



HAL
open science

Maladie d'Alzheimer : Impact extracellulaire et intracellulaire du peptide β -amyloïde sur la transmission synaptique glutamatergique

Marta Rolland

► **To cite this version:**

Marta Rolland. Maladie d'Alzheimer : Impact extracellulaire et intracellulaire du peptide β -amyloïde sur la transmission synaptique glutamatergique. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV034 . tel-01685279

HAL Id: tel-01685279

<https://theses.hal.science/tel-01685279>

Submitted on 16 Jan 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Neurosciences - Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Marta ROLLAND

Thèse dirigée par **Alain BUISSON** et
codirigée par **Fabien LANTE**

Préparée au sein de l'**institut des Neurosciences de
Grenoble INSERM U1216 – Equipe Neuropathologies et
Dysfonctions Synaptiques** dans l'**École Doctorale de Chimie et
Sciences du vivant**

Maladie d'Alzheimer : Impact extracellulaire et intracellulaire du peptide β -amyloïde sur la transmission synaptique glutamatergique

Thèse soutenue publiquement le **25 Octobre 2016**,
devant le jury composé de :

Pr. Michel VIGNES

Professeur - Université de Montpellier - **Rapporteur**

Dr. Patrick DUTAR

Directeur de recherche - CPN - Paris - **Rapporteur**

Pr. Carine ALI

Professeur – Université de Caen Normandie - **Examineur**

Dr. Antoine DEPAULIS

Directeur de recherche – Université de Grenoble Alpes – **Président du jury**

Dr. Fabien LANTE

MCF - Université de Grenoble Alpes - **Co-encadrant de thèse**

Pr. Alain BUISSON

Professeur - Université de Grenoble Alpes - **Directeur de thèse**



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu les membres de mon jury qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse et ont pris le temps de juger ce travail : Carine Ali, Michel Vignes, Patrick Dutar et Antoine Depaulis. Je remercie en particulier le Professeur Michel Vignes, malgré un emploi du temps très chargé, d'avoir accepté d'être mon rapporteur et d'avoir analysé mon manuscrit. Je remercie le Docteur Patrick Dutar, pour avoir également pris du temps pour analyser et évaluer mon travail de thèse. Un grand merci au Professeur Carine Ali d'être venue depuis Caen pour évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Antoine Depaulis pour avoir accepté de présider ce jury de thèse, mais surtout pour toutes nos autres discussions et pour sa volonté de m'aider lorsque j'en ai eu besoin. Merci encore et encore, je pense que ce sont en grande partie nos discussions, tes conseils et ton aide qui ont permis de conforter mes choix d'après thèse et de mieux « définir » ma voie !

Ma plus profonde gratitude pour Alain Buisson, mon directeur de thèse. Je te suis extrêmement reconnaissante de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de ton équipe. Trois ans pendant lesquels j'ai appris énormément autant professionnellement et scientifiquement que personnellement. De longs moments passés au labo à discuter de tout et de rien, parfois aussi de science ;) Merci pour m'avoir soutenu et aidé notamment dans les derniers mois de ma thèse lorsque le temps pressait ! Bref, j'ai été contente et ravie d'avoir un chef comme toi.

Ces travaux n'auraient certainement pas pu être effectués sans l'aide précieuse de Fabien Lanté, mon co-directeur de thèse. Je te remercie énormément de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse. Merci beaucoup de m'avoir formée au patch et de m'avoir appris tout ce que tu m'as appris ! Je te remercie énormément pour ton aide au niveau scientifique et donc pour m'avoir aidé à avancer ce projet au cours de ces trois années passées ensemble ! C'était une chance d'être formée par toi.

Un grand merci à toutes les personnes de mon équipe avec qui nous avons partagé toujours de bons moments, eu de bonnes conversations et bien souvent rigolotes ! Sylvie, ma petite compagne de bureau, merci beaucoup pour nos discussions sur tout et n'importe quoi, je pense que j'aurai du mal à trouver une meilleure compagne de bureau que toi. Et biensûr, merci à Eve d'avoir été la deuxième compagne de bureau, merci pour les discussions, les rires, etc...tout pareil ! Merci beaucoup à toi Mireille, pour ta bonne humeur de bon matin, ta sympathie, ton ouverture d'esprit, pour nos discussions, pour les nombreuses fois où tu m'as aidé pour quoi que ce soit et pour toutes les choses que tu m'as apprises juste en discutant ensemble ! Je remercie également Muriel pour sa gentillesse et sa bonne humeur constante, c'était un plaisir de discuter avec toi et de travailler en quelque sorte ensemble !

Merci beaucoup aux membres juniors de l'équipe : Antho et Adrien pour tous les moments que nous avons partagé au labo, les discussions de tout et n'importe quoi, les moments de rires...vous êtes de bons co-équipiers ;)

Je voudrais remercier également toutes les autres nombreuses personnes du labo hors équipe 12 avec qui j'ai passé des bons moments pendant les heures de travail passées au labo, en particulier l'équipe 13.

Un grand merci aux amis du labo : Elé...c'était une vraie chance de t'avoir eu à mes côtés. Ah ces vacances inoubliables à l'autre bout du monde avec toi ou à te voir bouffer des insectes... tant de moments passés ensemble ! Peut-être qu'un jour on saura sur quoi on bosse chacune^^ Ca va me manquer de ne pas te voir tous les matins... Becky, tout simplement c'était génial que tu débarques dans l'équipe et te connaître... comme quoi ce n'est jamais trop tard pour faire de belles rencontres ! ;) Merci aussi à toi Marc, pour nos discussions, nos multiples échanges, ton aide et nos fous rires ! Merci également aux amis (labo ou pas labo), Momo, Perrine, Olivia, Astrid, kata, Julia, Kev, Jojo, Laurie, Aline... et encore d'autres que je ne peux citer par soucis de place mais qui ont réalisé à même temps que moi cette traversée en y apportant quelques escales sympas.

Miki... El meu pare preferit de totes les eras del temps del espai i de tot! Todos los sabios están de acuerdo : la vida no vale nada!! Total, no es lo que farem nosaltres de la vida pero lu que ella fara de nosaltres, no?

Sisterita de la vida... Sin ti, las emociones de hoy no serían más que la piel muerta de las de ayer... :)

Y tú... Muchas veces lo que no se halla cuando se busca, sale al encuentro cuando no se busca... mi mejor historia en esos años eres tú.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) constitue la forme la plus commune de démence associée à une perte de mémoire et caractérisée par l'accumulation de plaques extracellulaires contenant des peptides bêta-amyloïdes ($A\beta$). Des études ont révélé une perte plus importante de synapses que ne peut l'expliquer la mort neuronale, suggérant qu'un déficit synaptique serait présent dès les stades initiaux de la maladie. Bien que le peptide $A\beta$ fût identifié comme un composé des plaques amyloïdes extracellulaires dans les années 1980, des études plus récentes ont mis en évidence la présence intracellulaire de ce peptide. L'accumulation d' $A\beta$ intracellulaire serait un événement antérieur à la formation des plaques séniles dans la pathogenèse de la MA et corrèlerait mieux avec les perturbations de mémoire et d'apprentissage caractéristiques de cette maladie. De plus, des données mettent en évidence la responsabilité des formes oligomériques solubles d' $A\beta$ ($A\beta_o$) dans les événements précoces de la MA. Ce projet vise à mieux comprendre et caractériser l'impact extracellulaire et intracellulaire des peptides $A\beta_o$ et le lien fonctionnel de leurs effets sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus mnésiques affectés dans la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, il nous a paru essentiel d'étudier l'impact extracellulaire et intracellulaire des oligomères d' $A\beta$ sur la transmission synaptique. Ces travaux ont été effectués sur culture primaire de neurones corticaux et sur tranche de cortex de souris par des méthodes d'électrophysiologie via la technique de patch-clamp.

Nous avons analysé la fréquence et l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs spontanés (sEPSC) des principaux récepteurs impliqués dans la transmission glutamatergique et dans les mécanismes moléculaires à la base de la mémoire et de l'apprentissage : les récepteurs AMPA et NMDA. Nos données montrent que les peptides $A\beta_o$ dans le milieu extracellulaire (e $A\beta_o$) ou dans le milieu intracellulaire (i $A\beta_o$), affectent spécifiquement les courants associés à l'activation des récepteurs NMDA au niveau postsynaptique sans altérer les courants AMPA. L'application dans le milieu extracellulaire d' $A\beta_o$ réduit l'amplitude des courants NMDA. Ce phénomène n'est pas lié à la pénétration du peptide $A\beta_o$ dans les neurones mais à l'activation par l' $A\beta_o$ de la voie amyloïdogénique induisant une accumulation intrasynaptique d' $A\beta_o$ responsable de la réduction des courants NMDA.

L'ensemble de ces données suggère que l' $A\beta_o$ perturbe le processing d'APP menant à une production intracellulaire d' $A\beta_o$ responsable de la réduction de la transmission glutamatergique NMDA-dépendante. Une étape essentielle afin d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires qui sont à la base des altérations synaptiques glutamatergiques dans la MA est d'approfondir le lien fonctionnel entre les effets extracellulaire et intracellulaire des peptides $A\beta_o$.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia associated with memory loss and characterized by an accumulation of extracellular plaques composed of amyloid-beta peptides ($A\beta$). Studies have revealed a greater loss of synapses than the neuronal death can explain, suggesting that a synaptic deficit would be present from the early stages of the disease. Although the $A\beta$ peptide has been identified as a component of the extracellular amyloid plaques in the 1980s, recent studies have highlighted the intracellular presence of this peptide. The intracellular accumulation of $A\beta$ precedes the appearance of amyloid plaques in the pathogenesis of AD and seems to be correlated with the memory and learning troubles, characteristic of this disease. Moreover, some data highlight the responsibility of the soluble oligomeric $A\beta$ form ($A\beta_o$) in the early events of AD. This project aims to better understand and characterize the extracellular and intracellular impact of $A\beta_o$ peptides and the functional link of their effects on the molecular mechanisms involved in memory processes affected in AD. In this context, it was essential to study the extracellular and intracellular impact of $A\beta$ oligomers on synaptic transmission. This work was carried out on cultures of primary cortical neurons and mouse cortex slices using electrophysiological methods via the patch-clamp technique.

We have recorded the spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC) frequency and amplitude from the main receptors implicated in the glutamatergic transmission and in the molecular mechanisms underlying memory and learning processes: AMPA and NMDA receptors. Our data show that external or internal application of $A\beta_o$ peptides affect specifically the currents associated with NMDA receptors at a postsynaptic level without altering the AMPA currents. The external application of $A\beta_o$ reduces the NMDA current amplitude. This phenomenon is not due to the penetration of the $A\beta_o$ peptide into the neurons but rather to the activation of the amyloidogenic pathway by $A\beta_o$ inducing an intracellular accumulation of $A\beta_o$ responsible of the NMDA current reduction.

All these data suggest that $A\beta_o$ perturb the processing of APP leading to an intracellular $A\beta_o$ production responsible of the glutamatergic NMDA-dependent transmission reduction. An essential step in order to improve our understanding of the molecular mechanisms underlying the altered glutamatergic synaptic alterations found in AD is to deepen the functional link between the extracellular and intracellular effects of the $A\beta_o$ peptides.

Liste des abréviations

A β : Peptide β -amyloïde
A β _o : Peptide β -amyloïde oligomérique
ADAM : A disintegrin and metalloproteinase
ADDL/ A β -derived diffusible ligand / synonyme d'A β _o.
AICD : APP Intracellular Domain
AMP : Adénosine monophosphate
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate
AP5 : Acide _{D,L}-2-amino-5-phosphonopentanoïque
APOE : Apolipoprotéine E
APP : Amyloid precursor protein / protéine précurseur du peptide β -amyloïde
ATP : Adenosine tri-phosphate
BACE-1: β -site APP-cleaving enzyme 1
CA1 : Région de la corne d'Ammon 1
CA3 : Région de la corne d'Ammon 3
CaMKII : Calcium / calmoduline kinase dépendante 2
C-ter : C-terminale
CREB : cAMP response element-binding protein / facteur de transcription activé par Erk
DNF : Dégénérescence neurofibrillaire
ERK : Extracellular-signal Regulated Kinase / protéine kinase régulée par signal extracellulaire
GSK3 β : Glycogène synthase kinase-3 β
KO : Knock-out
LCR / Liquide céphalo-rachidien
LTD : Long term depression / dépression à long terme
LTP : Long term potentiation / potentialisation à long terme
MA : Maladie d'Alzheimer
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
N-ter : N-terminal
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PP1 : Protéine Phosphatase 1
PP2A : Protéine Phosphatase 2A
PP2B : Protéine Phosphatase 2B
PPSE : Potentiel postsynaptique excitateur
PS1/PS2 : préséniline 1/2
PSD : Post Synaptic Density / Densité post-synaptique
R-AMPA : Récepteurs AMPA
R-NMDA : Récepteurs NMDA
Ser : Sérine
TTX : Tétródotoxine

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Partie I – La Maladie d’Alzheimer	2
1- Généralités	2
1-1 Un problème mondial de santé majeur	2
1-2 La démence	2
1-3 Statistiques	3
2- Les différentes formes de la Maladie d’Alzheimer	3
2-1 Formes familiales	3
2-1.1 PS1 et PS2	4
2-1.2 APP	4
2-2 Formes sporadiques	5
2-2.1 L’apolipoprotéine E (APOE)	5
2-2.2 Autres facteurs génétiques	6
2-2.3 Facteurs environnementaux	6
3- Caractéristiques histopathologiques	6
3-1 Historique	6
3-2 Physiopathologie	7
3-2.1 Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)	9
3-2.2 Les plaques séniles	9
Partie II – L’amyloïdogénèse	11
1- Synthèse du peptide A β	11
1-1 Voie non-amyloïdogénique et α -sécrétase	11
1-2 Voie amyloïdogénique, β et γ -sécrétases	12
1-3 Voie η -sécrétase	13
1-4 Trafic, processing de l’APP et localisation du peptide A β	14
2- Dégradation et élimination du peptide A β	18
3- Rôle physiologique et toxique du peptide A β	19
4- Les différentes formes du peptide A β	19
5- Les mutations affectant la production du peptide A β	21
6- Les approches thérapeutiques	22

7- La maladie d'Alzheimer : A β intracellulaire Vs A β extracellulaire et synaptotoxicité	24
Partie III – La synapse glutamatergique	28
1- La neurotransmission glutamatergique	28
1-1 Les récepteurs métabotropiques	28
1-2 Les récepteurs ionotropiques	31
1-2.1 Le récepteur AMPA	33
1-2.2 Le récepteur NMDA	35
1-2.3 Les partenaires des récepteurs AMPA et NMDA	38
2- Implication des récepteurs AMPA et NMDA dans la plasticité synaptique	40
2-1 Modèle d'étude - LTP	41
2-2 Modèle d'étude - LTD	44
2-3 Formes de plasticité fonctionnelle et structurale	45
Partie IV – La pathologie amyloïde et son impact sur la neurotransmission glutamatergique	46
1- Impact du peptide A β sur les mécanismes à la base de la neurotransmission	46
1-1 Atteinte des synapses	46
1-2 Altérations du cytosquelette d'actine	47
2- Impact extracellulaire du peptide A β sur la neurotransmission glutamatergique	48
2-1 Perturbations de l'activité synaptique et cognitive	48
2-2 Altérations du nombre et du fonctionnement des récepteurs synaptiques	49
2-3 Altérations de la plasticité synaptique	49
3- Impact intracellulaire du peptide A β sur la neurotransmission glutamatergique	49
3-1 L'accumulation intraneuronale d'A β : un événement précoce dans la MA	52
3-2 Formes intraneuronales d'A β oligomérique	53
3-3 Localisation intraneuronale de l'A β et conséquences de son accumulation	53
4- Relation entre les effets extracellulaires et intracellulaires du peptide A β ?	54
4-1 Origines de l'A β intracellulaire	54
4-2 Relation fonctionnelle des pools extracellulaire et intracellulaire d'A β	55
Partie V – Introduction méthodologique de la technique de «patch-clamp»	57
1- Généralités sur les principes d'électricité	57
1-1 Potentiel électrique de la membrane plasmique	57
1-2 Potentiel de repos membranaire : polarisation	58

1-3 Fonction de signalisation des potentiels membranaires	59
2- Techniques électrophysiologiques	59
2-1 Le « patch-clamp »	59
2-2 La configuration « whole-cell »	61
OBJECTIFS	62
RESULTATS	65
Partie I – Introduction de l’article	66
Partie II – Article - Reduction of synaptic NMDA currents induced by Amyloid- β oligomers requires APP processing and an intraneuronal accumulation of Amyloid- β oligomers	68
DISCUSSION - PERSPECTIVES	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107

INTRODUCTION

Partie I – La maladie d’Alzheimer

1- Généralités

1-1 Un problème mondial de santé majeur

Avec le vieillissement de leur population, les pays développés et en voie de développement font face au défi sociétal et économique majeur que représentent les maladies neurodégénératives. L’émergence de ces pathologies, sont caractéristiques des sociétés vieillissantes. Entre 2000 et 2050, le nombre de personnes âgées de plus de 60 ans devrait augmenter de 65 millions à deux milliards. Une croissance aussi rapide exigera dans la plupart des pays des mesures importantes au niveau économique, social et médical. Cette augmentation de la proportion du nombre de personnes âgées est une conséquence d’une «transition démographique» correspondant à un déclin de la mortalité et de la fécondité.

L’une des principales conséquences de ce vieillissement mondial est l’émergence de pathologies telles que les démences.

1-2 La démence

La démence est un syndrome chronique et évolutif, dans lequel les capacités cognitives des individus sont affectées de manière plus importante que celles que l’on pourrait attendre du vieillissement normal. Ces fonctions cognitives telles que la mémoire, les capacités d’apprentissage, le raisonnement, l’orientation et l’attention se dégradent progressivement et irréversiblement et peuvent déclencher des perturbations sensorielles, motrices et comportementales. Par conséquent, les démences affectent l’autonomie des personnes âgées et représentent un problème de santé public majeur de par les conséquences sociales et économiques considérables qu’elles engendrent en termes de coûts médicaux et de dépenses sociales. Plusieurs types de démences existent, certaines sont classifiables et diffèrent selon les causes qui les provoquent.

L’émergence de la Maladie d’Alzheimer (MA) a suscité énormément d’intérêt de la part des recherches scientifiques et de la médecine. Inconnue du grand public il y a environ quatre décennies, la MA est actuellement à l’origine de la majorité des démences rencontrées chez les personnes âgées, soit entre 60 et 70% des cas de démence. Cette pathologie neurodégénérative débute généralement par des déficits marqués de la mémoire suivis par une atteinte progressive de l’ensemble des fonctions cognitives telles que le langage, le jugement et l’humeur et s’en suit le décès du malade.

1-3 Statistiques

Depuis le début des années 1980, la communauté scientifique et les professionnels de santé se sont concentrés sur l'identification des symptômes, des causes, des facteurs de risques ainsi que des potentiels traitements pour la MA. Bien que les avancées sur cette maladie soient considérables, les altérations biologiques conduisant à l'apparition de cette pathologie sont encore méconnues à l'exception des formes héréditaires de la MA.

D'après le World Alzheimer Report, il a été estimé à 46,8 millions le nombre de personnes vivant avec une démence actuellement dans le monde, nombre qui sera doublé dans 20 ans et presque triplé en 2050. Ces nouvelles estimations sont 13% plus élevées que celles réalisées pour le Rapport Mondial Alzheimer en 2009. Environ 70% de ces cas seraient attribués à la MA.

D'après France Alzheimer & maladies apparentées, en France, plus de 850 000 personnes sont touchées par la MA ou une maladie apparentée. Il est estimé qu'une personne sur quatre âgée de plus de 65 ans sera atteinte par la MA en 2020, constituant une véritable pandémie.

2- Les différentes formes de la Maladie d'Alzheimer

Pendant des années, la MA était classée en deux cas cliniques en fonction de l'âge de déclaration de la pathologie. Lorsque la MA était déclarée chez une personne âgée de moins de 65 ans elle était considérée comme une « démence présénile » alors qu'une démence similaire déclarée chez une personne de plus de 65 ans était considérée comme une « démence sénile de type Alzheimer » (Roth et al., 1967, 1966; Tomlinson et al., 1970). A ce jour, il n'y a pas de preuves formelles montrant que la MA soit différente selon l'âge d'apparition. Plus récemment, la recherche épidémiologique, la neuro-imagerie et la neuropathologie de la MA montrent qu'il s'agit d'une maladie multifactorielle. Notamment, des facteurs génétiques sont responsables de la « **forme familiale** » et généralement précoce de la MA, alors que d'autres facteurs tels que des facteurs environnementaux semblent être responsables des « **formes sporadiques** » généralement plus tardives. Néanmoins, l'âge semble être un facteur déterminant dans le développement de la MA et peut refléter l'effet cumulatif de facteurs de risques accumulés au cours de la vie.

2-1 Formes familiales

Les formes familiales représentent 5% des cas de la MA, elles sont caractérisées par une apparition précoce entre 40 et 50 ans (Bertram and Tanzi, 2005) et sont liées à des mutations autosomiques dominantes induisant le développement de la maladie chez les personnes possédant ces mutations.

La majorité des cas de MA est donc d'origine sporadique avec une large hétérogénéité des profils de facteurs de risques qui ont été identifiés comme facilitant le développement de la MA.

2-1.1 PS1 et PS2

Une mutation autosomale dominante sur l'un des gènes situés sur les chromosomes 21, 14 et 1, respectivement le gène codant pour le précurseur de la protéine amyloïde (APP : amyloid precursor protein), la présiniline 1 (PS1) et celui codant pour la présiniline 2 (PS2) est suffisant pour développer la forme familiale de la MA (tableau 1) (Selkoe, 2011, 1997). Ces gènes codent pour des enzymes impliquées dans la génèse des peptides A β , une mutation sur un de ces 3 gènes affecte la production, le métabolisme et la stabilité des peptides A β retrouvés dans le cerveau des patients (voir Partie II.5).

Plus précisément, les présinilines PS1 et PS2 font parti du complexe de la γ -sécrétase nécessaire à la production du peptide A β . Des mutations sur ces gènes vont altérer le processus de formation du peptide A β en faveur d'une augmentation de la synthèse et de l'agrégation. Par exemple, la mutation sur le gène codant pour la PS1 est caractérisé par le remplacement de la leucine en position 166 par une proline et aboutit à la plus forte production d'A β_{1-42} en comparaison aux autres formes autosomales de la MA (Moehlmann et al., 2002).

2-1.2 APP

Les mutations sur le gène codant pour l'APP ont été découvertes à partir d'une observation faite sur des individus atteints de trisomie 21 qui présentaient des similitudes neuropathologiques avec les patients atteints de la MA. Ceci a soulevé des questions sur l'existence d'éventuels gènes sur le chromosome 21 impliqués dans le développement de la MA. En 1991, une région contenant le gène de l'APP a été identifiée et a permis de mettre en évidence la première mutation impliquée dans une forme autosomique dominante de la MA (Goate et al., 1991). Actuellement, sur les 30 mutations observées sur le gène APP, 25 sont pathogéniques et mènent à une surproduction d'A β . En effet, la plupart des mutations dans le gène de l'APP sont des mutations localisées au niveau des sites de coupures des sécrétases (α , β , γ). **Ce type de mutations conditionne le clivage de l'APP et par conséquent la production de peptide A β et favoriserait également des états particuliers d'agrégation de ce peptide** (Streltsov et al., 2011).

Plus récemment, un allèle de l'APP, la version « APP A673T (Icelandic) » a été montré comme constituant un facteur neuroprotecteur contre la MA et les individus possédant cette mutation présentent un meilleur vieillissement cognitif que les personnes ne possédant pas cette mutation. Il a été montré que cette version du gène induit au niveau protéique une forte diminution (40%) de la production du peptide A β via une réduction du clivage par la β -sécrétase BACE-1 au niveau de l'APP (Jonsson et al., 2012; Kero et al., 2013).

Chromosome	Gène muté	Phénotype
21	APP	↑ Production des peptides $A\beta_{1-42}$
14	PS1	↑ Production des peptides $A\beta_{1-42}$
1	PS2	↑ Production des peptides $A\beta_{1-42}$

Tableau 1 : Facteurs génétiques principaux prédisposant à la maladie d'Alzheimer

L'identification de l'ensemble de ces mutations pathogènes découvertes chez les patients souffrant de la MA a permis la génération de nombreux modèles animaux transgéniques (Selkoe and Hardy, 2016). En dépit du fait que ces animaux ne reflètent pas la totalité de la pathologie humaine, ils permettant d'étudier les aspects clés de la maladie.

2-2 Formes sporadiques

2-2.1 L'apoplipoprotéine E (APOE)

Les variations alléliques du gène codant pour l'Apoplipoprotéine E (APOE, protéine sérique transporteuse du cholestérol) localisé sur le chromosome 19, représentent le facteur de risque génétique le plus important prédisposant à développer la MA (Strittmatter et al., 1993). Le gène APOE possède trois variants alléliques : l'allèle APO ϵ 2 (5-10%), l'allèle APO ϵ 3 (70-75%) et l'allèle APO ϵ 4 (15-20%). **Il a été démontré que l'allèle APO ϵ 4 augmente de 20% le risque d'incidence de la MA** (Corder et al., 1994) et est associé aux formes précoce et tardive de de la MA (Borgaonkar et al., 1993; van Duijn et al., 1994). La présence d'un seul allèle ϵ 4 augmente le risque d'incidence de la MA de 3 fois alors que deux copies de ce même allèle l'augmente de 12 fois (Michaelson, 2014). Le gène APOE code pour une protéine essentielle dans le métabolisme des lipides mais également dans la clairance hépatique du peptide β -amyloïde ($A\beta$) (Kline, 2012). Notamment, une étude a montré que les patients atteints de la MA par APO ϵ 4 présentaient une quantité plus faible de peptides $A\beta$ dans le LCR (liquide céphalo-rachidien) que les patients sains, mais que ce peptide se trouvait sous forme oligomérique, suggérant un lien entre APO ϵ 4 et les formes oligomériques du peptide $A\beta$ (Tai et al., 2013). D'un autre côté, des données montrent que la présence du variant allélique APO ϵ 2 confère un rôle neuroprotecteur contrairement à son homologue APO ϵ 4 (Corder et al., 1994).

2-2.2 Autres facteurs génétiques

Jusqu'en 2009, la mutation du gène codant pour l'APO ϵ 4 était le seul facteur génétique de risque connu pour la MA (tableau 1). Actuellement, 18 autres mutations ont été détectées dont par exemple, Bin-1, CLU ou PICALM. Un allèle en amont de Bin-1 augmentant l'expression de ce dernier a été établi comme le deuxième facteur génétique impliqué dans le développement de la MA (Holler et al., 2014).

2-2.3 Facteurs environnementaux

L'origine des formes « sporadiques » ou tardives de la MA est encore inconnue malgré que ces dernières constituent les formes les plus fréquentes de cette pathologie. Elles sont très hétérogènes d'un point de vue clinique. Néanmoins, plusieurs facteurs de risques de nature environnementale ont été associés au développement de cette pathologie. Notamment, l'hygiène de vie est un facteur prépondérant dans le développement de ces formes sporadiques de la MA : un régime alimentaire mal adapté c'est-à-dire riche en graisses saturées, l'hypertension et des troubles métaboliques peuvent engendrer des syndromes inflammatoires et augmenter l'incidence de la MA. La consommation d'alcool et de tabac est associée à une augmentation du vieillissement cellulaire augmentant l'incidence de la maladie. La pollution environnementale due à certains métaux neurotoxiques (plomb, mercure, aluminium...) ou aux pesticides peuvent quant à eux altérer la production du peptide A β et augmenter le risque d'incidence de la MA (Chin-Chan et al., 2015). De plus, le contexte social est lui aussi déterminant dans le risque de développer la MA, le niveau d'éducation, l'activité physique et les traitements post-ménopause sont parmi les paramètres susceptibles de moduler le risque de développement des formes sporadiques de cette pathologie (Cummings 2008 ; Barnes and Yaffe, 2011)

Il existe néanmoins des facteurs neuroprotecteurs environnementaux susceptibles de retarder et/ou diminuer l'incidence d'apparition de la MA, tels que l'exercice physique, la consommation d'aliments riches en antioxydants (fruits, légumes, thé...) ou en acides gras oméga-3, l'utilisation d'agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens et un environnement enrichi.

3- Caractéristiques histopathologiques

3-1 Historique

Il y a environ un siècle que la MA a été identifiée pour la première fois par le praticien allemand Alois Alzheimer. En 1901, il examine pour la première fois une patiente de 51 ans

dénommée Auguste Dieter (Figure 1) présentant des troubles cognitifs très marqués (Graeber, 2003; Maurer et al., 1997). Celle-ci présentait des changements de comportements imprévisibles, une négligence progressive, de la paranoïa, une aphasie très prononcée, des hallucinations auditives et bien sûr des altérations importantes de la mémoire.

Bien que le premier cas de la MA ait été rapporté en 1906 par le Dr Alzheimer, c'est l'autopsie post-mortem d'Auguste Dieter qui a permis de décrire pour la première fois la présence de deux marqueurs histopathologiques caractéristiques de cette maladie : **les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques séniles**.

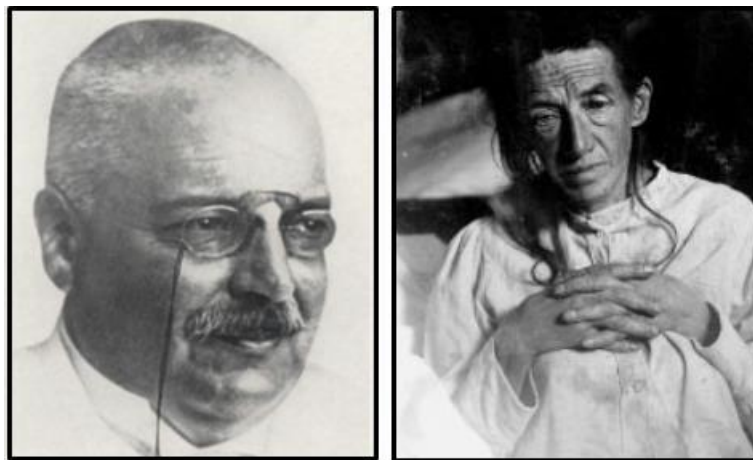


Figure 1 : Portraits d'Alois Alzheimer et d'Auguste Dieter

3-2 Physiopathologie

D'un point de vue histologique, au niveau macroscopique, la MA se caractérise par une atrophie générale de l'encéphale, des sillons creusés, une dilation ventriculaire et par des gyrus resserrés (Figure 2).

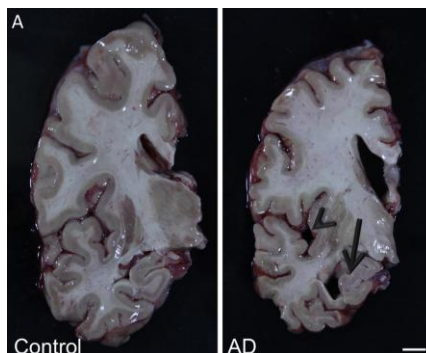


Figure 2 : Observation des lésions anatomo-pathologiques caractéristiques de la MA.

Le cerveau de patients atteints de la MA (AD) présente une atrophie générale avec en particulier un amincissement de l'ensemble du cortex (pointe de flèche) et une atrophie prononcée de l'hippocampe (flèche). (« Control » = patient sain). Barre d'échelle : 1 cm. D'après Crimins et al., 2013.

Au niveau tissulaire, deux lésions histopathologiques caractéristiques de la MA sont retrouvées : **les enchevêtrements neurofibrillaires appelés également dégénérescences neurofibrillaires (DNF)**, composées d'agrégats de protéine Tau hyper et anormalement phosphorylée, et **les plaques séniles composées d'agrégats de peptides A β selon une conformation en feuillets β antiparallèles insolubles (appelés fibrilles)** (Figure 3).

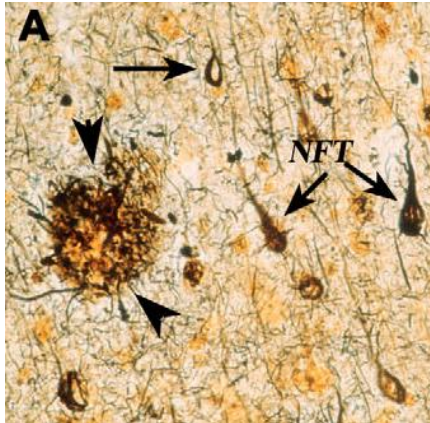


Figure 3 : Mise en évidence des deux marqueurs caractéristiques de la MA.

On observe la présence des enchevêtrements neurofibrillaires (flèches=NFT) et des plaques séniles (pointes de flèches) dans le cerveau de patients atteints de la MA. D'après Nixon, 2007.

Il a été démontré qu'au cours de la MA, l'évolution de la distribution spatiale des DNF dans le cerveau s'effectue différemment que celle des plaques séniles (Braak and Braak, 1991). Un modèle d'évolution de la MA composé en 6 étapes a été établi (figure 4).

En ce qui concerne les DNF, les premières atteintes de l'encéphale ont lieu au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe (figure 4, étapes I et II). Au cours de ces étapes dites silencieuses, des troubles cognitifs légers (Mild Cognitive Impairment) apparaissent mais ne sont pas des signes déterminants de la MA, puisqu'à ce stade, ces troubles cognitifs peuvent évoluer vers d'autres types de démences autres que la MA. Par la suite, les DNF atteignent les zones limbiques (figure 4, étapes III et IV) puis corticales (figure 4, étapes V et VI). A ce stade, la MA est totalement développée (Fully Developed Alzheimer) et les troubles cognitifs importants.

Concernant les dépôts amyloïdes constituant les plaques séniles, ils sont initialement retrouvés dans des zones corticales (figure 4, stade A). On les retrouve par la suite au niveau des aires corticales associatives, notamment dans l'hippocampe (figure 4, stade B) pour se répandre ensuite dans l'ensemble du cortex (figure 4, stade C) notamment le cortex sensori-moteur.

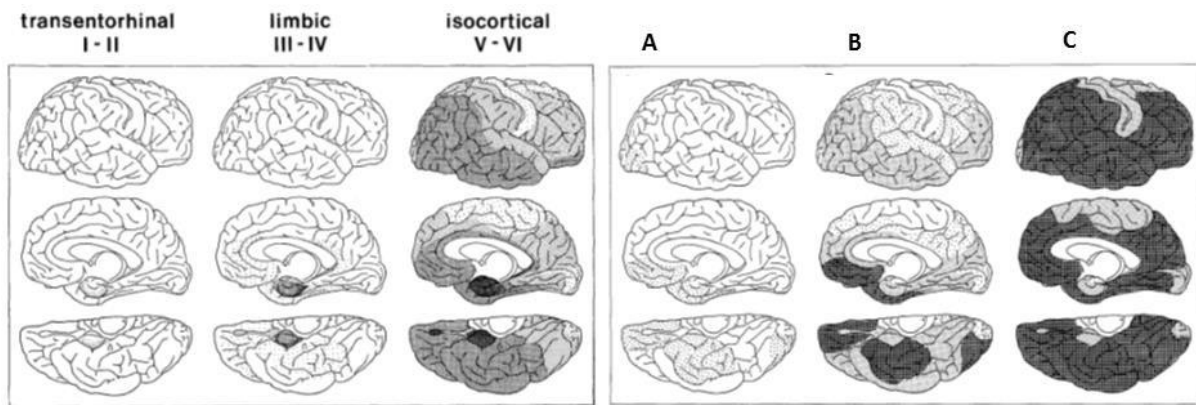


Figure 4 : Evolution de la distribution spatiale des DNF et des plaques séniles au cours de la MA. Les nuances de gris montrent la densité pauvre (blanc) ou riche (noir) des DNF (cadre à gauche) ou des dépôts séniles (cadre à droite). D'après Braak and Braak, 1991.

3-2.1 Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)

Dans les années 1960 il a été montré par microscopie électronique que les principaux éléments composant les DNF sont : des neurofilaments, des protéines associées aux microtubules (MAP2), les protéines vimentine et tropomyosine, des éléments du protéasome, des protéoglycanes, des molécules inflammatoires, des molécules amyloïdogéniques (APP, présiniline, APE) et des éléments du cytosquelette notamment la protéine Tau (associée aux microtubules) (Smith et al., 1996). **Il est maintenant largement accepté que la protéine Tau est l'élément protéique majeur composant les DNF.** Néanmoins, les DNF ne constituent pas une caractéristique déterminante de la MA puisqu'elles sont retrouvées également dans d'autres pathologies telles que les démences fronto-temporales faisant partie des pathologies neurodégénératives nommées tauopathies (Buée et al., 2000).

3-2.2 Les plaques séniles

Les plaques séniles sont constituées principalement de peptides A β assemblés en fibrilles et agrégés dans le milieu extracellulaire. C'est en 1983 que ce peptide est isolé pour la première fois à partir de cortex pré-frontaux de cerveaux de patients atteints de la MA (Allsop et al., 1983). Les fibrilles d'A β ont longtemps été considérées comme la source de la neurodégénérescence dans la MA (Hardy and Higgins, 1992), mais l'apparition des plaques séniles ne corrélait pas ou peu avec la mort neuronale, la perte synaptique et les déficits cognitifs caractéristiques de la MA. De plus, tout comme les DNF, les plaques séniles ne constituent pas une caractéristique déterminante de la MA puisqu'elles sont retrouvées également dans le cortex de patients atteints du syndrome de Down (Glennner and Wong, 1984). **En revanche, il a été montré ultérieurement que la présence d'oligomères solubles**

de peptide A β (A β o) coïncide avec la perte synaptique et la sévérité des atteintes cognitives qui caractérisent la MA (Pour revue: Haass and Selkoe, 2007).

Partie II - L'amyloïdogénèse

1- Synthèse du peptide A β

Le peptide A β est constitué de 39 à 43 acides aminés et possède une masse moléculaire de 3 à 4 kDa environ. Il est issu du clivage successif par des enzymes d'une glycoprotéine transmembranaire : l'**APP (amyloïd precursor protein)**, constituée de 695 à 770 acides aminés et de masse moléculaire comprise entre 110 et 135 kDa. Initialement, le peptide A β a été considéré comme une forme anormale issue du clivage de la protéine APP, cependant, il est maintenant reconnu comme un peptide étant produit de façon physiologique (Seubert et al., 1992). Les études sur l'APP ont mis en évidence deux voies de maturation de ce précurseur : **la voie non-amyloïdogénique qui ne produit pas de peptide A β et la voie amyloïdogénique à l'origine de la production du peptide A β** (Selkoe, 1994). Ces deux voies distinctes mettent en jeu des clivages enzymatiques par des enzymes appelées sécrétases de type α , β et γ .

1-1 Voie non-amyloïdogénique et α sécrétase

Cette voie est caractérisée par le clivage de l'APP par l' α -sécrétase. Deux fragments sont générés: le fragment N-terminal « sAPP- α » et le fragment C-terminal « C83 » ou « α -CTF » (figure 5).

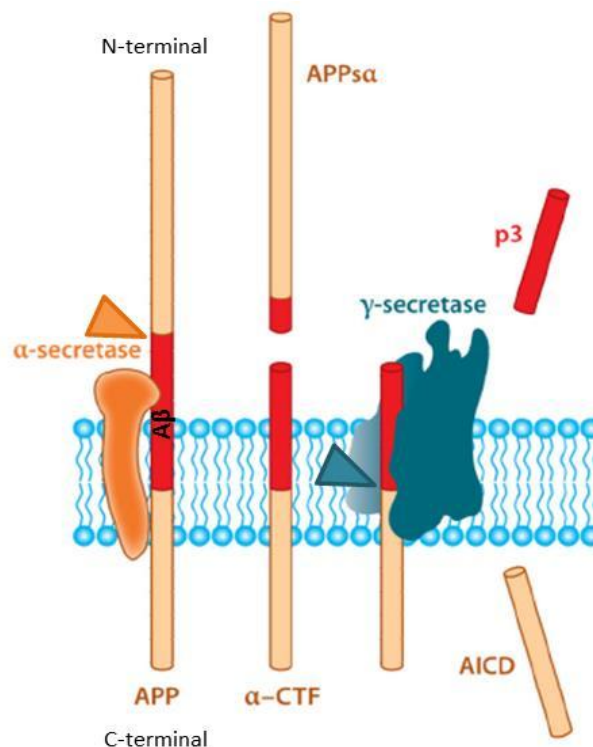


Figure 5 : Voie non-amyloïdogénique. Le clivage de l'APP par l' α -sécrétase libère les fragments sAPP- α et α -CTF membranaire. L'action des γ -sécrétases libèrent le peptide P3 et AICD. Figure adaptée d'après O'Brien and Wong, 2011.

Aucun de ces fragments ne contient la séquence entière du peptide A β . Ce clivage s'effectue au niveau de la membrane plasmique par un complexe enzymatique à activité α -sécrétase, constitué en particulier par des protéines appartenant à la famille ADAM (« A Desintegrin And Metalloproteinase »). **Les trois protéines ADAM porteuses de l'activité α -sécrétase sont : ADAM 9, 10 et 17.** Ces protéines à activité α -sécrétase sont aussi impliquées dans la coupure de nombreux autres substrats incluant des facteurs de croissance. Des études soutiennent que le fragment soluble sAPP- α a des propriétés neurotrophiques et améliore la survie des neurones *in vitro* et protègerait de l'excitotoxicité (van der Kant and Goldstein, 2015). Le fragment α -CTF est quant à lui un fragment membranaire qui peut ensuite subir un clivage par la γ -sécrétase et générer deux nouveaux fragments : le fragment p3 contenant les acides aminés 17 à 43 de la séquence du peptide A β et le fragment AICD (« APP IntraCellular Domain »).

1-2 Voie amyloïdogénique, β et γ sécrétases

La deuxième voie de clivage de l'APP est la voie amyloïdogénique. Celle-ci va générer le peptide A β par la coupure successive de l'APP par deux complexes enzymatiques ou sécrétases : la β puis la γ sécrétase qui vont libérer respectivement les extrémités N- et C-terminales du peptide A β (figure 6).

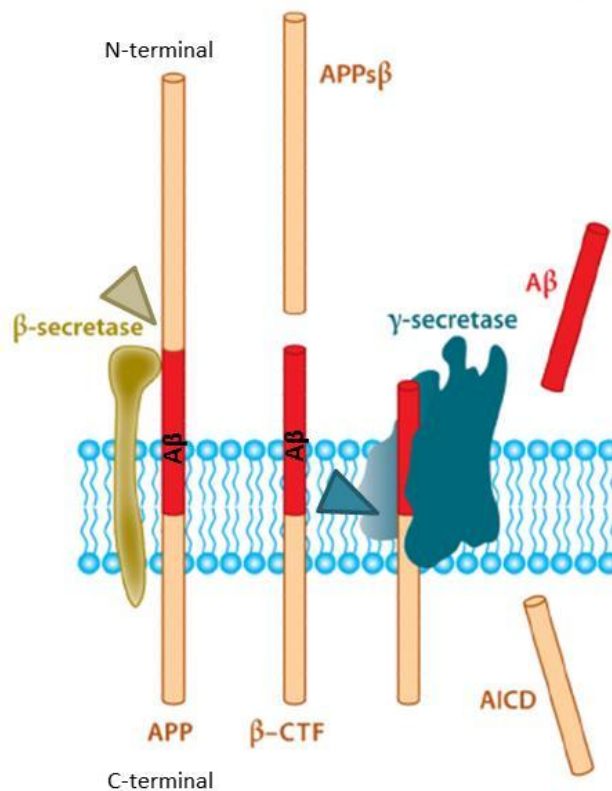


Figure 6 : Voie amyloïdogénique. Le clivage de l'APP par la β -sécrétase libère les fragments sAPP- β et β -CTF membranaire. L'action des γ -sécrétases libèrent le peptide A β et AICD. Figure adaptée d'après O'Brien and Wong, 2011.

La β -sécrétase ou BACE-1 (« β -site APP cleaving enzyme 1 ») est une protéase responsable du clivage de l'APP au niveau de son extrémité N-terminale et constitue l'étape limitante de la production du peptide A β . Son activité est optimale à pH acide dans les endosomes précoces où a lieu le clivage de l'APP par cette sécrétase (Rajendran et al., 2006). À l'issue de ce clivage, deux fragments sont libérés : le fragment N-terminal sAPP- β et le fragment C-terminal C99 ou β -CTF. Ce dernier fragment est le substrat du complexe enzymatique γ -sécrétase qui achève le processus amyloïdogénique en clivant le peptide β -CTF au niveau transmembranaire pour libérer le fragment AICD et le peptide A β . **Le complexe enzymatique γ -sécrétase est formé de 4 sous-unités protéiques : la présiniline 1 (PS1), la présiniline 2 (PS2), la nicastrine et l'APH-1 (anterior pharynx-defective 1)** (Takasugi et al., 2003). L'activité de ce complexe n'est pas spécifique de l'APP et cible des substrats vitaux pour l'organisme comme Notch (De Strooper et al., 1999). Cependant, il existe des modulateurs d'activité de la γ -sécrétase qui montrent qu'il est possible de bloquer la production du peptide A β sans interférer avec le clivage de ces autres substrats (Kounnas et al., 2010), donc pouvant moduler la production du peptide A β sans effet délétère majeur.

