressionne des films photographiques (Hyperfilm, Amersham). Les films exposés sont ensuite développés à l'aide d'une développeuse (Kodak).

6) Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle est réalisée à partir des mêmes extraits que pour le western blot.

Les protéines sont séparées tout d'abord par isoélectrofocalisation 5-6 (IEF 5-6) selon le protocole décrit par O'Farrell (O'Farrell, 1975). Cette première migration permet une ségrégation des protéines selon leur pHi. Les gels de polyacrylamide sont coulés dans des tubes. Ils contiennent un mélange d'ampholytes spécifiques permettant de former un gradient de pH entre 5 et 6.

La préfocalisation nécessaire à l'établissement du gradient s'effectue grâce à l'application d'une tension : pendant 20 minutes à 200 V, 30 minutes à 400 V, 30 minutes à 600 V au moins 30 minutes à 750 V. Chaque gel est chargé à 150 μ g de protéines. Les échantillons sont traités au Tampon d'échantillon (TE) et à l'urée. Les échantillons déposés contiennent : le volume de protéine, le même volume de TE, 1 μ g d'urée par μ l de volume final (8 M urée final).

Les échantillons sont déposés sur le haut des gels, au sommet des tubes. Pour les IEF 5-6 la migration est de 16 heures à 750 V puis 4 heures à 1500 V. Les protéines migrent jusqu'à atteindre la zone correspondant à leurs pHi.

Après la migration, les gels sont sortis et plongés immédiatement dans un tampon d'équilibration pendant 20 minutes pour faire sortir l'urée et les ampholytes des gels.

La deuxième dimension a pour but de séparer les protéines en fonction de leurs masses moléculaires apparentes sur gel de poly-acrylamide en présence de SDS.

Les gels de l'IEF sont déposés sur le gel de concentration de la 2^{ème} dimension et y sont maintenus grâce à de l'agarose de scellement. La migration de ces gels de deuxième dimension dure environ 18h. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de

nitrocellulose par transfert liquide (500 mA pendant 1h15) dans un tampon Tris/Glycine/Méthanol.

Les membranes sont colorées au rougeponceau afin de vérifier la qualité du transfert et l'homogénéité de charge des gels.

La suite du protocole est une immunodétection semblable à celle utilisée en western blot.

7) Filter Assay

Pour mettre en évidence les agrégats par la technique du filter assay (d'après Rousseau *et al.*, 2004), il faut utiliser des extraits protéiques non congelés. Les cellules de chaque puit sont lysées dans 200 μ L de tampon de lyse (Frackelton) supplémenté en inhibiteurs de protéases. Les extraits sont centrifugés à 15.000 g, 15 minutes à 4°C. Les culots sont repris dans 100 μ L de DNase Buffer et incubés 1 heure à 37°C.

DNase buffer :

20 mM Tris-HCl pH 8	(stock : 200 mM) :	200 μ L
15 mM MgCl ₂	(stock : 1 mM) :	3 μ L
250 unités/mL DNase	(stock : 11 mg/mL) :	5 μ L
H ₂ O qsp :		2 mL

La dénaturation des protéines avec conservation des agrégats se fait par ajout de 100 μ L de tampon SDS/DTT (2X).

Tp SDS/DTT 2X :

40 mM EDTA	(stock : 0,1 M) :	800 μ L
4% SDS	(stock : 20%) :	400 μ L
100 mM DTT	(stock : 1 M) :	200 μ L
H ₂ O qsp :		2 mL

Les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à 95°C puis resuspendus.

Les échantillons sont alors filtrés sur une membrane d'acétate de cellulose. La membrane est rincée deux fois. La suite du protocole est une immunodétection semblable au western blot et à l'électrophorèse bidimensionnelle.

III Résultats

1) Caractérisation des cultures primaires de neurones corticaux

Afin de vérifier la pureté de la culture de neurones corticaux, nous avons quantifié les cellules positives pour MAP2 - un marqueur de neurones, pour la GFAP - exprimée par les astrocytes - et pour la vimentine - exprimée par la microglie. Le bisbenzimidé (ou Hoechst), permet de compter le nombre total de cellules.

Dans les cultures primaires (JIV5) cultivées dans du milieu N5 (5% FCS, 1% HS), les neurones représentent plus de 95 % de la population cellulaire (Fig. 17A) (cellules MAP2 positives : 95,79 +/- 0,21 %), les astrocytes représentent moins de 3 % de la population cellulaire (Fig 17B) (cellules GFAP positives : 2,4 +/- 0,15 %) et moins de 2 % des cellules ne sont pas caractérisées et représentent probablement des fibroblastes et des cellules endothéliales.

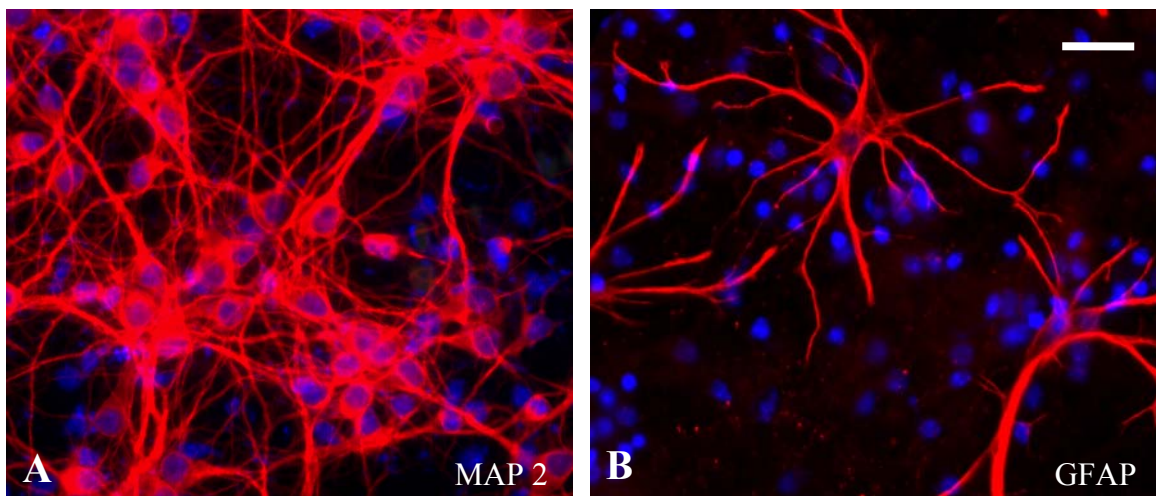


Figure 17 : Caractérisation des cultures primaires de neurones corticaux par immunodétection de protéines spécifiques. Les marquages sont effectués sur des cellules fixées à JIV 5. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Barre d'échelle : 20 μ M

A : Marquage de la protéine neuronale MAP 2

B : Marquage de la protéine GFAP

2) L'apoptose neuronale

Afin de déterminer la dose optimale de peptide A β à utiliser pour obtenir une apoptose massive et rapide nous avons comparé la mort cellulaire de neurones soumis à différentes doses de peptide A β (25-35) pendant 24 heures (Fig. 18).

La figure 18 montre que pour des applications inférieures à 40 μ M, il y a peu de mort de neurones par rapport au contrôle. A partir de 60 μ M, la mortalité se situe entre 50 et 60 %. Toutes les expériences suivantes ont donc été réalisées avec des traitements de 60 μ M d'A β (25-35).

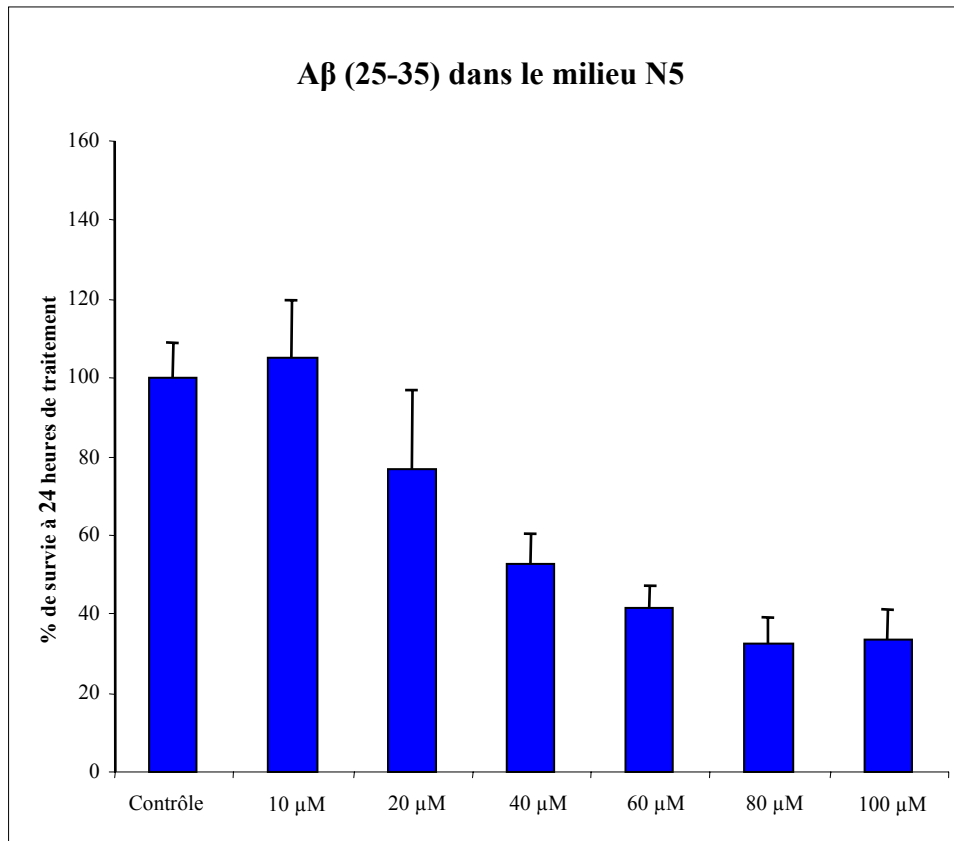


Figure 18 : Courbe dose-réponse des effets apoptotiques de l'A β (25-35) sur des neurones corticaux en culture primaire. Les neurones sont soumis à différentes doses de peptide A β pendant 24 heures et la survie cellulaire est quantifiée par mesure du nombre de cellules présentant un noyau non condensé après coloration au Hoechst.

L'apoptose induite par l'application de 60 μ M d'A β (25-35) sur des neurones corticaux maintenus en culture primaire dans du milieu N5 est caractérisée par des modifications nucléaires. Si l'on distingue les cellules vivantes des cellules mortes par l'état de condensation de leur ADN grâce à un marquage à l'aide d'un agent intercalant, on observe, tout d'abord une période de latence d'environ 8 à 10 heures pendant laquelle les cellules meurent peu. Il y a ensuite une mort rapide et massive avec 60 % de cellules mortes après 24 heures de traitement (Fig. 19).

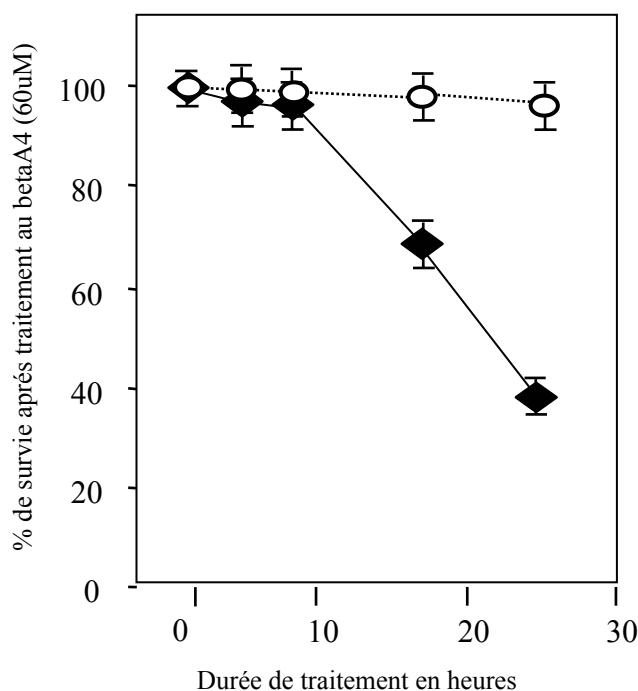


Figure 19 : Cinétique de survie des neurones corticaux pendant un traitement au peptide A β (25-35) (losanges noirs) ou dans des conditions contrôles (ronds blancs).

Le fait que l'apoptose puisse être induite de façon rapide et massive sur des populations homogènes de cellules composées presque exclusivement de neurones corticaux permet l'utilisation d'approches à la fois cellulaires et moléculaires.

Dans ce modèle de neurones corticaux, l'activation de voies de transduction des MAP kinases a été mise en évidence lors de l'apoptose induite par le céramide (Willaime *et al.*, 2001) ou après action de divers stimuli apoptotiques (Carimalo *et al.*, 2005).

3) Caractérisation morphologique de l'apoptose neuronale

Par transfection des neurones corticaux, nous avons induit l'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein). Cela permet d'observer en microscopie de fluorescence la forme des cellules, la GFP étant répartie de façon uniforme dans le cytoplasme des neurones transfectés. Le taux de transfection des neurones par l'utilisation de lipofectamine 2000 est faible, de 1 à 5%, ce qui nous permet d'observer des cellules individualisées (Fig. 20 A).

Pendant les traitements pro-apoptotiques, par le peptide A β (25-35) ou par carence en sérum, on observe des altérations de la forme des cellules qui surviennent tout au long du processus apoptotique (Fig. 20 B, C).

Avant l'induction de l'apoptose, les cellules présentent une morphologie allongée avec de longs prolongements fins et réguliers. Dès les phases les plus précoces de l'apoptose, pendant la phase réversible du phénomène, les neurones peuvent présenter des rétractions des prolongements neuritiques ou des fragmentations neuritiques (Fig. 20 B). Ces altérations sont observées quels que soient les stimuli apoptotiques utilisés et sont observables pendant la phase de latence avant même la condensation de la chromatine.

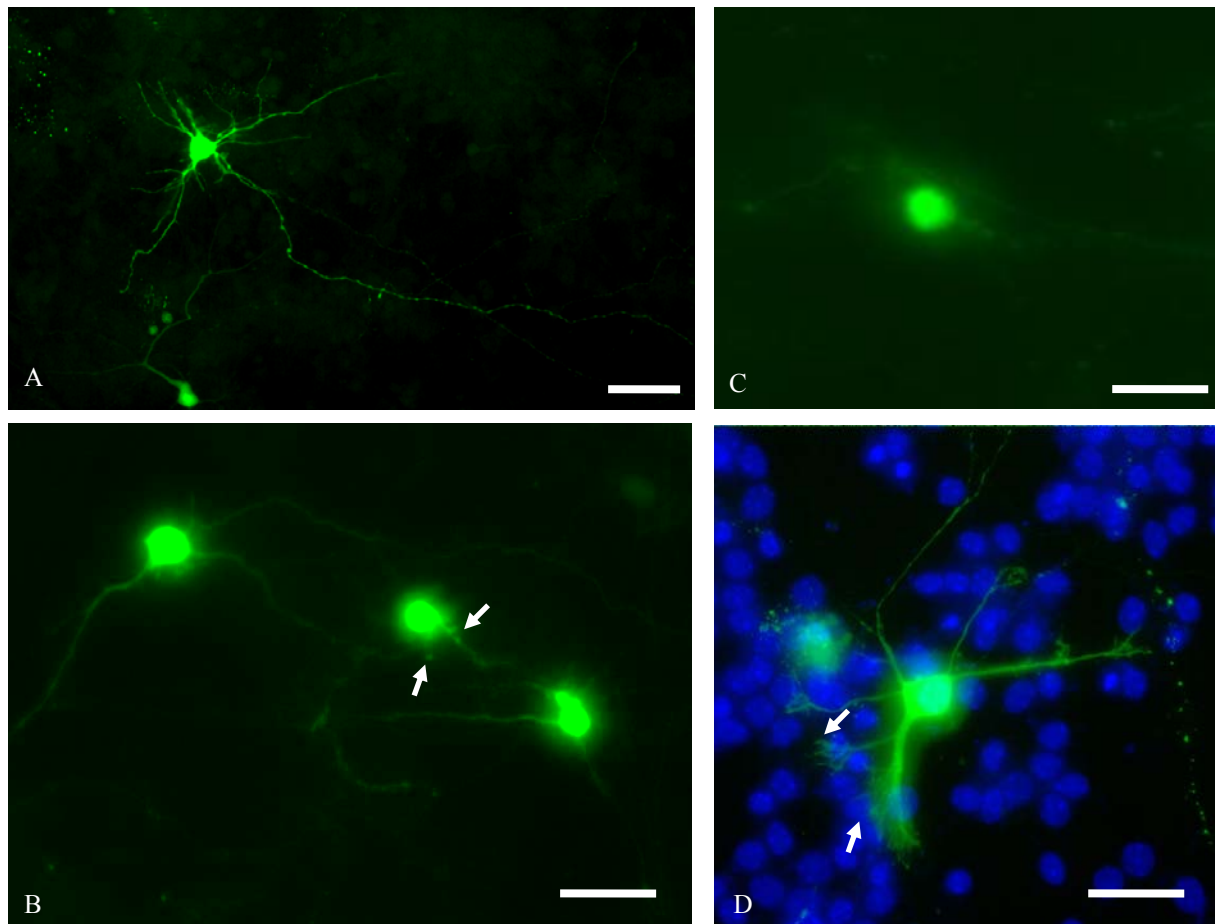


Figure 20 : Transfection des neurones corticaux par la GFP. Dans les conditions contrôle, les neurones présentent de long prolongements (A). Après 8 heures de traitement au peptide A β (25-35), la morphologie des cellules est altérée et elles présentent des rétractions neuritiques (flèches blanches) (B). Pendant les phases tardives, de l'apoptose les cellules s'arrondissent et perdent tous leurs prolongements (C). Les cellules traitées au peptide amyloïde présentent des nouvelles extensions cytoplasmiques (flèches blanches) (D). Barre d'échelle : 20 μ m

Dans les phases les plus tardives de l'apoptose, après 24 heures de traitement, on observe également une altération du corps cellulaire des neurones avec, là encore, des condensations et des fragmentations. Les cellules finissent par perdre tous leur prolongements et les corps cellulaires sont alors arrondis. Dans les tous derniers stades de l'apoptose, ils se fragmentent également pour former les corps apoptotiques (Fig. 20 C).

Néanmoins, il existe des différences entre l'apoptose induite par le peptide amyloïde et celle induite par la carence en sérum. En effet, lors de l'apoptose induite par le peptide A β (25-35), en plus de ces modifications communes, on observe la mise place de nouvelles extensions cytoplasmiques autour du corps cellulaire des neurones en souffrance. Ces extensions sont nombreuses et donnent un aspect « hérissé » aux corps cellulaires des neurones qui les présentent (Fig. 20 D).

Toutes ces observations morphologiques montrent qu'il se produit de fortes modifications des neurones dans l'apoptose, et ce même dans les phases les plus précoces. De si profondes modifications morphologiques ne peuvent être expliquées que par des modifications au niveau du cytosquelette neuronal.

4) Modifications des tubulines et des microtubules lors de l'apoptose neuronale

a) Modifications cellulaires

Par microscopie à fluorescence, nous avons observé les changements intervenant dans le cytosquelette de microtubules pendant l'apoptose neuronale. Là encore, nous avons utilisé deux stimuli apoptotiques différents : le peptide A β (25-35) et la carence en sérum, ce qui nous permet de distinguer les effets spécifiques au peptide amyloïde.

Avant tout traitement, les cellules présentent un réseau de microtubules dense, continu et régulier. Les résultats obtenus sont les mêmes quels que soient les anticorps utilisés. Un anticorps dirigé contre l' α -tubuline donnera le même immunomarquage qu'un anticorps dirigé contre la β -tubuline (Fig. 21).

L'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la β -tubuline de classe III dans les conditions contrôles confirme les résultats obtenus par immunomarquage de MAP 2 en ce qui concerne la proportion de neurones dans la culture. En effet, la β -tubuline de classe III est spécifique des neurones et est révélée dans une grande majorité de cellules (Fig. 23 A).

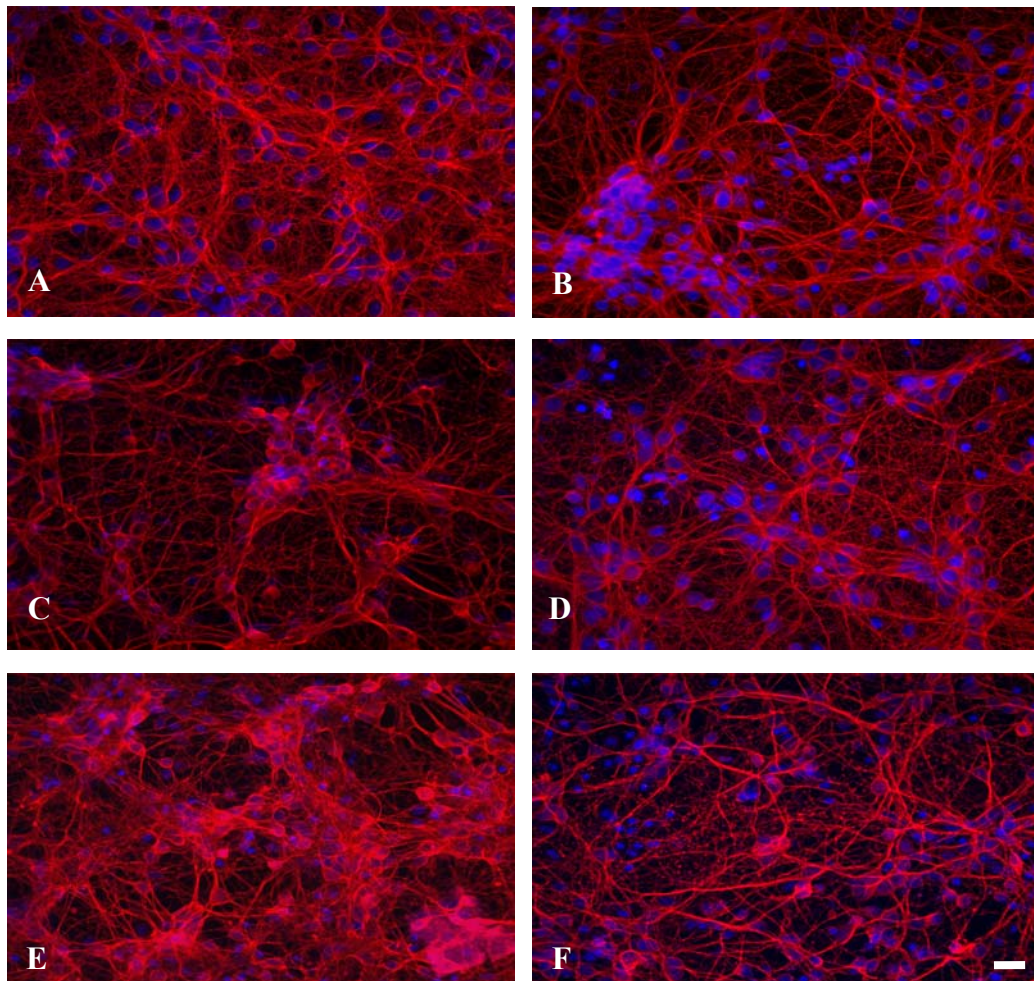


Figure 21 : Immunomarquage de l' α -tubuline lors de l'apoptose neuronale. Les cellules sont traitées soit par 60 μ M d'A β (25-35) pendant 0 h (A), 8 h (C) ou 24 h (E) soit par une carence en sérum pendant 0 h (B), 8h (D) ou 24 h (F). Barre d'échelle : 20 μ m

Lors de l'apoptose induite par le peptide A β , on constate des différences de localisation selon le type de tubuline observé. En effet, pour l' α -tubuline on observe peu de changements dans la répartition de la protéine au sein de la cellule, et ce, même après 24 heures de traitement (Fig. 21).

Le réseau de microtubules reste relativement préservé tout au long du traitement et l'on peut penser que la disparition effective du réseau ne survient que lorsque la cellule est en voie de dégradation. Dans nos conditions de cultures, on peut constater que même à 24 heures de traitement la grande majorité des cellules garde un réseau relativement dense, ce qui contraste avec la mort observée avec le Hoechst.

En revanche, les anticorps anti β -tubuline, révèlent que les effets de l'application d'A β (25-35) ne sont pas les mêmes. En effet, si l'on utilise un anticorps dirigé contre toutes les

formes de β -tubuline, le réseau de microtubules apparaît conservé pendant toute la durée du traitement malgré une légère diminution après 24 heures de traitement (Fig. 22).

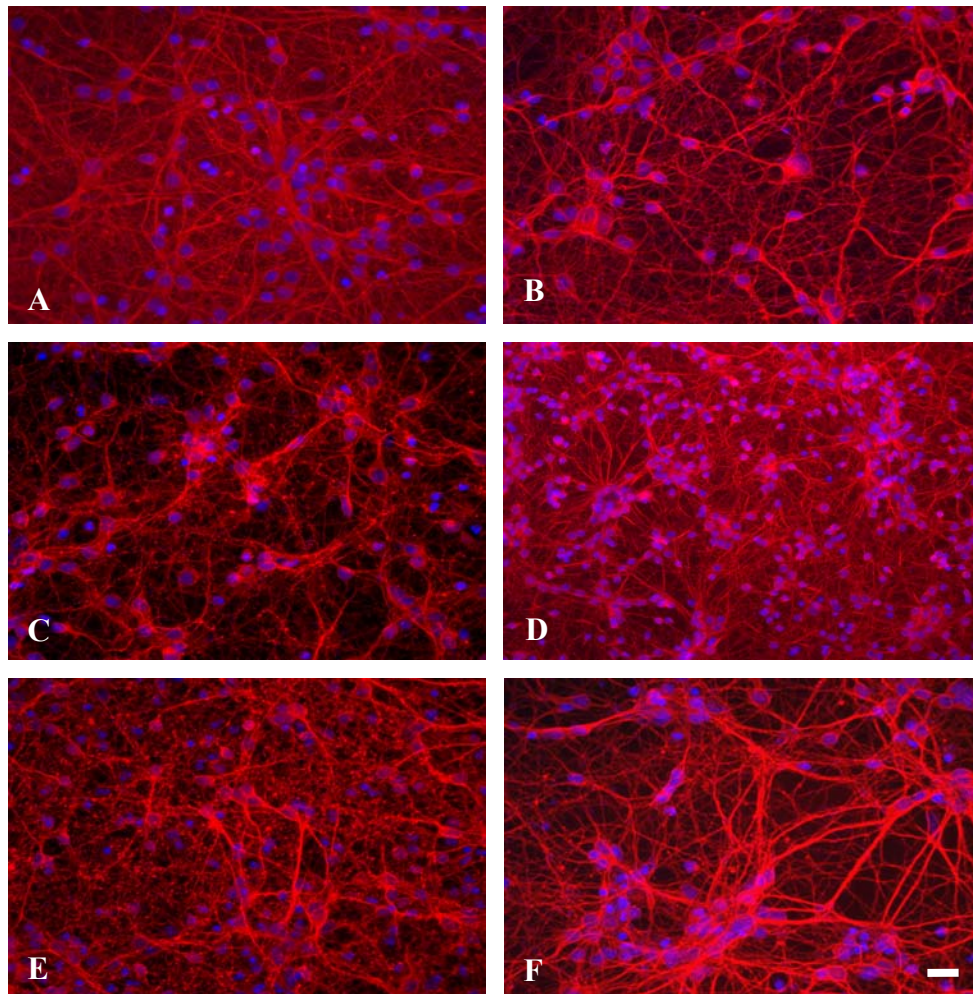


Figure 22 : Immunomarquage de la β -tubuline lors de l'apoptose neuronale. Les cellules sont traitées soit par 60 μ M d'A β (25-35) pendant 0 h (A), 8 h (C) ou 24 h (E) soit par une carence en sérum pendant 0 h (B), 8h (D) ou 24 h (F). Barre d'échelle : 20 μ m

De plus, un marquage ponctué apparaît dans les cytoplasme des cellules et ce rapidement au cours du traitement (Fig. 22).

Ce marquage ponctué est visualisé de façon plus précise quand on utilise l'anticorps spécifique de la β -tubuline de classe III. En effet, on observe que tout au long du traitement l'immunoréactivité de la β -tubuline de classe III disparaît du réseau de microtubules pour se retrouver sous forme d'amas (Fig. 23). Ce marquage ponctué est spécifique du traitement des neurones corticaux par l'A β (25-35). En effet, l'immunodétection de la β -tubuline de classe

III lors de l'apoptose induite par une carence en sérum, on n'observe pas de disparition de la β -tubuline du réseau de microtubules ni d'apparition d'amas cytoplasmiques (Fig. 23 F).

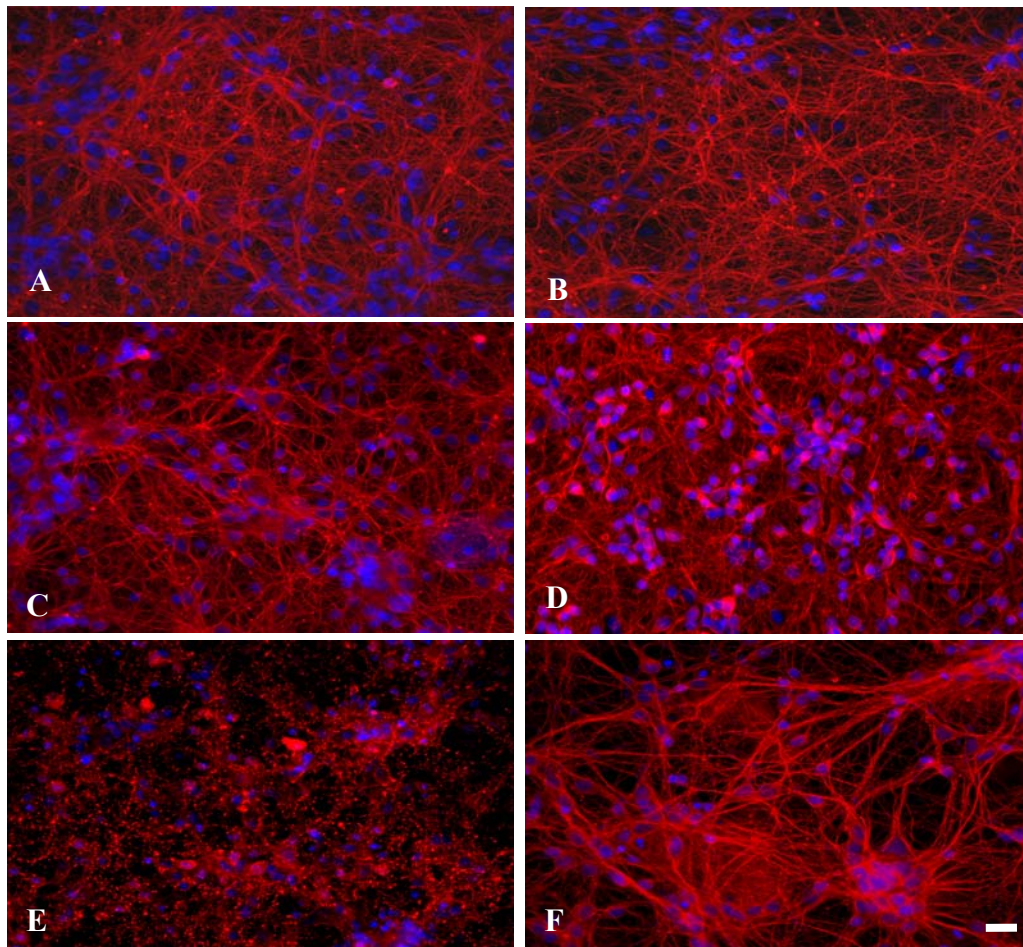


Figure 23 : Immunomarquage de la β -tubuline de classe III lors de l'apoptose neuronale. Les cellules sont traitées soit par 60 μ M d'A β (25-35) pendant 0 h (A), 8 h (C) ou 24 h (E) soit par une carence en sérum pendant 0 h (B), 8h (D) ou 24 h (F). Barre d'échelle : 20 μ m

L'utilisation d'un anticorps dirigé contre l' α -tubuline directement couplé au FITC permet de réaliser des doubles immunomarquages α -tubuline / β -tubuline et α -tubuline / β -tubuline de classe III. Ces doubles immunomarquages montrent les mêmes résultats que les simples (Fig. 24 et Fig. 25). Quand on réalise la superposition des images (Fig. 24 C, F et I ; Fig. 25 C, F et I), on observe que certains amas de β -tubuline de classe III sont dépourvus d' α -tubuline.

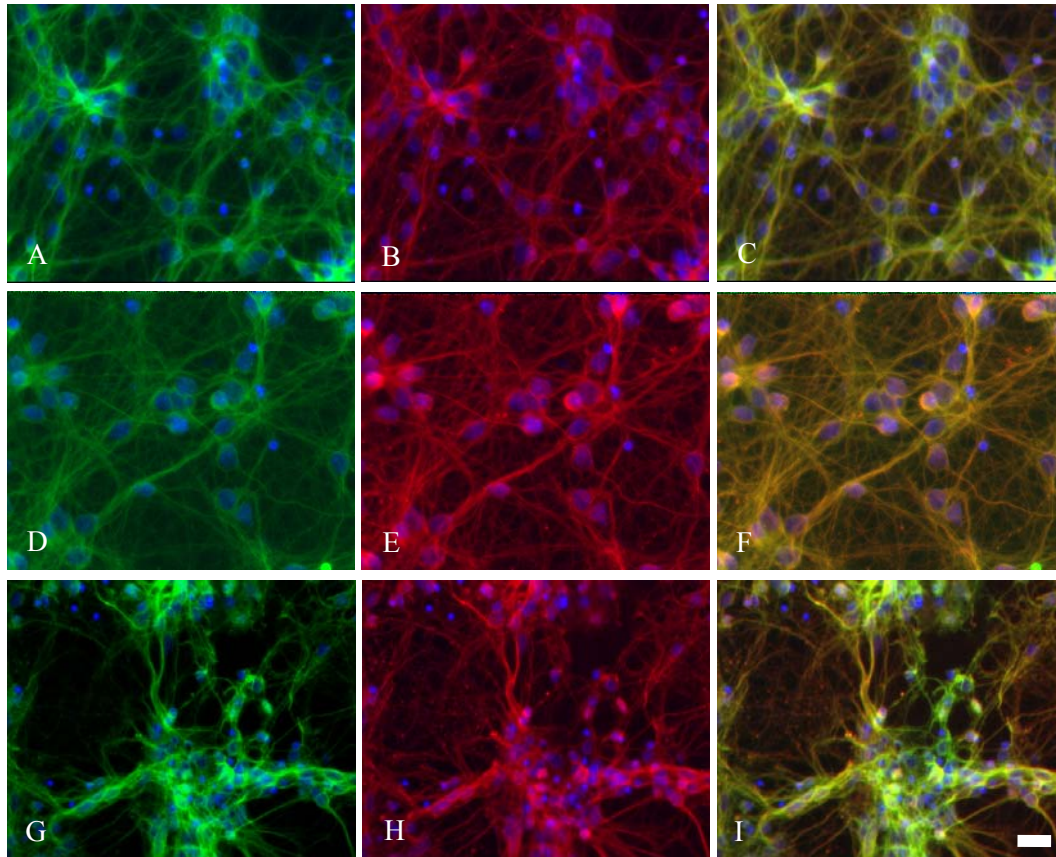


Figure 24 : Double immunomarquage β -tubuline / α -tubuline. Les cellules sont traitées par 60 μ M d'A β (25-35) pendant 0 h (A, B, C), 8 h (D, E, F) ou 24 h (G, H, I). La localisation de l' α -tubuline (A, D, G) et de la β -tubuline (B, E, H) sont révélées. Barre d'échelle : 20 μ m

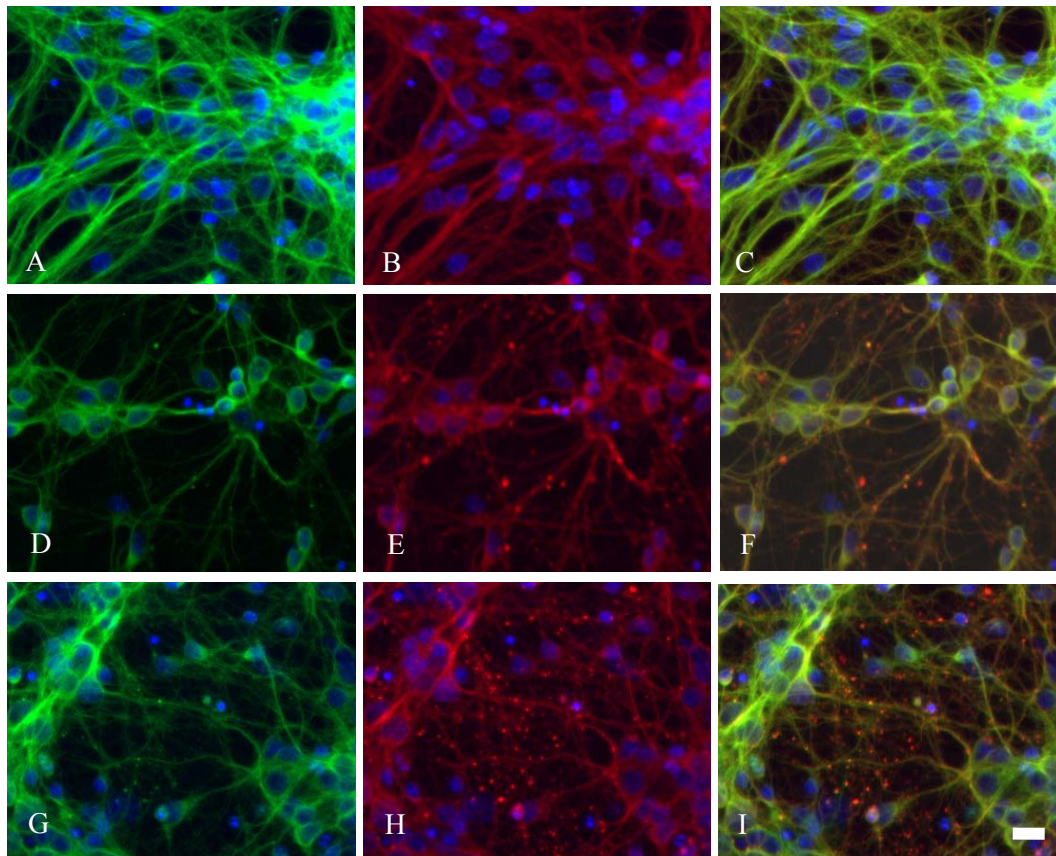


Figure 25 : Double immunomarquage β -tubuline de classe III / α -tubuline. Les cellules sont traitées par 60 μ M d'A β (25-35) pendant 0 h (A, B, C), 8 h (D, E, F) ou 24 h (G, H, I). La localisation de l' α -tubuline (A, D, G) et de la β -tubuline de classe III (B, E, H) sont révélées. Barre d'échelle : 20 μ m

L'analyse de ces mêmes cellules en microscopie confocale, nous a permis de confirmer la formation d'amas de β -tubuline de classe III dans le cytoplasme et leur disparition progressive du réseau de microtubules (Fig 24). L'intérêt de la microscopie confocale réside dans la capacité de discrimination verticale de la fluorescence du microscope. Cela permet de savoir si les deux marquages sont sur un même plan de coupe ou non. Grâce à cette possibilité nous avons pu voir que la β -tubuline de classe III située dans les agrégats semble être seule, sans α -tubuline.

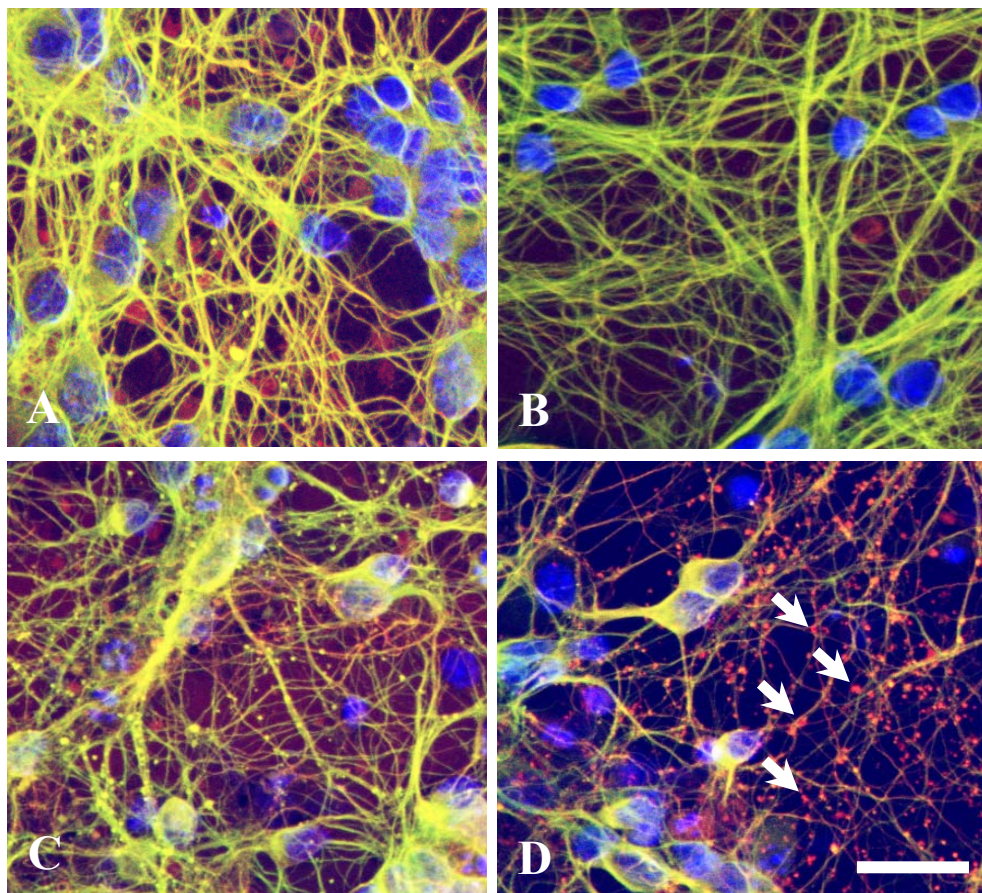


Figure 26 : Co-immunodétection des tubulines en microscopie confocale. Double immunomarquage de l' α - et de la β tubuline sans traitement (A) ou après 24 h de traitement à l'A β (25-35) (C). Double immunomarquage de l' α - et de la β -tubuline de classe III sans traitement (B) ou après 24 h de traitement à l'A β (25-35) (D). Les flèches indiquent des amas de tubuline de β -tubuline de classe III. Baree d'échelle : 20 μ m

Cette formation d'amas cytoplasmiques de β -tubuline de classe III est un effet spécifique de l'A β (25-35) puisque qu'elle n'existe pas lorsque la carence en sérum est utilisée comme inducteur de l'apoptose neuronale. Quelle que soit l'isoforme de tubuline

observée - α -tubuline, β -tubuline ou β -tubuline de classe III - il n'y a pas alors de changements dans le réseau des microtubules pendant l'apoptose. La cinétique de mort neuronale par la carence est plus lente que celle par le peptide A β ; nous avons donc vérifié que l'absence de formation d'amas pendant la carence en sérum n'est pas juste due à ce décalage de cinétiques ; en effet, après un traitement de 40 heures, on n'observe toujours pas d'amas intracellulaires.

Ainsi nous avons donc mis en évidence une action spécifique du peptide A β (25-35) sur un isotype particulier de tubuline puisqu'elle concerne seulement la β -tubuline de classe III neurospécifique.

b) *Modifications biochimiques*

Parallèlement aux analyses par microscopie après immunocytochimie de fluorescence, nous avons réalisé une étude biochimique des modifications de la tubuline au cours de l'apoptose neuronale induite par le peptide amyloïde et par la carence en sérum, ce par immunoblot après électrophorèse mono- ou bidimensionnelle.

Modifications de la tubuline

L'analyse par western blot de la tubuline dans les cellules, traitées par le peptide A β et par la carence en sérum, montre que les quantités de tubulines ne varient pas tout au long du traitement apoptotique (Fig. 27).

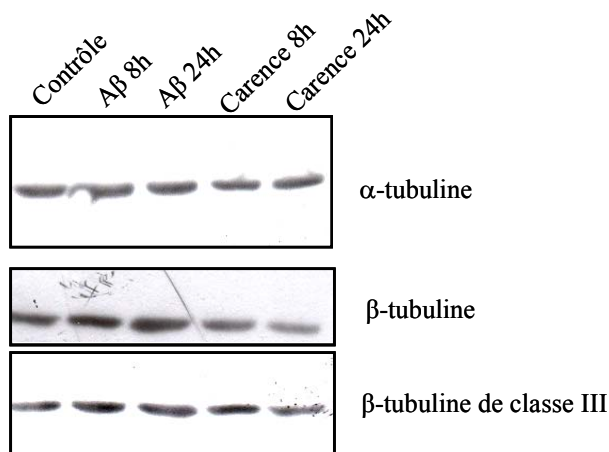


Figure 27 : Western blot des tubulines. Les extraits protéiques totaux sont séparés en SDS-PAGE, transférés sur membrane de PVDF et les tubulines sont détectées à l'aide d'anticorps spécifiques. Les protéines sont extraites de neurones traités ou non par 60 μ M d'A β (25-35) ou par carence en sérum.

Modifications post-traductionnelles de la tubuline

Les modifications post-traductionnelles des tubulines entraînent des variations de leur comportement au sein du microtubule. Ainsi les formes les moins modifiées se retrouvent plus au sein du pool de tubuline libre qu'au sein du pool de tubuline liée aux microtubules. L'analyse de l'état de modification post-traductionnelle des tubulines a été effectuée par électrophorèse bidimensionnelle. Par isoélectrofocalisation des protéines sur un gradient de pH 5-6 suivi d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, on peut séparer les différentes isoformes d' α - et de β -tubuline et les visualiser, après transfert, à l'aide d'anticorps spécifiques.

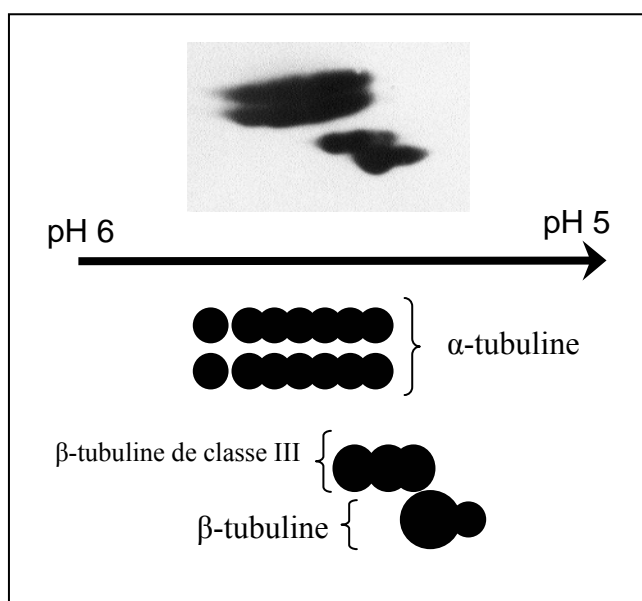


Figure 28 : Profil d'expression des isoformes de tubulines de neurones corticaux en culture primaire.

L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle des tubulines montre que dans notre modèle de culture primaire de neurones corticaux embryonnaires de souris, il est possible de séparer deux séries d'isoformes d' α -tubuline et deux séries de d'isoformes de β -tubuline. Ce profil d'expression ne change pas tout au long des 24 heures pendant lesquelles ont lieu les traitements.

Pendant le traitement par l'A β , on n'observe aucun changement dans le profil des modifications post-traductionnelles des tubulines que ce soit à 16 heures ou à 24 heures de traitement. On observe toujours les mêmes 7 « spots » d' α -tubuline sur deux niveaux de masses moléculaires apparentes ainsi que les 5 spots de β -tubuline dont les 3 de β -tubuline de classe III (Fig. 29).

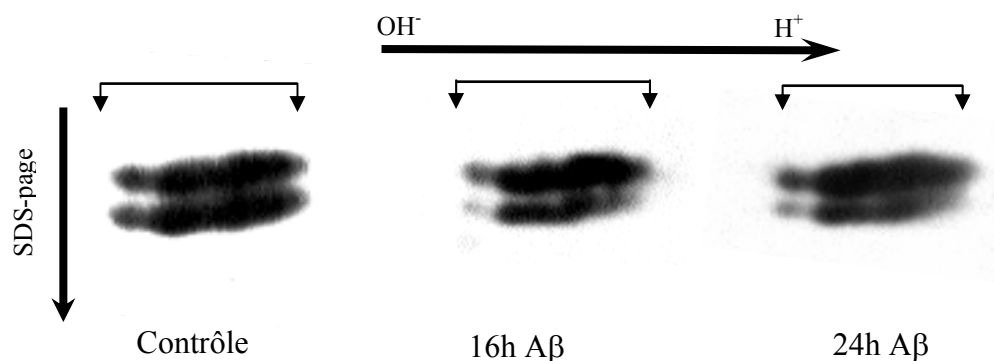


Figure 29 : Isoformes d' α -tubuline séparées par électrophorèse bidimensionnelle dans les conditions contrôles ou après 16h ou 24h de traitement au peptide A β (25-35) et révélées par immunodétection.

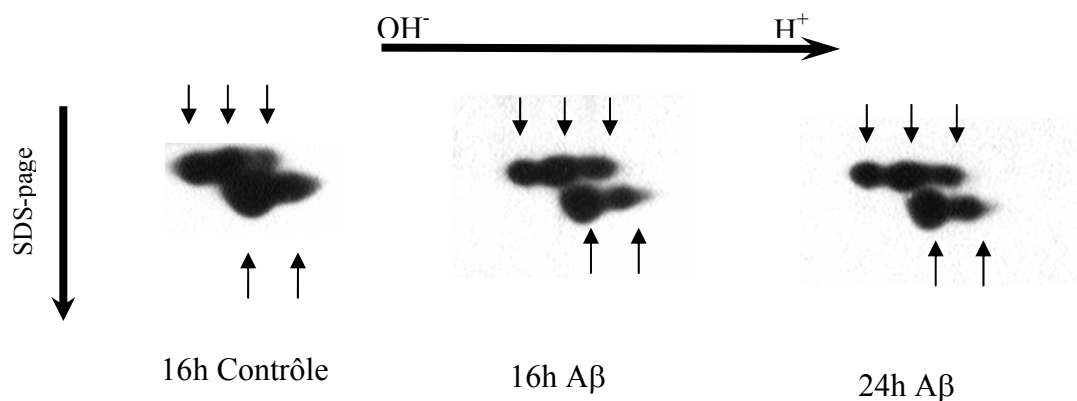


Figure 30 : Isoformes de β -tubuline et de β -tubuline de classe III séparées par électrophorèse bidimensionnelle dans les conditions contrôles ou après 16h ou 24h de traitement au peptide A β (25-35) et révélées par immunodétection.

En revanche, lors d'un traitement par carence en sérum, on observe une disparition progressive des « spots » les plus acides aussi bien pour l' α -tubuline que pour la β -tubuline. La disparition de ces « spots » est progressive dès 8 heures de traitement et est totale à 24 heures. Ces formes les plus acides correspondent aux formes ayant subi le plus de modifications post-traductionnelles. Ces formes sont classiquement associées de façon préférentielle aux microtubules. On observe donc un décalage du profil de modifications post-traductionnelles de la tubuline vers un état moins différencié associé à des tubulines libres plutôt qu'à des tubulines intégrées aux microtubules.

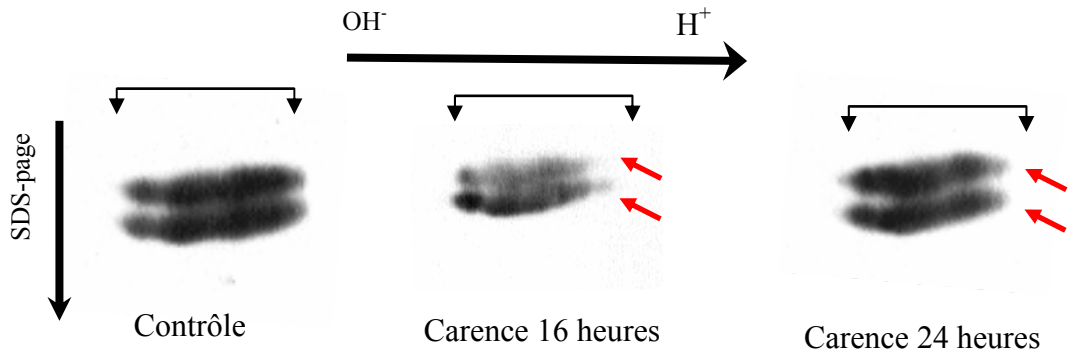


Figure 31 : Isoformes d' α -tubuline séparées par électrophorèse bidimensionnelle dans les conditions contrôles ou après 16h ou 24h de carence en sérum et révélées par immunodétection. Noter la disparition des spots les plus acides pendant la carence (flèches rouges).

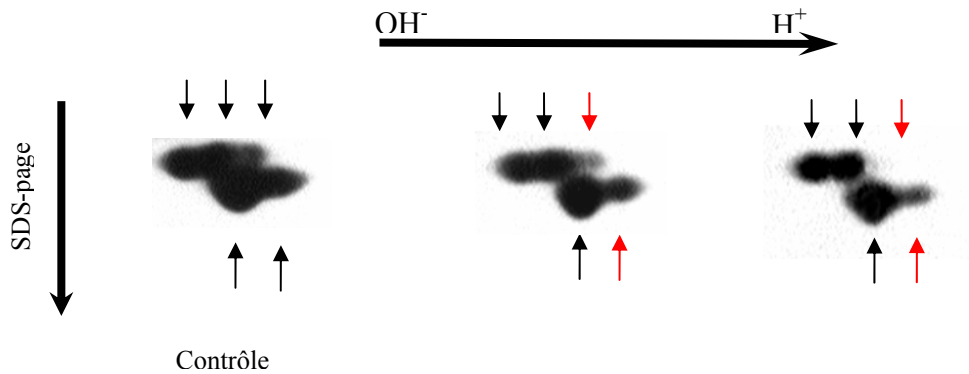


Figure 32 : Isoformes de β -tubuline et de β -tubuline de classe III séparées par électrophorèse bidimensionnelle dans les conditions contrôles ou après 16h ou 24h de carence en sérum et révélées par immunodétection. Noter la disparition des spots les plus acides pendant la carence (flèches rouges).

Il a été décrit précédemment que les modifications qui sont à l'origine des formes les plus acides des tubulines sont des polyglutamylations, c'est-à-dire un ajout de plusieurs résidus glutamyles (de 1 jusqu'à 20) latéralement sur la tubuline (Eddé *et al.*, 1990).

Afin de vérifier que les spots qui disparaissent sont bien des formes polyglutamylées des tubulines, nous avons utilisé l'anticorps GT335 qui reconnaît les tubulines polyglutamylées (quel que soit le nombre de glutamyles et ce aussi bien sur l' α -tubuline que sur la β -tubuline).

Comme illustré sur la figure 33 pour un traitement de 24 heures, les spots les plus acides d' α -tubuline qui disparaissent pendant la carence en sérum sont effectivement des

formes polyglutamylées. On constate également que sur ces neurones, on observe peu de β -tubulines glutamylées.

La polyglutamylation de la tubuline a été décrite tout d'abord dans les neurones (Eddé *et al.*, 1990) puis dans d'autres structures stables comme l'axonème ou le centriole (Bre *et al.*, 1994, Bobinnec *et al.*, 1998) laissant présager un rôle stabilisateur pour cette modification post-traductionnelle mais ce rôle ne semble pas être direct puisque l'on retrouve de la polyglutamylation sur de la tubuline libre et sur des microtubules labiles (Bre *et al.*, 1994).

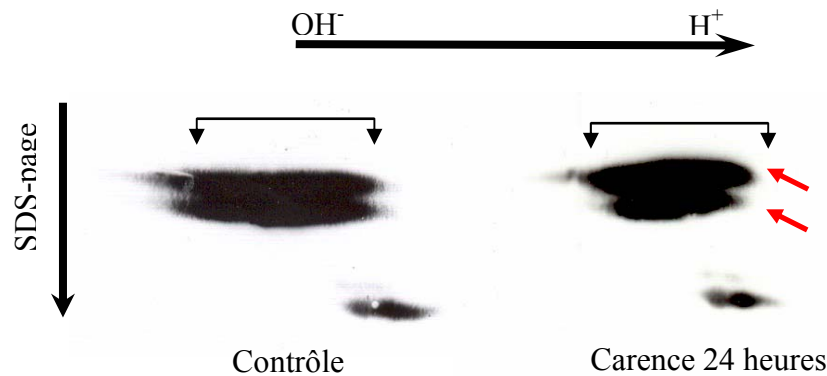


Figure 33 : Isoformes de tubulines polyglutamylées séparées par électrophorèse bidimensionnelle dans les conditions contrôles ou après 16h ou 24h de carence en sérum et révélées par immunodétection. Noter la disparition des spots les plus acides pendant la carence (flèches rouges).

5) Caractérisation des agrégats de β -tubuline de classe III

Afin de vérifier que le marquage ponctué observé avec l'anticorps anti- β -tubuline de classe III correspond bien à des agrégats de tubuline, nous avons vérifié les caractéristiques de ce marquage.

a) Sensibilité au Triton

Nous avons tout d'abord déterminé si ces amas étaient modifiés par une augmentation de triton. Par l'utilisation de concentrations croissantes de Triton X100 sur des cellules préalablement traitées par le peptide A β pendant 24 heures, il a été mis en évidence que les corps observés ne changent pas quelle que soit la quantité de triton appliquée sur les cellules, suggérant une nature non vésiculaire de ces amas.

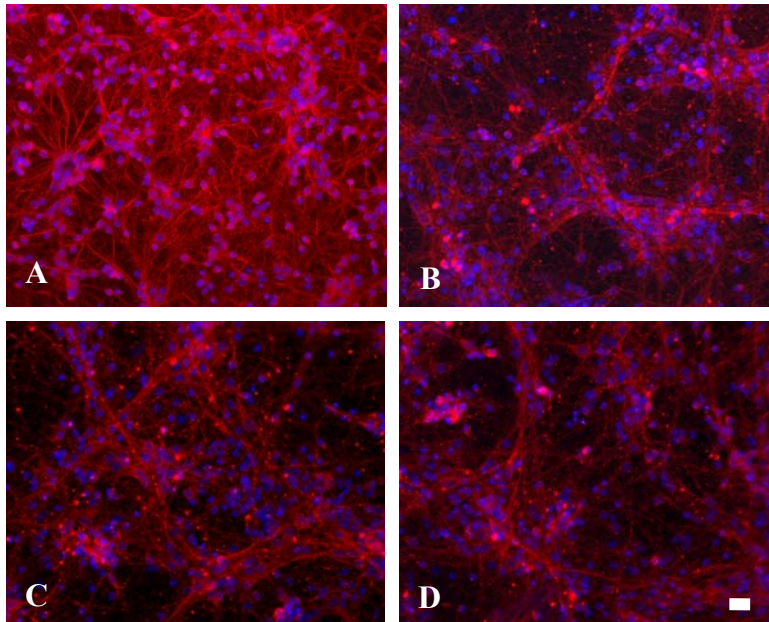


Figure 34 :
Immunomarquage de la β -tubuline de classe III dans les conditions contrôles (A), après 24h de traitement avec 60 μ M d'A β (25-35). Les cellules sont ensuite traitées avec 0,01 % (B), 0,5 % (C) ou 2% de triton X-100 (D).

Barre d'échelle : 20 μ m

Comme on peut le constater sur la figure 34, le marquage ponctué de β -tubuline de classe III reste présent même après un traitement des cellules avec de fortes concentrations de Triton X100. Les amas observés seraient donc cytoplasmiques plutôt que vésiculaires.

b) Agrégats protéiques

La nature d'agrégat a été démontrée en traitant des cellules préalablement soumises aux effets du peptide A β pendant 24 heures avec des concentrations croissantes de SDS. Les amas observés sont insensibles au SDS et sont observés quelle que soit la quantité de SDS utilisée.

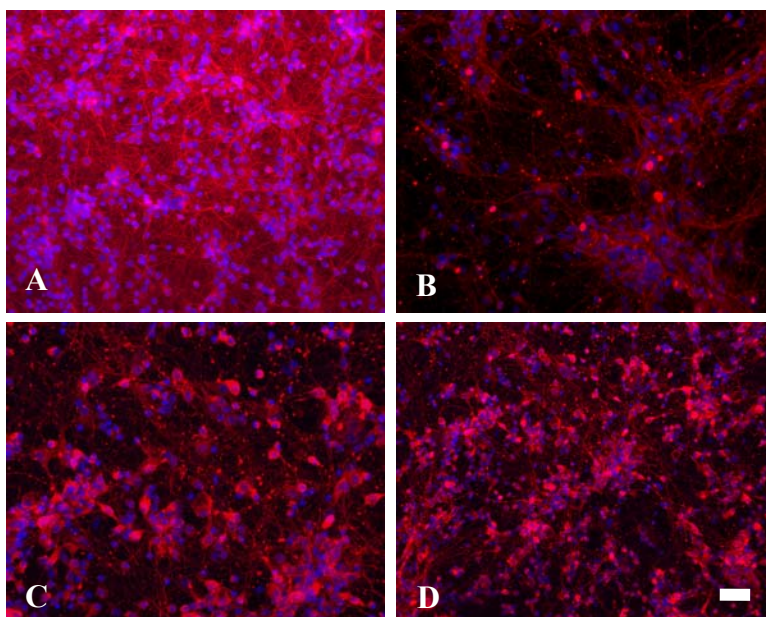


Figure 35 :
Immunomarquage de la β -tubuline de classe III dans les conditions contrôles (A), après 24h de traitement de 24 heures avec 60 μ M d'A β (25-35). Les cellules sont ensuite traitées avec 0,01 % (B), 0,5 % (C) ou 2% de SDS (D).

Barre d'échelle : 20 μ m

Comme on peut le voir sur la figure 35, l'immunomarquage dû à l'anticorps anti β -tubuline de classe III ne change pas quelles que soient les quantités de SDS appliquées sur les cellules. Les corps observés dans les cellules au cours de l'apoptose neuronale induite par le peptide amyloïde A β (25-35) sont donc bien des agrégats de β -tubuline de classe III.

c) Synthèse de protéines ?

Afin de comprendre l'origine de ces molécules de β -tubuline nous avons réalisé le même immunomarquage de la β -tubuline de classe III sur des neurones traités 24 heures au peptide amyloïde A β (25-35) en présence de cycloheximide. En effet, le blocage de la synthèse protéique avant le début du traitement par le peptide permet de savoir si les agrégats proviennent de protéines nouvellement synthétisées ou bien s'il s'agit de protéines déjà présentes dans la cellule.

Nous avons donc pu mettre en évidence que les protéines de β -tubuline de classe III présentes dans les agrégats au bout de 24 heures de traitement proviennent du pool de tubuline de la cellule et non d'une néosynthèse de tubuline. En effet, comme illustré sur la figure 36, le cycloheximide appliqué tout au long du traitement ne prévient pas la formation d'agrégats.

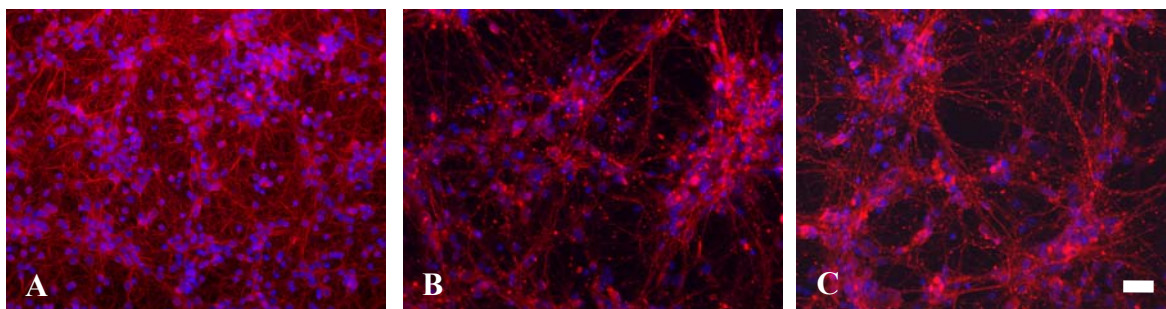


Figure 36 : Immunomarquage de la β -tubuline de classe III dans les conditions contrôles (A), après 24h de traitement de 24 heures avec 60 μ M d'A β (25-35) en présence (B) ou non (C) de cycloheximide. Barre d'échelle 20 μ m

d) Mise en évidence biochimique des agrégats

L'absence de colocalisation de l' α -tubuline avec la β -tubuline au sein de ces agrégats démontrée par microscopie confocale pose la question de la dédimérisation réelle des dimères de tubuline pendant l'apoptose. En effet, il est couramment admis que le dimère de tubuline une fois formé ne se dédimérise qu'extrêmement difficilement *in vitro* (Caplow et Fee, 2002)

et ce sous l'influence de cofacteur de dimérisation (Tian *et al.*, 1997 ; Bartolini *et al.*, 2005). L'absence d'immunoréactivité pour l' α -tubuline au sein des agrégats pourrait s'expliquer par un masquage du site antigénique empêchant l'accès à l'anticorps. Une autre explication pourrait être que les protéines qui sont agrégées et qui réagissent avec les anticorps ne soient que des fragments issus d'une dégradation des dimères de tubuline. Ainsi, il pourrait y avoir une dégradation de la tubuline au cours de l'apoptose qui aboutirait à la formation d'agrégats de fragments de tubuline - aussi bien l' α -tubuline que la β -tubuline - capables de réagir avec l'anticorps anti β -tubuline de classe III mais pas avec l'anticorps anti α -tubuline. Toutefois, les résultats en western blot laissent penser que cette possibilité est à exclure.

Afin de vérifier l'hypothèse de la dédimérisation, nous avons fait appel à une technique biochimique d'isolement d'agrégats par filtration, la technique du Filter assay (Rousseau *et al.*, 2004), qui consiste en la filtration d'extraits protéiques à travers une membrane d'acétate de cellulose pour recueillir les agrégats protéiques. Ainsi, nous avons pu montrer que lors du traitement au peptide amyloïde A β (25-35) il y a bien formation d'agrégats de β -tubuline de classe III. En effet, l'immunodétection de protéines à l'aide de l'anticorps spécifique sur des membranes ayant filtré des extraits protéiques de neurones, traités pendant 24h par du peptide amyloïde A β (25-35), montre la présence de β -tubuline de classe III au sein d'agrégats (Fig. 37). En revanche, ces agrégats semblent être dépourvus d' α -tubuline puisqu'ils ne réagissent pas avec l'anticorps anti α -tubuline (Fig. 37). Le traitement des neurones par le taxol permet de stabiliser les microtubules et ainsi empêcher leur passage à travers la membrane. Le traitement des cellules au nocodazole permet de dépolimériser les microtubules permettant ainsi de montrer que la tubuline passe librement à travers la membrane. Ces résultats confirment les observations de microscopie confocale et identifient les agrégats de tubuline comme étant des agrégats de β -tubuline de classe III et suggèrent qu'il se produirait effectivement une dédimérisation des tubulines.

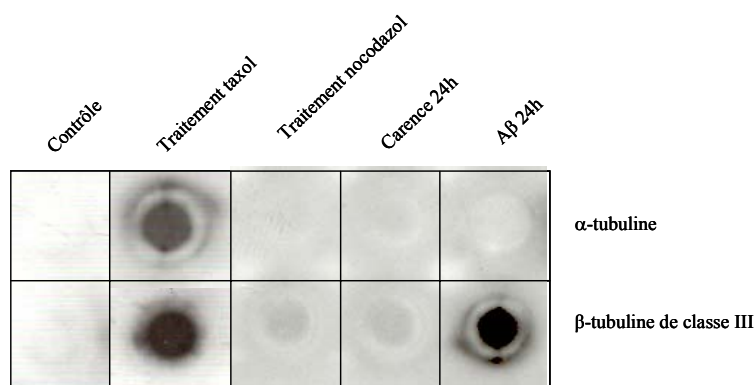


Figure 37 : Immunodétection d'agrégats protéiques filtrés sur une membrane. Des neurones corticaux ont été traités ou non pendant 24 h par 60 μ M d'A β ou par carence en sérum. Des extraits totaux de neurones soumis à du taxol ou à du nocodazol sont utilisés comme témoins positifs et négatifs.

6) Implication de la famille de la stathmine dans les modifications des microtubules

Le traitement des neurones par l'A β (25-35) provoque l'apoptose et une disparition de la β -tubuline de classe III du réseau de microtubule et son agrégation. Il est vraisemblable que l'effet de l'A β ne soit pas un effet direct sur les microtubules. Afin de trouver l'intermédiaire de l'action de l'A β qui aurait une action spécifique sur la β -tubuline de classe III, nous nous sommes intéressés à une famille de protéines capable de dépolymériser les microtubules, la famille de stathmine. En effet, les protéines ayant la capacité à se lier à la tubuline ou aux microtubules sont de bons candidats pour expliquer les effets de l'A β . La plupart des MAP et autres protéines interagissant avec les microtubules favorisent la polymérisation des microtubules, il était donc intéressant a priori de se concentrer sur une famille de protéines qui favorise la dépolymérisation.

Nous avons analysé par doubles marquages immunocytochimiques la colocalisation éventuelle de la tubuline avec les différents membres de la famille de la stathmine - SCG10, SCLIP, RB3 et la stathmine elle-même - afin de déterminer si ces protéines changeaient d'expression ou de localisation durant l'apoptose neuronale induite par le peptide amyloïde.

La stathmine présente une distribution cytoplasmique dans les neurones non traités et est retrouvée dans toutes les cellules (Fig. 38). Lors de l'apoptose induite par le peptide amyloïde on n'observe pas de changements de localisation de stathmine, ni de façon précoce ni de façon tardive. On n'observe pas non plus de colocalisation de stathmine avec les agrégats de β -tubuline de classe III (Fig. 38).

SCG10 est présent dans l'appareil de Golgi et les cônes de croissance des neurones non traités (Fig. 39). On n'observe pas de changements de localisation de SCG10 ni de façon précoce ni de façon tardive lors de l'apoptose induite par le peptide amyloïde. On n'observe pas non plus de colocalisation de SCG10 avec les agrégats de β -tubuline de classe III (Fig. 39).

La situation est la même pour SCLIP dont la localisation à l'appareil de Golgi et les cônes de croissance ne varie pas tout au long du traitement (Fig. 40).

Il en est de même pour RB3 dont la localisation ne présente pas non plus de variation pendant l'apoptose et qui n'est pas retrouvé dans les agrégats de β -tubuline de classe III (Fig. 41).

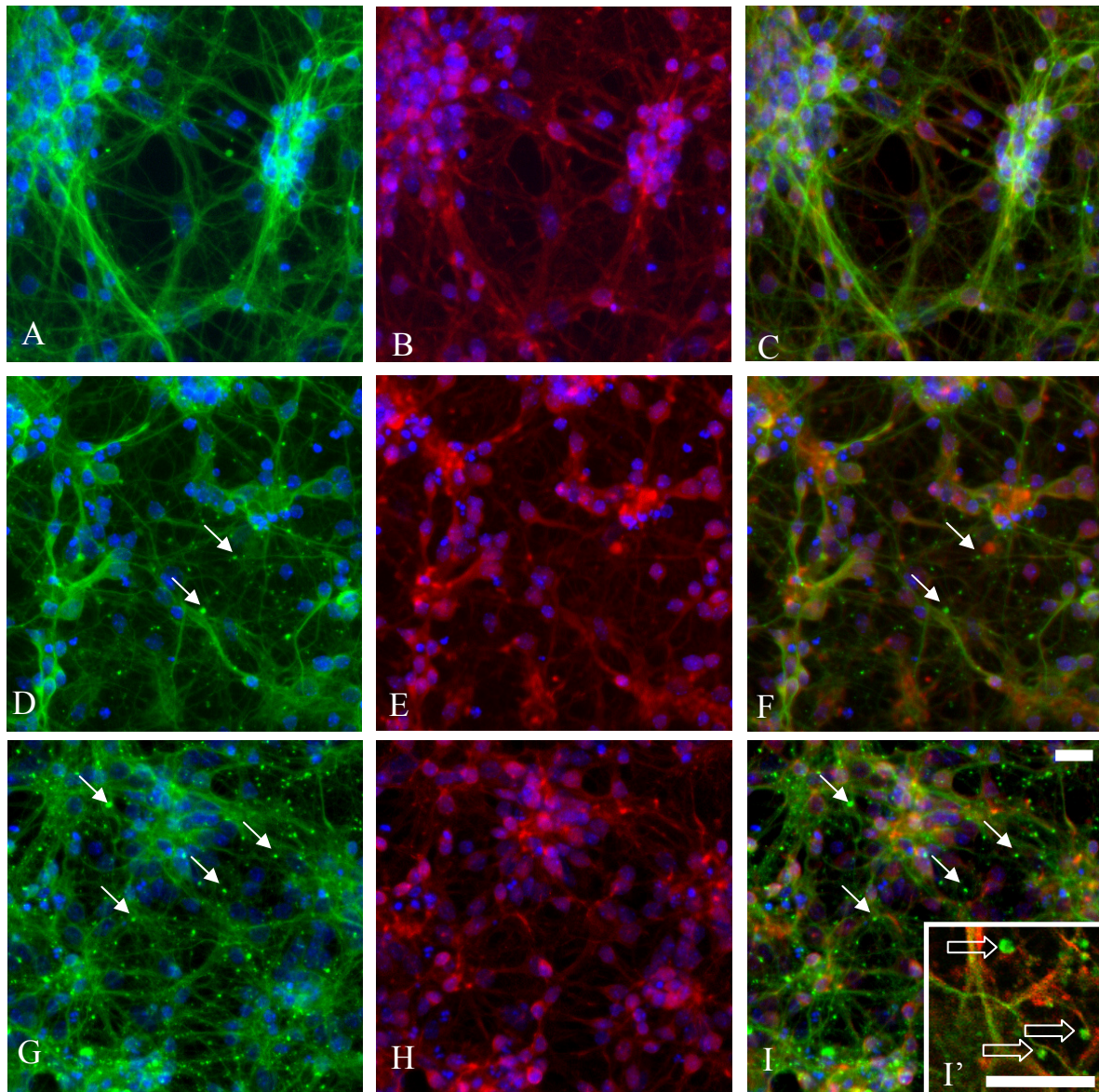


Figure 38 : Coimmunodétection de la stathmine et de la β -tubuline de classe III lors de l'apoptose neuronale induite par l'A β (25-35).

La β -tubuline de classe III est visualisée en vert (A, D, G). La stathmine est visualisée en rouge (B, E, H). Les superpositions sont représentées en C, F et I.

A, B, C : Neurones corticaux non traités

D, E, F : Neurones corticaux traités pendant 8 heures à l'A β (25-35)

G, H, I : Neurones corticaux traités pendant 24h à l'A β (25-35)

I' : Détail en microscopie confocale des agrégats de tubuline.

La β -tubuline de classe III forme des agrégats dès 8 heures de traitement (flèches blanches). La stathmine n'est pas localisée dans ces agrégats (flèches vides).

Barre d'échelle : 20 μ m

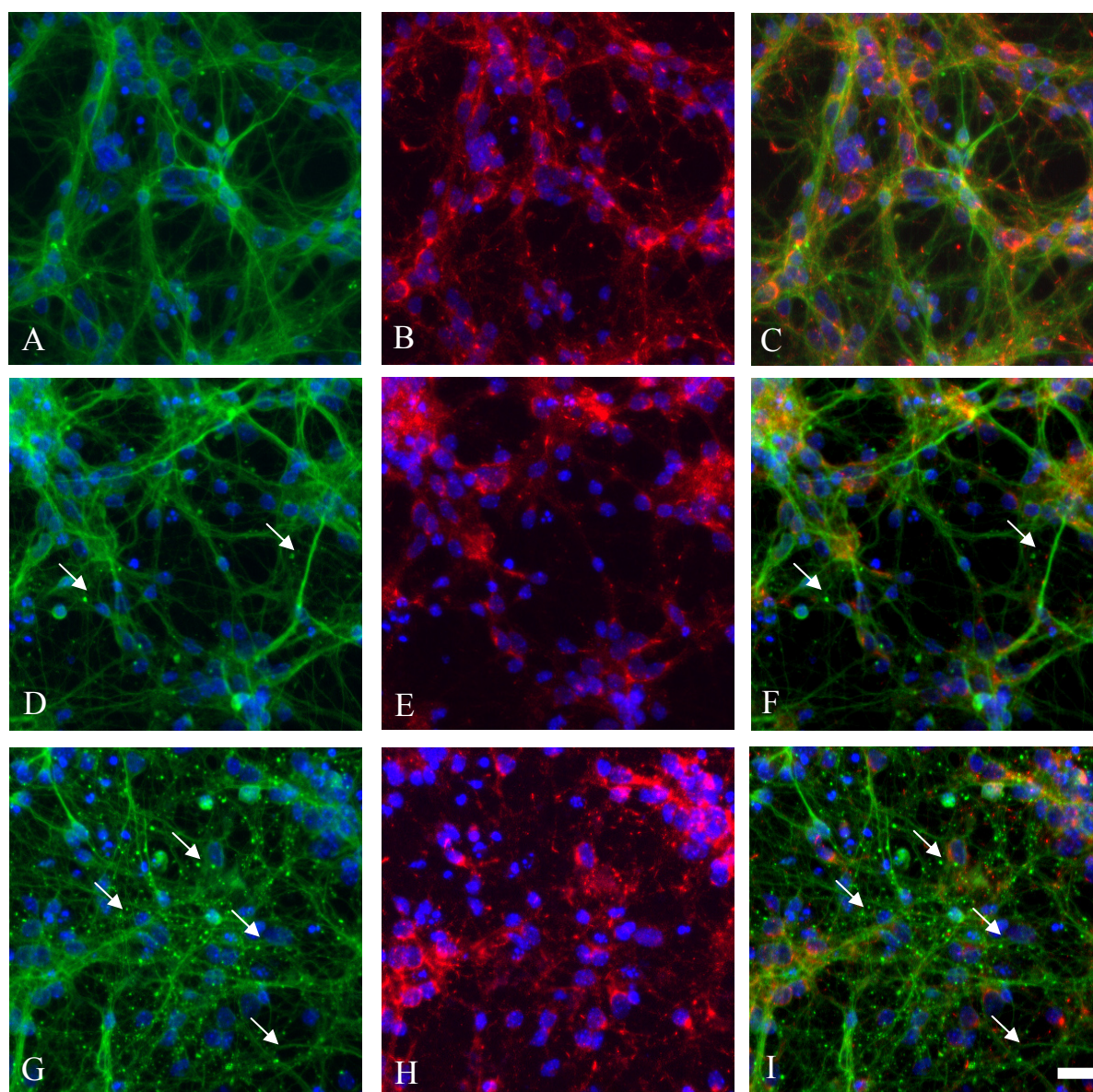


Figure 39 : Coimmunodétection de SCG10 et de la β -tubuline de classe III lors de l'apoptose neuronale induite par l'A β (25-35).

La β -tubuline de classe III est visualisée en vert (A, D, G). SCG10 est visualisé en rouge (B, E, H). Les superpositions sont représentées en C, F et I.

A, B, C : Neurones corticaux non traités

D, E, F: Neurones corticaux traités pendant 8 heures à l'A β (25-35)

C, F, I : Neurones corticaux traités pendant 24h à l'A β (25-35)

La β -tubuline de classe III forme des agrégats dès 8 heures de traitement (flèches blanches).

Barre d'échelle : 20 μ m

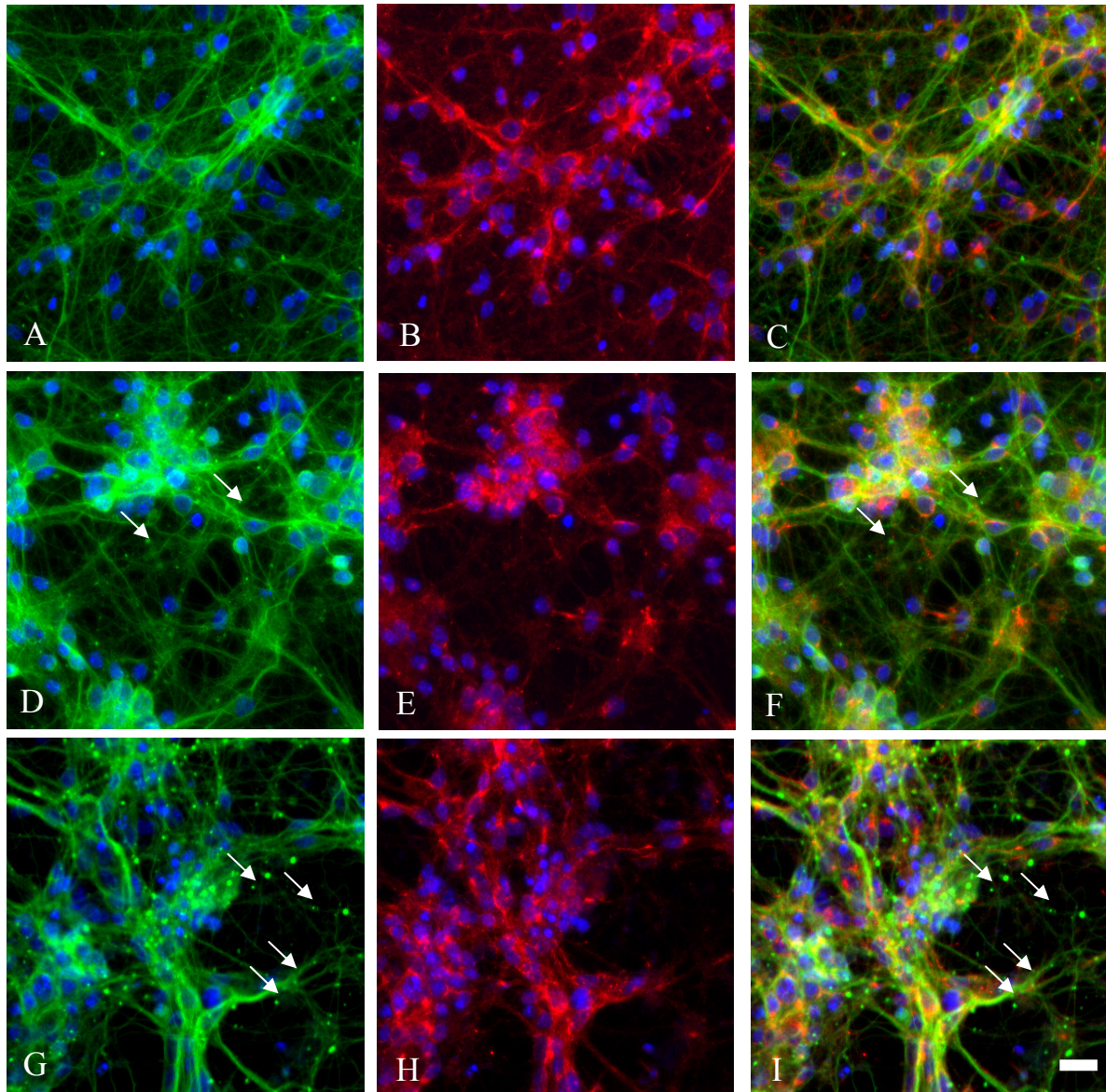


Figure 40 : Coimmunodétection de SCLIP et de la β -tubuline de classe III lors de l'apoptose neuronale induite par l'A β (25-35).