1-3 Voie η -sécrétase

Cette vision binaire du clivage de l'APP a récemment évolué, en particulier avec la découverte de la η -sécrétase. Bien que le peptide A β soit depuis longtemps désigné comme étant le principal peptide impliqué dans la MA, un nouveau peptide produit à partir du clivage de l'APP par la η -sécrétase a été identifié à la fois dans le cerveau de modèles animaux de la MA mais également dans le cerveau de patients atteints de la maladie : le peptide amyloïde- η (η) (Willem et al., 2015). Cette étude a été réalisée à partir de souris traitées avec un inhibiteur de l'activité de BACE1 et montre que l'inhibition de cette enzyme réduit en effet la production d'A β mais provoque une accumulation massive d'amyloïde- η (A η) responsable de perturbations neuronales. En particulier, la potentialisation à long terme, corrélat électrophysiologique de la mémoire et de l'apprentissage, est réduite au niveau de l'hippocampe en présence d'A η . Or, cette découverte pourrait avoir des conséquences sur certains essais cliniques en cours étudiant l'inhibition de BACE1 afin de réduire la quantité d'A β dans l'espoir d'enrayer la perte de mémoire. Il est donc probable que des effets secondaires dus à l'action du peptide A η sur les neurones remettent en question la stratégie thérapeutique de certains essais cliniques. Au vu de sa neurotoxicité et des données présentées dans l'étude de Willem, ce nouveau peptide A η est sans doute impliqué dans le mécanisme de la MA, mais son impact sur les déficits cognitifs n'est pas encore très défini.

L'ensemble de ces données mettent en évidence la complexité des mécanismes impliqués dans le « processing » de l'APP dans le cerveau.

1-4 Traffic, processing de l'APP et localisation du peptide A β

L'APP est une protéine ubiquitaire retrouvée de manière physiologique dans l'organisme. Notamment, les isoformes APP770 et APP751 sont largement exprimés dans la plupart des cellules de l'organisme à l'exception des neurones où ils sont peu abondants. Par contre, **l'isoforme APP695 est quant à lui exprimé uniquement par les neurones** (LeBlanc et al., 1996, 1991). L'APP est constitué de trois domaines consécutifs : un domaine N-terminal extracellulaire transmembranaire et glycosylé (acides aminés 18-699), un domaine transmembranaire (acides aminés 700-723) et un domaine C-terminal intracellulaire (acides aminés 724-770).

Alors que les voies de clivage amyloïdogénique et non-amyloïdogénique de l'APP sont bien connues, le ou les sites de localisation de l'APP et des complexes α , β et γ sécrétases sont encore mal connus tout comme le trafic de l'APP et du peptide A β au sein des neurones. Notamment, bien que de nombreuses études montrent que le peptide A β s'accumule intracellulairement, le lieu de production de ce peptide est controversé.

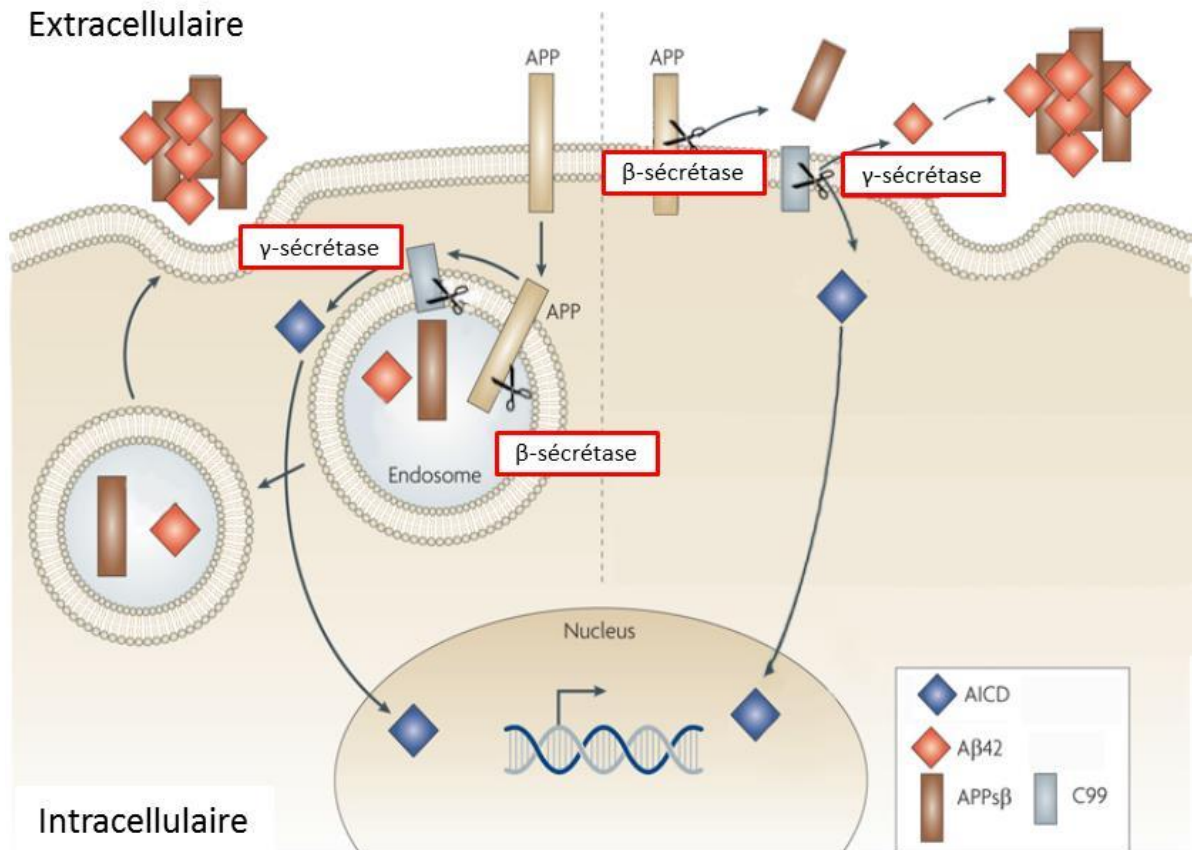


Figure 7 : Voies de production possibles du peptide A β . L'APP est clivé dans un premier temps par la β -sécrétase, donnant naissance à 2 fragments, sAPP- β (en marron) et un peptide membranaire C99 ou β -CTF (en gris). Ce dernier est ensuite clivé par la γ -sécrétase permettant ainsi la libération du peptide A β (en orange). L'APP pourrait être clivée de 2 manières : soit au niveau des endosomes (partie gauche), soit directement au niveau de la membrane plasmique (partie droite). Figure adaptée d'après Aguzzi and O'Connor, 2010.

Il existe deux hypothèses concernant la production du peptide A β (Aguzzi and O'Connor, 2010; LaFerla et al., 2007):

- soit l'APP est endocyté puis clivé, conduisant à une production intracellulaire du peptide A β suivie éventuellement d'une exocytose (figure 7, partie gauche).
- soit les clivages par les β - et γ -sécrétases se font directement au niveau de la membrane plasmique du neurone et le relargage extracellulaire du peptide est immédiat (figure 7, partie droite). Dans ce cas, il reste à déterminer si le peptide A β ou du moins une quantité de peptides A β est sécrété puis repris par les cellules pour former des pools intracellulaires de peptides A β .

Il est donc important de connaître où sont localisés les fragments APP et les complexes des β - et γ -sécrétases afin de déterminer le lieu exact de production du peptide A β lors du trafic de l'APP. En effet, la libération du peptide A β pourrait potentiellement avoir lieu aux endroits où sont localisés l'APP et les complexes β - et γ -sécrétases (pour revues voir LaFerla et al., 2007; van der Kant and Goldstein, 2015).

- **Voie de sécrétion de l'APP**

Des études immunohistochimiques montrent que l'APP se trouve au niveau de la membrane plasmique mais également dans plusieurs compartiments subcellulaires tel que le réticulum endoplasmique, le réseau trans-golgi, au niveau de la membrane des endosomes, des lysosomes et des mitochondries. Néanmoins, l'ensemble des données montrent que l'APP est synthétisé dans le réticulum endoplasmique (figure 8, ①) avant d'être transporté vers le réseau trans-golgi (figure 8, ②) où sa concentration est la plus élevée (Xu et al., 1997). Ensuite l'APP est adressé à la membrane plasmique (LaFerla et al., 2007; O'Brien and Wong, 2011) via la **voie de sécrétion** (figure 8, ③) soit adressé directement aux endosomes (figure 8, ④).

- **Voie non-amyloïdogénique**

D'une part, l'APP se trouvant à la membrane plasmique est majoritairement clivé par l' α -sécrétase, libérant le fragment sAPP- α dans le milieu extracellulaire et laissant le fragment C83 aussi appelé α -CTF au sein de la membrane (figure 8, ②) avant d'être endocyté et adressé au sein des endosomes précoces (figure 8, ③). Le clivage α ayant lieu au sein du domaine A β de l'APP, il empêche la production du peptide A β et constitue par conséquent la **voie dite non-amyloïdogénique**.

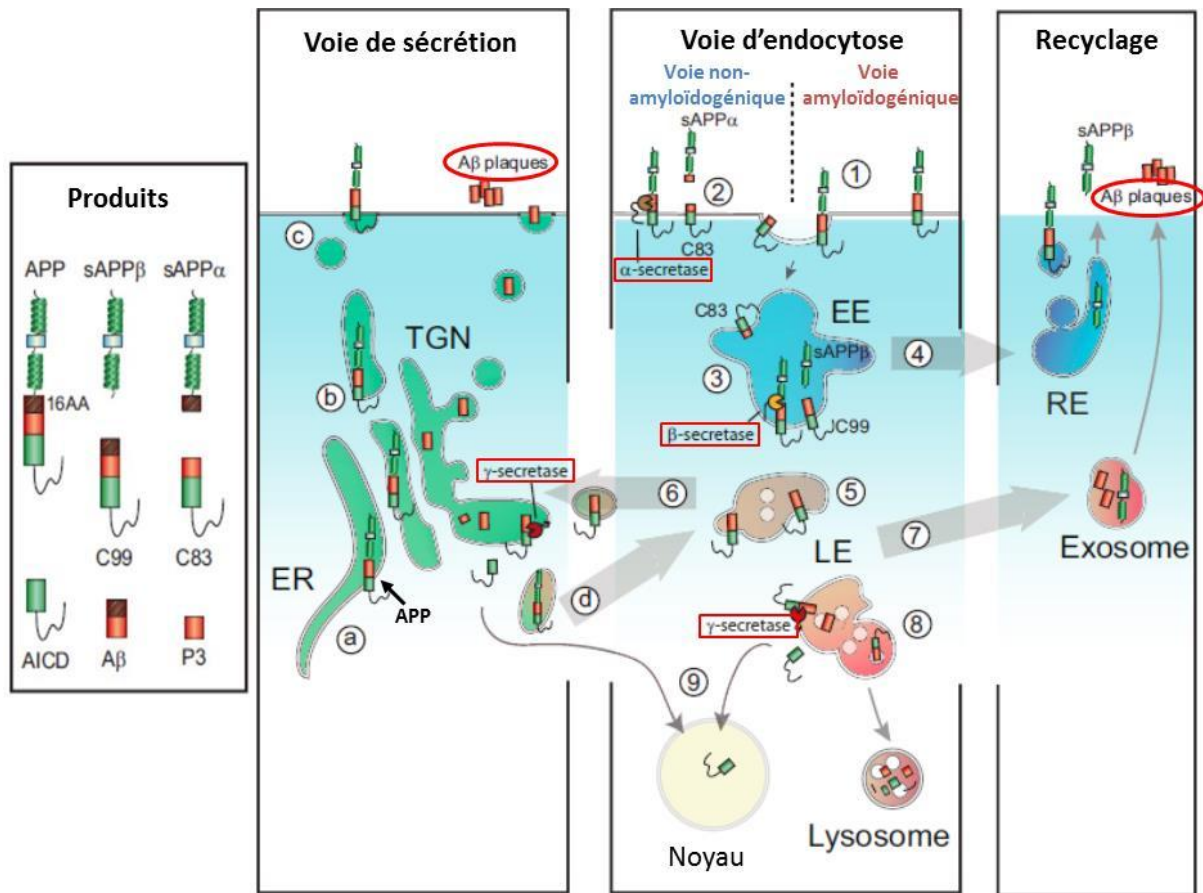


Figure 8 : Produits protéolytiques et trafic intracellulaire de l'APP. L'APP nouvellement synthétisé est transporté du réticulum endoplasmique (ER) vers le réseau trans-golgi (TGN) puis vers la membrane plasmique (voie de sécrétion (a), (b), (c)), soit adressé directement aux endosomes (d). Au niveau de la membrane plasmique, certains fragments APP sont clivés par l' α -sécrétase (2) générant des fragments sAPP- α qui vont diffuser dans le milieu extracellulaire alors que les fragments C83 (ou α -CTF) seront endocytés dans les endosomes précoces (EE, 3) avec d'autres fragments APP n'ayant pas encore subit de « processing » (1). Le clivage de l'APP par BACE-1 libèrerait dans la lumière endosomale les fragments sAPP- β et C99 (ou β -CTF) adressés vers les endosomes de recyclages (RE) puis vers la membrane plasmique (4). Les fragments C99 et C83 seraient adressés aux endosomes tardifs (LE, 5) puis vers le réseau trans-golgi (6) soit exocytés (7) ou adressés aux lysosomes pour être dégradés (8). Le clivage des fragments C99 et C83 par la γ -sécrétase au sein du réseau trans-golgi et/ou des endosomes tardifs, libère (via la voie de sécrétion ou par exocytose) le peptide A β ou P3 selon le clivage α ou β initial. Le fragment AICD va être transloqué vers le noyau (9). Figure adaptée d'après van der Kant and Goldstein, 2015.

- **Voie amyloïdogénique**

D'autre part, l'APP n'ayant pas encore subit de « processing » (figure 8, 1) est endocyté puis internalisé dans les endosomes précoces (figure 8, 3) vers les épines

dendritiques. Les endosomes précoces présentent le pH optimal pour l'activité des β -sécrétases (ou BACE-1). En fait, l'APP est adressé à des sites d'endocytose via sa séquestration au sein des radeaux lipidiques ce qui empêche alors le clivage par l' α -sécrétase et promeut **la voie amyloïdogénique**.

Clivage par la β -sécrétase

Bien que BACE-1 soit enrichi au niveau des radeaux lipidiques, lorsque BACE-1 et APP sont retrouvés dans des pools de vésicules séparées ils se retrouvent ensembles au niveau du compartiment somato-dendritique en conditions d'activité neuronale (Das et al., 2013). Bace-1 et APP peuvent également être internalisés séparément à partir de la membrane plasmique et interagir lorsqu'ils se retrouvent dans des endosomes précoces communs (Sannerud et al., 2011). Notamment, alors que l'APP est internalisé via une endocytose clathrine-dépendante, Bace-1 est internalisé via une endocytose ARF6 (« ADP ribosylation factor 6 ») - dépendante (Sannerud et al., 2011). Le pH au niveau de la membrane plasmique (pH \approx 7.5) n'étant pas optimal pour l'activité de BACE-1, cette dernière clive l'APP uniquement après qu'il soit internalisé dans l'environnement le plus acide du système endosomal (pH optimal \approx 4.5-5.5). **L'ensemble des données suggère que le clivage de l'APP par BACE-1 a lieu au sein des endosomes précoces au sein desquels son activité est optimale et libère dans la lumière endosomale le fragment sAPP- β et C99 (aussi appelé β -CTF)**. Le fragment sAPP- β est adressé vers les endosomes de recyclages pour retourner ensuite vers la membrane plasmique (figure 8, ④), mais il peut également être adressé vers les lysosomes et dégradé, puis exocyté à partir des lysosomes et recyclé dans les endosomes de recyclages pour retourner vers la membrane plasmique.

Le clivage de l'APP par BACE-1 au sein des endosomes précoces libère le fragment sAPP- β mais également le fragment C99 (ou β -CTF) alors que le clivage de l'APP par l' α -sécrétase au niveau de la membrane plasmique libère le fragment sAPP- α et C83 (ou α -CTF). Les fragments C99 (ou β -CTF) et C83 (ou α -CTF) sont retenus au sein de la membrane des endosomes précoces (figure 8, ③) avant d'être adressés aux endosomes tardifs (figure 8, ⑤). Une fois dans les endosomes tardifs, ces fragments sont adressés vers le réseau trans-golgi (figure 8, ⑥) soit exocytés (figure 8, ⑦) soit adressés aux lysosomes pour être dégradés (figure 8, ⑧).

Clivage par la γ -sécrétase

Au vue de la littérature, le débat à propos du lieu de clivage par la γ -sécrétase reste ouvert et suggère que le clivage des fragments C99 (ou β -CTF) et C83 (ou α -CTF) par le complexe de la γ -sécrétase a lieu au sein du réseau trans-golgi et/ou des endosomes tardifs. Suite à ce clivage, il y a libération (via la voie de sécrétion ou par exocytose) des peptides A β ou P3 selon respectivement le clivage β ou α initial. Le troisième peptide libéré est le fragment AICD (domaine intracellulaire de l'APP) qui va être transloqué vers le noyau au sein duquel il agirait comme un facteur de transcription (figure 8, ⑨).

Les fragments exacts générés par le clivage de la γ -sécrétase varient, des études ont identifié divers peptides $A\beta$ constitués de 34 à 50 acides aminés et environ 90% de ces peptides $A\beta$ générés sont des peptides $A\beta_{40}$. **Les peptides $A\beta_{42/43}$ constituent la plus petite fraction générée par le clivage de la γ -sécrétase. Ce sont eux qui possèdent un fort pouvoir d'agrégation et sont principalement associés aux effets neurotoxiques que l'on observe dans la MA, ils sont retrouvés dans les plaques amyloïdes et sont les plus enclins à l'oligomérisation et à la fibrillogénèse (Kim et al., 2007).**

Au vue de l'ensemble des données, il n'y a pas de consensus à propos du lieu de génération du peptide $A\beta$ pouvant être produit dans les endosomes, dans le réseau trans-golgi au sein duquel le fragment APP est sujet à de fortes glycosylations ou dans les 2 structures. Il est possible que le clivage des fragments β -CTF par la γ -sécrétase dans les endosomes tardifs versus le réseau trans-golgi affecte le site de clivage de la γ -sécrétase : cela influencerait la taille des peptides $A\beta$ générés, soit par exemple, la production des peptides $A\beta_{40}$ versus $A\beta_{42}$. De plus, le clivage au niveau du réseau trans-golgi peut conduire le peptide $A\beta$ vers le pool constitutif de sécrétion et par conséquent le libérer dans le milieu extracellulaire facilitant la formation des plaques amyloïdes. Le clivage dans les endosomes tardifs libèrerait le peptide $A\beta$ dans la lumière de ses organelles à partir desquels il serait dégradé ultérieurement soit il serait exocyté pour être sécrété.

Concernant le trafic d'APP, la plupart des recherches effectuées sur ce sujet ont été réalisées sur des cellules non neuronales alors que les neurones sont des cellules polarisées ce qui laisse supposer que le trafic d'APP devrait être encore plus complexe dans les neurones. Des études montrent que le fragment APP peut se trouver dans les deux compartiments pré et post synaptiques (DeBoer et al., 2014) et que le peptide $A\beta$ peut être généré au niveau du compartiment somatodendritique avant d'être transporté vers le compartiment axonal (Niederst et al., 2015).

2- Dégradation du peptide $A\beta$

Les peptides $A\beta$ peuvent être dégradés par les neuropeptidases, tronqués dans leur partie N-terminale dans le milieu interstitiel cérébral (milieu extracellulaire) soit éliminés via des récepteurs spécifiques leur permettant de traverser la barrière hémato-encéphalique. Concernant les neuropeptidases, plusieurs enzymes de dégradation du peptide $A\beta$ sont connues (Miners et al., 2011), en particulier la néprilysine (NEP), l'enzyme de dégradation de l'insuline et l'enzyme de conversion de l'endothéline. Cependant, la neuropeptidase connue comme la protéase la plus efficace pour dégrader le peptide $A\beta$ est la NEP, une enzyme métalloprotéase dépendante du zinc (Iwata et al., 2000). Il semblerait par exemple, que la dégradation du peptide $A\beta_{42}$ en conditions d'activation synaptique se fait via la néprilysine mais que les mécanismes de clairance du peptide $A\beta$ déclinent avec l'âge et notamment la néprilysine (Tampellini et al., 2009). Néanmoins, si la nature des enzymes de dégradation des peptides $A\beta$ est connue, leur régulation doit être approfondie. Notamment, il semblerait

que la NEP soit régulée par le fragment AICD généré à partir du clivage de l'APP par le complexe de la γ -sécrétase. Ainsi, la γ -sécrétase participerait indirectement à la régulation des mécanismes de clairance du peptide A β par la NEP.

En résumé, l'ensemble de ces enzymes constituent des cibles potentielles capables de moduler les concentrations endogènes de peptide A β .

3- Rôle physiologique et toxique du peptide A β

Le peptide A β est produit par le métabolisme neuronal et peut être détecté dans le plasma ou LCR des personnes non atteintes de la MA (Haass et al., 1992; Walsh et al., 2000). Dans ces conditions, la présence physiologique de ce peptide n'induit pas de processus neurodégénératifs. Des études montrent qu'en conditions physiologiques on retrouve une production « normale » du peptide A β mais la proportion des différentes formes de ces peptides A β diffère de celle retrouvée en conditions pathologiques. En particulier, le ratio A β_{1-40} /A β_{1-42} est modifié en conditions pathologiques. Des études suggèrent que le ratio A β_{1-40} /A β_{1-42} constitue un facteur déterminant dans la toxicité, la fibrillogénèse et la distribution pathologique d'A β et montrent que les peptides A β_{1-40} et A β_{1-42} ont des rôles différents. Le peptide A β_{1-42} promeut l'accumulation et le dépôt de peptides amyloïdes contrairement au peptide A β_{1-40} (Jan et al., 2008; Kim et al., 2007).

En conditions pathologiques le ratio A β_{1-40} /A β_{1-42} est réduit. Notamment, un certain nombre d'études montrent que dans la MA, la production du peptide A β_{1-42} est augmentée due à une suractivation de la voie amyloïdogénique et/ou à des mutations affectant les acteurs de cette synthèse à la fois dans des modèles animaux mais aussi chez l'homme (Li et al., 2007) et/ou à des dysfonctionnements au niveau des mécanismes d'élimination du peptide A β . D'autres travaux montrent que la quantité d'A β dans le LCR varie selon l'activité synaptique (Cirrito et al., 2005) et les cycles circadiens (Musiek et al., 2015), notamment l'inhibition de l'activité synaptique décroît la quantité de peptides A β sécrétés dans le milieu extracellulaire alors qu'une augmentation de l'activité synaptique ou des dysfonctionnements du cycle circadien provoquent une augmentation de la sécrétion d'A β dans le milieu extracellulaire.

4- Les différentes formes du peptide A β

Le peptide A β peut être retrouvé sous différents états conformationnels : des formes alpha, des formes intermédiaires solubles tel que les monomères et les oligomères, mais également des formes insolubles en feuillets bêta tel que les protofibrilles et les fibrilles à l'origine de la formation des plaques amyloïdes (figure 9).

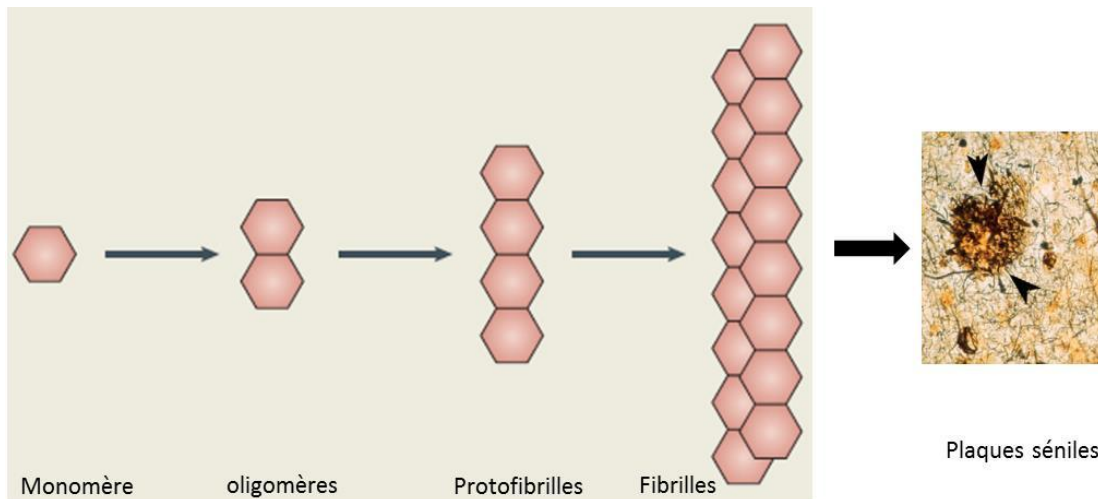


Figure 9 : Illustration schématique du modèle de fibrillogénèse du peptide A β . Le peptide A β se retrouve sous plusieurs formes au cours de la MA avant de former les plaques amyloïdes extracellulaires. Figure adaptée d'après LaFerla et al., 2007.

Les peptides A β ont tendance à s'agréger. C'est ainsi que la majorité de l'A β dans le cerveau des patients atteints de la MA est agrégé sous forme de fibrilles qui elles-mêmes ont tendance à former les plaques amyloïdes. Plusieurs études ont étudié les propriétés d'agrégation des peptides A β . Le peptide A β_{42} est plus hydrophobe que ses analogues plus courts. Sa solubilité est par conséquent plus faible et sa capacité à s'agréger très forte (environ 70 fois plus rapide que l'A β_{40}). Deux résidus différents dans l'extrémité C-terminale hydrophobe des peptides d'A $\beta_{42/40}$ conférant une organisation plus structurée de l'extrémité C-terminale de l'A β_{42} comparée à celle de l'A β_{40} responsable d'une toxicité et de propriétés d'agrégation plus importantes de l'A β_{42} (Sgourakis et al., 2007). Comment cette différence de 2 résidus entre l'A $\beta_{42/40}$ change les propriétés toxiques et agrégantes du peptide reste encore à découvrir. Néanmoins, la capacité d'A β à s'agréger et former des structures organisées (fibrilles) dépend non seulement de la nature de l'A β (40/42), mais aussi du pH, de la température, de la concentration en peptides et principalement des interactions hydrophobes de ces peptides leur permettant de passer d'une conformation monomérique sous forme d'hélice α vers une structure monomérique composée principalement en «random coil» (conformation dans laquelle les unités de monomères sont orientées de façon aléatoire) à une structure en feuillets β (Ahmed et al., 2010; Zagorski and Barrow, 1992). Ce sont des études basées sur la spectroscopie RMN qui montrent que les oligomères ne possèdent pas cette structure en feuillets β caractéristique des fibrilles, mais sont plutôt composés de brins agrégés possédant une conformation en épingle dont les acides aminés Phe19 et Leu34 sont en contact, placés face à face (Ahmed et al., 2010) (figure 10,A). Ce sont plusieurs unités de feuillets β interagissant entre eux et polymérisant en parallèle qui vont former les protofibrilles et s'associer par la suite en fibrilles « torsadées » constituées de feuillets β parallèles insolubles (figure 10,B). Ce sont ces formes fibrillaires insolubles qui s'agrégent en plaques amyloïdes extracellulaires.

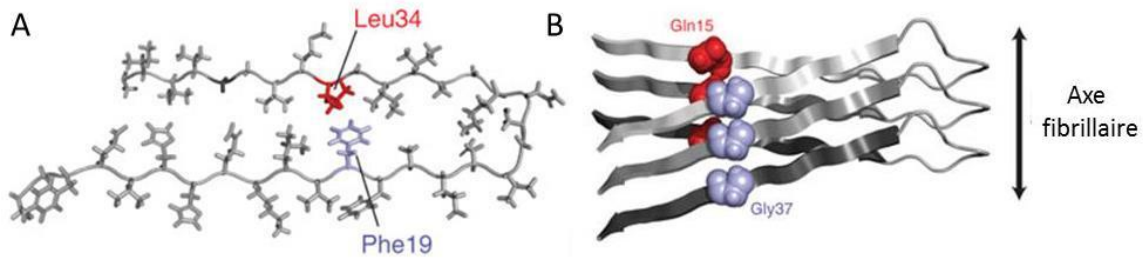


Figure 10 : Illustration du modèle moléculaire de la conformation en épingle du peptide $A\beta_{42}$. **A.**, Le peptide $A\beta_{42}$ sous forme oligomérique présente une conformation structurale dans laquelle la Phe19 et la Leu34 sont en contact. **B.**, Modèle d'échelonnement entre le N- et le C-terminal des brins β via le contact des acides aminés Gln15-Gly37 des fibrilles $A\beta_{42}$. Figure adaptée d'après Ahmed et al., 2010.

Il a donc été montré que les monomères, formes solubles, s'agrègent pour former des oligomères et que **ces formes oligomériques solubles de peptides $A\beta$ ($A\beta_o$) sont comprises entre 4 et 100 kDa. Ce sont ces formes qui sont décrites comme étant les formes les plus toxiques et responsables des déficits cognitifs dans la MA** (Haass and Selkoe, 2007; Lambert et al., 1998; Tomiyama et al., 2010). Des travaux de biologie moléculaire et structurale ont démontré la toxicité accrue des oligomères d' $A\beta$ comparé aux protofibrilles et fibrilles sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris (Ahmed et al., 2010). Plusieurs types d'oligomères globulaires ont été identifiés allant des dimères, trimères et tétramères jusqu'aux 24-mères, oligomères d' $A\beta_{42}$ solubles de plus haut poids moléculaire. Ces petits oligomères globulaires solubles d' $A\beta_{42}$ sont dénommés ADDLs « $A\beta$ -derived diffusible ligands ».

Il a été mis en évidence que des oligomères d'origine synthétique présentent une toxicité analogue à celle des oligomères naturels, fournissant ainsi un modèle de choix dans l'étude de l'assemblage et de la toxicité du peptide $A\beta$ et de ses formes oligomériques (Snyder et al., 1994).

5- Les mutations affectant la production du peptide $A\beta$

Il a été montré que le métabolisme, la stabilité et la production du peptide $A\beta$ est affecté dans certains cas de mutations situées sur les gènes APP, PS1 et PS2. Ces mutations sont responsables des formes autosomales dominantes de la MA. Plus particulièrement, la mutation Swedish (« APPSwe ») fait partie des mutations les plus connues de l'APP. Dans cette mutation, un double changement d'acide aminé où la lysine et la méthionine en position 670/671 sont remplacées par l'asparagine et la leucine, conduit à l'augmentation du clivage d'APP par le complexe de la β -sécrétase menant à une surproduction de peptides $A\beta$ (Haass et al., 1995). Une autre mutation au sein de l'APP augmentant l'agrégation des peptides $A\beta$ et conduisant à une forme précoce et agressive de la maladie est la mutation Arctic (« APPArc ») (Nilsberth et al., 2001). Concernant d'autres mutations sur les enzymes

participant au clivage de l'APP tel que les présinilines, la mutation PS1 M146V augmente le niveau d'A β ₁₋₄₂ au détriment de l'A β ₁₋₄₀, moins prompt à l'agrégation (Moehlmann et al., 2002). Cette mutation est considérée comme étant la plus agressive, induisant la plus forte production d'A β ₁₋₄₂ comparée à toutes les autres formes autosomales de la MA. **L'ensemble de ces mutations conduisent à une production anormale de peptides A β ₁₋₄₂. Ces derniers vont s'assembler en oligomères et exercer leur pouvoir potentiellement neurotoxique** (LaFerla et al., 2007). C'est la découverte de ces mutations qui a permis l'élaboration de modèles murins d'étude de la MA. En association avec ces modèles d'étude, notamment des études biochimiques mais également des études *in vitro* sur culture primaire de neurones, ont permis de mettre en évidence le processus d'assemblage et la toxicité du peptide A β , de ses formes oligomériques et de ses cibles, en particulier les synapses.

6- Les approches thérapeutiques

Actuellement, il n'existe que des traitements symptomatiques de la MA. Parmi ces traitements, quatre sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et le cinquième est un antagoniste des récepteurs NMDA. Des études anciennes ont montré que les neurones cholinergiques étaient particulièrement atteints dans la MA (Coyle et al., 1983) et le nombre de neurones cholinergiques restant est corrélé aux performances mnésiques chez les patients AD (Baskin et al., 1999). **Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE)** bloquent l'enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine induisant ainsi une augmentation de la concentration d'acétylcholine dans la fente synaptique et donc une action prolongée du neurotransmetteur sur l'élément postsynaptique. Cela permet de pallier la diminution de l'apport synaptique d'acétylcholine dû à une neurodégénérescence sélective des neurones présynaptiques. Néanmoins, ces traitements ne sont efficaces que s'il y a encore synthèse et libération d'acétylcholine et deviennent donc inefficaces lorsque la dégénérescence neuronale parvient à un stade avancé (Ellis, 2005). Parallèlement aux AChE, un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA est utilisé dans le traitement de la MA et notamment dans les phases avancées et sévères de la maladie : la **mémantine**. Cet antagoniste des récepteurs NMDA va pouvoir bloquer ces récepteurs lors des libérations faibles mais continues de glutamate qui ont lieu lors de la mort de neurones. L'ensemble de ces traitements ne présente qu'une efficacité relative.

Plus récemment de nouvelles stratégies thérapeutiques visant l'augmentation anormale de production du peptide A β dans la MA ont été développées dans le but de réduire et/ou de restaurer les niveaux de peptide A β dans le cerveau (Giacobini and Gold, 2013) :

- La réduction de la production d'A β

Une première stratégie thérapeutique a été de cibler les enzymes protéolytiques impliquées dans le processing d'APP et par conséquent dans la production de peptide A β (γ - et β -sécrétases).

Plusieurs **inhibiteurs du complexe de la γ -sécrétase** ont été testés, mais aucun d'entre eux n'a montré de véritable efficacité thérapeutique et leurs développements ont été arrêtés en cours d'essais cliniques. De plus, plusieurs problèmes étaient rencontrés de façon récurrente, tel que la faible pénétration de la barrière hémato-encéphalique par ces molécules. Parmi les inhibiteurs de la γ -sécrétase, deux molécules modulant l'activité de la γ -sécrétase sans altérer la signalisation Notch ont été développées : le Tarenflurbil ou l'Avagacestat. Le Tarenflurbil a été abandonné en phase III des essais cliniques dû notamment à son manque d'effet sur les patients se trouvant dans le stade modéré de la maladie. L'Avagacestat a également été abandonné suite à des détériorations de l'état cognitif des patients. Un autre inhibiteur de la γ -sécrétase, le Semagacestat, 30 fois plus puissant que le Tarenflurbil mais affectant le clivage de Notch, a également été abandonné à son tour dû à son manque de sélectivité mais également en raison des détériorations de l'état cognitif des patients.

Une deuxième approche thérapeutique a été de cibler l'activité de la β -sécrétase afin de réduire la production d'A β . Malgré le manque de succès de plusieurs **inhibiteurs de la β -sécrétase** tout comme les inhibiteurs de la γ -sécrétase, un nouvel inhibiteur, le MK-8931, est actuellement en cours d'essai clinique (en phase III) et semble présenter des résultats probants.

- Les approches immunologiques

Une deuxième stratégie thérapeutique est basée sur le développement **d'immunothérapies, actives ou passives**, contre le peptide A β . Ces approches ont pour but de promouvoir via l'immunité cellulaire, l'élimination du peptide A β déjà existant dans les plaques amyloïdes extracellulaires et/ou de réduire son accumulation.

Malgré des résultats positifs issus des essais effectués par une approche immunologique non spécifique (immunoglobine intravaineuse ; IVIg, gammagard) sur des animaux transgéniques développant la MA, ces effets n'ont pas été retrouvés chez les patients. Un premier vaccin actif contre le peptide A β (AN1792), a été développé puis abandonné suite à des réactions inflammatoires néfastes. De plus, les études post-mortem ont montré qu'il n'y avait pas de relation entre le degré d'élimination du peptide A β dans les plaques de cerveaux des patients et l'intégrité synaptique de ces derniers. Par la suite, un anticorps monoclonal reconnaissant l'A β soluble et insoluble (fibrillaire), le Bapineuzumab, a été développé et a montré des résultats positifs sur les animaux transgéniques de la MA (réduction de l'accumulation des peptides A β). Cependant, les essais cliniques ont été arrêtés dû à l'absence d'efficacité thérapeutiques des anticorps. Il a également été développé un nouvel anticorps monoclonal ciblant un épitope dans la région centrale du peptide A β et liant préférentiellement les oligomères solubles d'A β , le Solanezumab. Malgré que le Solanezumab ait montré des effets positifs (réverse les déficits de mémoire) chez les

animaux transgéniques de la MA, aucune amélioration cognitive a été observée chez les patients. Malgré ces échecs, plusieurs approches basées sur de nouveaux anticorps monoclonaux et six nouveaux vaccins sont actuellement en cours d'essais cliniques et se focalisent sur les patients se trouvant dans les phases précoces de la MA et même dans la phase asymptomatique. Néanmoins, le manque de biomarqueurs dans les phases précoces précliniques de la MA et la complexité des mesures de l'évolution de l'état cognitif des patients se trouvant dans les stades asymptomatique/précoce constitue un vrai challenge pour démontrer les effets de ces approches thérapeutiques avant même l'apparition des manifestations cliniques de la MA chez ces patients.

Malgré les doutes émis sur la validité de l'hypothèse amyloïde au vu des échecs des approches thérapeutiques ciblant l'A β , une nouvelle étude récemment publiée (Sevigny et al., 2016) présente des résultats préliminaires très encourageants et renforce plutôt l'hypothèse de la cascade amyloïde. Cette étude est basée sur le développement d'un nouvel anticorps humain monoclonal, appelé aducanumab, ciblant sélectivement les agrégats d'A β et plus particulièrement les oligomères solubles et les fibrilles insolubles. Les tests précliniques effectués sur les animaux transgéniques montrent qu'un analogue de l'aducanumab traverse la barrière hémato-encéphalique, lie l'A β du parenchyme cérébral et réduit l'A β soluble et insoluble des plaques d'une manière temps- et dose-dépendante, ce qui a permis le démarrage des essais cliniques. Ces derniers ont été testés sur des patients en phase précoce (« mild stage») auxquels ont été administrés tous les mois pendant 2 ans du placebo ou des doses de 1, 3, 6 ou 10 mg.Kg⁻¹ d'aducanumab. Les résultats sont prometteurs puisque d'après plusieurs analyses les patients ayant reçu l'aducanumab présentent une réduction considérable des plaques amyloïdes d'une manière temps- et dose-dépendante. Le développement de cet anticorps est actuellement en phase III des essais cliniques et devrait renforcer l'importance de cibler le peptide A β dans le traitement de la MA.

- La réduction de l'agrégation d'A β

L'agrégation des peptides A β en fibrilles à la base de la formation des plaques amyloïdes extracellulaires a conduit à développer **des composés anti-agrégants** empêchant l'oligomérisation des peptides A β ou promouvant l'élimination des agrégats.

Plusieurs composés, tels que le tramiprosat ou le scyllo-inositol ont été développés sans succès une fois testés chez les patients.

- Augmenter la clairance du peptide A β

La quatrième approche thérapeutique est basée sur l'utilisation de composés visant à réduire le taux de peptides A β dans le plasma. Notamment, la **Néprilysine**, une métalloprotéase dépendante de zinc, une enzyme de dégradation du peptide A β dans le cerveau, a constituée l'objet d'études *in vitro* mais également sur des animaux transgéniques de la MA. Malgré les effets positifs *in vitro* sur la réduction d'A β dans le plasma, la concentration d'A β

dans le cerveau des animaux n'était pas réduite, suggérant que ce type d'approche thérapeutique possède une efficacité limitée.

La difficulté de développement de l'ensemble de ces approches thérapeutiques, est notamment dû à la différence d'efficacité clinique entre les essais effectués sur l'animal et ceux effectués sur l'homme. Toutes ces données et recherches suggèrent fortement une évolution de l'hypothèse de la cascade amyloïde dans les temps à venir.

7- La maladie d'Alzheimer : A β intracellulaire Vs A β extracellulaire et synaptotoxicité

Historiquement, les plaques séniles, constituées de fibrilles d'A β , étaient considérées comme l'origine et la cause des phénomènes neurotoxiques et neurodégénératifs observés au cours de la MA (Hardy and Higgins, 1992). Cependant, les déficits cognitifs observés et une perte plus importante de synapses que ne peut l'expliquer la mort neuronale ont permis de suggérer que **ce sont les oligomères d'A β qui sont responsables des premiers déficits synaptiques et cognitifs à l'origine du développement de la MA.** Au contraire, les dépôts amyloïdes insolubles constituant les plaques séniles auraient plutôt un rôle de réservoir des oligomères bioactifs (Haass and Selkoe, 2007).

C'est pourquoi, l'évolution récente de l'hypothèse de la cascade amyloïde (figure 11) met en lumière que **ce sont les oligomères d'A β qui sont responsables des premiers déficits synaptiques et cognitifs observés dans la MA.** Cette hypothèse est devenue le modèle dominant du développement de cette pathologie (Glennner and Wong, 1984; Hardy and Higgins, 1992) même si la linéarité de cette cascade reste encore controversée (De Strooper and Karran, 2016). **Des études ont révélé que la perte des synapses constitue le marqueur qui corrèle le mieux avec les déficits mnésiques observés** (Selkoe, 2002; Shankar et al., 2007). Depuis, de nombreuses autres études ont confirmé les effets synaptotoxiques des formes solubles oligomériques (pour revue: Shankar and Walsh, 2009).

Cependant, bien que le peptide A β ait été identifié dans le milieu des années 1980 comme le composant majoritaire des plaques amyloïdes extracellulaires, des études réalisées sur culture primaire de neurones traitées avec du peptide A β synthétique ou extraits de cerveau humain ainsi que des études basées sur des animaux transgéniques ont montré l'existence intracellulaire de ce peptide (Gouras et al., 2000; Grundke-Iqbal et al., 1989; pour revue: LaFerla et al., 2007; Ripoli et al., 2014; Tampellini et al., 2011) et notamment à l'intérieur des synapses (Pickett et al., 2016). **Il semblerait que l'accumulation intracellulaire d'oligomères d'A β serait un événement préalable à la formation des plaques séniles dans la pathogenèse de la MA, responsable des dysfonctionnements précoces de la MA.** Plusieurs études montrent que l'accumulation intraneuronale de peptides A β coïncide avec le dysfonctionnement synaptique ainsi que les altérations de la mémoire dépendantes

de l'hippocampe, structure cérébrale impliquée dans la mémoire spatiale (Billings et al., 2005; LaFerla et al., 2007; Umeda et al., 2015).

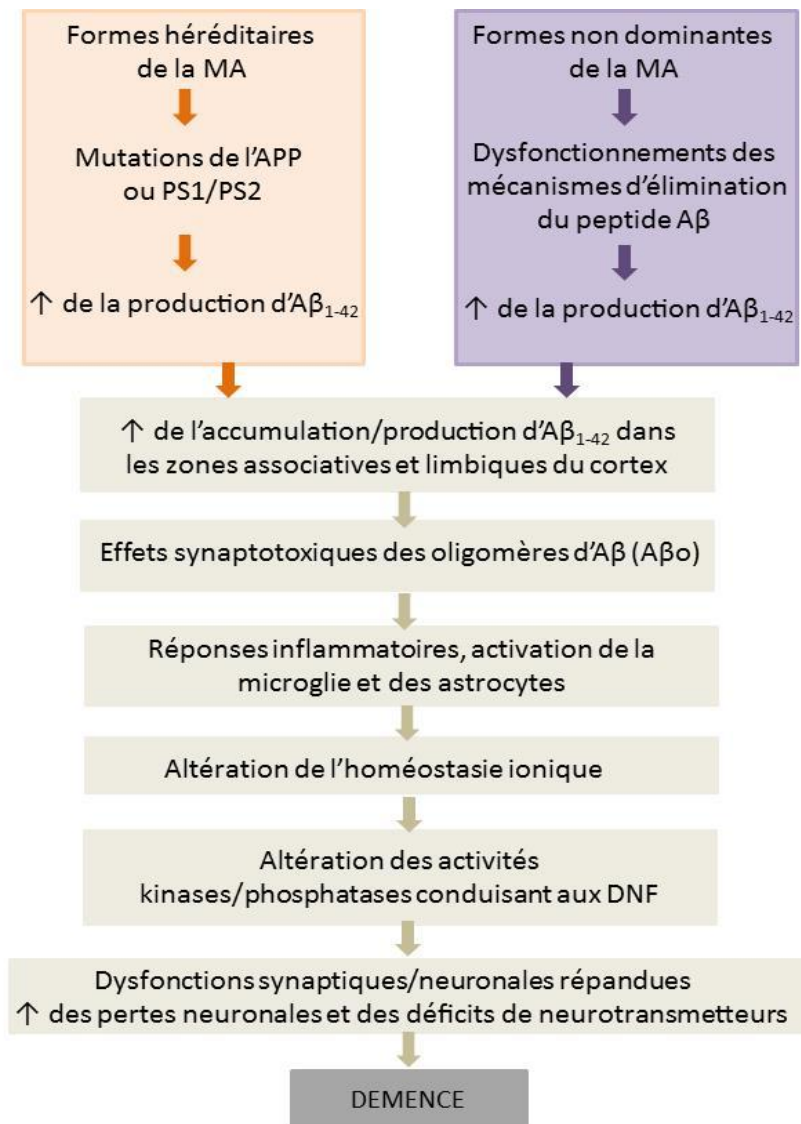


Figure 11 : L'hypothèse de la cascade amyloïde. Illustration de la séquence des événements majeurs conduisant au développement de la MA. Figure adaptée d'après Selkoe and Hardy, 2016.