La β -tubuline de classe III est visualisée en vert (A, D, G). SCLIP est visualisé en rouge (B, E, H). Les superpositions sont représentées en C, F et I.

A, B, C : Neurones corticaux non traités

D, E, F: Neurones corticaux traités pendant 8 heures à l'A β (25-35)

C, F, I : Neurones corticaux traités pendant 24h à l'A β (25-35)

La β -tubuline de classe III forme des agrégats dès 8 heures de traitement (flèches blanches).

Barre d'échelle : 20 μ m

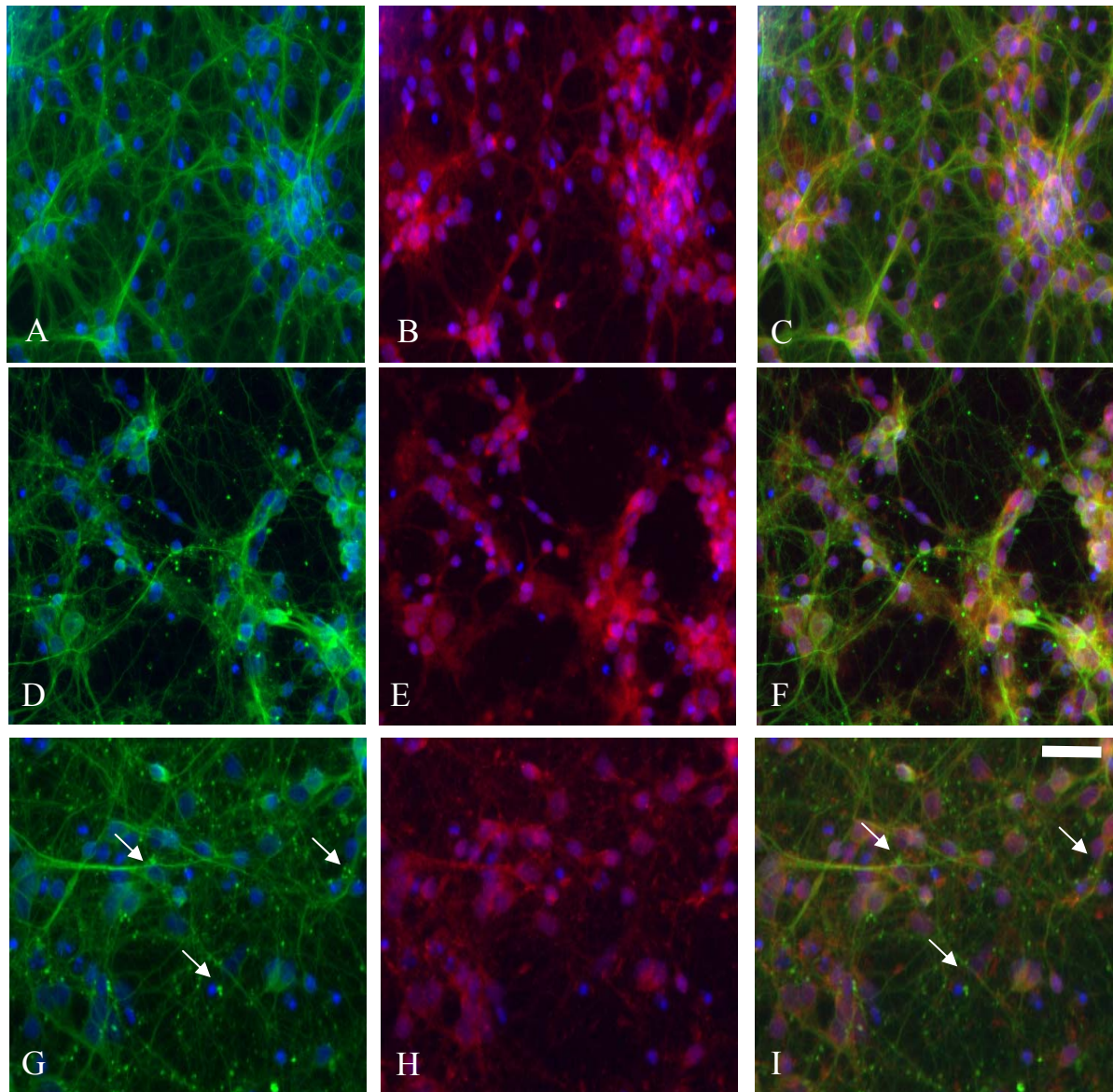


Figure 41 : Coimmunodétection de RB3 et de la β -tubuline de classe III lors de l'apoptose neuronale induite par l'A β (25-35).

La β -tubuline de classe III est visualisée en vert (A, D, G). RB3 est visualisée en rouge (B, E, H). Les superpositions sont représentées en C, F et I.

A, B, C : Neurones corticaux non traités

D, E, F : Neurones corticaux traités pendant 8 heures à l'A β (25-35)

C, F, I : Neurones corticaux traités pendant 24h à l'A β (25-35)

I' : Détail en microscopie confocale des agrégats de tubuline.

La β -tubuline de classe III forme des agrégats dès 8 heures de traitement (flèches blanches). La stathmine n'est pas localisée dans ces agrégats (flèches vides).

Barre d'échelle : 20 μ m

Aucun membre de la famille de la stathmine n'est donc impliqué directement dans les modifications du cytosquelette de microtubules dans l'apoptose neuronale induite par le peptide amyloïde ni dans la formation des agrégats de β -tubuline de classe III.

IV Discussion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons montré que lors de l'apoptose neuronale induite par le peptide amyloïde A β (25-35), il se produit une déstabilisation du cytosquelette de microtubules caractérisée par la formation d'agrégats de β -tubuline de classe III qui s'accumulent dans le cytoplasme le long des microtubules.

Notre modèle d'étude de culture primaire de neurones corticaux nous permet d'analyser les événements moléculaires mis en jeu spécifiquement dans les neurones lors de l'apoptose. Il permet d'étudier les cascades moléculaires activées pendant la mort induite par le peptide amyloïde.

L'approche *in vitro* de l'apoptose neuronale induite par le peptide A β représente certains aspects neuronaux des phases tardives de la maladie d'Alzheimer.

1) Les modifications post-traductionnelles de la tubuline

Le peptide A β a donc des effets spécifiques sur le cytosquelette mais ceux-ci ne sont pas dus à un changement des modifications post-traductionnelles des tubulines puisque le profil électrophorétique ne change pas tout au long du traitement par le peptide.

Par l'utilisation de l'apoptose induite par la carence en sérum comme « apoptose modèle », nous avons pu mettre en évidence des différences entre les deux modèles.

En effet, la carence en sérum entraîne un changement des modifications des tubulines en provoquant une baisse de la polyglutamylolation. L'utilisation d'extraits totaux ne permet pas de savoir s'il se produit également des changements dans la répartition des dimères de tubulines entre le pool soluble et le pool microtubulaire. En effet, on peut penser que la baisse de la polyglutamylolation est due à une augmentation des tubulines dans le pool cytoplasmique puisque l'enzyme responsable de cette modification post-traductionnelle, la glutamylase, agit directement sur les dimères présents sur les microtubules et peu sur les dimères libres

(Audebert *et al.*, 1993). Le rôle de la polyglutamylation de la tubuline est de moduler les interactions entre la tubuline et ses protéines associées. La carence en sérum aboutirait donc à un affaiblissement des liaisons entre tubuline et protéines associées par une baisse de la polyglutamylation par un déplacement de l'équilibre dynamique en faveur des formes libres de tubuline.

Les voies de transduction activées lors de la carence en sérum et qui sont responsables de cette baisse de la polyglutamylation ne sont pas identifiées mais il pourrait s'agir des voies de récepteurs à dépendances qui activent des voies pro-apoptotiques en absence de leurs ligands. Ces récepteurs sont activés lors de la carence en sérum et ont été montrés comme étant reliés au cytosquelette cellulaire (Mehlen et Thibert, 2004).

2) L'A β provoque l'agrégation de β -tubuline de classe III

Nous avons montré par immunocytochimie et par la technique de filter assay que la β -tubuline de classe III se trouve dans des agrégats qui se forment pendant l'apoptose induite par le peptide. Les fonctions des différents isotypes de la tubulines ne sont pas très bien connues, mais la composition en isotypes régule les propriétés de polymérisation/dépolymérisation du microtubule.

L'effet observé ici se produit sur la β -tubuline de classe III. Cet isotype est spécifique des neurones ; il est exprimé de façon très précoce dans le développement des lignées neuronales et est même considéré comme le marqueur de différenciation neuronale le plus précoce. La β -tubuline de classe III est également réexprimée lors de la régénération axonale après lésion. Elle confère une grande dynamique aux microtubules dans lesquels elle s'intègre. De plus, cet isotype de tubuline peut être associé à différentes pathologies, sa surexpression étant associée à certains types de cancer. Ceci suggère un rôle important de cette forme de β -tubuline dans les neurones qui présentent une forte croissance de microtubules. Néanmoins, l'apparition de ces amas n'est pas due à une synthèse nouvelle de β -tubuline de classe III, ce qui infirme l'hypothèse d'un « sauvetage » des neurones par la réexpression d'un isotype juvénile de tubuline lors de l'apoptose.

3) L'A β provoquerait la dédimérisation de la tubuline

L'apparition d'agrégats de β -tubuline de classe III sans α -tubuline associée pose la question de l'existence de formes libres de tubuline au sein du cytoplasme lors de l'apoptose.

En effet, il est généralement admis qu'une fois la dimérisation de l' α - et de la β -tubuline réalisée, le retour aux monomères est quasiment impossible.

Les observations de doubles marquages α -tubuline et β -tubuline de classe III au microscope confocal et les immunodétections sur les membranes de filter assay ont mis en évidence que les amas de β -tubuline de classe III qui se forment pendant l'apoptose induite par le peptide sont dépourvus d' α -tubuline. L'application d'un inhibiteur de la synthèse protéique montre qu'il ne s'agit pas de nouvelles molécules de β -tubuline mais bel et bien de la protéine qui était déjà présente dans la cellule au début du traitement apoptotique. L'action de cofacteurs de dimérisation de la tubuline pourrait être à l'origine de cette dédimérisation. En effet, il a été montré récemment qu'il existe un analogue du cofacteur E, le cofacteur E-like ou E1, qui n'est pas capable d'induire la polymérisation de la tubuline *in vitro* mais qui est capable de dépolymériser les microtubules par une action de dédimérisation directe des dimères sur les microtubules (Bartolini *et al.*, 2005). L'action d'une telle protéine déstabilisatrice qui aurait une spécificité sur certains isotypes de β -tubuline sur les microtubules pourrait expliquer les résultats que nous avons obtenus.

La validation de l'hypothèse de la dédimérisation de l'hétérodimère de tubuline nécessite de répondre à quelques questions de première importance. Que devient l' α -tubuline lors de la dédimérisation : est-elle prise en charge spécifiquement par un jeu de protéine comme les protéines chaperonnes, ou bien est-elle dégradée ? Étant donné que nous n'avons pas pu mettre en évidence de fortes modifications de la quantité de tubuline lors de l'apoptose neuronale, il est raisonnable de penser que l' α -tubuline est prise en charge plutôt que dégradée. Il serait donc intéressant d'étudier les cofacteurs de dimérisation de la tubuline - et en particulier les cofacteurs pouvant lier l' α -tubuline - pendant l'apoptose neuronale induite par le peptide amyloïde.

Il est également nécessaire de comprendre quels sont les partenaires moléculaires responsables de cette dédimérisation et les régulations possibles de ce phénomène.

4) Les protéines de la famille de stathmine ne sont pas impliquées dans l'agrégation de la tubuline

La formation d'agrégats de tubuline libre laissait présager de l'implication de protéines capables de dépolymériser les microtubules - dont la famille de stathmine fait partie - dans les effets cytosquelettiques pendant l'apoptose induite par le peptide amyloïde.

L'étude de tous les membres de la famille de stathmine a montré qu'aucune de ces protéines n'est colocalisée avec les agrégats de β -tubuline de classe III.

Néanmoins, il faudra compléter cette étude de la famille de stathmine par l'analyse de l'évolution des états de phosphorylation de stathmine au cours de l'apoptose. En effet, l'activité de stathmine étant régulée par son état de phosphorylation, il est possible que la phosphorylation de stathmine change puisque pendant l'apoptose, puisqu'il y a activation de kinases décrites comme pouvant phosphoryler la stathmine (Marklund *et al.*, 1993 ; Antonsson *et al.*, 1998).

5) Perspectives

Un des points les plus intéressants de nos résultats concerne ce rôle spécifique de l'isotype de β -tubuline. Il existe peu d'études faisant la distinction entre les différentes isoformes de tubuline, et pas non plus d'étude décrivant les différences d'affinité des MAP avec les différents isotypes de tubuline. Il serait intéressant de savoir quelles protéines pourraient avoir une affinité particulière avec la β -tubuline de classe III. L'analyse de la liaison de stathmine en fonction des isotypes de tubuline n'a pas non plus été faite. Comprendre la fonction des différents isotypes de tubuline permettrait de mettre à jour des fonctions fines des microtubules, des hétéodimères, voire même des monomères...

Les éventuelles protéines qui sont associées à la tubuline intervenant dans la formation des agrégats de β -tubuline de classe III doivent être étudiées. Ainsi, à l'aide de la technique du filter assay, il serait possible de les identifier et de mieux comprendre la formation de ces agrégats.

Il est également important de chercher s'il existe une interaction de ces agrégats avec d'autres protéines associées au cytosquelette et, en particulier, avec les membres de la famille des protéines associées aux microtubules (MAP) dont fait partie la protéine Tau. Comme la protéine Tau est à l'origine des dégénérescences neurofibrillaires qui sont d'autres types d'agrégats intracellulaires caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, il est important de savoir si les agrégats de β -tubuline de classe III peuvent avoir comme partenaire moléculaire des MAP, et ce en utilisant dans un premier temps des inhibiteurs pharmacologiques.

Au niveau intracellulaire, il reste à déterminer les compartiments neuronaux concernés. Des immunomarquages spécifiques permettraient de savoir si le phénomène d'agrégation se produit de façon différentielle au niveau de l'axone et des dendrites.

Aux côtés des acteurs moléculaires présents dans les agrégats, il reste à déterminer les voies de transduction mises en jeu dans ces phénomènes. Il est important de savoir quelles voies sont impliquées afin de pouvoir les bloquer pour savoir s'il est possible de dissocier les effets de l'A β sur le cytosquelette, de l'apoptose proprement dite. Pour cela l'étude des voies des MAPs Kinases et en particulier du module JNK/c-JUN semble à privilégier étant donné leur rôle dans l'apoptose neuronale induite par le peptide A β .

Il serait ainsi possible de montrer l'existence d'un point de réversibilité de ces modifications structurales du cytosquelette. De façon générale, cela permettrait de comprendre la place de ces altérations morphologiques et la formation d'agrégats dans l'apoptose neuronale, comme un élément déclencheur ou bien une conséquence de la mort cellulaire programmée.

Enfin, jusqu'à présent tous nos résultats ont été obtenus sur des cultures primaires de neurones corticaux. L'outil cellulaire permet d'obtenir de nombreuses et précieuses informations sur les mécanismes moléculaires de l'action du peptide amyloïde mais reste limité quant à l'implication des résultats à la pathologie humaine. Il serait donc intéressant d'étudier également l'état d'agrégation de la β -tubuline de classe III sur des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. L'étude *in vivo* de l'agrégation de la β -tubuline de classe III permettrait de valider les résultats *ex vivo*.

Discussion

Discussion

La phase symptomatique de la maladie d'Alzheimer est maintenant bien connue ainsi que les mécanismes moléculaires à l'origine de la pathologie. Néanmoins, il reste à comprendre l'initiation du phénomène et le déroulement des stades les plus précoces. En effet, s'il est clair dans les formes familiales de la maladie que le dysfonctionnement du métabolisme de l'APP et la surproduction de peptide amyloïde sont dus aux mutations de l'APP ou des présénilines, les conditions aboutissant au déclenchement de la cascade amyloïde dans les formes sporadiques de la maladie ne sont pas connues (Selkoe, 2003). La compréhension des mécanismes par lesquels se déclenche la maladie d'Alzheimer est très importante étant donné les enjeux en matière de santé publique que cela représente.

Les différents rôles de l'A β

Nous avons démontré l'existence d'effets de l'A β qui sont le reflet d'évènements très précoces et d'effets qui sont le reflet d'évènements beaucoup plus tardifs. Le type de peptide, la concentration et l'état d'agrégation font que le peptide amyloïde joue de nombreux rôles pathogènes différents tout au long du développement de la maladie. Le peptide agirait à toutes les étapes de la maladie en passant d'un effet à l'autre au fur et à mesure de son agrégation et de l'augmentation de la concentration. Ainsi, les formes solubles à de faibles concentrations agissent sur les conductances membranaires, notamment sur les courants des canaux calciques calciques (Eckinci *et al.*, 1999 ; Rovira *et al.*, 2002), ainsi que sur la transmission et la plasticité synaptique (Rowan *et al.*, 2004) puis de plus fortes concentrations et les formes agrégées des peptides provoquent la mort cellulaire (voir par exemple Liu *et al.*, 2004).

Quels sont les effets physiologiques du peptide amyloïde ?

Malgré les connaissances accumulées sur les effets pathogènes du peptide amyloïde, son rôle physiologique et celui de son précurseur, l'APP, ne semblent toujours pas clairs (Selkoe, 1998). L'importance de l'APP dans le transport axonal et sa présence à la synapse semblent néanmoins indiquer une action dans la formation ou le maintien de la synapse. De plus l'APP et la préséniline sont retrouvées au niveau des synapses selon des distributions

précises (Ribaut-Barassin *et al.*, 2000) suggérant ainsi une importance de ces protéines et de leurs dérivés dans la structure et la fonction des synapses. Les effets électrophysiologiques observés du peptide amyloïde A β (1-40) non agrégé à de faibles doses doivent pouvoir être des indications d'un effet physiologique des peptides amyloïdes. Il est donc envisageable de penser à un rôle de l'A β (1-40) sur la physiologie synaptique. L'A β pourrait donc servir de modulateur de la synapse permettant d'augmenter l'action de neurotransmetteur par la régulation de canaux ioniques. En effet, nous avons démontré que l'application de 200 nM d'A β (1-40) induit l'augmentation des courants des canaux calciques voltage-dépendants de type non-L impliqués dans la libération de transmetteur à la synapse (Rovira *et al.*, 2002). Par la régulation de la synthèse d'A β , les cellules pourraient moduler l'activité de ses synapses et de synapses avoisinantes.

De l'amélioration des synapses à la souffrance excitotoxique

Lors des premières phases de la maladie, le dérèglement du métabolisme de l'APP - dont le déclenchement est encore inconnu - provoquerait l'augmentation de la synthèse d'A β et notamment des formes longues (Hardy, 1997 ; Selkoe, 1999). L'action du peptide passerait alors d'un mode physiologique à un mode pathologique. Les effets électrophysiologiques concerneraient alors l'augmentation des courants des canaux calciques de type L ainsi que des changements dans le fonctionnement synaptique provoquant des entrées plus massives de calcium, un dérèglement de l'homéostasie calcique des neurones, amenant les cellules dans des états de souffrance. Parallèlement, les doses croissantes de peptide provoqueraient des réponses de type pro-inflammatoire au niveau des cellules gliales (Combs *et al.*, 2001). Il y aurait alors sécrétion de cytokines et autres médiateurs de la réponse inflammatoire comme le NO. Ces molécules pourraient agir sur les neurones en modulant leur activité et, en augmentant les dysfonctionnements, induire l'activation de voies de transduction pro-apoptotiques menant à terme à la mort de la cellule.

Chaque nouvelle voie activée depuis la première augmentation de synthèse de l'A β est capable d'augmenter les dommages provoqués sur les cellules. Le dérèglement du métabolisme de l'APP provoquerait donc une série de réactions en chaîne qui amplifierait les dommages provoqué pour atteindre finalement la mort des cellules.

Dans cette optique, les plaques séniles deviendraient des conséquences du dérèglement cellulaire et des reliquats des peptides présents dans et autour des neurones morts. On peut

ainsi établir un parallèle entre la formation des plaques d'athérome lors de l'athérosclérose et la formation des plaques séniles. Les plaques d'athérome se forment par la mort des cellules spumeuses dont les lipides oxydés intracellulaires se déposent dans la paroi des vaisseaux (Stocker et Keaney, 2004). Ainsi les plaques séniles seraient dues à l'agrégation de peptides amyloïdes issus de cellules mortes. Elles se formeraient par l'accumulation d'A β issu de cellules dont la mort aurait été provoquée par l'A β soluble - ou dans des états d'agrégation intermédiaires - intra et extra-cellulaire. A leur tour, les plaques séniles sont alors toxiques pour les cellules qui les entourent, créant ainsi une nouvelle source de souffrance et de mort neuronale - tant pour les neurones que pour les cellules gliales - amplifiant les effets des peptides et la vitesse des pertes synaptique et neuronale.

Considérer les plaques séniles comme des conséquences de la pathologie plutôt que comme sa cause permettrait d'expliquer le manque de corrélation observé entre la distribution des plaques séniles dans les différentes structures du cerveau et les troubles cognitifs observés. En effet, les troubles seraient dus plus particulièrement aux pertes synaptiques et aux neurones en dysfonctionnement et non pas aux plaques elles mêmes (Pike *et al.*, 1991). Cela permettrait également d'expliquer pourquoi dans certains modèles animaux de la maladie d'Alzheimer on observe des déficits cognitifs sans pour autant observer de plaques séniles (German et Eisch, 2004).

Le rôle de la glie dans les actions de l'A β

Les phénomènes inflammatoires et le stress oxydant jouent un rôle important dans la maladie d'Alzheimer (Giovannini *et al.*, 2002). Nous avons montré que les effets de l'A β sur le fonctionnement synaptiques sont médiés par une réaction inflammatoire. Ceci suggère l'implication des cellules gliales dans ces processus, les astrocytes et la microglie étant des cellules produisant beaucoup de composés pro-inflammatoires.

Les modulations pathologiques de l'activité synaptique par l'A β seraient donc sous le contrôle non seulement des éléments pré et post-synaptiques mais également d'un troisième élément, la cellule gliale. Par la sécrétion d'agents inflammatoires tels que l'IL1, le TNF ou le NO, les cellules gliales participent aux effets de l'A β et ce même dans les phases précoces comme par exemple l'inhibition de la LTP par l'A β pour laquelle la microglie a été mise en

évidence comme responsable (Wang *et al.*, 2004a). Il est tout à fait possible que les effets observés de l'A β sur les EPSCs et les mEPSCs dans le cervelet soient pour une partie dus à une action post-synaptiques sécrétée par de la microglie activée par le peptide.

La maladie d'Alzheimer, une maladie de surcharge protéique...

Il est de plus en plus clair que la maladie d'Alzheimer peut être considérée comme une maladie de surcharge de protéines. En plus des deux amas de protéines habituellement décrites, les plaques séniles composées d'A β et les dégénérescences neurofibrillaires constituées de protéine Tau hyperphosphorylée (Morishima-Kawashima et Ihara, 2002), il faut maintenant envisager l'hypothèse de la présence d'un nouveau type d'agrégat protéique lors des phases tardives de la maladie. En effet, nous avons démontré ici la présence d'agrégats de β -tubuline de classe III lors de l'apoptose neuronale induite par le peptide A β (25-35) en culture. Les implications de la formation de ces agrégats sont nombreuses. Ces résultats rejoignent les hypothèses présentant la maladie d'Alzheimer comme étant avant tout une maladie due à un dysfonctionnement du transport axonal. Ainsi, le groupe de Golstein a montré que la perturbation du transport de l'APP le long de l'axone entraîne une augmentation de la sécrétion de peptide amyloïde et l'hypothèse de ces auteurs est que les origines de la maladie résident dans cette perturbation du transport axonal (Stokin *et al.*, 2005 ; Gunawardena *et al.*, 2001).

Nos résultats sur la tubuline et les microtubules pourraient donner du poids à cette hypothèse. En effet, l'exclusion du réseau de microtubule des dimères de tubuline contenant spécifiquement la β -tubuline de classe III laisse supposer des modifications dans la dynamique des microtubules et, partant du fonctionnement du transport axonal. En effet, il a été montré que les caractéristiques dynamiques des microtubules changent selon leur composition en sous-unités de β -tubuline (Panda *et al.*, 1994). Ainsi, l'action de l'A β sur la tubuline, en plus de son action sur la phosphorylation de Tau, provoquerait des fortes perturbations du transport intracellulaire par une désorganisation des microtubules.

De la spécificité des effets du peptide

Néanmoins, la question de la spécificité des effets du peptide amyloïde se pose. En effet, de plus en plus de données montrent qu'il existe de fortes similitudes entre les effets du

peptide amyloïde et les effets de la protéine PrP du Prion (pour revue voir Checler et Vincent, 2002). Il a été mis en évidence que, tout comme le peptide amyloïde, le peptide prion PrP 106-126 induit l'apoptose via l'activation de la voie de signalisation JNK/c-Jun (Carimalo *et al.*, 2005) et les changements de conformation observés dans le passage de la forme PrP cellulaire à la forme PrP scrapie, c'est-à-dire un passage d'une forme composée principalement d'hélices α à une forme contenant des feuillets β , sont comparables à ceux intervenant sur l'A β lors de son agrégation.

Les effets du peptide amyloïde pourraient donc être en partie commun aux peptides agrégés et la spécificité viendrait *in vivo* des cinétiques de production et d'agrégation des peptides ainsi que du profil d'expression des différents peptides.

Ainsi, il est vraisemblable que les effets des formes solubles du peptide amyloïde sont des effets spécifiques alors que les effets des formes agrégées - ou en cours d'agrégation - sont des effets moins spécifiques de l'A β .

Conclusions

La compréhension des mécanismes les plus précoces intervenant dans la maladie d'Alzheimer est d'une importance cruciale pour la mise au point d'outils de diagnostic précoce et l'élaboration de thérapeutiques efficaces. Les premiers dysfonctionnements sont difficiles à mettre en évidence *in vivo* puisque sub-létaux pour les neurones. L'utilisation des techniques d'électrophysiologie nous a permis de mettre en évidence des perturbations induites par le peptide A β sous de formes et des concentrations qui correspondent à des stades très précoces de la maladie. La mise en place de déséquilibres ioniques des neurones par l'augmentation de courants des canaux calciques ou la diminution de la transmission synaptique pourrait constituer la première étape d'un cercle vicieux. L'action des premiers peptides solubles sur les cellules provoque leur souffrance, qui induit une perturbation du métabolisme cellulaire. Ces phénomènes conduisent à la production de peptides en plus grande quantité et ainsi provoque l'amplification de la boucle jusqu'à ce que les concentrations de peptides entraînent la mort des cellules de façon massive.

La compréhension des mécanismes de la mort neuronale qu'induit le peptide amyloïde est, elle aussi, nécessaire pour la lutte contre la maladie. En effet, la connaissance détaillée des mécanismes de la mort cellulaire peut permettre la mise au point d'inhibiteurs spécifiques et donc ouvre la voie à d'éventuelles thérapeutiques. De plus, l'apoptose neuronale est un

phénomène à l'origine de nombreuses maladies neurodégénératives en plus de la maladie d'Alzheimer. Comprendre les différentes facettes de cette mort et pouvoir reconnaître les aspects spécifiques des aspects généraux permettrait de mieux comprendre d'autres pathologies et ainsi par la modulation des mécanismes communs lutter contre les maladies neurodégénératives.

Sujets annexes

Sujets annexes - Présentation

Comme il a été montré précédemment, le peptide amyloïde sous certaines formes est capable d'induire l'apoptose notamment au niveau des neurones. Il existe cependant bien d'autres molécules capables d'induire l'apoptose, aussi bien d'autres protéines comme la protéine PrP – dont le passage d'une forme cellulaire à une forme « scrapie » résistante aux protéases va entraîner une pathologie sévère – ou bien des molécules lipidiques comme le c2-céramide.

Au cours de ma thèse j'ai eu l'occasion de participer à des projets annexes qui m'ont permis d'aborder le phénomène de l'apoptose dans les cultures primaires de neurones corticaux de souris par le biais de différents inducteurs. L'intérêt d'une telle approche transversale par l'utilisation de nombreux stimuli sur un même modèle cellulaire permet la comparaison des différents effets et la mise en évidence de grandes voies communes ainsi que de voies spécifiques aux différentes molécules étudiées.

La première étude à laquelle j'ai participé reposait sur l'étude de l'activation du module JNK/c-Jun lors de l'apoptose neuronale induite par le peptide Prion PrP106-126 et par l'infection par le prion. Ce travail repose sur l'exploitation de deux modèles cellulaires différents : le modèle de mort neuronale induite par un fragment toxique de la protéine du prion, le peptide PrP106-126 sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris et le modèle d'infection de cultures par la protéine Prion humaine. Ce travail a mis en évidence le rôle important de l'activation de la voie JNK/c-Jun dans l'apoptose neuronale observée dans les deux modèles.

La deuxième étude portait sur les effets protecteurs de l'IGF1 lors de l'apoptose neuronale induite par le céramide. Sur le modèle de cultures primaires de neurones corticaux, l'application de céramide induit une apoptose rapide et massive qui partage de nombreuses caractéristiques de l'apoptose induite par le peptide amyloïde. Ce travail a montré que l'IGF1 protège les neurones corticaux de la mort neuronale induite par le céramide et que cette protection implique la voie PI3K/Akt mais est indépendante de ERK, CREB et Bcl-2.

Sujet Annexe 1 :

Apoptose induite par le peptide

Prion PrP₁₀₆₋₁₂₆

Carimalo J., Cronier S., Petit G., Peyrin J.-M., Boukhtouche F., **Arbez N.**, Lemaigre-Dubreuil Y., Brugg B. and Miquel M.-C.
“Activation of the JNK/c-Jun pathway during the early phase of neuronal apoptosis induced by PrP₁₀₆₋₁₂₆ and prion infection.”

European Journal of Neuroscience 2005 May, 21 (9), 2311-2319

Activation of the JNK–c-Jun pathway during the early phase of neuronal apoptosis induced by PrP106–126 and prion infection

J. Carimalo,¹ S. Cronier,² G. Petit,¹ J.-M. Peyrin,² F. Boukhtouche,¹ N. Arbez,¹ Y. Lemaigre-Dubreuil,¹ B. Brugg^{1,*} and M.-C. Miquel^{1,*}

¹Laboratoire 'Différenciation et Mort Neuronales', CNRS UMR 7102, case 12, Université Paris 6, 9 quai St-Bernard, 75005 Paris, France

²INRA VIM, 78350 Jouy-en-Josas, France

Keywords: c-Jun N-terminal kinases, neuronal apoptosis, p38, prion peptide, scrapie

Abstract

Prion diseases are neurodegenerative pathologies characterized by apoptotic neuronal death. Although the late execution phase of neuronal apoptosis is beginning to be characterized, the sequence of events occurring during the early decision phase is not yet well known. In murine cortical neurons in primary culture, apoptosis was first induced by exposure to a synthetic peptide homologous to residues 106–126 of the human prion protein (PrP), PrP106–126. Exposure to its aggregated form induced a massive neuronal death within 24 h. Apoptosis was characterized by nuclear fragmentation, neuritic retraction and fragmentation and activation of caspase-3. During the early decision phase, reactive oxygen species were detected after 3 h. Using immunocytochemistry, we showed a peak of phosphorylated c-Jun–N-terminal kinase (JNK) translocation into the nucleus after 8 h, along with the activation of the nuclear c-Jun transcription factor. Both pharmacological inhibition of JNK by SP600125 and overexpression of a dominant negative form of c-Jun significantly reduced neuronal death, while the MAPK p38 inhibitor SB203580 had no effect. Apoptosis was also studied after exposure of tg338 cortical neurons in primary culture to sheep scrapie agent. In this model, prion-induced neuronal apoptosis gradually increased with time and induced a 40% cell death after 2 weeks exposure. Immunocytochemical analysis showed early c-Jun activation after 7 days. In summary, the JNK–c-Jun pathway plays an important role in neuronal apoptosis induced by PrP106–126. This pathway is also activated during scrapie infection and may be involved in prion-induced neuronal death. Pharmacological blockade of early pathways opens new therapeutic prospects for scrapie PrP-based pathologies.

Introduction

Prion diseases are transmissible spongiform encephalopathies which include Creutzfeldt–Jakob disease, scrapie and bovine spongiform encephalopathy. These pathologies are characterized by spongiform degeneration or vacuolation in the neuropil, glial activation, neuronal death by apoptosis (Giese *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1999) and, in most cases, accumulation in the brain of a protease-resistant form of the cellular prion protein (PrP^C) named scrapie PrP (PrP^{Sc}) (Prusiner, 1998). PrP^C is a ubiquitous glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane protein which is highly expressed in the central nervous system, in both neurons and glial cells, but whose function is still largely unknown.

The events leading to neuronal dysfunction, the basis of the disease-associated clinical disorders, and also the molecular mechanisms of neurodegeneration are still not well understood. Two nonexclusive causal hypotheses are considered: a 'loss of function' of the normal PrP^C (for a review, see Hetz *et al.*, 2003) and a 'gain of function' of the abnormally folded PrP^{Sc} conformer, as supported by studies with

genetically modified animals (Chiesa *et al.*, 2003; Mallucci *et al.*, 2003).

PrP^C has a rapid turnover in cells whereas the pathogenic isoform PrP^{Sc} is only partially degraded by proteases, generating a protease-resistant core. PrP^{Sc} can polymerise into rod-shaped fibrils and accumulates in the nervous tissue with a pattern which is temporally and topographically associated with neuronal death (Bruce *et al.*, 1989) and activation of the apoptotic program (Gray *et al.*, 1999).

Apoptosis is a cell death program starting with an early, reversible decision phase leading to a late, irreversible execution phase (Pittman *et al.*, 1998). Although the molecular mechanisms underlying the execution phase, such as caspase involvement, are well described, those occurring during the early stage of the apoptotic process in central neurons are not well known, particularly in transmissible spongiform encephalopathies.

Many studies have been carried out using a peptide corresponding to residues 106–126 of the human PrP sequence (PrP106–126). *In vitro*, it maintains most of the characteristics of PrP^{Sc}, including a strong tendency to aggregate into a β -sheet structure forming amyloid fibrils (Tagliavini *et al.*, 1993; Rymer & Good, 2000; Kuwata *et al.*, 2003) and a partial resistance to proteolysis (Selvaggini *et al.*, 1993). It has been reported that this peptide induces neuronal apoptotic death in primary cultures of various brain origins (Forloni *et al.*, 1993a; Brown *et al.*, 1994, 1996; Jobling *et al.*, 1999; Thellung *et al.*, 2000), as well

Correspondence: Dr Marie-Christine Miquel, as above.
E-mail: marie-christine.miquel@snv.jussieu.fr

*B.B. and M.-C.M. share senior authorship.

Received 9 December 2004, accepted 17 February 2005

as *in vivo* after injection into mouse retina (Ettaiche *et al.*, 2000). However, the detailed mechanisms leading to apoptosis induced by PrP106–126, and possibly PrP^{Sc}, are not well known except for the demonstration of early increased production of reactive oxygen species (ROS) (Brown *et al.*, 1996; Turnbull *et al.*, 2003b) inducing oxidative damage (for a review, see Milhavel & Lehmann, 2002).

The c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and p38 MAP kinase (p38) are members of the family of mitogen-activated protein (MAP) kinases which are important regulators of the cell death program in postmitotic neurons following survival-factor withdrawal (Mielke & Herdegen, 2000). When activated, JNKs phosphorylate and activate several transcription factors, including c-Jun and activating transcription factor 2 (Ip & Davis, 1998). Recent data suggest that JNKs and their target c-Jun play an important role in triggering neuronal apoptosis (Yang *et al.*, 1997; Herdegen *et al.*, 1998; Kuan *et al.*, 1999; Morishima *et al.*, 2001; Willaime *et al.*, 2001; Willaime-Morawek *et al.*, 2003), and targeting JNKs for therapeutic benefit has attracted considerable interest (Manning & Davis, 2003).

To date, several cellular models, including immortalised neuronal and neuroglial cell lines, are available to study prion infection but most show no overt sign of cytotoxicity (Solassol *et al.*, 2003). Recently, new transmissible spongiform encephalopathy models based on brain-derived primary cells have been developed and shown to be suitable for the study of prion-induced neuronal apoptosis (Cronier *et al.*, 2004).

In order to better understand the PrP^{Sc}-associated neurodegenerative process, we have thus used similar primary models derived from mouse cerebral cortex and focused on the intracellular events occurring during the early phase of apoptosis triggered by PrP106–126 and during scrapie infection.

Materials and methods

Primary culture of mouse cortex

Embryos were removed from pregnant mice at embryonic day 14 under halothane (Sigma) anaesthesia; the mice were either Swiss (Janvier, Le Genest-St-Isle, France), *prnp* (the PrP-encoding gene) knock-out (PrP^{-/-}; Zurich I; Bueler *et al.*, 1992), or transgenic (tg338) mice overexpressing ovine PrP on a PrP null background (Vilotte *et al.*, 2001). Animals were killed by cervical dislocation. The embryonic cortex was dissected, mechanically dissociated and plated on poly-ethylenimine (1 mg/mL)-coated glass cover-slips in culture wells.

When destined for peptide treatment, cultures were first grown in Eagle's basal medium (Eurobio, Les Ulis, France), supplemented with 5% horse serum (HS; Eurobio), 2.5% fetal calf serum (FCS; Eurobio), 2 mM glutamine and 0.1% penicillin and streptomycin (Gibco), at a density of 7×10^5 cells/cm². After 3 days *in vitro* (DIV) the medium was replaced with N5 medium (Kawamoto & Barrett, 1986) with 180 mg/L glucose and supplemented with 5% HS and 1% FCS. Cytosine arabinoside (3 μ M; Sigma, St Louis, MO, USA) was added to prevent astrocyte proliferation (resulting in at least 97% pure neuronal cultures), and MK-801 (1 μ M; Research Biochemicals International) to prevent excitotoxicity (Knusel *et al.*, 1990; Brugg *et al.*, 1996). The medium was changed daily. On DIV 5, FCS was removed and the HS content was reduced to 1%. Cells were cultured at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Alternatively, to allow long-term culture for infection experiments, cells were grown for 3 days in Eagle's basal medium (Gibco) supplemented with 5% HS, 2.5% FCS (Eurobio), 2 mM glutamine and 0.1% penicillin and streptomycin at a density of 7×10^5 cells/cm². On DIV 3, the medium was changed to N5 medium with 5% HS and

2% FCS supplemented with 1 μ M MK-801 and both the antimetabolites uridine and fluorodeoxyuridine at a 10- μ M concentration (Sigma). The medium was changed every 2 days.

Kinase inhibitors

The JNK inhibitor SP600125 and the p38 inhibitor SB203580 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) were prepared as dimethyl sulfoxide stocks at 10 mM and added to the culture media as described below.

Peptide treatments

Peptide (Neosystems, Strasbourg, France or Bachem, Voisins-le-Bretonneux, France) aggregation was performed with a 24-h period of agitation (300 vibrations/min at room temperature) at 2 mM in phosphate-buffered saline (PBS) followed by a 24-h period of agitation at final concentration (80 μ M) in culture medium (N5 with 1% HS, 3 μ M cytosine arabinoside and 1 μ M MK-801).

Cortical neurons in primary culture from E14 mouse brain were treated at DIV 6 with the aggregated peptide PrP106–126 (80 μ M) in N5 medium with or without SP600125 (1 μ M; see Bennett *et al.*, 2001) or SB203580 (10 μ M; Willaime-Morawek *et al.*, 2003) for 4–24 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Survival rate was determined from fixed cells after Hoechst staining as described below.

Infection with brain homogenate

As previously described by Cronier *et al.* (2004), the material used for infection was prepared from the brains of terminally ill tg338 mice inoculated with the 127S prion strain (Vilotte *et al.*, 2001) and control material from tg338 mice. Ten per cent brain homogenates were prepared in 5% glucose–PBS and stored at –20 °C until use. On DIV 3, primary neurons were exposed to 0.01% brain homogenate (corresponding to 0.2 ID₅₀/cell) sonicated for 10 min in a cup-horn apparatus.

Detection of active caspase-3

Active caspase-3 was detected in neurons after PrP106–126 treatment using the FAM-DEVD-FMK peptide (carboxyfluorescein analogue of benzyloxycarbonyl-aspartylglutamylvalylaspartic acid fluoromethyl ketone; Intergen Company). This compound covalently binds active caspase-3 and the complex emits green fluorescent light. The FAM-DEVD-FMK peptide was added to the culture medium for 1 h before adding the Hoechst 33342 solution and the PI solution following manufacturer's instructions. Treated live cells were analysed under an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 300).

Measurement of ROS

Intracellular ROS were measured by assay with the nonfluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA; Molecular Probes) after peptide treatment. The CM-H₂DCFDA passively diffuses into cells and produces a green fluorescence when oxidised. At DIV 6, cells were loaded with 15 μ M CM-H₂DCFDA for 30 min at 37 °C, washed twice with N5 with 1% HS for 15 min. Then H₂O₂ (100 μ M) or PrP106–126 (80 μ M) was added to cells in fresh N5–HS 1% medium. For each experiment, fluorescence was analysed on living cells directly into the wells under an inverted microscope (excitation 475 nm, emission 525 nm; Nikon Eclipse TE 300).