Le lieu de production et la localisation du peptide A β est controversée, comme détaillé précédemment dans la Partie [II.1.1-4 Traffic, processing de l'APP et localisation du peptide A β]. Il reste à déterminer si la majorité du peptide A β produit provient d'une production intracellulaire au sein des membranes des organites intraneuronaux ou si cette production se fait au niveau de la membrane plasmique et le relargage extracellulaire du peptide est immédiat. Néanmoins, l'internalisation du peptide A β et ses effets inhérents sont régulés par plusieurs récepteurs et transporteurs avec lesquels le peptide peut interagir (tableau 2). Notamment, des récepteurs post-synaptiques comme les récepteurs cholinergiques nicotiques $\alpha 7nAChR$ mais également **les récepteurs ionotropiques**

glutamatergiques NMDA (*N*-methyl-D-aspartic acid) et AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) peuvent interagir avec le peptide A β (Dinamarca et al., 2012). Il est important de noter que ces récepteurs interagissent avec les formes oligomériques d'A β et non les formes fibrillaires (Nimmrich et al., 2008a) et que leurs fonctionnements en est altéré menant à des perturbations synaptiques. Actuellement, il est en effet bien établi que la cible privilégiée du peptide A β est la synapse (Li et al., 2013; Ripoli et al., 2014; Shankar and Walsh, 2009), conduisant aux altérations synaptiques et dysfonctionnements neuronaux observés lors du développement de la MA et aboutissant à l'altération de la mémoire.

Récepteur/Transporteur fixant le peptide A β	Effet	Référence
Récepteur NMDA	<ul style="list-style-type: none"> - \uparrow neurotoxique de l'influx calcique - Endocytose des R NMDA 	De Felice et al., 2007 Snyder et al., 2005
Récepteur AMPA	Endocytose du R AMPA par voie calcineurine-dépendante	Zhao et al., 2010
Récepteur GABA	Inhibition du R GABA	Ulrich, D., 2015
Intégrines de type α v	Inhibition de la LTP (« long term potentiation », corrélat électrophysiologique d'induction de mémoire au niveau cellulaire)	Wang et al., 2008
Récepteur de la protéine prion (PrP ^C)	<ul style="list-style-type: none"> - Liaison au niveau des radeaux lipidiques - Active la Src Kinase Fyn 	Um et al., 2013
Récepteur nicotinique α 7nAChr	<ul style="list-style-type: none"> - Internalisation du récepteur - Accumulation intracellulaire d'Aβ - Induit endocytose des R NMDA 	Wang et al., 2000
Récepteur lié aux lipoprotéines (LRP1)	<ul style="list-style-type: none"> - Liaison au récepteur ou via son ligand ApoE - Induit endocytose de LRP1 - Accumulation intracellulaire d'Aβ 	Fuentealba et al., 2010

Tableau 2 : Exemples de récepteurs et transporteurs membranaires du peptide A β .

Partie III – La synapse glutamatergique

Les synapses représentent la zone de contact et de communication entre deux neurones. Elles sont formées d'un **compartiment pré-synaptique (bouton axonal** du neurone émetteur) et **post-synaptique (épine dendritique** du neurone receveur). Les épines dendritiques qui constituent la région réceptrice de la plupart des synapses excitatrices, ont une structure hétérogène et varient en volume et en nombre. Elles sont représentatives des connexions excitatrices que le neurone établi avec d'autres neurones.

Dans le SNC (système nerveux central), deux types de synapses coexistent : les synapses électriques et chimiques. Les synapses électriques sont minoritaires dans le SNC des vertébrés, la communication se fait via un échange d'ions et un passage de courant directement via des jonctions serrées. Les synapses majoritairement retrouvées au sein du SNC, les synapses chimiques, représentent la majorité de la neurotransmission (Figure 12).

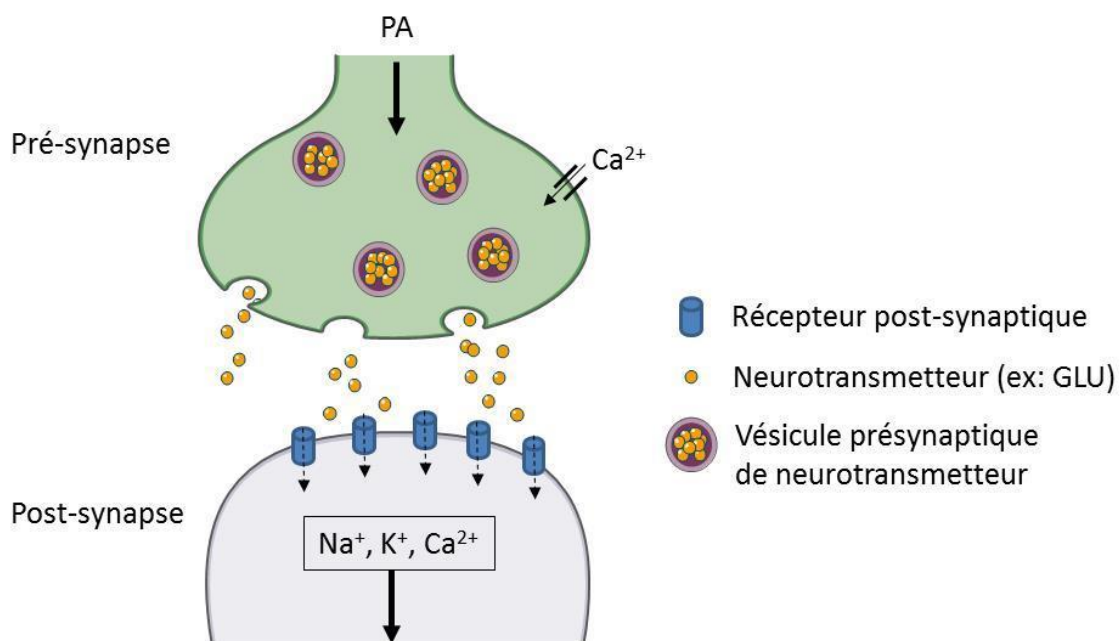


Figure 12 : Illustration schématique d'une synapse chimique. Le potentiel d'action (PA) arrive au bouton axonal au niveau pré-synaptique (flèche noire) et provoque l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée de calcium induit la fusion des vésicules de neurotransmetteurs (par exemple de glutamate) qui vont être libérés dans la fente synaptique avant de se lier aux récepteurs post-synaptiques. Il y aura alors ouverture des canaux perméables aux ions. L'entrée de cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) dans l'élément post-synaptique provoquera une dépolarisation membranaire alors que l'entrée d'anions (Cl^-) provoquera une hyperpolarisation. L'entrée de ces ions permettra la transmission du message nerveux.

Le neurone émetteur de l'influx nerveux va recevoir le potentiel d'action au niveau du bouton axonal, c'est-à-dire dans le compartiment pré-synaptique. Dans ce compartiment, les neurotransmetteurs contenus dans les vésicules présynaptiques vont être libérés dans la fente synaptique et récupérés au niveau du compartiment post-synaptique, à l'épine dendritique. Les neurotransmetteurs vont se lier à des récepteurs-canaux et vont permettre l'ouverture des canaux ioniques post-synaptiques et assurer ainsi le relai du signal. L'efficacité de l'élément post-synaptique à répondre au message pré-synaptique constitue la force synaptique. De plus, les synapses ont la propriété d'être plastiques, c'est-à-dire qu'elles adaptent leur force et morphologie selon l'usage qui en est fait, on appelle ce phénomène la plasticité synaptique.

1- La neurotransmission glutamatergique

Il existe différents types de synapses selon le type de neurotransmetteurs qu'elles contiennent (tableau 3). **La majorité de la neurotransmission excitatrice dans le SNC est effectuée au sein des synapses excitatrices glutamatergiques.** Ce type de synapses est très abondante dans l'hippocampe et le cortex.

Neurotransmetteur	Effet post-synaptique
Glutamate (GLU)	Excitateur
Acétylcholine	
Catécholamines (Dopamine, Adrénaline..)	
Histamine	
Adénosine triphosphate (ATP)	
Sérotonine	
Acide γ -aminobutyrique (GABA)	Inhibiteur
Glycine	
Neuropeptides	Excitateur et inhibiteur
Monoxyde d'azote (NO)	

Tableau 3 : Exemple de neurotransmetteurs et leurs effets au niveau post-synaptique.

Parmi les neurotransmetteurs excitateurs, le **glutamate** constitue le principal neurotransmetteur excitateur du SNC et joue un rôle essentiel dans le développement du cerveau et dans **les mécanismes moléculaires qui sont à la base des processus de mémorisation et d'apprentissage.**

Le glutamate active deux types de récepteurs appartenant à des familles pharmacologiquement différentes et classés en fonction de leurs modalités de transduction : métabotropiques ou ionotropiques (Dhami and Ferguson, 2006; Pin and Duvoisin, 1995).

1-1 Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques (mGluRs) ce sont des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (GPCR « G-protein coupled receptor »). Il existe huit sous-types de récepteurs métabotropiques subdivisés en trois familles selon leurs homologies de séquence et leur couplage à un second messager (figure 13) (Pour revue: Conn and Pin, 1997).

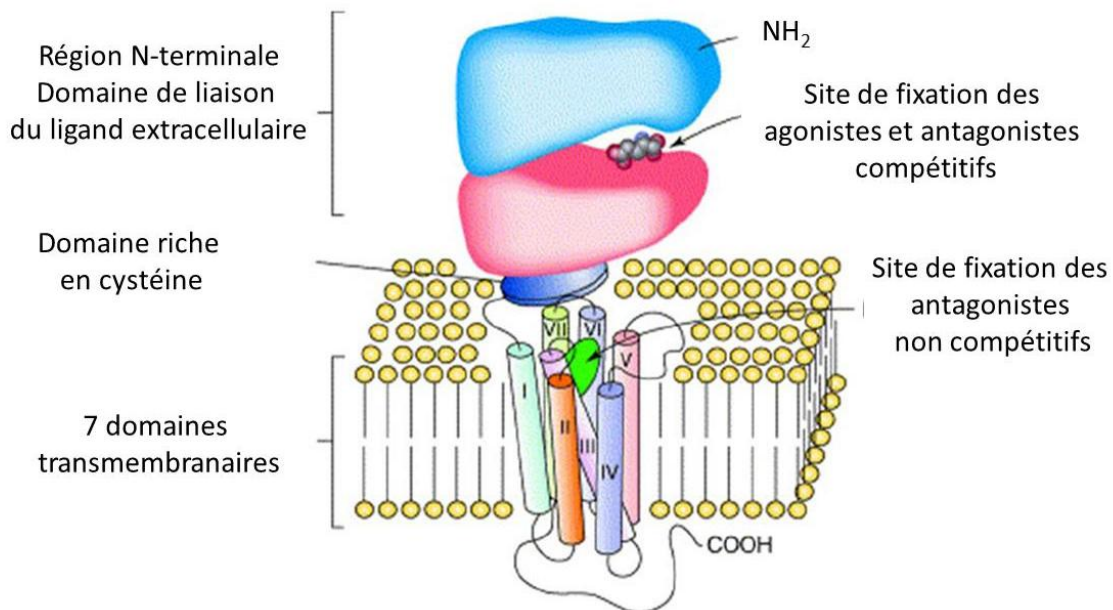


Figure 13 : Illustration schématique d'un récepteur métabotrope glutamatergique. Le domaine liant le neurotransmetteur (glutamate) se trouve au niveau de la région N-terminale et est suivi du domaine heptahélice (la région à 7 domaines transmembranaires) et du domaine C-terminal cytosolique (COOH). Figure adaptée d'après Spooren et al., 2001.

Les récepteurs mGluR1 et mGluR5 appartiennent au groupe de la famille I, mGluR2 et mGluR3 au groupe II et mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8 appartiennent au groupe III (tableau 4, partie mGluRs).

Le groupe I inclut les récepteurs couplés positivement à la phospholipase C (PLC) via des protéines G de type Gq. L'activation de la PLC provoque à son tour la libération de diacylglycérol (DAG) et d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). L'IP3 va induire la libération des réserves intracellulaires de Ca^{2+} stockées dans le réticulum endoplasmique.

Les récepteurs métabotropiques des groupes II et III sont couplés négativement à l'adénylate cyclase (AC) via des protéines G inhibitrices de type Gi/Go. L'activation de ces récepteurs va conduire à l'activation de ces protéines G inhibitrices qui vont réduire l'activité des AC et diminuer la quantité d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans la cellule (Pour revue: Conn and Pin, 1997). L'AMPc est impliqué dans l'activation de la protéine kinase

A (PKA), phosphorylant les récepteurs Kainate mais également AMPA et potentialisant leur activité.

Les mGluRs régulent et participent à la transmission synaptique par le biais de divers effecteurs comme la protéine kinase C (PKC), les récepteurs à l'inositol triphosphate ou des canaux ioniques membranaires.

Parmi ces trois groupes de récepteurs, les récepteurs métabotropiques du groupe I sont localisés au niveau post-synaptique, les récepteurs du groupe II au niveau pré et post-synaptique et les récepteurs du groupe III sont exprimés préférentiellement au niveau pré-synaptique où ils modulent la libération des neurotransmetteurs en agissant comme des autorécepteurs pré-synaptiques (tableau 4, partie mGluRs). Un certain nombre d'études ont montré que les récepteurs métabotropiques du groupe I sont impliqués dans de nombreux désordres neuropsychiatriques et dans la plasticité synaptique (Pour revue: Bhattacharyya, 2016). La variété des rôles tenus par les récepteurs métabotropiques du glutamate se reflète dans la diversité de leur localisation autour de la synapse glutamatergique mais également dans leurs caractéristiques pharmacologiques et leur sensibilité sélective aux agonistes/antagonistes (tableau 5, partie mGluRs).

Famille	iGluRs			mGluRs		
Récepteur	AMPA	Kainate	NMDA	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Nature de complexe	Homo/hétéro oligomérique			Homo/hétéro oligomérique		
Sous-unités	GluA1 à 4	GluK1 à 5	GluN1 GluN2(A,B,C,D) GluN3(A,B)	mGluR 1 et 5	mGluR 2 et 3	mGluR 4, 6,7,8
Perméabilité (iGluRs) ou effets induits (mGluRs)	Na ⁺ , K ⁺ , (Ca ²⁺)	Na ⁺ , K ⁺ , (Ca ²⁺)	Na ⁺ , K ⁺ , Ca²⁺ +++	↑ PLC	↓ AC	
Localisation	Post-synaptique	Pré et post-synaptique	Post-synaptique	Post-synaptique	Pré-synaptique	

Tableau 4 : Récapitulatif des principales caractéristiques des récepteurs glutamatergiques ionotropiques et métabotropiques.

1-2 Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques (iGluRs) sont des récepteurs canaux perméables aux cations sodium (Na⁺), calcium (Ca²⁺) et potassium (K⁺) (tableau 4, partie iGluRs).

Il existe trois groupes de récepteurs ionotropiques présents dans le SNC. Ils sont classés selon leurs caractéristiques pharmacologiques, leur sensibilité sélective aux agonistes, leur sensibilité au voltage et leur localisation (tableau 5, partie iGluRs). Ces récepteurs portent le

nom de l'agoniste qui a permis de les identifier : AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate), NMDA (*N*-methyl-d-aspartate) et Kainate (KA).

Famille	iGluRs			mGluRs		
Récepteur	AMPA	Kainate	NMDA	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Particularités	<ul style="list-style-type: none"> - GluA2 imperméable au Ca^{2+} - Transmission Synaptique excitatrice rapide 	<ul style="list-style-type: none"> - 2 sites de liaison d'affinités différentes - Impliqués dans l'Épilepsie - Modulent la libération de Glutamate 	<ul style="list-style-type: none"> - Canal bloqué par le Mg^{2+} au potentiel de repos - Apprentissage, mémoire, induction de la plasticité synaptique +++ 	Régulation de l'excitabilité neuronale via la modulation des canaux ioniques	Impliqués dans l'inhibition de la libération de Glutamate et autres neurotransmetteurs	
Agonistes	AMPA	Kainate	NMDA	(S)-3,5-DHPG	DCG-IV	
Antagonistes	DNQX, NBQX, CNQX	GYKI 53655	APV	AIDA, MPEP	LY341495	
Sensibilité au voltage	Voltage-dépendant	Voltage-dépendant	Voltage-dépendant	RCPG	RCPG	

Tableau 5 : Particularités différenciant les récepteurs glutamatergiques ionotropiques et métabotropiques.

La structure globale des iGluRs (figure 14) est partagée par tous les représentants des récepteurs de cette famille. Chaque sous-unité d'iGluRs est composée de quatre domaines : un domaine amino-terminal (domaine N-terminal), un domaine de liaison de l'agoniste (Glutamate ou Glycine) formé par le repliement spatial des deux boucles extracellulaires S1 et S2. Ces deux boucles étant reliées au domaine transmembranaire (TM) composé de 4 régions hydrophobes (TM I-IV) qui définit une partie du pore du récepteur tétramérique. Et enfin, le domaine carboxy-terminal, cytoplasmique. Ce dernier est le domaine le plus variable entre les différentes sous-unités des iGluRs et participe notamment au trafic et à l'ancrage des iGluRs aux protéines d'échafaudage dans la membrane plasmique.

La fonction des iGluRs est conditionnée par leur localisation dans le complexe synaptique, soit au niveau du compartiment pré-synaptique où ils modulent la libération de neurotransmetteurs (récepteurs de type kainate), soit dans la densité post-synaptique (PSD, sous-structure de l'épine dendritique composée d'une centaine de protéines telles que les récepteurs-canaux), où ils participent à la transmission synaptique (AMPA, NMDA et KA). Enfin, les iGluRs peuvent aussi être extra-synaptiques et être activés par diffusion du glutamate hors de la fente synaptique (« spillover ») soit par la libération de glutamate par les cellules gliales.

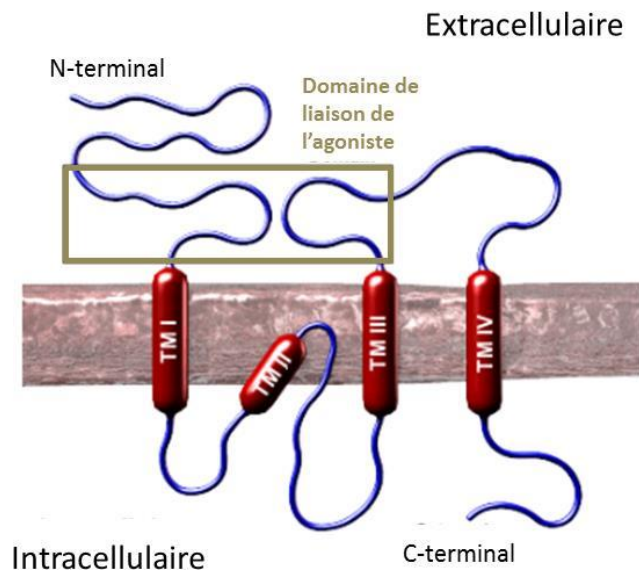


Figure 14 : Représentation schématique de la structure générale d'un récepteur ionotrope glutamatergique. Le domaine N-terminal est extracellulaire alors que le domaine le plus court, le domaine C-terminal, est intracellulaire. Figure adaptée d'après (Bristol, n.d.).

1-2.1 Le récepteur AMPA

Le récepteur AMPA (R-AMPA) est un complexe formé de 4 sous-unités : GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4 (tableau 4, partie iGluRs) produites par des gènes différents. C'est donc un récepteur glutamatergique tétramérique. Ce type de sous-unités formant le récepteur détermine ses caractéristiques électrophysiologiques. **Le R-AMPA forme un canal ionique perméable aux ions K^+ et Na^+ mais possède également une perméabilité limitée au Ca^{2+} .** C'est la sous-unité GluA2 qui bloque le passage des ions calcium à travers le pore (tableau 5, partie iGluRs). Cette fonction est contrôlée par le changement post-transcriptionnel de l'acide aminé glutamine (Q) dans la région TMII Q/R par l'arginine (R). GluA2(Q) est perméable au calcium alors que GluA2(R) ne l'est pas. Les récepteurs ne possédant pas cette sous-unité GluA2(R) sont donc perméables aux ions calcium.

Les sous-unités GluA possèdent un domaine extracellulaire N-terminal, un domaine de liaison au ligand au niveau des régions S1 et S2, la région transmembranaire (TM) et la région C-terminale intracellulaire (figure 15). Pour chaque sous-unité il existe des variations d'épissage portés sur la queue carboxyterminale (domaine de liaison PDZ permettant d'interagir avec des protéines) et la dernière boucle extracellulaire (région « Flip-Flop »).

Ces sous-unités possèdent une forte homologie des régions extracellulaires et transmembranaires et diffèrent par leur domaine C-terminal intracellulaire. Les sous-unités GluA1 et GluA4 possèdent un domaine c-terminal long tandis que les sous-unités GluA2 et GluA3 ont un domaine C-terminal plus court. Le domaine C-terminal de ces unités est crucial dans la régulation de la fonction des R-AMPA : l'ouverture du canal, le déplacement et la

stabilisation à la synapse (Anggono and Huganir, 2012). La composition en sous-unités gouverne ainsi le trafic des R-AMPA à la membrane. La longue queue C-terminale (GluA1, GluA4) est importante dans l'insertion des récepteurs à la synapse et dépend de l'activité durant le renforcement synaptique. Alors qu'en absence d'activité, les sous-unités ayant une queue C-terminale courte (GluA2, GluA3) sont en recyclage permanent.

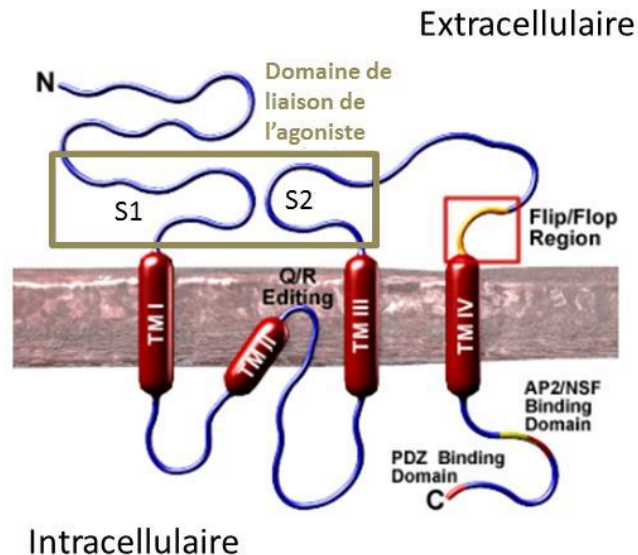


Figure 15 : Représentation schématique de la structure générale d'un récepteur AMPA. Le domaine N-terminal est extracellulaire alors que le domaine le plus court, le domaine C-terminal, est intracellulaire. Les variations d'épissage ont lieu dans la région « flip/flop » donnant deux variants pour chaque séquence de gène. La région C-terminale contient des domaines AP2, NSF et PDZ permettant l'interaction avec des protéines. Figure adaptée d'après (Bristol, n.d.).

Les R-AMPA sont les acteurs majeurs de la transmission synaptique rapide et sont présents dans l'ensemble des synapses glutamatergiques. Ces récepteurs sont donc activés très rapidement. Ils sont impliqués dans le déclenchement de la neurotransmission glutamatergique et présentent une mobilité latérale importante au niveau de la membrane. Ils permettent une conversion rapide de la libération de glutamate contenu dans les vésicules en activité électrique du neurone post-synaptique. Ces récepteurs sont donc concentrés majoritairement sur la membrane post-synaptique, au niveau des épines dendritiques au sein de la PSD. Néanmoins, leur localisation à l'échelle subcellulaire semble être variable. Il semblerait qu'ils soient présents en quantité importante au niveau synaptique. Au niveau extra-synaptique, les R-AMPA diffusent librement dans la membrane plasmique mais perdent leur mobilité une fois qu'ils pénètrent dans la synapse, donc les récepteurs extrasynaptiques serviraient de réservoir à la population de récepteurs post-synaptiques (Pour revue: Groc and Choquet, 2006).

1-2.2 Le récepteur NMDA

Le récepteur NMDA est un complexe formé de 7 sous-unités : GluN1, GluN2A-D et GluN3A-B (tableau 4, partie iGluRs). Ces récepteurs possèdent des caractéristiques structurales similaires aux autres iGluRs, une extrémité N-terminale, un domaine transmembranaires et un domaine C-terminal intracellulaire (figure 16).

Les R-NMDA présentent trois propriétés fondamentalement différentes des autres iGluRs : ils sont activés par le glutamate (le site de liaison se trouvant sur la sous-unité GluN2) **et par un co-agoniste, la glycine ou la D-sérine** (le site de liaison se trouvant sur la sous-unité GluN1), **ils sont fortement perméables aux ions calcium et ils possèdent une cinétique d'ouverture particulière** puisqu'ils sont bloqués aux potentiels négatifs (notamment au potentiel de repos) par le magnésium extracellulaire (tableau 5, partie iGluRs).

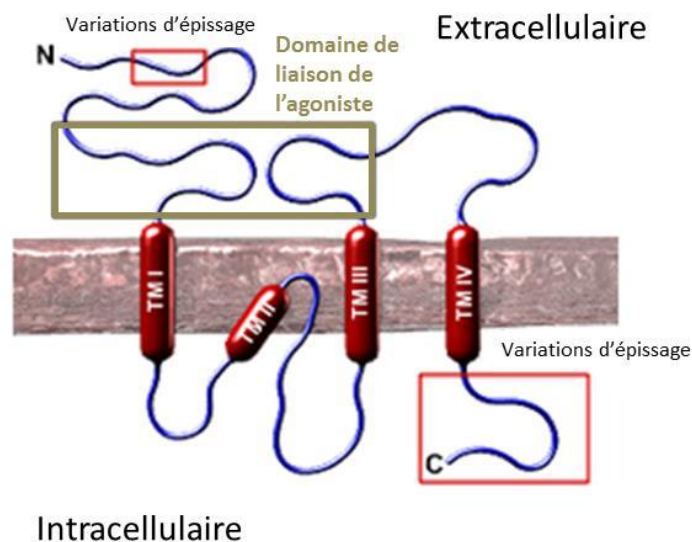


Figure 16 : Représentation schématique de la structure générale d'un récepteur NMDA. Comme l'ensemble des iGluRs, le domaine N-terminal est extracellulaire alors que le domaine le plus court, le domaine C-terminal, est intracellulaire. Figure adaptée d'après (Bristol, n.d.).

Ces récepteurs sont des hétéromères incorporant obligatoirement la sous-unité GluN1 et au moins une des sous-unités GluN2 et/ou GluN3, même si la grande majorité des R-NMDA seraient des complexes GluN1/N2. Ces sous-unités se présentent donc dans des combinaisons di-hétéromères (GluN1/GluN2A ou GluN1/GluN2B) ou tri-hétéromères (GluN1/GluN2A/GluN2B). La combinaison en sous-unités des R-NMDA détermine les propriétés fonctionnelles de ces canaux récepteurs (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). En effet, les différentes sous-unités diffèrent par leur cinétique d'ouverture du canal, leur localisation synaptique et leurs partenaires protéiques. Notamment, les sous-unités GluN2A

et GluN2B sont prédominantes dans le cortex, tandis que par exemple la sous-unité GluN2D est principalement exprimée dans le tronc cérébral et le diencephale.

Il y a donc une grande hétérogénéité dans la composition de ces récepteurs dans les épines dendritiques conférant des propriétés pharmacologiques et biologiques différentes. Ceci explique en partie **le rôle essentiel des R-NMDA dans de nombreuses formes de plasticité synaptique comme la potentialisation à long terme** (LTP, « long term potentiation » corrélat électrophysiologique d'induction des mécanismes moléculaires à la base des processus d'apprentissage et de mémorisation).

Le niveau d'expression des sous-unités varie également au cours du développement. Notamment, au cours du développement cérébral, la sous-unité GluN2B est majoritaire et confère une inactivation lente au R-NMDA composé de cette sous-unité. **La stimulation des R-NMDA composés de la sous-unité GluN2B provoque une réponse longue qui est nécessaire à l'établissement des connections glutamatergiques au cours du développement cérébral.** Ce n'est que plus tard que l'expression de la sous-unité GluN2A s'accroît en comparaison à celle de GluN2B. L'inactivation de la sous-unité GluN2A est plus rapide que celle de la sous-unité GluN2B. **Les propriétés électrophysiologiques des R-NMDA composés des sous-unités GluN1 et GluN2A sont mieux adaptées aux processus liés à la plasticité synaptique** (Cull-Candy et al., 2001). Les synapses contenant surtout GluN1/GluN2B représentent donc des synapses immatures alors que celles contenant surtout GluN1/GluN2A constituent les synapses matures (Pour revue: Mota et al., 2014).

Outre la disparité d'expression des différentes sous-unités des R-NMDA au cours du développement cérébral mais également dans les différentes structures cérébrales, il existe aussi une disparité dans la localisation cellulaire de ces récepteurs.

Localisation synaptique et extrasynaptique des R-NMDA

Il a été démontré que les R-NMDA peuvent se trouver soit localisés à la synapse, ce sont les R-NMDA synaptiques soit à l'extérieur de la synapse, au niveau des dendrites, aux bords des épines, sur les axones, les terminaisons axonales ou sur les cellules gliales et dans ce cas il s'agit des R-NMDA extra-synaptiques. Les récepteurs synaptiques et extra-synaptiques sont différenciés non seulement par leur localisation mais aussi par l'induction préférentielle de voies de transduction différentes. **Une fonction neuroprotectrice est attribuée aux R-NMDA synaptiques tandis qu'une fonction délétère est attribuée aux R-NMDA extrasynaptiques** (Hardingham et al., 2002).

En effet, la localisation des R-NMDA influence leur couplage avec des protéines menant à des cascades de signalisation promouvant la mort soit la survie neuronale. Notamment, les kinases ERK (« Extracellular signal-regulated kinases ») jouant un rôle dans les cascades de signalisation pour la plasticité neuronale et la survie, sont régulées en partie par l'activation des R-NMDA. Le pool synaptique des R-NMDA active des protéines kinases tel que ERK, promouvant la survie cellulaire (Léveillé et al., 2008), mais également la CaMK (« Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase») ou le PI-3K (« phosphatidylinositol 3-

kinase »). Le pool synaptique des R-NMDA promeut également l'induction de gènes de survie (tel que le BDNF « brain-derived neurotrophic factor »), l'activation de CREB (« cAMP response element binding protein », facteur de transcription impliqué dans les voies de signalisation de survie cellulaire, dans la plasticité synaptique et la neurogénèse), supprime également l'expression des gènes pro-apoptotiques (*Puma*) ou de FOXO (Forkhead box protein O) impliqués dans l'induction de la mort neuronale et de plus, active également les défenses contre le stress oxydatif (Papadia et al., 2008). Or, l'ensemble de ces protéines de transduction a été décrites comme étant impliquées dans les mécanismes de LTP, ce qui suggère un rôle important des R-NMDA synaptiques dans la LTP. Au contraire, l'activation des R-NMDA extrasynaptiques promeut l'activation de voies de signalisation de mort neuronale en inactivant les voies de signalisation intracellulaires impliquant CREB et ERK suggérant que l'activation de ces récepteurs induit une augmentation de l'activité des phosphatases, également observée lors de la dépression à long terme (LTD, « long term depression » corrélat électrophysiologique de la réduction de l'efficacité synaptique à long terme) (Sheng and Kim, 2002).

Cependant, des auteurs ont montré que l'activation des R-NMDA seuls ne déclenche pas de mort neuronale mais c'est la co-activation des R-NMDA extrasynaptiques et synaptiques qui en serait responsable (Zhou and Sheng, 2013). De plus, les données concernant la nature des sous-unités composant les R-NMDA synaptiques et extrasynaptiques restent encore très controversées.

Il est connu que la signalisation calcique, initiée par les R-NMDA synaptiques, permet la communication entre les synapses et le noyau afin de promouvoir la survie neuronale (Hardingham and Bading, 2010). Les récepteurs extrasynaptiques agissent comme des antagonistes à cet effet protecteur en perturbant la communication synapse-noyau à plusieurs niveaux. **Un déséquilibre du ratio R-NMDA synaptiques/extrasynaptiques pourrait donc participer à la perte synaptique rencontrée dans des pathologies neurodégénératives comme la MA.** Néanmoins, ce n'est pas le calcium qui détermine la neurotoxicité mais plutôt l'influx calcique à travers les R-NMDA localisés en dehors de la synapse qui est particulièrement nocive pour les neurones (Pour revue: Zhang et al., 2016). La mémantine, antagoniste non compétitif des R-NMDA, bloque préférentiellement les R-NMDA extrasynaptiques du fait de sa cinétique rapide de retrait au niveau du canal de ces récepteurs et agit comme un bloqueur de canaux ouverts en présence d'une augmentation prolongée de la concentration en glutamate ou d'une activité prolongée des canaux (à l'échelle des minutes) comme c'est le cas pour les récepteurs extrasynaptiques. Par contre, cet antagoniste est relativement inactif lorsque l'augmentation de la concentration en glutamate n'a lieu que pendant quelques millisecondes comme c'est le cas pour les récepteurs synaptiques (Xia et al., 2010). Une étude basée sur le mode d'action de la mémantine (Atri et al., 2013) a montré que l'utilisation de celle-ci permet de réprimer la mort neuronale dépendante des R-NMDA extrasynaptiques. Ceci confirme que l'activation des R-NMDA extrasynaptiques contribue fortement à l'excitotoxicité.

Les modulateurs endogènes du R-NMDA

L'activation des R-NMDA est régulée par des ions et des composés endogènes ou chimiques présentant des sites de fixation sur les sous-unités GluN1 ou GluN2 du récepteur. Parmi les composés endogènes se trouvent les **ions magnésium (Mg^{2+})**. Cet ion est un antagoniste non-compétitif réversible dont la fixation dans le pore du canal est contrôlée par le potentiel de membrane. Au potentiel membranaire de repos (-70 mV), le récepteur est bloqué par les ions Mg^{2+} . Lorsque le potentiel de membrane augmente, les ions Mg^{2+} libèrent le pore permettant un influx ionique après la fixation du glutamate et du co-agoniste sur le récepteur. Le R-NMDA est activé par la fixation simultanée du glutamate et d'un co-agoniste : la glycine ou la D-sérine. Leur site de fixation sur le R-NMDA est positionné sur la sous-unité GluN1 (Johnson and Ascher, 1987; Kleckner and Dingledine, 1988) alors que le glutamate se fixe exclusivement sur la sous-unité GluN2 (Anson et al., 1998).

Les modulateurs pharmacologiques du R-NMDA

Plusieurs types de modulateurs pharmacologiques existent mais pour des raisons pratiques, seulement certains d'entre eux seront cités dans ce manuscrit et notamment ceux ayant été utilisés. Parmi les modulateurs pharmacologiques se trouve par exemple l'**AP-5** [D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5)] : antagoniste compétitif réversible qui agit au niveau du site de fixation du glutamate. Un autre modulateur exogène est le **MK-801** [(5R,10S)-(+)-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]-cyclopten-5-10-imine maleate] : antagoniste non-compétitif et irréversible. La fixation irréversible de cet antagoniste dans le pore ne peut avoir lieu que si le récepteur est dans une conformation active. Parmi d'autres modulateurs exogènes se trouve aussi l'**Ifenprodil** : antagoniste non-compétitif bloquant spécifiquement les récepteurs formés par les sous-unités GluN1 et GluN2B.

Ces données confirment que les propriétés électrophysiologiques des R-NMDA varient en fonction de leur composition en sous-unités.

1-2.3 Les partenaires des récepteurs AMPA et NMDA

Une centaine de protéines composant l'épine dendritique et notamment la densité post-synaptique (PSD, « postsynaptic density ») ont été identifiées. **La PSD est une sous-structure de l'épine dendritique, regroupant la machinerie cellulaire à la base de la transduction du signal électrique en signal biochimique.** Parmi ces protéines composant la PSD se trouvent les récepteurs AMPA et NMDA (figure 17) mais également des éléments du cytosquelette comme l'actine ou la tubuline tout comme des protéines d'ancrage comme la PSD-95 (« postsynaptic density-95 », membre de la famille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK)) et de signalisation comme les familles de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). **Toutes ces familles de protéines retrouvées au sein de la PSD participent activement à l'établissement de la plasticité synaptique, qui constitue la**

capacité de la synapse à être constamment remodelée afin de répondre à une demande présynaptique. La force synaptique constitue quant à elle la capacité à répondre de façon efficace à l'influx pré-synaptique. Cette force synaptique est directement liée à la composition de la PSD.

Les R-NMDA interagissent aussi avec la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CaMKII) (figure 17) et les phosphatases PP et PP2B (non présentes sur la figure 17). Ainsi, lors de l'entrée d'ions Ca^{2+} via les R-NMDA dans l'élément postsynaptique, ce dernier va activer la CaMKII qui va s'auto-phosphoryler et va induire la phosphorylation des R-AMPA non synaptiques. Ceci va aboutir à l'augmentation de l'insertion des R-AMPA à la PSD. D'autre part, cette activation de la CaMKII va activer la MAPK (« Mitogen-activated protein kinases ») activant la voie de signalisation CREB induisant à terme la synthèse de protéines synaptiques. Parallèlement à cela, le Ca^{2+} entrant via les R-NMDA va également activer la voie de l'adénylate cyclase (AC) qui active l'AMPc puis les PKA phosphorylant les R-AMPA à la PSD.

Ces multiples interactions avec des enzymes sensibles au calcium permettent une régulation de l'activité des R-NMDA en fonction des concentrations calciques, le Ca^{2+} agissant comme un messager secondaire fondamental pour la modification de la synapse. **Toutes ces protéines partenaires des R-NMDA et AMPA au sein de la PSD participent aux mécanismes de plasticité synaptique,** phénomène essentiel pour l'établissement des mécanismes cellulaires et moléculaires à la base des processus d'apprentissage et de mémorisation.

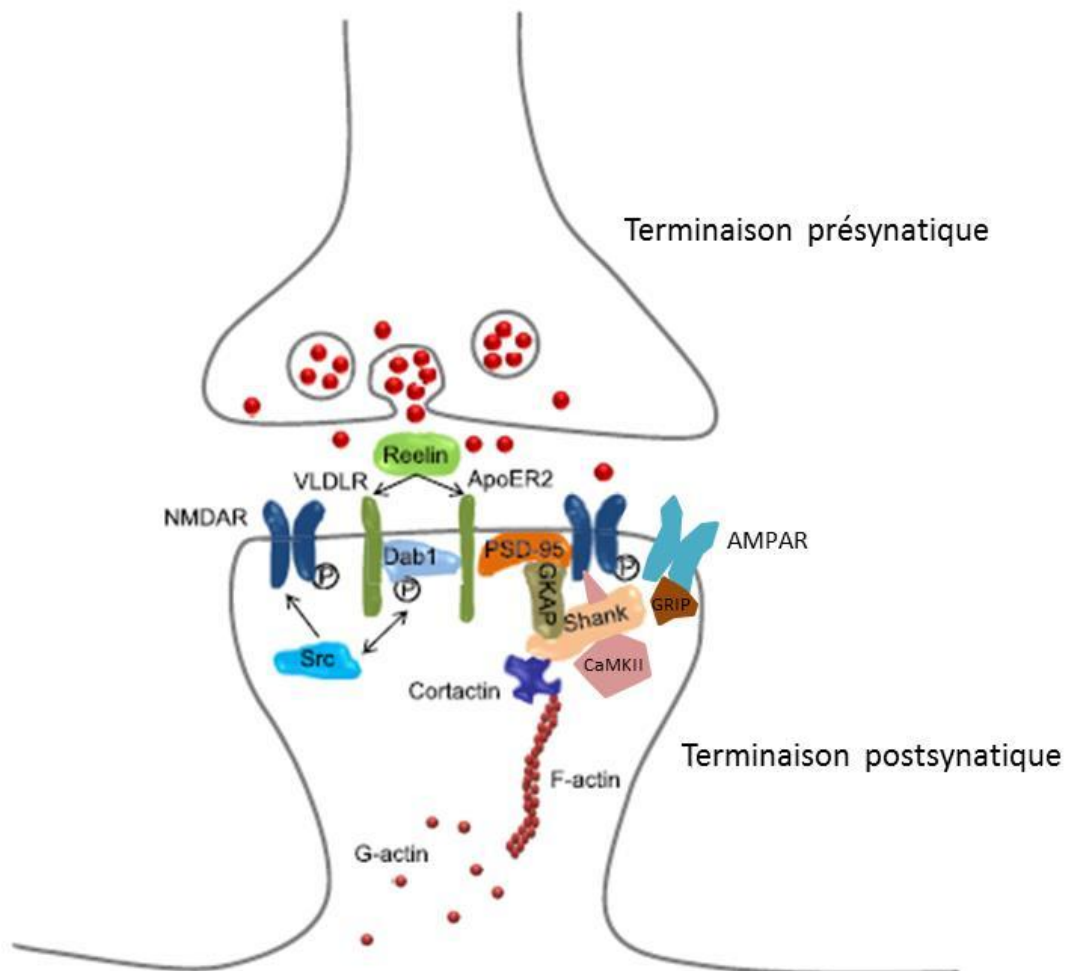


Figure 17 : Représentation schématique de l'ancrage des Récepteurs NMDA et AMPA à la PSD. Les R-NMDA sont indirectement liés au cytosquelette d'actine via la PSD-95, la GKAP (« guanylate kinase-associated protein »), Shank et les protéines « cortactin ». Lors de l'entrée d'influx calcique, le Ca^{2+} active la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CamKII) provoquant l'activation de la voie de signalisation CREB aboutissant à terme à la formation de nouvelles synapses. La protéine « Reelin », impliquée dans la plasticité synaptique, se lie à ses récepteurs ApoER2 ou VLDLR et active Dab1. ApoER2 s'associe avec la PSD-95 et associe le complexe de signalisation de la Reelin aux R-NMDA. L'activation de Dab1 induit l'activation de Src et la polymérisation de l'actine glomérulaire (G-actin) en actine filamenteuse (F-actin). Les R-AMPA sont quant à eux directement liés à des protéines GRIP (« glutamate receptor-interacting protein »). Figure adaptée d'après Mota et al., 2014.

2- Implication des récepteurs AMPA et NMDA dans la plasticité synaptique

La plasticité synaptique définit l'ensemble des mécanismes moléculaires mis en place au sein des synapses pour modifier leurs propriétés de neurotransmission en fonction de l'usage qui en est fait. Le cerveau est en effet capable de moduler positivement ou

négativement l'efficacité des connections synaptiques en réponse à une activité neuronale : c'est une caractéristique essentielle pour la formation et le fonctionnement des circuits neuronaux impliqués dans les mécanismes moléculaires à la base de l'apprentissage et de la mémoire.

Il est possible d'augmenter ou de diminuer la force de la neurotransmission pour quelques minutes voir des heures ou des mois : c'est ce que l'on appelle la potentialisation ou dépression à long terme de la fonction synaptique (Barnes, 1979). Ce modèle est considéré comme le modèle de référence pour l'étude moléculaire et cellulaire des mécanismes à la base des processus d'apprentissage et de consolidation de la mémoire et a permis des avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires à la base des processus mnésiques.

2-1 Modèle d'étude - LTP

Une des formes de plasticité synaptique peut être induite de façon électrique par stimulation à haute fréquence du neurone présynaptique : la potentialisation à long terme (ou LTP, « Long Term Potentiation »). Il s'agit d'un paradigme expérimental reproduisant une des formes de plasticité synaptique associée aux phénomènes moléculaires à la base des processus de consolidation de la mémoire.

En 1973 l'équipe de Bliss et Lomo a montré qu'une stimulation à haute fréquence de la voie perforante dans l'hippocampe provoquait une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique dans le Gyrus Denté (Bliss and Lomo, 1973). Ceci a également été mis en évidence au niveau des connections entre les collatérales de Schaeffer et les épines dendritiques de la zone CA3 (Alger and Teyler, 1976) et CA1 (corne d'Ammon 1) (Andersen et al., 1977) de l'hippocampe (figure 18). La LTP n'est pas propre aux synapses excitatrices de l'hippocampe, elle a également été mise en évidence dans beaucoup d'autres synapses de diverses régions du cerveau tel que l'amygdale, le cortex ou encore le cervelet (Maroun, 2006; Martin et al., 2000; Xin et al., 2006).