Immunocytochemistry

Cells were fixed directly in the cell culture dishes with PBS containing 4% paraformaldehyde for 20 min and incubated with methanol and acetone solution (50 : 50) for 10 min at 4 °C. After washing three times with PBS, cells were permeabilized by incubation in PBS containing 0.2% Triton X-100 for 10 min. Cells exposed to brain homogenates were then treated with 3 M guanidine thiocyanate for 5 min. All cells were then treated with blocking buffer containing 0.2% Triton X-100, 10% FCS, 3% bovine serum albumin in PBS for 1 h. Polyclonal antibodies raised against dually phosphorylated JNK (Thr¹⁸³-Tyr¹⁸⁵-JNK; P-JNK, 1 : 100; New England Biolabs, Ozyme, France) or P-c-Jun (Ser⁷³-c-Jun; 1 : 500; New England Biolabs, Ozyme, France), and/or monoclonal antibodies raised against Map2 (microtubule associated protein 2; 1 : 500; Sigma) were then incubated overnight at 4 °C in PBS containing 1% bovine serum albumin. Cells were rinsed in PBS and incubated for 2 h with an antirabbit CY3-conjugated antibody (1 : 2000, Sigma) and antimouse fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody (1 : 500, Sigma) or antimouse CY3-conjugated antibody (1 : 2000, Sigma). After counterstaining with Hoechst 33342 (Sigma), coverslips were mounted on microscope slides using Vectashield (Vector Abcys, France) and analysed under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 300).

PrP immunoblot

Protein concentration in cell lysates was measured by the BCA protein assay (Pierce) and 40 µg of protein was treated with proteinase K (7.5 µg/mg of protein; Euromedex, Mundolsheim, France) for 30 min at 37 °C. Samples were then supplemented with 1 mM Pefabloc, methanol-precipitated for 1 h at 20 °C and centrifuged at 16 000 *g* for 30 min. Pellets were resuspended in sample buffer, boiled, subjected to SDS-PAGE electrophoresis on 15% tricine gels, and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. PrP was immunodetected with the biotinylated monoclonal antibody ICSM 18 (a generous gift from S. Hawke, London, UK). Western blots were revealed with streptavidin-HRP (Sigma) labelling followed by an enhanced chemiluminescence detection system (ECL; Amersham Pharmacia).

Transfections

Transient transfection of primary cortical cultures was performed with LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) as recommended by the manufacturer's protocol. Cells were transfected at DIV 4 with 1 µg of enhanced green fluorescent protein plasmid (pEGFP-N3; Clontech, Cambridge, UK) alone or in the presence of 5 µg of the dominant negative c-Jun plasmid (DNc-Jun; Ham *et al.*, 1995) or of the empty vector. After 5 h, the cultures were rinsed with fresh medium. Transfection efficiency was 3–5%. Treatments were as explained above and the cells were fixed as described above and counterstained with Hoechst. After analysis under a fluorescence inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300), images were digitised from 20 independent fields per well (three wells per treatment for each experiment; *n* = 3). Previous studies in the laboratory have established that GFP-positive cells were DNc-Jun-positive given their respective transfected ratio, 1 : 5 (Willaime-Morawek *et al.*, 2003). Therefore, healthy nuclei in green fluorescence-expressing neurons were counted manually on digitised images as described below.

Quantification and statistical significance

Cells were analysed under an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 300) and images were digitised (magnification

×400, using a Qimaging Retiga 1300 camera) from 10 independent fields per well (three wells per treatment for each experiment, *n* = 3 independent experiments).

Survival percentages were determined from the number of Hoechst-stained healthy nuclei, automatically computed using a specific macro (thanks to Dr Philippe Mailly, CNRS UMR 7101, Paris) designed for the Image-Pro Plus® 4.1 software (Media Cybernetics). In transfection experiments, percentages were calculated from double-labelled neuron values, numbered manually using the Image-Pro Plus® 4.1 software (Media Cybernetics).

Alternatively, in infected cell cultures, neuronal apoptosis was assessed by manually counting Map2-positive Hoechst-stained fragmented nuclei in a double-blind manner. Statistical significance was determined by ANOVA followed by Student-Neuman-Keuls' *post hoc* test or, when applicable, by *t*-test (***P* < 0.01).

Results

Apoptotic features of PrP106–126-induced neuronal death

Embryonic neurons are usually cultured in the presence of 5–10% FCS and/or 5% HS, concentrations which are optimal for maturation and differentiation but which also provide protection from apoptosis. Under these conditions, apoptosis is generally rather limited and delayed. To obtain more stringent culture conditions, we used the specific N5 medium whose composition resembles that of cerebrospinal fluid (Kawamoto & Barrett, 1986), supplemented with 1% HS and no FCS. In addition, cytosine arabinoside (3 µM) was added to the media between DIV 3 and 6 to reduce glial proliferation (Willaime *et al.*, 2001). Immunolabelling with an antibody against glial fibrillary acidic protein showed that >3% of the cells were astrocytes (data not shown). Therefore, these conditions allowed us to test the direct neurotoxicity of the prion peptide.

Treatment with PrP106–126 (80 µM) induced a massive (70%) neuronal apoptosis after 24 h (Fig. 1). Cell death began after a 10-h latency phase and a 50% cell loss was observed after 16 h (Fig. 1). In control experiments with scrambled peptide, only ≈10% of cells died after 24 h (data not shown), no more than in the absence of treatment (Fig. 1).

Figures 2a and b compare the morphological characteristics of normal neurons and neuronal death induced by 80 µM PrP106–126: Map2-labelled cortical neurons (Fig. 2b) died massively after 24 h

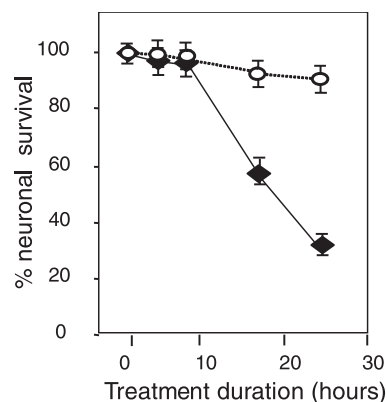


FIG. 1. Survival of cortical neurons following PrP106–126 treatment. (a) Percentages of healthy nuclei: control cultures (○); cultures treated with peptide PrP106–126 (◆). Values represent the mean ± SEM, 10 fields per well, three wells per condition for each experiment; *n* = 6 independent experiments.

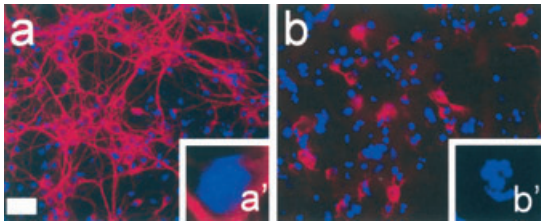


FIG. 2.

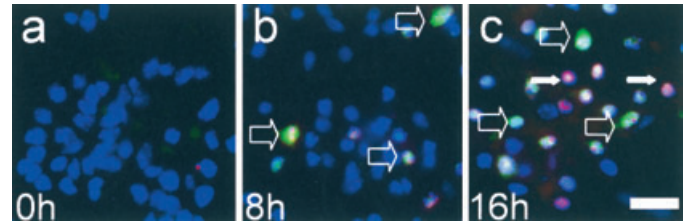


FIG. 4.

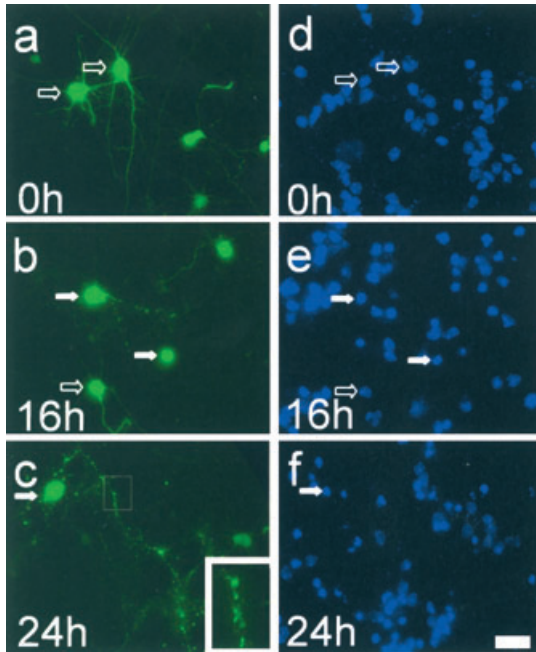


FIG. 3.

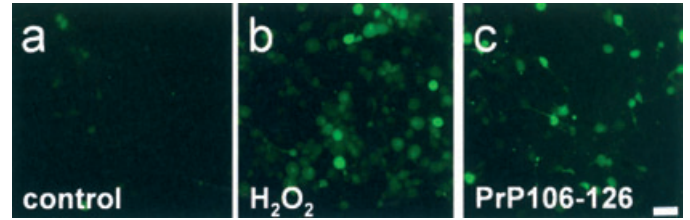


FIG. 5.

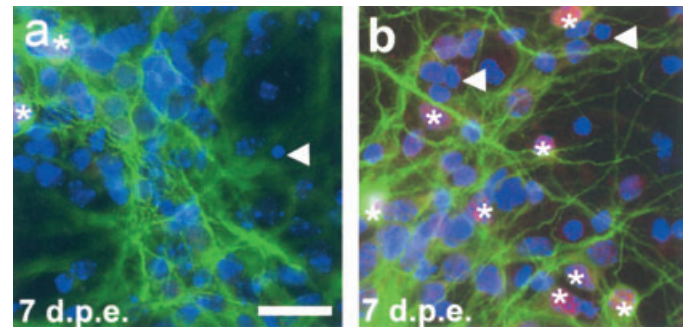


FIG. 7.

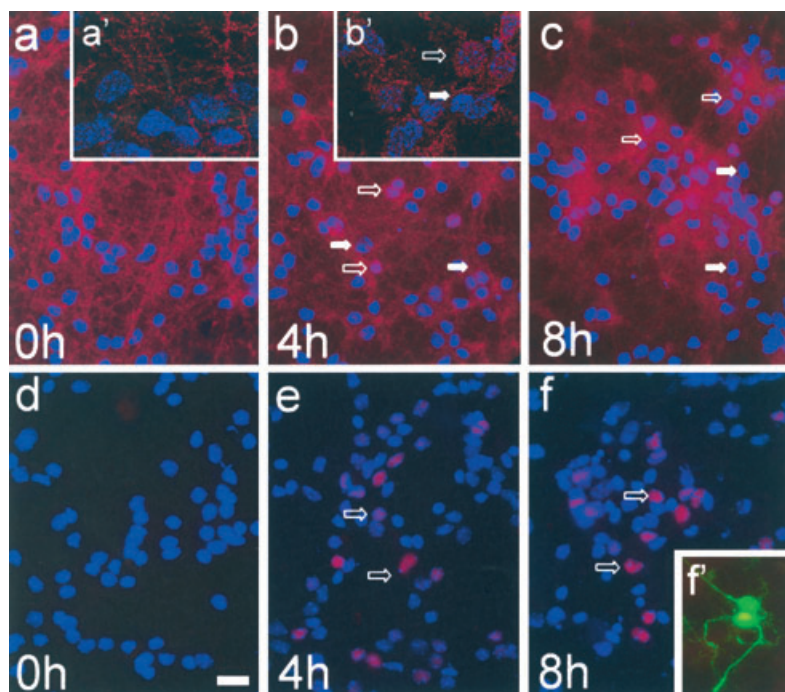


FIG. 6.

(Fig. 2b). Neuronal death was accompanied by chromatin condensation and fragmentation, revealed by intercalation of Hoechst dye in the DNA (Fig. 2b'), compared to normal nuclei in control neurons (Fig. 2a').

To further characterise morphological alterations during PrP106–126-induced neuronal death, cells were transfected with the green fluorescent protein (GFP) plasmid. GFP expression enabled us to visualise the cytoarchitecture, including neuritic extension, of transfected neurons. Figure 3 illustrates the specific morphological pattern of neuronal apoptosis: neurite retraction was visible after 16 h (Fig. 3b) and was followed by neurite fragmentation and shrinkage of cell bodies after 24 h (Fig. 3c) along with chromatin condensation and fragmentation (Fig. 3e and f; filled arrows). Activation of caspase-3 was detectable after 8 h (Fig. 4b) and was much stronger after 16 h (Fig. 4c).

PrP106–126-treatment of cortical neurons induced a rapid production of ROS

In cortical neurons, ROS were detected with the fluorescent marker DCDHF diacetate after H₂O₂ treatment (Fig. 5b). Control cultures had morphologically normal nuclei and did not show DCDHF fluorescence (Fig. 5a). Upon PrP106–126 treatment (80 µM), the fluorescent signal appeared early, after 3 h, in viable cells with unaltered nuclei (Fig. 5c), and preceded the appearance of the morphological features of apoptosis.

PrP106–126 treatment induced P-JNK nuclear translocation and subsequent c-Jun phosphorylation during apoptosis of cortical neurons

Activation of the JNK pathway was assessed by immunohistochemistry using phosphorylation site-specific antibodies which recognise the activated forms of JNK or c-Jun (Fig. 6). A basal level of P-JNK

immunoreactivity was found in control cells, exclusively localized in neurites and cell bodies (Fig. 6a), as further demonstrated by confocal microscopic analysis (Fig. 6a'). After 4 h of PrP106–126 treatment (Fig. 6b), P-JNK immunoreactivity started to show a distinct localization in the nucleus as demonstrated by confocal microscopic analysis (Fig. 6b'). After 8 h, the vast majority of neuronal nuclei were labelled (Fig. 6c).

Within the nucleus, activated JNKs are known to control the phosphorylation state of c-Jun as well as its transcriptional activity (Kallunki *et al.*, 1994). Using an antibody specific for P-c-Jun, we found that P-c-Jun immunoreactivity appeared in the nucleus after 4 h of PrP106–126 treatment (Fig. 6e) and peaked after 8 h (Fig. 6f). In GFP-positive neurons, nuclear P-c-Jun immunoreactivity appeared in yellow (Insert f' in Fig. 6f). Control neurons (t0, Fig. 6d) did not contain any P-c-Jun immunoreactivity.

Using an antibody specific for P-c-Jun we found that, in ScCx³³⁸ as opposed to Cx³³⁸ (Fig. 7a), P-c-Jun immunoreactivity appeared in the nucleus of Map2-positive cells after 7 d.p.e. (Fig. 7b), preceding the increase in neuronal death.

Thus, c-Jun phosphorylation and the translocation of activated JNK followed roughly similar time courses (Fig. 8).

Reduction of PrP106–126-induced cell death by inhibition of the JNK-c-Jun pathway as opposed to p38

To determine to what extent the activation of the JNK-c-Jun pathway is required for PrP106–126-induced neuronal apoptosis, we used the pharmacological inhibitor SP600125. At a 1-µM concentration, this compound has been shown to specifically inhibit the activity of the JNK kinase (IC₅₀, 0.19 µM; Bennett *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2001) and subsequent c-Jun phosphorylation (Lambeng *et al.*, 2003). In our cell culture model, treatment with SP600125 (1 µM) partially protected neurons against PrP106–126-induced cell death (Fig. 9a). Higher concentrations were not used to avoid inhibiting other kinases such as

FIG. 2. Characteristic evolution of cortical neurons following PrP106–126 treatment. (a) Control cultures, neuronal dendrite and soma labelling (Map2, red) superimposed on nuclei labelling (Hoechst, blue); (a') healthy cell nucleus. (b) Cultures treated for 24 h with PrP106–126 (80 µM); (b') apoptotic cell, condensed chromatin after neuritic retraction. Scale bar, 20 µm.

FIG. 3. Morphology of cortical neurons following PrP106–126 treatment. (a–c) Transfected neurons expressing GFP; (a) control; (b) 16 h treatment; (c) 24 h treatment. (d–f) Corresponding fluorescent nuclei after Hoechst labelling (blue): (d) control; (e) 16 h treatment; (f) 24 h treatment. Empty arrows, healthy cell nuclei; filled arrows, apoptotic cell nuclei. Note the intense neuritic fragmentation after 24 h (insert in c) in an apoptotic neuron. Scale bar, 20 µm.

FIG. 4. Activated caspase-3 in cortical neurons following PrP106–126 treatment a: Treatment with control solution. b: 8 h treatment with PrP106–126. c: 16 h treatment with PrP106–126. Cells nuclei appear in blue (Hoechst), activated caspase-3 active in green (empty arrows). Dead cells appear in pink after propidium iodine labelling (white arrows). Scale bar, 20 µm.

FIG. 5. Detection of free radicals in cortical neurons after 3 h of treatment with PrP106–126. (a) Negative control. (b) Positive control (treatment with 1 mM H₂O₂); production of free radicals is shown in green. (c) Treatment with PrP106–126. Scale bar, 20 µm.

FIG. 6. Immunocytochemical detection of P-JNK and P-c-Jun following PrP106–126 treatment. (a–c) Activation of JNK is revealed by anti-P-JNK immunolabelling (red). Nuclei are stained with Hoechst (blue). Nuclear localization of P-JNK appears in pink by superimposition. (a) Control; (a') confocal microscopic analysis of (a); (b) 4 h treatment; (b') confocal microscopic analysis of (b); (c) 8 h treatment. Filled arrows, healthy nuclei with no P-JNK. Open arrows, healthy nuclei immunostained with P-JNK antibody. (d–f) Nuclear localization of activated c-Jun appears in pink after double labelling of anti-P-c-Jun in red and Hoechst nuclear labelling in blue. Double-stained nuclei belong to healthy (non-apoptotic) neurons (empty arrows). (d) control; (e) 4 h treatment; (f) 8 h treatment. (f') GFP-transfected neurons. Nuclear localization of activated c-Jun appears in yellow after superimposition of anti-P-c-Jun in red and GFP in green. Scale bar, 20 µm.

FIG. 7. Immunocytochemical detection of P-c-Jun in cortical neurons following scrapie infection. (a) Mock-exposed Cx³³⁸ and (b) scrapie-exposed ScCx³³⁸ at 7 d.p.e. to sheep prion. Map2 immunolabelling appears in green. Nuclear localization of activated c-Jun appears in pink after double labelling of anti-P-c-Jun in red and Hoechst nuclear labelling in blue. Double-stained nuclei belong to healthy (non-apoptotic) neurons (stars). Arrowheads show apoptotic nuclei. Scale bar, 20 µm.

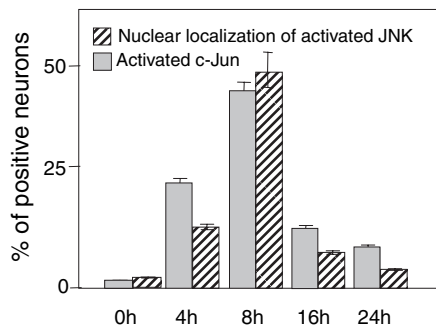


FIG. 8. Quantification of PrP106–126 induction of P-JNK translocation and nuclear c-Jun activation following treatment duration (illustrated in Fig. 6). A peak of P-JNK translocation and nuclear c-Jun activation appeared after 8 h of PrP106–126 treatment, during the apoptosis decision phase.

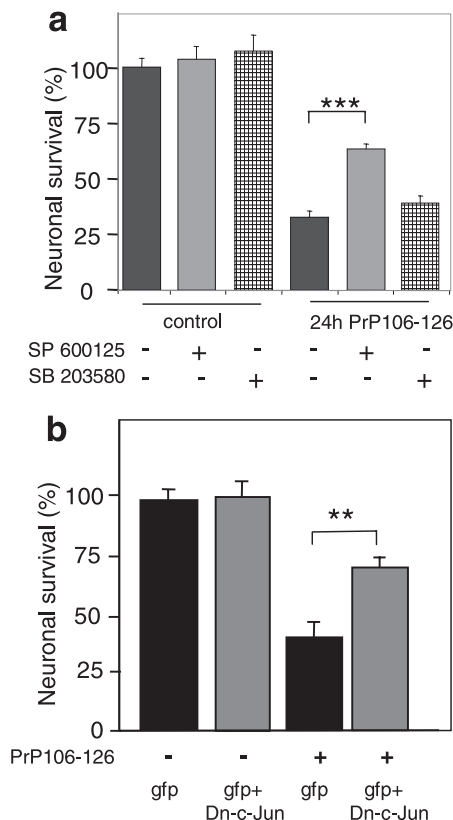


FIG. 9. Pharmacological JNK inhibition by SP600125 and overexpression of a dominant interfering form of c-Jun (Dn-c-Jun) protected cortical neurons from PrP106–126 toxicity. (a) Cells were treated with PrP106–126 (80 μ M) for 16 or 24 h with or without SP600125 (1 μ M). (b) Cells were transfected at DIV 4 with a mix of a GFP-encoding plasmid and a Dn-c-Jun-encoding plasmid or the empty coding vector. PrP106–126 (80 μ M) was applied at DIV 6 and neuronal survival was measured after 24 h. In each case, neuronal survival was quantified as described (in Materials and Methods) on 10 digitised images per well, three wells per condition for each experiment. Values represent the percentage of healthy nuclei, mean + SEM, $n = 4$ independent experiments; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

p38 ($IC_{50} > 10 \mu$ M; Bennett *et al.*, 2001). However, specific inhibition of p38 by treatment with SB203580 (10 μ M, Cuenda *et al.*, 1995; Willaime *et al.*, 2001) did not result in any significant protective effect.

Moreover, we introduced into cortical neurons a dominant interfering form of c-Jun, Dn-c-Jun. We used a construct corresponding to a

deletion of the first 169 amino acids, the region containing the transactivation domain, which contains the phosphorylation target sites of activated JNK (Ham *et al.*, 1995; Willaime-Morawek *et al.*, 2003). On DIV 4, neurons were transfected with a GFP plasmid in combination with a Dn-c-Jun plasmid or the empty vector. After 24 h of PrP106–126 treatment on DIV 6, $\approx 30\%$ of neurons expressing only GFP were alive while $\approx 70\%$ of neurons coexpressing GFP and Dn-c-Jun were alive (Fig. 9b).

These two different approaches thus demonstrated that activation of the JNK–c-Jun pathway plays an important role in PrP106–126-induced neuronal apoptosis.

Scrapie infection induced c-Jun phosphorylation and apoptosis of cortical neurons

As previously reported for primary cultured cerebellar granule neurons from tg338 mice (Cronier *et al.*, 2004), primary cortical neurons from tg338 mice (Cx^{338}) were shown to be permissive to infection by sheep prion. Cortical cells could be maintained for 15 days. After 3 days, Cx^{338} were exposed to low doses of inoculum, giving scrapie-infected Cx^{338} (ScCx³³⁸), and cultures from PrP^{-/-} mice were inoculated in parallel thus making it possible to monitor the levels of input PrP^{sc} and infectivity along the experiment. Figure 10a shows the accumulation

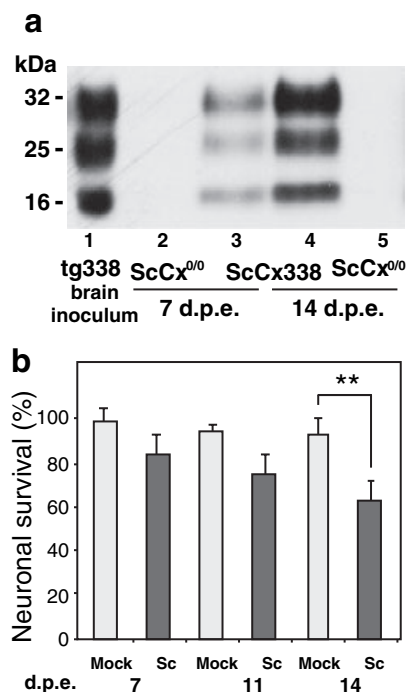


FIG. 10. Scrapie infection-induced apoptosis of cortical neurons. (a) *De novo* synthesis of PrP^{sc} in cortical cell culture exposed to sheep scrapie agent as assessed by Western Blotting. Lane 1, extract from sheep scrapie-infected tg338 brain; Lane 2, extract from $Cx^{-/-}$ exposed for 7 days to normal tg338 brain homogenate at a 0.01% dilution; Lane 3, extract from Cx^{338} exposed for 7 days to normal tg338 brain homogenate at a 0.01% dilution; Lane 4, extract from ScCx³³⁸ exposed for 14 days to scrapie-infected tg338 brain homogenate; Lane 5, extract from $Cx^{-/-}$ exposed for 14 days to normal tg338 brain homogenate at a 0.01% dilution. Forty micrograms of protein was proteinase K-treated and PrP^{sc} was revealed by using the monoclonal antibody ICSM 18. (b) Evolution of neuronal survival between 7, 11 and 14 days after exposure to sheep prion. Healthy nuclei in Map2-positive neurons were quantified manually on five digitised images per well, four wells per condition for each experiment. Values represent the percentage of healthy nuclei, mean + SEM, $n = 3$ independent experiments; ** $P < 0.01$.

of PrP^{res} which was reproducibly observed in ScCx³³⁸ cultures exposed to inoculum and increased from 7 to 14 days post-exposure (d.p.e.) but was absent from ScCx^{-/-} ($n = 3$ for each condition). From these results it was concluded that Cx³³⁸ cultures sustained an active multiplication of the infectious agent.

As previously demonstrated with neuronal cells in primary cultures from tg338 mouse cerebellum (Cronier *et al.*, 2004), scrapie infection induced neuronal apoptosis in Cx³³⁸. In (noninfected) Cx³³⁸, neuronal survival slightly decreased from DIV 7 to 14. In ScCx³³⁸, however, survival rate decreased after 7 d.p.e. to reach $\approx 60\%$ of the control at 14 d.p.e. (Fig. 10). Some apoptotic nuclei are illustrated in Fig. 7a and b (arrowheads).

Using an antibody specific for P-c-Jun we found that, in ScCx³³⁸ as opposed to Cx³³⁸ (Fig. 7a), P-c-Jun immunoreactivity appeared in the nucleus of Map2-positive cells after 7 d.p.e. (Fig. 7b), preceding the increase in neuronal death.

These results show that early c-Jun activation and apoptosis are induced in primary cortical neurons during prion infection.

Discussion

Exposure to PrP106–126 directly induced a rapid and synchronized apoptotic process in cortical neurons, including early production of ROS and late activation of the apoptosis effector caspase-3. We report that the prion peptide PrP106–126-induced neuronal apoptosis involves the early translocation of activated JNKs from the cytosol to the nucleus and subsequent c-Jun phosphorylation. Inhibition of the JNK–c-Jun pathway by pharmacological blockade of JNKs significantly protected cortical neurons against PrP106–126-induced apoptosis and a similar protection was achieved by overexpression of a dominant negative form of c-Jun (DNc-Jun) while pharmacological blockade of the MAP kinase p38 had no effect. Activation of the JNK–c-Jun cascade occurred during the decision phase of neuronal apoptosis, i.e. during the first 8 h in this model and before the execution phase when neuronal viability became significantly reduced.

Although the neuronal toxicity of PrP106–126 has previously been reported to require the presence of microglia which respond to this peptide by increasing their oxygen radical production (Brown *et al.*, 1996; Brown, 2001), we report here a direct neuronal response to PrP106–126 consisting of the rapid production of ROS. The fact that we are using a stringent culture medium could explain why we are able to observe a direct effect on neurons which may be prevented in usual conditions by elements contained in serum (Haik *et al.*, 2000). In these conditions, PrP106–126 directly induced an early increased production of ROS as previously reported in other neuronal models (Turnbull *et al.*, 2003a,b); for a review, see Milhavel & Lehmann (2002).

Neuronal ROS production has been clearly demonstrated to trigger the stress-activated protein kinase JNK (Morishima *et al.*, 2001; Willaime-Morawek *et al.*, 2003). Phosphorylation of the nuclear transcription factor c-Jun by JNK has been reported to induce apoptosis both *ex vivo* (Ham *et al.*, 2000) and *in vivo* (Kyriakis *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1995; Behrens *et al.*, 1999), confirming the important role of the JNK–c-Jun cascade in neuronal apoptosis.

The fact that the protection provided by pharmacological inhibition of JNK and by overexpression of a dominant negative form of c-Jun were only partial suggests that other signal transduction pathways could play a role in PrP106–126-induced apoptosis. Activation of the MAP kinase p38 was first suspected because it has been reported in SH-SY5Y neuroblastoma cells following exposure to PrP106–126 (Thellung *et al.*, 2002) but its pharmacological blockade had no effect

here in cortical neurons. This further suggests that the subtle balance between pro- and antiapoptotic pathways that regulates neuronal apoptosis is likely to vary with neuronal cell phenotype. Of particular importance is the fact that the distribution, nature and basal level of the different isoforms of the MAP kinases JNKs and p38 have been shown to vary among cell types (Mielke & Herdegen, 2000). Intracellular apoptotic pathways can also depend on the type of cell stressor but, in the nervous system (brain or primary neuronal cultures), most of the pro-apoptotic stimuli (including serum withdrawal, NMDA and environmental stress) have been shown to involve JNK–c-Jun while the role of p38 is less well understood (Mielke & Herdegen, 2000). Here, other mechanisms, possibly within the cytoplasm, which would cooperate with the JNK–c-Jun pathway are to be looked for.

Interestingly, amyloid structures such as the aggregated PrP106–126 peptide or PrP^{sc} (Forloni *et al.*, 1993a; Kuwata *et al.*, 2003) and the A β peptide that is associated with Alzheimer's disease have been shown to induce neuronal apoptosis *ex vivo* (Forloni *et al.*, 1993a; Forloni *et al.*, 1993b; Loo *et al.*, 1993) via the production and accumulation of ROS (Behl *et al.*, 1994; Ekinici *et al.*, 1999) and activation of the JNK–c-Jun pathway (Morishima *et al.*, 2001). A β and PrP106–126 peptides could share other common targets than JNKs, as the activation of glycogen synthase kinase 3 has been shown to be crucial in prion peptide-induced neurodegeneration of cortical neurons in culture (Perez *et al.*, 2003), reproducing a sequence observed after A β peptide treatment (Alvarez *et al.*, 1999). However, specific pathways linked to one of the three isoforms of JNK are likely to be involved because A β has been shown recently to specifically trigger JNK3 (Morishima *et al.*, 2001). Interestingly, JNK isoforms 1 and 2 have been shown to regulate region-specific apoptosis during early brain development (Kuan *et al.*, 1999). The role of the different types of JNKs and their precise localization within cortical neurons remains to be determined to fully understand PrP106–126 neurotoxicity.

Our findings are in good correlation with the fact that JNK activation, and its nuclear translocation, have been associated with transcriptional events which occur early in the apoptotic process (Ham *et al.*, 2000). The downstream effects of JNK–c-Jun in PrP106–126-induced apoptosis may be mediated by apoptotic effectors whose expression is also regulated by JNK, such as Fas-Ligand (Herdegen *et al.*, 1998; Morishima *et al.*, 2001) and Bim, a pro-apoptotic member of Bcl-2 family (Putcha *et al.*, 2001; Whitfield *et al.*, 2001). The exact nature of the downstream sequence of events remains to be determined.

The accuracy of the PrP106–126 model is still questioned because it is not certain that it reproduces the events occurring in prion diseases. However, it could be relevant for the detection of early events which precede actual neurotoxicity. Indeed, we have observed a similar activation of c-Jun in scrapie-infected primary cortical neurons at 7 d.p.e. As opposed to cerebellar granule neurons which could be maintained in culture for ≈ 1 month (Cronier *et al.*, 2004), cortical neurons could not be maintained in significant numbers for more than 16 days. Considering that apoptosis was ≈ 2 -fold higher after 14 d.p.e. than in control and not significantly higher after 7 d.p.e., we can consider that c-Jun activation, well known to trigger apoptosis and observed here at 7 d.p.e., actually represents an early event of this process. Although in some proliferating cell types, N-terminal phosphorylation of c-Jun can be triggered by ERK1/ERK2 (Morton *et al.*, 2003), in neurons, c-Jun activation is believed to involve only JNKs. Whether or not the activation of the JNK–c-Jun pathway plays a crucial and reversible role in prion-induced neuronal apoptosis remains to be fully demonstrated. Because in some cases, and

particularly in peripheral neurons (Lindwall *et al.*, 2004), P-c-Jun has been associated with survival, the possibility can not be completely excluded that JNKs could promote cell death by post-transcriptional mechanisms. However, interestingly, c-Jun induction as well as activation of Fas have been reported in the CA2 region of the hippocampus of prion-infected mouse brain during the incubation period, long before PrP accumulation (Jamieson *et al.*, 2001a; Jamieson *et al.*, 2001b).

In conclusion, we have demonstrated that the JNK–c-Jun pathway plays an important role in the decision phase of neuronal apoptosis induced by PrP106–126. Whether or not this pathway is crucial in prion-infected neurons is currently under study. The fact that neuronal death is significantly reduced by pharmacological blockade of a kinase involved in the early and reversible phase of apoptosis opens new therapeutic prospects for PrP^{Sc}-based pathologies, hopefully during the preclinical phase.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Hubert Laude and Dr Didier Vilette for helpful discussions and to Dr A. Lohof for a critical reading of the manuscript. This research was supported by grants from CNRS, the French GIS-Prion, the French Fondation pour la Recherche Médicale (F. Boukhtouche funding) and the France Alzheimer association (N. Arbez funding).

Abbreviations

Cx³³⁸, neurons from tg338 embryonic mouse cortex; d.p.e., days post-exposure; DIV, days *in vitro*; DNc-Jun, dominant negative c-Jun plasmid; FCS, fetal calf serum; GFP, green fluorescent protein; HS, horse serum; JNKs, c-Jun N-terminal kinases; MAP, mitogen-activated protein; Map2, microtubule associated protein 2; MK-801, 5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[*c*]hepten-5,10-imine maleate; p38, p38 MAP kinase; PBS, phosphate-buffered saline; P-c-Jun, phospho-c-Jun; P-JNK, phospho-c-Jun N-terminal kinase; PrP106–126, peptide corresponding to residues 106–126 of the human PrP sequence; PrP^c, cellular prion protein; PrP^{res}, proteinase K-resistant abnormal PrP; PrP^{Sc}, scrapie prion protein; ROS, reactive oxygen species; SB203580, p38 inhibitor; ScCx³³⁸, scrapie-infected neurons from tg338 embryonic mouse cortex; SP600125, JNK inhibitor.

References

Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E. & Diaz-Nido, J. (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett.*, **453**, 260–264.

Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. & Schubert, D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, **77**, 817–827.

Behrens, A., Sibilio, M. & Wagner, E.F. (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.*, **21**, 326–329.

Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M. & Anderson, D.W. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 13681–13686.

Brown, D.R. (2001) Microglia and prion disease. *Microsc. Res. Technol.*, **54**, 71–80.

Brown, D.R., Herms, J. & Kretschmar, H.A. (1994) Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport*, **5**, 2057–2060.

Brown, D.R., Schmidt, B. & Kretschmar, H.A. (1996) Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **380**, 345–347.

Bruce, M.E., McBride, P.A. & Farquhar, C.F. (1989) Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci. Lett.*, **102**, 1–6.

Brugg, B., Michel, P.P., Agid, Y. & Ruberg, M. (1996) Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *J. Neurochem.*, **66**, 733–739.

Bueller, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M. & Weissmann, C. (1992) Normal development and

behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, **356**, 577–582.

Chiesa, R., Piccardo, P., Quaglio, E., Drisaldi, B., Si-Hoe, S.L., Takao, M., Ghetti, B. & Harris, D.A. (2003) Molecular distinction between pathogenic and infectious properties of the prion protein. *J. Virol.*, **77**, 7611–7622.

Cronier, S., Laude, H. & Peyrin, J.M. (2004) Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 12271–12276.

Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R. & Lee, J.C. (1995) SB203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.*, **384**, 229–233.

Ekinici, F.J., Malik, K.U. & Shea, T.B. (1999) Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to beta-amyloid. MAP kinase mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J. Biol. Chem.*, **274**, 30322–30327.

Ettaiche, M., Pichot, R., Vincent, J.P. & Chabry, J. (2000) In vivo cytotoxicity of the prion protein fragment 106–126. *J. Biol. Chem.*, **275**, 36487–36490.

Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O. & Tagliavini, F. (1993a) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **362**, 543–546.

Forloni, G., Chiesa, R., Smiroldo, S., Verga, L., Salmona, M., Tagliavini, F. & Angeretti, N. (1993b) Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25–35. *Neuroreport*, **4**, 523–526.

Giese, A., Groschup, M.H., Hess, B. & Kretschmar, H.A. (1995) Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol.*, **5**, 213–221.

Gray, F., Chretien, F., Adle-Biassette, H., Dorandeu, A., Ereau, T., Delisle, M.B., Kopp, N., Ironside, J.W. & Vital, C. (1999) Neuronal apoptosis in Creutzfeldt–Jakob disease. *J. Neuropathol. Exp Neurol.*, **58**, 321–328.

Haik, S., Peyrin, J.M., Lins, L., Rosseneu, M.Y., Brasseur, R., Langeveld, J.P., Tagliavini, F., Deslys, J.P., Lasmez, C. & Dormont, D. (2000) Neurotoxicity of the putative transmembrane domain of the prion protein. *Neurobiol. Dis.*, **7**, 644–656.

Ham, J., Babij, C., Whitfield, J., Pfarr, C.M., Lallemand, D., Yaniv, M. & Rubin, L.L. (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron*, **14**, 927–939.

Ham, J., Eilers, A., Whitfield, J., Neame, S.J. & Shah, B. (2000) c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1015–1021.

Han, Z., Boyle, D.L., Chang, L., Bennett, B., Karin, M., Yang, L., Manning, A.M. & Firestein, G.S. (2001) c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.*, **108**, 73–81.

Herdegen, T., Claret, F.X., Kallunki, T., Martin-Villalba, A., Winter, C., Hunter, T. & Karin, M. (1998) Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J. Neurosci.*, **18**, 5124–5135.

Hetz, C., Maundrell, K. & Soto, C. (2003) Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends Mol. Med.*, **6**, 237–243.

Ip, Y.T. & Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 205–219.

Jamieson, E., Jeffrey, M., Ironside, J.W. & Fraser, J.R. (2001a) Activation of Fas and caspase 3 precedes PrP accumulation in 87V scrapie. *Neuroreport*, **12**, 3567–3572.

Jamieson, E., Jeffrey, M., Ironside, J.W. & Fraser, J.R. (2001b) Apoptosis and dendritic dysfunction precede prion protein accumulation in 87V scrapie. *Neuroreport*, **12**, 2147–2153.

Jobling, M.F., Stewart, L.R., White, A.R., McLean, C., Friedhuber, A., Maher, F., Beyreuther, K., Masters, C.L., Barrow, C.J., Collins, S.J. & Cappai, R. (1999) The hydrophobic core sequence modulates the neurotoxic and secondary structure properties of the prion peptide 106–126. *J. Neurochem.*, **73**, 1557–1565.

Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Derijard, B., Moore, G., Davis, R. & Karin, M. (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.*, **8**, 2996–3007.

Kawamoto, J.C. & Barrett, J.N. (1986) Cryopreservation of primary neurons for tissue culture. *Brain Res.*, **384**, 84–93.

Knusel, B., Michel, P.P., Schwaber, J.S. & Hefti, F. (1990) Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development *in vitro* by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J. Neurosci.*, **10**, 558–570.