La stimulation électrique *in vivo* chez l'animal peut induire une LTP persistant plusieurs jours (Douglas and Goddard, 1975) et dont la modulation par des agents pharmacologiques peut affecter les capacités d'apprentissage chez l'animal, notamment par l'utilisation d'un antagoniste des R-NMDA, l'AP5 (Morris et al., 1986). **En effet, le déclenchement de la LTP dépend de la libération synaptique de glutamate et de l'entrée post-synaptique de Ca^{2+} qui se fait principalement via les R-NMDA : il s'agit de la LTP NMDA-dépendante.** Néanmoins, la LTP peut également être induite par l'activation des canaux calciques voltage-dépendants ou des mGluRs (mGluR1,5) : il s'agit de la LTP NMDA-indépendante (Lanté et al., 2006; Whitlock et al., 2006).

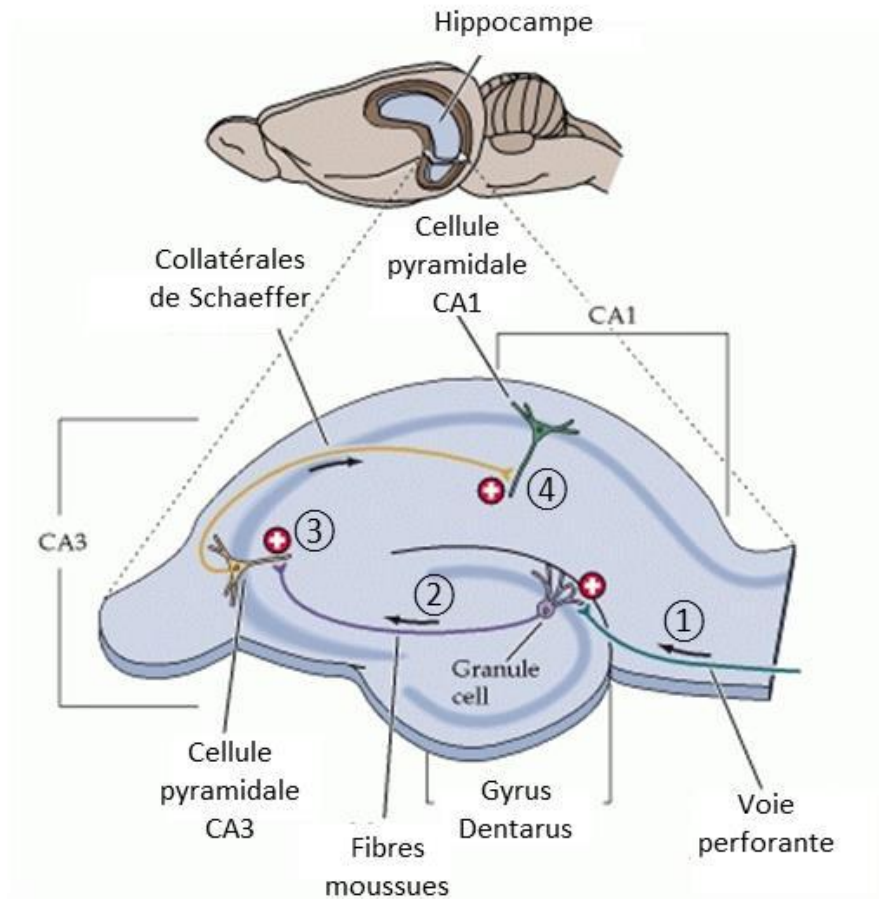


Figure 18 : Représentation schématique d'une coupe d'hippocampe de rongeur illustrant les principales régions, voies excitatrices et connexions synaptiques. Les voies excitatrices sont illustrées par le signe (+). L'influx venant du cortex entorhinal suit la voie perforante (1) puis la voie des fibres moussues du Gyrus denté (2) qui connecte les collatérales de Schaeffer dans la Corne d'Ammon (CA3) (3) qui rejoint les cellules de la région CA1(4). Cette voie a permis de mettre en évidence la LTP, qui a été observée dans chacune de ces 3 connexions synaptiques (2,3 et 4) représentées sur ce schéma adapté d'après Purves et al., 2001.

Lors d'une transmission synaptique brève à basse fréquence (figure 19) le potentiel d'action qui arrive au niveau présynaptique via la terminaison axonale induit une entrée de Ca^{2+} dans le compartiment présynaptique. Cette entrée de Ca^{2+} va permettre de déclencher l'exocytose des vésicules contenant le glutamate qui va être libéré dans la fente synaptique pour se fixer ensuite sur les R-AMPA et NMDA. Les R-AMPA s'ouvrent et laissent entrer des ions Na^+ induisant une dépolarisation membranaire ce qui va permettre d'expulser le Mg^{2+} bloquant les R-NMDA et d'induire un influx ionique après la fixation du glutamate et du co-agoniste sur le récepteur. Ceci peut déclencher un PPSE (potentiel postsynaptique exciteur), mais n'induit pas l'activation soutenue des R-NMDA nécessaire au déclenchement des mécanismes induisant la LTP.

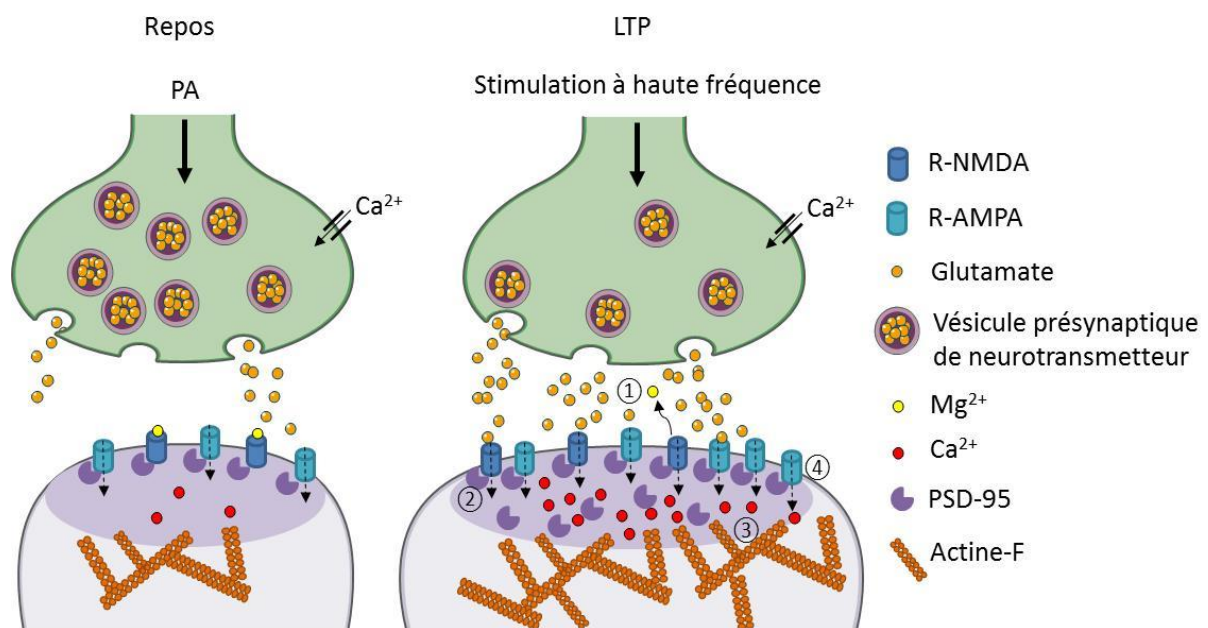


Figure 19 : Représentation schématique des principaux mécanismes synaptiques à la base du processus de LTP. Lors d'une neurotransmission simple, les R-NMDA sont bloqués par l'ion Mg²⁺, la synapse est dans un état de « repos » (gauche). Lors d'une stimulation synaptique à haute fréquence (droite), le compartiment pré-synaptique libère du glutamate qui va aller interagir avec les R-AMPA et R-NMDA. Cette stimulation va créer une dépolarisation membranaire permettant d'éjecter l'ion Mg²⁺ des R-NMDA ① et va alors provoquer une entrée massive d'ions Ca²⁺ ②, messenger secondaire majeur qui va activer plusieurs voies de signalisation conduisant à une réorganisation de l'actine en faveur de l'élargissement de la synapse ③, un recrutement des R-AMPA, de PSD-95 et R-NMDA ④. L'ensemble de ces processus et de ces changements fonctionnels et structuraux au sein de la synapse vont aboutir à une augmentation de l'efficacité synaptique via l'induction et la consolidation de la potentialisation à long terme.

La LTP comporte deux phases : l'**induction** et la **consolidation**. La phase d'induction peut être reproduite expérimentalement par une **stimulation à haute fréquence** du neurone présynaptique comme celle appliquée lors d'un protocole de LTP (par exemple, par une stimulation courte, inférieure à 1s et de fréquence élevée, 100 Hz). Ce type de stimulation induit une dépolarisation prolongée de la membrane plasmique via l'activation des R-AMPA suite à la libération de glutamate au niveau de la synapse, ce qui provoque l'expulsion du bouchon Mg²⁺ hors du canal du R-NMDA (figure 18). La suppression du Mg²⁺ permet le passage d'un influx massif d'ions Ca²⁺ au travers des R-NMDA, provoquant une augmentation importante de la concentration calcique postsynaptique. Les R-NMDA sont donc actifs lorsque la libération de glutamate provenant du bouton axonal, sa fixation sur les récepteurs et la dépolarisation de la membrane post-synaptique se produisent de manière concomitante. **Les récepteurs NMDA sont donc les principaux responsables de l'entrée de Ca²⁺ impliquée dans la LTP-NMDA dépendante** (Collingridge et al., 1983).

L'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} est centrale dans la phase de consolidation de la LTP. Elle induit **l'activation de voies de transduction** aboutissant à la potentialisation de la réponse post-synaptique. L'induction de la LTP est associée à l'activation de voies de transduction impliquant des protéines kinases comme les protéines kinases PKA et PKC (Roberson and Sweatt, 1996), les ERKs (Bading and Greenberg, 1991), les PI3K (Man et al., 2003) et les CaMKs (Malenka et al., 1989). L'ensemble de ces protéines kinases participent à l'augmentation de l'efficacité synaptique. Notamment, une néo-synthèse protéique a lieu suite à la phosphorylation par les kinases des facteurs de transcription tel que CREB (Kandel, 2001). Un autre exemple c'est l'activation de la CaMKII qui induit **la phosphorylation des récepteurs AMPA non synaptiques et augmente leur intégration et par conséquent leur nombre à la PSD grâce à la phosphorylation de GluA1 au niveau de la sérine 831** (Pour revue: Lisman et al., 2012). **Ceci a pour conséquence d'augmenter l'intégration synaptique de récepteurs AMPA présents au niveau extrasynaptique, ce qui augmente également leur conductance.**

Le niveau d'expression des sous-unités du R-NMDA semble avoir également un rôle dans l'établissement des processus de LTP. Notamment, la sous-unité GluN2B confère une inactivation lente au R-NMDA responsable d'un courant qui perdure, confère un temps d'ouverture plus long au R-NMDA laissant entrer une quantité plus importante de Ca^{2+} que les récepteurs GluN1/GluN2A. De plus, les R-NMDA GluN1/GluN2B interagissent plus avec la CaMKII impliquée dans la phosphorylation des R-AMPA et ERK. Des études soutiennent que le R-NMDA de type GluN1/GluN2B facilite l'induction de la LTP (Barria and Malinow, 2005). Cependant, d'autres études montrent des résultats en faveur de l'implication de la sous-unité GluN2A dans l'induction de la LTP (Bellone and Nicoll, 2007; Matta et al., 2011). Ainsi, l'implication de l'une ou l'autre de ces sous-unités dans la LTP reste encore très débattue.

2-2 Modèle d'étude - LTD

C'est dans les années 1980 que la dépression à long terme (LTD) a été découverte. Elle constitue en quelque sorte le mécanisme « inverse » de la LTP. C'est une forme de plasticité synaptique présente au niveau des synapses du cervelet, du cortex cérébral, de l'hippocampe et du striatum.

La LTD est induite par une stimulation à basse fréquence du neurone présynaptique (1-5 Hz) provoquant une entrée calcique faible/modérée dans le neurone postsynaptique suite à l'activation des R-NMDA (Lüscher and Malenka, 2012). **Les R-NMDA sont responsables de l'entrée de Ca^{2+} induite lors de la LTP mais également lors de la LTD.** Cependant, alors que la LTP est induite par une forte dépolarisation et un influx massif de calcium dans l'épine, la LTD est induite par une dépolarisation modérée et une faible entrée de Ca^{2+} se traduisant par l'activation des protéines phosphatases (Mulkey et al., 1994) impliquant la calcineurine et la PP1 (« protein phosphatase 1 »). Ces phosphatases vont déclencher les mécanismes

d'endocytose des R-AMPA depuis la PSD aboutissant à une réduction du nombre de R-AMPA à la PSD associé à une réduction du volume de l'épine.

Il a été suggéré que cette insertion/endocytose des R-AMPA pendant la LTP et la LTD ont lieu au niveau de zones pérисynaptiques à partir desquelles les récepteurs atteignent la densité postsynaptique par diffusion latérale (Lüscher and Malenka, 2012).

2-3 Formes de plasticité fonctionnelle et structurale

Toutes ces « **modifications fonctionnelles** », définies par les enregistrements électrophysiologiques, sont principalement attribuées à l'insertion/retrait des sous-unités GluA1 des R-AMPA dans la PSD au cours de la LTP/LTD (Malinow and Malenka, 2002) et aboutissent à une potentialisation ou dépression de la transmission synaptique. Ce type de modifications est accompagné par des « **modifications structurales** » au niveau des épines dendritiques. La force synaptique évolue proportionnellement avec le volume des épines. Ainsi, il a été montré que l'hétérogénéité de la taille des épines est la conséquence de différents niveaux d'activation synaptique (Oh et al., 2013). L'épine dendritique est structurée par l'actine qui va stabiliser la structure de la synapse mais aussi participer à la composition de la PSD via son interaction avec de nombreuses protéines d'échafaudage. Ainsi, des études ont mis en évidence que l'induction de la LTP provoque une polymérisation rapide de l'actine au niveau de l'épine dendritique alors que la LTD provoque une dépolymérisation de l'actine (Okamoto et al., 2004).

Il a été montré par de nombreuses études que l'ensemble de ces phénomènes de plasticité synaptique sont altérés dans la maladie d'Alzheimer. Ces perturbations résultent de l'effet synaptotoxique du peptide β -amyloïde affectant différents composants de la PSD notamment les R-NMDA.

Partie IV – La pathologie amyloïde et son impact sur la neurotransmission glutamatergique

1- Impact du peptide A β sur les mécanismes à la base de la neurotransmission

Les plaques amyloïdes extracellulaires constituées de peptides A β sont parmi les principaux changements pathologiques observés au cours du développement de la MA. De nombreuses autres altérations structurales et fonctionnelles s'ajoutent à ces changements pathologiques, telles que les réponses inflammatoires et le stress oxydatif (McGeer et al., 2006). La combinaison de l'ensemble de ces altérations aboutit à des dysfonctionnements et des pertes synaptiques. Néanmoins, la majorité des études indiquent que c'est l'accumulation de peptides A β dans le cerveau la cause principale des dysfonctionnements synaptiques à la base du développement de la maladie.

Alors que les plaques amyloïdes extracellulaires étaient considérées comme les agents causatifs de la MA et notamment leur dépôts au niveau du cortex et de l'hippocampe, **il est maintenant reconnu que ce sont les oligomères solubles d'A β (A β o) qui constituent les espèces à l'origine du déclenchement de la maladie.** La formation et l'accumulation de ces oligomères semblent mieux corrélés avec le début des symptômes, la progression de la maladie et le dysfonctionnement et la perte synaptique que les plaques amyloïdes extracellulaires ou les DNF (Gong et al., 2003; McLean et al., 1999). **Les oligomères d'origine synthétique présentent une toxicité analogue à celle des oligomères naturels extraits de cerveaux de patients atteints de la MA ou encore à ceux sécrétés par des cellules surexprimant les formes mutées de l'APP (Lacor et al., 2004; Snyder et al., 1994) fournissant ainsi un modèle de choix dans l'étude de l'assemblage et de la toxicité des oligomères d'A β .**

1-1 Atteinte des synapses

Plusieurs études montrent que les peptides A β o sont responsables des atteintes fonctionnelles et structurales des synapses contribuant à la perte synaptique caractéristique de la MA. Notamment, cette perte synaptique corrèle mieux avec les déficits mnésiques que tous les autres marqueurs comme par exemple le nombre de DNF (Pour revue: Masliah et al., 2006; Selkoe, 2002). **L'A β o qu'il soit d'origine synthétique, sécrété par les cellules surexprimant des formes mutées de l'APP humain ou extraits de cerveaux de patients atteints de la MA, induit une perte des synapses lorsqu'il est appliqué sur des cultures de**

neurones tandis que les monomères et les fibrilles semblent être relativement inertes (Lacor et al., 2004; Lambert et al., 1998).

Parallèlement à cette réduction du nombre de synapses, l'expression de plusieurs protéines des compartiments synaptiques sont également altérées telles que par exemple des protéines membranaires vésiculaires pré-synaptiques comme la synaptophysine (Arendt, 2009).

1-2 Altérations du cytosquelette d'actine

Les oligomères d'A β induisent des altérations importantes au niveau des épines dendritiques contribuant aux pertes synaptiques (Penzes and Vanleeuwen, 2011). Des études ont mis en évidence que la morphologie de l'épine dendritique est étroitement liée à son fonctionnement. Les filaments d'actine, composés de molécules d'actine et de protéines partenaires qui fixent l'actine, forment un réseau squelettique à l'intérieur de l'épine dendritique qui va jouer un rôle essentiel dans la morphogenèse, la maintenance et la plasticité de l'épine dendritique. **Les formes oligomériques du peptide A β induisent une perte des épines dendritiques** (Shankar et al., 2007) **expliquant la réduction de la densité synaptique retrouvée également chez des patients atteints de la MA ou dans des modèles transgéniques** (Knobloch and Mansuy, 2008).

Les mécanismes à l'origine de la disparition des épines dendritiques sont encore mal connus. Néanmoins, **l'une des principales hypothèses de la synaptotoxicité induite par les oligomères d'A β suggère que l'effondrement synaptique se fait de façon NMDA dépendante**. En effet, un blocage des R-NMDA est suffisant pour induire une perte des épines synaptiques similaire à ce que l'on obtient en présence des oligomères d'A β . La perte des épines dendritiques dû à la présence des oligomères d'A β peut être empêchée par l'utilisation d'anticorps contre le peptide A β et des molécules empêchant l'agrégation des oligomères mais requiert également une cascade de signalisation impliquant les R-NMDA, la calcineurine et la cofiline (Shankar et al., 2007a). Ces données suggèrent que les oligomères d'A β activeraient des voies de signalisations dépendantes des R-NMDA induisant l'induction de LTD. Les oligomères activeraient ou inhiberaient les R-NMDA induisant l'activation d'une phosphatase dépendante du calcium, la calcineurine. Cette phosphatase pourrait à son tour déphosphoryler la cofiline (protéine dépolymérisant l'actine filamenteuse), entraînant son activation. Ainsi, la déphosphorylation de la cofiline par la calcineurine va induire une dépolymérisation progressive des filaments d'actine qui structurent les épines dendritiques (Cheng et al., 2009; Liu et al., 2005). **Les oligomères d'A β pourraient donc déclencher la perte des épines dendritiques en affectant les R-NMDA menant à une altération de l'influx calcique postsynaptique déclenchant par la suite des voies de signalisation induisant des affaiblissements, des pertes synaptiques et une réduction de la densité d'épines dendritiques** (Shankar et al., 2007).

L'ensemble des études effectuées sur les mécanismes d'action du peptide A β semblent indiquer que des perturbations de l'actine sont en partie responsables des effets observés par les oligomères d'A β sur la structure, la morphologie et la densité des épines dendritiques. Les effets de ces oligomères semblent également passer par des perturbations des R-NMDA et entraîner des modifications dans les voies de signalisation intracellulaires qui en découlent. **Il n'y a donc pas de consensus concernant l'action de ces oligomères qui ne semble pas se faire par une action directe sur l'actine ou les épines dendritiques mais plutôt via une dérégulation de la neurotransmission glutamatergique.**

2- Impact extracellulaire du peptide A β sur la neurotransmission glutamatergique

2-1 Perturbations de l'activité synaptique et cognitive

D'un point de vue général, le rôle du peptide A β au sein des synapses et l'effet de l'activité synaptique sur le peptide A β font partie des problématiques actuelles qui sont à la base de la compréhension de la MA.

Notamment, il a été montré que l'activité synaptique augmente la sécrétion d'A β dans le milieu extracellulaire (A β e) (Cirrito et al., 2005; Kamenetz et al., 2003) et c'est cet A β e qui ensuite provoque une réduction de la LTP (Shankar et al., 2008), facilite la LTD et altère la quantité de protéines synaptiques (Snyder et al., 2005) et la structure de la synapse *in vitro* et *in vivo* (Almeida et al., 2005; Coleman and Yao, 2003; Hsieh et al., 2006; Selkoe, 2002). Ainsi, il semblerait que l'exposition chronique à l'A β e provoque des altérations synaptiques pouvant induire une accumulation de peptides A β à l'origine de la formation des plaques amyloïdes extracellulaires. Ceci suggère que l'activité synaptique pourrait contribuer à la progression de la MA. D'autre part, il a aussi été montré que suite à une lésion cérébrale, une augmentation d'A β e dans le cerveau humain survenait lors de la période de récupération des fonctions cognitives (Brody et al., 2008).

Bien que l'activité synaptique et l'activité cognitive/neuronale ne soient pas totalement équivalentes, des études montrent que la stimulation de l'activité cognitive aurait quant à elle un rôle protecteur contre le développement de la MA. En effet, un niveau d'études élevé semble être associé à une réduction du risque de développer la MA (Stern, 2012). De plus, des études basées sur des souris transgéniques APP^{swe}/PS1 Δ E9 montrent qu'un environnement enrichi permet de réduire la formation des plaques et d'augmenter la régulation des gènes impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Lazarov et al., 2005).

2-2 Altérations du nombre et du fonctionnement des récepteurs synaptiques

Plusieurs études montrent que les oligomères d'A β exercent leurs effets neurotoxiques en affectant la neurotransmission glutamatergique. Bien que des approches électrophysiologiques mettent en évidence que ces oligomères causent des dysfonctionnements synaptiques, ces peptides altèrent également le nombre et le fonctionnement des récepteurs glutamatergiques. Ainsi, des interactions directes entre le peptide A β et des récepteurs de la PSD ont été identifiées, tels que les R-NMDA (De Felice et al., 2007; Decker et al., 2010), les R-AMPA et mGluR5 (Renner et al., 2010), la neurotrophine p75^{NTR} (Kraemer et al., 2014), la protéine Prion (PrP^C) (Laurén et al., 2009), le transporteur du glutamate (Li et al., 2009a), le récepteur ephrinB2 (Cissé et al., 2011) et ephrinA4 (Fu et al., 2014; Vargas et al., 2014) et les récepteurs α -7 nicotiques de l'acétylcholine (α 7nAChRs) (Wang et al., 2000). Des interactions entre le peptide A β et des protéines intracellulaire de la PSD ont également été identifiées, tels que les la PSD-95 (Pham et al., 2010). **En conditions pathologiques, l'ensemble de ces protéines-récepteurs synaptiques constituent des partenaires potentiels de liaison du peptide A β et leurs interactions seraient impliquées dans les dysfonctionnements synaptiques et de plasticité synaptique induits par ces oligomères** (Pour revue: Tu et al., 2014).

2-3 Altérations de la plasticité synaptique

En effet, les phénomènes de plasticité synaptique, LTP et LTD sont fortement altérés par les formes oligomériques du peptide A β . Notamment, plusieurs études ont montré que la LTP était perturbée/inhibée par les oligomères d'A β contrairement à la LTD qui dans ces conditions était facilitée (Li et al., 2011, 2009; Selkoe, 2008; Shankar et al., 2007; Walsh et al., 2002).

Parmi plusieurs hypothèses expliquant les effets de ces oligomères d'A β sur les mécanismes de plasticité synaptique, l'une d'entre elles soutient que **l'inhibition de la LTP serait dû à une internalisation et endocytose des R-NMDA et AMPA induite par l'A β** . L'application d'A β sur des tranches d'hippocampe provoquerait une diminution des récepteurs synaptiques AMPA à la surface des épines et notamment une endocytose des R-AMPA GluA2 aboutissant à une dépression de la transmission synaptique (Hsieh et al., 2006; Zhao et al., 2010). D'autres études montrent que l'incubation d'A β sur des cultures de neurones dissociées augmente l'endocytose des R-NMDA via l'activité de la calcineurine et de la STEP (« striatal enriched phosphatase ») (Snyder et al., 2005). D'après l'ensemble de ces travaux, l'A β induit une endocytose des R-AMPA notamment GluA1 et GluA2 provoquant une perte des épines et responsable de la diminution de la réponse des R-NMDA (Hsieh et al., 2006; Lacor et al., 2004; Miñano-Molina et al., 2011; Shankar et al., 2007).

Une autre hypothèse suggère que **les changements au niveau des récepteurs synaptiques peuvent entraîner des modifications dans les voies de signalisation intracellulaires qui seraient responsables des effets observés des A β sur la plasticité synaptique** (figure 20). Notamment, l'activation excessive par l'A β des R-NMDA contenant la sous-unité GluN2B perturberait le fonctionnement d'enzymes, de protéines kinases et phosphatases dépendantes du calcium telles que la calcineurine, ce qui conduirait à terme à des dysfonctionnements synaptiques et des phénomènes d'excitotoxicité dû à l'altération de certaines voies de signalisation et de l'homéostasie mitochondriale. Selon un certain nombre d'études, l'A β altère différentes kinases ou phosphatases comme par exemple la GSK3 β (« Glycogen synthase Kinase 3 β »), la Cdk5 (« cyclin-dependent kinase5 »), des membres de la famille MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») comme la PAK (« p21-activated kinase ») ou ERK (« extracellular-signal-related kinase »), l'AMPK (« AMP-activated protein kinase ») la CaMKII (Dolan and Johnson, 2010; Mairet-Coello et al., 2013; Thornton et al., 2011; Zhu et al., 2007) mais également le facteur de transcription CREB (« cAMP response element binding protein »). D'un autre côté, des études basées sur des modèles surexprimant l'APP, montrent que des altérations de la dynamique, du transport et de la physiologie des mitochondries sont associées avec le dysfonctionnement et la perte synaptique (Baliatti et al., 2013) suggérant que les peptides A β affecteraient le fonctionnement mitochondrial menant à des dérégulations de la concentration de calcium intracellulaire. Cependant, une étude récente montre que **la toxicité d'A β serait dépendante du R-NMDA plutôt que des variations du flux calcique uniquement** puisque les altérations synaptiques sont atténuées en bloquant les R-NMDA avec l'AP5 mais pas en bloquant le flux ionique avec un chélateur calcique tel que le BAPTA ni par des bloqueurs du canal ionique NMDA tels que le MK-801 ou la mémantine (Birnbaum et al., 2015).

D'autres études suggèrent que **les effets que l'on observe des peptides A β sur les phénomènes de plasticité synaptique seraient principalement dus à l'activation excessive des récepteurs NMDA extrasynaptiques**. L'activation de ces récepteurs extrasynaptiques induirait des altérations des régulations calciques et des mécanismes oxydatifs dus à des dysfonctionnements mitochondriaux. De plus, l'activation des R-NMDA extrasynaptiques serait responsable d'un métabolisme préférentiel vers la voie amyloïdogénique (Bordji et al., 2010) menant à une augmentation de la production d'A β . Plus récemment, une étude a montré que les oligomères d'A β altèrent la recapture du glutamate qui va alors déborder en dehors de la fente synaptique (phénomène « glutamate spillover ») et augmenter l'activité des R-NMDA extrasynaptiques inhibant la LTP mais également déclenchant par la suite les cascades de signalisation pro-apoptotiques (Li et al., 2011; Varga et al., 2015). Ce recrutement des récepteurs extrasynaptiques pourrait expliquer pourquoi les oligomères A β potentialisent la LTD. En effet, il a été montré que l'induction de la LTD par l'exposition aux A β induit une activation préférentielle des R-NMDA contenant la sous-unité GluN2B, une population de récepteurs plus spécifiquement localisée au niveau extrasynaptique (figure 20) (Kervern et al., 2012).

L'ensemble de tous ces mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les processus de synaptotoxicité par les oligomères d'A β constituent un large éventail de perturbations induites notamment via les R-NMDA sur la signalisation dépendante de ces récepteurs et affectant l'homéostasie calcique, l'activité des protéines impliquées dans les voies de signalisations qui en découlent, mais également affectant le fonctionnement mitochondrial.

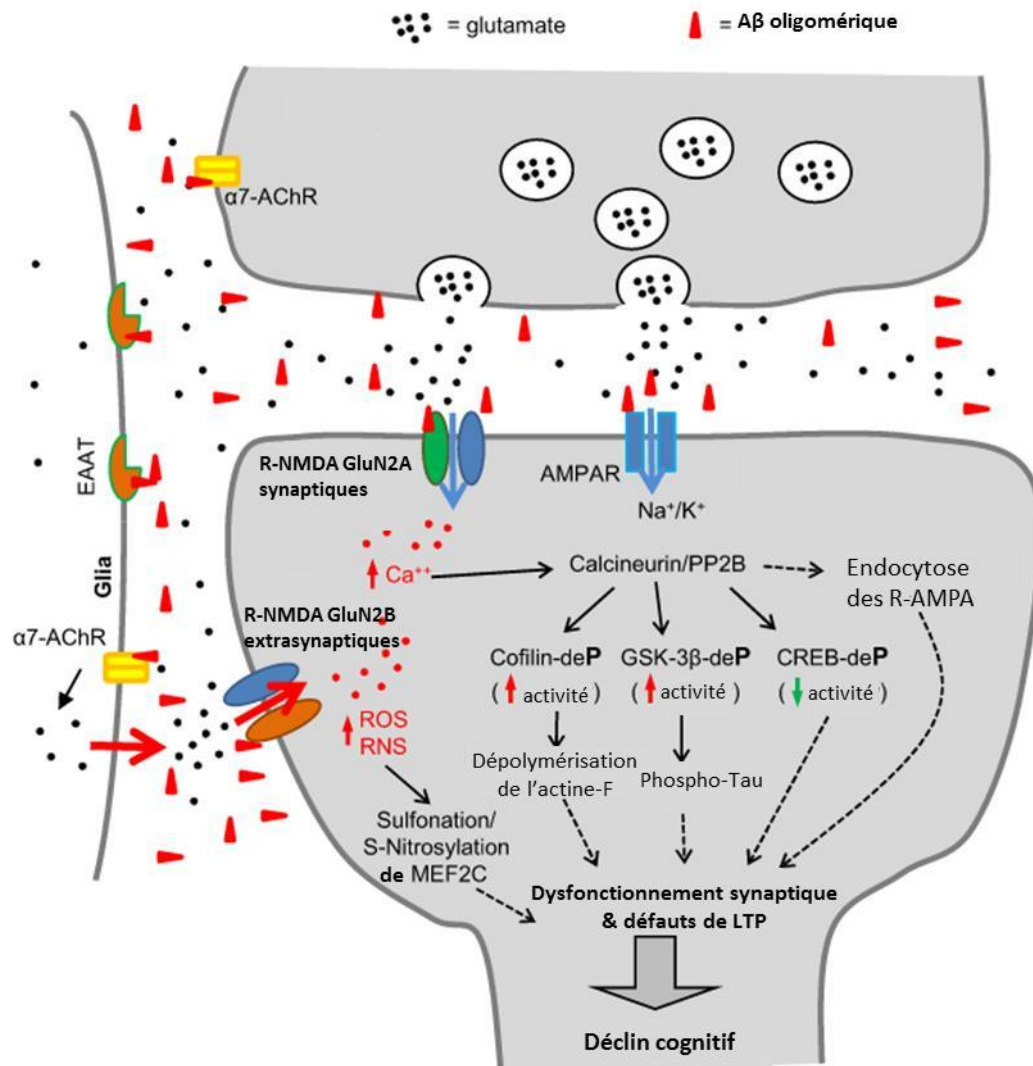


Figure 20: Représentation schématique d'une partie des mécanismes menant aux dysfonctionnements synaptiques induits par les oligomères d'A β . Les oligomères d'A β interagissent avec des protéines synaptiques et astrocytaires tels que les transporteurs de glutamate « EAAT ». Les oligomères d'A β vont déclencher une série d'évènements synaptotoxiques tel que l'activation anormale des R-NMDA extrasynaptiques (en particulier R-NMDA GluN2B), une altération de l'influx calcique, l'activation de la calcineurine/PP2B altérant l'activité des protéines kinases ou phosphatases telles que la cofiline ou la GSK-3 β et des voies de signalisations qui en découlent. Ces évènements aboutissent à des altérations de la structure et fonction synaptique (déstabilisation de l'actine), des réactions oxydatives anormales et une endocytose des R-AMPA menant aux dysfonctionnements synaptiques et cognitifs de la MA. Figure adaptée d'après Tu et al., 2014.

D'autres études ont montré que les peptides A β étaient également capables de créer des pores dans les couches lipidiques des membranes ce qui pourrait contribuer aux variations abérrantes de l'influx calcique au sein des neurones (Demuro et al., 2005; Lin and Arispe, 2015). Néanmoins, selon la littérature, il semble peu probable que les interactions de l'A β avec les récepteurs membranaires synaptiques et les phénomènes neurotoxiques associés soient les seuls évènements responsables des effets synaptotoxiques induits par l'A β . En effet, un nombre croissant d'études effectuées sur les modèles animaux de la MA et des études *in vitro* sur culture neuronale ont mis en évidence **une problématique récurrente : celle de l'existence de peptides A β à l'intérieur des neurones** (Grundke-Iqbal et al., 1989) **et leur rôle potentiel dans le développement de la MA** (Pour revue: Gouras et al., 2012).

3- Impact intracellulaire du peptide A β sur la neurotransmission glutamatergique

L'accumulation intraneuronale de peptides A β constitue actuellement un évènement essentiel et déterminant dans la pathogénicité de la MA. De plus en plus d'études soutiennent que ces peptides A β oligomériques intracellulaires (A β i) jouent un rôle critique dans le développement des perturbations synaptiques à la base des dysfonctionnements cognitifs caractéristiques de la MA (Billings et al., 2005; Gouras et al., 2012, 2010, 2005, 2000; LaFerla et al., 2007; Mohamed and Posse de Chaves, 2011; Mori et al., 2002; Oddo et al., 2003; Sheng et al., 2003). Ce concept a été difficile à accepter puisque les premières études montrant l'existence de l'accumulation intracellulaire d'A β datent d'environ 20 ans (Grundke-Iqbal et al., 1989). Cependant, à cette période donnée, les anticorps utilisés au cours de ces études n'étaient pas capables de différencier l'APP et l'A β à l'intérieur des neurones.

3-1 L'accumulation intraneuronale d'A β : un évènement précoce dans la MA

Il est maintenant admis que l'accumulation intracellulaire d'A β constitue un des évènements précoces chez l'homme et les modèles animaux de la MA. **Des études ont mis en évidence que l'accumulation intracellulaire d'A β précède l'apparition des DNF et des plaques extracellulaires amyloïdes** (D'Andrea et al., 2001; Gouras et al., 2000a). De plus, les défauts de LTP et les altérations cognitives apparaissant chez le modèle de souris triple transgénique de la MA corrént avec la présence d'A β intracellulaire avant même l'apparition de DNF ou de plaques amyloïdes (Billings et al., 2005; Oddo et al., 2003).

3-2 Formes intraneuronales d'Aβ oligomérique

Concernant la forme spécifique du peptide Aβ qui s'accumule à l'intérieur des neurones, des études d'immunocytochimie basées sur des cerveaux humains atteints de la MA ont cherché à déterminer quelle forme oligomérique d'Aβ était principalement présente à l'intérieur des neurones. Via l'utilisation d'anticorps contre l'extrémité C-terminale d'Aβ₄₀ ou Aβ₄₂, **l'ensemble des études démontrent que c'est le peptide Aβ₄₂ oligomérique qui se retrouve accumulé à l'intérieur des neurones** (D'Andrea et al., 2001; Echeverria and Cuello, 2002; Gouras et al., 2000a; Näslund et al., 2000; Ohyagi et al., 2007; Tabira et al., 2002). Néanmoins, une étude récente effectuée sur un modèle de souris transgénique de la MA (APP/PS1), démontre que **l'on retrouve non seulement des formes oligomériques d'Aβ à l'intérieur des neurones mais également des formes monomériques, des formes agrégées et des formes fibrillaires** (Pickett et al., 2016).

3-3 Localisation intraneuronale de l'Aβ et conséquences de son accumulation

Une étude effectuée sur un modèle de souris transgénique de la MA (APP/PS1), démontre via des techniques d'imagerie de haute résolution, que l'Aβ s'accumule au niveau de la fente synaptique et à l'intérieur des synapses au niveau des terminaisons présynaptiques, mais de façon plus importante au niveau des terminaisons postsynaptiques proches des plaques amyloïdes (Pickett et al., 2016). Ces résultats sont en accord avec l'idée générale que les deux compartiments pré et postsynaptiques sont affectés fonctionnellement par l'Aβ₀ et que les terminaisons postsynaptiques jouent un rôle particulièrement important dans les événements de perte synaptiques induits par la présence d'Aβ₀ intracellulaire. Les études effectuées sur culture cellulaire démontrent également l'existence de l'accumulation intracellulaire d'Aβ et des dysfonctionnements synaptiques associés (J. P. Greenfield et al., 1999; Skovronsky et al., 1998; Takahashi et al., 2004). Plus particulièrement, un ensemble de données montrent que l'Aβ oligomérique, l'Aβ₄₀ et l'Aβ₄₂ peuvent s'accumuler dans plusieurs compartiments intracellulaires (le réticulum endoplasmique, les complexes de Golgi, les corps multivésiculaires appelés également endosomes tardifs, les mitochondries et les vésicules d'exocytose) mais également dans le cytosol et dans ce cas là l'Aβ est retrouvé plutôt sous forme de « clusters » (Zheng et al., 2013). Cette accumulation intracellulaire d'Aβ serait responsable de dysfonctionnements synaptiques (Meyer-Luehmann et al., 2008; Takahashi et al., 2004, 2002) menant à des pathologies cellulaires plus sévères.

En effet, il est maintenant connu que l'accumulation d'Aβ à l'intérieur des neurones précède les événements de dégénérescence chez l'ensemble des modèles animaux présentant des pertes neuronales et des dysfonctionnements synaptiques (Wirhth and Bayer, 2010). Plusieurs études ont démontré que l'accumulation intraneuronale d'Aβ coïncidait avec les perturbations électrophysiologiques et comportementales

caractéristiques des modèles animaux transgéniques de la MA (Billings et al., 2005; Knobloch and Mansuy, 2008). De plus, des études électrophysiologiques basées sur des cultures de neurones primaires et des tranches d'hippocampe de souris transgéniques portant une mutation APP, démontrent que **l'activité synaptique augmente la production/libération de l'Aβ extracellulaire mais réduit l'Aβ intracellulaire** (Tampellini et al., 2009). De plus, Tampellini et collaborateurs montrent que malgré la toxicité de l'Aβi et de l'Aβe, sous activation synaptique le niveau d'expression protéique de la PSD-95 chez les souris transgéniques est restauré à un niveau similaire à celui des souris contrôles. Ces données suggèrent donc **un rôle protecteur de l'activité synaptique face aux perturbations synaptiques induites par l'Aβ**. En conclusion, l'effet de l'activité synaptique sur le pool intracellulaire d'Aβ constitue l'élément clé.

4- Relation entre les effets intracellulaires et extracellulaires du peptide Aβ ?

Que l'on se concentre sur les mécanismes éventuels pouvant expliquer l'origine d'un pool d'Aβ intracellulaire et d'un pool extracellulaire ou sur les effets de ces deux pools d'Aβ au niveau neuronal et synaptique, de nombreuses études convergent sur **l'importance de l'interconnexion particulièrement évidente des pools intracellulaire et extracellulaire d'Aβ**.

4-1 Origines de l'Aβ intracellulaire

Le pool intraneuronal d'Aβ peut provenir d'une part du clivage de l'APP à l'intérieur des neurones et d'autre part de l'internalisation de l'Aβ extracellulaire. Bien que ces deux mécanismes soient assez distincts et régulés différemment, comprendre lequel de ces deux mécanismes est éventuellement plus important et/ou contribue plus à la pathogénicité de la MA pourrait apporter des informations importantes pour identifier des nouvelles cibles potentielles pour le traitement de cette pathologie.

D'une part, un ensemble de données a décrit une production intraneuronale d'Aβ₁₋₄₂ « in situ » (J. P. Greenfield et al., 1999; Nathalie and Jean-Noël, 2008) et son accumulation intracellulaire, qui a notamment fait l'objet de plusieurs revues (Bayer and Wirths, 2010; LaFerla et al., 2007; Mohamed and Posse de Chaves, 2011).

D'autre part, les études convergent vers un mécanisme impliquant une internalisation d'Aβ à partir du pool extracellulaire (D'Andrea et al., 2001; LaFerla et al., 1997; Ohyagi et al., 2007). Notamment, il a été montré que des cellules traitées avec des

peptides A β synthétiques présentaient une accumulation intracellulaire d'A β_{42} et cette internalisation était inhibée lorsque le mécanisme d'endocytose était bloqué (Knauer et al., 1992). Néanmoins, un autre mécanisme possible d'internalisation d'A β a été suggéré, tel que la diffusion passive de l'A β extracellulaire au travers de la membrane plasmique (Li et al., 2007). D'autres études montrent que le mécanisme d'internalisation d'A β pourrait se faire via le récepteur nicotinique $\alpha 7nACh$ suivit d'une endocytose du complexe menant ensuite à une inhibition des fonctions de ce récepteur étant à l'origine des dysfonctionnements cognitifs et de mémoire (Dziewczapolski et al., 2009; Wang et al., 2000). Il a été suggéré également que l'A β soit internalisé au niveau des cellules de la région CA1 de l'hippocampe mais pas dans les autres régions hippocampiques et cette accumulation intracellulaire d'A β serait impliquée dans la réduction de l'expression synaptique de la PSD-95 et des GluR1 perturbant l'activité synaptique (Almeida et al., 2005; Bahr et al., 1998). D'autres données ont mis en évidence le rôle des intégrines et du récepteur NMDA dans l'internalisation d'A β . L'internalisation d'A β étant facilitée lors de l'utilisation d'antagonistes des intégrines mais bloqué lors de l'utilisation d'antagonistes NMDA (Bi et al., 2002; De Felice et al., 2007).

L'ensemble de ces données met en évidence la relation dynamique qui semble exister entre les deux pools d'A β et le potentiel rôle néfaste de cette relation.

4-2 Relation fonctionnelle des pools intracellulaire et extracellulaire d'A β

L'internalisation de l'A β à partir du milieu extracellulaire et la production d'A β intraneuronale à partir de l'APP semblent être reliées par ce que l'on pourrait appeler un « cercle vicieux auto-catalytique » : c'est-à-dire que **l'accumulation intracellulaire d'A β_{42} provoque une surproduction de l'A β_{42} nouvellement synthétisée dans les neurones** (Pour revue: Mohamed and Posse de Chaves, 2011).

De plus en plus de données soutiennent l'hypothèse de ce mécanisme. Par exemple, il a été montré que l'ajout d'A β_{42} extracellulaire dans des cultures cellulaires rénales embryonnaires humaines (HEK) augmente la production d'A β_{42} intracellulaire nouvellement synthétisé (Yang et al., 1999).

Une autre étude effectuée sur des neurones hippocampiques a mis en évidence à l'aide de méthodes électrophysiologiques et de la microscopie confocale le rôle majeur de l'accumulation intracellulaire d'A β_{42} dans les perturbations de la transmission glutamatergique synaptique (Ripoli et al., 2014). Cette étude montre que la synaptotoxicité d'A β_{42} se fait indépendamment d'une interaction avec les récepteurs membranaires et met en avant l'hypothèse d'une internalisation à partir du milieu extracellulaire et une accumulation intracellulaire qui jouent un rôle majeur dans les perturbations synaptiques. Notamment, via un marquage fluorescent de l'A β_{42} perfusé dans le milieu extracellulaire sur culture neuronale, il apparaît qu'après 20 minutes celui-ci se retrouve internalisé au sein des compartiments somatiques et dendritiques des neurones. Lors de l'utilisation d'un variant

d'A β_{42} (A β_{42}^{MO}), oxydé sur son résidu méthionine-35 (A β -Met₃₅-O) le rendant incapable de traverser les membranes lipidiques (Ripoli et al., 2013), celui-ci se retrouve toujours dans le milieu extracellulaire au bout de 20 minutes d'application mais n'affecte plus la neurotransmission synaptique ni la plasticité synaptique. Par contre, lorsque ce variant est appliqué directement à l'intérieur des neurones via l'électrode d'enregistrement, il induit une dépression synaptique et inhibe la LTP tout comme le fait l'A β_{42} intracellulaire. Cette étude suggère **que l'effet synaptotoxique de l'A β_{42} extracellulaire requiert son internalisation et dépend de son interaction avec des partenaires intracellulaires** (Ripoli et al., 2014).

Concernant les mutations familiales de la MA, une étude a récemment mis en évidence une augmentation intracellulaire importante du ratio A β_{42} /A β_{40} associée à la mutation de la PS2. Cette étude montre l'existence d'une spécificité d'action du complexe de la γ -sécrétase selon sa localisation et sa composition en sous-unités PS1 ou PS2. Le complexe PS1/ γ -sécrétase est distribué de façon ubiquitaire au sein de la cellule et notamment dans la membrane plasmique. Par contre, le complexe PS2/ γ -sécrétase est localisé au niveau des endosomes tardifs/lysosomes où il va alors cliver les substrats au niveau de ces compartiments puis générer un pool intracellulaire de peptides A β mais surtout de formes A β_{42} aboutissant à une augmentation intracellulaire drastique du ratio A β_{42} /A β_{40} (Sannerud et al., 2016). **C'est par conséquent la localisation restreinte de la PS2 au niveau des endosomes tardifs/lysosomes qui contribue à la génération du pool intracellulaire d'A β associé au développement de la MA** (Bayer and Wirths, 2010; Gouras et al., 2010).

Par ailleurs, la découverte de la mutation Osaka (APP- Δ E693), une mutation découverte dans une famille japonaise il y a une dizaine d'années renforce l'importance du rôle de l'A β intracellulaire dans les mécanismes de synaptotoxicité observés dans la MA (Tomiya et al., 2008). Cette mutation induit une apparition précoce de la MA dès l'âge de 45 ± 4 ans. Des modèles animaux portant cette mutation ont été générés et permettent d'analyser le rôle de l'A β intracellulaire. D'après les études effectuées à partir de ces modèles animaux **les perturbations synaptiques et cognitives dans la MA sont principalement causées par les oligomères solubles d'A β intracellulaires.**

L'ensemble des données actuelles convergent vers l'hypothèse que les phénomènes synaptotoxiques induits par l'A β_o sont dus à un ensemble d'évènements impliquant l'A β_o extracellulaire et intracellulaire. Il est nécessaire d'identifier les évènements qui sont à l'origine de l'internalisation et/ou surproduction de l'A β_{42} ainsi que de son interaction avec les partenaires intracellulaires responsables des effets synaptotoxiques observés dans la MA. Des études plus poussées pour identifier des cibles moléculaires intracellulaires sont indispensables afin de mettre en évidence des cibles thérapeutiques empêchant et/ou atténuant les perturbations synaptiques et cognitives de la MA.

Partie V - Introduction méthodologique de la technique de « patch-clamp »

Dans notre contexte d'étude, l'électrophysiologie est la principale méthode nous permettant d'analyser la transmission synaptique dans des conditions spécifiques afin de mieux appréhender les mécanismes moléculaires affectés par l'Aβ qui dérèglent les processus mnésiques dans la MA.

L'électrophysiologie est une technique qui permet d'étudier et de mettre en évidence les phénomènes électriques et électrochimiques qui se produisent dans les tissus des organismes vivants ou dans les cellules et notamment, dans les neurones. L'électrogénèse biologique a été découverte et analysée en 1843 par Galvani et ensuite Du Bois-Remond. Par la suite, l'intervention des ions Na^+ et K^+ dans la genèse du potentiel d'action sur l'axone géant de calmar a été décrite par Hodgkin et Huxley dans les années 1950 (Huxley, 2002) mettant en évidence le mécanisme ionique à la base de la transmission électrique nerveuse. Une vingtaine d'année plus tard apparaissent les premiers enregistrements électrophysiologiques de neurones du système nerveux central des mammifères.

1- Généralités sur les principes d'électricité

1-1 Potentiel électrique de la membrane plasmique

L'unité de base du vivant, la cellule, est constituée d'une membrane phospholipidique jouant un rôle d'isolant électrique placé entre deux milieux aqueux conducteurs. Les courants électriques relèvent de la circulation des ions positifs et négatifs à travers la membrane plasmique. Il existe une légère différence entre le nombre d'ions positifs et le nombre d'ions négatifs de part et d'autre de la membrane plasmique. Cette séparation de charges produit une différence de potentiel membranaire entre le cytoplasme cellulaire et le liquide interstitiel.

Les membranes plasmiques sont parcourues de protéines disposées dans la partie externe de la membrane, les récepteurs ; de protéines disposées dans la partie interne de la membrane, des protéines intracellulaires, protéines G et de protéines transmembranaires qui font que la barrière membranaire n'est pas totalement étanche. Ce sont les protéines transmembranaires qui permettent des échanges ioniques à travers de la membrane. En particulier, les canaux permettent le passage ionique à travers la membrane plasmique des cellules. Il existe des canaux à fonction passive toujours ouverts, et des canaux à fonction

active s'ouvrant par intermittence. Dans la famille des canaux à fonction active on trouve : des **canaux ligand-dépendants comme les récepteurs au glutamate** dont l'ouverture dépend de la liaison avec un neurotransmetteur et des **canaux voltage-dépendants** qui s'ouvrent et qui se ferment en réponse à des modifications du potentiel membranaire.

Lorsque la concentration ionique est différente de part et d'autre de la membrane plasmique, cette variation est appelée **gradient de concentration ou gradient chimique** : l'ion diffuse rapidement d'une région de forte concentration vers une région de faible concentration. Par ailleurs, la différence de charges de part et d'autre de la membrane correspond à un **gradient électrique** et la diffusion ionique se fait vers une région de charge électrique opposée. Le gradient électrique et le gradient chimique forment le **gradient électrochimique**. **La diffusion des ions à travers les canaux de la membrane plasmique du neurone se fait donc selon un gradient électrochimique**. Ce transfert d'ions crée ainsi des courants électriques et donc des modifications du voltage à travers la membrane, conformément à la loi d'Ohm : Voltage (U) = courant (I) x résistance (R).

1-2 Potentiel de repos membranaire : polarisation

Le **potentiel de repos** correspond à une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane plasmique neuronale, existant au repos. A ce potentiel, le côté cytoplasmique de la membrane du neurone est chargé négativement, alors que le côté extérieur (liquide interstitiel) est chargé positivement. La valeur du potentiel a été établie environ à **-70 mV**. Le potentiel de repos est produit par des différences dans la composition ionique du cytoplasme et du liquide interstitiel. L'existence de canaux potassium (K^+) ouverts à l'état de repos permet au gradient chimique de ces ions, maintenu par le fonctionnement de la pompe sodium-potassium (Na^+/K^+ -ATPase) qui transporte activement le Na^+ à l'extérieur de la cellule et le K^+ à l'intérieur, de se dissiper. En particulier, le cytoplasme contient une plus faible concentration de sodium Na^+ et une plus forte concentration de K^+ que le liquide interstitiel qui l'entoure. Les différences ioniques découlent de la différence de perméabilité de la membrane plasmique au Na^+ et au K^+ . Ce phénomène est lié aux propriétés des canaux ioniques à fonction passive présents dans la membrane.

Ainsi, pour résumer, le potentiel de membrane est créé par l'existence concomitante de deux phénomènes.

- Un déséquilibre ionique est maintenu par les pompes membranaires, en particulier la Na^+/K^+ -ATPase qui échange des ions Na^+ contre des ions K^+ . Cet échange se fait contre le gradient chimique de ces espèces et nécessite donc de l'énergie, fournie sous forme d'ATP.
- L'ouverture à l'état de repos des canaux potassiques permet au gradient chimique de cet ion de se dissiper par un phénomène de diffusion. Cette sortie d'ions potassium crée une différence de potentiel, polarisant l'intérieur de la cellule négativement par rapport à l'extérieur.

1-3 Fonction de signalisation des potentiels membranaires

Les modifications du potentiel membranaire de repos des neurones jouent un rôle dans la réception, l'intégration et l'envoi d'information. Une modification du potentiel membranaire de repos peut être causée par tous les facteurs qui changent la perméabilité de la membrane à n'importe quel ion ou qui modifient les concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane plasmique. **La dépolarisation représente une réduction du potentiel membranaire de repos : l'intérieur de la membrane devient moins négatif. L'hyperpolarisation quant à elle se produit lorsque le potentiel membranaire de repos augmente et devient plus négatif.**

En électrophysiologie, il est possible de mesurer à la fois les courants ioniques ainsi que la différence de potentiel engendrée par ces courants.

2- Techniques électrophysiologiques

Différentes techniques d'électrophysiologie permettent de mesurer les propriétés électriques des systèmes biologiques. Parmi ces dernières, celles fondées sur l'utilisation de microélectrodes de verre sont considérées comme des méthodes « standard » pour l'étude de l'activité électrique neuronale. En particulier, la technique de « patch-clamp » permettant de mesurer les courants électriques internes à un neurone, voir les courants traversant une fraction de sa membrane et même un seul canal ionique.

2-1 Le « patch-clamp »

La technique de « patch-clamp » est une méthode d'enregistrement électrophysiologique inventée par Erwin Neher et Bert Sakmann qui leur valut le prix Nobel en 1991 (Neher et al., 1978). Bien que plusieurs années aient été nécessaires pour perfectionner cette technique, son principe est simple : en posant une fine pipette en verre de taille et de forme adéquate sur la membrane cellulaire, on isole un « petit morceau » (« patch ») de membrane, avec les canaux ioniques contenus dans cette portion de membrane. Il est nécessaire de placer une pipette de verre de taille suffisamment large pour former un contact électrique très résistant appelé « gigaseal » car d'une résistance de l'ordre du gigaohm, avec un fragment de membrane. Ce type de contact électrique permet d'enregistrer et d'étudier via l'électrode d'enregistrement contenue dans la pipette de verre, les propriétés électriques de ces canaux.

D'une part, il est possible via cette technique de mesurer des courants ioniques de très faible amplitude dus à l'activation d'un seul ou d'un petit groupe de canaux ioniques, il s'agit des configurations « cellule attachée », « inside out » et « outside out ».

D'autre part, cette technique, dans une configuration « cellule entière » ou aussi appelée « whole-cell » permet également de mesurer les courants globaux existant de part et d'autre de la membrane plasmique d'une cellule. Cette configuration permet de contrôler de manière stricte la composition ionique du milieu intracellulaire et le potentiel de membrane de la cellule enregistrée. Ce type de configuration est obtenu après formation d'un gigaseal et succion à l'intérieur de l'électrode pour retirer le morceau de membrane. Il existe une continuité entre le milieu interne de la pipette contenant l'électrode d'enregistrement et le cytoplasme de la cellule (figure 21). Le volume de la pipette étant très supérieur au volume intracellulaire, les deux milieux s'équilibrent rapidement. **La configuration « whole-cell » est une technique majeure pour mesurer efficacement la transmission synaptique d'un réseau neuronal. Elle permet également de caractériser les canaux ioniques et récepteurs-canaux impliqués dans l'excitabilité neuronale.**

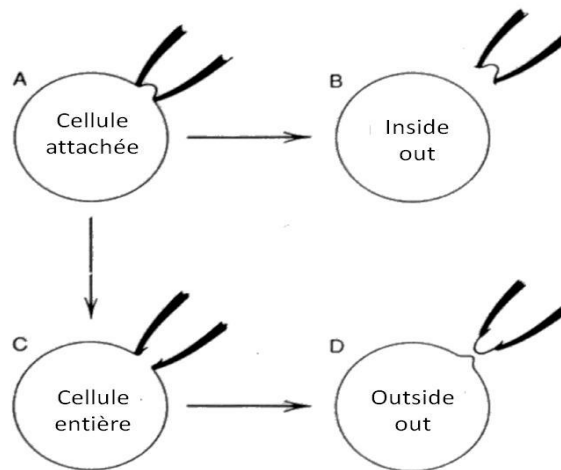


Figure 21 : Les différentes configurations en patch clamp. *A., En configuration « cellule attachée » la micropipette est pressée contre la membrane. Cette configuration est utilisée dans les cas où un facteur inconnu du cytoplasme est nécessaire au maintien de l'activité du canal, ou bien lorsque le canal nécessite une liaison avec les protéines du cytosquelette. B., En configuration « inside-out », le fragment de membrane accolé à la pipette de mesure a sa face intracellulaire en contact avec l'intérieur de la pipette. C'est la configuration de choix pour l'étude unitaire de tous les canaux ioniques, sauf ceux dont l'ouverture nécessite la fixation d'un ligand. C., En configuration « cellule entière » l'activité macroscopique de l'ensemble des courants cellulaires est mesurée. Les canaux ioniques sont les équivalents électriques de résistances en parallèle. Cette technique est aussi utilisée lorsque les propriétés biophysiques du canal sont trop complexes ou pour étudier la physiologie de la cellule. D., En configuration « outside-out », le fragment de membrane accolé à la pipette de mesure a sa face intracellulaire en contact avec l'extérieur de la pipette. Cette méthode est typiquement utilisée pour l'étude de canaux activés par fixation d'un ligand, comme par exemple le canal récepteur à l'acétylcholine nicotinique ou les canaux GABA_A. Cette configuration est plus difficile à obtenir que celle « inside-out », ce qui explique que son choix se limite à cette classe de canaux. Les deux catégories inside-out et outside-out permettent de mesurer l'activité d'un seul canal ionique.*

2-2 La configuration « whole-cell »

Le patch-clamp en configuration « whole-cell » a initialement été développé sur modèle de cellules isolées mais peut aussi s'appliquer facilement sur les tranches de cortex.

Sur un modèle de culture primaire de neurones corticaux comme celui que l'on a utilisé pour la majorité des travaux de cette thèse, la configuration cellule entière est obtenue après établissement d'un contact avec un neurone et succion à l'intérieur de l'électrode pour retirer le morceau de membrane. Sur tranche de cortex, l'électrode d'enregistrement se positionne au-dessus de la couche V du cortex où se trouvent les cellules pyramidales. Les électrodes sont remplies avec une solution intracellulaire permettant, entre autre, de bloquer les canaux ioniques dont l'activation pourrait gêner la mesure des courants synaptiques. En effet, les ions Cs^+ bloquent la plupart des canaux K^+ dépendants du voltage, le QX-314 bloque les canaux Na^+ dépendants du voltage.

Les courants sEPSC (« spontaneous excitatory postsynaptic currents ») dépendants des récepteurs AMPA sont isolés en bloquant les récepteurs NMDA avec un antagoniste (le type AP5) et les courants NMDA sont isolés en bloquant la composante AMPA avec un antagoniste (de type NBQX). L'amplitude des sEPSC peut être alors augmentée en dépolarisant le neurone jusqu'à un voltage de -60 mV et en se plaçant dans un milieu dépourvu en Mg^{2+} . Les signaux captés sont amplifiés, digitalisés, transférés sur un ordinateur et enfin analysés. La perte du milieu intracellulaire au profit du milieu intraélectrode est un avantage mais aussi une limite du patch clamp configuration « whole-cell ». A terme, la cellule perd un grand nombre de ses constituants intracellulaires, comme les seconds messagers, sensibles à la variation du milieu.

Les courants sEPSC sont induits par des potentiels d'action (PA) dirigés par des événements dus aux propriétés intrinsèques de la cellule présynaptique et/ou à l'activité du réseau neuronal. Ces PA vont provoquer la libération du glutamate contenu dans les vésicules de l'élément présynaptique qui vont alors activer les récepteurs glutamatergiques tels que les récepteurs AMPA et NMDA situés sur l'élément postsynaptique. L'analyse des courants spontanés permet donc d'étudier la transmission glutamatergique dépendante de l'activité du réseau neuronal soit des PA. Au contraire, l'analyse des courants miniatures (mEPSC), obtenu par ajout de la tétrotoxine (bloqueur des canaux Na^+ voltage dépendant permettant de bloquer la genèse et la propagation des PA dans l'élément présynaptique) permet d'étudier la transmission glutamatergique indépendante des PA soit indépendamment de l'activité du réseau neuronal. Etudier les deux types de courants, les sEPSC et les mEPSC, permet de comprendre d'où viennent les changements dans la transmission glutamatergique, c'est-à-dire, si ces changements proviennent d'une altération au niveau de l'élément présynaptique ou postsynaptique. Notamment, une réduction de l'amplitude des mEPSC est généralement traduite comme une diminution de la densité/conductance des récepteurs postsynaptiques, alors qu'une réduction de la fréquence des mEPSC peut traduire une altération de la probabilité de libération des vésicules présynaptiques ou une réduction du nombre d'épines fonctionnelles.

OBJECTIFS

Au vue de l'ensemble des données bibliographiques, plusieurs problématiques subsistent, notamment concernant les espèces toxiques d'A β , puisque diverses études montrent des résultats différents selon les espèces d'oligomères utilisées. Parmi plusieurs sujets à élucider, les mécanismes par lequel le peptide A β o extracellulaire rentre dans les neurones et notamment se retrouve dans les compartiments subcellulaires mais également dans le cytosol fait partie des sujets les plus controversés. Une autre problématique concerne les mécanismes de propagation de ces oligomères au sein du réseau neuronal. L'ensemble des études convergent vers une hypothèse d'internalisation de l'A β extracellulaire qui pourrait ensuite être ré-exocyté et ré-internalisé par d'autres neurones. Des données suggèrent que l'A β extracellulaire provoque une augmentation de la production intracellulaire d'A β nouvellement synthétisé (Tampellini et al., 2009; Yang et al., 1999) qui pourrait affecter les neurones voisins via un mécanisme de type prion par lequel l'A β o induirait une augmentation de la production d'A β o qui se propagerait d'un neurone au neurone voisin.

En effet, plusieurs étapes au sein de ce « cercle vicieux auto-catalytique » d'internalisation de l'A β à partir du milieu extracellulaire et de production d'A β intraneuronale doivent être approfondies. Plusieurs études mettent en évidence une altération des étapes impliquées dans le processing d'APP. Approfondir le lien fonctionnel entre les effets de l'A β o extracellulaire et intracellulaire constitue par conséquent une étape critique et essentielle afin d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires qui sont à la base des altérations synaptiques glutamatergiques dans la MA.

Il paraît donc primordial de se focaliser sur les mécanismes qui sous-tendent les effets extracellulaires et intracellulaires des oligomères d'A β dans des conditions de transmission synaptique basale afin de mieux appréhender les mécanismes moléculaires affectés par l'A β qui dérégulent les processus mnésiques dans la MA.

Pour tenter de répondre à cette problématique, ce projet de thèse c'est déroulé en plusieurs étapes :

- Dans un premier temps, nous avons étudié les effets extracellulaires et intracellulaires du peptide A β sur l'activité glutamatergique synaptique spontanée en condition basale sur des cultures de neurones corticaux. Nous nous sommes focalisés en particulier sur les R-AMPA et NMDA, principaux récepteurs impliqués dans la transmission synaptique glutamatergique à la base des processus d'apprentissage et de mémorisation.
- Un certain nombre d'études suggèrent qu'il y a internalisation de l'A β à partir du milieu extracellulaire et/ou production d'A β intraneuronale (Ripoli et al., 2014; Tampellini et al., 2009). Nous avons donc utilisé des bloqueurs des complexes enzymatiques β et γ -sécrétases afin de déterminer si l'altération de la transmission synaptique glutamatergique provoquée par l'A β est dépendante d'une perturbation du processing d'APP menant à une surproduction d'A β .
- La relation fonctionnelle entre les pools d'A β extracellulaire et d'A β intracellulaire étant un sujet très controversé dans la littérature, nous avons utilisé un variant d'A β_{42} (A β_{42}^{MO}), oxydé sur son résidu méthionine-35 (A β -Met₃₅-O) le rendant incapable de traverser les membranes lipidiques (Ripoli et al., 2013). Nous avons utilisé ce variant d'A β_{42} afin de déterminer si la pénétration d'A β extracellulaire au sein du neurone est indispensable pour induire des perturbations de la transmission synaptique glutamatergique.
- Au vue des débats sur le potentiel toxique des différentes formes d'A β nous avons étudié sur des cultures de neurones corticaux l'effet synaptotoxique des oligomères versus les monomères d'A β_{1-42} sur la transmission glutamatergique basale. Nous avons ensuite validé ces résultats sur un modèle d'étude plus évolué tel que les tranches de cortex de souris.

RESULTATS

Partie I – INTRODUCTION DE L'ARTICLE

Reduction of synaptic NMDA currents induced by Amyloid- β oligomers requires APP processing and an intraneuronal accumulation of Amyloid- β oligomers

M. Rolland^{1,2}, M. Jacquier-Sarlin¹, R. Powell^{1,2}, T. Rush^{1,2}, E. Borel^{1,2}, A. Buisson^{1,2} and F. Lanté¹

¹Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, BP170, Grenoble, Cedex 9, F-38042, France

²INSERM - U1216, BP170, BP 170, Cedex 9, F-38042, France

Une étape importante dans la compréhension du mode d'action du peptide β -amyloïde ($A\beta$) est de déterminer comment cet acteur de la Maladie d'Alzheimer (MA) affecte les réseaux neuronaux qui sous-tendent la mémoire. Il est maintenant largement accepté qu'un déficit synaptique préalable à l'apparition des plaques amyloïdes extracellulaires serait présent dès les stades initiaux de la maladie.

Au vue de l'ensemble des données bibliographiques, plusieurs problématiques subsistent concernant les espèces toxiques d' $A\beta$ et ses formes oligomériques. Les voies protéolytiques menant à la formation du peptide $A\beta$ à partir de l'APP ont été caractérisés par plusieurs études. La distribution de l'APP dans différents compartiments subcellulaires s'accompagne de deux voies possibles de processing produisant l' $A\beta$. Dans la voie amyloïdogénique, l'APP peut être internalisé dans des compartiments endocytiques pour être clivé par la β et la γ sécrétases qui vont permettre de générer les peptides $A\beta$ sécrétés ensuite vers le milieu extérieur. Il est admis que les plaques extracellulaires sont composées de ces peptides, produits sous différents isoformes de longueurs différentes. Notamment l'isoforme $A\beta_{40}$ est le plus abondant alors que le peptide $A\beta_{42}$ a été associé à des formes de la MA. Des études plus récentes suggèrent que ce sont les formes oligomériques d' $A\beta_{42}$ ($A\beta_o$) qui sont fortement impliquées dans les premiers déficits synaptiques observés dans la MA. Ensuite, à partir d'études basées sur des modèles expérimentaux et des patients atteints de la MA, il a été suggéré que c'est une accumulation d' $A\beta_o$ intracellulaire qui serait un événement antérieur à la formation des plaques séniles dans la pathogenèse de la MA.

Les mécanismes de propagation des oligomères d' $A\beta$ au sein du réseau neuronal et son impact sur la transmission synaptique glutamatergique constitue également un sujet à approfondir. Les principaux récepteurs glutamatergiques impliqués dans les mécanismes moléculaires et cellulaires à la base de l'apprentissage et de la mémoire sont les récepteurs AMPA et NMDA. Il a déjà été mis en évidence que l'application d' $A\beta_o$ sur des cultures

neuronales ou sur des tranches de cerveau perturbe la transmission synaptique glutamatergique en déclenchant l'endocytose des récepteurs AMPA et NMDA. Un ensemble de données montrent que les premiers déficits synaptiques observés sur les modèles animaux de la MA ont lieu avant l'accumulation extracellulaire des plaques amyloïdes. Plus exactement, les premiers déficits synaptiques observés seraient associés à l'accumulation intracellulaire des oligomères d'A β . Les mécanismes par lesquels le peptide A β extracellulaire rentre dans les neurones et notamment se retrouve dans les compartiments subcellulaires mais également dans le cytosol fait partie des sujets les plus controversés. De plus en plus de données mettent en évidence un lien fonctionnel entre les pools extracellulaire et intracellulaire d'A β et le rôle potentiellement synaptotoxique de cette relation. Cependant, de quelle manière ces deux pools sont connectés reste encore à découvrir.

Cette étude vise à mieux comprendre l'impact extracellulaire et intracellulaire du peptide A β sur la transmission glutamatergique basale, en particulier sur les récepteurs AMPA et NMDA. Pour cela, nous avons utilisé des oligomères de peptide A β_{42} synthétique humain sur des cultures primaires de neurones corticaux et sur des neurones corticaux (couche V) de tranches de souris.

Dans un premier temps, les effets extra- et intracellulaires des peptides A β sur la transmission synaptique glutamatergique ont été étudiés et comparés. Pour cela, la fréquence et l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs spontanés (sEPSC) des récepteurs AMPA et NMDA ont été enregistrées.

La relation fonctionnelle entre les pools d'A β extracellulaire et d'A β intracellulaire étant un sujet très controversé dans la littérature, l'objectif suivant a consisté à étudier l'éventuel lien fonctionnel entre les pools extra et intracellulaires des peptides A β . Notamment, en déterminant si la pénétration du peptide extracellulaire au sein du neurone est ou pas indispensable pour induire des perturbations de la transmission synaptique glutamatergique. Nous avons tenté de mettre en évidence l'éventuel lien entre l'effet de l'A β extracellulaire observé et une perturbation du processing d'APP. Au vue des débats sur le potentiel toxique des différentes formes d'A β nous avons étudié sur des cultures de neurones corticaux l'effet synaptotoxique des oligomères versus les monomères d'A β_{1-42} sur la transmission glutamatergique basale. Nous avons ensuite validé ces résultats sur un modèle d'étude plus évolué tel que les tranches de cortex de souris.

Partie II – Article

Les résultats de cette thèse sont présentés dans le document joint, faisant actuellement l'objet d'un article devant être soumis pour publication :

Reduction of synaptic NMDA currents induced by Amyloid- β oligomers requires APP processing and an intraneuronal accumulation of Amyloid- β oligomers

M. Rolland^{1,2}, M. Jacquier-Sarlin¹, R. Powell^{1,2}, T. Rush^{1,2}, E. Borel^{1,2}, A. Buisson^{1,2} and F. Lanté¹

¹Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, BP170, Grenoble, Cedex 9, F-38042, France

²INSERM - U1216, BP170, BP 170, Cedex 9, F-38042, France

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia associated with memory loss and characterized by an accumulation of extracellular plaques composed of amyloid-beta peptides ($A\beta$). Studies have revealed a greater loss of synapses than the neuronal death can explain, suggesting that a synaptic deficit is present at the early stages of the disease. Although the $A\beta$ peptide has been identified as a component of the extracellular amyloid plaques, recent studies have highlighted that the intracellular accumulation of the $A\beta$ oligomers ($A\beta_o$) precedes senile plaques formation and seems to be correlated with the memory and learning troubles that characterize the disease. This project aims at better understanding and characterizing the extracellular and intracellular impact of $A\beta_o$ peptides on synaptic excitatory transmission. We performed an electrophysiological study of cultures of primary cortical neurons and mouse cortex slices by the patch-clamp technique. We measured the spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC) frequency and amplitude from the glutamatergic receptors involved in learning and memory processes: AMPA and NMDA receptors. Our results show that external or internal application of $A\beta_o$ peptides reduces specifically NMDA receptors currents amplitude without affecting AMPA currents. The external application of $A\beta_o$ does not require the penetration of the $A\beta_o$ into the neurons but rather the activation of the APP processing towards the amyloidogenic pathway leading to intracellular $A\beta_o$ ($iA\beta_o$) synaptic accumulation. Together, these data reveal that extracellular $A\beta_o$ trigger a vicious circle leading to promote synaptic dysfunction of the glutamatergic neurotransmission. By targeting this mechanism, we may stop the propagation of the excitatory neurotransmission deficit that characterizes the early stages of AD.

Introduction

Alzheimer disease (AD), is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive cognitive impairment. The first description of neuropathological features of AD dates back to the early 1900s and includes two characteristic lesions of the cerebral cortex, neurofibrillary tangles and extracellular deposits of β -amyloid ($A\beta$) peptides in senile plaques¹. Extracellular senile plaques are formed from $A\beta$ peptide of different length: the 40-residue peptide $A\beta_{40}$ represents the most abundant $A\beta$ isoform in the brain, while the 42-residue $A\beta_{42}$ shows a significant increase with certain forms of AD². The production of $A\beta$ results from the proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP), a trans-membrane protein. In neurons, APPs are distributed in different subcellular compartments and processed by two routes designated as the non amyloidogenic and amyloidogenic pathways: one precluding and other promoting the generation of $A\beta$ peptides³. In the amyloidogenic pathway, APP are internalized into endocytic compartments and subsequently cleaved by two proteases, β -secretase (BACE) and γ -secretase, to generate $A\beta$ ⁴. If APPs mostly mature through secretory pathway starting from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, where it is post-translationally modified before vesicular transport to the cell surface, it can also be processed in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment. $A\beta$ produced in the endoplasmic reticulum is almost exclusively $A\beta_{42}$ and is not destined for secretion⁵ suggesting that there might exist several pools of $A\beta$ produced by neurons: one deposited extracellularly and another pool that can accumulate intracellularly⁶. The ability of neurons to modulate their excitatory synaptic strength is believed to be a cellular correlate of learning and memory. The majority of fast excitatory synaptic transmission in the mammalian central nervous system is mediated by the activation of ionotropic glutamate receptors AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), NMDA (N-methyl-D-aspartate) and kainate on the postsynaptic membrane. In 2002, it has been shown that the extracellular application of $A\beta$ oligomers ($A\beta_o$) on brain slices blocks NMDA receptors-dependent long-term potentiation⁷. Other studies confirmed the impact of $A\beta_o$ on learning and memory processes revealing the synaptotoxic potential of extracellular application of these specific $A\beta$ species⁸⁻¹⁰. In contrast, several studies revealed that memory impairments in various transgenic models of AD precede extracellular accumulation of $A\beta$ into plaques¹¹. These intracellular accumulations of $A\beta$ with learning deficits associated are also observable in AD brains patients¹² suggesting that this specific feature is causal in the alteration of memory processes.

The present study aims at further understanding the consequences of extracellular $A\beta_o$ exposure on the excitatory neurotransmission by measuring the influence of $A\beta_o$ on spontaneous glutamatergic activity. For this purpose, we performed electrophysiological studies of cultures of primary cortical neurons and mouse cortex slices by the patch-clamp technique. These approaches revealed that extracellular $A\beta_o$ exposure promotes APP

processing and subsequently intracellular accumulation of A β o responsible for the synaptotoxic effects observed.

Materials and methods

All experiments were carried out in accordance with the European Community Council directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) and with the French guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the "Grenoble Institute of Neurosciences Ethical Committee". All experiments were performed with Swiss mice from Janvier (Le Genest St Isle, France).

Preparation of amyloid solutions

The peptide used in these experiments was obtained from recombinant A β ₁₋₄₂ peptide (Bachem, Maneim, Germany) resuspended in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to 1 mM until complete re-suspension as described in ¹³. A β oligomers (A β o) were prepared by diluting A β to 1 mM in DMSO then to 100 μ M in ice-cold HEPES and Bicarbonate-buffered saline solution (HBBSS) or in Artificial Cerebro-Spinal Fluid (ACSF; in mM: NaCl 119, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 1.3, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 26, and Glucose 11) if it was for electrophysiological experiments with immediate vortexing and bath sonication and then incubated at 4°C for 24 h with mild agitation.

A β monomer purification

The A β monomer is purified on a C18 column (SPE-Chromabond-HRX C18ec, 200 μ L, 5 mg, Macherey-Nagel, Duren, Germany). The column was equilibrated with 0,1% Trifluoroacetic acid (TFA) in water. After loading the A β sample, the column is washed three times with 0,1% TFA. Then, a gradient of acetonitrile from 30% to 60% is applied. Fractions (0,1 mL) were collected. The elution profile is determined by measuring the absorbance at 275 nm. The peak fraction was collected and the concentration of peptide was determined by absorbance at 275 nm using $\xi_{275\text{nm}} = 1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The peptide is stored at -80°C.

Plasmids

pFR-Luciferase reporter vector containing the firefly luciferase gene under the control of the yeast GAL4 activation sequence, (pFR-Luc) the phRL-thymidine kinase (TK) vector containing the renilla luciferase gene (phRL-TK) and the pRC-CMV vector containing a cDNA encoding for human APP695 fused to the yeast transcription factor GAL4 (APP695-Gal4) was kindly provided by Prof. Sadoul (Grenoble Institut des Neurosciences, France) and previously described by Hoey et al., 2009 ¹⁴. Plasmid containing a cDNA encoding for human A β ₁₋₄₂ fused in frame (with a spacer coding for 6 amino acids) at its C terminus to mCherry protein (A β -mcherry) was generated by cloning the human a β sequence amplified by PCR into pmCherry-N1 vector (Clontech, Saint Germain en Lay, France) between HindIII and AgeI sites.

Cell lines

Mouse neuroblastoma N2a were cultured in in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma Saint Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma) as described previously¹⁵.

Primary culture of cortical neurons

Primary cortical neurons were prepared from Swiss embryonic mice (E14-E16) as previously described¹⁶. Cerebral cortices were dissected, dissociated, and cultured in Dulbecco's modified eagle medium containing 5% fetal bovine serum, 5% horse serum, and 2 mM glutamine (all from Sigma Saint Quentin Fallavier, France) on 24-well plates (Falcon Becton Dickinson labware Europe, Meylan, France) for biochemical experiments. Neurons were seeded on 12 mm cover slips (Dominique Dutscher, Germany) at final concentration of two cortical hemispheres for six-well plates. All plates, dishes and coverslips were coated with 0.1 mg/ml poly-D-lysine and 0.02 mg/ml laminin (Sigma). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ - 95% air. After 3–4 days in vitro (DIV), cytosine arabinoside (AraC 10 μM, Sigma) was added to inhibit proliferation of non-neuronal cells in cultures used for biochemistry experiments, 98% of the cells were considered as neuronal. The day before the experiments, cells were washed into DMEM. Electrophysiological experiments were performed on neuronal cultures at 14-15 DIV.

Brain slices preparation

All horizontal brain slices containing the somatosensory cortex were prepared from 17 to 30 day-old SWISS mice. Mice were cervically dislocated and immediately decapitated. Their cortices were dissected out and 300 μm thick transverse slices were cut in ice-cold cutting solution (in mM: KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 10, CaCl₂ 0.5, NaHCO₃ 26, Sucrose 234, and Glucose 11, saturated with 95% O₂ and 5% CO₂) with a Leica VT1200 blade microtome. After the dissection, slices were kept in oxygenated Artificial Cerebro-Spinal Fluid (ACSF; in mM: NaCl 119, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 1.3, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 26, and Glucose 11), at a temperature of 37± 1 °C for at least 1 hour.

Neuronal Transfection

Transfections were performed on cortical neuron cultures after 12 DIV with calcium phosphate precipitation. Growth medium (DMEM and serums) is removed and kept until the last step of transfection. Cells were washed into DMKY for 1-1.5 hours (in mM: kynurenic acid 1, phenol red 0.05%, NaOH 0.9, HEPES 0.5, MgCl₂ 10 pH: 7.4). 3.5 μg of plasmids, Aβ-mcherry and LifeAct-GFP, a peptide that specifically interacts with filamentous actin (Riedl et al., 2008) were mixed with CaCl₂ (120 mM) in HBS (in mM: HEPES 25, NaCl 140, Na₂HPO₄ 0.750, pH=7.06) and left for 20 minutes to precipitate the DNA. Plasmids were then applied to cells for 30 min. Transfection media was replaced with conditioned growth medium and cultures were returned to the incubator until use at DIV 14-15.

Confocal imaging of transfected neurons

Transfected neurons were placed in HBBSS solution (in mM: NaCl 0.110, KCl 0.005, CaCl₂ 2, MgSO₄ 0.0008, NaH₂PO₄ 1, HEPES 12, D-Glucose 5, NaHCO₃ 25, glycine 0.01, All from Sigma) 1.5-2 hours before experiments. Neurons were imaged with a Nikon C2 confocal imaging system using a 60x water immersion objective and EZC2 software. Z-stacks were 0.3 μm per step. Images were collected 48h after transfection and after 30 minutes after treatment with actin depolymerizing agent latrunculin. Three independent experiments were performed.

Electrophysiological recordings in neuronal culture and brain slices

Cortical neurons in culture and layer 5 pyramidal cells were visualized in a chamber on an upright microscope with transmitted illumination and continuously perfused at 2 ml/min with oxygenated Artificial Cerebro-Spinal Fluid (ACSF in mM : 119 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, and 11 Glucose) at room temperature. Spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC) were recorded with borosilicate glass pipettes of 4-5MΩ resistance filled for whole cell recordings (in mM: 117.5 CsMeSO₄, 15.5 CsCl, 10 TEACl, 8 NaCl, 10 HEPES, 0.25 EGTA, 4 MgATP, 0.3 NaGTP, pH 7.3). sEPSCs were recorded in neurons voltage clamped at a membrane potential of -60 mV. NMDA currents were recorded using an external Mg²⁺-free ACSF solution containing 10 μM of the AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptor blocker NBQX (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione). AMPA currents were recorded using an external Mg²⁺-free ACSF solution containing 100 μM of the NMDA receptor blocker D-APV ((2R)-amino-5-phosphonovaleric acid; (2R)-amino-5-phosphonopentanoate). Signals were amplified with an EPC 10 Amplifier Patchmaster Multi-channel (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Wiesenstrasse, Germany). Recordings were filtered at 1kHz and sampled at 10 kHz using the Patchmaster Multi-channel data acquisition software (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Wiesenstrasse, Germany). Amplitude and frequency of AMPA and NMDA sEPSCs were recorded at 0 min referred as T₀ (before neuron exposure to ACSF containing either 300 nM exAβ₀ or exAβ^{M0}) and 20 min later referred as to T₂₀ (after neuron exposure to ACSF containing either 300 nM exAβ₀ or exAβ^{M0}). Recordings were considered stable when the series and access resistances and the resting membrane potential did not change > 20%. Comparisons were performed between data collected after whole-cell configuration had been achieved (referred as T₀) and 20 min later (referred as to T₂₀).

Dual-Glo luciferase reporter gene activity assay for quantification of g-secretase activity

Gamma-secretase activity was measured with dual-Glo luciferase reporter gene activity (Hoye et al, 2009). 24 h after seeding clone of N2a into 3.5 cm dishes, cells were co-transfected with pFR-Luc (30 ng), APP695-Gal4 (300 ng) and phRL-TK (5 ng) using Exgen (Euromedex, Strasbourg, France) according to the protocol of the manufacturer. Dual-Glo luciferase activity assays were performed 48h after transfection by quantification of firefly and Renilla luciferase activity according to the manufacturer instructions (Promega, Charbonniere les Bains, France).

Immunoblotting for A β ₁₋₄₂

Peptide solutions were analyzed by Western blotting as previously described with minor modification¹⁷. Peptides of each sample (50 pmoles for purified peptides or 20 μ l of collected fractions) were supplemented with Laemli Blue 5X and boiled for 5 min. Samples resolved by 8% SDS-PAGE and transferred to 0.2 μ m Immobilon PVDF membrane (GE Healthcare, Buc, France). Immunoblotting was performed using primary monoclonal antibody directed against A β (4G8, Biolegend, San Diego, USA) at 1/1000 and HRP-conjugated goat anti-mouse Fab'2 secondary antibodies (Jackson, Marseille, France). Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using the ECL Plus detection reagent and Hyperfilm ECL according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Graphpad 6.0 Software (La Jolla, CA, USA). After determining whether the data follow normal distribution or not, we used non-parametric test (Kruskal walis or Wilcoxon Signed Rank Test) or one-way ANOVA followed by Bonferroni test for multiple comparisons. Significance was set at 0.05. Results are expressed as the mean \pm SEM from independent experiments.

Results

Extracellular A β ₁₋₄₂ oligomers (A β _o) perturb spontaneous synaptic activity in cortical cell cultures

We measured spontaneous synaptic activity in primary cortical neurons whole-clamped at resting membrane potential (-60 mV). We studied the effect of extracellular A β oligomers (A β _o) application on excitatory neurotransmission. When we removed Mg²⁺ from the bathing medium, neurons exhibit both AMPA and NMDA spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs). To isolate selectively NMDA or AMPA sEPSCs, we used NBQX (10 μ M) or D-APV (100 μ M) respectively. We recorded the amplitude and the frequency of sEPSCs at 0 min referred as T₀ (before neuron exposure to 300 nM A β _o) and 20 min later referred as T₂₀ (after neuron exposure to 300 nM A β _o). As several studies revealed that extracellularly applied A β _o in the nanomolar range markedly affects synaptic transmission and plasticity^{18,19} we checked whether external application of synthetic human A β _o (eA β _o) at 300 nM (Fig1.) altered AMPA dependent synaptic transmission by measuring the amplitude and frequency of both sEPSCs and spontaneously occurring miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) in the presence of 1 μ M TTX. As shown in (Fig 2. A,B) exposure to eA β _o did not modify AMPA sEPSC amplitude (T₂₀ vs T₀: 17.6 \pm 21.5%; p>0.05; n=10) but significantly reduced AMPA sEPSCs frequency (T₂₀ vs T₀: -39.3 \pm 10.9%; p<0.05; n=10). Interestingly, we did not detect any change on AMPA mEPSC frequency (T₂₀ vs T₀: 7.6 \pm 6.5%; p>0.05; n=6; Fig2. C,D), thus it appears that eA β _o caused an alteration of neuronal excitability. Then we checked whether eA β _o affected NMDA dependent synaptic

transmission. By contrast to AMPA-dependent synaptic transmission, eA β o reduced both NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : $-41 \pm 7.4\%$; $p > 0.001$; $n = 17$; Fig 3. A,B) and frequency (T_{20} vs T_0 : $-33.4 \pm 7.6\%$; $p < 0.001$; $n = 17$; Fig 3. A,B). Together, these results suggest that eA β o induced a reduction of sEPSC frequencies observed both on AMPA and NMDA sEPSCs due to a reduced neuronal excitability. In contrast, eA β o selectively reduce NMDA currents amplitude without affecting AMPA currents amplitude.

Neuronal uploading of A β o is not required to alter NMDA-dependent synaptic transmission

The relationship between the extracellular and intracellular pools of A β o remains to be clearly established¹¹. If studies suggested that eA β o have the ability to cross the plasma membrane and accumulate inside neurons others favor alternative mechanisms to explain intracellular A β o accumulation^{19–21}. To test whether the perturbations of NMDA sEPSCs observed were associated to an uploading of eA β o inside neurons, we performed experiments with an A β variant with an oxidized methionine at position 35 named A β^{MO} exhibiting biophysical properties comparable to those of A β but unable to cross the plasma membrane¹⁹. This variant exhibits a polymerization profile in soluble small-oligomers similar to that observed with Human 1-42 A β ²². We investigated whether external application of A β^{MO} (eA β^{MO}) perturbed NMDA-dependent synaptic transmission. As shown in Fig 4. A,B, we found that A β^{MO} significantly reduced NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : -41 ± 4.9 ; $p < 0.001$; $n = 11$) after 20 min without affecting NMDA sEPSC frequency (T_{20} vs T_0 : -6.9 ± 12.0 ; $p > 0.05$). These data demonstrate that the reduction of NMDA sEPSC amplitude does not require an uploading of eA β o into neurons.

Alteration of NMDA-dependent synaptic transmission is linked to APP cleavage by γ -secretase and β -secretase

Previous studies raised the possibility that the toxic effect of eA β o may be mediated via an enhanced APP processing^{23,24} and a subsequently raising in intraneuronal A β concentration. To test this hypothesis, we treated primary cortical neurons with a gamma secretase inhibitor, D-APT. As a control condition, we applied this inhibitor alone at the concentration of 5 μ M to demonstrate that it did not affect neither NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : $-16.9 \pm 3.2\%$; $p > 0.05$; $n = 13$) or frequency (T_{20} vs T_0 : $6.1 \pm 18.3\%$; $p > 0.05$; $n = 13$; Fig 5. A,B). In contrast, the reduction of NMDA sEPSCs amplitude induced by eA β o was abolished in presence of D-APT (T_{20} vs T_0 : $-4.4 \pm 3.8\%$; $p > 0.05$; $n = 9$) while we still observed a reduction of NMDA sEPSC frequency (T_{20} vs T_0 : $-32.4 \pm 5.6\%$; $p < 0.001$; $n = 9$). Similarly, the reduction of NMDA sEPSCs amplitude induced by eA β^{MO} was also abolished by D-APT treatment (T_{20} vs T_0 : $1.2 \pm 7.6\%$; $p > 0.05$; $n = 8$). These results suggest that the reduction of NMDA-dependent synaptic transmission by eA β o does not involve A β o uploading into neurons and requires APP processing of APP.

Because γ -secretase is involved in both amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways, we further confirm the pivotal role of the APP processing in the effect of A β o on NMDA sEPSC through the amyloidogenic pathway by performing experiments with a specific inhibitor of

β -secretase: the β -secretase inhibitor IV (referred as to “ β -sec”). In control condition, β -sec alone at the concentration of 1 μ M did not affect neither NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : $-7.0 \pm 4.9\%$; $p > 0.05$; $n=10$) nor frequency (T_{20} vs T_0 : $-0.1 \pm 9.6\%$; $p > 0.05$; $n=10$; Fig 5.C,D). The reduction of NMDA sEPSCs amplitude induced by eA β was abolished in presence of β -sec (T_{20} vs T_0 : $-12.6 \pm 7.1\%$; $p > 0.05$; $n=8$) while we still observed a reduction of NMDA sEPSC frequency (T_{20} vs T_0 : $-48.0 \pm 7.8\%$; $p < 0.05$; $n=8$; Fig 5.C,D). These results suggest that the alteration of NMDA-dependent synaptic transmission by eA β is linked to the amyloidogenic pathway and APP processing. The implication of APP processing in the effect of eA β may rely on a subsequent production of iA β or APP fragments.