- Kuan, C.Y., Yang, D.D., Samanta Roy, D.R., Davis, R.J., Rakic, P. & Flavell, R.A. (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron*, **22**, 667–676.
- Kuwata, K., Matumoto, T., Cheng, H., Nagayama, K., James, T.L. & Roder, H. (2003) NMR-detected hydrogen exchange and molecular dynamics simulations provide structural insight into fibril formation of prion protein fragment 106–126. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 14790–14795.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. & Woodgett, J.R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, **369**, 156–160.
- Lambeng, N., Willaime-Morawek, S., Mariani, J., Ruberg, M. & Brugg, B. (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways during the death of PC12 cells is dependent on the state of differentiation. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **111**, 52–60.
- Lindwall, C., Dahlin, L., Lundborg, G. & Kanje, M. (2004) Inhibition of c-Jun phosphorylation reduces axonal outgrowth of adult rat nodose ganglia and dorsal root ganglia sensory neurons. *Mol. Cell Neurosci.*, **27**, 267–279.
- Loo, D.T., Copani, A., Pike, C.J., Whitemore, E.R., Walencewicz, A.J. & Cotman, C.W. (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 7951–7955.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Kohn, P.C., Brandner, S. & Collinge, J. (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, **302**, 871–874.
- Manning, A.M. & Davis, R.J. (2003) Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 554–565.
- Mielke, K. & Herdegen, T. (2000) JNK and p38 stresskinases – degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **61**, 45–60.
- Milhavet, O. & Lehmann, S. (2002) Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **38**, 328–339.
- Morishima, Y., Gotoh, Y., Zieg, J., Barrett, T., Takano, H., Flavell, R., Davis, R.J., Shirasaki, Y. & Greenberg, M.E. (2001) Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J. Neurosci.*, **21**, 7551–7560.
- Morton, S., Davis, R.J., McLaren, A. & Cohen, P. (2003) A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J.*, **22**, 3876–3886.
- Perez, M., Rojo, A.I., Wandosell, F., Diaz-Nido, J. & Avila, J. (2003) Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. *Biochem. J.*, **372**, 129–136.
- Pittman, R.N., Messam, C.A. & Mills, J.C. (1998) Asynchronous death as a characteristic feature of apoptosis. In Koliatsos, V.E. & Ratan, R. (eds), *Cell Death and Diseases of the Nervous System*, Humana Press Inc., Totona, NJ, USA, pp. 29–43.
- Prusiner, S.B. (1998) Prions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 13363–13383.
- Putcha, G.V., Moulder, K.L., Golden, J.P., Bouillet, P., Adams, J.A., Strasser, A. & Johnson, E.M. (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron*, **29**, 615–628.
- Rymer, D.L. & Good, T.A. (2000) The role of prion peptide structure and aggregation in toxicity and membrane binding. *J. Neurochem.*, **75**, 2536–2545.
- Selvaggini, C., De Gioia, L., Cantu, L., Ghibaudi, E., Diomedea, L., Passerini, F., Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F. & Salmona, M. (1993) Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106–126 of the prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 1380–1386.
- Solassol, J., Crozet, C. & Lehmann, S. (2003) Prion propagation in cultured cells. *Br. Med. Bull.*, **66**, 87–97.
- Tagliavini, F., Prelli, F., Verga, L., Giaccone, G., Sarma, R., Gorevic, P., Ghetti, B., Passerini, F., Ghibaudi, E., Forloni, G., Salmona, M., Bugiani, O. & Brangione, B. (1993) Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106–147 form amyloid-like fibrils in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 9678–9682.
- Thellung, S., Florio, T., Villa, V., Corsaro, A., Arena, S., Amico, C., Robello, M., Salmona, M., Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F. & Schettini, G. (2000) Apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granule cells treated with the prion protein fragment 106–126. *Neurobiol. Dis.*, **7**, 299–309.
- Thellung, S., Villa, V., Corsaro, A., Arena, S., Millo, E., Damonte, G., Benatti, U., Tagliavini, F., Florio, T. & Schettini, G. (2002) p38 MAP kinase mediates the cell death induced by PrP106–126 in the SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurobiol. Dis.*, **9**, 69–81.
- Turnbull, S., Tabner, B.J., Brown, D.R. & Allsop, D. (2003a) Copper-dependent generation of hydrogen peroxide from the toxic prion protein fragment PrP106–126. *Neurosci. Lett.*, **336**, 159–162.
- Turnbull, S., Tabner, B.J., Brown, D.R. & Allsop, D. (2003b) Quinacrine acts as an antioxidant and reduces the toxicity of the prion peptide PrP106–126. *Neuroreport*, **14**, 1743–1745.
- Vilotte, J.L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M.G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J.C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M.F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D. & Laude, H. (2001) Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J. Virol.*, **75**, 5977–5984.
- Whitfield, J., Neame, S.J., Paquet, L., Bernard, O. & Ham, J. (2001) Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron*, **29**, 629–643.
- 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.
- Willaime-Morawek, S., Brami-Cherrier, K., Mariani, J., Caboche, J. & Brugg, B. (2003) C-Jun N-terminal kinases/c-Jun and p38 pathways cooperate in ceramide-induced neuronal apoptosis. *Neuroscience*, **119**, 387–397.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. & Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, **270**, 1326–1331.
- Yang, D.D., Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Rincon, M., Zheng, T.S., Davis, R.J., Rakic, P. & Flavell, R.A. (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*, **389**, 865–870.

Sujet Annexe 2 :

Protection par l'IGF-1 contre la
mort neuronale induite par le
céramide.

Willaime-Moravek S., Arbez N., Mariani J. and Brugg B.
“IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced
apoptosis via activation of the PI-3K/Akt pathway,
independent of CREB/Bcl-2.”
Molecular Brain Research 2005



Research Report

IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis via activation of the PI-3K/Akt and ERK pathways; is this protection independent of CREB and Bcl-2?

Sandrine Willaime-Morawek, Nicolas Arbez, Jean Mariani, Bernard Brugg*

Laboratoire Neurobiologie des Processus Adaptatifs (UMR 7102 CNRS and Univ. P. and M. Curie), 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France

Accepted 18 September 2005

Abstract

Current understanding of IGF-I-mediated neuroprotection implies the activation of phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K), which leads to the activation of Akt/Protein Kinase B. In non-neuronal cells, Akt phosphorylates and activates the transcription factor CREB, implicated in the transcription of the anti-apoptotic *bcl-2* gene. This paper further analyses the anti-apoptotic IGF-I action in neurons. We show that IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis. Ceramide decreases Akt phosphorylation during apoptotic process whereas a simultaneous treatment with IGF-I increases Akt phosphorylation. Analysis of the signals transduction pathway revealed that IGF-I induces CREB phosphorylation via PI-3K and ERK, whereas simultaneous ceramide and IGF-I treatment decreases CREB phosphorylation. Although an overexpression of Bcl-2 protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis, our data indicate that the Bcl-2 protein level is not modulated during IGF-I, ceramide and/or LY294002 treatment. In consequence, we demonstrated that IGF protects neurons against ceramide-induced apoptosis and that IGF-I protection involves the PI-3K/Akt and ERK pathways; this protection may be independent of CREB and Bcl-2.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

Theme: Development and regeneration

Topic: Neuronal death

Keywords: Primary culture; Cortex; Signal transduction

1. Introduction

Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) belongs to the somatomedin group of polypeptide hormones [12]. IGF-I has neuroprotective properties by reducing programmed death of motorneurons during development, after axotomy and spinal cord transection [34,35,42]. Intraventricular application of IGF-I has shown to attenuate neuronal cell loss after hypoxic–ischemic brain injury in adult rats [22,56,57]. In vitro studies revealed that IGF-I exerts its biological actions through a tyrosine kinase receptor, responsible for the phosphorylation of intracellular signal transduction proteins [59]. IGF-I-mediated neuroprotection is induced through the activation of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K), as demonstrated for cerebellar granule

Abbreviations: Ara-C Cytosine arabinoside; BSA Bovine serum albumin; CaMKIV Calcium-calmoduline kinase IV; CAPP Ceramide activated protein phosphatase; cer: c_2 -ceramide; CREB CAMP-response element binding protein; ECLEnhanced chemiluminescence; ERK Extracellular signal regulated kinases; FCS Fetal calf serum; HS Horse serum; IGF-I Insulin-like growth factor-I; JNK Stress activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases; LY LY 294002, PI-3K inhibitor; MAP kinase Mitogen activated protein kinase; MTT tetrazolium salt 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PC12 Pheochromocytoma clone 12; PDK2 PIP₃ dependent kinase 2; PI-3K phosphatidylinositol-3-kinase; PKA Proteine kinase A; PKB Proteine kinase B; PKCζ Proteine kinase Cζ; PP2A Protein phosphatase-2A-like phosphatase; SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

* Corresponding author. Fax: +33 1 44 27 26 69.

E-mail address: bernard.brugg@snv.jussieu.fr (B. Brugg).

42 cells and sensory dorsal root ganglion cells [1,33,39,50]
 43 leading to the phosphorylation and subsequent activation
 44 of Akt/Protein Kinase B [2,18,21,44]. Active Akt in turn
 45 can phosphorylate and thereby inactivate several cytoplas-
 46 mic or nuclear targets such as the initiator caspase,
 47 caspase-9 [9,33], the proapoptotic protein Bad and the
 48 transcription factor FKHL-1 [10,15,33]. A recent study in
 49 non-neuronal cells has demonstrated that Akt can also
 50 phosphorylate and activate the transcription factor CREB,
 51 implicated in the transcription of the antiapoptotic *bcl-2*
 52 gene [49].

53 This report analyses the effects of the anti-apoptotic
 54 action IGF-I on neuronal apoptosis using ceramide as an
 55 apoptotic inducer. Ceramide is a second messenger
 56 generated intracellularly by the sphingomyelinase-medi-
 57 ated cleavage of sphingomyelin [23,29,38]. Sphingomye-
 58 linase activity is strongly increased during develop-
 59 mental neuronal death in rat brain [54]. Increased
 60 ceramide levels are observed during apoptosis induced
 61 by growth factor-withdrawal in neuronally differentiated
 62 PC12 cells [32] or cortical neurons [62] and after
 63 ischemia in the gerbil hippocampus [41]. Furthermore,
 64 apoptosis can be induced by exogenous ceramide
 65 treatment of PC12 cells [20,24], mesencephalic [7],
 66 hippocampal [40] or cortical neurons [60]. Recently, we
 67 have shown that ceramide regulates pro-apoptotic MAP
 68 kinase pathways and that JNK and p38 activation is
 69 crucial in ceramide-induced neuronal apoptosis in primary
 70 cortical neurons [60,61]. Thus, the objective of this study
 71 is to evaluate the protective effects of IGF-I on ceramide-
 72 induced neuronal cell death in primary cortical neuronal
 73 cultures.

74 2. Materials and methods

75 2.1. Materials

76 2.1.1. Drugs

77 C₂-ceramide (N-acetylsphingosine, Biomol Research
 78 Lab, Plymouth Meeting, PA, USA) was prepared as a 25-
 79 mM stock in ethanol and incubated in the culture media.
 80 The specificity of c₂-ceramide was evaluated by comparing
 81 its effects with those of c₂-dihydro-ceramide (Biomol
 82 Research Lab). This analogue is lacking the 4–5 *trans*
 83 double bond in the sphingosine moiety of c₂-ceramide, and
 84 is unable to activate the sphingomyelin pathway in
 85 lymphocytes [4,45] and neurons [7].

86 Insulin-like growth factor-I (Sigma, Saint Louis, MO,
 87 USA) was prepared as 0.1 M acid acetic stocks at 0,05 mg/
 88 mL and added to the culture media as described. LY294002
 89 (Cell Signaling Technology, Ozyme, France) was prepared
 90 as DMSO stocks at 50 mM and added to the culture media
 91 as described. ERK pathway inhibitor U0126 (Promega) was
 92 prepared as DMSO stocks at 10 mM and added to the
 93 culture media as described.

2.1.2. Antibodies

94 We used Cell Signaling Technology rabbit antisera
 95 specifically directed towards phospho-Ser⁴⁷³ Akt diluted
 96 1:1000, phospho-Ser¹³³ CREB diluted 1:750 for Western
 97 blot or 1:500 for immunocytochemistry. We also used rabbit
 98 polyclonal antisera raised against synthetic peptides specific
 99 for Akt (phosphorylation-state independent; Cell Signaling
 100 Technology) diluted 1:1000, mouse monoclonal antisera
 101 raised against a recombinant Bcl-2 (Santa Cruz, Santa Cruz,
 102 CA, USA) diluted 1:1000. Phospho-ERK (P-ERK) diluted
 103 1:1000, ERK diluted 1:750 and CREB diluted 1:1000
 104 antibodies were all rabbit antisera purchased from Cell
 105 Signaling Technology. 106

2.1.3. Mice

107 The Swiss mice were purchased from Janvier (Le
 108 Genest-St-Isle, France). Bcl-2 transgenic mice were gener-
 109 ated from our breeding colony, from mice kindly given by
 110 Dr. Martinou, University of Geneva, Switzerland. Expres-
 111 sion of Bcl-2 in these transgenic mice has been previously
 112 published [17,37]. Adequate measures were taken to
 113 minimize the number of animals used, pain or discomfort.
 114 All experiments conformed to French guidelines on the
 115 ethical use of animals and European Communities Council
 116 Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). 117

2.2. Genotyping

118 Genotyping for *bcl-2* was performed by PCR using two
 119 primers to detect the human *bcl-2* transgene: forward 5'-
 120 ATGAGCCTTGGGACTGTGAA-3', reverse 5'-GAA-
 121 GACTCTGCTCAGTTTGG-3'. Cycling parameters were 5
 122 min at 94 °C for one cycle, 45 s at 94 °C, 45 s at 60 °C, 1
 123 min at 72 °C for a total of 40 cycles. PCR products were
 124 resolved on a 2% agarose gel. 125

2.3. Primary cultures of mouse cortex

126 Embryos were removed at day 14 from timed-pregnant
 127 Swiss mice (Janvier, Le Genest-St-Isle, France). The cortex
 128 was dissected, mechanically dissociated and plated on
 129 polyethyleneimine (1 mg/mL) coated culture wells, in
 130 Eagle's basal medium (Eurobio, Les Ulis, France), supple-
 131 mented with 5% horse serum (HS; Eurobio) and 2.5% fetal
 132 calf serum (FCS; Eurobio), at a density of 7×10^5 cells/cm².
 133 After 2 days in culture the media was replaced with N5
 134 medium [26] with 180 mg/L glucose and changed daily;
 135 FCS content was reduced to 1%; Ara-C (cytosine arabino-
 136 side, 3 μM, Sigma, Saint Louis, MO, USA) was added to
 137 prevent astrocyte proliferation (our cultures were at least
 138 95% neuronal after this treatment), and MK-801 (1 μM,
 139 Research Biochemicals International, Natick, MA, USA) to
 140 prevent excitotoxicity [7,28]. 141

142 Primary neuronal cultures taken from the *bcl-2* trans-
 143 genic mice were prepared using the cortex. The cortex from
 144 one embryo provides approximately 4×10^6 cells that we

145 plated at a density of 7×10^5 cells/cm² in 96 well plates.
 146 Each culture was derived from an individual embryo, as
 147 genotyping was performed after putting the cells into
 148 culture.

149 2.4. Ceramide treatment

150 Embryonic cortical neurons cultivated in 5% HS and
 151 1% FCS, optimal conditions for their maturation and
 152 differentiation were insensitive to c₂-ceramide treatment.
 153 That is why we reduced serum content to 1% HS, 24
 154 h before any ceramide treatment [7]. Thus, the effects seen
 155 were not due to partial serum deprivation but rather to
 156 specific treatment, since control cells were in the same
 157 serum conditions during the same time as the treated cells.
 158 The culture conditions (concentration and time course)
 159 under which c₂-ceramide provokes cell death were
 160 determined by a cell-viability test.

161 2.5. Cell viability

162 Cell viability was determined by counting viable cells
 163 after a ten-min treatment with bisbenzimidazole (0.8 µg/mL),
 164 Triton X-100 (0.005%) or with the MTT assay (the
 165 conversion of the yellow tetrazolium salt [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] to the
 166 purple formazan dye depends upon the mitochondrial
 167 activity [3,53]). The MTT assay was performed on neurons
 168 in N5 medium 1% HS, with MTT (0.5 mg/mL) for 4 h in a
 169 humidified atmosphere at 37 °C, 5% CO₂. The purple
 170 formazan salt was solubilized in 100 µL of a solution
 171 containing 0.1 M HCl in isopropanol. The spectrophotometric absorbency of the samples was determined at a 560-nm wave length.

175 2.6. Transfections

176 Transient transfection of primary cortical cultures was
 177 performed with LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) as recommended by the manufacturer's protocol. Cells were transfected with 1 µg of a plasmid encoding enhanced green fluorescent protein (pEGFP-N3; Clontech, Cambridge, UK). After 6 h, the cultures were rinsed with fresh media. Transfection efficacy was 3–5% of the cells. After treatments, the cells were fixed as described for immunocytochemistry.

185 2.7. Western blot analysis

186 Cultured neurons were lysed in solubilization buffer (10
 187 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 30 mM
 188 Na₄P₂O₇, 50 mM NaF, 5 µM ZnCl₂, 100 µM Na₃VO₄, 1
 189 mM dithiothreitol, 5 nM okadaic acid, 2.5 µg/mL aprotinin,
 190 3.6 µM pepstatin, 0.5 µM phenylmethylsulfonyl fluoride,
 191 0.5 mM benzamidine, 5.3 µM leupeptin) at 4 °C. Insoluble
 192 materials were removed by centrifugation (13,000 g for 20

min at 4 °C), supernatants were isolated and the samples
 were stored at –80 °C. Proteins were dosed with the DC
 protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cell-
 extracts containing equivalent amounts of protein were
 boiled for 5 min in sample loading buffer. After a 10% (15%
 for Bcl-2 detection) SDS-PAGE, proteins were transferred
 to a polyvinylidene difluoride membrane (ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA USA). The transfer was checked by
 Coomassie blue staining of the gels and the equal gel
 loading was confirmed by Ponceau red staining of the
 membranes. The transfer was also checked by the
 homogenous background of the blots after revelation.
 Non-specific sites were blocked with 5% skimmed dried
 milk for 2 h. Blots were then incubated overnight at 4 °C
 with primary antibodies against the phosphorylated form of
 the kinases, in 5% Bovine Serum Albumin (BSA). They
 were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated
 secondary antibodies in 5% skimmed dried milk for
 1 h. The revelation was processed with enhanced
 chemiluminescence substrate (Amersham, UK). The blots
 were stripped with 0.1 M glycine-HCl (pH 2.8) twice
 for 30 min at 60 °C and SDS 2% for 10 min, followed
 by saturation in 5% skimmed dried milk overnight at 4 °C.
 They were then incubated with the primary antibodies
 detecting both phosphorylated and non-phosphorylated
 forms of the kinases, in 5% skimmed dried milk, followed
 by incubation with the secondary antibody for 1 h, and
 revealed with the ECL kit as described above. Quantification
 was processed using the Densylab software (Microvision
 Instruments).

2.8. Immunocytochemistry

After c₂-ceramide treatment, cells were fixed with PBS
 (Phosphate Buffer Saline) containing 2% paraformaldehyde
 for 40 min, and then incubated with methanol/acetone
 solution (50/50) for 10 min at 4 °C. After washing
 three times with PBS, plates were treated with blocking
 buffer containing FCS 10%, BSA 3% Triton X-100 0.2%
 in PBS for 30 min. Polyclonal antibody raised against
 phosphorylated CREB was incubated overnight at 4 °C in
 PBS containing 1% BSA and 0.2% Triton X-100. Plates
 were rinsed 3 times in PBS and then incubated with an
 anti-rabbit Cy3-conjugated antibody (1:2000) for 1.5 h in
 PBS containing BSA 1%, Triton X-100 0.2%. After
 counterstaining with Hoechst, cells were mounted under
 coverslips using Vectashield (Vector Abcys, France).

3. Results

3.1. IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis

The effect of IGF-I on ceramide-induced apoptosis was
 examined in primary cortical neurons. Cortical neurons

243 were treated after a 5-day maturation period in vitro with c_2 -
 244 ceramide (40 μ M) and IGF-I (10 ng/mL), then assayed for
 245 cell viability at various times after treatment using the MTT
 246 metabolism assay (Fig. 1A). By measuring survival, we
 247 have shown that IGF-I inhibited ceramide-induced apopto-
 248 sis. From 16 h until 48 h of treatment, co-treatment of
 249 ceramide with IGF-I resulted in a survival increase from
 250 61% to 97% at 24 h, and from 50% to 84% at 48 h (Fig.
 251 1A). Furthermore, dose dependence analysis (Fig. 1B)
 252 reveals that a dose of 5 ng/mL completely protects cortical
 253 neurons from ceramide-induced apoptosis.

254 GFP transfection of the neurons allowed determination of
 255 their morphology during treatment. After 24 h of ceramide
 256 treatment, apoptotic features such as neurite fragmentation
 257 and nuclear condensation and fragmentation were observed
 258 (Figs. 1D and H). In IGF-I treated cells, GFP labeling
 259 visualized intact neurons with long neurites, as observed in
 260 the untreated control cells (Figs. 1C and E). When cells
 261 were co-treated with ceramide and IGF-I, cells looked
 262 healthy similar to control cells (Fig. 1F). In conclusion, we
 263 show that IGF-I protects neurons against ceramide-induced
 264 apoptosis, and that such protected neurons show no signs of
 265 nuclear fragmentation and condensation or neurite fragmen-
 266 tation.

3.2. Ceramide decreases P-Akt, whereas IGF-I increases it, even in presence of ceramide

269 In non-neuronal cells, ceramide has been shown to
 270 inhibit the PI-3K/Akt pathway. To determine whether this
 271 pathway is modulated during ceramide-induced neuronal
 272 apoptosis, Western blots of cellular extracts were performed
 273 with antibodies directed against the phosphorylated form of
 274 Akt. As ceramide inhibits Akt by promoting dephosphory-
 275 lation of serine 473 [52] and phosphorylation of both
 276 residues is required for the optimal activation of Akt [31],
 277 we analyzed phosphorylation of serine 473. After 0.5 h, c_2 -
 278 ceramide treatment resulted in a rapid and substantial
 279 decrease in the signals corresponding to P-Ser⁴⁷³-Akt (Fig.
 280 2A, first panel) without significantly affecting the level of
 281 total Akt (Fig. 2A, second panel). The ratio P-Akt/total Akt
 282 decreased very rapidly during c_2 -ceramide treatment and
 283 reached 15% of the control value after a 0.5-h treatment, this
 284 low phosphorylation level remained throughout the apopto-
 285 tic process (up to a 24-h treatment; Fig. 2B).

286 In contrast, a 0.5-h co-treatment of c_2 -ceramide and IGF-
 287 I caused a rapid and substantial increase in signals
 288 corresponding to P-Ser⁴⁷³-Akt (Fig. 2A, third panel) without
 289 significantly affecting the level of total Akt (Fig. 2A, fourth

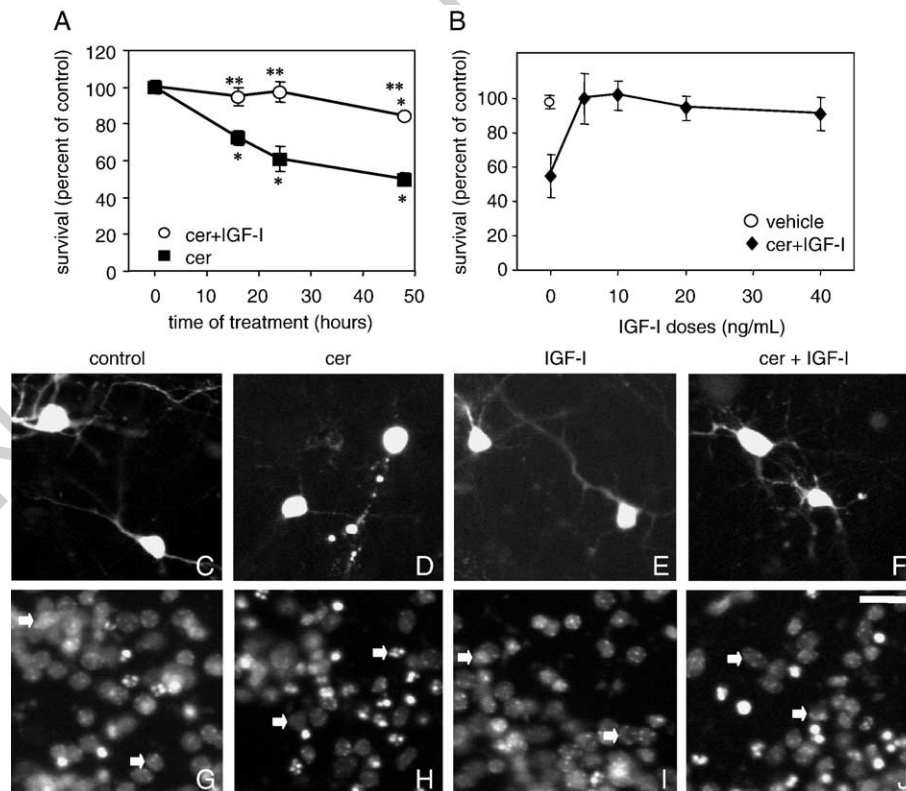


Fig. 1. IGF-I (10 ng/mL) protects cultured cortical neurons against c_2 -ceramide (40 μ M)-induced neuronal death. The effect is time-(A) and-dose (B) dependent. Survival was assessed using the MTT assay. Data represent mean \pm SEM, $n = 6$ independent experiments (A), $n = 4$ independent experiments (B). * $P < 0.05$ compared with the control value, according to the one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. ** $P < 0.05$ compared with related ceramide value, according to the Student's t test. (C–J) GFP visualization of transfected cortical neurons (C–F) and corresponding nuclei labeled with Hoechst (G–J), in control (C, G), c_2 -ceramide treated (40 μ M; D, F, H, J), and/or IGF-I treated (10 ng/mL; E, F, I, J) neurons after 24 h of treatment. White arrows: nuclei corresponding to GFP transfected cells. Scale bar: 20 μ m.

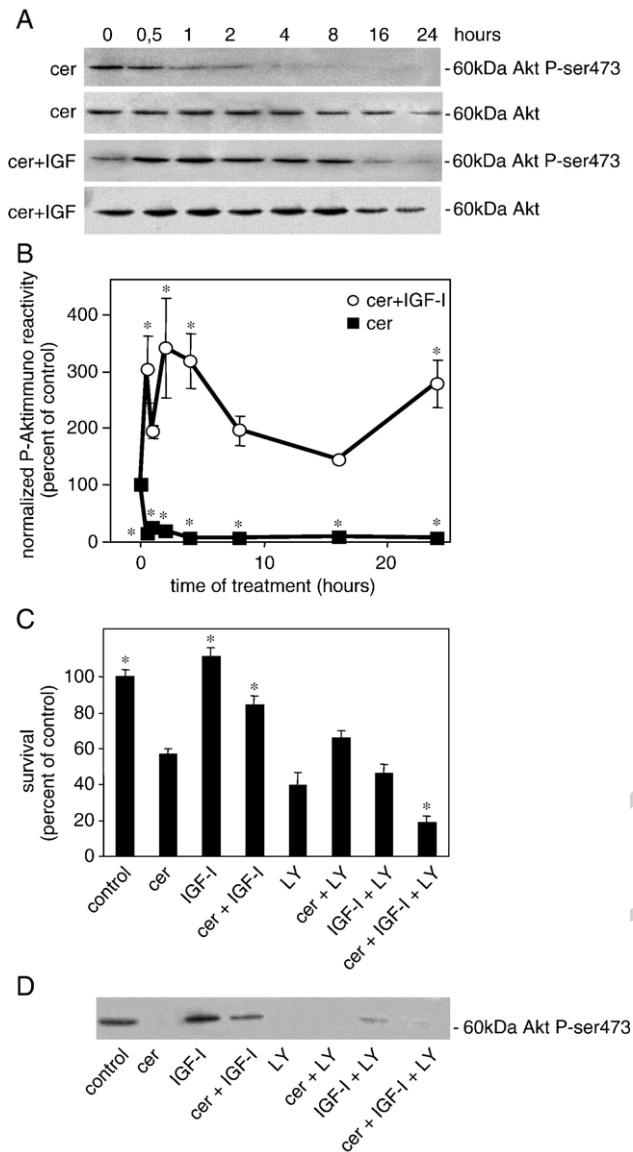


Fig. 2. IGF-I protection of cortical neurons implicates PI-3K/Akt pathway. (A) Immunoblot analysis of P-Akt (first and third panels) and total Akt (second and fourth panels) in extracts of c_2 -ceramide (40 μ M; first and second panels) or c_2 -ceramide (40 μ M) and IGF-I (10 ng/mL; third and fourth panels)-treated cortical neurons. (B) Quantification of P-Akt immunoreactivity during c_2 -ceramide (40 μ M) or c_2 -ceramide (40 μ M) and IGF-I (10 ng/mL) treatment. P-Akt signals were normalized to the corresponding total Akt signals. Data represent mean \pm SEM, $n = 3$ independent experiments. $*P < 0.05$ compared with the control value, according to the one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. (C) The PI-3K inhibitor LY294002 decreases survival. Survival measures were obtained after 24 h of LY294002 (50 μ M), IGF-I (10 ng/mL) and/or c_2 -ceramide (40 μ M) treatment. Survival was assessed using the MTT assay. Data represent mean \pm SEM, $n = 4$ independent experiments. $*P < 0.05$ compared with the c_2 -ceramide value, according to the one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. (D) Immunoblot analysis of P-Akt in extracts of 7-h treated cortical neurons with LY294002 (50 μ M), IGF-I (10 ng/mL) and/or c_2 -ceramide (40 μ M) treatment as indicated.

290 panel). The ratio P-Akt/total Akt increased very rapidly
 291 during c_2 -ceramide and IGF-I co-treatment and reached
 292 304% of the control values after a 0.5-h treatment. This

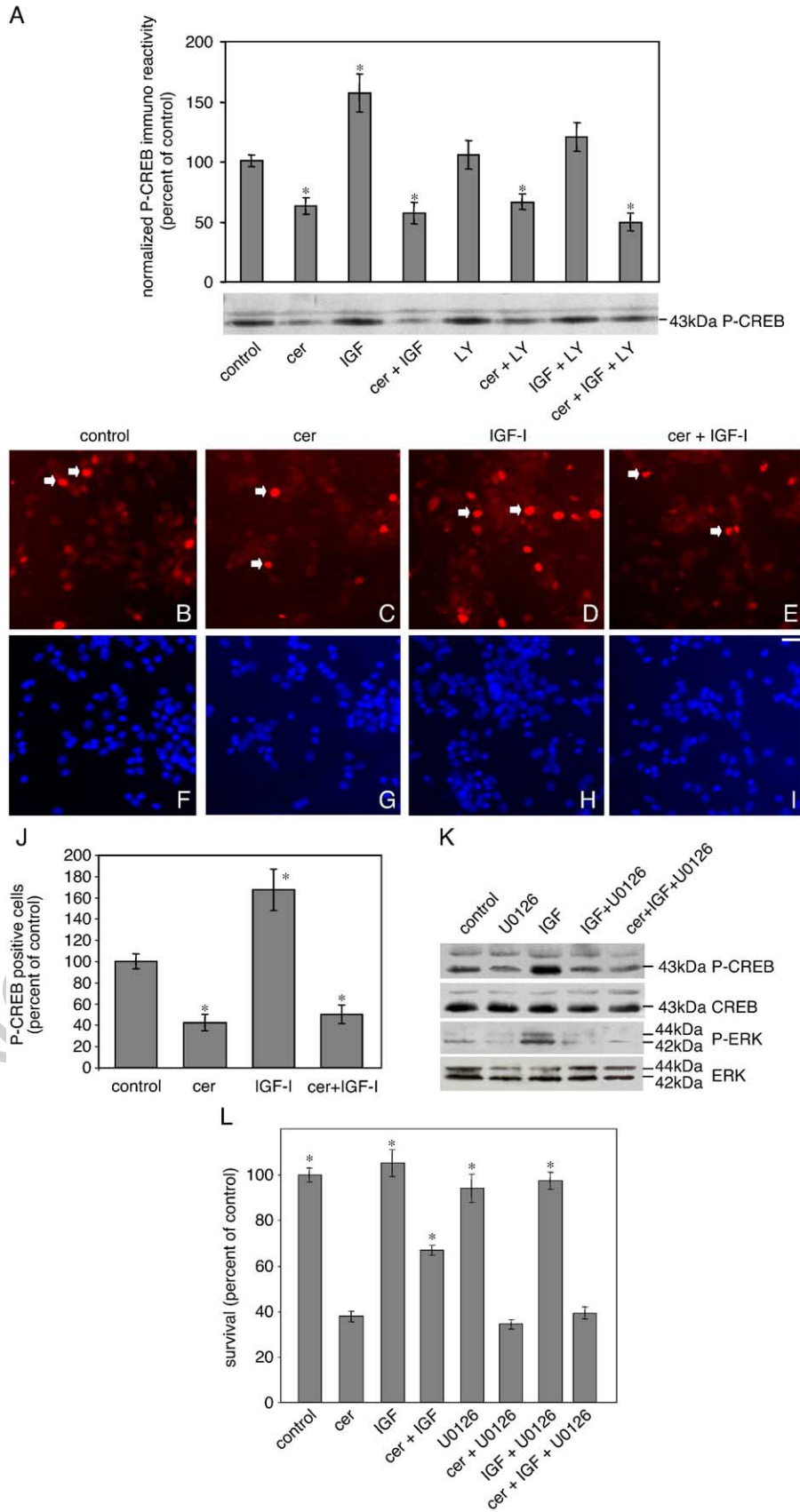
increase in phosphorylation level was maintained through-
 293 out the treatment (up to 24 h; Fig. 2B). Inhibition of PI-3K
 294 by LY294002 abolishes IGF-I protection of cortical neurons
 295 against ceramide-induced apoptosis.
 296

To determine whether the PI-3K/Akt pathway is involved
 297 in IGF-I protection against c_2 -ceramide-induced neuronal
 298 cell death, we applied the PI-3K inhibitor LY294002. This
 299 inhibitor is specific for PI-3K [13]. In Fig. 2C, ceramide
 300 decreased survival to 57% of the control and IGF-I
 301 protected neurons against ceramide-induced neuronal apo-
 302 ptosis, as detailed in Fig. 1. LY294002 (50 μ M) alone
 303 decreased survival to 40% of the control. LY294002 did not
 304 enhance ceramide-induced apoptosis after 24 h of treatment,
 305 but abolished IGF-I protection of cortical neurons against
 306 ceramide-induced neuronal apoptosis. Western blots of
 307 cellular extracts with the same treatments were performed
 308 with antibodies directed against the Ser⁴⁷³ phosphorylated
 309 form of Akt (Fig. 2D). We observe that when survival level
 310 was similar to the control value (control, IGF-I, cer+IGF-I),
 311 Akt was phosphorylated, whereas when apoptosis was
 312 induced (cer, LY, IGF-I+LY, cer+LY, cer+IGF-I+LY), the
 313 level of Akt phosphorylation was low or undetectable.
 314

3.3. Ceramide causes a decrease in CREB phosphorylation in cortical neurons

As Akt may phosphorylate and activate CREB, we tested
 317 whether the phosphorylated form of CREB (P-CREB) was
 318 modulated during ceramide and/or IGF-I treatment. Western
 319 blot analyses of cellular extracts were performed after 7 h of
 320 treatment with ceramide and/or IGF-I (Fig. 3A), the time
 321 corresponding to the highest level of Akt phosphorylation
 322 during IGF-I and ceramide treatment, and also the minimum
 323 level of Akt phosphorylation during ceramide treatment
 324 alone (Fig. 2B). Ceramide treatment decreased CREB
 325 phosphorylation compared to control values, whereas IGF-I
 326 treatment increased CREB phosphorylation. Thus IGF-I is
 327 able to induce CREB activity. However, when ceramide and
 328 IGF-I were applied in tandem, CREB phosphorylation
 329 decreased to the same level as the one after ceramide
 330 treatment alone. We also performed a more detailed kinetic
 331 analysis of P-CREB during ceramide and ceramide+IGF-I
 332 treatments, but there was no difference in the level of CREB
 333 phosphorylation at any time between both treatments (data
 334 not shown). Furthermore, we performed a P-CREB analysis
 335 after 1 h of the same different treatments as presented in Fig.
 336 3A, and we got the exact same results as the one shown in
 337 Fig. 3A (data not shown).
 338

Immunocytochemical detection of P-CREB confirmed
 339 these results (Figs. 3B–I). A basal level of P-CREB
 340 immunoreactivity was found in the nuclei of control cells
 341 (Figs. 3B and J), whereas after 7 h of c_2 -ceramide (40 μ M)
 342 treatment, P-CREB immunoreactivity was distinctly de-
 343 creased (Figs. 3C and J). After IGF-I treatment, P-CREB
 344 immunoreactivity was increased (Figs. 3D and J), whereas
 345 ceramide+IGF-I treatment (Figs. 3E and J) decreased
 346



347 immunoreactivity to the level of ceramide treated cells.
 348 Thus, CREB phosphorylation is not involved in the IGF-I
 349 protection against ceramide-induced neuronal apoptosis.

350 3.4. The PI-3K/Akt pathway is involved in IGF-I-induced
 351 phosphorylation of CREB

352 To test if the PI-3K/Akt pathway is involved in CREB
 353 phosphorylation, we performed Western blot analyses of
 354 cellular extracts treated with ceramide, IGF-I and/or
 355 LY294002 during 7 h (Fig. 3A). These experiments revealed
 356 that LY294002 treatment alone, or in tandem with ceramide,
 357 had no effect on CREB phosphorylation. We also showed
 358 that LY294002 inhibited IGF-I induced-phosphorylation of
 359 CREB (compare IGF to IGF+LY treatments in Fig. 3A), but
 360 did not further decrease CREB phosphorylation after
 361 cer+IGF+LY treatment, compared to cer+IGF-I treatment.
 362 In conclusion, PI-3K is involved in IGF-induced phosphor-
 363 ylation of CREB but PI-3K inhibition is not involved in the
 364 basal phosphorylation of CREB, nor in CREB phosphory-
 365 lation decrease induced by ceramide.

366 3.5. The ERK pathway is involved in IGF-I-induced
 367 phosphorylation of CREB and in IGF-I-mediated protection
 368 of cortical neurons

369 To investigate how ceramide antagonizes the stimulatory
 370 actions of IGF-I on CREB, we performed Western blot
 371 analyses of cellular extracts treated with IGF-I, c_2 -ceramide
 372 and/or the ERK pathway inhibitor, U0126, during 7 h. We
 373 showed that IGF-I increases CREB phosphorylation (Figs.
 374 3A, J and K), and that U0126 treatment decreases CREB
 375 phosphorylation, even in the presence of IGF-I (Fig. 3K).
 376 We also showed that IGF-I-induced ERK phosphorylation is
 377 abolished by U0126. In addition, we showed that ceramide
 378 or U0126, with or without IGF-I, induces a decrease in P-
 379 CREB phosphorylation (Figs. 3A and K). In conclusion, the
 380 ERK pathway is involved in the basal and in IGF-I-induced
 381 phosphorylation of CREB.

382 To see if the ERK pathway is also involved in the
 383 survival of cortical neurons, we performed survival experi-
 384 ments after treatment with IGF-I, c_2 -ceramide and/or the
 385 ERK pathway inhibitor, U0126, during 24 h. As we have
 386 already shown [60], inhibition of the ERK pathway does not

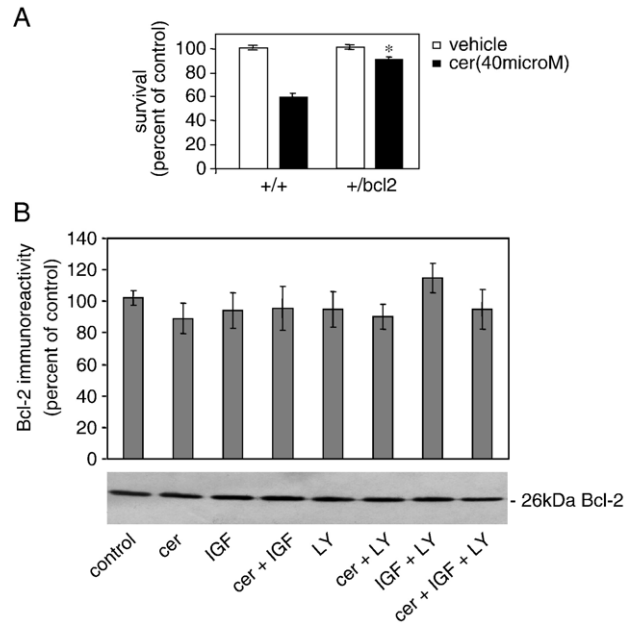


Fig. 4. (A) Survival after 24 h of c_2 -ceramide (40 μ M) treatment of cortical neurons from mice overexpressing *Bcl-2* and wild-type littermate. Survival was assessed counting viable cells with intact nuclei after Hoechst labeling. Data represent mean \pm SEM, $n = 13$ independent experiments, $*P < 0.05$ compared with wild-type (+/+) value, according to the Student's *t* test. (B) Immunoblot analysis of Bcl-2 in extracts of 7-h treated cortical neurons as indicated. Quantification of Bcl-2 immunoreactivity during c_2 -ceramide (40 μ M), IGF-I (10 ng/mL) and/or LY294002 (50 μ M) treatment. Data represent mean \pm SEM, $n = 5$ independent experiments. $P > 0.05$ compared with the control value, according to the one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.

387 affect neuronal survival in control conditions, nor does it
 388 affect ceramide-induced apoptosis (Fig. 3L). We showed
 389 here that U0126 abolishes IGF-I-mediated protection
 390 against ceramide-induced apoptosis (compare cer+IGF and
 391 cer+IGF+U0126 in Fig. 3L). Thus, the ERK pathway is
 392 involved in IGF-I-mediated protection of cortical neurons
 393 against ceramide-induced apoptosis.

394 3.6. *Bcl-2* is not involved in cortical neurons protection
 395 against ceramide-induced apoptosis

396 As the transcription factor CREB may regulate *bcl-2*
 397 gene, we examined the effect of Bcl-2 on ceramide-induced
 398 apoptosis in primary cortical neurons from transgenic mice

Fig. 3. (A) Immunoblot analysis of P-CREB in extracts of 7-h treated cortical neurons as indicated. Quantification of P-CREB immunoreactivity during c_2 -ceramide (40 μ M), IGF-I (10 ng/mL) and/or LY294002 (50 μ M) treatments. P-CREB signals were normalized to the corresponding total CREB signal (data not shown). Data represent mean \pm SEM, $n = 8$ independent experiments. $*P < 0.05$ compared with the control value, according to the one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. (B–I) C_2 -ceramide induces a decrease of P-CREB in the nuclei of cultured cortical neurons. Neurons immunostained for P-CREB (red; B–E) and nuclear labeled by Hoechst (blue, F–I) in cortical cultures. Neurons control (B, F), treated with c_2 -ceramide (40 μ M; C, E, G, I) or treated with IGF-I (10 ng/mL; D, E, H, I) during 7 h. White arrows: examples of P-CREB positive cells. Scale bar: 20 μ M. (J) Quantification of P-CREB positive cells from Figs. 4B–I immunocytochemistry experiments. Data represent mean \pm SEM, $n = 3$ independent experiments. $*P < 0.05$ compared with the control value, according to the one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. (K) Immunoblot analysis of P-CREB, total CREB, P-ERK and total ERK in extracts of 7-h IGF-I (10 ng/mL), c_2 -ceramide (40 μ M) and/or ERK pathway inhibitor U0126 (10 μ M)-treated cortical neurons. (L) IGF-I protection involves the ERK pathway. Survival measures were obtained after 24 h of U0126 (10 μ M), IGF-I (10 ng/mL), IGF-I (10 ng/mL) and/or c_2 -ceramide (40 μ M) treatment. Survival was assessed by counting viable cells after treatment with bisbenzimidazole. Data represent mean \pm SEM, $n = 15$ from 3 independent wells. $*P < 0.05$ compared with the c_2 -ceramide value, according to the one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

399 expressing human *bcl-2* and their wild-type littermate. After
400 a 5-day maturation period in vitro, cultures were treated
401 with c_2 -ceramide (40 μ M) and assayed for cell viability 24
402 h after treatment by counting cells with normal nuclei
403 labeled with bisbenzimidazole (Fig. 4A). Our results show that
404 *bcl-2* overexpression inhibited ceramide-induced apoptosis
405 and protected cortical neurons: 91% *bcl-2* overexpressing
406 neurons survived compared to 59% of the wild type. Thus,
407 Bcl-2 protects cortical neurons against ceramide-induced
408 apoptosis. The same cellular extracts as in Fig. 3A were
409 submitted to Bcl-2 detection by Western blot (Fig. 4B). We
410 showed that Bcl-2 protein level was not modulated by
411 ceramide, IGF-I, or LY294002. In all conditions tested, the
412 Bcl-2 protein level was comparable to the one of the control.
413 We also performed a more detailed kinetic analysis of Bcl-2
414 during ceramide and ceramide+IGF treatments. As a result,
415 we did not see any difference in the level of Bcl-2 protein at
416 longer time points between both treatments (data not
417 shown). Furthermore, we performed Bcl-2 analysis after 1
418 h of the same different treatments as presented in Fig. 4B,
419 and we got the exact same results as the one shown in Fig.
420 4B (data not shown). Thus, although overexpression of Bcl-
421 2 protects cortical neurons against ceramide-induced apo-
422 ptosis, there is no modulation of Bcl-2 protein level in IGF
423 protection against ceramide-induced apoptosis.