Oligomeric forms of eA β induce γ -secretase-mediated processing of APP

To further investigate the link between eA β and APP processing, we used the cell-based reporter gene assay for γ -secretase-mediated cleavage of APP previously described by Hoey et al., 2009. In this test, we expressed in N2a cells APP 695 with the Human Swedish mutation fused at its C terminus to the yeast transcription factor Gal4 (APPSw-Gal4). This mutation adjacent to the β -secretase cleavage site promotes strong increase of A β production. Processing of exogenously expressed APPSw-Gal4 by γ -secretase produces an AICD-Gal4 fragments that translocate in the nucleus and induce transcription of a transfected UAS-luciferase reporter gene (pFR-Luc). Firefly luciferase expression is then quantified by performing luciferase activity assays. In all experiments, cells were co-transfected with pRL-TK plasmid that constitutively expresses Renilla luciferase to normalize the Firefly luciferase reporter activity. When N2a cells were co-transfected with pFR-Luc and pRL-TK plasmids low level of basal luciferase activity was detected. The ratio of Firefly to Renilla luciferase activities was normalized to 1. Transfection with APPSw-Gal4 plasmid promoted a 390 folds increase in the luciferase activity. When N2a cells were treated with D-APT (at 5 μ M), luciferase activity was reduced by approximately 80% indicating that Gal4-driven luciferase activity requires γ -secretase activity (Figure 6A). Next, we performed a time course experiment that revealed a time-dependent increase in luciferase activity induced by eA β treatments (Figure 6B). These results indicate that eA β enhance APP processing by γ -secretase. Finally, we compared the ability of different conformation of eA β to induce γ -secretase-mediated luciferase activity (Figure 6C). We demonstrated that only oligomeric forms of A β or A β Mo induced luciferase activity increased while eA β monomers did not induce any change in luciferase activity. Together these data demonstrate that eA β enhance γ -secretase proteolysis of APP.

Human A β_{1-42} expressed in primary cortical neurons accumulates in the postsynaptic compartment

To decipher whether endogenous production of A β will affect excitatory synapses, we chose a strategy based on the use of fusion of GFP variants with A β to identify their sub-cellular localization. Here we transfected cortical cultured neurons at 12 DIV with full Human A β_{1-42} fused with mCherry and LifeAct-GFP, the latter of which encodes a small 17-amino-acid

peptide that binds specifically to filamentous actin²⁵. Among several proteins that structure the postsynaptic compartment of excitatory synapses, filamentous actin has unique structural and functional roles and may serve as a landmark for excitatory synapses¹⁷. After 48 hours of expression of the fusion peptide, the merged image showed that filamentous actin and Human A β ₁₋₄₂ tagged with RFP are mainly localized in neuronal cell bodies and in dendritic spines (Fig 7 A). Higher magnification revealed that A β ₁₋₄₂ driven fluorescence displays a diffuse fluorescence, concentrated in dendritic spines labeled with Lifeact-GFP (Fig 7 B). Treatment with the depolymerizing agent latrunculin (at 10mM for 30 min) that result in disappearance of dendritic spines abolished both LifeAct-GFP and A β ₁₋₄₂ fluorescence strengthening the human A β ₁₋₄₂ produced intracellularly accumulated in dendritic spines.

Intracellular A β ₁₋₄₂ oligomer (iA β) reduces spontaneous synaptic NMDA current in cortical cell cultures

Studies have described accumulation of intracellular A β is concomitant with synaptic functional alterations¹¹. Thus, to analyze the influence of intracellular A β (iA β) on NMDA and AMPA synaptic transmission, we incorporate A β at 300 nM in the intracellular medium of the patch pipette. After 20 min of intracellular application of A β we did not measure any modifications of both AMPA sEPSCs amplitude or frequency ($3.9 \pm 13.1\%$; $p < 0.05$; $n = 11$ and $8.9 \pm 27.6\%$; $p < 0.05$; $n = 11$ respectively; Fig 8. A,B). However, iA β reduced NMDA sEPSC amplitude ($-45.5 \pm 5.5\%$; $p < 0.001$; $n = 9$; Fig 8. C,D) without affecting the sEPSCs NMDA frequency (-2.7 ± 13.5 ; $p < 0.05$; Fig 8. C,D). These data show that similarly to eA β , 20 minutes of iA β application induces a strong reduction of NMDA synaptic currents.

To confirm that the effects observed on NMDA synaptic currents are specifically due to A β ₁₋₄₂ oligomers we tested the impact of monomers on NMDA sEPSCs. For this purpose, we incorporated monomers at 300 nM (Fig 1.) in the intracellular medium of the patch pipette. Accordingly to others studies, we did not find any significant effect on NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : -10.4 ± 4.2 ; $p > 0.05$; $n = 7$; Fig 8. C,D) and frequency (T_{20} vs T_0 : 1.7 ± 2.0 ; $p > 0.05$; Fig 8. C,D) after 20 min of intracellular monomers treatment.

Reduction of NMDA sEPSC amplitude by iA β does not require APP processing

Similarly to iA β , intracellular application of 300 nM A β ^{MO} (iA β ^{MO}) during 20 min significantly affected NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : -42.1 ± 58.0 ; $p < 0.01$; $n = 7$; Fig 9. A,B). By contrast, we observed that in presence of D-APT, application of 300 nM iA β still induced a significant reduction of NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : $-19.9 \pm 7.5\%$; $p < 0.01$; $n = 9$) while the NMDA sEPSC frequency remained stable (T_{20} vs T_0 : $12.1 \pm 29.4\%$; $p > 0.05$; $n = 9$; Fig 9. A,B). We also observed that in presence of β -sec, application of 300 nM iA β still induced a significant reduction of NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : $-33.5 \pm 3.0\%$; $p < 0.01$; $n = 7$) while the NMDA sEPSC frequency remained stable (T_{20} vs T_0 : $7.8 \pm 14.6\%$; $p > 0.05$; $n = 7$; Fig 8. A,B).

Intracellular A β ₁₋₄₂ oligomer (A β) induces a postsynaptic reduction of NMDA currents on cortical slices

Finally, we checked whether these alterations observed in cortical neuronal cultures were also present in neurons of somatosensory cortical slices. As shown in Fig 10.A,B, application of eA β markedly affects NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : -24.0 ± 8.3 ; $p > 0.05$; $n=11$) and frequency (T_{20} vs T_0 : -30.0 ± 10.5 ; $p < 0.01$; $n=11$) recorded on layer 5 pyramidal neurons. Similarly, iA β reduced NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : -36.2 ± 8.2 ; $p < 0.001$; $n=8$) without affecting NMDA sEPSC frequency (T_{20} vs T_0 : -18.4 ± 16.4 ; $p > 0.05$; $n=8$; Fig 10. A,B). These data reveal that both eA β and iA β applications induce a reduction of NMDA synaptic currents of layer 5 pyramidal cells and we found no significant effect of monomers (at 300 nM) on NMDA sEPSC amplitude (T_{20} vs T_0 : -5.1 ± 4.3 ; $p > 0.05$; $n=6$) and frequency (T_{20} vs T_0 : 7.2 ± 16.2 ; $p > 0.05$; $n=6$) after 20 min.

Discussion

In the past decade, A β has emerged as the pivotal actor in the pathophysiological processes leading to synaptotoxicity and memory deficits in AD. Indeed, the first characterization of their disrupting action on long-term potentiation, the biological correlate of memory processes, revealed that a short exposure to A β is sufficient to disrupt the molecular mechanisms leading to synaptic plasticity suggesting that minutes after A β exposure, excitatory synaptic neurotransmission is affected⁷. In our study, we demonstrated that a 20 minute application of eA β significantly affects glutamatergic synaptic transmission by exerting a dual effect at both presynaptic and postsynaptic levels resulting in AMPA and NMDA sEPSC frequency and NMDA sEPSC amplitude reduction respectively. However, these two alterations of the excitatory neurotransmission are relying on different mechanisms. If the perturbation of neuronal excitability necessitates A β crossing of the neuronal membrane, the reduction of NMDA dependent synaptic currents requires activation of β and γ -secretases, two enzymes involve the amyloidogenic pathway of APP. The processing of APP driven by A β promotes a subsequent accumulation of intracellular A β that leads to the reduction of synaptic NMDA currents.

The impact of eA β peptides on excitatory synaptic transmission has been extensively studied to further understand the mechanism of action of A β in the disruption of learning and memory processes associated with AD. If a consensus has emerged that validate the idea that A β application negatively affects cortical excitatory neurotransmission, questions remain about its involvement in the pre or postsynaptic sites of action. Our data reveal that the perturbation of cellular excitability induced by eA β is associated with the reduction of the frequency of spontaneous but not miniature EPSCs recorded in presence of TTX. Perturbations of cellular excitability have already been reported in transgenic models of AD or after A β application. Indeed, it has been shown that A β overproducing transgenic mice

present a reduction in somatic Na⁺ current density by 50%²⁶ or an increase in K⁺ maximal conductance²⁷. Similarly, in other transgenic mice model of AD (Tg 2576), neurons involved in the major input to the entorhinal cortex exhibited a decreased firing frequency during depolarizations, as well as an increased spike frequency adaptation²⁸. A decreased neuronal excitability has also been shown after cortical A β injection in rats²⁹. Different molecular mechanisms have been described that would lead to this reduced excitability. They may result from the reduction of synaptic current due to a direct suppression of a presynaptic calcium current involved in excitatory neurotransmission and synaptic plasticity in the brain³⁰, by a reduction of the docked synaptic vesicle pool at the presynaptic active zone³¹ or by a deficit in the rate at which recycled vesicles replenish the reserve pool³². Thus, a perturbation of passive membrane properties and/or action potential properties may lead to the reduction in AMPA and NMDA sEPSCs frequencies described in our study. Of note, we do not observe any excitability alterations in presence of eA β ^{MO}, an analog of eA β that exhibits reduced ability to cross the neuronal membrane. This result suggests that the alteration of sEPSCs frequencies requires an uploading of A β in neurons.

In opposition to the effect observed on sEPSCs frequency, the reduction of NMDA sEPSCs amplitude does not require a penetration of the A β . Indeed, in presence of eA β ^{MO}, we still observed a decrease of NMDA sEPSCs amplitude suggesting that the reduction of NMDA current amplitude relies on an interaction with extracellular proteins. Among the potential membrane receptors that have been suggested to promote molecular mechanisms leading to synaptic dysfunction, memory impairment and neurotoxicity observed in AD³³, several studies describe that extracellular A β interact with amyloid precursor protein (APP) located at the plasma membrane^{23,34} and increase both its endocytosis and processing^{35,36}. In our model, we demonstrate that extracellular A β application enhances neuronal amyloidogenic pathway leading to synaptic function alterations. The fact that the reduction of NMDA sEPSCs amplitude detected after 20 minutes of eA β application is completely blocked by the treatment with both β or γ -secretase inhibitor implies a causal role of the amyloidogenic pathway in the reduction of NMDA currents. These results were confirmed by a biochemical assay in which both eA β and eA β ^{MO} significantly raise APP processing towards the amyloidogenic pathway revealing a vicious circle triggered by eA β that promotes neuronal A β production. If the mismatch in the temporal profile measured in these two assays may be due to biochemical assays themselves that rely on the expression of de novo proteins, they both show a significant effect connected to APP processing induced by eA β and eA β ^{MO} applications completely blocked by treatment with γ -secretase inhibitors. As previous studies described that eA β promotes newly synthesized intracellular A β accumulation in cultured neurons^{20,21}, we evaluated the functional consequences of iA β infusion in cortical neurons. For this purpose, we injected the A β directly into neurons through the patch pipette. Remarkably, we observed that similarly to eA β , 20 minutes of iA β application induces a specific reduction of NMDA-dependent synaptic current amplitude without any modification of AMPA-dependent synaptic transmission validating the potential physiopathological role of iA β in synaptic transmission disruption that characterize AD³⁷. In

parallel, we studied the sub-cellular localization of A β produced intracellularly by expressing a plasmid encoding for the Human A β ₁₋₄₂ fused with mCherry. The fluorescence revealed that newly synthesized A β localized in the post-synaptic site of excitatory synapses: the dendritic spines. Together, these results strengthened the idea that intraneuronal A β targets excitatory synapses and disrupt their ability to promote synaptic plasticity. Consistent with this observation, high-resolution imaging techniques show that iA β can be found at the level of individual spines^{38,39}.

In summary, our study strengthen the hypothesis that eA β may propagate AD pathology via neuron-to-neuron propagation involving APP processing and subsequently accumulation of iA β . This accumulation of iA β may be responsible for the loss of synaptic plasticity potential of dendritic spines that characterize the early stage of AD. Pharmacological strategies targeting intraneuronal accumulation of A β may represent a novel therapeutic approach of the early stage of the disease.

References

1. Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L. & Bonuccelli, U. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* **32**, 275–279 (2011).
2. Näslund, J. *et al.* Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8378–8382 (1994).
3. Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. & Sisodia, S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006270 (2012).
4. Kamenetz, F. *et al.* APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**, 925–937 (2003).
5. Greenfield, J. P. *et al.* Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer β -amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 742–747 (1999).
6. LaFerla, F. M., Green, K. N. & Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 499–509 (2007).
7. Walsh, D. M. *et al.* Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**, 535–539 (2002).
8. Li, S. *et al.* Soluble Oligomers of Amyloid β Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake. *Neuron* **62**, 788–801 (2009).
9. Shankar, G. M. *et al.* Amyloid β -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat. Med.* **14**, 837–842 (2008).
10. Shankar, G. M. *et al.* Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *J. Neurosci.* **27**, 2866–2875 (2007).
11. Oddo, S. *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409–421 (2003).
12. Gouras, G. K. *et al.* Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* **156**, 15–20 (2000).

13. Stine, W. B., Dahlgren, K. N., Krafft, G. A. & LaDu, M. J. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 11612–11622 (2003).
14. Hoey, S. E., Williams, R. J. & Perkinson, M. S. Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 4442–4460 (2009).
15. Rajendran, L. *et al.* Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11172–11177 (2006).
16. Léveillé, F. *et al.* Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J.* **22**, 4258–4271 (2008).
17. Frandemiche, M. L. *et al.* Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **34**, 6084–6097 (2014).
18. Li, S. *et al.* Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 6627–6638 (2011).
19. Ripoli, C. *et al.* Intracellular Accumulation of Amyloid- β (A β) Protein Plays a Major Role in A β -Induced Alterations of Glutamatergic Synaptic Transmission and Plasticity. *J. Neurosci.* **34**, 12893–12903 (2014).
20. Tampellini, D. *et al.* Synaptic activity reduces intraneuronal Abeta, promotes APP transport to synapses, and protects against Abeta-related synaptic alterations. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 9704–9713 (2009).
21. Yang, A. J., Chandswangbhuvana, D., Shu, T., Henschen, A. & Glabe, C. G. Intracellular accumulation of insoluble, newly synthesized abetan-42 in amyloid precursor protein-transfected cells that have been treated with Abeta1-42. *J. Biol. Chem.* **274**, 20650–20656 (1999).
22. Ripoli, C. *et al.* Effects of different amyloid β -protein analogues on synaptic function. *Neurobiol. Aging* **34**, 1032–1044 (2013).
23. Lorenzo, A. *et al.* Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **3**, 460–464 (2000).
24. Shaked, G. M. *et al.* Abeta induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624). *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 1254–1256 (2006).
25. Riedl, J. *et al.* Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **5**, 605–607 (2008).
26. Brown, J. T., Chin, J., Leiser, S. C., Pangalos, M. N. & Randall, A. D. Altered intrinsic neuronal excitability and reduced Na⁺ currents in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **32**, 2109.e1-14 (2011).
27. Tamagnini, F. *et al.* Altered intrinsic excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons in aged PDAPP mice. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 372 (2015).
28. Marcantoni, A., Raymond, E. F., Carbone, E. & Marie, H. Firing properties of entorhinal cortex neurons and early alterations in an Alzheimer's disease transgenic model. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **466**, 1437–1450 (2014).
29. Eslamizade, M. J. *et al.* Alterations in CA1 pyramidal neuronal intrinsic excitability mediated by Ih channel currents in a rat model of amyloid beta pathology. *Neuroscience* **305**, 279–292 (2015).

30. Nimmrich, V. *et al.* Amyloid β Oligomers (A β 1–42 Globulomer) Suppress Spontaneous Synaptic Activity by Inhibition of P/Q-Type Calcium Currents. *J. Neurosci.* **28**, 788–797 (2008).
31. Moreno, H. *et al.* Synaptic transmission block by presynaptic injection of oligomeric amyloid beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5901–5906 (2009).
32. Ting, J. T., Kelley, B. G., Lambert, T. J., Cook, D. G. & Sullivan, J. M. Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 353–358 (2007).
33. Jarosz-Griffiths, H. H., Noble, E., Rushworth, J. V. & Hooper, N. M. Amyloid- β Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein. *J. Biol. Chem.* **291**, 3174–3183 (2016).
34. Fogel, H. *et al.* APP homodimers transduce an amyloid- β -mediated increase in release probability at excitatory synapses. *Cell Rep.* **7**, 1560–1576 (2014).
35. Lefort, R., Pozueta, J. & Shelanski, M. Cross-linking of cell surface amyloid precursor protein leads to increased β -amyloid peptide production in hippocampal neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 10674–10685 (2012).
36. Maloney, M. T., Minamide, L. S., Kinley, A. W., Boyle, J. A. & Bamburg, J. R. Beta-secretase-cleaved amyloid precursor protein accumulates at actin inclusions induced in neurons by stress or amyloid beta: a feedforward mechanism for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 11313–11321 (2005).
37. Gouras, G. K., Tampellini, D., Takahashi, R. H. & Capetillo-Zarate, E. Intraneuronal beta-amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **119**, 523–541 (2010).
38. Capetillo-Zarate, E. *et al.* High-resolution 3D reconstruction reveals intra-synaptic amyloid fibrils. *Am. J. Pathol.* **179**, 2551–2558 (2011).
39. Pickett, E. K. *et al.* Non-Fibrillar Oligomeric Amyloid- β within Synapses. *J. Alzheimers Dis. JAD* (2016).

Figures

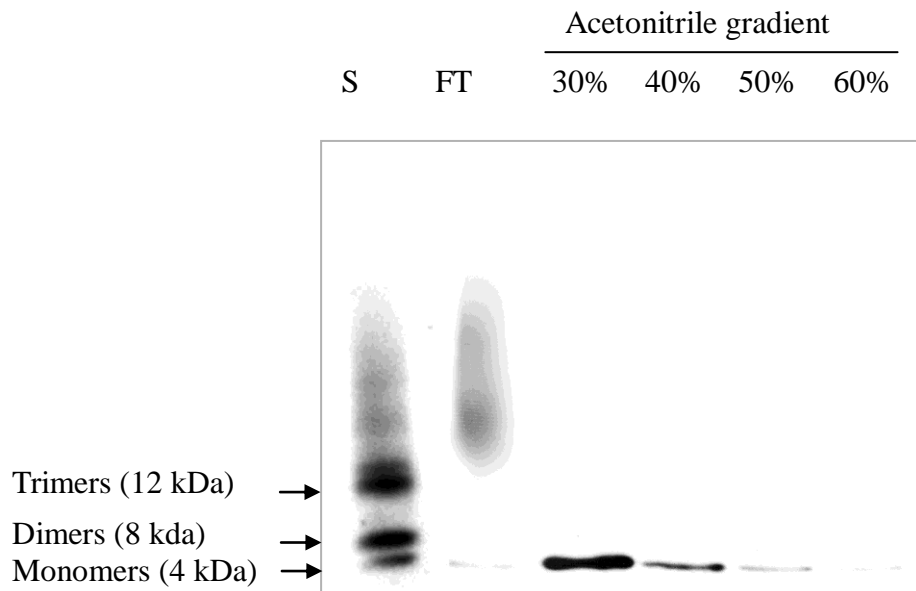


Figure 1. SDS-PAGE analysis of A β o and A β monomers after purification on C18 column. Western blot analysis of experimental solutions before (S) and after purification on C18 column. All fractions were electrophorated on 15% tris-glycine gel and A β oligomers presence was determine in our experimental solutions by western blot with 4G8 antibody. Our experimental solutions display very different profiles: A β o (S) showed both monomers and abundant dimers and trimers composition. After purification, we isolated high concentration of A β monomers from the oligomers solution with 30% acetonitrile. FT: Flow Through; Peptides eluted at 30%, 40%, 50% and 60% acetonitrile. Form used of A β monomer (dot plot).

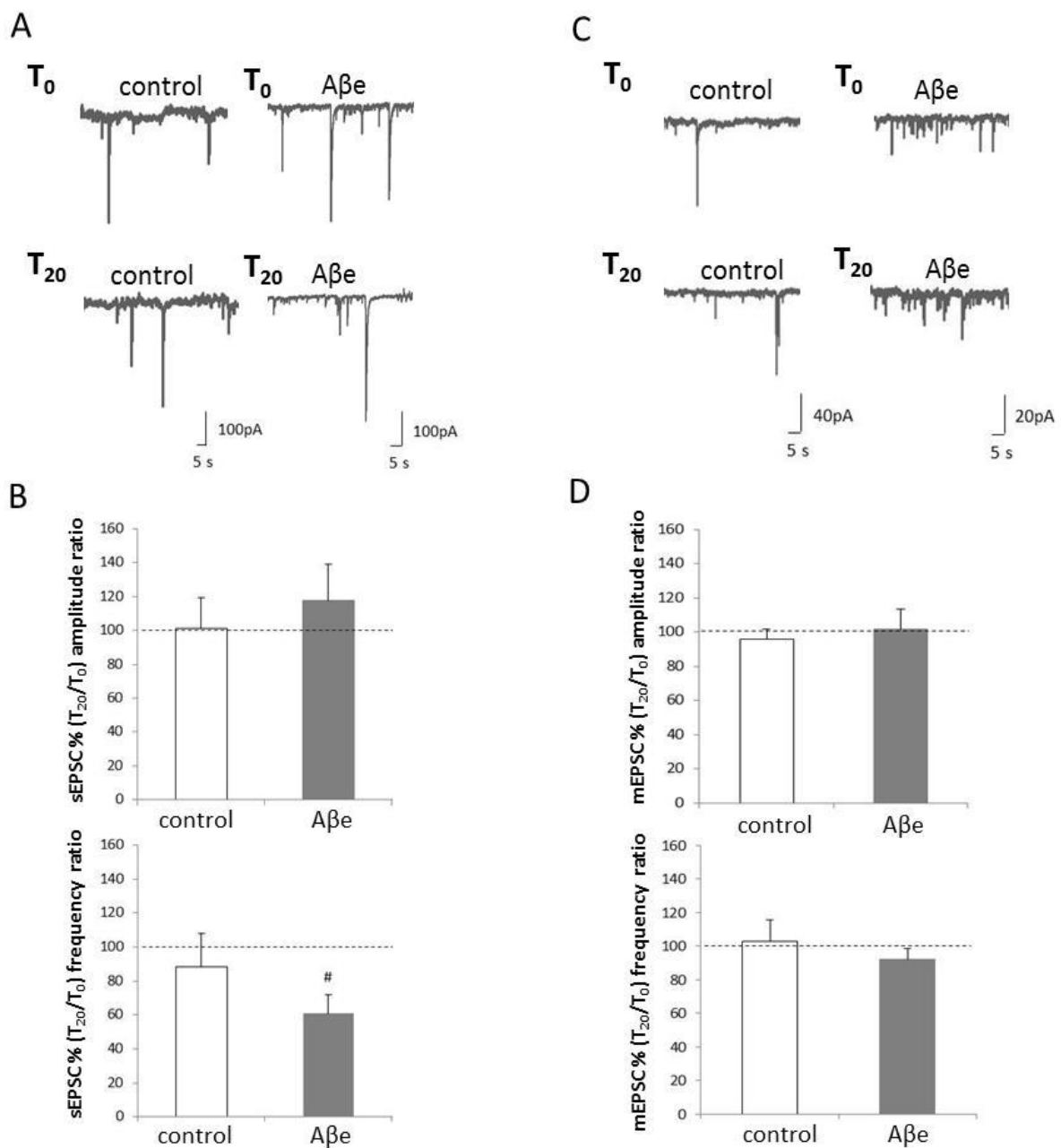


Figure 2. Extracellular A β_{1-42} oligomers (A β o) perturb AMPA dependent synaptic transmission in cortical cell cultures. A, Representative traces of AMPA sEPSC currents at T_0 and T_{20} in control condition or with [300 nM] extracellular A β o (A β e). **B.,** Bar graphs (mean \pm SEM) showing the T_{20}/T_0 ratio of sEPSC amplitude and frequency in control condition (n=10) (white bars); with [300 nM] extracellular A β o (A β e) (n=10) (grey bars). **C,** Representative traces of AMPA mEPSC currents at T_0 and T_{20} in control condition or with [300 nM] extracellular A β o (A β e). **D.,** Bar graphs (mean \pm SEM) showing the T_{20}/T_0 ratio of sEPSC amplitude and frequency in control condition (n=7) (white bars) or with [300 nM] extracellular A β o (A β e) (n=6) (grey bars). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, n.s.: $p > 0,05$. # $p < 0,05$ relative to the T_0 recording (dotted line) normalized to 100%.

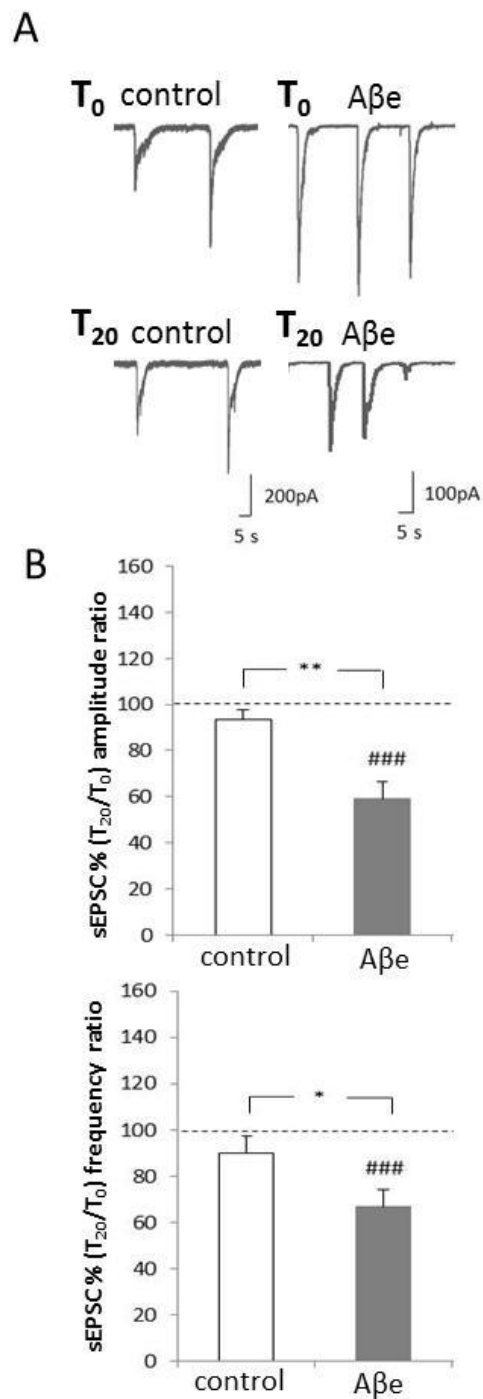


Figure 3. Extracellular $A\beta_{1-42}$ oligomers ($A\beta_o$) perturb NMDA dependent synaptic transmission in cortical cell cultures. A, Representative traces of NMDA sEPSC currents at T_0 and T_{20} in control condition; with [300 nM] extracellular $A\beta_o$ ($A\beta_e$). B., Bar graphs (mean \pm SEM) showing the T_{20}/T_0 ratio of sEPSC amplitude and frequency in control condition (n=10) (white bars); with [300 nM] extracellular $A\beta_o$ ($A\beta_e$) (n=17) (grey bars). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$, n.s.: $p > 0,05$. # $p < 0,05$ relative to the T_0 recording (dotted line) normalized to 100%.**

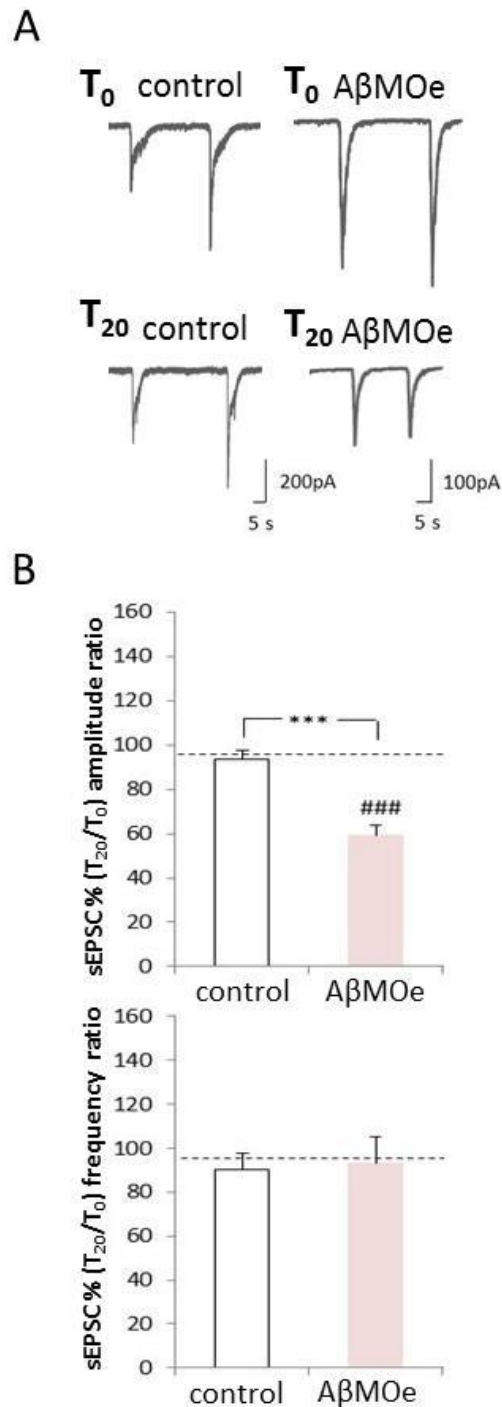


Figure 4. The perturbation of NMDA synaptic transmission is not dependent of an uploading of extracellular A β into neurons. **A**, Representative traces of NMDA sEPSC currents at T₀ and T₂₀ in control condition; with [300 nM] extracellular A β ^{MO} (A β MOe). **B.**, Bar graphs (mean \pm SEM) showing the T₂₀/T₀ ratio of sEPSC amplitude and frequency in control condition (n=10); with [300 nM] extracellular A β ^{MO} (A β MOe) (n=11). * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, n.s.: p >0,05. # p <0,05 relative to the T₀ recording (dotted line) normalized to 100%.

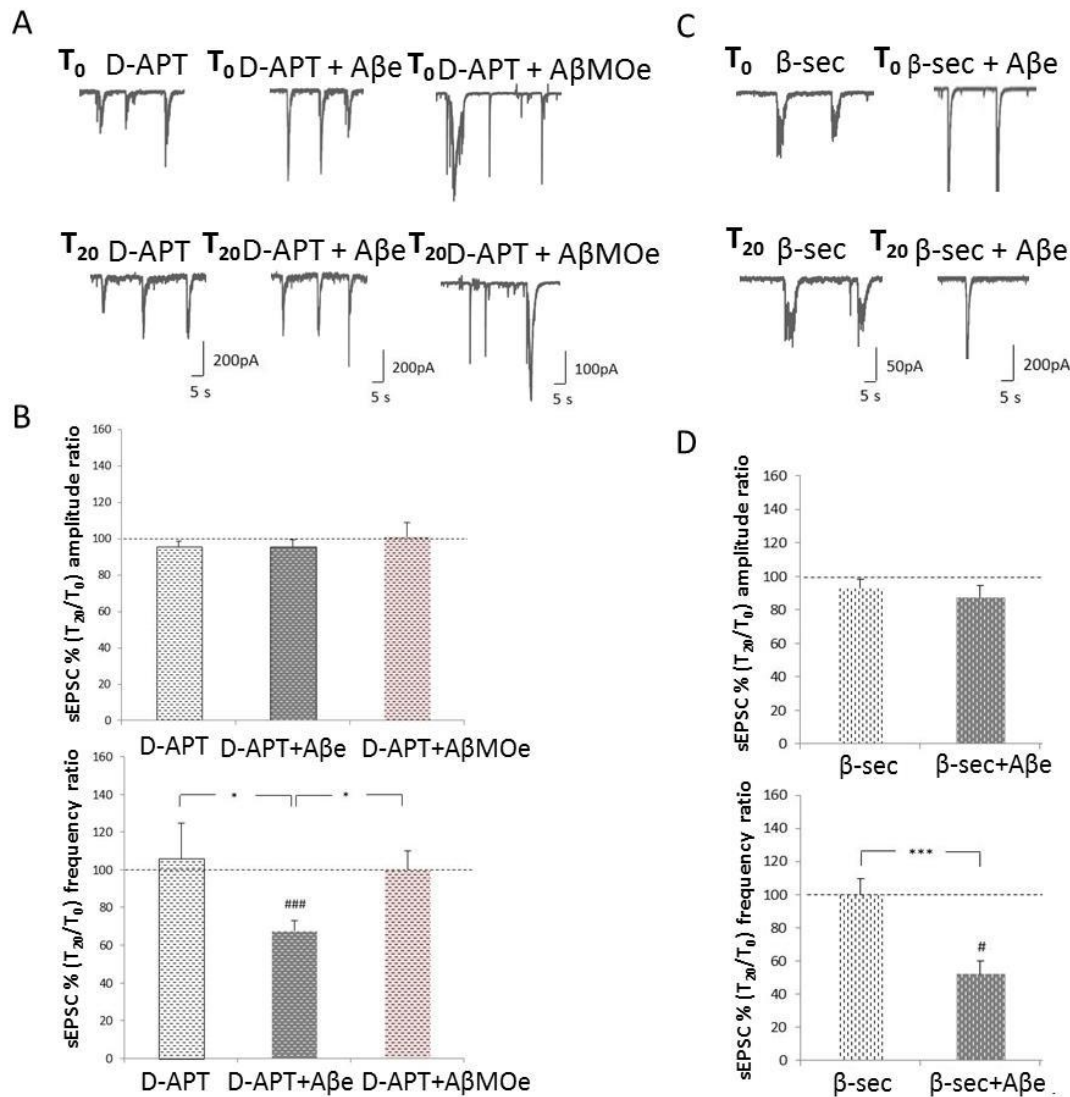


Figure 5. The alteration of NMDA-dependent synaptic transmission by extracellular Aβ is linked to a processing of APP and may be a subsequent production of iAβ. **A**, Representative traces of NMDA sEPSC currents at T₀ and T₂₀ with [5 μM] D-APT; with [5 μM] D-APT plus [300 nM] extracellular Aβ_e (Aβ_e) or with [5 μM] D-APT plus [300 nM] extracellular Aβ^{MO} (Aβ^{MO}e). **B**., Bar graphs (mean ± SEM) showing the T₂₀/T₀ ratio of sEPSC amplitude and frequency with [5 μM] D-APT (n=13); with [5 μM] D-APT plus [300 nM] extracellular Aβ_e (Aβ_e) (n=10) or with [5 μM] D-APT plus [300 nM] extracellular Aβ^{MO} (Aβ^{MO}e) (n=8). **C**, Representative traces of NMDA sEPSC currents at T₀ and T₂₀ with [1 μM] β-secretase inhibitor IV (β-sec); with [1 μM] β-secretase inhibitor IV (β-sec) plus [300 nM] extracellular Aβ_e (Aβ_e) **D**., Bar graphs (mean ± SEM) showing the T₂₀/T₀ ratio of sEPSC amplitude and frequency with [1 μM] β-secretase inhibitor IV (β-sec) (n=10); with [1 μM] β-secretase inhibitor IV (β-sec) plus [300 nM] extracellular Aβ_e (Aβ_e) (n=8). **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001, n.s.:*p*>0,05. #*p*<0,05 relative to the T₀ recording (dotted line) normalized to 100%.

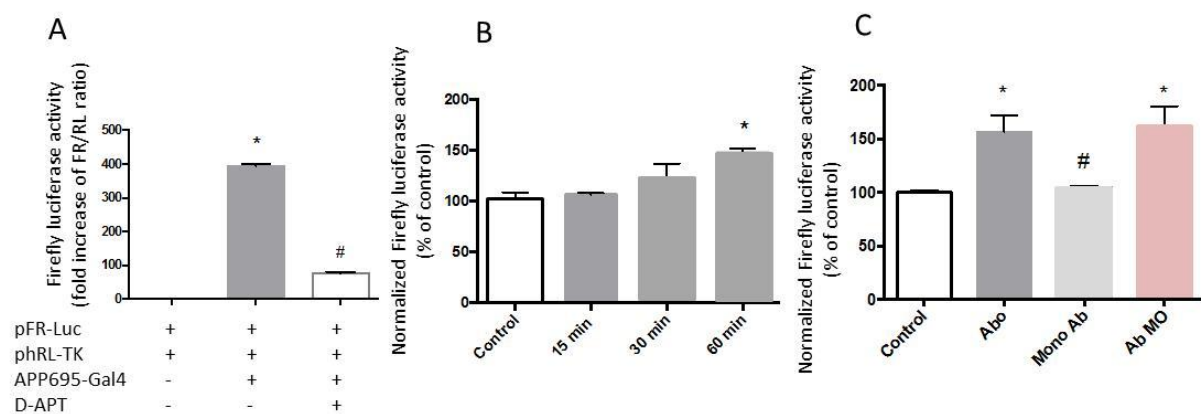


Figure 6. Oligomeric forms of eA β ₀ can induce γ -secretase-mediated processing of APP. A., N2a cells were co-transfected with pFR-Luc firefly luciferase reporter gene plasmid and phRL-TK Renilla luciferase plasmid alone or in combination with plasmids coding for APPSw-Gal4. Dual-Glow luciferase activity assays were performed 48h post-transfection for quantification of firefly and Renilla luciferase expression. In all experiments, Firefly luciferase activity was normalized using the constitutive Renilla luciferase activity. When indicated, γ -secretase inhibitor (D-APT) was added overnight before measurement. Each column is the mean \pm SEM of a minimum of 3 independent experiments. **B.,** Time-dependent increase in luciferase activity induced by eA β ₀ treatments **C.,** Co-transfected N2a cells were treated with eA β ₀ (100 nM), A β mono (100 nM) or eA β ^{MO} (100 nM) for 60 min before measuring luciferase activities. Results are expressed as % of control (N2a not exposed to eA β ₀). **C** Co-transfected N2a cells were treated with eA β ₀ (100 nM), A β mono (100 nM) or eA β ^{MO} (100 nM) for 60 min before measuring luciferase activities. Results are expressed as % of control (N2a not exposed to eA β ₀). *p<0,05 relative to ctrl, #p<0,05 relative to A β ₀, N=3 independent cultures).

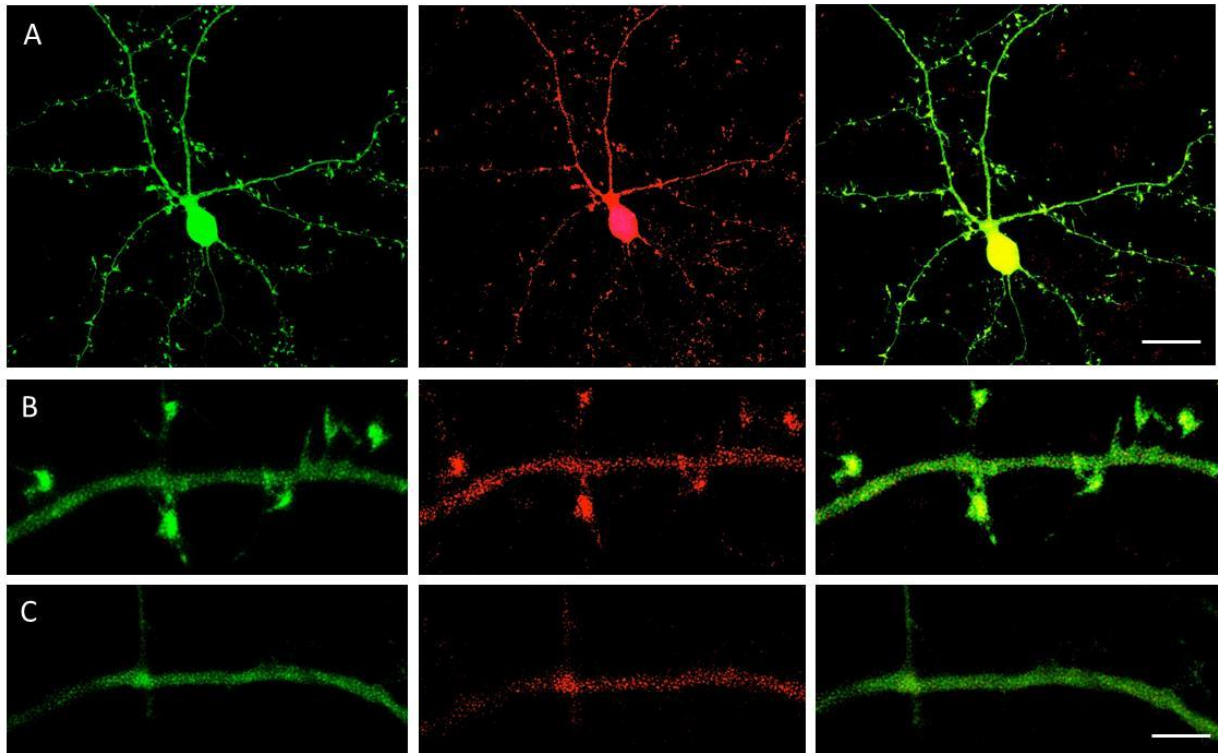


Figure 7. Intraneuronal expression of Human $A\beta_{1-42}$ -DsRed accumulates within postsynaptic compartments of excitatory synapses. **A.**, Confocal imaging of primary murine cortical neuronal cultures (14 DIV) co-transfected with life-actin-GFP and Human $A\beta_{1-42}$ -DsRed 48h before imaging. Merge images show the co-localization of $A\beta_{1-42}$ and filamentous actin in dendritic spines. **B.**, Dendritic spines of a cultured cortical neuron co-transfected with LifeAct-GFP and $A\beta_{1-42}$ -DsRed. Merge images show co-localization of $A\beta_{1-42}$ -DsRed with actin cytoskeleton localized in dendritic spine. **C.**, Treatment with actin depolarizing agent Latrunculin for 30 min abolished both LifeAct-GFP and $A\beta_{1-42}$ -DsRed fluorescence. Scale bars in the upper panel: 40 μm , lower panel: 4 μm .