424 4. Discussion

425 The objective of this study was to investigate the effects
426 of IGF-I on ceramide-induced neuronal apoptosis, and the
427 possible link between this molecule and the PI-3K/Akt/
428 CREB/Bcl-2 pathway in cortical neurons.

429 We showed for the first time that IGF-I protects cortical
430 neurons from ceramide-induced apoptosis. IGF-I protection
431 from ceramide has previously been shown in non-neuronal
432 cells [30,36]. IGF-I has been also shown to protect
433 hippocampal neurons from β -amyloid peptide toxicity
434 [16], dorsal root ganglion neurons from Nerve Growth
435 Factor withdrawal [59] and cortical neurons from hypoxia
436 [58].

437 Pugazhenthil and his coworkers have proposed a link
438 between IGF-I and the PI-3K/Akt/CREB/Bcl-2 pathway
439 [48,49]. To test this hypothesis in cortical neurons, we
440 analyzed Akt phosphorylation during ceramide treatment
441 with or without IGF-I and PI-3K inhibitor. Using these
442 different treatments, we have shown that when survival
443 level was similar to the control value, Akt was phosphor-
444 ylated, whereas when survival was low, Akt phosphoryla-
445 tion level was also low or undetectable. Thus, Akt seems to
446 be a key enzyme for cortical neurons survival. A minimal
447 activation of the PI-3K pathway is required for the survival
448 of neurons; indeed, the levels of neuronal survival are in
449 agreement with the immunoblotting raised against phospho-
450 Akt (taken as a test of PI-3K activity) in the control situation
451 and after treatment by LY alone: when PI-3K pathway is

452 inhibited, the neuronal survival is decreased. The inhibition
453 of Akt by ceramide may be mediated by several processes.
454 Ceramide may decrease Akt phosphorylation by inhibiting
455 PI-3K or PDK2, kinases upstream of Akt. This might be the
456 case in our model, since (i) Akt has a low undetectable level
457 of phosphorylation during ceramide treatment with or
458 without LY294002; and (ii) IGF-I-induced phosphorylation
459 of Akt has been shown to involve PI-3K and PDK2
460 [14,25,43,46]. However the intermediates between ceramide
461 and PI-3K or PDK2 have not been identified yet. We cannot
462 exclude other mechanisms for ceramide-decreasing Akt
463 phosphorylation, such as dephosphorylation of Akt by a
464 Protein Phosphatase-2A-like phosphatase (PP2A), Ceramide
465 Activated Protein Phosphatase (CAPP) [51] or PKC ζ [5].

466 Since IGF-I and Akt promote neuronal survival, we
467 examined a possible downstream effector, the transcription
468 factor CREB. In accordance with previous results on non-
469 neuronal cells [47,49], we have shown for the first time in
470 neurons, that IGF-I induced CREB phosphorylation via PI-
471 3K and ERK. However, our data demonstrate that CREB
472 and Akt phosphorylations are not coupled, and that the
473 neuronal survival is independent of CREB. Indeed, during
474 ceramide and IGF-I treatment, neurons are protected, Akt
475 phosphorylation increased but CREB phosphorylation
476 decreased. Moreover, our experiments revealed that ERK
477 is involved in the basal and in the IGF-I-induced phosphor-
478 ylation of CREB. We also showed that IGF-I-mediated
479 protection against ceramide-induced apoptosis involves the
480 ERK pathway but not CREB. Thus, CREB is not linked to
481 neuronal survival.

482 Our data showed that cortical neurons overexpressing
483 Bcl-2 were protected from ceramide-induced apoptosis. A
484 protective role of Bcl-2 from ceramide-induced apoptosis
485 has previously been observed in two neuronal cell lines
486 [19,63] probably by blocking the release of cytochrome *c*
487 from the mitochondria into the cytosol [27,62]. However,
488 immunoblotting experiments of Bcl-2 showed that Bcl-2
489 expression was not modulated during IGF-I, ceramide or
490 LY294002 treatments. In consequence, Bcl-2 is not
491 involved in IGF-I mediated protection. From this experi-
492 ment we can conclude, that Akt does not act via CREB or
493 Bcl-2 to protect neurons against ceramide-induced apopto-
494 sis. Akt may act on other proteins such as the transcription
495 factor Forkhead or cytoplasmic proteins Bad, caspase-9 or
496 κ B Kinase (for review see [6,8,11]). Moreover, a recent
497 study shows that ceramide may act on Bad and Forkhead
498 during neuronal apoptosis [55].

499 To summarize our results, in control conditions, the PI-
500 3K/Akt pathway is involved in the survival of cortical
501 neurons and the ERK pathway is involved in CREB
502 phosphorylation. When neurons are treated with IGF-I, the
503 ERK and PI-3K/Akt pathways are involved in CREB
504 phosphorylation. When ceramide induces neuronal apopto-
505 sis, the ERK and PI-3K/Akt pathways, as well as CREB, are
506 inhibited. We demonstrate for the first time that IGF-I
507 protects neurons against ceramide-induced neuronal apopto-

508 sis and that this protection involves the ERK and PI-3K/Akt
509 pathways, but may be independent of CREB and Bcl-2.

510 Acknowledgments

511 We are grateful to C. Jarvis for critical review of the
512 manuscript. This work was partially supported by grants
513 from the French Association pour la Recherche sur le
514 Cancer (to S.W.M.), France Alzheimer (to N.A.), and
515 European Community (TMR Neuril FMRX CT97-0149
516 and Biomed Cybrainet BMH4 CT97-2492 to J.M.).

517 References

- 518
- 519 [1] D.R. Alessi, M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P.
520 Cohen, B.A. Hemmings, Mechanism of activation of protein kinase B
521 by insulin and IGF-1, *Embo J.* 15 (1996) 6541–6551.
- 522 [2] D.R. Alessi, S.R. James, C.P. Downes, A.B. Holmes, P.R. Gaffney,
523 C.B. Reese, P. Cohen, Characterization of a 3-phosphoinositide-
524 dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein
525 kinase Balph α , *Curr. Biol.* 7 (1997) 261–269.
- 526 [3] F.P. Altman, Tetrazolium salts and formazans, *Prog. Histochem.*
527 *Cytochem.* 9 (1976) 1–56.
- 528 [4] A. Bielawska, H.M. Crane, D. Liotta, L.M. Obeid, Y.A. Hannun,
529 Selectivity of ceramide-mediated biology. Lack of activity of erythro-
530 dihydroceramide, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 26226–26232.
- 531 [5] N.A. Bourbon, L. Sandirasegarane, M. Kester, Ceramide-induced
532 inhibition of Akt is mediated through protein kinase Czeta: implica-
533 tions for growth arrest, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 3286–3292.
- 534 [6] D.P. Brazil, B.A. Hemmings, Ten years of protein kinase B signalling:
535 a hard Akt to follow, *Trends Biochem. Sci.* 26 (2001) 657–664.
- 536 [7] B. Brugg, P.P. Michel, Y. Agid, M. Ruberg, Ceramide induces
537 apoptosis in cultured mesencephalic neurons, *J. Neurochem.* 66
538 (1996) 733–739.
- 539 [8] A. Brunet, S.R. Datta, M.E. Greenberg, Transcription-dependent and -
540 independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling
541 pathway, *Curr. Opin. Neurobiol.* 11 (2001) 297–305.
- 542 [9] M.H. Cardone, N. Roy, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, T.F. Franke, E.
543 Stanbridge, S. Frisch, J.C. Reed, Regulation of cell death protease
544 caspase-9 by phosphorylation, *Science* 282 (1998) 1318–1321.
- 545 [10] S.R. Datta, H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, M.E.
546 Greenberg, Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to
547 the cell-intrinsic death machinery, *Cell* 91 (1997) 231–241.
- 548 [11] S.R. Datta, A. Brunet, M.E. Greenberg, Cellular survival: a play in
549 three Akts, *Genes Dev.* 13 (1999) 2905–2927.
- 550 [12] W.H. Daughaday, A. Solomon, Berson 1918–1972, *Trans. Assoc.*
551 *Am. Physicians* 85 (1972) 9–10.
- 552 [13] S.P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen, Specificity and
553 mechanism of action of some commonly used protein kinase
554 inhibitors, *Biochem. J.* 351 (2000) 95–105.
- 555 [14] P. De Meys, B. Wallach, C.T. Christoffersen, B. Urso, K. Gronskov,
556 L.J. Latus, F. Yakushiji, M.M. Ilondo, R.M. Shymko, The insulin-like
557 growth factor-I receptor. Structure, ligand-binding mechanism and
558 signal transduction, *Horm. Res.* 42 (1994) 152–169.
- 559 [15] L. del Peso, M. Gonzalez-Garcia, C. Page, R. Herrera, G. Nunez,
560 Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein
561 kinase Akt, *Science* 278 (1997) 687–689.
- 562 [16] S. Dore, S. Kar, R. Quirion, Insulin-like growth factor I protects and
563 rescues hippocampal neurons against beta-amyloid- and human
564 amylin-induced toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997)
565 4772–4777.
- 566 [17] M. Dubois-Dauphin, H. Frankowski, Y. Tsujimoto, J. Huarte, J.C.
Martinou, Neonatal motoneurons overexpressing the bcl-2 protoonco-
gene in transgenic mice are protected from axotomy-induced cell
death, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 3309–3313.
- [18] H. Dudek, S.R. Datta, T.F. Franke, M.J. Birnbaum, R. Yao, G.M.
Cooper, R.A. Segal, D.R. Kaplan, M.E. Greenberg, Regulation of
neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt [see
comments], *Science* 275 (1997) 661–665.
- [19] C. Esdar, S. Milasta, A. Maelicke, T. Herget, Differentiation-
associated apoptosis of neural stem cells is effected by Bcl-2
overexpression: impact on cell lineage determination, *Eur. J. Cell*
Biol. 80 (2001) 539–553.
- [20] V. France-Lanord, B. Brugg, P.P. Michel, Y. Agid, M. Ruberg,
Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a
putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease,
J. Neurochem. 69 (1997) 1612–1621.
- [21] T.F. Franke, S.I. Yang, T.O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D.K.
Morrison, D.R. Kaplan, P.N. Tsichlis, The protein kinase encoded by
the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphati-
dylinositol 3-kinase, *Cell* 81 (1995) 727–736.
- [22] J. Guan, C. Williams, M. Gunning, C. Mallard, P. Gluckman, The
effects of IGF-1 treatment after hypoxic-ischemic brain injury in
adult rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13 (1993) 609–616.
- [23] Y.A. Hannun, Functions of ceramide in coordinating cellular responses
to stress, *Science* 274 (1996) 1855–1859.
- [24] P.J. Hartfield, G.C. Mayne, A.W. Murray, Ceramide induces apoptosis
in PC12 cells, *FEBS Lett.* 401 (1997) 148–152.
- [25] R. Kapeller, L.C. Cantley, Phosphatidylinositol 3-kinase, *Bioessays* 16
(1994) 565–576.
- [26] J.C. Kawamoto, J.N. Barrett, Cryopreservation of primary neurons for
tissue culture, *Brain Res.* 384 (1986) 84–93.
- [27] R.M. Kluck, E. Bossy-Wetzler, D.R. Green, D.D. Newmeyer, The
release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2
regulation of apoptosis, *Science* 275 (1997) 1132–1136.
- [28] B. Knusel, P.P. Michel, J.S. Schwaber, F. Hefti, Selective and
nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic
development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth
factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth
factors I and II, *J. Neurosci.* 10 (1990) 558–570.
- [29] R. Kolesnick, D.W. Golde, The sphingomyelin pathway in tumor
necrosis factor and interleukin-1 signaling, *Cell* 77 (1994) 325–328.
- [30] T. Kondo, T. Kitano, K. Iwai, M. Watanabe, Y. Taguchi, T. Yabu, H.
Umehara, N. Domae, T. Uchiyama, T. Okazaki, Control of ceramide-
induced apoptosis by IGF-1: involvement of PI-3 kinase, caspase-3
and catalase, *Cell Death Differ.* 9 (2002) 682–692.
- [31] S. Kumari, X. Liu, T. Nguyen, X. Zhang, S.R. D'Mello, Distinct
phosphorylation patterns underlie Akt activation by different survival
factors in neurons, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 96 (2001) 157–162.
- [32] N. Lambeng, P.P. Michel, B. Brugg, Y. Agid, M. Ruberg, Mechanisms
of apoptosis in PC12 cells irreversibly differentiated with nerve
growth factor and cyclic AMP, *Brain Res.* 821 (1999) 60–68.
- [33] G.M. Leininger, C. Backus, M.D. Uhler, S.I. Lentz, E.L. Feldman,
Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt effectors mediate insulin-like
growth factor-I neuroprotection in dorsal root ganglia neurons, *FASEB*
J. 18 (13) (2004) 1544–1546.
- [34] M.E. Lewis, N.T. Neff, P.C. Contreras, D.B. Stong, R.W. Oppen-
heim, P.E. Grebow, J.L. Vaught, Insulin-like growth factor-I:
potential for treatment of motor neuronal disorders, *Exp. Neurol.*
124 (1993) 73–88.
- [35] L. Li, R.W. Oppenheim, M. Lei, L.J. Houenou, Neurotrophic agents
prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the
neonatal mouse, *J. Neurobiol.* 25 (1994) 759–766.
- [36] L.A. Maile, Z.P. Gill, C.M. Perks, J.M. Holly, The role of cell surface
attachment and proteolysis in the insulin-like growth factor (IGF)-
independent effects of IGF-binding protein-3 on apoptosis in breast
epithelial cells, *Endocrinology* 140 (1999) 4040–4045.
- [37] J.C. Martinou, M. Dubois-Dauphin, J.K. Staple, I. Rodriguez, H.
Frankowski, M. Missotten, P. Albertini, D. Talabot, S. Catsicas, C.

- 634 Pietra, J. Huarte, Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects
635 neurons from naturally occurring cell death and experimental
636 ischemia, *Neuron* 13 (1994) 1017–1030.
- 637 [38] S. Mathias, L.A. Pena, R.N. Kolesnick, Signal transduction of stress
638 via ceramide, *Biochem. J.* 335 (1998) 465–480.
- 639 [39] T.M. Miller, M.G. Tansey, E.M. Johnson Jr., D.J. Creedon, Inhibition
640 of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and
641 insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule
642 cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 9847–9853.
- 643 [40] J. Mitoma, M. Ito, S. Furuya, Y. Hirabayashi, Bipotential roles of
644 ceramide in the growth of hippocampal neurons: promotion of cell
645 survival and dendritic outgrowth in dose- and developmental stage-
646 dependent manners, *J. Neurosci. Res.* 51 (1998) 712–722.
- 647 [41] M. Nakane, M. Kubota, T. Nakagomi, A. Tamura, H. Hisaki, H.
648 Shimasaki, N. Ueta, Lethal forebrain ischemia stimulates sphingo-
649 myelin hydrolysis and ceramide generation in the gerbil hippocampus,
650 *Neurosci. Lett.* 296 (2000) 89–92.
- 651 [42] N.T. Neff, D. Prevette, L.J. Houenou, M.E. Lewis, M.A. Glicksman,
652 Q.W. Yin, R.W. Oppenheim, Insulin-like growth factors: putative
653 muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival,
654 *J. Neurobiol.* 24 (1993) 1578–1588.
- 655 [43] E. Nishida, Y. Gotoh, The MAP kinase cascade is essential for
656 diverse signal transduction pathways, *Trends Biochem. Sci.* 18
657 (1993) 128–131.
- 658 [44] G. Nunez, L. del Peso, Linking extracellular survival signals and the
659 apoptotic machinery, *Curr. Opin. Neurobiol.* 8 (1998) 613–618.
- 660 [45] L.M. Obeid, C.M. Linardic, L.A. Karolak, Y.A. Hannun, Programmed
661 cell death induced by ceramide, *Science* 259 (1993) 1769–1771.
- 662 [46] S.L. Pelech, J.S. Sanghera, Mitogen-activated protein kinases:
663 versatile transducers for cell signaling, *Trends Biochem. Sci.* 17
664 (1992) 233–238.
- 665 [47] S. Pugazhenth, T. Boras, D. O'Connor, M.K. Meintzer, K.A.
666 Heidenreich, J.E. Reusch, Insulin-like growth factor I-mediated
667 activation of the transcription factor cAMP response element-binding
668 protein in PC12 cells. Involvement of p38 mitogen-activated protein
669 kinase-mediated pathway, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 2829–2837.
- 670 [48] S. Pugazhenth, E. Miller, C. Sable, P. Young, K.A. Heidenreich, L.M.
671 Boxer, J.E. Reusch, Insulin-like growth factor-I induces bcl-2
672 promoter through the transcription factor cAMP-response element-
673 binding protein, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27529–27535.
- 674 [49] S. Pugazhenth, A. Nesterova, C. Sable, K.A. Heidenreich, L.M.
675 Boxer, L.E. Heasley, J.E. Reusch, Akt/protein kinase B up-regulates
676 Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein,
677 *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 10761–10766.
- 678 [50] J.W. Russell, A.J. Windebank, A. Schenone, E.L. Feldman, Insulin-
679 like growth factor-I prevents apoptosis in neurons after nerve growth
680 factor withdrawal, *J. Neurobiol.* 36 (1998) 455–467.
- 681 [51] M. Salinas, R. Lopez-Valdalisio, D. Martin, A. Alvarez, A. Cuadrado,
682 Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of
683 ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells, *Mol. Cell
684 Neurosci.* 15 (2000) 156–169.
- 685 [52] K.M. Schubert, M.P. Scheid, V. Duronio, Ceramide inhibits protein
686 kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473, *J. Biol.
687 Chem.* 275 (2000) 13330–13335.
- 688 [53] T.F. Slater, B. Sawyer, U. Sträuli, Studies on succinate-tetrazolium
689 reductase systems, *Biochim. Biophys. Acta* 77 (1963) 383–393.
- 690 [54] M.W. Spence, J.K. Burgess, Acid and neutral sphingomyelinases of rat
691 brain. Activity in developing brain and regional distribution in adult
692 brain, *J. Neurochem.* 30 (1978) 917–919.
- 693 [55] B.A. Stoica, V.A. Movsesyan, P.M.T. Lea, A.I. Faden, Ceramide-
694 induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of
695 Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and induction of the mitochondrial-
696 dependent intrinsic caspase pathway, *Mol. Cell Neurosci.* 22 (2003)
697 365–382.
- 698 [56] M. Tagami, K. Ikeda, Y. Nara, H. Fujino, A. Kubota, F. Numano, Y.
699 Yamori, Insulin-like growth factor-1 attenuates apoptosis in hippo-
700 campal neurons caused by cerebral ischemia and reperfusion in
701 stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Lab. Invest.* 76 (1997)
702 613–617.
- 703 [57] M. Tagami, K. Yamagata, Y. Nara, H. Fujino, A. Kubota, F. Numano,
704 Y. Yamori, Insulin-like growth factors prevent apoptosis in cortical
705 neurons isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats,
706 *Lab. Invest.* 76 (1997) 603–612.
- 707 [58] M. Tamatani, S. Ogawa, M. Tohyama, Roles of Bcl-2 and caspases in
708 hypoxia-induced neuronal cell death: a possible neuroprotective
709 mechanism of peptide growth factors, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 58
710 (1998) 27–39.
- 711 [59] R.S. Westphal, K.A. Anderson, A.R. Means, B.E. Wadzinski, A
712 signaling complex of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase IV
713 and protein phosphatase 2A, *Science* 280 (1998) 1258–1261.
- 714 [60] S. Willaime, P. Vanhoutte, J. Caboche, Y. Lemaigre-Dubreuil, J.
715 Mariani, B. Brugg, Ceramide-induced apoptosis in cortical neurons
716 is mediated by an increase in p38 phosphorylation and not by the
717 decrease in ERK phosphorylation, *Eur. J. Neurosci.* 13 (2001)
718 2037–2046.
- 719 [61] S. Willaime-Morawek, K. Brami-Cherrier, J. Mariani, J. Caboche, B.
720 Brugg, C-jun N-terminal kinases/c-Jun and p38 pathways cooperate
721 in ceramide-induced neuronal apoptosis, *Neuroscience* 119 (2003)
722 387–397.
- 723 [62] J. Yang, X. Liu, K. Bhalla, C.N. Kim, A.M. Ibrado, J. Cai, T.I.
724 Peng, D.P. Jones, X. Wang, Prevention of apoptosis by Bcl-2:
725 release of cytochrome *c* from mitochondria blocked, *Science* 275
726 (1997) 1129–1132.
- 727 [63] H. Zhou, X.M. Li, J. Meinkoth, R.N. Pittman, Akt regulates cell
728 survival and apoptosis at a postmitochondrial level, *J. Cell Biol.* 151
729 (2000) 483–494.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- A -

Acheson A., Conover J.C., Fandl J.P., Dechiara T.M., Russell M., Thadani A., Squinto S.P., Yancopoulos G.D. and Lindsay R.M. (1995).

"A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death." *Nature*, 374: 6521-450-3

Acquati F., Accarino M., Nucci C., Fumagalli P., Jovine L., Ottolenghi S. and Taramelli R. (2000).

"The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region." *FEBS Lett*, 468: 1 59-64

Afagh A., Cummings B.J., Cribbs D.H., Cotman C.W. and Tenner A.J. (1996).

"Localization and cell association of C1q in Alzheimer's disease brain." *Exp Neurol*, 138: 1 22-32

Akiyama H., Arai T., Kondo H., Tanno E., Haga C. and Ikeda K. (2000).

"Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain." *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 14 Suppl 1: S47-53

Alexander J.E., Hunt D.F., Lee M.K., Shabanowitz J., Michel H., Berlin S.C., Macdonald T.L., Sundberg R.J., Rebhun L.I. and Frankfurter A. (1991).

"Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 11 4685-9

Alzheimer A. (1907).

"Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allg Zeitschr Psychiatr*, 64: 146-8

Alzheimer A., Stelzmann R.A., Schnitzlein H.N. and Murtagh F.R. (1995).

"An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"." *Clin Anat*, 8: 6 429-31

Amos L.A. (1995).

"The microtubule lattice--20 years on." *Trends Cell Biol*, 5: 2 48-51

Anaes. (2001).

"Practice guideline for the diagnosis of Alzheimer's disease." *Presse Med.*, 24: 30(11) 537-9

Ancolio K., Dumanchin C., Barelli H., Warter J.M., Brice A., Campion D., Frebourg T. and Checler F. (1999).

"Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 7 4119-24

Andersen P., Sundberg S.H., Svein O. and Wigstrom H. (1977).

"Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices." *Nature*, 266: 5604 736-7

Antonsson B., Kassel D.B., Di Paolo G., Lutjens R., Riederer B.M. and Grenningloh G. (1998).

"Identification of in vitro phosphorylation sites in the growth cone protein SCG10. Effect Of phosphorylation site mutants on microtubule-destabilizing activity." *J Biol Chem*, 273: 14 8439-46

Antonsson B., Lutjens R., Di Paolo G., Kassel D., Allet B., Bernard A., Catsicas S. and Grenningloh G. (1997).

"Purification, characterization, and in vitro phosphorylation of the neuron-specific membrane-associated protein SCG10." *Protein Expr Purif*, 9: 3 363-71

Araki W., Kitaguchi N., Tokushima Y., Ishii K., Aratake H., Shimohama S., Nakamura S. and Kimura J. (1991).

"Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture." *Biochem Biophys Res Commun*, 181: 1 265-71

Arispe N., Pollard H.B. and Rojas E. (1993a).

"Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 22 10573-7

Arispe N., Pollard H.B. and Rojas E. (1996).

"Zn²⁺ interaction with Alzheimer amyloid beta protein calcium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 4 1710-5

Arispe N., Rojas E. and Pollard H.B. (1993b).

"Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 2 567-71

Armogida M., Petit A., Vincent B., Scarzello S., Da Costa C.A. and Checler F. (2001).

"Endogenous beta-amyloid production in presenilin-deficient embryonic mouse fibroblasts." *Nat Cell Biol*, 3: 11 1030-3

Arnold C.S., Johnson G.V., Cole R.N., Dong D.L., Lee M. and Hart G.W. (1996).

"The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine." *J Biol Chem*, 271: 46 28741-4

Asai D.J. and Koonce M.P. (2001).

"The dynein heavy chain: structure, mechanics and evolution." *Trends Cell Biol*, 11: 5 196-202

Audebert S., Desbruyeres E., Gruszczynski C., Koulakoff A., Gros F., Denoulet P. and Eddé B. (1993).

"Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons." *Mol Biol Cell*, 4: 6 615-26

Audebert S., Koulakoff A., Berwald-Netter Y., Gros F., Denoulet P. and Eddé B. (1994).

"Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons." *J Cell Sci*, 107 (Pt 8): 2313-22

-B -

Barbar E., Kleinman B., Imhoff D., Li M., Hays T.S. and Hare M. (2001).

"Dimerization and folding of LC8, a highly conserved light chain of cytoplasmic dynein." *Biochemistry*, 40: 6 1596-605

Barger S.W. and Harmon A.D. (1997).

"Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E." *Nature*, 388: 6645 878-81

Barger S.W., Horster D., Furukawa K., Goodman Y., Kriegstein J. and Mattson M.P. (1995).

"Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 20 9328-32

Barnham K.J., Haeffner F., Ciccotosto G.D., Curtain C.C., Tew D., Mavros C., Beyreuther K., Carrington D., Masters C.L., Cherny R.A., Cappai R. and Bush A.I. (2004).

"Tyrosine gated electron transfer is key to the toxic mechanism of Alzheimer's disease beta-amyloid." *Faseb J*, 18: 12 1427-9

Barra H.S., Arce C.A. and Argaraña C.E. (1988).

"Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin." *Mol. Neurobiol.*, 2: 133-53

Bartolini F., Tian G., Piehl M., Cassimeris L., Lewis S.A. and Cowan N.J. (2005).

"Identification of a novel tubulin-destabilizing protein related to the chaperone cofactor E." *J Cell Sci*, 118: Pt 6 1197-207

Bashir Z.I., Bortolotto Z.A., Davies C.H., Berretta N., Irving A.J., Seal A.J., Henley J.M., Jane D.E., Watkins J.C. and Collingridge G.L. (1993).

"Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors." *Nature*, 363: 6427 347-50

Baskin D.S., Browning J.L., Pirozzolo F.J., Korporaal S., Baskin J.A. and Appel S.H. (1999).

"Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease." *Arch Neurol*, 56: 9 1121-3

Bauer J., Strauss S., Schreiter-Gasser U., Ganter U., Schlegel P., Witt I., Volk B. and Berger M. (1991).

"Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices." *FEBS Lett*, 285: 1 111-4

Baulac S., Lavoie M.J., Kimberly W.T., Strahle J., Wolfe M.S., Selkoe D.J. and Xia W. (2003).

"Functional gamma-secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma-secretase substrates." *Neurobiol Dis*, 14: 2 194-204

Bear M.F. and Abraham W.C. (1996).

"Long-term depression in hippocampus." *Annu Rev Neurosci*, 19: 437-62

Behl C. (1999).

"Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches." *Prog Neurobiol*, 57: 3 301-23

Beilharz E.J., Zhukovsky E., Lanahan A.A., Worley P.F., Nikolich K. and Goodman L.J. (1998).

"Neuronal activity induction of the stathmin-like gene RB3 in the rat hippocampus: possible role in neuronal plasticity." *J Neurosci*, 18: 23 9780-9

Belmont L.D. and Mitchison T.J. (1996).

"Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules." *Cell*, 84: 4 623-31

Beretta L., Dobransky T. and Sobel A. (1993).

"Multiple phosphorylation of stathmin. Identification of four sites phosphorylated in intact cells and in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase and p34cdc2." *J Biol Chem*, 268: 27 20076-84

Bianca V.D., Dusi S., Bianchini E., Dal Pra I. and Rossi F. (1999).

"beta-amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease." *J Biol Chem*, 274: 22 15493-9

Bieche I., Manceau V., Curmi P.A., Laurendeau I., Lachkar S., Leroy K., Vidaud D., Sobel A. and Maucuer A. (2003).

"Quantitative RT-PCR reveals a ubiquitous but preferentially neural expression of the KIS gene in rat and human." *Brain Res Mol Brain Res*, 114: 1 55-64

Black R.A., Rauch C.T., Kozlosky C.J., Peschon J.J., Slack J.L., Wolfson M.F., Castner B.J., Stocking K.L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K.A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J.N., Johnson R.S., Paxton R.J., March C.J. and Cerretti D.P. (1997).

"A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." *Nature*, 385: 6618 729-33

Blennow K. and Hampel H. (2003).

"CSF markers for incipient Alzheimer's disease." *Lancet Neurol*, 2: 10 605-13

Bliss T.V. and Gardner-Medwin A.R. (1973).

"Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J Physiol*, 232: 2 357-74

Bliss T.V. and Lomo T. (1973).

"Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J Physiol*, 232: 2 331-56

Bobinnec Y., Moudjou M., Fouquet J.P., Desbruyeres E., Eddé B. and Bornens M. (1998).

"Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells." *Cell Motil Cytoskeleton*, 39: 3 223-32

Boland K., Behrens M., Choi D., Manias K. and Perlmutter D.H. (1996).

"The serpin-enzyme complex receptor recognizes soluble, nontoxic amyloid-beta peptide but not aggregated, cytotoxic amyloid-beta peptide." *J Biol Chem*, 271: 30 18032-44

Bonnet C., Boucher D., Lazereg S., Pedrotti B., Islam K., Denoulet P. and Larcher J.C. (2001).

"Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation." *J Biol Chem*, 276: 16 12839-48

Bonnet C., Denarier E., Bosc C., Lazereg S., Denoulet P. and Larcher J.C. (2002).

"Interaction of STOP with neuronal tubulin is independent of polyglutamylation." *Biochem Biophys Res Commun*, 297: 4 787-93

Botchkina G.I., Meistrell M.E., 3rd, Botchkina I.L. and Tracey K.J. (1997).

"Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia." *Mol Med*, 3: 11 765-81

Boucher D., Larcher J.C., Gros F. and Denoulet P. (1994).

"Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin." *Biochemistry*, 33: 41 12471-7

Boustani M., Peterson B., Hanson L., Harris R. and Lohr K.N. (2003).

"Screening for dementia in primary care: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force." *Ann Intern Med*, 138: 11 927-37

Bradt B.M., Kolb W.P. and Cooper N.R. (1998).

"Complement-dependent proinflammatory properties of the Alzheimer's disease beta-peptide." *J Exp Med*, 188: 3 431-8

Bre M.H., De Nechaud B., Wolff A. and Fleury A. (1994).

"Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody GT335." *Cell Motil Cytoskeleton*, 27: 4 337-49

Breder C.D., Tsujimoto M., Terano Y., Scott D.W. and Saper C.B. (1993).

"Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system." *J Comp Neurol*, 337: 4 543-67

Brendza R.P., Serbus L.R., Duffy J.B. and Saxton W.M. (2000).

"A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein." *Science*, 289: 5487 2120-2

Brugg B., Dubreuil Y.L., Huber G., Wollman E.E., Delhay-Bouchaud N. and Mariani J. (1995).

"Inflammatory processes induce beta-amyloid precursor protein changes in mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 7 3032-5

Buée L., Bussiere T., Buee-Scherrer V., Delacourte A. and Hof P.R. (2000).

"Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders." *Brain Res Brain Res Rev*, 33: 1 95-130

Bulinski J.C. and Borisy G.G. (1980).

"Widespread distribution of a 210,000 mol wt microtubule-associated protein in cells and tissues of primates." *J Cell Biol*, 87: 3 Pt 1 802-8

Burkhart C.A., Kavallaris M. and Band Horwitz S. (2001).

"The role of beta-tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs." *Biochim Biophys Acta*, 1471: 2 01-9

Buxbaum J.D., Liu K.N., Luo Y., Slack J.L., Stocking K.L., Peschon J.J., Johnson R.S., Castner B.J., Cerretti D.P. and Black R.A. (1998).

"Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." *J Biol Chem*, 273: 43 27765-7

Buxbaum J.D., Oishi M., Chen H.I., Pinkas-Kramarski R., Jaffe E.A., Gandy S.E. and Greengard P. (1992).

"Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 21 10075-8

- C -

Cacabelos R., Takeda M. and Winblad B. (1999).

"The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease." *Int J Geriatr Psychiatry*, 14: 1 3-47

Cai H., Wang Y., Mccarthy D., Wen H., Borchelt D.R., Price D.L. and Wong P.C. (2001).

"BACE1 is the major beta-secretase for generation of A β peptides by neurons." *Nat Neurosci*, 4: 3 233-4

Caille I., Allinquant B., Dupont E., Bouillot C., Langer A., Muller U. and Prochiantz A. (2004).

"Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone." *Development*, 131: 9 2173-81

Camoletto P., Colesanti A., Ozon S., Sobel A. and Fasolo A. (2001).

"Expression of stathmin and SCG10 proteins in the olfactory neurogenesis during development and after lesion in the adulthood." *Brain Res Bull*, 54: 1 19-28

Campbell A. (2001).

"beta-amyloid: friend or foe." *Med Hypotheses*, 56: 3 388-91

Caplow M. and Fee L. (2002).

"Dissociation of the tubulin dimer is extremely slow, thermodynamically very unfavorable, and reversible in the absence of an energy source." *Mol Biol Cell*, 13: 6 2120-31

Carette B., Poulain P. and Delacourte A. (1993).

"Electrophysiological effects of 25-35 amyloid-beta-protein on guinea-pig lateral septal neurons." *Neurosci Lett*, 151: 1 111-4

Caricasole A., Copani A., Caruso A., Caraci F., Iacovelli L., Sortino M.A., Terstappen G.C. and Nicoletti F. (2003).

"The Wnt pathway, cell-cycle activation and beta-amyloid: novel therapeutic strategies in Alzheimer's disease?" *Trends Pharmacol Sci*, 24: 5 233-8

Carlier M.F., Didry D. and Pantaloni D. (1987).

"Microtubule elongation and guanosine 5'-triphosphate hydrolysis. Role of guanine nucleotides in microtubule dynamics." *Biochemistry*, 26: 14 4428-37

Carroll R.C., Beattie E.C., Von Zastrow M. and Malenka R.C. (2001).

"Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci*, 2: 5 315-24

Carroll R.C., Beattie E.C., Xia H., Luscher C., Altschuler Y., Nicoll R.A., Malenka R.C. and Von Zastrow M. (1999).

"Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 24 14112-7

Caudron N., Arnal I., Buhler E., Job D. and Valiron O. (2002).

"Microtubule nucleation from stable tubulin oligomers." *J Biol Chem*, 277: 52 50973-9

Caudron N., Valiron O., Usson Y., Valiron P. and Job D. (2000).

"A reassessment of the factors affecting microtubule assembly and disassembly in vitro." *J Mol Biol*, 297: 1 211-20

Caughey B. and Lansbury P.T. (2003).

"Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders." *Annu Rev Neurosci*, 26: 267-98

Chao C.C., Ala T.A., Hu S., Crossley K.B., Sherman R.E., Peterson P.K. and Frey W.H., 2nd. (1994a).

"Serum cytokine levels in patients with Alzheimer's disease." *Clin Diagn Lab Immunol*, 1: 4 433-6

Chao C.C., Hu S., Frey W.H., 2nd, Ala T.A., Tourtellotte W.W. and Peterson P.K. (1994b).

"Transforming growth factor beta in Alzheimer's disease." *Clin Diagn Lab Immunol*, 1: 1 109-10

Chapman P.F., White G.L., Jones M.W., Cooper-Blacketer D., Marshall V.J., Irizarry M., Younkin L., Good M.A., Bliss T.V., Hyman B.T., Younkin S.G. and Hsiao K.K. (1999).

"Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice." *Nat Neurosci*, 2: 3 271-6

Chartier-Harlin M.C., Crawford F., Houlden H., Warren A., Hughes D., Fidani L., Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J. and Et Al. (1991).

"Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene." *Nature*, 353: 6347 844-6

Checler F. and Vincent B. (2002).

"Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators." *Trends Neurosci*, 25: 12 616-20

Chen Q.S., Kagan B.L., Hirakura Y. and Xie C.W. (2000).

"Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides." *J Neurosci Res*, 60: 1 65-72

Chen Q.S., Wei W.Z., Shimahara T. and Xie C.W. (2002).

"Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus." *Neurobiol Learn Mem*, 77: 3 354-71

Cheon M.S., Fountoulakis M., Cairns N.J., Dierssen M., Herkner K. and Lubec G. (2001).

"Decreased protein levels of stathmin in adult brains with Down syndrome and Alzheimer's disease." *J Neural Transm Suppl*: 61 281-8

Chneiweiss H., Beretta L., Cordier J., Bouterin M.C., Glowinski J. and Sobel A. (1989).

"Stathmin is a major phosphoprotein and cyclic AMP-dependent protein kinase substrate in mouse brain neurons but not in astrocytes in culture: regulation during ontogenesis." *J Neurochem*, 53: 3 856-63

Chrétien D. and Wade R.H. (1991).

"New data on the microtubule surface lattice." *Biol Cell*, 71: 1-2 161-74

Christie B.R., Schexnayder L.K. and Johnston D. (1997).

"Contribution of voltage-gated Ca²⁺ channels to homosynaptic long-term depression in the CA1 region in vitro." *J Neurophysiol*, 77: 3 1651-5

Chung W.J., Kindler S., Seidenbecher C. and Garner C.C. (1996).

"MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2." *J Neurochem*, 66: 3 1273-81

Clarke P.G. (1990).

"Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." *Anat Embryol (Berl)*, 181: 3 195-213

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-beta protein specifically disrupt cognitive function." *Nat Neurosci*, 8: 1 79-84

Cleveland D.W., Joshi H.C. and Murphy D.B. (1990).

"Tubulin site interpretation." *Nature*, 344: 6265 389

Collingridge G.L., Kehl S.J. and McLennan H. (1983).

"Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus." *J Physiol*, 334: 33-46

Colurso G.J., Nilson J.E. and Vervoort L.G. (2003).

"Quantitative assessment of DNA fragmentation and beta-amyloid deposition in insular cortex and midfrontal gyrus from patients with Alzheimer's disease." *Life Sci*, 73: 14 1795-803

Combs C.K., Johnson D.E., Cannady S.B., Lehman T.M. and Landreth G.E. (1999).

"Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins." *J Neurosci*, 19: 3 928-39

Combs C.K., Karlo J.C., Kao S.C. and Landreth G.E. (2001).

"beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis." *J Neurosci*, 21: 4 1179-88

Conway K.A., Harper J.D. and Lansbury P.T. (1998).

"Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease." *Nat Med*, 4: 11 1318-20

Conway K.A., Harper J.D. and Lansbury P.T., Jr. (2000).

"Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid." *Biochemistry*, 39: 10 2552-63

Cooper H.L., Mcduffie E. and Braverman R. (1989).

"Human peripheral lymphocyte growth regulation and response to phorbol esters is linked to synthesis and phosphorylation of the cytosolic protein, prosolin." *J Immunol*, 143: 3 956-63

Coraci I.S., Husemann J., Berman J.W., Hulette C., Dufour J.H., Campanella G.K., Luster A.D., Silverstein S.C. and El-Khoury J.B. (2002).

"CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils." *Am J Pathol*, 160: 1 101-12

Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L. and Pericak-Vance M.A. (1993).

"Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science*, 261: 5123 921-3

Cotman C.W. and Anderson A.J. (1995).

"A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease." *Mol Neurobiol*, 10: 1 19-45

Cowburn R.F., Wiehager B. and Sundstrom E. (1995).

"beta-Amyloid peptides enhance binding of the calcium mobilising second messengers, inositol(1,4,5)trisphosphate and inositol-(1,3,4,5)tetrakisphosphate to their receptor sites in rat cortical membranes." *Neurosci Lett*, 191: 1-2 31-4

Coy D.L. and Howard J. (1994).

"Organelle transport and sorting in axons." *Curr Opin Neurobiol*, 4: 5 662-7

Coyle J.T., Price D.L. and Delong M.R. (1983).

"Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation." *Science*, 219: 4589-4592

Cullen W.K., Suh Y.H., Anwyl R. and Rowan M.J. (1997).

"Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments." *Neuroreport*, 8: 15 3213-7

Cullen W.K., Wu J., Anwyl R. and Rowan M.J. (1996).

"beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus." *Neuroreport*, 8: 1 87-92

Curmi P.A., Andersen S.S., Lachkar S., Gavet O., Karsenti E., Knossow M. and Sobel A. (1997).

"The stathmin/tubulin interaction in vitro." *J Biol Chem*, 272: 40 25029-36

- D -

De Koninck P. and Cooper E. (1995).

"Differential regulation of neuronal nicotinic ACh receptor subunit genes in cultured neonatal rat sympathetic neurons: specific induction of alpha 7 by membrane depolarization through a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase pathway." *J Neurosci*, 15: 12 7966-78

De Strooper B. (2003).

"Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex." *Neuron*, 38: 1 9-12

De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K., Vanderstichele H., Guhde G., Annaert W., Von Figura K. and Van Leuven F. (1998).

"Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein." *Nature*, 391: 6665 387-90

De Strooper B., Umans L., Van Leuven F. and Van Den Berghe H. (1993).

"Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway." *J Cell Biol*, 121: 2 295-304

Deisseroth K., Heist E.K. and Tsien R.W. (1998).

"Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons." *Nature*, 392: 6672 198-202

Dekosky S.T. and Scheff S.W. (1990).

"Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity." *Ann Neurol*, 27: 5 457-64

Del Bo R., Angeretti N., Lucca E., De Simoni M.G. and Forloni G. (1995).

"Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and beta-amyloid production in cultures." *Neurosci Lett*, 188: 1 70-4

Delacourte A. and Buée L. (1989).

"[Alzheimer's disease: the glial reaction is general and severe in all areas of the central nervous system]." *C R Acad Sci III*, 308: 13 359-65

Delacourte A., Sergeant N., Wattez A., Gauvreau D. and Robitaille Y. (1998).

"Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation." *Ann Neurol*, 43: 2 193-204

Dewachter I. and Van Leuven F. (2002).

"Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease: the prospects." *Lancet Neurol*, 1: 7 409-16

Di Paolo G., Antonsson B., Kassel D., Riederer B.M. and Grenningloh G. (1997).

"Phosphorylation regulates the microtubule-destabilizing activity of stathmin and its interaction with tubulin." *FEBS Lett*, 416: 2 149-52

Dickson D.W. (1998).

"Pick's disease: a modern approach." *Brain Pathol*, 8: 2 339-54

Dineley K.T., Westerman M., Bui D., Bell K., Ashe K.H. and Sweatt J.D. (2001).

"Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease." *J Neurosci*, 21: 12 4125-33

Dipasquale B., Marini A.M. and Youle R.J. (1991).

"Apoptosis and DNA degradation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in neurons." *Biochem Biophys Res Commun*, 181: 3 1442-8

Doll T., Meichsner M., Riederer B.M., Honegger P. and Matus A. (1993).

"An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif." *J Cell Sci*, 106 (Pt 2): 633-9

Dougherty J.J., Wu J. and Nichols R.A. (2003).

"Beta-amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex." *J Neurosci*, 23: 17 6740-7

Douglas R.M. and Goddard G.V. (1975).

"Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus." *Brain Res*, 86: 2 205-15

Du C., Fang M., Li Y., Li L. and Wang X. (2000).

"Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell*, 102: 1 33-42

Dutar P., Potier B. and Lamour Y. (1994).

"Short-term effects of beta-amyloid protein on CA1 hippocampal neurons in young and aged rats: a study of calcium-dependent events." *Neurodegeneration*, 3: 119-28

- E -

Edbauer D., Winkler E., Haass C. and Steiner H. (2002).

"Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 13 8666-71

Eddé B., Rossier J., Le Caer J.P., Desbruyeres E., Gros F. and Denoulet P. (1990).

"Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin." *Science*, 247: 4938 83-5

Ekinci F.J., Malik K.U. and Shea T.B. (1999).

"Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to beta-amyloid. MAP kinase mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration." *J Biol Chem*, 274: 42 30322-7

El Khoury J., Hickman S.E., Thomas C.A., Cao L., Silverstein S.C. and Loike J.D. (1996).

"Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils." *Nature*, 382: 6593 716-9

El-Agnaf O.M. and Irvine G.B. (2000).

"Review: formation and properties of amyloid-like fibrils derived from alpha-synuclein and related proteins." *J Struct Biol*, 130: 2-3 300-9

Ellis H.M. and Horvitz H.R. (1986).

"Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*." *Cell*, 44: 6 817-29

Ellis J.M. (2005).

"Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia." *J Am Osteopath Assoc*, 105: 3 145-58

Esler W.P., Kimberly W.T., Ostaszewski B.L., Ye W., Diehl T.S., Selkoe D.J. and Wolfe M.S. (2002).

"Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma -secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 5 2720-5

Etcheberrigaray R., Ito E., Kim C.S. and Alkon D.L. (1994).

"Soluble beta-amyloid induction of Alzheimer's phenotype for human fibroblast K⁺ channels." *Science*, 264: 5156 276-9

Farzan M., Schnitzler C.E., Vasilieva N., Leung D. and Choe H. (2000).

"BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 17 9712-7

- F -

Feierbach B., Nogales E., Downing K.H. and Stearns T. (1999).

"Alflp, a CLIP-170 domain-containing protein, is functionally and physically associated with alpha-tubulin." *J Cell Biol*, 144: 1 113-24

Feng R., Rampon C., Tang Y.P., Shrom D., Jin J., Kyin M., Sopher B., Miller M.W., Ware C.B., Martin G.M., Kim S.H., Langdon R.B., Sisodia S.S. and Tsien J.Z. (2001).

"Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces." *Neuron*, 32: 5 911-26

Ferhat L., Represa A., Ferhat W., Ben-Ari Y. and Khrestchatisky M. (1998).

"MAP2d mRNA is expressed in identified neuronal populations in the developing and adult rat brain and its subcellular distribution differs from that of MAP2b in hippocampal neurones." *Eur J Neurosci*, 10: 1 161-71

Fillit H., Ding W.H., Buee L., Kalman J., Altstiel L., Lawlor B. and Wolf-Klein G. (1991).
"Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease." *Neurosci Lett*, 129: 2 318-20

Fitzjohn S.M., Morton R.A., Kuenzi F., Rosahl T.W., Shearman M., Lewis H., Smith D., Reynolds D.S., Davies C.H., Collingridge G.L. and Seabrook G.R. (2001).

"Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein." *J Neurosci*, 21: 13 4691-8

Flaherty D.B., Soria J.P., Tomasiewicz H.G. and Wood J.G. (2000).

"Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3beta and cdk5 are key participants." *J Neurosci Res*, 62: 3 463-72

Flood J.F., Morley J.E. and Roberts E. (1991).

"Amnesic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 8 3363-6

Flood J.F., Morley J.E. and Roberts E. (1994a).

"An amyloid beta-protein fragment, A beta[12-28], equipotently impairs post-training memory processing when injected into different limbic system structures." *Brain Res*, 663: 2 271-6

Flood J.F., Roberts E., Sherman M.A., Kaplan B.E. and Morley J.E. (1994b).

"Topography of a binding site for small amnesic peptides deduced from structure-activity studies: relation to amnesic effect of amyloid beta protein." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 1 380-4

Forloni G. (1996).

"Neurotoxicity of beta-amyloid and prion peptides." *Curr Opin Neurol*, 9: 6 492-500

Fraering P.C., Lavoie M.J., Ye W., Ostaszewski B.L., Kimberly W.T., Selkoe D.J. and Wolfe M.S. (2004a).

"Detergent-dependent dissociation of active gamma-secretase reveals an interaction between Pen-2 and PS1-NTF and offers a model for subunit organization within the complex." *Biochemistry*, 43: 2 323-33

Fraering P.C., Ye W., Strub J.M., Dolios G., Lavoie M.J., Ostaszewski B.L., Van Dorselaer A., Wang R., Selkoe D.J. and Wolfe M.S. (2004b).

"Purification and characterization of the human gamma-secretase complex." *Biochemistry*, 43: 30 9774-89

Francis R., Mcgrath G., Zhang J., Ruddy D.A., Sym M., Apfeld J., Nicoll M., Maxwell M., Hai B., Ellis M.C., Parks A.L., Xu W., Li J., Gurney M., Myers R.L., Himes C.S., Hiebsch R., Ruble C., Nye J.S. and Curtis D. (2002).

"aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation." *Dev Cell*, 3: 1 85-97

Frautschy S.A., Yang F., Calderon L. and Cole G.M. (1996).

"Rodent models of Alzheimer's disease: rat A beta infusion approaches to amyloid deposits." *Neurobiol Aging*, 17: 2 311-21

Freir D.B., Holscher C. and Herron C.E. (2001).

"Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo." *J Neurophysiol*, 85: 2 708-13

Fukutani Y., Cairns N.J., Rossor M.N. and Lantos P.L. (1997).

"Cerebellar pathology in sporadic and familial Alzheimer's disease including APP 717 (Val->Ile) mutation cases: a morphometric investigation." *J Neurol Sci*, 149: 2 177-84

Fukutani Y., Nakamura I., Kobayashi K., Yamaguchi N. and Matsubara R. (1989).

"An autopsy case of familial juvenile Alzheimer's disease with extensive involvement of the subcortical gray and white matters." *Acta Neuropathol (Berl)*, 77: 3 329-32

Furukawa K., Abe Y. and Akaike N. (1994).

"Amyloid beta protein-induced irreversible current in rat cortical neurones." *Neuroreport*, 5: 16 2016-8

- G -

Garner C.C. and Matus A. (1988).

"Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts." *J Cell Biol*, 106: 3 779-83

Gasque P., Fontaine M. and Morgan B.P. (1995).

"Complement expression in human brain. Biosynthesis of terminal pathway components and regulators in human glial cells and cell lines." *J Immunol*, 154: 9 4726-33

Gavet O., Ozon S., Manceau V., Lawler S., Curmi P. and Sobel A. (1998).

"The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network." *J Cell Sci*, 111 (Pt 22): 3333-46

German D.C. and Eisch A.J. (2004).

"Mouse models of Alzheimer's disease: insight into treatment." *Rev Neurosci*, 15: 5 353-69

Gervais F.G., Xu D., Robertson G.S., Vaillancourt J.P., Zhu Y., Huang J., Leblanc A., Smith D., Rigby M., Shearman M.S., Clarke E.E., Zheng H., Van Der Ploeg L.H., Ruffolo S.C., Thornberry N.A., Xanthoudakis S., Zamboni R.J., Roy S. and Nicholson D.W. (1999).

"Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation." *Cell*, 97: 3 395-406

Gewurz H., Ying S.C., Jiang H. and Lint T.F. (1993).

"Nonimmune activation of the classical complement pathway." *Behring Inst Mitt*: 93 138-47

Giacchino J., Criado J.R., Games D. and Henriksen S. (2000).

"In vivo synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice." *Brain Res*, 876: 1-2 185-90

Gigant B., Curmi P.A., Martin-Barbey C., Charbaut E., Lachkar S., Lebeau L., Siavoshian S., Sobel A. and Knossow M. (2000).

"The 4 A X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex." *Cell*, 102: 6 809-16

Giovannini M.G., Scali C., Prosperi C., Bellucci A., Vannucchi M.G., Rosi S., Pepeu G. and Casamenti F. (2002).

"Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway." *Neurobiol Dis*, 11: 2 257-74

Giulian D., Young D.G., Woodward J., Brown D.C. and Lachman L.B. (1988).

"Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain." *J Neurosci*, 8: 2 709-14

Glennner G.G. and Wong C.W. (1984).

"Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." *Biochem Biophys Res Commun*, 120: 3 885-90

Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L. and Et Al. (1991).

"Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." *Nature*, 349: 6311 704-6

Goldgaber D., Harris H.W., Hla T., Maciag T., Donnelly R.J., Jacobsen J.S., Vitek M.P. and Gajdusek D.C. (1989).

"Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 19 7606-10

Good P.F., Werner P., Hsu A., Olanow C.W. and Perl D.P. (1996a).

"Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease." *Am J Pathol*, 149: 1 21-8

Good T.A., Smith D.O. and Murphy R.M. (1996b).

"Beta-amyloid peptide blocks the fast-inactivating K⁺ current in rat hippocampal neurons." *Biophys J*, 70: 1 296-304

Gouras G.K., Tsai J., Naslund J., Vincent B., Edgar M., Checler F., Greenfield J.P., Haroutunian V., Buxbaum J.D., Xu H., Greengard P. and Relkin N.R. (2000).

"Intraneuronal Aβ₄₂ accumulation in human brain." *Am J Pathol*, 156: 1 15-20

Goutte C., Tsunozaki M., Hale V.A. and Priess J.R. (2002).

"APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 2 775-9

Grace E.A., Rabiner C.A. and Busciglio J. (2002).

"Characterization of neuronal dystrophy induced by fibrillar amyloid beta: implications for Alzheimer's disease." *Neuroscience*, 114: 1 265-73

Green D.R. (2000).

"Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors." *Cell*, 102: 1 1-4

Griffin W.S., Sheng J.G., Roberts G.W. and Mrak R.E. (1995).

"Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution." *J Neuropathol Exp Neurol*, 54: 2 276-81

Griffin W.S., Stanley L.C., Ling C., White L., Macleod V., Perrot L.J., White C.L., 3rd and Araoz C. (1989).

"Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 19 7611-5

Grimes C.A. and Jope R.S. (2001).

"The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling." *Prog Neurobiol*, 65: 4 391-426

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y.C., Zaidi M.S. and Wisniewski H.M. (1986).

"Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments." *J Biol Chem*, 261: 13 6084-9

Gu Z., Zhong P. and Yan Z. (2003).

"Activation of muscarinic receptors inhibits beta-amyloid peptide-induced signaling in cortical slices." *J Biol Chem*, 278: 19 17546-56

Guillaume E., Evrard B., Com E., Moertz E., Jegou B. and Pineau C. (2001).

"Proteome analysis of rat spermatogonia: reinvestigation of stathmin spatio-temporal expression within the testis." *Mol Reprod Dev*, 60: 4 439-45

Gunawardena S. and Goldstein L.S. (2001).

"Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*." *Neuron*, 32: 3 389-401

- H -

Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B.L., Lieberburg I., Koo E.H., Schenk D., Teplow D.B. and Et Al. (1992).

"Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." *Nature*, 359: 6393 322-5

Hailat N., Strahler J., Melhem R., Zhu X.X., Brodeur G., Seeger R.C., Reynolds C.P. and Hanash S. (1990).

"N-myc gene amplification in neuroblastoma is associated with altered phosphorylation of a proliferation related polypeptide (Op18)." *Oncogene*, 5: 11 1615-8

Hampel H., Haslinger A., Scheloske M., Padberg F., Fischer P., Unger J., Teipel S.J., Neumann M., Rosenberg C., Oshida R., Hulette C., Pongratz D., Ewers M., Kretschmar H.A. and Moller H.J. (2005).

"Pattern of interleukin-6 receptor complex immunoreactivity between cortical regions of rapid autopsy normal and Alzheimer's disease brain." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 255: 4 269-78

Hanash S.M., Strahler J.R., Kuick R., Chu E.H. and Nichols D. (1988).

"Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia." *J Biol Chem*, 263: 26 12813-5

Hardy J. (1997).

"Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease." *Trends Neurosci*, 20: 4 154-9

Harper J.D. and Lansbury P.T., Jr. (1997).

"Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins." *Annu Rev Biochem*, 66: 385-407

Harris-White M.E., Chu T., Balverde Z., Sigel J.J., Flanders K.C. and Frautschy S.A. (1998).

"Effects of transforming growth factor-beta (isoforms 1-3) on amyloid-beta deposition, inflammation, and cell targeting in organotypic hippocampal slice cultures." *J Neurosci*, 18: 24 10366-74

Hartell N.A. and Suh Y.H. (2000).

"Peptide fragments of beta-amyloid precursor protein: effects on parallel fiber-Purkinje cell synaptic transmission in rat cerebellum." *J Neurochem*, 74: 3 1112-21

Hartley D.M., Walsh D.M., Ye C.P., Diehl T., Vasquez S., Vassilev P.M., Teplow D.B. and Selkoe D.J. (1999).

"Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons." *J Neurosci*, 19: 20 8876-84

He L.M., Chen L.Y., Lou X.L., Qu A.L., Zhou Z. and Xu T. (2002).

"Evaluation of beta-amyloid peptide 25-35 on calcium homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons." *Brain Res*, 939: 1-2 65-75

Hebert L.E., Scherr P.A., Bienias J.L., Bennett D.A. and Evans D.A. (2003).

"Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census." *Arch Neurol*, 60: 8 1119-22

Herreman A., Serneels L., Annaert W., Collen D., Schoonjans L. and De Strooper B. (2000).

"Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells." *Nat Cell Biol*, 2: 7 461-2

Hirata D., Masuda H., Eddison M. and Toda T. (1998).

"Essential role of tubulin-folding cofactor D in microtubule assembly and its association with microtubules in fission yeast." *Embo J*, 17: 3 658-66

Hirokawa N. (1998).

"Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport." *Science*, 279: 5350-5359

Ho L., Pieroni C., Winger D., Purohit D.P., Aisen P.S. and Pasinetti G.M. (1999).

"Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease." *J Neurosci Res*, 57: 3295-3303

Holscher C. (1998).

"Beta-amyloid induced reduction in synaptic transmission is reversed by inhibitors of nitric oxide synthase." *Neuroreport*, 9: 61245-8

Holzbaumer E.L. and Vallee R.B. (1994).

"DYNEINS: molecular structure and cellular function." *Annu Rev Cell Biol*, 10: 339-72

Howell B., Odde D.J. and Cassimeris L. (1997).

"Kinase and phosphatase inhibitors cause rapid alterations in microtubule dynamic instability in living cells." *Cell Motil Cytoskeleton*, 38: 2201-14

Howlett D.R., Jennings K.H., Lee D.C., Clark M.S., Brown F., Wetzel R., Wood S.J., Camilleri P. and Roberts G.W. (1995).

"Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide." *Neurodegeneration*, 4: 123-32

Howlett D.R., Simmons D.L., Dingwall C. and Christie G. (2000).

"In search of an enzyme: the beta-secretase of Alzheimer's disease is an aspartic proteinase." *Trends Neurosci*, 23: 11565-70

Hsia A.Y., Masliah E., McConlogue L., Yu G.Q., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Malenka R.C., Nicoll R.A. and Mucke L. (1999).

"Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 63228-33

Hull M., Fiebich B.L., Lieb K., Strauss S., Berger S.S., Volk B. and Bauer J. (1996).

"Interleukin-6-associated inflammatory processes in Alzheimer's disease: new therapeutic options." *Neurobiol Aging*, 17: 5795-800

Huse J.T., Liu K., Pijak D.S., Carlin D., Lee V.M. and Doms R.W. (2002).

"Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain." *J Biol Chem*, 277: 1816278-84

Husemann J., Loike J.D., Kodama T. and Silverstein S.C. (2001).

"Scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates adhesion of neonatal murine microglia to fibrillar beta-amyloid." *J Neuroimmunol*, 114: 1-2142-50

Hussain I., Powell D., Howlett D.R., Tew D.G., Meek T.D., Chapman C., Gloger I.S., Murphy K.E., Southan C.D., Ryan D.M., Smith T.S., Simmons D.L., Walsh F.S., Dingwall C. and Christie G. (1999).

"Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase." *Mol Cell Neurosci*, 14: 6 419-27

Hyman A.A. (1995).

"Microtubule dynamics. Kinetochores get a grip." *Curr Biol*, 5: 5 483-4

Hyman A.A., Salser S., Drechsel D.N., Unwin N. and Mitchison T.J. (1992).

"Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP." *Mol Biol Cell*, 3: 10 1155-67

- I -

Inestrosa N., De Ferrari G.V., Garrido J.L., Alvarez A., Olivares G.H., Barria M.I., Bronfman M. and Chacon M.A. (2002).

"Wnt signaling involvement in beta-amyloid-dependent neurodegeneration." *Neurochem Int*, 41: 5 341-4

Ishii T. and Haga S. (1984).

"Immuno-electron-microscopic localization of complements in amyloid fibrils of senile plaques." *Acta Neuropathol (Berl)*, 63: 4 296-300

Iversen L.L., Mortishire-Smith R.J., Pollack S.J. and Shearman M.S. (1995).

"The toxicity in vitro of beta-amyloid protein." *Biochem J*, 311 (Pt 1): 1-16

Iwatsubo T., Mann D.M., Odaka A., Suzuki N. and Ihara Y. (1995).

"Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome." *Ann Neurol*, 37: 3 294-9

Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N. and Ihara Y. (1994).

"Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)." *Neuron*, 13: 1 45-53

- J -

Jarrett J.T., Berger E.P. and Lansbury P.T., Jr. (1993).

"The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Biochemistry*, 32: 18 4693-7

Jeha S., Luo X.N., Beran M., Kantarjian H. and Atweh G.F. (1996).

"Antisense RNA inhibition of phosphoprotein p18 expression abrogates the transformed phenotype of leukemic cells." *Cancer Res*, 56: 6 1445-50

Jhamandas J.H., Cho C., Jassar B., Harris K., Mactavish D. and Easaw J. (2001).

"Cellular mechanisms for amyloid beta-protein activation of rat cholinergic basal forebrain neurons." *J Neurophysiol*, 86: 3 1312-20

Jiang H., Burdick D., Glabe C.G., Cotman C.W. and Tenner A.J. (1994).

"beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain." *J Immunol*, 152: 10 5050-9

Jin K., Mao X.O., Cottrell B., Schilling B., Xie L., Row R.H., Sun Y., Peel A., Childs J., Gendeh G., Gibson B.W. and Greenberg D.A. (2004).

"Proteomic and immunochemical characterization of a role for stathmin in adult neurogenesis." *Faseb J*, 18: 2 287-99

Jin L.W., Masliah E., Iimoto D., Deteresa R., Mallory M., Sundsmo M., Mori N., Sobel A. and Saitoh T. (1996).

"Neurofibrillary tangle-associated alteration of stathmin in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging*, 17: 3 331-41

Job D., Valiron O. and Oakley B. (2003).

"Microtubule nucleation." *Curr Opin Cell Biol*, 15: 1 111-7

John V., Beck J.P., Bienkowski M.J., Sinha S. and Heinrikson R.L. (2003).

"Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors." *J Med Chem*, 46: 22 4625-30

Jordan M.A. and Wilson L. (1998).

"Use of drugs to study role of microtubule assembly dynamics in living cells." *Methods Enzymol*, 298: 252-76

Jourdain L., Curmi P., Sobel A., Pantaloni D. and Carlier M.F. (1997).

"Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules." *Biochemistry*, 36: 36 10817-21

- K -

Kaltschmidt B., Uherek M., Volk B., Baeuerle P.A. and Kaltschmidt C. (1997).

"Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 6 2642-7

Kamenetz F., Tomita T., Hsieh H., Seabrook G., Borchelt D., Iwatsubo T., Sisodia S. and Malinow R. (2003).

"APP processing and synaptic function." *Neuron*, 37: 6 925-37

Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K. and Muller-Hill B. (1987).

"The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature*, 325: 6106 733-6

Karki S. and Holzbaur E.L. (1995).

"Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex." *J Biol Chem*, 270: 48 28806-11

Kayed R., Head E., Thompson J.L., Mcintire T.M., Milton S.C., Cotman C.W. and Glabe C.G. (2003).

"Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis." *Science*, 300: 5618-5624

Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R. (1972).

"Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer*, 26: 4 239-57

Kihara T., Shimohama S., Sawada H., Honda K., Nakamizo T., Shibasaki H., Kume T. and Akaike A. (2001).

"alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity." *J Biol Chem*, 276: 17 13541-6

Kim J.H., Anwyl R., Suh Y.H., Djamgoz M.B. and Rowan M.J. (2001).

"Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (beta)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo." *J Neurosci*, 21: 4 1327-33

Kins S., Cramer A., Evans D.R., Hemmings B.A., Nitsch R.M. and Gotz J. (2001).

"Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice." *J Biol Chem*, 276: 41 38193-200

Klegeris A. and McGeer P.L. (1997).

"beta-amyloid protein enhances macrophage production of oxygen free radicals and glutamate." *J Neurosci Res*, 49: 2 229-35

Klyubin I., Walsh D.M., Lemere C.A., Cullen W.K., Shankar G.M., Betts V., Spooner E.T., Jiang L., Anwyl R., Selkoe D.J. and Rowan M.J. (2005).

"Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo." *Nat Med*, 11: 5 556-61

Koike H., Tomioka S., Sorimachi H., Saido T.C., Maruyama K., Okuyama A., Fujisawa-Sehara A., Ohno S., Suzuki K. and Ishiura S. (1999).

"Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein." *Biochem J*, 343 Pt 2: 371-5

Kovacs D.M., Fausett H.J., Page K.J., Kim T.W., Moir R.D., Merriam D.E., Hollister R.D., Hallmark O.G., Mancini R., Felsenstein K.M., Hyman B.T., Tanzi R.E. and Wasco W. (1996).

"Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells." *Nat Med*, 2: 2 224-9

Kowall N.W., Beal M.F., Busciglio J., Duffy L.K. and Yankner B.A. (1991).

"An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 16 7247-51

Kumar V.B., Farr S.A., Flood J.F., Kamlesh V., Franko M., Banks W.A. and Morley J.E. (2000).

"Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice." *Peptides*, 21: 12 1769-75

Kumar-Singh S., De Jonghe C., Cruts M., Kleinert R., Wang R., Mercken M., De Strooper B., Vanderstichele H., Lofgren A., Vanderhoeven I., Backhovens H., Vanmechelen E., Kroisel P.M. and Van Broeckhoven C. (2000).

"Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A beta(42) in Alzheimer's disease." *Hum Mol Genet*, 9: 18 2589-98

Kuner P., Schubel R. and Hertel C. (1998).

"Beta-amyloid binds to p57NTR and activates NFkappaB in human neuroblastoma cells." *J Neurosci Res*, 54: 6 798-804

- L -

Laemmli U.K. (1970).

"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, 227: 5259 680-5

Laferriere N.B., Macrae T.H. and Brown D.L. (1997).

"Tubulin synthesis and assembly in differentiating neurons." *Biochem Cell Biol*, 75: 2 103-17

Lambert M.P., Barlow A.K., Chromy B.A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T.E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K.L., Wals P., Zhang C., Finch C.E., Krafft G.A. and Klein W.L. (1998).

"Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 11 6448-53

Lammich S., Kojro E., Postina R., Gilbert S., Pfeiffer R., Jasionowski M., Haass C. and Fahrenholz F. (1999).

"Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 7 3922-7

Lander H.M., Ogiste J.S., Pearce S.F., Levi R. and Novogrodsky A. (1995).

"Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras." *J Biol Chem*, 270: 13 7017-20

Larcher J.C., Boucher D., Ginzburg I., Gros F. and Denoulet P. (1992).

"Heterogeneity of Tau proteins during mouse brain development and differentiation of cultured neurons." *Dev Biol*, 154: 1 195-204

Larcher J.C., Boucher D., Lazereg S., Gros F. and Denoulet P. (1996).

"Interaction of kinesin motor domains with alpha- and beta-tubulin subunits at a tau-independent binding site. Regulation by polyglutamylation." *J Biol Chem*, 271: 36 22117-24

Larson J., Lynch G., Games D. and Seubert P. (1999).

"Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice." *Brain Res*, 840: 1-2 23-35

Larsson N., Marklund U., Gradin H.M., Brattsand G. and Gullberg M. (1997).

"Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis." *Mol Cell Biol*, 17: 9 5530-9

- Le Gouvello S., Manceau V. and Sobel A. (1998).**
"Serine 16 of stathmin as a cytosolic target for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II after CD2 triggering of human T lymphocytes." *J Immunol*, 161: 3 1113-22
- Ledizet M. and Piperno G. (1987).**
"Identification of an acetylation site of Chlamydomonas alpha-tubulin." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 16 5720-4
- Lee S.C., Dickson D.W., Liu W. and Brosnan C.F. (1993).**
"Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma." *J Neuroimmunol*, 46: 1-2 19-24
- Lee V.M., Goedert M. and Trojanowski J.Q. (2001).**
"Neurodegenerative tauopathies." *Annu Rev Neurosci*, 24: 1121-59
- Lee W., Boo J.H., Jung M.W., Park S.D., Kim Y.H., Kim S.U. and Mook-Jung I. (2004).**
"Amyloid beta peptide directly inhibits PKC activation." *Mol Cell Neurosci*, 26: 2 222-31
- Lemere C.A., Blusztajn J.K., Yamaguchi H., Wisniewski T., Saido T.C. and Selkoe D.J. (1996a).**
"Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation." *Neurobiol Dis*, 3: 1 16-32
- Lemere C.A., Lopera F., Kosik K.S., Lendon C.L., Ossa J., Saido T.C., Yamaguchi H., Ruiz A., Martinez A., Madrigal L., Hincapie L., Arango J.C., Anthony D.C., Koo E.H., Goate A.M. and Selkoe D.J. (1996b).**
"The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology." *Nat Med*, 2: 10 1146-50
- Levi-Strauss M. and Mallat M. (1987).**
"Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B, two components of the alternative pathway of complement activation." *J Immunol*, 139: 7 2361-6
- Lewis S.A., Tian G., Vainberg I.E. and Cowan N.J. (1996).**
"Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin." *J Cell Biol*, 132: 1-2 1-4
- Li Y., Liu L., Kang J., Sheng J.G., Barger S.W., Mrak R.E. and Griffin W.S. (2000).**
"Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression." *J Neurosci*, 20: 1 149-55
- Liao D., Scannevin R.H. and Hagan R. (2001).**
"Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors." *J Neurosci*, 21: 16 6008-17
- Liedtke W., Leman E.E., Fyffe R.E., Raine C.S. and Schubart U.K. (2002).**
"Stathmin-deficient mice develop an age-dependent axonopathy of the central and peripheral nervous systems." *Am J Pathol*, 160: 2 469-80

Lin X., Koelsch G., Wu S., Downs D., Dashti A. and Tang J. (2000).

"Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 4 1456-60

Liu Q., Kawai H. and Berg D.K. (2001).

"beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 8 4734-9

Liu Q. and Zhao B. (2004).

"Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures." *Br J Pharmacol*, 141: 4 746-54

Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. and Wang X. (1996).

"Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell*, 86: 1 147-57

Lockshin R.A. (1969).

"Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein." *J Insect Physiol*, 15: 9 1505-16

Loo D.T., Copani A., Pike C.J., Whittemore E.R., Walencewicz A.J. and Cotman C.W. (1993).

"Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 17 7951-5

Lorenzo A. and Yankner B.A. (1994).

"Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 25 12243-7

Lorton D., Schaller J., Lala A. and De Nardin E. (2000).

"Chemotactic-like receptors and Abeta peptide induced responses in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging*, 21: 3 463-73

Los M., Wesselborg S. and Schulze-Osthoff K. (1999).

"The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice." *Immunity*, 10: 6 629-39

Lu Q. and Luduena R.F. (1994).

"In vitro analysis of microtubule assembly of isotypically pure tubulin dimers. Intrinsic differences in the assembly properties of alpha beta II, alpha beta III, and alpha beta IV tubulin dimers in the absence of microtubule-associated proteins." *J Biol Chem*, 269: 3 2041-7

Luduena R.F. (1998).

"Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications." *Int Rev Cytol*, 178: 207-75

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 beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." *Am J Pathol*, 155: 3 853-62

Lue L.F., Rydel R., Brigham E.F., Yang L.B., Hampel H., Murphy G.M., Jr., Brachova L., Yan S.D., Walker D.G., Shen Y. and Rogers J. (2001).

"Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro." *Glia*, 35: 1 72-9

Lynch G., Larson J., Kelso S., Barrionuevo G. and Schottler F. (1983).

"Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation." *Nature*, 305: 5936 719-21

- M -

Maccioni R.B., Otth C., Concha, Ii and Munoz J.P. (2001).

"The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology." *Eur J Biochem*, 268: 6 1518-27

Macmanus A., Ramsden M., Murray M., Henderson Z., Pearson H.A. and Campbell V.A. (2000).

"Enhancement of (45)Ca(2+) influx and voltage-dependent Ca(2+) channel activity by beta-amyloid-(1-40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. Modulation by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta." *J Biol Chem*, 275: 7 4713-8

Madani R., Hulo S., Toni N., Madani H., Steimer T., Muller D. and Vassalli J.D. (1999).

"Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice." *Embo J*, 18: 11 3007-12

Malenka R.C. and Nicoll R.A. (1993).

"NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms." *Trends Neurosci*, 16: 12 521-7

Malin D.H., Crothers M.K., Lake J.R., Goyarzu P., Plotner R.E., Garcia S.A., Spell S.H., Tomsic B.J., Giordano T. and Kowall N.W. (2001).

"Hippocampal injections of amyloid beta-peptide 1-40 impair subsequent one-trial/day reward learning." *Neurobiol Learn Mem*, 76: 2 125-37

Mandelkow E. and Mandelkow E.M. (1995).

"Microtubules and microtubule-associated proteins." *Curr Opin Cell Biol*, 7: 1 72-81

Mandelkow E., Song Y.H. and Mandelkow E.M. (1995).

"The microtubule lattice--dynamic instability of concepts." *Trends Cell Biol*, 5: 7 262-6

Mann D.M., Takeuchi A., Sato S., Cairns N.J., Lantos P.L., Rossor M.N., Haltia M., Kalimo H. and Iwatsubo T. (2001).

"Cases of Alzheimer's disease due to deletion of exon 9 of the presenilin-1 gene show an unusual but characteristic beta-amyloid pathology known as 'cotton wool' plaques." *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27: 3 189-96

Margolis R.L. and Wilson L. (1978).

"Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro." *Cell*, 13: 1 1-8

Markesbery W.R. and Carney J.M. (1999).

"Oxidative alterations in Alzheimer's disease." *Brain Pathol*, 9: 1 133-46

Marklund U., Brattsand G., Shingler V. and Gullberg M. (1993).

"Serine 25 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem*, 268: 20 15039-47

Marklund U., Larsson N., Brattsand G., Osterman O., Chatila T.A. and Gullberg M. (1994).

"Serine 16 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase-Gr." *Eur J Biochem*, 225: 1 53-60

Mastrangelo P., Mathews P.M., Chishti M.A., Schmidt S.D., Gu Y., Yang J., Mazzella M.J., Coomaraswamy J., Horne P., Strome B., Pelly H., Levesque G., Ebeling C., Jiang Y., Nixon R.A., Rozmahel R., Fraser P.E., St George-Hyslop P., Carlson G.A. and Westaway D. (2005).

"Dissociated phenotypes in presenilin transgenic mice define functionally distinct gamma-secretases." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 25 8972-7

Matter M.L., Zhang Z., Nordstedt C. and Ruoslahti E. (1998).

"The alpha5beta1 integrin mediates elimination of amyloid-beta peptide and protects against apoptosis." *J Cell Biol*, 141: 4 1019-30

Mattson M.P., Cheng B., Culwell A.R., Esch F.S., Lieberburg I. and Rydel R.E. (1993).

"Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein." *Neuron*, 10: 2 243-54

Mattson M.P. and Pedersen W.A. (1998).

"Effects of amyloid precursor protein derivatives and oxidative stress on basal forebrain cholinergic systems in Alzheimer's disease." *Int J Dev Neurosci*, 16: 7-8 737-53

Maucuer A., Moreau J., Mechali M. and Sobel A. (1993).

"Stathmin gene family: phylogenetic conservation and developmental regulation in *Xenopus*." *J Biol Chem*, 268: 22 16420-9

Mcdonald D.R., Bamberger M.E., Combs C.K. and Landreth G.E. (1998).

"beta-Amyloid fibrils activate parallel mitogen-activated protein kinase pathways in microglia and THP1 monocytes." *J Neurosci*, 18: 12 4451-60

Mcgeer P.L. and Mcgeer E. (2004).

"Immunotherapy for Alzheimer's disease." *Sci Aging Knowledge Environ*, 2004: 27 pe29

Mcgeer P.L. and Mcgeer E.G. (1995).

"The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases." *Brain Res Brain Res Rev*, 21: 2 195-218

Mcgeer P.L., Schulzer M. and Mcgeer E.G. (1996).

"Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies." *Neurology*, 47: 2 425-32

- Mckee A.C., Kowall N.W., Schumacher J.S. and Beal M.F. (1998).**
 "The neurotoxicity of amyloid beta protein in aged primates." *Amyloid*, 5: 1 1-9
- Mckhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D. and Stadlan E.M. (1984).**
 "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." *Neurology*, 34: 7 939-44
- 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 A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease." *Ann Neurol*, 46: 6 860-6
- Meda L., Baron P., Prat E., Scarpini E., Scarlato G., Cassatella M.A. and Rossi F. (1999).**
 "Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with beta-amyloid[25-35]." *J Neuroimmunol*, 93: 1-2 45-52
- Melander Gradin H., Marklund U., Larsson N., Chatila T.A. and Gullberg M. (1997).**
 "Regulation of microtubule dynamics by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IV/Gr-dependent phosphorylation of oncoprotein 18." *Mol Cell Biol*, 17: 6 3459-67
- Melander Gradin H.M., Larsson N., Marklund U. and Gullberg M. (1998).**
 "Regulation of microtubule dynamics by extracellular signals: cAMP-dependent protein kinase switches off the activity of oncoprotein 18 in intact cells." *J Cell Biol*, 140: 1 131-41
- Mehlen P. and Thibert C. (2004).**
 "Dependence receptors: between life and death." *Cell Mol Life Sci*, 61: 15 1854-66
- Melki R., Rommelaere H., Leguy R., Vandekerckhove J. and Ampe C. (1996).**
 "Cofactor A is a molecular chaperone required for beta-tubulin folding: functional and structural characterization." *Biochemistry*, 35: 32 10422-35
- Merlos-Suarez A., Fernandez-Larrea J., Reddy P., Baselga J. and Arribas J. (1998).**
 "Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing." *J Biol Chem*, 273: 38 24955-62
- Michaelis M.L., Ansar S., Chen Y., Reiff E.R., Seyb K.I., Himes R.H., Audus K.L. and Georg G.I. (2005).**
 "{beta}-Amyloid-induced neurodegeneration and protection by structurally diverse microtubule-stabilizing agents." *J Pharmacol Exp Ther*, 312: 2 659-68
- Migaud M., Charlesworth P., Dempster M., Webster L.C., Watabe A.M., Makhinson M., He Y., Ramsay M.F., Morris R.G., Morrison J.H., O'dell T.J. and Grant S.G. (1998).**
 "Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein." *Nature*, 396: 6710 433-9
- Mignotte B. and Vayssiere J.L. (1998).**
 "Mitochondria and apoptosis." *Eur J Biochem*, 252: 1 1-15

Minghetti L., Polazzi E., Nicolini A., Creminon C. and Levi G. (1996).

"Interferon-gamma and nitric oxide down-regulate lipopolysaccharide-induced prostanoid production in cultured rat microglial cells by inhibiting cyclooxygenase-2 expression." *J Neurochem*, 66: 5 1963-70

Minogue A.M., Schmid A.W., Fogarty M.P., Moore A.C., Campbell V.A., Herron C.E. and Lynch M.A. (2003).

"Activation of the c-Jun N-terminal kinase signaling cascade mediates the effect of amyloid-beta on long term potentiation and cell death in hippocampus: a role for interleukin-1beta?" *J Biol Chem*, 278: 30 27971-80

Mintz I.M., Sabatini B.L. and Regehr W.G. (1995).

"Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse." *Neuron*, 15: 3 675-88

Mitchison T. and Kirschner M. (1984).

"Dynamic instability of microtubule growth." *Nature*, 312: 5991 237-42

Mock B.A., Krall M.M., Padlan C., Dosik J.K. and Schubart U.K. (1993).

"The gene for Lap18, leukemia-associated phosphoprotein p18 (metablastin), maps to distal mouse chromosome 4." *Mamm Genome*, 4: 8 461-2

Mogi M., Harada M., Riederer P., Narabayashi H., Fujita K. and Nagatsu T. (1994).

"Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients." *Neurosci Lett*, 165: 1-2 208-10

Morgan S.L. and Teyler T.J. (1999).

"VDCCs and NMDARs underlie two forms of LTP in CA1 hippocampus in vivo." *J Neurophysiol*, 82: 2 736-40

Mori N. and Morii H. (2002).

"SCG10-related neuronal growth-associated proteins in neural development, plasticity, degeneration, and aging." *J Neurosci Res*, 70: 3 264-73

Morishima-Kawashima M. and Ihara Y. (2002).

"Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau." *J Neurosci Res*, 70: 3 392-401

Moritz M., Braunfeld M.B., Sedat J.W., Alberts B. and Agard D.A. (1995).

"Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome." *Nature*, 378: 6557 638-40

Morley J.E., Farr S.A. and Flood J.F. (2002).

"Antibody to amyloid beta protein alleviates impaired acquisition, retention, and memory processing in SAMP8 mice." *Neurobiol Learn Mem*, 78: 1 125-38

Morley J.E., Kumar V.B., Bernardo A.E., Farr S.A., Uezu K., Tumosa N. and Flood J.F. (2000).

"Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory." *Peptides*, 21: 12 1761-7

Morris R.G., Anderson E., Lynch G.S. and Baudry M. (1986).

"Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5." *Nature*, 319: 6056 774-6

Moss M.L., Jin S.L., Becherer J.D., Bickett D.M., Burkhart W., Chen W.J., Hassler D., Leesnitzer M.T., Mcgeehan G., Milla M., Moyer M., Rocque W., Seaton T., Schoenen F., Warner J. and Willard D. (1997a).

"Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE)." *J Neuroimmunol*, 72: 2 127-9

Moss M.L., Jin S.L., Milla M.E., Bickett D.M., Burkhart W., Carter H.L., Chen W.J., Clay W.C., Didsbury J.R., Hassler D., Hoffman C.R., Kost T.A., Lambert M.H., Leesnitzer M.A., Mccauley P., Mcgeehan G., Mitchell J., Moyer M., Pahel G., Rocque W., Overton L.K., Schoenen F., Seaton T., Su J.L., Becherer J.D. and Et Al. (1997b).

"Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha." *Nature*, 385: 6618 733-6

Moss M.L., White J.M., Lambert M.H. and Andrews R.C. (2001).

"TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery." *Drug Discov Today*, 6: 8 417-26

Mrak R.E., Sheng J.G. and Griffin W.S. (1996).

"Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease." *J Neuropathol Exp Neurol*, 55: 3 273-9

Mucke L., Masliah E., Yu G.Q., Mallory M., Rockenstein E.M., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Johnson-Wood K. and Mconlogue L. (2000).

"High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." *J Neurosci*, 20: 11 4050-8

Mulkey R.M., Endo S., Shenolikar S. and Malenka R.C. (1994).

"Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression." *Nature*, 369: 6480 486-8

- N -

Nag S. and Tang F. (2001).

"The effect of age on the response of the rat brains to continuous beta-amyloid infusion." *Brain Res*, 889: 1-2 303-7

Nagele R.G., D'andrea M.R., Anderson W.J. and Wang H.Y. (2002).

"Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease." *Neuroscience*, 110: 2 199-211

Nagy Z. (2005).

"The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *J Cell Mol Med*, 9: 3 531-41

Naslund J., Schierhorn A., Hellman U., Lannfelt L., Roses A.D., Tjernberg L.O., Silberring J., Gandy S.E., Winblad B., Greengard P. and Et Al. (1994).

"Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 18 8378-82

Nguyen H.L., Gruber D. and Bulinski J.C. (1999).

"Microtubule-associated protein 4 (MAP4) regulates assembly, protomer-polymer partitioning and synthesis of tubulin in cultured cells." *J Cell Sci*, 112 (Pt 12): 1813-24

Nicholson D.W. and Thornberry N.A. (1997).

"Caspases: killer proteases." *Trends Biochem Sci*, 22: 8 299-306

Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C.B., Condrón M.M., Axelman K., Forsell C., Sten C., Luthman J., Teplow D.B., Younkin S.G., Naslund J. and Lannfelt L. (2001).

"The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation." *Nat Neurosci*, 4: 9 887-93

Nogales E. (1999).

"A structural view of microtubule dynamics." *Cell Mol Life Sci*, 56: 1-2 133-42

Nogales E. (2000).

"Structural insights into microtubule function." *Annu Rev Biochem*, 69: 277-302

Nogales E., Wolf S.G. and Downing K.H. (1998).

"Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography." *Nature*, 391: 6663 199-203

Nogawa S., Zhang F., Ross M.E. and Iadecola C. (1997).

"Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage." *J Neurosci*, 17: 8 2746-55

Nothias F., Fischer I., Murray M., Mirman S. and Vincent J.D. (1996).

"Expression of a phosphorylated isoform of MAP1B is maintained in adult central nervous system areas that retain capacity for structural plasticity." *J Comp Neurol*, 368: 3 317-34

Nunan J. and Small D.H. (2000).

"Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases." *FEBS Lett*, 483: 1 6-10

- O -

O'banion M.K., Sadowski H.B., Winn V. and Young D.A. (1991).

"A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein." *J Biol Chem*, 266: 34 23261-7

O'banion M.K., Winn V.D. and Young D.A. (1992).

"cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 11 4888-92

Oda T., Pasinetti G.M., Osterburg H.H., Anderson C., Johnson S.A. and Finch C.E. (1994).

"Purification and characterization of brain clusterin." *Biochem Biophys Res Commun*, 204: 3 1131-6

Ohm T.G., Scharnagl H., Marz W. and Bohl J. (1999).

"Apolipoprotein E isoforms and the development of low and high Braak stages of Alzheimer's disease-related lesions." *Acta Neuropathol (Berl)*, 98: 3 273-80

Ohsawa I., Hirose Y., Ishiguro M., Imai Y., Ishiura S. and Kohsaka S. (1995).

"Expression, purification, and neurotrophic activity of amyloid precursor protein-secreted forms produced by yeast." *Biochem Biophys Res Commun*, 213: 1 52-8

Oka J., Suzuki E. and Kondo Y. (2000).

"Endogenous GLP-1 is involved in beta-amyloid protein-induced memory impairment and hippocampal neuronal death in rats." *Brain Res*, 878: 1-2 194-8

Okazaki T., Wang H., Masliah E., Cao M., Johnson S.A., Sundsmo M., Saitoh T. and Mori N. (1995).

"SCG10, a neuron-specific growth-associated protein in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging*, 16: 6 883-94

Ouardouz M., Nikolaeva M.A., Coderre E., Zamponi G.W., Mcrory J.E., Trapp B.D., Yin X., Wang W., Woulfe J. and Stys P.K. (2003).

"Depolarization-induced Ca²⁺ release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca²⁺ channel activation of ryanodine receptors." *Neuron*, 40: 1 53-63

Ozols J. and Caron J.M. (1997).

"Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation." *Mol Biol Cell*, 8: 4 637-45

Ozon S., Byk T. and Sobel A. (1998).

"SCLIP: a novel SCG10-like protein of the stathmin family expressed in the nervous system." *J Neurochem*, 70: 6 2386-96

Ozon S., El Mestikawy S. and Sobel A. (1999).

"Differential, regional, and cellular expression of the stathmin family transcripts in the adult rat brain." *J Neurosci Res*, 56: 5 553-64

Ozon S., Guichet A., Gavet O., Roth S. and Sobel A. (2002).

"Drosophila stathmin: a microtubule-destabilizing factor involved in nervous system formation." *Mol Biol Cell*, 13: 2 698-710

Ozon S., Maucuer A. and Sobel A. (1997).

"The stathmin family -- molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system." *Eur J Biochem*, 248: 3 794-806

- P -

Panda D., Miller H.P., Banerjee A., Luduena R.F. and Wilson L. (1994).

"Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 24 11358-62

Pannaccione A., Secondo A., Scorziello A., Cali G., Tagliatela M. and Annunziato L. (2005).

"Nuclear factor-kappaB activation by reactive oxygen species mediates voltage-gated K⁺ current enhancement by neurotoxic beta-amyloid peptides in nerve growth factor-differentiated PC-12 cells and hippocampal neurones." *J Neurochem*, 94: 3 572-86

Paradis E., Douillard H., Koutroumanis M., Goodyer C. and Leblanc A. (1996).

"Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons." *J Neurosci*, 16: 23 7533-9

Parent A., Linden D.J., Sisodia S.S. and Borchelt D.R. (1999).

"Synaptic transmission and hippocampal long-term potentiation in transgenic mice expressing FAD-linked presenilin 1." *Neurobiol Dis*, 6: 1 56-62

Parvathy S., Hussain I., Karran E.H., Turner A.J. and Hooper N.M. (1998).

"Alzheimer's amyloid precursor protein alpha-secretase is inhibited by hydroxamic acid-based zinc metalloprotease inhibitors: similarities to the angiotensin converting enzyme secretase." *Biochemistry*, 37: 6 1680-5

Parvathy S., Hussain I., Karran E.H., Turner A.J. and Hooper N.M. (1999).

"Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells." *Biochemistry*, 38: 30 9728-34

Parysek L.M., Wolosewick J.J. and Olmsted J.B. (1984).

"MAP 4: a microtubule-associated protein specific for a subset of tissue microtubules." *J Cell Biol*, 99: 6 2287-96

Pasinetti G.M. and Aisen P.S. (1998).

"Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain." *Neuroscience*, 87: 2 319-24

Pasmantier R., Danoff A., Fleischer N. and Schubart U.K. (1986).

"P19, a hormonally regulated phosphoprotein of peptide hormone-producing cells: secretagogue-induced phosphorylation in AtT-20 mouse pituitary tumor cells and in rat and hamster insulinoma cells." *Endocrinology*, 119: 3 1229-38

Paturle-Lafanechère L., Eddé B., Denoulet P., Van Dorsselar A., Mazarguil H., J.P. L.C., Wehland J. and D. J. (1991).

"Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated." *Biochemistry*, 30: 10523-8

Peschanski M., Hirsch E., Dusart I., Doye V., Marty S., Manceau V. and Sobel A. (1993).

"Stathmin: cellular localization of a major phosphoprotein in the adult rat and human CNS." *J Comp Neurol*, 337: 4 655-68

Pettit D.L., Shao Z. and Yakel J.L. (2001).

"beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice." *J Neurosci*, 21: 1 RC120

Peyron J.F., Aussel C., Ferrua B., Haring H. and Fehlmann M. (1989).
"Phosphorylation of two cytosolic proteins. An early event of T-cell activation." *Biochem J*, 258: 2 505-10

Pike C.J., Burdick D., Walencewicz A.J., Glabe C.G. and Cotman C.W. (1993).
"Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state." *J Neurosci*, 13: 4 1676-87

Pike C.J., Cummings B.J., Monzavi R. and Cotman C.W. (1994).
"Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease." *Neuroscience*, 63: 2 517-31

Pike C.J., Walencewicz A.J., Glabe C.G. and Cotman C.W. (1991).
"Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures." *Eur J Pharmacol*, 207: 4 367-8

Pockett S. and Figuero A. (1993).
"Long-term potentiation and depression in the ventral horn of rat spinal cord in vitro." *Neuroreport*, 4: 1 97-9

Podlisny M.B., Ostaszewski B.L., Squazzo S.L., Koo E.H., Rydell R.E., Teplow D.B. and Selkoe D.J. (1995).
"Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture." *J Biol Chem*, 270: 16 9564-70

Pollard H.B., Rojas E. and Arispe N. (1993).
"A new hypothesis for the mechanism of amyloid toxicity, based on the calcium channel activity of amyloid beta protein (A beta P) in phospholipid bilayer membranes." *Ann N Y Acad Sci*, 695: 165-8

Price S.A., Held B. and Pearson H.A. (1998).
"Amyloid beta protein increases Ca²⁺ currents in rat cerebellar granule neurones." *Neuroreport*, 9: 3 539-45

- Q -

Qian J. and Noebels J.L. (2001).
"Presynaptic Ca²⁺ channels and neurotransmitter release at the terminal of a mouse cortical neuron." *J Neurosci*, 21: 11 3721-8

- R -

Rabizadeh S., Bitler C.M., Butcher L.L. and Bredesen D.E. (1994).
"Expression of the low-affinity nerve growth factor receptor enhances beta-amyloid peptide toxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 22 10703-6

Raff E.C., Fackenthal J.D., Hutchens J.A., Hoyle H.D. and Turner F.R. (1997).
"Microtubule architecture specified by a beta-tubulin isoform." *Science*, 275: 5296 70-3

Ramaroson H., Helmer C., Barberger-Gateau P., Letenneur L. and Dartigues J.F. (2003).

"[Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]." *Rev Neurol (Paris)*, 159: 4 405-11

Raymond C.R., Ireland D.R. and Abraham W.C. (2003).

"NMDA receptor regulation by amyloid-beta does not account for its inhibition of LTP in rat hippocampus." *Brain Res*, 968: 2 263-72

Redeker V., Lachkar S., Siavoshian S., Charbaut E., Rossier J., Sobel A. and Curmi P.A. (2000).

"Probing the native structure of stathmin and its interaction domains with tubulin. Combined use of limited proteolysis, size exclusion chromatography, and mass spectrometry." *J Biol Chem*, 275: 10 6841-9

Redeker V., Levilliers N., Schmitter J.M., Le Caer J.P., Rossier J., Adoutte A. and Bre M.H. (1994).

"Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules." *Science*, 266: 5191 1688-91

Redeker V., Melki R., Prome D., Le Caer J.P. and Rossier J. (1992).

"Structure of tubulin C-terminal domain obtained by subtilisin treatment. The major alpha and beta tubulin isotypes from pig brain are glutamylated." *FEBS Lett*, 313: 2 185-92

Regnard C., Desbruyeres E., Denoulet P. and Eddé B. (1999).

"Tubulin polyglutamylase: isozymic variants and regulation during the cell cycle in HeLa cells." *J Cell Sci*, 112 (Pt 23): 4281-9

Reid C.A., Bekkers J.M. and Clements J.D. (1998).

"N- and P/Q-type Ca²⁺ channels mediate transmitter release with a similar cooperativity at rat hippocampal autapses." *J Neurosci*, 18: 8 2849-55

Reyes A.E., Chacon M.A., Dinamarca M.C., Cerpa W., Morgan C. and Inestrosa N.C. (2004).

"Acetylcholinesterase-Abeta complexes are more toxic than Abeta fibrils in rat hippocampus: effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis, and neuronal cell loss." *Am J Pathol*, 164: 6 2163-74

Ribaut-Barassin C., Moussaoui S., Brugg B., Haeberle A.M., Huber G., Imperato A., Delhay-Bouchaud N., Mariani J. and Bailly Y.J. (2000).

"Hemisynaptic distribution patterns of presenilins and beta-APP isoforms in the rodent cerebellum and hippocampus." *Synapse*, 35: 2 96-110

Riley K.P., Snowdon D.A. and Markesbery W.R. (2002).

"Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: findings from the Nun Study." *Ann Neurol*, 51: 5 567-77

Ringheim G.E., Szczepanik A.M., Petko W., Burgher K.L., Zhu S.Z. and Chao C.C. (1998).

"Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex." *Brain Res Mol Brain Res*, 55: 1 35-44

Roberts S.B., Ripellino J.A., Ingalls K.M., Robakis N.K. and Felsenstein K.M. (1994).
"Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase." *J Biol Chem*, 269: 4 3111-6

Rogers G.C., Chui K.K., Lee E.W., Wedaman K.P., Sharp D.J., Holland G., Morris R.L. and Scholey J.M. (2000).
"A kinesin-related protein, KRP(180), positions prometaphase spindle poles during early sea urchin embryonic cell division." *J Cell Biol*, 150: 3 499-512

Rogers J., Cooper N.R., Webster S., Schultz J., Mcgeer P.L., Styren S.D., Civin W.H., Brachova L., Bradt B., Ward P. and Et Al. (1992).
"Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 21 10016-20

Roghani M., Becherer J.D., Moss M.L., Atherton R.E., Erdjument-Bromage H., Arribas J., Blackburn R.K., Weskamp G., Tempst P. and Blobel C.P. (1999).
"Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity." *J Biol Chem*, 274: 6 3531-40

Roher A.E., Chaney M.O., Kuo Y.M., Webster S.D., Stine W.B., Haverkamp L.J., Woods A.S., Cotter R.J., Tuohy J.M., Krafft G.A., Bonnell B.S. and Emmerling M.R. (1996).
"Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease." *J Biol Chem*, 271: 34 20631-5

Rohn T.T., Head E., Nesse W.H., Cotman C.W. and Cribbs D.H. (2001a).
"Activation of caspase-8 in the Alzheimer's disease brain." *Neurobiol Dis*, 8: 6 1006-16

Rohn T.T., Head E., Su J.H., Anderson A.J., Bahr B.A., Cotman C.W. and Cribbs D.H. (2001b).
"Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease." *Am J Pathol*, 158: 1 189-98

Rosenbaum J. (2000).
"Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last." *Curr Biol*, 10: 21 R801-3

Rousseau E., Dehay B., Ben-Haiem L., Trottier Y., Morange M. and Bertolotti A. (2004).
"Targeting expression of expanded polyglutamine proteins to the endoplasmic reticulum or mitochondria prevents their aggregation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 26 9648-53

Rowan M.J., Klyubin I., Wang Q. and Anwyl R. (2004).
"Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid beta-protein on synaptic plasticity." *Exp Gerontol*, 39: 11-12 1661-7

- S -

Saleshando G. and O'connor J.J. (2000).

"SB203580, the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor blocks the inhibitory effect of beta-amyloid on long-term potentiation in the rat hippocampus." *Neurosci Lett*, 288: 2 119-22

Sawada M., Kondo N., Suzumura A. and Marunouchi T. (1989).

"Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture." *Brain Res*, 491: 2 394-7

Scharnagl H., Tisljar U., Winkler K., Huttinger M., Nauck M.A., Gross W., Wieland H., Ohm T.G. and Marz W. (1999).

"The betaA4 amyloid peptide complexes to and enhances the uptake of beta-very low density lipoproteins by the low density lipoprotein receptor-related protein and heparan sulfate proteoglycans pathway." *Lab Invest*, 79: 10 1271-86

Scherzinger E., Lurz R., Turmaine M., Mangiarini L., Hollenbach B., Hasenbank R., Bates G.P., Davies S.W., Lehrach H. and Wanker E.E. (1997).

"Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo." *Cell*, 90: 3 549-58

Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T.D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy-Lahad E., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R., Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D. and Younkin S. (1996).

"Secreted amyloid 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." *Nat Med*, 2: 8 864-70

Schoonenboom N.S., Mulder C., Van Kamp G.J., Mehta S.P., Scheltens P., Blankenstein M.A. and Mehta P.D. (2005).

"Amyloid beta 38, 40, and 42 species in cerebrospinal fluid: more of the same?" *Ann Neurol*, 58: 1 139-42

Schubart U.K. (1982).

"Regulation of protein phosphorylation in hamster insulinoma cells. Identification of Ca²⁺-regulated cytoskeletal and cAMP-regulated cytosolic phosphoproteins by two-dimensional electrophoresis." *J Biol Chem*, 257: 20 12231-8

Schubart U.K., Banerjee M.D. and Eng J. (1989).

"Homology between the cDNAs encoding phosphoprotein p19 and SCG10 reveals a novel mammalian gene family preferentially expressed in developing brain." *DNA*, 8: 6 389-98

Schubart U.K., Xu J., Fan W., Cheng G., Goldstein H., Alpini G., Shafritz D.A., Amat J.A., Farooq M., Norton W.T. and Et Al. (1992).

"Widespread differentiation stage-specific expression of the gene encoding phosphoprotein p19 (metablastin) in mammalian cells." *Differentiation*, 51: 1 21-32

Schubart U.K., Yu J., Amat J.A., Wang Z., Hoffmann M.K. and Edelman W. (1996).

"Normal development of mice lacking metablastin (P19), a phosphoprotein implicated in cell cycle regulation." *J Biol Chem*, 271: 24 14062-6

Schwartz L.M. and Osborne B.A. (1995).

"Cell death." *Methods Cell Biol*, 46: xv-xviii

Seilheimer B., Bohrmann B., Bondolfi L., Muller F., Stuber D. and Dobeli H. (1997).
"The toxicity of the Alzheimer's beta-amyloid peptide correlates with a distinct fiber morphology." *J Struct Biol*, 119: 1 59-71

Selkoe D.J. (1994).
"Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease." *Annu Rev Cell Biol*, 10: 373-403

Selkoe D.J. (1998).
"The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease." *Trends Cell Biol*, 8: 11 447-53

Selkoe D.J. (1999).
"Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease." *Nature*, 399: 6738 Suppl A23-31

Selkoe D.J. (2003).
"Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman." *Neurochem Res*, 28: 11 1705-13

Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Esch F., Lee M., Dovey H., Davis D., Sinha S., Schlossmacher M., Whaley J., Swindlehurst C. and Et Al. (1992).
"Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids." *Nature*, 359: 6393 325-7

Shah S., Lee S.F., Tabuchi K., Hao Y.H., Yu C., Laplant Q., Ball H., Dann C.E., 3rd, Sudhof T. and Yu G. (2005).
"Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor." *Cell*, 122: 3 435-47

Shen Y., Li R., Mcgeer E.G. and Mcgeer P.L. (1997).
"Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain." *Brain Res*, 769: 2 391-5

Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K. and Et Al. (1995).
"Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature*, 375: 6534 754-60

Shimohama S. and Kihara T. (2001).
"Nicotinic receptor-mediated protection against beta-amyloid neurotoxicity." *Biol Psychiatry*, 49: 3 233-9

Shiomura Y. and Hirokawa N. (1987).
"The molecular structure of microtubule-associated protein 1A (MAP1A) in vivo and in vitro. An immunoelectron microscopy and quick-freeze, deep-etch study." *J Neurosci*, 7: 5 1461-9

Shoji M., Golde T.E., Ghiso J., Cheung T.T., Estus S., Shaffer L.M., Cai X.D., Mckay D.M., Tintner R., Frangione B. and Et Al. (1992).

"Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing." *Science*, 258: 5079 126-9

Shoji M., Iwakami N., Takeuchi S., Waragai M., Suzuki M., Kanazawa I., Lippa C.F., Ono S. and Okazawa H. (2000).

"JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation." *Brain Res Mol Brain Res*, 85: 1-2 221-33

Shore V.G. and Shore B. (1973).

"Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components." *Biochemistry*, 12: 3 502-7

Simmons L.K., May P.C., Tomaselli K.J., Rydel R.E., Fuson K.S., Brigham E.F., Wright S., Lieberburg I., Becker G.W., Brems D.N. and Et Al. (1994).

"Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro." *Mol Pharmacol*, 45: 3 373-9

Sinha S., Anderson J.P., Barbour R., Basi G.S., Caccavello R., Davis D., Doan M., Dovey H.F., Frigon N., Hong J., Jacobson-Croak K., Jewett N., Keim P., Knops J., Lieberburg I., Power M., Tan H., Tatsuno G., Tung J., Schenk D., Seubert P., Suomensaaari S.M., Wang S., Walker D., Zhao J., Mcconlogue L. and John V. (1999).

"Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." *Nature*, 402: 6761 537-40

Sisodia S.S. (1992).

"Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 13 6075-9

Slunt H.H., Thinakaran G., Von Koch C., Lo A.C., Tanzi R.E. and Sisodia S.S. (1994).

"Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP)." *J Biol Chem*, 269: 4 2637-44

Smith R.P., Higuchi D.A. and Broze G.J., Jr. (1990).

"Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein." *Science*, 248: 4959 1126-8

Snyder E.M., Nong Y., Almeida C.G., Paul S., Moran T., Choi E.Y., Nairn A.C., Salter M.W., Lombroso P.J., Gouras G.K. and Greengard P. (2005).

"Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta." *Nat Neurosci*, 8: 8 1051-8

Snyder S.W., Lador U.S., Wade W.S., Wang G.T., Barrett L.W., Matayoshi E.D., Huffaker H.J., Krafft G.A. and Holzman T.F. (1994).

"Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths." *Biophys J*, 67: 3 1216-28

Sobel A. (1991).

"Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction?" *Trends Biochem Sci*, 16: 8 301-5

Sobel A., Bouterin M.C., Beretta L., Chneiweiss H., Doye V. and Peyro-Saint-Paul H. (1989).

"Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin)." *J Biol Chem*, 264: 7 3765-72

Sobel A. and Tashjian A.H., Jr. (1983).

"Distinct patterns of cytoplasmic protein phosphorylation related to regulation of synthesis and release of prolactin by GH cells." *J Biol Chem*, 258: 17 10312-24

Sperry A.O. and Zhao L.P. (1996).

"Kinesin-related proteins in the mammalian testes: candidate motors for meiosis and morphogenesis." *Mol Biol Cell*, 7: 2 289-305

Spillantini M.G. and Goedert M. (1998).

"Tau protein pathology in neurodegenerative diseases." *Trends Neurosci*, 21: 10 428-33

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-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation." *J Biol Chem*, 278: 5 3437-45

Staubli U., Thibault O., Dilorenzo M. and Lynch G. (1989).

"Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory." *Behav Neurosci*, 103: 1 54-60

Stein R., Mori N., Matthews K., Lo L.C. and Anderson D.J. (1988).

"The NGF-inducible SCG10 mRNA encodes a novel membrane-bound protein present in growth cones and abundant in developing neurons." *Neuron*, 1: 6 463-76

Steiner H., Duff K., Capell A., Romig H., Grim M.G., Lincoln S., Hardy J., Yu X., Picciano M., Fichtler K., Citron M., Kopan R., Pesold B., Keck S., Baader M., Tomita T., Iwatsubo T., Baumeister R. and Haass C. (1999).

"A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling." *J Biol Chem*, 274: 40 28669-73

Steinmetz M.O., Kammerer R.A., Jahnke W., Goldie K.N., Lustig A. and Van Oostrum J. (2000).

"Op18/stathmin caps a kinked protofilament-like tubulin tetramer." *Embo J*, 19: 4 572-80

Steller H. (1995).

"Mechanisms and genes of cellular suicide." *Science*, 267: 5203 1445-9

Stéphan A., Laroche S. and Davis S. (2001).

"Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits." *J Neurosci*, 21: 15 5703-14

Stocker R. and Keaney J.F., Jr. (2004).

"Role of oxidative modifications in atherosclerosis." *Physiol Rev*, 84: 4 1381-478

Stokin G.B., Lillo C., Falzone T.L., Bruschi R.G., Rockenstein E., Mount S.L., Raman R., Davies P., Masliah E., Williams D.S. and Goldstein L.S. (2005).

"Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Science*, 307: 5713 1282-8

Strauss S., Bauer J., Ganter U., Jonas U., Berger M. and Volk B. (1992).

"Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients." *Lab Invest*, 66: 2 223-30

Streit W.J., Walter S.A. and Pennell N.A. (1999).

"Reactive microgliosis." *Prog Neurobiol*, 57: 6 563-81

Strohmeier R., Shen Y. and Rogers J. (2000).

"Detection of complement alternative pathway mRNA and proteins in the Alzheimer's disease brain." *Brain Res Mol Brain Res*, 81: 1-2 7-18

Sullivan K.F. (1988).

"Structure and utilization of tubulin isotypes." *Annu Rev Cell Biol*, 4: 687-716

Sullivan K.F. and Cleveland D.W. (1986).

"Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 12 4327-31

Sun M.K. and Alkon D.L. (2002).

"Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transformation and spatial memory by beta-amyloid(25-35)." *J Neurophysiol*, 87: 5 2441-9

- T -

Takasugi N., Tomita T., Hayashi I., Tsuruoka M., Niimura M., Takahashi Y., Thinakaran G. and Iwatsubo T. (2003).

"The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." *Nature*, 422: 6930 438-41

Takeda A., Yasuda T., Miyata T., Goto Y., Wakai M., Watanabe M., Yasuda Y., Horie K., Inagaki T., Doyu M., Maeda K. and Sobue G. (1998).

"Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain." *Acta Neuropathol (Berl)*, 95: 6 555-8

Tamagno E., Parola M., Guglielmotto M., Santoro G., Bardini P., Marra L., Tabaton M. and Danni O. (2003).

"Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis." *Free Radic Biol Med*, 35: 1 45-58

Tarkowski E., Blennow K., Wallin A. and Tarkowski A. (1999).

"Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia." *J Clin Immunol*, 19: 4 223-30

Tata J.R. (1966).

"Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture." *Dev Biol*, 13: 1 77-94

Terai K., Walker D.G., Mcgeer E.G. and Mcgeer P.L. (1997).

"Neurons express proteins of the classical complement pathway in Alzheimer disease." *Brain Res*, 769: 2 385-90

Terry R.D. (2000).

"Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol*, 59: 12 1118-9

Terry R.D., Masliah E., Salmon D.P., Butters N., Deteresa R., Hill R., Hansen L.A. and Katzman R. (1991).

"Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." *Ann Neurol*, 30: 4 572-80

Thibault O., Hadley R. and Landfield P.W. (2001).

"Elevated postsynaptic [Ca²⁺]_i and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity." *J Neurosci*, 21: 24 9744-56

Tian G., Lewis S.A., Feierbach B., Stearns T., Rommelaere H., Ampe C. and Cowan N.J. (1997).

"Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors." *J Cell Biol*, 138: 4 821-32

Tocco G., Freire-Moar J., Schreiber S.S., Sakhi S.H., Aisen P.S. and Pasinetti G.M. (1997).

"Maturation regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: implications for Alzheimer's disease." *Exp Neurol*, 144: 2 339-49

Togano T., Kurachi M., Watanabe M., Grenningloh G. and Igarashi M. (2005).

"Role of Ser50 phosphorylation in SCG10 regulation of microtubule depolymerization." *J Neurosci Res*, 80: 4 475-80

Tomita S., Kirino Y. and Suzuki T. (1998).

"Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism." *J Biol Chem*, 273: 11 6277-84

Trinczek B., Marx A., Mandelkow E.M., Murphy D.B. and Mandelkow E. (1993).

"Dynamics of microtubules from erythrocyte marginal bands." *Mol Biol Cell*, 4: 3 323-35

Tyszkiewicz J.P. and Yan Z. (2005).

"beta-Amyloid peptides impair PKC-dependent functions of metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortical neurons." *J Neurophysiol*, 93: 6 3102-11

- U -

Ueda K., Shinohara S., Yagami T., Asakura K. and Kawasaki K. (1997).

"Amyloid beta protein potentiates Ca²⁺ influx through L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels: a possible involvement of free radicals." *J Neurochem*, 68: 1 265-71

- V -

Vale R.D., Coppin C.M., Malik F., Kull F.J. and Milligan R.A. (1994).

"Tubulin GTP hydrolysis influences the structure, mechanical properties, and kinesin-driven transport of microtubules." *J Biol Chem*, 269: 38 23769-75

Vallée R.B. (1982).

"A taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs)." *J Cell Biol*, 92: 2 435-42

Van Der Wal E.A., Gomez-Pinilla F. and Cotman C.W. (1993).

"Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies." *Neuroreport*, 4: 1 69-72

Van Muiswinkel F.L., Raupp S.F., De Vos N.M., Smits H.A., Verhoef J., Eikelenboom P. and Nottet H.S. (1999).

"The amino-terminus of the amyloid-beta protein is critical for the cellular binding and consequent activation of the respiratory burst of human macrophages." *J Neuroimmunol*, 96: 1 121-30

Van Wagoner N.J., Oh J.W., Repovic P. and Benveniste E.N. (1999).

"Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor." *J Neurosci*, 19: 13 5236-44

Vandenabeele P. and Fiers W. (1991).

"Is amyloidogenesis during Alzheimer's disease due to an IL-1-/IL-6-mediated 'acute phase response' in the brain?" *Immunol Today*, 12: 7 217-9

Vassar R. (2002).

"Beta-secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease." *Adv Drug Deliv Rev*, 54: 12 1589-602

Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M.A., Biere A.L., Curran E., Burgess T., Louis J.C., Collins F., Treanor J., Rogers G. and Citron M. (1999).

"Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science*, 286: 5440 735-41

Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J. and Vaux D.L. (2000).

"Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell*, 102: 1 43-53

Verhagen A.M. and Vaux D.L. (2002).

"Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac." *Apoptosis*, 7: 2 163-6

Vitolo O.V., Sant'angelo A., Costanzo V., Battaglia F., Arancio O. and Shelanski M. (2002).

"Amyloid beta -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 20 13217-21

Vogelsberg-Ragaglia V., Schuck T., Trojanowski J.Q. and Lee V.M. (2001).
"PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus." *Exp Neurol*, 168: 2 402-12

- W -

Wade R.H. and Hyman A.A. (1997).
"Microtubule structure and dynamics." *Curr Opin Cell Biol*, 9: 1 12-7

Walczak C.E. and Mitchison T.J. (1996).
"Kinesin-related proteins at mitotic spindle poles: function and regulation." *Cell*, 85: 7 943-6

Walker D.G. (1998).
"Expression and regulation of complement C1q by human THP-1-derived macrophages." *Mol Chem Neuropathol*, 34: 2-3 197-218

Walker R.A., O'brien E.T., Pryer N.K., Soboeiro M.F., Voter W.A., Erickson H.P. and Salmon E.D. (1988).
"Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies." *J Cell Biol*, 107: 4 1437-48

Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condron M.M., Lomakin A., Benedek G.B., Selkoe D.J. and Teplow D.B. (1999).
"Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates." *J Biol Chem*, 274: 36 25945-52

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 beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature*, 416: 6880 535-9

Walsh D.M., Townsend M., Podlisny M.B., Shankar G.M., Fadeeva J.V., Agnaf O.E., Hartley D.M. and Selkoe D.J. (2005).
"Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (Abeta) fibrillogenesis block oligomerization of natural Abeta and thereby rescue long-term potentiation." *J Neurosci*, 25: 10 2455-62

Walsh D.M., Tseng B.P., Rydel R.E., Podlisny M.B. and Selkoe D.J. (2000).
"The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain." *Biochemistry*, 39: 35 10831-9

Walsh J.S., Welch H.G. and Larson E.B. (1990).
"Survival of outpatients with Alzheimer-type dementia." *Ann Intern Med*, 113: 6 429-34

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. (2002a).

"Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus." *Brain Res*, 924: 2 133-40

Wang H.Y., D'andrea M.R. and Nagele R.G. (2002b).

"Cerebellar diffuse amyloid plaques are derived from dendritic Abeta42 accumulations in Purkinje cells." *Neurobiol Aging*, 23: 2 213-23

Wang H.Y., Lee D.H., D'andrea M.R., Peterson P.A., Shank R.P. and Reitz A.B. (2000a).

"beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology." *J Biol Chem*, 275: 8 5626-32

Wang H.Y., Lee D.H., Davis C.B. and Shank R.P. (2000b).

"Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors." *J Neurochem*, 75: 3 1155-61

Wang Q., Rowan M.J. and Anwyl R. (2004a).

"Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide." *J Neurosci*, 24: 27 6049-56

Wang Q., Walsh D.M., Rowan M.J., Selkoe D.J. and Anwyl R. (2004b).

"Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-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: 13 3370-8

Ward R.V., Jennings K.H., Jepras R., Neville W., Owen D.E., Hawkins J., Christie G., Davis J.B., George A., Karran E.H. and Howlett D.R. (2000).

"Fractionation and characterization of oligomeric, protofibrillar and fibrillar forms of beta-amyloid peptide." *Biochem J*, 348 Pt 1: 137-44

Wasco W., Bupp K., Magendantz M., Gusella J.F., Tanzi R.E. and Solomon F. (1992).

"Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 22 10758-62

Watt J.A., Pike C.J., Walencewicz-Wasserman A.J. and Cotman C.W. (1994).

"Ultrastructural analysis of beta-amyloid-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons." *Brain Res*, 661: 1-2 147-56

Webster S., Bradt B., Rogers J. and Cooper N. (1997).

"Aggregation state-dependent activation of the classical complement pathway by the amyloid beta peptide." *J Neurochem*, 69: 1 388-98

Webster S.D., Tenner A.J., Poulos T.L. and Cribbs D.H. (1999).

"The mouse C1q A-chain sequence alters beta-amyloid-induced complement activation." *Neurobiol Aging*, 20: 3 297-304

Weidemann A., Konig G., Bunke D., Fischer P., Salbaum J.M., Masters C.L. and Beyreuther K. (1989).

"Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein." *Cell*, 57: 1 115-26

Weiss J.H., Pike C.J. and Cotman C.W. (1994).

"Ca²⁺ channel blockers attenuate beta-amyloid peptide toxicity to cortical neurons in culture." *J Neurochem*, 62: 1 372-5

Whitson J.S., Selkoe D.J. and Cotman C.W. (1989).

"Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro." *Science*, 243: 4897 1488-90

Willaime S., Vanhoutte P., Caboche J., Lemaigre-Dubreuil Y., Mariani J. and 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: 11 2037-46

Wogulis M., Wright S., Cunningham D., Chilcote T., Powell K. and Rydel R.E. (2005).

"Nucleation-dependent polymerization is an essential component of amyloid-mediated neuronal cell death." *J Neurosci*, 25: 5 1071-80

Wolfe M.S., Xia W., Ostaszewski B.L., Diehl T.S., Kimberly W.T. and Selkoe D.J. (1999).

"Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." *Nature*, 398: 6727 513-7

Wolff A., De Nechaud B., Chillet D., Mazarguil H., Desbruyeres E., Audebert S., Eddé B., Gros F. and Denoulet P. (1992).

"Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335." *Eur J Cell Biol*, 59: 2 425-32

Wood J.G. and Zinsmeister P. (1991).

"Tyrosine phosphorylation systems in Alzheimer's disease pathology." *Neurosci Lett*, 121: 1-2 12-6

Wu J., Anwyl R. and Rowan M.J. (1995).

"beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus." *Neuroreport*, 6: 17 2409-13

Wu L.G., Westenbroek R.E., Borst J.G., Catterall W.A. and Sakmann B. (1999).

"Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses." *J Neurosci*, 19: 2 726-36

Wyllie A.H., Kerr J.F. and Currie A.R. (1980).

"Cell death: the significance of apoptosis." *Int Rev Cytol*, 68: 251-306

Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L. and Dunlop D. (1984).

"Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis." *J Pathol*, 142: 1 67-77

Wyss-Coray T., Lin C., Yan F., Yu G.Q., Rohde M., Mconlogue L., Masliah E. and Mucke L. (2001).

"TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice." *Nat Med*, 7: 5 612-8

- X -

Xia M., Qin S., Mcnamara M., Mackay C. and Hyman B.T. (1997a).

"Interleukin-8 receptor B immunoreactivity in brain and neuritic plaques of Alzheimer's disease." *Am J Pathol*, 150: 4 1267-74

Xia M.Q., Bacskai B.J., Knowles R.B., Qin S.X. and Hyman B.T. (2000).

"Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease." *J Neuroimmunol*, 108: 1-2 227-35

Xia M.Q. and Hyman B.T. (1999).

"Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease." *J Neurovirol*, 5: 1 32-41

Xia W., Zhang J., Kholodenko D., Citron M., Podlisny M.B., Teplow D.B., Haass C., Seubert P., Koo E.H. and Selkoe D.J. (1997b).

"Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins." *J Biol Chem*, 272: 12 7977-82

- Y -

Yaar M., Zhai S., Pilch P.F., Doyle S.M., Eisenhauer P.B., Fine R.E. and Gilchrist B.A. (1997).

"Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease." *J Clin Invest*, 100: 9 2333-40

Yan R., Bienkowski M.J., Shuck M.E., Miao H., Tory M.C., Pauley A.M., Brashier J.R., Stratman N.C., Mathews W.R., Buhl A.E., Carter D.B., Tomasselli A.G., Parodi L.A., Heinrichson R.L. and Gurney M.E. (1999).

"Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." *Nature*, 402: 6761 533-7

Yan S.D., Chen X., Fu J., Chen M., Zhu H., Roher A., Slattery T., Zhao L., Nagashima M., Morser J., Migheli A., Nawroth P., Stern D. and Schmidt A.M. (1996).

"RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease." *Nature*, 382: 6593 685-91

Yang F., Sun X., Beech W., Teter B., Wu S., Sigel J., Vinters H.V., Frautschy S.A. and Cole G.M. (1998).

"Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease." *Am J Pathol*, 152: 2 379-89

Yang S.N., Tang Y.G. and Zucker R.S. (1999).

"Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ elevation." *J Neurophysiol*, 81: 2 781-7

Yankner B.A. (1996).

"Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease." *Neuron*, 16: 5 921-32

Yankner B.A., Dawes L.R., Fisher S., Villa-Komaroff L., Oster-Granite M.L. and Neve R.L. (1989).

"Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease." *Science*, 245: 4916 417-20

Yankner B.A., Duffy L.K. and Kirschner D.A. (1990).

"Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides." *Science*, 250: 4978 279-82

Yasojima K., Schwab C., McGeer E.G. and McGeer P.L. (1999).

"Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain." *Am J Pathol*, 154: 3 927-36

Ye L. and Qiao J.T. (1999).

"Suppressive action produced by beta-amyloid peptide fragment 31-35 on long-term potentiation in rat hippocampus is N-methyl-D-aspartate receptor-independent: it's offset by (-) huperzine A." *Neurosci Lett*, 275: 3 187-90

Younkin S.G. (1995).

"Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease." *Ann Neurol*, 37: 3 287-8

Yu G., Nishimura M., Arawaka S., Levitan D., Zhang L., Tandon A., Song Y.Q., Rogueva E., Chen F., Kawarai T., Supala A., Levesque L., Yu H., Yang D.S., Holmes E., Milman P., Liang Y., Zhang D.M., Xu D.H., Sato C., Rogaev E., Smith M., Janus C., Zhang Y., Aebersold R., Farrer L.S., Sorbi S., Bruni A., Fraser P. and St George-Hyslop P. (2000).

"Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing." *Nature*, 407: 6800 48-54

Yu H., Saura C.A., Choi S.Y., Sun L.D., Yang X., Handler M., Kawarabayashi T., Younkin L., Fedeles B., Wilson M.A., Younkin S., Kandel E.R., Kirkwood A. and Shen J. (2001).

"APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice." *Neuron*, 31: 5 713-26

Yu S.P., Farhangrazi Z.S., Ying H.S., Yeh C.H. and Choi D.W. (1998).

"Enhancement of outward potassium current may participate in beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death." *Neurobiol Dis*, 5: 2 81-8

Yuan J. and Yankner B.A. (2000).

"Apoptosis in the nervous system." *Nature*, 407: 6805 802-9

- Z -

Zambito A.M. and Wolff J. (1997).

"Palmitoylation of tubulin." *Biochem Biophys Res Commun*, 239: 3 650-4

Zhai Y., Kronebusch P.J., Simon P.M. and Borisy G.G. (1996).

"Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis." *J Cell Biol*, 135: 1 201-14

Zheng H., Jiang M., Trumbauer M.E., Sirinathsinghji D.J., Hopkins R., Smith D.W., Heavens R.P., Dawson G.R., Boyce S., Conner M.W., Stevens K.A., Slunt H.H., Sisoda S.S., Chen H.Y. and Van Der Ploeg L.H. (1995a).

"beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." *Cell*, 81: 4 525-31

Zheng Y., Wong M.L., Alberts B. and Mitchison T. (1995b).

"Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex." *Nature*, 378: 6557 578-83