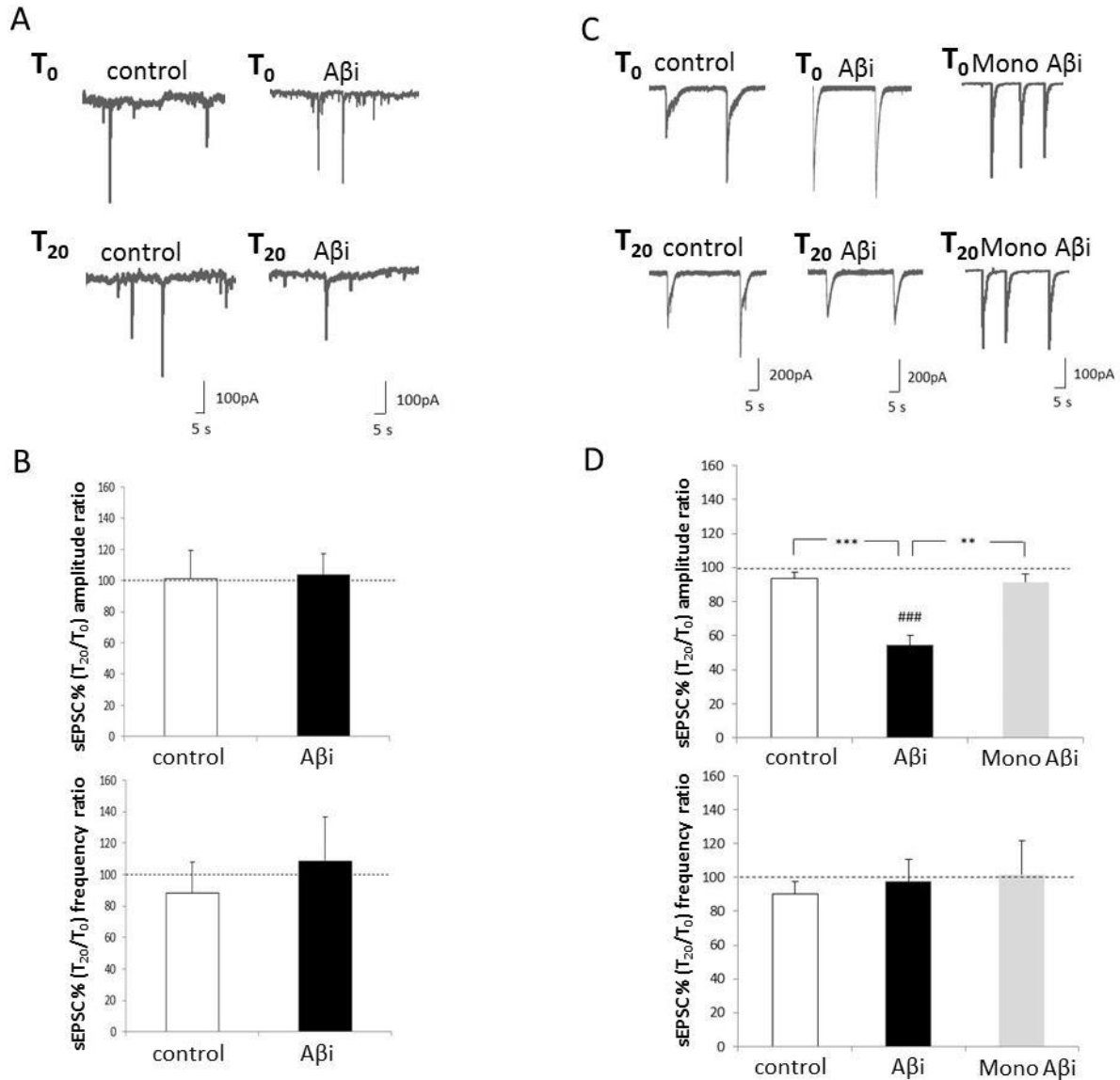


Figure 8. Intracellular $A\beta_{1-42}$ oligomers ($A\beta_o$) perturb NMDA dependent postsynaptic transmission in cortical cell cultures without affecting AMPA currents. A, Representative traces of AMPA sEPSC currents at T_0 and T_{20} in control condition or with [300 nM] intracellular $A\beta_o$ ($A\beta_i$). **B.,** Bar graphs (mean \pm SEM) showing the T_{20}/T_0 ratio of sEPSC amplitude and frequency in control condition ($n=10$) (white bars) or with [300 nM] intracellular $A\beta_o$ ($A\beta_i$) ($n=11$) (black bars). **C,** Representative traces of NMDA sEPSC currents at T_0 and T_{20} in control condition; with [300 nM] intracellular $A\beta_o$ ($A\beta_i$) or with [300 nM] intracellular $A\beta$ monomers (mono $A\beta_i$). **D.,** Bar graphs (mean \pm SEM) showing the T_{20}/T_0 ratio of sEPSC amplitude and frequency in control condition ($n=10$) (white bars); with [300 nM] intracellular $A\beta_o$ ($A\beta_i$) ($n=9$) (black bars) or with [300 nM] intracellular $A\beta$ monomers (mono $A\beta_i$) ($n=7$) (light grey bars). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, n.s.: $p > 0,05$. # $p < 0,05$ relative to the T_0 recording (dotted line) normalized to 100%.

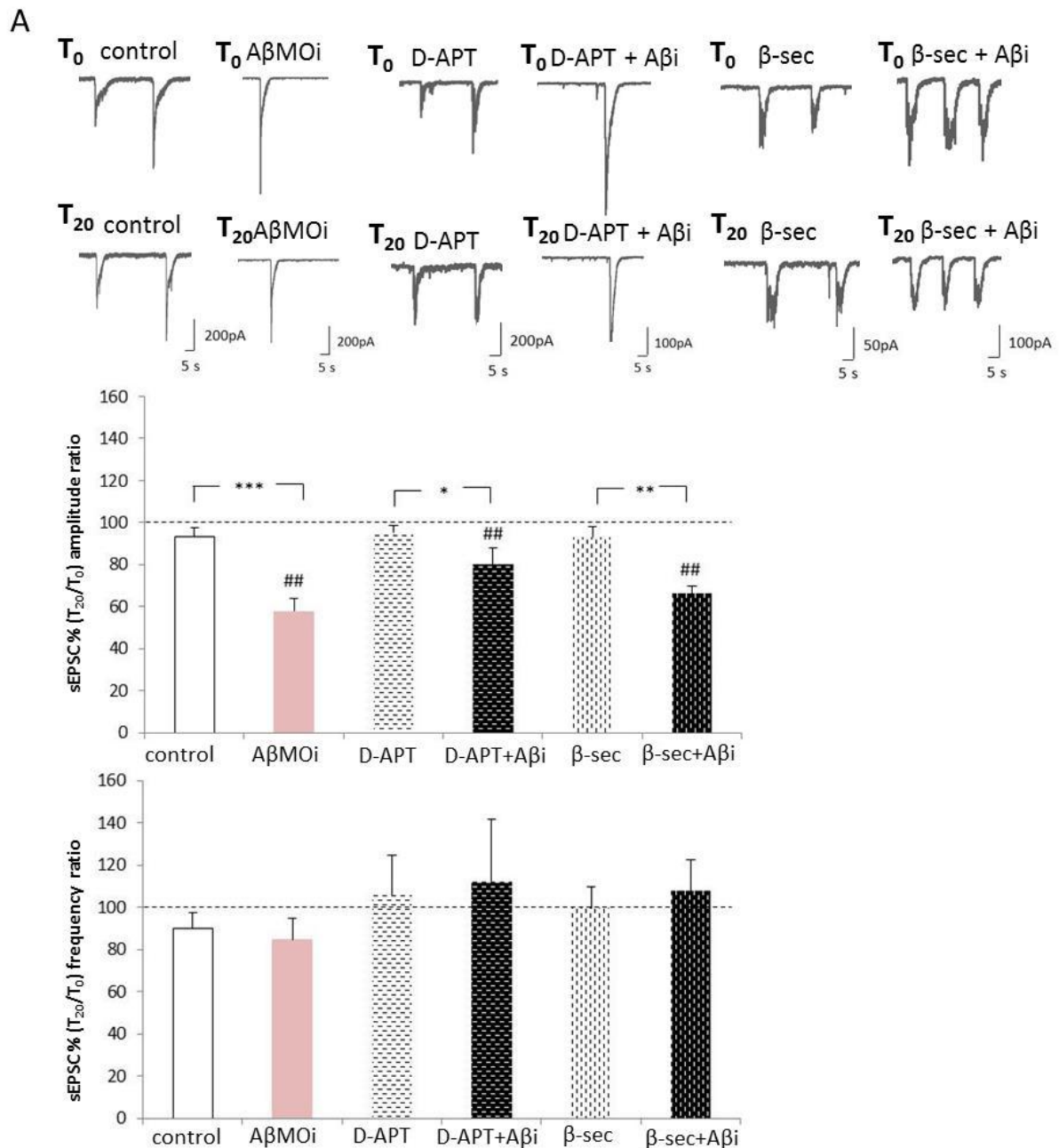


Figure 9. The postsynaptic reduction of NMDA currents induced by intracellular Aβ₁₋₄₂ oligomer (Aβo) is independent of the APP processing on cortical cell cultures. A, Representative traces of NMDA sEPSC currents at T₀ and T₂₀ in control condition or with [300 nM] intracellular Aβ^{MO} (AβMOi); with [5 μM] D-APT or with [5 μM] D-APT plus [300 nM] intracellular Aβo (Aβi); with [1 μM] β-secretase inhibitor IV (β-sec) or [1 μM] β-secretase inhibitor IV (β-sec) plus [300 nM] intracellular Aβo (Aβi). **B.,** Bar graphs (mean ± SEM) showing the T₂₀/T₀ ratio of sEPSC amplitude and frequency in control condition (n=11) or with [300 nM] intracellular Aβ^{MO} (AβMOi) (n=7); with [5 μM] D-APT (n=13) or with [5 μM] D-APT plus [300 nM] intracellular Aβo (Aβi) (n=9); with [1 μM] β-secretase inhibitor IV (β-sec) (n=10) or with [1 μM] β-secretase inhibitor IV (β-sec) plus [300 nM] intracellular Aβo (Aβi) (n=7). **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001, n.s.:*p*>0,05. #*p*<0,05 relative to the T₀ recording (dotted line) normalized to 100%.

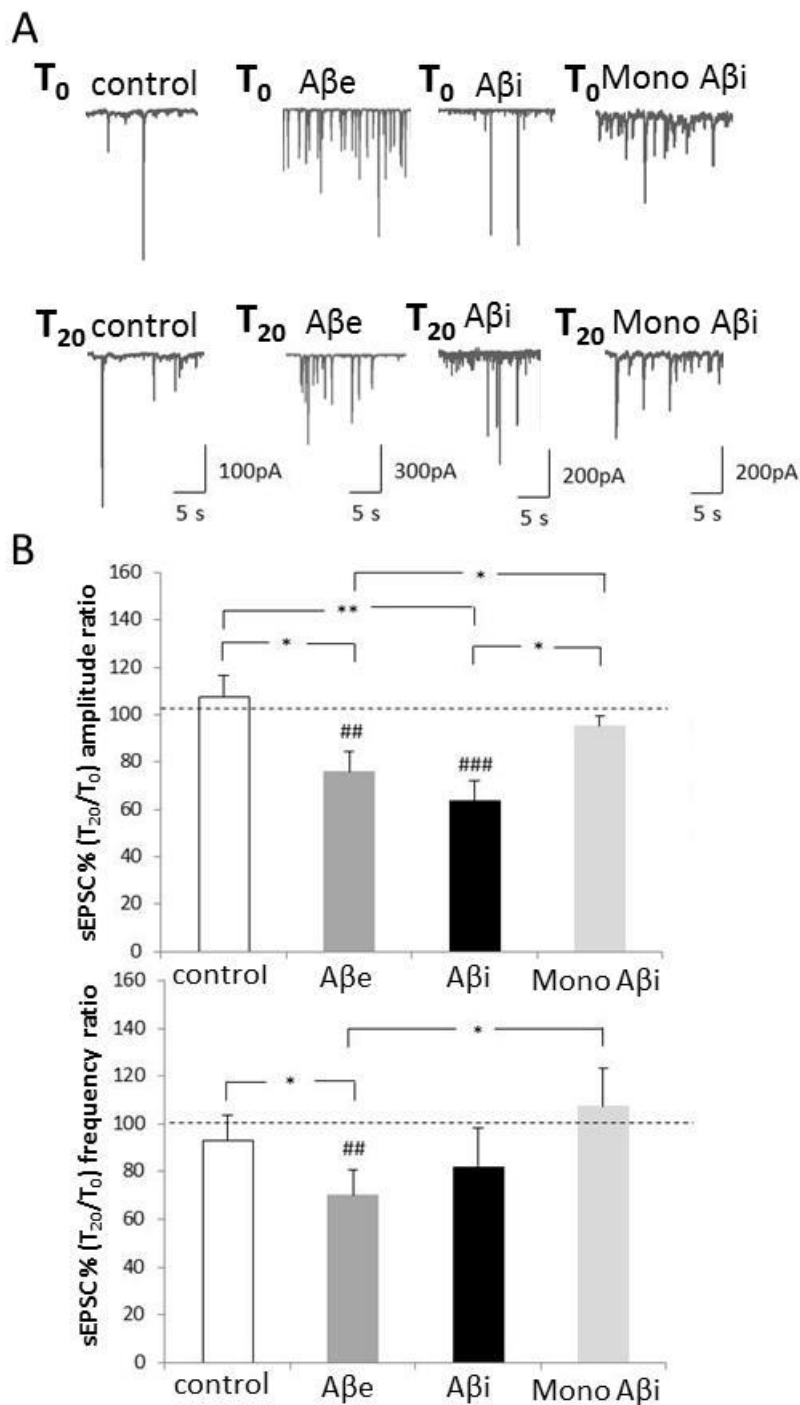


Figure 10. A β_{1-42} oligomer (A β_o) triggers a postsynaptic reduction of NMDA currents on cortical slices. A, Representative traces of NMDA sEPSC currents at T_0 and T_{20} in control condition; with [300 nM] extracellular A β_o (A β_e); with [300 nM] intracellular A β_o (A β_i) or with [300 nM] intracellular A β monomers (mono A β_i). **B.,** Bar graphs (mean \pm SEM) showing the T_{20}/T_0 ratio of sEPSC amplitude and frequency in control condition ($n=11$); with [300 nM] extracellular A β_o (A β_e) ($n=11$); with [300 nM] intracellular A β_o (A β_i) ($n=8$) or with [300 nM] intracellular A β monomers (mono A β_i) ($n=6$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$, n.s.: $p>0,05$. # $p<0,05$ relative to the T_0 recording (dotted line) normalized to 100%.

Discussion – Perspectives

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales. A un stade précoce celle-ci entraîne des troubles de la mémoire. Au niveau cellulaire, cette altération de la mémoire est corrélée à une perte progressive des synapses et *in fine* des neurones. Il a été mis en évidence que l'altération fonctionnelle des synapses et par conséquent de la transmission synaptique glutamatergique constitue un événement précoce de la maladie d'Alzheimer. Ces perturbations sont dues aux formes oligomériques solubles du peptide A β plutôt qu'aux plaques extracellulaires. C'est pour cela qu'il est aujourd'hui important de connaître les mécanismes délétères qui conduisent à ces dysfonctionnements.

Mes travaux de thèse ont eu pour but de caractériser ces mécanismes néfastes et de mieux comprendre leurs origines. La compréhension de l'impact du peptide A β et en particulier des oligomères d'A β au niveau de la synapse est primordiale, car peut expliquer l'origine de la synaptotoxicité A β -dépendante. Afin de mieux déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires affectés par le peptide A β qui sont à l'origine des altérations des processus mnésiques dans la MA, il est donc capital de connaître son impact sur la transmission synaptique basale.

1. Impact du peptide A β sur la transmission synaptique glutamatergique AMPA et NMDA

De nombreuses données montrent que ce sont les oligomères d'A β_{42} qui altèrent le fonctionnement des neurones dans la MA et perturbent la plasticité synaptique (Lambert et al., 1998; Walsh et al., 2002). Les dysfonctionnements synaptiques sont à la base des perturbations de la plasticité synaptique et de la perte de mémoire dans la MA. Plusieurs études ont montré que l'accumulation d'A β_{42} dans les neurones constitue un événement antérieur à son accumulation dans le milieu extracellulaire et à la formation des DNF (Gouras et al., 2000; Pour revue: LaFerla et al., 2007). En particulier, un ensemble de données a mis en évidence l'existence de l'A β intracellulaire dans le cerveau de patients atteints de la MA et dans le cerveau de modèles animaux de la maladie (D'Andrea et al., 2001; LaFerla et al., 2007). Notamment, cette accumulation intracellulaire d'A β_{42} corrèle avec les déficits de LTP et les dysfonctionnements cognitifs chez la souris triple transgénique avant l'apparition des plaques extracellulaires ou DNF (Billings et al., 2005; Oddo et al., 2003). L'ensemble des données actuelles convergent vers l'existence d'une relation dynamique et néfaste entre les deux pools d'A β extracellulaire et intracellulaire. Plus particulièrement, ces données mettent en lumière le rôle nuisible de cette relation dans l'origine des effets synaptotoxiques associés aux formes oligomériques d'A β (A β o) (Pour revue: LaFerla et al., 2007; Pour revue: Mohamed and Posse de Chaves, 2011; Sannerud et al., 2016; Pour revue: Wirths and Bayer, 2010).

Dans ce contexte, nous avons comparé les effets extra- et intracellulaires des peptides A β o sur la transmission synaptique glutamatergique basale. Nous avons enregistré

en configuration cellule entière la fréquence et l'amplitude des courants postsynaptiques excitateurs spontanés (sEPSC) des récepteurs AMPA et NMDA sur culture primaire de neurones corticaux de souris. Lorsque le milieu extracellulaire des neurones est dépourvu de magnésium, les neurones émettent spontanément au potentiel de repos (-60 mV) des sEPSC NMDA (en présence de 10 μ M de NBQX, antagoniste des R-AMPA) ou des sEPSC AMPA (en présence de 100 μ M de D-AP5, antagoniste des R-NMDA). Cette technique nous permet d'observer l'effet spécifique des oligomères d'A β sur le fonctionnement de chaque récepteur glutamatergique : AMPA et NMDA.

Nos résultats montrent **qu'en présence d'une concentration de 300 nM d'une solution d'A β humain synthétique dans le milieu extracellulaire (eA β) ou intracellulaire (iA β), l'amplitude des courants résultant de l'activité des R-AMPA n'est pas altérée. Seule la fréquence des courants AMPA est significativement réduite suite à l'exposition extracellulaire d'A β .** L'effet extracellulaire d'A β sur les courants miniatures (mEPSCs) AMPA, suggère que l'A β affecte les courants AMPA en perturbant l'excitabilité neuronale. En microscopie confocale, des données obtenues au sein de l'équipe montrent qu'avant et après incubation pendant 30 minutes des neurones corticaux avec de l'A β , la quantité d'épines dendritiques n'est pas altérée. Cela montre que l'effet d'A β sur la fréquence des courants est lié essentiellement à une modification de l'excitabilité neuronale et non pas à une perte des synapses fonctionnelles.

Nos résultats mettent également en évidence une implication spécifique et majeure des R-NMDA dans l'altération de la transmission glutamatergique synaptique induite par l'A β . **Tout comme les R-AMPA, seule l'exposition extracellulaire d'A β induit une réduction de la fréquence des courants postsynaptiques NMDA.** Des perturbations de l'excitabilité neuronale ont déjà été retrouvées suite à l'application extracellulaire d'A β ou également dans des études basées sur des modèles animaux de la MA. Notamment, la souris double transgénique PSAPP présente une réduction de la densité de courant Na⁺ (Brown et al., 2011) et une augmentation de la conductance K⁺ (Tamagnini et al., 2015). Une réduction de l'excitabilité neuronale a également été observée suite à des injections corticales d'A β chez les rats (Eslamizade et al., 2015). Des perturbations des propriétés passives membranaires et/ou des propriétés des PA pourraient donc expliquer la réduction de la fréquence des sEPSC AMPA et NMDA que nous observons dans notre modèle d'étude.

Concernant l'amplitude des sEPSC AMPA et NMDA, contrairement aux R-AMPA, l'exposition extracellulaire et intracellulaire du peptide A β affecte spécifiquement l'amplitude des courants postsynaptiques des R-NMDA au bout de 20 minutes. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par l'étude de Walsh et collaborateur. Dans leur étude ils examinent l'activité biologique *in vivo* d'oligomères d'A β humains issus de microsomes de cellules 7PA2 CHO exprimant l'APP₇₅₁. Leur étude s'était plutôt focalisée sur l'effet de ces oligomères sur les mécanismes de plasticité synaptique (LTP). Ils mettent en évidence que l'induction de la LTP dans la région CA1 de l'hippocampe de rat est bloquée

spécifiquement par les oligomères d'A β dès 15-20 minutes environ et ceci pendant 3 heures (Walsh et al., 2000). Ces données corroborent les résultats que nous observons sur la réduction de l'amplitude des courants spontanés sEPSC NMDA au bout de 20 minutes en présence d'oligomères d'A β dans le milieu extracellulaire mais également intracellulaire.

Néanmoins, contrairement aux courants NMDA, nous avons observé une légère augmentation (même si non significative) des courants AMPA après 20 minutes d'application de l'A β o extracellulaire. Des résultats similaires ont été observés sur des neurones exposés à l'A β o extracellulaire (Tozaki et al., 2002 ; Wang et al., 2010) mais également en présence d'A β o intracellulaire (Whitcomb et al., 2015). Cependant, d'autres études ont montré que le peptide A β induisait une internalisation des récepteurs AMPA (Gu et al., 2009 ; Hiesh et al., 2006). Ces résultats opposés peuvent être dus aux différents temps d'exposition de l'A β o, aux différents systèmes d'étude (modèle animal, culture primaire de neurones, cultures organotypiques...) mais également à l'utilisation de concentrations différentes de peptide A β o.

Un sujet assez controversé est celui de la concentration de peptides A β utilisés. Il est difficile de connaître précisément la concentration d'A β o ou de monomères à utiliser qui correspondrait à la concentration retrouvée dans le liquide céphalo-rachidien ou le plasma des patients atteints de la MA (déterminée souvent en pg/ml). L'ensemble des données bibliographiques montre que de nombreuses études utilisent des concentrations d'A β o de l'ordre de 1 à 100 μ M, mais ces concentrations sont trop élevées alors que des concentrations de l'ordre de 1 à 500 nM sont plus adaptées puisqu'elles induisent des perturbations synaptiques et notamment de la plasticité synaptique sans être pour autant neurotoxiques (Dahlgren et al., 2002; Kervern et al., 2012; Podlisny et al., 1995). De plus, ces concentrations d'A β o sont dans la fourchette de concentrations d'A β ₄₂ intracellulaire retrouvées dans les neurones des modèles de la MA et des patients atteints de cette maladie (Hashimoto et al., 2010; Hu et al., 2009). Dans notre modèle d'étude, nous avons donc testé l'effet d'A β à une concentration de 100 nM (données non montrées). A cette concentration donnée, l'amplitude des courants postsynaptiques NMDA est significativement réduite, tout comme lorsque nous avons utilisé une concentration d'A β o à 300 nM. Cependant, alors qu'en présence de 300 nM d'A β o la fréquence des courants postsynaptiques NMDA est réduite au bout de 20 minutes, en présence d'une concentration de 100 nM d'A β o la fréquence des courants NMDA n'est pas significativement altérée. Ces résultats sont similaires aux données obtenues par Ripoli et collaborateurs qui ont étudié la relation dose-réponse des effets de l'A β o intracellulaire. Ils ont montré que l'effet sur l'amplitude des courants est maximum entre 200 et 1000 nM d'A β ₄₂ intracellulaire (Ripoli et al., 2014). Dans notre modèle expérimental, nous avons donc choisi d'utiliser une concentration à 300 nM pour l'ensemble des expériences électrophysiologiques afin de pouvoir observer l'effet de l'A β o au niveau postsynaptique mais également au niveau présynaptique. Par contre, pour les expériences de biochimie, l'utilisation d'une concentration de 100 nM est suffisante pour observer les effets induits par l'A β o et permet de s'affranchir des effets de l'A β o au niveau présynaptique sur la perturbation de l'activité du réseau neuronal.

Concernant la réduction d'amplitude des courants NMDA que nous observons en présence de 300 nM d'A β , une possibilité serait qu'elle soit due à une internalisation et endocytose des R-NMDA provoquée par l'A β . Notamment, Snyder et collaborateurs montrent que l'incubation pendant 1 heure de cultures de neurones corticaux avec 1 μ M d'A β réduit l'expression à la surface synaptique des sous-unités GluN1 des R-NMDA responsable par conséquent d'une réduction des courants évoqués des R-NMDA (Snyder et al., 2005). Cette étude n'a pas analysé l'effet d'A β sur les R-AMPA ni l'effet intracellulaire d'A β sur les R-NMDA. Néanmoins, les changements observés au niveau de la composition des R-NMDA synaptiques suite à 1 heure d'incubation d'A β , peuvent être à l'origine de modifications dans les voies de signalisation intracellulaires qui participent aux effets observés de l'A β sur la transmission glutamatergique.

Dans notre projet d'étude, avant de se focaliser sur les voies de signalisation induites par la modification des sous-unités du R-NMDA, nous avons envisagé la possibilité qu'une modification des sous-unités du R-NMDA par l'application d'A β participe à la réduction des courants postsynaptiques NMDA que nous observons. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en analysant l'effet des oligomères d'A β sur les courants postsynaptiques spontanés NMDA en présence d'un inhibiteur des sous-unités GluN2B, tel que l'Ifenprodil. Cependant, une étude effectuée au sein de notre équipe, a montré que sur des cultures de neurones corticaux incubés pendant 15 minutes avec 100 nM d'A β , la densité de GluN2B à la PSD n'est pas modifiée (Frاندemiche et al., 2014).

Une autre possibilité serait d'analyser si le peptide A β altère les propriétés électrophysiologiques des R-NMDA, un enregistrement de la courbe i/v (intensité en fonction du voltage) permettrait d'avoir un premier flux d'informations à ce sujet.

D'autre part, des interactions directes entre le peptide A β et les R-NMDA ont été identifiées (De Felice et al., 2007; Decker et al., 2010). Il est possible que les différents assemblages/conformations des peptides A β possèdent différentes cibles dépendant de la forme d'A β utilisé, cela expliquerait les différents résultats trouvés dans la littérature (Pour revue: Shankar and Walsh, 2009). De plus, les différentes formes d'A β ne possèdent pas le même pouvoir synaptotoxique. Notamment, des études montrent que les oligomères d'A β mais pas les monomères perturbent la plasticité synaptique *in vivo* (Walsh et al., 2002). Nos résultats sont en accord avec ces données bibliographiques puisque nous n'observons pas de réduction des courants postsynaptiques spontanés des R-NMDA suite à l'application intracellulaire de 300 nM de monomères d'A β .

2. Les altérations de la transmission synaptique glutamatergique NMDA-dépendante ont lieu via une altération du processing d'APP

Des études suggèrent que l'effet toxique de l'A β extracellulaire pourrait être médié via une augmentation du processing d'APP (Lorenzo et al., 2000) et par conséquent d'une augmentation de la concentration d'A β intracellulaire néosynthétisé (Tampellini et al.,

2009; Yang et al., 1999). Nos résultats corroborent ces données, puisque **la perfusion extracellulaire d'un inhibiteur de la γ -sécrétase (D-APT) ou de la β -sécrétase (« β -sécrétase inhibitor IV ») reverse la diminution de l'amplitude des courants postsynaptiques spontanés NMDA induite par le peptide $eA\beta$** . Seule la fréquence des courants NMDA est encore réduite, du fait de l' $A\beta$ extracellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par des tests d'activité de la γ -sécrétase effectués sur une lignée cellulaire de neuroblastome de souris, les cellules N2A. Ces derniers montrent que l'activité de γ -sécrétase est augmentée dans des cellules N2A incubées pendant 1 heure en présence de 100 nM d' $A\beta$. Au contraire, en présence de 100 nM de monomères d' $A\beta$ nous n'avons pas observé d'augmentation d'activité de la γ -sécrétase, ce qui est en accord avec les résultats électrophysiologiques que nous avons obtenus préalablement sur l'absence d'effet des monomères d' $A\beta$ sur l'activité des R-NMDA. **L'ensemble de ces résultats montrent qu'en présence d' $A\beta$ le processing d'APP est augmenté et suggère une augmentation subséquente de la production d' $A\beta$ intracellulaire.**

Tampellini et collaborateurs ont montré en 2009 que l'ajout d' $1\ \mu\text{M}$ d' $A\beta_{1-42}$ dans le milieu extracellulaire de cultures de neurones provoque une augmentation de l' $A\beta_{42}$ intracellulaire nouvellement synthétisé. Il a également été suggéré dans cette étude que les mécanismes par lesquels l' $A\beta_{42}$ extracellulaire induit son effet toxique, bien qu'ils soient controversés, se font probablement via l' $A\beta_{42}$ intracellulaire (Tampellini et al., 2009c). De plus, en présence d'un inhibiteur de la γ -sécrétase ou lors de l'utilisation de neurones KO (« knock out », invalidation génique) pour l'APP, l'ajout extracellulaire d' $A\beta_{42}$ sur les neurones ne révèle plus de perte d'expression de protéines synaptiques tel que la PSD-95 (Almeida et al., 2005; Snyder et al., 2005; Tampellini et al., 2009). Nos résultats sont en accord avec ces derniers puisqu'ils suggèrent que le mécanisme synaptotoxique de l' $A\beta_{42}$ extracellulaire requiert le processing d'APP et notamment l'activité γ -sécrétase. Néanmoins, nos résultats apportent des informations supplémentaires puisqu'ils impliquent également l'activité de la β -sécrétase dans l'augmentation du processing d'APP par l' $A\beta_{42}$ extracellulaire.

On envisage dans un avenir proche de confirmer par d'autres méthodes l'implication du processing d'APP et par conséquent du clivage par la γ -sécrétase et la β -sécrétase dans l'effet synaptotoxique d' $A\beta$ en analysant l'effet du peptide $A\beta$ sur des cellules APP KO ou des cellules transfectées par des siRNA APP.

Il serait également intéressant de mesurer la potentielle augmentation d' $A\beta$ intracellulaire nouvellement synthétisé. Cela permettrait de confirmer les données obtenues par certaines études suggérant que l'effet toxique de l' $A\beta$ extracellulaire pourrait être médié via une augmentation du processing d'APP (Lorenzo et al., 2000) mais également par une augmentation de la concentration d' $A\beta$ intracellulaire (Tampellini et al., 2009; Yang et al., 1999). Notamment, une méthode par immunofluorescence telle que celle utilisée par Tampellini et collaborateurs nous permettrait d'observer spécifiquement l' $A\beta$ nouvellement synthétisé.

3. L'effet du peptide A β sur la transmission synaptique glutamatergique NMDA-dépendante ne requiert pas la pénétration du peptide dans le neurone

L'origine des pools d'A β extracellulaire et intracellulaire est un sujet très controversé dans la littérature. D'une part, un ensemble de données décrit qu'il y a une production intraneuronale d'A β_{1-42} « in situ » (J. P. Greenfield et al., 1999; Nathalie and Jean-Noël, 2008) et une accumulation intracellulaire, ce qui a notamment fait l'objet de plusieurs revues (Bayer and Wirths, 2010; LaFerla et al., 2007; Mohamed and Posse de Chaves, 2011). D'autre part, plusieurs études convergent vers un mécanisme impliquant une internalisation d'A β à partir du pool extracellulaire (D'Andrea et al., 2001; LaFerla et al., 1997; Ohyagi et al., 2007). Par exemple, il a été montré que des cellules traitées avec des peptides A β synthétiques présentaient une accumulation intracellulaire d'A β_{42} et cette internalisation était inhibée lorsque le mécanisme d'endocytose était bloqué (Knauer et al., 1992). Néanmoins, un autre mécanisme possible d'internalisation d'A β a été suggéré, tel que la diffusion passive de l'A β extracellulaire au travers de la membrane plasmique (Li et al., 2007). D'autres études ont montré que les peptides A β étaient également capables de créer des pores dans les couches lipidiques des membranes ce qui pourrait contribuer aux variations aberrantes de l'influx calcique au sein des neurones (Demuro et al., 2005; Lin and Arispe, 2015). D'autres données ont mis en évidence le rôle des intégrines et du récepteur NMDA dans l'internalisation d'A β . L'internalisation d'A β étant facilitée lors de l'utilisation d'antagonistes des intégrines mais bloqué lors de l'utilisation d'antagonistes NMDA (Bi et al., 2002; De Felice et al., 2007).

Il est évident que la relation entre les pools d'A β extracellulaire et d'A β intracellulaire constitue donc un sujet très débattu dans la littérature. **Nos résultats précédents suggèrent que la perturbation de la transmission glutamatergique NMDA-dépendante par les oligomères d'A β passe par une augmentation du processing d'APP. Par conséquent, nous avons voulu déterminer si la pénétration de l'A β extracellulaire dans le neurone est nécessaire ou pas pour induire les dysfonctionnements que nous avons observé.** Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser un variant d'A β_{42} (A β_{42}^{MO} , oxydé sur son résidu méthionine-35 (A β -Met₃₅-O)) le rendant incapable de traverser les membranes lipidiques (Ripoli et al., 2013). Nos résultats ont montré que les deux formes d'A β^{MO} , intracellulaire et également extracellulaire, induisent une réduction significative de l'amplitude des courants postsynaptiques NMDA. **Ceci confirme que l'effet postsynaptique de l'A β extracellulaire sur les courants NMDA peut se faire via un mécanisme de signalisation cellulaire sans forcément avoir besoin de pénétrer dans le neurone.**

De plus, l'ajout de l'inhibiteur de la γ -sécrétase (D-APT) dans le milieu extracellulaire en présence de l'A β^{MO} extracellulaire reverse l'effet préalablement observé de l'A β^{MO} extracellulaire sur l'amplitude des courants NMDA. **Ce dernier résultat suggère que l'A β extracellulaire est responsable d'une augmentation du processing d'APP et d'une éventuelle augmentation subséquente de la production intracellulaire d'A β via un mécanisme de signalisation (sans nécessité de pénétrer à l'intérieur du neurone) et**

responsable de la réduction des courants postsynaptiques NMDA. Il est important de noter que nos résultats n'écartent pas la possibilité qu'un mécanisme d'internalisation dans le neurone ait lieu parallèlement à ce mécanisme de signalisation cellulaire induit par l'A β o extracellulaire (figure 22).

Ainsi, Ripoli et collaborateurs ont montré que la synaptotoxicité d'A β ₄₂ se fait indépendamment d'une interaction avec des récepteurs membranaires. Cette étude met en avant l'hypothèse d'une internalisation à partir du milieu extracellulaire et une accumulation intracellulaire qui jouent un rôle majeur dans les perturbations synaptiques (Ripoli et al., 2014). Via un marquage fluorescent de l'A β ₄₂ perfusé dans le milieu extracellulaire sur culture de neurones hippocampiques, il apparaît qu'après 20 minutes celui-ci se retrouve internalisé au sein des compartiments somatiques et dendritiques des neurones. Par contre, lors de l'utilisation du variant d'A β ₄₂ (A β ₄₂^{MO}) le rendant incapable de traverser les membranes lipidiques (Ripoli et al., 2013), celui-ci se retrouve toujours dans le milieu extracellulaire au bout de 20 minutes d'application et n'affecte plus la neurotransmission synaptique ni la plasticité synaptique. Au contraire, en présence d'A β ₄₂^{MO} extracellulaire, nos résultats montrent une réduction significative de l'amplitude des courants NMDA. Donc contrairement aux résultats que nous avons obtenus, l'étude de Ripoli et collaborateurs suggère que l'effet synaptotoxique de l'A β ₄₂ extracellulaire requiert son internalisation et dépend de son interaction avec des partenaires intracellulaires (Ripoli et al., 2014). En effet, ces résultats peuvent différer du fait que nous utilisons des cultures de neurones de cortex et non des microcultures autaptiques de neurones d'hippocampe.

Il est nécessaire de valider nos résultats concernant l'impact du peptide A β o^{MO} extracellulaire sur les courants NMDA via un mécanisme de signalisation cellulaire puisqu'il n'y a pas d'études montrant si ce peptide peut interagir avec le même nombre de récepteurs ou de la même manière que son homologue A β ₄₂ non oxydé. Il serait donc intéressant de tester si le peptide A β o induit les perturbations de la transmission glutamatergique postsynaptiques NMDA-dépendante via une éventuelle fixation sur le R-NMDA. Par exemple des tests de co-immunoprécipitation d'A β ₁₋₄₂ oligomérique et du R-NMDA permettraient de donner un premier élément de réponse à cette problématique. Néanmoins, cette hypothèse paraît peu probable, puisque la réduction de l'amplitude des courants NMDA que nous observons en présence d'A β o n'a pas lieu de suite mais au bout de 15 à 20 minutes environ. De plus, nos résultats montrent que l'altération du processing d'APP est nécessaire pour induire une altération des courants NMDA. Cependant, cela n'exclut pas totalement la possibilité que la fixation de l'A β o sur les récepteurs NMDA se fasse parallèlement à d'autres mécanismes d'action de l'A β o. Plusieurs études ont montré que l'A β est capable d'interagir avec un certain nombre de récepteurs membranaires tels que les α 7-nAChR, NMDA, EphB2, PrPc, ou les mGluR, l'ensemble de ces interactions étant impliquées dans les dysfonctionnements synaptiques et les phénomènes neurotoxiques (Jarosz-Griffiths et al., 2016). Certaines études décrivent que l'A β extracellulaire est également capable d'interagir avec l'APP localisé à la membrane plasmique (Fogel et al., 2014 ; Lorenzo et al., 2000). Dans

notre modèle d'étude, il serait possible que l'A β o extracellulaire interagisse avec l'APP conduisant à son endocytose et clivage. En effet, le processing d'APP semble être impliqué dans les perturbations synaptiques puisque la réduction de l'amplitude des courants NMDA en présence d'A β o extracellulaire est réversée en présence des inhibiteurs de la β ou γ -sécrétase.

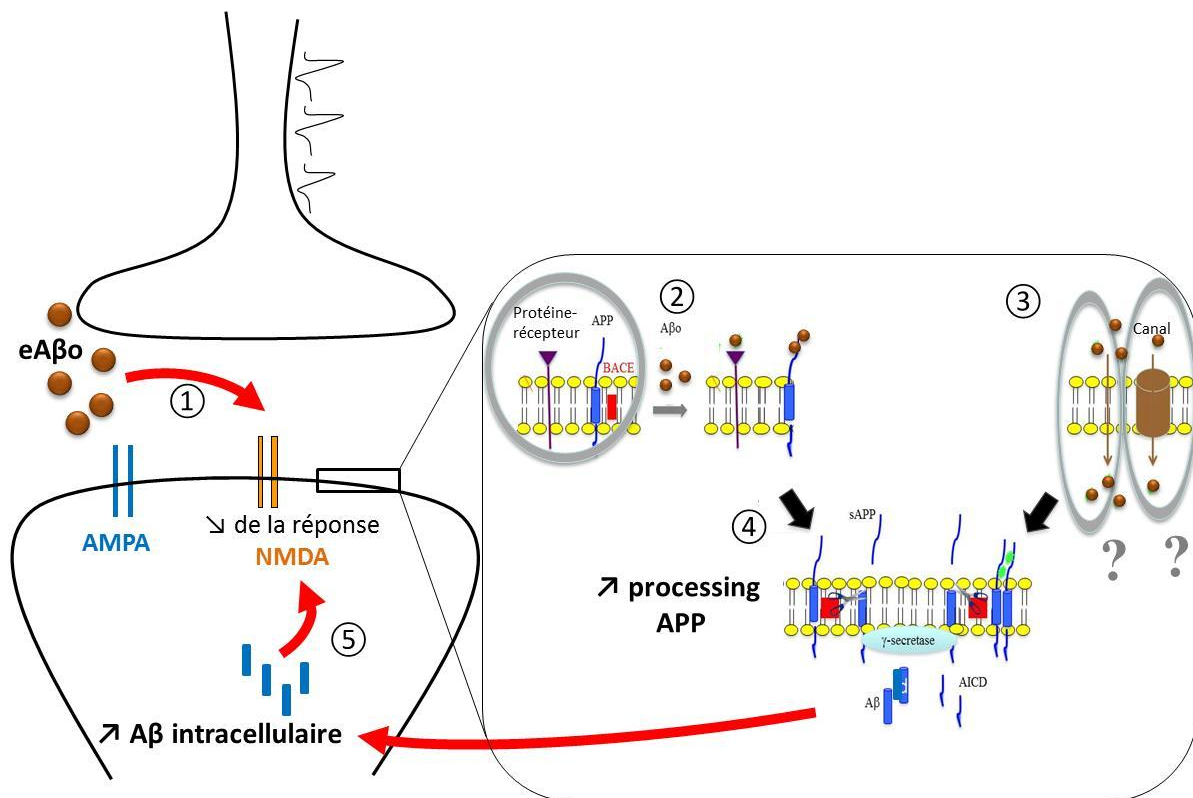


Figure 22. Illustration schématique du mode d'action de l'A β o extracellulaire. L'A β o extracellulaire induit une réduction de l'amplitude des courants postsynaptiques excitateurs spontanés des R-NMDA (1). C'est via un mécanisme de signalisation (2), sans nécessité que l'A β o pénètre à l'intérieur du neurone, qu'une augmentation du processing d'APP (4) a lieu et aboutit à une éventuelle augmentation subséquente de la production intracellulaire d'A β o responsable de la réduction des courants postsynaptiques NMDA (5). Néanmoins, il est possible qu'un mécanisme d'internalisation dans le neurone ait lieu parallèlement à ce mécanisme de signalisation cellulaire induit par l'A β o extracellulaire (3).

De plus, d'après la littérature, il semble peu probable que les interactions de l'A β o avec les récepteurs membranaires synaptiques et les phénomènes synaptotoxiques associés soient les seuls événements responsables des effets synaptotoxiques induits par l'A β o. En effet, un nombre croissant d'études mettent en évidence l'importance de l'existence de peptides A β à l'intérieur des neurones et leur rôle potentiel dans le développement de la MA

(Pour revue: Gouras et al., 2012). Comme nous l'avons mentionné, nos résultats n'écartent pas la possibilité qu'un mécanisme d'internalisation de l'A β o extracellulaire dans le neurone ait lieu parallèlement à un mécanisme de signalisation cellulaire induit par l'A β o extracellulaire. Notamment, alors que nous observons une réduction de la fréquence des courants NMDA en présence d'A β o extracellulaire, la fréquence des courants NMDA n'est pas affectée en présence d'A β ^{MO} extracellulaire. Ces données suggèrent que l'effet présynaptique de l'A β o extracellulaire sur la fréquence des courants des R-NMDA est dépendant d'une pénétration du peptide dans le neurone. Nous avons donc envisagé de vérifier si dans notre modèle d'étude, l'A β o extracellulaire rentre à l'intérieur du neurone via une pénétration passive ou via la création de pores. Pour cela, nous avons envisagé d'utiliser de l'A β conjugué au FITC (« fluorescein isothiocyanate ») afin permettre d'obtenir un premier élément de réponse à cette question. D'autres mécanismes de pénétration dans le neurone sont possibles, notamment, il faudrait tester si l'A β o pénètre à l'intérieur du neurone via un mécanisme d'endocytose en bloquant par exemple la dynamine.

4. Conclusion générale sur la relation fonctionnelle entre les pools intracellulaire et extracellulaire d'A β

Bien que l'origine et la relation fonctionnelle des pools d'A β extracellulaire et intracellulaire soit un sujet très controversé dans la littérature, **les études convergent sur l'importance du rôle de l'interconnexion de ces deux pools d'A β** . Nos résultats mettent en évidence la relation dynamique qui semble exister entre les deux pools d'A β et le potentiel rôle néfaste de cette relation.

Un nombre croissant de données permettent de suggérer que le peptide A β agit selon un mode de « cercle vicieux auto-catalytique » : c'est-à-dire que **l'accumulation extracellulaire d'A β ₄₂ provoque une accumulation et une surproduction de l'A β ₄₂ nouvellement synthétisée dans les neurones** (Pour revue: Mohamed and Posse de Chaves, 2011). Il est suggéré que le pool intraneuronal d'A β peut provenir d'une part du clivage de l'APP à l'intérieur des neurones et d'autre part de l'internalisation de l'A β extracellulaire. Bien que ces deux mécanismes soient assez distincts et régulés différemment, comprendre lequel de ces deux mécanismes est éventuellement plus important et/ou contribue plus à la pathogénicité de la MA pourrait apporter des informations importantes pour identifier des nouvelles cibles potentielles pour le traitement de cette pathologie.

Afin de valider l'hypothèse développée à partir des travaux d'ores et déjà réalisés qui suggère que les oligomères d'A β o extracellulaires pourraient induire une production d'A β o intracellulaire menant ensuite à des altérations synaptiques fonctionnelles, il serait intéressant de caractériser les courants NMDA sur des cellules exprimant la protéine APP Osaka. Cette mutation Osaka (APP- Δ E693) n'induit que des accumulations intracellulaires de peptides A β tout en produisant les mêmes symptômes que ceux observés chez les patients souffrant de formes sporadiques de la pathologie (Tomiya et al., 2008). Cette approche

complétée par l'utilisation de techniques d'imagerie cellulaire telle que la technique de bi-complémentation de la protéine Venus portée pour moitié par APP et par la β -sécrétase ou la γ -sécrétase, permettrait de suivre en temps réel les interactions entre le précurseur du peptide A β et la sécrétase BACE ou γ -sécrétase. Ces approches complémentaires permettraient de caractériser l'influence de l'exposition à l'A β o extracellulaire sur la production endogène du peptide A β .

Une autre problématique récurrente est celle des formes oligomériques (dimères, trimères, dodécamères...) responsables des atteintes sélectives synaptotoxiques. Afin d'identifier la/les formes oligomériques du peptide A β responsables de la réduction des courants NMDA il serait intéressant de développer par des techniques de purification et d'isolation différents oligomères d'A β produits par des bactéries (avec ou sans mutation afin d'obtenir des monomères purs ou des oligomères stables) à partir de cerveaux de souris transgéniques de la lignée APP/PS1-21 ou à partir d'isolats d'oligomères provenant de cerveau humain.

L'ensemble des données obtenues dans ce projet démontrent que l'effet postsynaptique d'A β o extracellulaire est dû à une augmentation du processing d'APP et à une augmentation probable d'A β intracellulaire menant à une réduction de la réponse des courants postsynaptiques NMDA. Le mécanisme par lequel l'A β o extracellulaire agit au niveau des courants glutamatergiques postsynaptiques, c'est-à-dire, via un mécanisme de signalisation sans nécessité de pénétrer dans le neurone, reste à approfondir. De la même manière, le mécanisme par lequel l'A β o extracellulaire peut rentrer, se retrouver à l'intérieur du neurone et affecter l'excitabilité neuronale doit être élucidé, tout comme les potentiels partenaires intracellulaires avec lesquels l'A β o peut interagir.

Un consensus croissant soutient que les formes solubles d'A β agissant directement ou indirectement avec un ou plusieurs récepteurs sont à l'origine des mécanismes de transduction aboutissant aux déficits de la plasticité synaptique observés dans la MA. La neutralisation directe ou indirecte des formes solubles non fibrillaires d'A β empêchant les perturbations des récepteurs induites par l'A β pourrait donc constituer une cible thérapeutique prometteuse.

Néanmoins, les R-NMDA constituent la cible des principales stratégies thérapeutiques actuelles. D'après certaines données de la littérature, des études suggèrent que les effets que l'on observe des peptides A β o sur les phénomènes de plasticité synaptique seraient principalement dus à l'activation excessive des récepteurs NMDA extrasynaptiques (Kervern et al., 2012; Li et al., 2011; Varga et al., 2015). L'activation de ces récepteurs extrasynaptiques induirait des altérations des régulations calciques et des mécanismes oxydatifs dus à des dysfonctionnements mitochondriaux. De plus, l'activation des R-NMDA extrasynaptiques serait responsable d'un métabolisme préférentiel vers la voie amyloïdogénique (Bordji et al., 2010) menant à une augmentation de la production d'A β o. Une fonction neuroprotectrice est donc attribuée aux R-NMDA synaptiques tandis qu'une

fonction délétère est attribuée aux R-NMDA extrasynaptiques (Hardingham et al., 2002; Hardingham and Bading, 2010). Etant donné l'effet d'A β o sur les R-NMDA dans la progression de la MA, ceci explique pourquoi cibler les R-NMDA constitue une piste thérapeutique actuelle. Cependant, il est possible de supposer que l'efficacité thérapeutique de ces essais puisse être améliorée si les deux types de populations de R-NMDA sont modulés : en préservant l'activité des R-NMDA synaptiques et en réprimant l'activité des R-NMDA extrasynaptiques en parallèle.

Cependant, nos données et celles de la littérature indiquent que l'impact du peptide A β o sur la perturbation des courants NMDA semble passer par une augmentation anormale du processing d'APP à l'origine d'une surproduction intracellulaire de peptides A β . **Une hypothèse mécanistique pourrait être que l'A β o extracellulaire déclenche l'augmentation de la production d'A β o intracellulaire qui pourrait à son tour affecter, via une libération dans le milieu extracellulaire, les neurones voisins.** Ceci pourrait constituer un mécanisme de propagation des peptides A β au sein du cortex des patients atteints de la MA. De plus, l'APP₆₉₅ est une protéine transmembranaire retrouvée de façon ubiquitaire dans le SNC au sein des neurones et constitue, tout comme les complexes enzymatiques (β et γ sécrétases) participant à son processing, une cible thérapeutique prometteuse afin de contrôler la propagation de cette surproduction du peptide A β au sein du cerveau.

Par ailleurs, d'autres stratégies thérapeutiques visent à stimuler l'activité cognitive. En effet, sur tranches d'hippocampe ou culture de neurones obtenues à partir de souris transgéniques porteuses de la mutation Swedish de l'APP (Tg2576) de la MA, l'étude de Tampellini et collaborateurs montre que sous activité synaptique (par un protocole de LTP induit par la glycine soit pas une dépolarisation induite par ajout de KCL) il y a une augmentation de la sécrétion d'A β ₄₂ accompagnée d'une réduction d'A β ₄₂ intracellulaire, conférant un effet neuroprotecteur sur les neurones. D'autres études sont en accord avec ces données, puisque sur des neurones de souris transgéniques APP, en conditions d'activité synaptique (par exemple en induisant une LTP chimique sur culture primaire de neurones), la réduction de l'accumulation intracellulaire d'A β ₄₂ est perturbée et l'expression des protéines synaptiques tel que la PSD-95 est réduite (Almeida et al., 2005; Snyder et al., 2005; Tampellini et al., 2007).

De nombreuses études comme celle-ci mettent en lumière l'importance de l'activité synaptique et du rôle intracellulaire du peptide A β o, soulevant des doutes sur l'efficacité et la pertinence des stratégies thérapeutiques et notamment les immunothérapies visant à contrecarrer l'effet de l'A β extracellulaire. Il paraît donc primordial de se focaliser également sur l'accumulation de l'A β intracellulaire. La mutation Osaka (APP- Δ E693) qui n'induit que des accumulations intracellulaires de peptides A β , constitue un exemple du rôle capital de l'A β intracellulaire dans la progression de la pathologie, puisque cette mutation produit néanmoins les mêmes symptômes que ceux observés chez les patients souffrant de formes sporadiques de la MA (Tomiya et al., 2008). Par ailleurs, un allèle de l'APP, la version « APP A673T (Icelandic) » a été montré comme constituant un facteur neuroprotecteur contre la MA et les individus possédant cette mutation présentent un meilleur vieillissement

cognitif que les personnes ne possédant pas cette mutation. Il a été montré que cette version du gène induit au niveau protéique une forte diminution (40%) de la production du peptide A β via une réduction du clivage par la β -sécrétase BACE-1 au niveau de l'APP (Jonsson et al., 2012; Kero et al., 2013). La mise en place d'une thérapie génique ciblant cette mutation au niveau de l'APP pourrait constituer une possible stratégie thérapeutique afin d'inhiber l'augmentation de la production de peptide A β intracellulaire qui a lieu au cours de la MA.

L'ensemble de ces données mettent en évidence l'importance primordiale de comprendre le lien fonctionnel entre les effets des pools d'A β o extracellulaire et intracellulaire afin de pouvoir expliquer et cibler les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine des altérations synaptiques glutamatergiques observés dans la MA.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

A

- Aguzzi, A., O'Connor, T., 2010. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 237–248.
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E., Smith, S.O., 2010. Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 561–567.
- Alger, B.E., Teyler, T.J., 1976. Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3, and dentate regions of the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 110, 463–480.
- Allsop, D., Landon, M., Kidd, M., 1983. The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein. *Brain Res.* 259, 348–352.
- Almeida, C.G., Tampellini, D., Takahashi, R.H., Greengard, P., Lin, M.T., Snyder, E.M., Gouras, G.K., 2005. Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol. Dis.* 20, 187–198.
- Andersen, P., Sundberg, S.H., Sveen, O., Wigström, H., 1977. Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. *Nature* 266, 736–737.
- Anggono, V., Huganir, R.L., 2012. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 461–469.
- Anson, L.C., Chen, P.E., Wyllie, D.J., Colquhoun, D., Schoepfer, R., 1998. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 581–589.
- Arendt, T., 2009. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 118, 167–179.
- Atri, A., Molinuevo, J.L., Lemming, O., Wirth, Y., Pulte, I., Wilkinson, D., 2013. Memantine in patients with Alzheimer's disease receiving donepezil: new analyses of efficacy and safety for combination therapy. *Alzheimers Res. Ther.* 5, 6.

B

- Bading, H., Greenberg, M.E., 1991. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* 253, 912–914.

- Bahr, B.A., Hoffman, K.B., Yang, A.J., Hess, U.S., Glabe, C.G., Lynch, G., 1998. Amyloid beta protein is internalized selectively by hippocampal field CA1 and causes neurons to accumulate amyloidogenic carboxyterminal fragments of the amyloid precursor protein. *J. Comp. Neurol.* 397, 139–147.
- Baliotti, M., Giorgetti, B., Casoli, T., Solazzi, M., Tamagnini, F., Burattini, C., Aicardi, G., Fattoretti, P., 2013. Early selective vulnerability of synapses and synaptic mitochondria in the hippocampal CA1 region of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 34, 887–896.
- Barnes, C.A., 1979. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 74–104.
- Barnes, D.E., Yaffe, K., 2011. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* 10, 819–828.
- Barria, A., Malinow, R., 2005. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 48, 289–301.
- Baskin, D.S., Browning, J.L., Pirozzolo, F.J., Korporaal, S., Baskin, J.A., Appel, S.H., 1999. Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 56, 1121–1123.
- Bayer, T.A., Wirths, O., 2010. Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2, 8.
- Bellone, C., Nicoll, R.A., 2007. Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron* 55, 779–785.
- Bertram, L., Tanzi, R.E., 2005. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* 115, 1449–1457.
- Bhattacharyya, S., 2016. Inside story of Group I Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*
- Bi, X., Gall, C.M., Zhou, J., Lynch, G., 2002. Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. *Neuroscience* 112, 827–840.

- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., LaFerla, F.M., 2005. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675–688.
- Birnbaum, J.H., Bali, J., Rajendran, L., Nitsch, R.M., Tackenberg, C., 2015. Calcium flux-independent NMDA receptor activity is required for A β oligomer-induced synaptic loss. *Cell Death Dis.* 6, e1791.
- Bliss, T.V., 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, 331–356.
- Bordji, K., Becerril-Ortega, J., Nicole, O., Buisson, A., 2010. Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- β production. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 15927–15942.
- Borgaonkar, D.S., Schmidt, L.C., Martin, S.E., Kanzer, M.D., Edelson, L., Growdon, J., Farrer, L.A., 1993. Linkage of late-onset Alzheimer's disease with apolipoprotein E type 4 on chromosome 19. *Lancet Lond. Engl.* 342, 625.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 1, 213–216.
- Bristol, U. of, n.d. Bristol University | Centre for Synaptic Plasticity | Glutamate receptors [WWW Document]. URL <http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors/> (accessed 6.15.16).
- Brody, D.L., Magnoni, S., Schwetye, K.E., Spinner, M.L., Esparza, T.J., Stocchetti, N., Zipfel, G.J., Holtzman, D.M., 2008. Amyloid-beta dynamics correlate with neurological status in the injured human brain. *Science* 321, 1221–1224.
- Brown, J.T., Chin, J., Leiser, S.C., Pangalos, M.N., Randall, A.D., 2011. Altered intrinsic neuronal excitability and reduced Na⁺ currents in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32, 2109.e1-14.
- Buée, L., Bussièrè, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R., 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 95–130.

C

- Capetillo-Zarate, E., Gracia, L., Yu, F., Banfelder, J.R., Lin, M.T., Tampellini, D., Gouras, G.K., 2011. High-resolution 3D reconstruction reveals intra-synaptic amyloid fibrils. *Am. J. Pathol.* 179, 2551–2558.
- Cheng, L., Yin, W.-J., Zhang, J.-F., Qi, J.-S., 2009. Amyloid beta-protein fragments 25-35 and 31-35 potentiate long-term depression in hippocampal CA1 region of rats in vivo. *Synap. N. Y. N* 63, 206–214.
- Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J., Quintanilla-Vega, B., 2015. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 124.
- Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L., Bonuccelli, U., 2011. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 32, 275–279.
- Cirrito, J.R., Yamada, K.A., Finn, M.B., Sloviter, R.S., Bales, K.R., May, P.C., Schoepp, D.D., Paul, S.M., Mennerick, S., Holtzman, D.M., 2005. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 48, 913–922.
- Cissé, M., Halabisky, B., Harris, J., Devidze, N., Dubal, D.B., Sun, B., Orr, A., Lotz, G., Kim, D.H., Hamto, P., Ho, K., Yu, G.-Q., Mucke, L., 2011. Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature* 469, 47–52.
- Coleman, P.D., Yao, P.J., 2003. Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 1023–1027.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., McLennan, H., 1983. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 334, 33–46.
- Conn, P.J., Pin, J.-P., 1997. Pharmacology and Functions of Metabotropic Glutamate Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 205–237.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmechel, K.E., 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 7, 180–184.
- Coyle, J.T., Price, D.L., DeLong, M.R., 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219, 1184–1190.

Crimins, J.L., Pooler, A., Polydoro, M., Luebke, J.I., Spires-Jones, T.L., 2013. The intersection of amyloid β and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* 12, 757–763.

Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 327–335.

Cull-Candy, S.G., Leszkiewicz, D.N., 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl.*

Cummings, J. L., 2008. The black book of Alzheimer's disease, part 1. *Primary Psychiatry*, 15(2), 66-76.

D

Dahlgren, K.N., Manelli, A.M., Stine, W.B., Baker, L.K., Krafft, G.A., LaDu, M.J., 2002. Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- β Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *J. Biol. Chem.* 277, 32046–32053.

D'Andrea, M.R., Nagele, R.G., Wang, H.Y., Peterson, P.A., Lee, D.H., 2001. Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology* 38, 120–134.

Das, U., Scott, D.A., Ganguly, A., Koo, E.H., Tang, Y., Roy, S., 2013. Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway. *Neuron* 79, 447–460.

De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., Klein, W.L., 2007. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.* 282, 11590–11601.

De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., Kopan, R., 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518–522.

De Strooper, B., Karran, E., 2016. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164, 603–615.

- DeBoer, S.R., Dolios, G., Wang, R., Sisodia, S.S., 2014. Differential release of β -amyloid from dendrite- versus axon-targeted APP. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 12313–12327.
- Decker, H., Jürgensen, S., Adrover, M.F., Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., Klein, W.L., Epstein, A.L., De Felice, F.G., Jerusalinsky, D., Ferreira, S.T., 2010. N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- β peptide oligomers. *J. Neurochem.* 115, 1520–1529.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S.C., Parker, I., Glabe, C.G., 2005. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 280, 17294–17300.
- Dhami, G.K., Ferguson, S.S.G., 2006. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol. Ther.* 111, 260–271.
- Dinamarca, M.C., Ríos, J.A., Inestrosa, N.C., 2012. Postsynaptic Receptors for Amyloid- β Oligomers as Mediators of Neuronal Damage in Alzheimer's Disease. *Front. Physiol.* 3, 464.
- Dolan, P.J., Johnson, G.V.W., 2010. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 13, 595–603.
- Douglas, R.M., Goddard, G.V., 1975. Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. *Brain Res.* 86, 205–215.
- Dziewczapolski, G., Glogowski, C.M., Masliah, E., Heinemann, S.F., 2009. Deletion of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor gene improves cognitive deficits and synaptic pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 8805–8815.

E

- Echeverria, V., Cuervo, A.C., 2002. Intracellular A-beta amyloid, a sign for worse things to come? *Mol. Neurobiol.* 26, 299–316.
- Eslamizade, M.J., Saffarzadeh, F., Mousavi, S.M.M., Meftahi, G.H., Hosseinmardi, N., Mehdizadeh, M., Janahmadi, M., 2015. Alterations in CA1 pyramidal neuronal intrinsic excitability mediated by Ih channel currents in a rat model of amyloid beta pathology. *Neuroscience* 305, 279–292.

F

Fogel, H., Frere, S., Segev, O., Bharill, S., Shapira, I., Gazit, N., O'Malley, T., Slomowitz, E., Berdichevsky, Y., Walsh, D.M., Isacoff, E.Y., Hirsch, J.A., Slutsky, I., 2014. APP homodimers transduce an amyloid- β -mediated increase in release probability at excitatory synapses. *Cell Rep.* 7, 1560–1576.

Frandemiche, M.L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lanté, F., Buisson, A., 2014a. Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 6084–6097.

Fu, A.K.Y., Hung, K.-W., Huang, H., Gu, S., Shen, Y., Cheng, E.Y.L., Ip, F.C.F., Huang, X., Fu, W.-Y., Ip, N.Y., 2014. Blockade of EphA4 signaling ameliorates hippocampal synaptic dysfunctions in mouse models of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 9959–9964.

G

Giacobini, E., Gold, G., 2013. Alzheimer disease therapy--moving from amyloid- β to tau. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 677–686.

Glennner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1131–1135.

Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706.

Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 2003. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10417–10422.

Gouras, G.K., Almeida, C.G., Takahashi, R.H., 2005. Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 26, 1235–1244.

- Gouras, G.K., Tampellini, D., Takahashi, R.H., Capetillo-Zarate, E., 2010. Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 523–541.
- 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., Relkin, N.R., 2000. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* 156, 15–20.
- Gouras, G.K., Willén, K., Tampellini, D., 2012. Critical role of intraneuronal A β in Alzheimer's disease: technical challenges in studying intracellular A β . *Life Sci.* 91, 1153–1158.
- Greenfield, J.P., Tsai, J., Gouras, G.K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., Sisodia, S.S., Greengard, P., Xu, H., 1999. Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 742–747.
- Groc, L., Choquet, D., 2006. AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell Tissue Res.* 326, 423–438.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., George, L., Tung, Y.C., Kim, K.S., Wisniewski, H.M., 1989. Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2853–2857.
- Gu, Z., Liu, W., Yan, Z., 2009. β -Amyloid impairs AMPA receptor trafficking and function by reducing Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II synaptic distribution. *J. Biol. Chem.* 284, 10639–10649.

H

- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., Sisodia, S., 2012. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006270.
- Haass, C., Lemere, C.A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., Selkoe, D.J., 1995. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.* 1, 1291–1296.
- 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., 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322–325.

- Haass, C., Selkoe, D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.
- Hardingham, G.E., Bading, H., 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 682–696.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., Bading, H., 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* 5, 405–414.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Hashimoto, M., Bogdanovic, N., Volkman, I., Aoki, M., Winblad, B., Tjernberg, L.O., 2010. Analysis of microdissected human neurons by a sensitive ELISA reveals a correlation between elevated intracellular concentrations of Abeta42 and Alzheimer's disease neuropathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 543–554.
- Hoey, S.E., Williams, R.J., Perkinson, M.S., 2009. Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4442–4460.
- Holler, C.J., Davis, P.R., Beckett, T.L., Platt, T.L., Webb, R.L., Head, E., Murphy, M.P., 2014. Bridging integrator 1 (BIN1) protein expression increases in the Alzheimer's disease brain and correlates with neurofibrillary tangle pathology. *J. Alzheimers Dis. JAD* 42, 1221–1227.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., Malinow, R., 2006. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52, 831–843.
- Hu, X., Crick, S.L., Bu, G., Frieden, C., Pappu, R.V., Lee, J.-M., 2009. Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20324–20329.
- Huxley, A.F., 2002. Hodgkin and the action potential 1935-1952. *J. Physiol.* 538, 2.

I

- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., Saido, T.C., 2000. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* 6, 143–150.

J

- Jan, A., Gokce, O., Luthi-Carter, R., Lashuel, H.A., 2008. The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. *J. Biol. Chem.* 283, 28176–28189.
- Jarosz-Griffiths, H.H., Noble, E., Rushworth, J.V., Hooper, N.M., 2016. Amyloid- β Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein. *J. Biol. Chem.* 291, 3174–3183.
- Johnson, J.W., Ascher, P., 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529–531.
- Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R.R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O.A., Jönsson, E.G., Palotie, A., Behrens, T.W., Magnusson, O.T., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Watts, R.J., Stefansson, K., 2012. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96–99.

K

- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R., 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925–937.
- Kandel, E.R., 2001. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci. Rep.* 21, 565–611.
- Kero, M., Paetau, A., Polvikoski, T., Tanskanen, M., Sulkava, R., Jansson, L., Myllykangas, L., Tienari, P.J., 2013. Amyloid precursor protein (APP) A673T mutation in the elderly Finnish population. *Neurobiol. Aging* 34, 1518.e1-3.
- Kervern, M., Angeli, A., Nicole, O., Léveillé, F., Parent, B., Villette, V., Buisson, A., Dutar, P., 2012. Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid- β peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors. *J. Alzheimers Dis. JAD* 32, 183–196.
- Kim, J., Onstead, L., Randle, S., Price, R., Smithson, L., Zwizinski, C., Dickson, D.W., Golde, T., McGowan, E., 2007. Abeta40 inhibits amyloid deposition in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 627–633.

- Kleckner, N.W., Dingledine, R., 1988. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241, 835–837.
- Kline, A., 2012. Apolipoprotein E, amyloid- β clearance and therapeutic opportunities in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 4, 32.
- Knauer, M.F., Soreghan, B., Burdick, D., Kosmoski, J., Glabe, C.G., 1992. Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7437–7441.
- Knobloch, M., Mansuy, I.M., 2008. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 37, 73–82.
- Kounnas, M.Z., Danks, A.M., Cheng, S., Tyree, C., Ackerman, E., Zhang, X., Ahn, K., Nguyen, P., Comer, D., Mao, L., Yu, C., Pleynt, D., Digregorio, P.J., Velicelebi, G., Stauderman, K.A., Comer, W.T., Mobley, W.C., Li, Y.-M., Sisodia, S.S., Tanzi, R.E., Wagner, S.L., 2010. Modulation of gamma-secretase reduces beta-amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 67, 769–780.
- Kraemer, B.R., Snow, J.P., Vollbrecht, P., Pathak, A., Valentine, W.M., Deutch, A.Y., Carter, B.D., 2014. A Role for the p75 Neurotrophin Receptor in Axonal Degeneration and Apoptosis Induced by Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 289, 21205–21216.

L

- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Chang, L., Fernandez, S.J., Gong, Y., Viola, K.L., Lambert, M.P., Velasco, P.T., Bigio, E.H., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 2004. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10191–10200.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., Oddo, S., 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499–509.
- LaFerla, F.M., Troncoso, J.C., Strickland, D.K., Kawas, C.H., Jay, G., 1997. Neuronal cell death in Alzheimer's disease correlates with apoE uptake and intracellular A β stabilization. *J. Clin. Invest.* 100, 310–320.
- 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., Klein, W.L., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6448–6453.

- Lanté, F., de Jésus Ferreira, M.-C., Guiramand, J., Récasens, M., Vignes, M., 2006. Low-frequency stimulation induces a new form of LTP, metabotropic glutamate (mGlu5) receptor- and PKA-dependent, in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus* 16, 345–360.
- Laurén, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., Strittmatter, S.M., 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457, 1128–1132.
- Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.-P., Hairston, I.S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V.M.-Y., Hersh, L.B., Sapolsky, R.M., Mirnic, K., Sisodia, S.S., 2005. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120, 701–713.
- LeBlanc, A.C., Chen, H.Y., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., 1991. Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures. *FEBS Lett.* 292, 171–178.
- LeBlanc, A.C., Xue, R., Gambetti, P., 1996. Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia. *J. Neurochem.* 66, 2300–2310.
- Lefort, R., Pozueta, J., Shelanski, M., 2012. Cross-linking of cell surface amyloid precursor protein leads to increased β -amyloid peptide production in hippocampal neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 10674–10685.
- Léveillé, F., El Gaamouch, F., Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O., Buisson, A., 2008a. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 4258–4271.
- Li, S., Hong, S., Shepardson, N.E., Walsh, D.M., Shankar, G.M., Selkoe, D., 2009. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 62, 788–801.
- Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N.E., Shankar, G.M., Selkoe, D.J., 2011. Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 6627–6638.
- Li, S., Jin, M., Zhang, D., Yang, T., Koeglsperger, T., Fu, H., Selkoe, D.J., 2013. Environmental novelty activates β 2-adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by A β oligomers. *Neuron* 77, 929–941.

- Li, T., Wen, H., Brayton, C., Laird, F.M., Ma, G., Peng, S., Placanica, L., Wu, T.C., Crain, B.J., Price, D.L., Eberhart, C.G., Wong, P.C., 2007. Moderate reduction of gamma-secretase attenuates amyloid burden and limits mechanism-based liabilities. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 10849–10859.
- Lin, H., Arispe, N.J., 2015. Single-cell screening of cytosolic [Ca(2+)] reveals cell-selective action by the Alzheimer's A β peptide ion channel. *Cell Stress Chaperones* 20, 333–342.
- Lisman, J., Yasuda, R., Raghavachari, S., 2012. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 169–182.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Oda, Y., Tomizawa, K., Gong, C.-X., 2005. Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. *J. Biol. Chem.* 280, 37755–37762.
- Lorenzo, A., Yuan, M., Zhang, Z., Paganetti, P.A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Mautino, J., Vigo, F.S., Sommer, B., Yankner, B.A., 2000. Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 3, 460–464.
- Lüscher, C., Malenka, R.C., 2012. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.

M

- Mairet-Coello, G., Courchet, J., Pieraut, S., Courchet, V., Maximov, A., Polleux, F., 2013. The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of A β oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron* 78, 94–108.
- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Nicoll, R.A., 1989. The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission--its role in long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 12, 444–450.
- Malinow, R., Malenka, R.C., 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126.
- Maloney, M.T., Minamide, L.S., Kinley, A.W., Boyle, J.A., Bamberg, J.R., 2005. Beta-secretase-cleaved amyloid precursor protein accumulates at actin inclusions induced in neurons by stress or amyloid beta: a feedforward mechanism for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 11313–11321.

- Man, H.-Y., Wang, Q., Lu, W.-Y., Ju, W., Ahmadian, G., Liu, L., D'Souza, S., Wong, T.P., Taghibiglou, C., Lu, J., Becker, L.E., Pei, L., Liu, F., Wymann, M.P., MacDonald, J.F., Wang, Y.T., 2003. Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 38, 611–624.
- Marcantoni, A., Raymond, E.F., Carbone, E., Marie, H., 2014. Firing properties of entorhinal cortex neurons and early alterations in an Alzheimer's disease transgenic model. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 466, 1437–1450.
- Maroun, M., 2006. Stress reverses plasticity in the pathway projecting from the ventromedial prefrontal cortex to the basolateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 24, 2917–2922.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G., 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 649–711.
- Maslah, E., Crews, L., Hansen, L., 2006. Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 9, 91–99.
- Matta, J.A., Ashby, M.C., Sanz-Clemente, A., Roche, K.W., Isaac, J.T.R., 2011. mGluR5 and NMDA receptors drive the experience- and activity-dependent NMDA receptor NR2B to NR2A subunit switch. *Neuron* 70, 339–351.
- Maurer, K., Volk, S., Gerbaldo, H., 1997. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* 349, 1546–1549.
- McGeer, P.L., Rogers, J., McGeer, E.G., 2006. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: The last 12 years. *J. Alzheimers Dis. JAD* 9, 271–6.
- McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., Masters, C.L., 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46, 860–866.
- Meyer-Luehmann, M., Spires-Jones, T.L., Prada, C., Garcia-Alloza, M., de Calignon, A., Rozkalne, A., Koenigsknecht-Talboo, J., Holtzman, D.M., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451, 720–724.
- Michaelson, D.M., 2014. APOE ε4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 10, 861–868.
- Miñano-Molina, A.J., España, J., Martín, E., Barneda-Zahonero, B., Fadó, R., Solé, M., Trullás, R., Saura, C.A., Rodríguez-Alvarez, J., 2011. Soluble oligomers of amyloid-β peptide disrupt membrane trafficking of α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic

- acid receptor contributing to early synapse dysfunction. *J. Biol. Chem.* 286, 27311–27321.
- Miners, J.S., Barua, N., Kehoe, P.G., Gill, S., Love, S., 2011. A β -Degrading Enzymes: Potential for Treatment of Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 944–959.
- Moehlmann, T., Winkler, E., Xia, X., Edbauer, D., Murrell, J., Capell, A., Kaether, C., Zheng, H., Ghetti, B., Haass, C., Steiner, H., 2002. Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8025–8030.
- Mohamed, A., Posse de Chaves, E., 2011. A β internalization by neurons and glia. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011, 127984.
- Moreno, H., Yu, E., Pigino, G., Hernandez, A.I., Kim, N., Moreira, J.E., Sugimori, M., Llinás, R.R., 2009. Synaptic transmission block by presynaptic injection of oligomeric amyloid beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5901–5906.
- Mori, C., Spooner, E.T., Wisniewsk, K.E., Wisniewski, T.M., Yamaguch, H., Saido, T.C., Tolan, D.R., Selkoe, D.J., Lemere, C.A., 2002. Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* 9, 88–102.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774–776.
- Mota, S.I., Ferreira, I.L., Rego, A.C., 2014. Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease - A focus on NMDA receptors. *Neuropharmacology* 76 Pt A, 16–26.
- Mulkey, R.M., Endo, S., Shenolikar, S., Malenka, R.C., 1994. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369, 486–488.
- Musiek, E.S., Xiong, D.D., Holtzman, D.M., 2015. Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer Disease. *Exp. Mol. Med.* 47, e148.

N

- Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K.L., Davies, P., Greengard, P., Buxbaum, J.D., 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283, 1571–1577.

- Näslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A.D., Tjernberg, L.O., Silberring, J., Gandy, S.E., Winblad, B., Greengard, P., 1994. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8378–8382.
- Nathalie, P., Jean-Noël, O., 2008. Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 92–99.
- Neher, E., Sakmann, B., Steinbach, J.H., 1978. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 375, 219–228.
- Niederst, E.D., Reyna, S.M., Goldstein, L.S.B., 2015. Axonal amyloid precursor protein and its fragments undergo somatodendritic endocytosis and processing. *Mol. Biol. Cell* 26, 205–217.
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C.B., Condron, M.M., Axelman, K., Forsell, C., Sten, C., Luthman, J., Teplow, D.B., Younkin, S.G., Näslund, J., Lannfelt, L., 2001. The “Arctic” APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat. Neurosci.* 4, 887–893.
- Nimmrich, V., Grimm, C., Draguhn, A., Barghorn, S., Lehmann, A., Schoemaker, H., Hillen, H., Gross, G., Ebert, U., Bruehl, C., 2008. Amyloid β Oligomers (A β 1–42 Globulomer) Suppress Spontaneous Synaptic Activity by Inhibition of P/Q-Type Calcium Currents. *J. Neurosci.* 28, 788–797.
- Nixon, R.A., 2007. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J. Cell Sci.* 120, 4081–4091.

O

- O’Brien, R.J., Wong, P.C., 2011. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer’s Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 185–204.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer’s disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.

- Oh, W.C., Hill, T.C., Zito, K., 2013. Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E305-312.
- Ohyagi, Y., Tsuruta, Y., Motomura, K., Miyoshi, K., Kikuchi, H., Iwaki, T., Taniwaki, T., Kira, J., 2007. Intraneuronal amyloid β 42 enhanced by heating but counteracted by formic acid. *J. Neurosci. Methods* 159, 134–138.
- Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A., Hayashi, Y., 2004. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.* 7, 1104–1112.

P

- Papadia, S., Soriano, F.X., Léveillé, F., Martel, M.-A., Dakin, K.A., Hansen, H.H., Kaindl, A., Sifringer, M., Fowler, J., Stefovská, V., McKenzie, G., Craigon, M., Corriveau, R., Ghazal, P., Horsburgh, K., Yankner, B.A., Wyllie, D.J.A., Ikonomidou, C., Hardingham, G.E., 2008. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat. Neurosci.* 11, 476–487.
- Penzes, P., Vanleeuwen, J.-E., 2011. Impaired regulation of synaptic actin cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* 67, 184–192.
- Pham, E., Crews, L., Ubhi, K., Hansen, L., Adame, A., Cartier, A., Salmon, D., Galasko, D., Michael, S., Savas, J.N., Yates, J.R., Glabe, C., Masliah, E., 2010. Progressive accumulation of amyloid-beta oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J.* 277, 3051–3067.
- Pickett, E.K., Koffie, R.M., Wegmann, S., Henstridge, C.M., Herrmann, A.G., Colom-Cadena, M., Lleo, A., Kay, K.R., Vaught, M., Soberman, R., Walsh, D.M., Hyman, B.T., Spires-Jones, T.L., 2016. Non-Fibrillar Oligomeric Amyloid- β within Synapses. *J. Alzheimers Dis. JAD.*
- Pin, J.-P., Duvoisin, R., 1995. The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology* 34, 1–26.
- Podlisny, M.B., Ostaszewski, B.L., Squazzo, S.L., Koo, E.H., Rydell, R.E., Teplow, D.B., Selkoe, D.J., 1995. Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. *J. Biol. Chem.* 270, 9564–9570.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2001. Long-Term Synaptic Potentiation.

- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., Simons, K., 2006. Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11172–11177.
- Renner, M., Lacor, P.N., Velasco, P.T., Xu, J., Contractor, A., Klein, W.L., Triller, A., 2010. Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66, 739–754.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R., 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* 5, 605–607.
- Ripoli, C., Cocco, S., Li Puma, D.D., Piacentini, R., Mastrodonato, A., Scala, F., Puzzo, D., D'Ascenzo, M., Grassi, C., 2014. Intracellular accumulation of amyloid- β (A β) protein plays a major role in A β -induced alterations of glutamatergic synaptic transmission and plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 12893–12903.
- Ripoli, C., Piacentini, R., Riccardi, E., Leone, L., Li Puma, D.D., Bitan, G., Grassi, C., 2013. Effects of different amyloid β -protein analogues on synaptic function. *Neurobiol. Aging* 34, 1032–1044.
- Roberson, E.D., Sweatt, J.D., 1996. Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation. *J. Biol. Chem.* 271, 30436–30441.
- Roth, M., Tomlinson, B.E., Blessed, G., 1967. The relationship between quantitative measures of dementia and of degenerative changes in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Proc. R. Soc. Med.* 60, 254–260.
- Roth, M., Tomlinson, B.E., Blessed, G., 1966. Correlation between Scores for Dementia and Counts of "Senile Plaques" in Cerebral Grey Matter of Elderly Subjects. *Nature* 209, 109–110.

S

- Sannerud, R., Declerck, I., Peric, A., Raemaekers, T., Menendez, G., Zhou, L., Veerle, B., Coen, K., Munck, S., De Strooper, B., Schiavo, G., Annaert, W., 2011. ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E559-568.

- Sannerud, R., Esselens, C., Ejsmont, P., Mattera, R., Rochin, L., Tharkeshwar, A.K., De Baets, G., De Wever, V., Habets, R., Baert, V., Vermeire, W., Michiels, C., Groot, A.J., Wouters, R., Dillen, K., Vints, K., Baatsen, P., Munck, S., Derua, R., Waelkens, E., Basi, G.S., Mercken, M., Vooijs, M., Bollen, M., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Bonifacino, J.S., Van Niel, G., De Strooper, B., Annaert, W., 2016. Restricted Location of PSEN2/ γ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A β Pool. *Cell*.
- Selkoe, D.J., 2011. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat. Med.* 17, 1060–1065.
- Selkoe, D.J., 2008. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav. Brain Res.* 192, 106–113.
- Selkoe, D.J., 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789–791.
- Selkoe, D.J., 1997. Images in neuroscience. Alzheimer's disease: from genes to pathogenesis. *Am. J. Psychiatry* 154, 1198.
- Selkoe, D.J., 1994. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 489–517.
- Selkoe, D.J., Hardy, J., 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595–608.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325–327.
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P.H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O'Gorman, J., Qian, F., Arastu, M., Li, M., Chollate, S., Brennan, M.S., Quintero-Monzon, O., Scannevin, R.H., Arnold, H.M., Engber, T., Rhodes, K., Ferrero, J., Hang, Y., Mikulskis, A., Grimm, J., Hock, C., Nitsch, R.M., Sandrock, A., 2016. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537, 50–56.
- Sgourakis, N.G., Yan, Y., McCallum, S., Wang, C., Garcia, A.E., 2007. The Alzheimer's peptides A β 40 and 42 adopt distinct conformations in water: A combined MD / NMR study. *J. Mol. Biol.* 368, 1448–1457.
- Shaked, G.M., Kummer, M.P., Lu, D.C., Galvan, V., Bredesen, D.E., Koo, E.H., 2006. A β induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624). *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1254–1256.

- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Sabatini, B.L., 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2866–2875.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J., 2008. Amyloid β -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat. Med.* 14, 837–842.
- Shankar, G.M., Walsh, D.M., 2009. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β . *Mol. Neurodegener.* 4, 48.
- Sheng, J.G., Bora, S.H., Xu, G., Borchelt, D.R., Price, D.L., Koliatsos, V.E., 2003. Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APPswe transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 14, 133–145.
- Sheng, M., Kim, M.J., 2002. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298, 776–780.
- Skovronsky, D.M., Doms, R.W., Lee, V.M., 1998. Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid beta protein that accumulates with time in culture. *J. Cell Biol.* 141, 1031–1039.
- Smith, M.A., Siedlak, S.L., Richey, P.L., Nagaraj, R.H., Elhammer, A., Perry, G., 1996. Quantitative solubilization and analysis of insoluble paired helical filaments from Alzheimer disease. *Brain Res.* 717, 99–108.
- 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., Greengard, P., 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat. Neurosci.* 8, 1051–1058.
- Snyder, S.W., Ladror, U.S., Wade, W.S., Wang, G.T., Barrett, L.W., Matayoshi, E.D., Huffaker, H.J., Krafft, G.A., Holzman, T.F., 1994. Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophys. J.* 67, 1216–1228.
- Spooren, W.P., Gasparini, F., Salt, T.E., Kuhn, R., 2001. Novel allosteric antagonists shed light on mglu(5) receptors and CNS disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 331–337.

Stern, Y., 2012. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 11, 1006–1012.

Stine, W.B., Dahlgren, K.N., Krafft, G.A., LaDu, M.J., 2003. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 11612–11622.

Streltsov, V.A., Varghese, J.N., Masters, C.L., Nuttall, S.D., 2011. Crystal structure of the amyloid- β p3 fragment provides a model for oligomer formation in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 1419–1426.

Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D., Roses, A.D., 1993. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8098–8102.

T

Tabira, T., Chui, D.H., Kuroda, S., 2002. Significance of intracellular Abeta42 accumulation in Alzheimer's disease. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 7, a44-49.

Tai, L.M., Bilousova, T., Jungbauer, L., Roeske, S.K., Youmans, K.L., Yu, C., Poon, W.W., Cornwell, L.B., Miller, C.A., Vinters, H.V., Van Eldik, L.J., Fardo, D.W., Estus, S., Bu, G., Gylys, K.H., Ladu, M.J., 2013. Levels of soluble apolipoprotein E/amyloid- β (A β) complex are reduced and oligomeric A β increased with APOE4 and Alzheimer disease in a transgenic mouse model and human samples. *J. Biol. Chem.* 288, 5914–5926.

Takahashi, R.H., Almeida, C.G., Kearney, P.F., Yu, F., Lin, M.T., Milner, T.A., Gouras, G.K., 2004. Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 3592–3599.

Takahashi, R.H., Milner, T.A., Li, F., Nam, E.E., Edgar, M.A., Yamaguchi, H., Beal, M.F., Xu, H., Greengard, P., Gouras, G.K., 2002. Intraneuronal Alzheimer A β 42 Accumulates in Multivesicular Bodies and Is Associated with Synaptic Pathology. *Am. J. Pathol.* 161, 1869–1879.

- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., Iwatsubo, T., 2003. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438–441.
- Tamagnini, F., Novelia, J., Kerrigan, T.L., Brown, J.T., Tsaneva-Atanasova, K., Randall, A.D., 2015. Altered intrinsic excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons in aged PDAPP mice. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 372.
- Tampellini, D., Magrané, J., Takahashi, R.H., Li, F., Lin, M.T., Almeida, C.G., Gouras, G.K., 2007. Internalized antibodies to the Abeta domain of APP reduce neuronal Abeta and protect against synaptic alterations. *J. Biol. Chem.* 282, 18895–18906.
- Tampellini, D., Rahman, N., Gallo, E.F., Huang, Z., Dumont, M., Capetillo-Zarate, E., Ma, T., Zheng, R., Lu, B., Nanus, D.M., Lin, M.T., Gouras, G.K., 2009. Synaptic activity reduces intraneuronal Abeta, promotes APP transport to synapses, and protects against Abeta-related synaptic alterations. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 9704–9713.
- Tampellini, D., Rahman, N., Lin, M.T., Capetillo-Zarate, E., Gouras, G.K., 2011. Impaired β -amyloid secretion in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 15384–15390.
- Thornton, C., Bright, N.J., Sastre, M., Muckett, P.J., Carling, D., 2011. AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid β -peptide exposure. *Biochem. J.* 434, 503–512.
- Ting, J.T., Kelley, B.G., Lambert, T.J., Cook, D.G., Sullivan, J.M., 2007. Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 353–358.
- Tomiyama, T., Matsuyama, S., Iso, H., Umeda, T., Takuma, H., Ohnishi, K., Ishibashi, K., Teraoka, R., Sakama, N., Yamashita, T., Nishitsuji, K., Ito, K., Shimada, H., Lambert, M.P., Klein, W.L., Mori, H., 2010. A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 4845–4856.
- Tomiyama, T., Nagata, T., Shimada, H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., Takuma, H., Kuwano, R., Imagawa, M., Ataka, S., Wada, Y., Yoshioka, E., Nishizaki, T., Watanabe, Y., Mori, H., 2008. A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann. Neurol.* 63, 377–387.

Tomlinson, B.E., Blessed, G., Roth, M., 1970. Observations on the brains of demented old people. *J. Neurol. Sci.* 11, 205–242.

Tozaki, H., Matsumoto, A., Kanno, T., Nagai, K., Nagata, T., Yamamoto, S., Nishizaki, T., 2002. The inhibitory and facilitatory actions of amyloid-beta peptides on nicotinic ACh receptors and AMPA receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 42–45.

Tu, S., Okamoto, S., Lipton, S.A., Xu, H., 2014. Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 9.

U

Umeda, T., Ramser, E.M., Yamashita, M., Nakajima, K., Mori, H., Silverman, M.A., Tomiyama, T., 2015. Intracellular amyloid β oligomers impair organelle transport and induce dendritic spine loss in primary neurons. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 51.

V

van der Kant, R., Goldstein, L.S.B., 2015. Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev. Cell* 32, 502–515.

van Duijn, C.M., de Knijff, P., Cruts, M., Wehnert, A., Havekes, L.M., Hofman, A., Van Broeckhoven, C., 1994. Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 7, 74–78.

Varga, E., Juhász, G., Bozsó, Z., Penke, B., Fülöp, L., Szegedi, V., 2015. Amyloid- β 1-42 Disrupts Synaptic Plasticity by Altering Glutamate Recycling at the Synapse. *J. Alzheimers Dis. JAD* 45, 449–456.

Vargas, L.M., Leal, N., Estrada, L.D., González, A., Serrano, F., Araya, K., Gysling, K., Inestrosa, N.C., Pasquale, E.B., Alvarez, A.R., 2014. EphA4 activation of c-Abl mediates synaptic loss and LTP blockade caused by amyloid- β oligomers. *PLoS One* 9, e92309.

W

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.

- Walsh, D.M., Tseng, B.P., Rydel, R.E., Podlisny, M.B., Selkoe, D.J., 2000. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 10831–10839.
- Wang, D., Govindaiah, G., Liu, R., De Arcangelis, V., Cox, C.L., Xiang, Y.K., 2010. Binding of amyloid beta peptide to beta2 adrenergic receptor induces PKA-dependent AMPA receptor hyperactivity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 3511–3521.
- Wang, H.Y., Lee, D.H., D’Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., Reitz, A.B., 2000. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer’s disease pathology. *J. Biol. Chem.* 275, 5626–5632.
- Whitcomb, D.J., Hogg, E.L., Regan, P., Piers, T., Narayan, P., Whitehead, G., Winters, B.L., Kim, D.-H., Kim, E., St George-Hyslop, P., Klenerman, D., Collingridge, G.L., Jo, J., Cho, K., 2015. Intracellular oligomeric amyloid-beta rapidly regulates GluA1 subunit of AMPA receptor in the hippocampus. *Sci. Rep.* 5, 10934.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F., 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093–1097.
- Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M.A., Ovsepian, S.V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L.D.B., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher, B., Wenninger-Weinzierl, A., Kremmer, E., Heneka, M.T., Thal, D.R., Giedraitis, V., Lannfelt, L., Müller, U., Livesey, F.J., Meissner, F., Herms, J., Konnerth, A., Marie, H., Haass, C., 2015. η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* 526, 443–447.
- Wirhth, O., Bayer, T.A., 2010. Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer’s disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2010.

X

- Xia, P., Chen, H.-S.-V., Zhang, D., Lipton, S.A., 2010. Memantine Preferentially Blocks Extrasynaptic Over Synaptic NMDA Receptor Currents in Hippocampal Autapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 11246–11250.
- Xin, W.-J., Gong, Q.-J., Xu, J.-T., Yang, H.-W., Zang, Y., Zhang, T., Li, Y.-Y., Liu, X.-G., 2006. Role of phosphorylation of ERK in induction and maintenance of LTP of the C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn. *J. Neurosci. Res.* 84, 934–943.

Xu, H., Sweeney, D., Wang, R., Thinakaran, G., Lo, A.C., Sisodia, S.S., Greengard, P., Gandy, S., 1997. Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3748–3752.

Y

Yang, A.J., Chandswangbhuvana, D., Shu, T., Henschen, A., Glabe, C.G., 1999. Intracellular accumulation of insoluble, newly synthesized abeta-42 in amyloid precursor protein-transfected cells that have been treated with Abeta1-42. *J. Biol. Chem.* 274, 20650–20656.

Z

Zagorski, M.G., Barrow, C.J., 1992. NMR studies of amyloid beta-peptides: proton assignments, secondary structure, and mechanism of an alpha-helix----beta-sheet conversion for a homologous, 28-residue, N-terminal fragment. *Biochemistry (Mosc.)* 31, 5621–5631.

Zhang, Y., Li, P., Feng, J., Wu, M., 2016. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.*

Zhao, W.-Q., Santini, F., Breese, R., Ross, D., Zhang, X.D., Stone, D.J., Ferrer, M., Townsend, M., Wolfe, A.L., Seager, M.A., Kinney, G.G., Shughrue, P.J., Ray, W.J., 2010. Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *J. Biol. Chem.* 285, 7619–7632.

Zheng, L., Calvo-Garrido, J., Hallbeck, M., Hultenby, K., Marcusson, J., Cedazo-Minguez, A., Terman, A., 2013. Intracellular localization of amyloid- β peptide in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Alzheimers Dis. JAD* 37, 713–733.

Zhou, Q., Sheng, M., 2013. NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology, Glutamate Receptor-Dependent Synaptic Plasticity* 74, 69–75.

Zhu, L.-Q., Wang, S.-H., Liu, D., Yin, Y.-Y., Tian, Q., Wang, X.-C., Wang, Q., Chen, J.-G., Wang, J.-Z., 2007. Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 12211–12220.