HAL
open science

Caractérisation des effets protecteurs du NAD+ et du Nicotinamide Riboside lors de la dégénérescence axonale dans le système nerveux central : Implications dans les processus neurodégénératifs

Pauline Magda Marie Vaur

To cite this version:

Pauline Magda Marie Vaur. Caractérisation des effets protecteurs du NAD+ et du Nicotinamide Riboside lors de la dégénérescence axonale dans le système nerveux central : Implications dans les processus neurodégénératifs. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066594 . tel-01889321

HAL Id: tel-01889321

https://theses.hal.science/tel-01889321

Submitted on 6 Oct 2018

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Cerveau, Cognition et Comportement

Laboratoire « Biological Adaptation & Aging », CNRS UMR 8256 UPMC

Equipe « Degenerative Processes in Neurons & Networks »

Caractérisation des effets protecteurs du NAD^+ et du Nicotinamide Riboside lors de la dégénérescence axonale dans le système nerveux central : Implications dans les processus neurodégénératifs

Pauline Vaur

Thèse de doctorat en **Neurosciences**

Dirigée par le Dr Bernard Brugg et co-encadrée par le Dr Eric Duplus

Présentée et soutenue publiquement le 04 octobre 2016

Devant un jury composé de :

Mme le Dr Isabelle Dusart	*Présidente du jury*
M. le Dr Emmanuel Brouillet	*Rapporteur*
M. le Dr Alain Buisson	*Rapporteur*
Mme le Dr GuilanVodjdani	*Examinatrice*
M. le Dr Bernard Brugg	*Examinateur*
M. le Dr Eric Duplus	*Examinateur*

RESUME

Les maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington se caractérisent par une déconnexion synaptique et une dégénérescence des axones précoces, menant à la mort spécifique d'une population neuronale. Les niveaux intracellulaires de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+), co-facteur essentiel dans le fonctionnement cellulaire et dans le maintien de l'intégrité de l'axone, sont fortement diminués lors de ces pathologies et l'augmentation des taux de NAD^+ *via* l'utilisation de précurseurs de biosynthèse est ainsi une stratégie thérapeutique dans la prévention de ces maladies. Parmi ces précurseurs, le nicotinamide riboside (NR) semble être un bon candidat comme le suggère sa capacité à retarder la dégénérescence axonale dans le système nerveux périphérique (SNP). De plus, une voie extracellulaire, suggérant la conversion du NAD^+ en NR nécessaire à son effet sur les cellules, a récemment été mise en évidence dans des lignées cellulaires et dans le SNP. L'objectif de mon projet de thèse a donc été d'étudier et de comparer les effets du NAD^+ et du NR et de décrire leur métabolisme dans un modèle de dégénérescence axonale dans le système nerveux central (SNC).

Pour cela, un modèle de stress excitotoxique a été mis au point sur des neurones corticaux mis en culture dans des dispositifs microfluidiques afin d'étudier les effets du NAD^+ et de ses précurseurs sur la mort neuronale et la dégénérescence des axones. Pour la première fois, nous montrons que le NR protège de la dégénérescence axonale dans des neurones issus du SNC, de manière plus efficace que le NAD^+. L'effet différentiel de ces deux métabolites a également été confirmé dans un modèle d'excitotoxicité *in vivo.* Le NR permet une augmentation intracellulaire des taux de NAD^+, suggérant ainsi que l'intégrité axonale est entièrement dépendante de ce co-facteur.

Les effets du NAD^+ et du NR ont ensuite été caractérisés dans un modèle de neurodégénérescence induite par une déplétion aigüe en NAD^+. De manière surprenante, nous montrons un effet protecteur total à la fois du NAD^+ et du NR, suggérant une adaptation du métabolisme du NAD^+ dans ce paradigme, notamment sa conversion en NR. Nous avons ainsi analysé la pertinence de cette voie de conversion extracellulaire à l'aide de plusieurs agents pharmacologiques : celle-ci semble limitée lors d'un stress excitotoxique mais complète lors d'une déplétion totale en NAD^+. Nos résultats démontrent donc une métabolisation extracellulaire du NAD^+ dépendante du paradigme neurotoxique.

En conclusion, ce travail démontre un fort potentiel protecteur du NR dans le SNC et ouvre de nouvelles voies thérapeutiques dans la prévention des processus neurodégénératifs.

ABSTRACT

Synaptic and axonal degeneration (AD) are major events in neurodegenerative diseases. Furthermore, levels of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), an important coenzyme for axonal integrity, are strongly reduced in different degeneration models. Enhancing cellular NAD^+ synthesis by addition of biosynthesis precursors is one of the numerous therapeutic strategies against neuronal pathologies. Among these precursors, nicotinamide riboside (NR) is a good candidate as it has already been shown to delay AD in peripheral nervous system (PNS). Moreover, it was previously described in cell lines and in PNS that NAD^+ is metabolized to NR via an extracellular pathway before entering into the cell. During my thesis project, we analyzed the role of NR metabolism to prevent degeneration processes in the central nervous system.

We used a NMDA-induced excitotoxicity model in primary cortical neurons cultured in microfluidic devices to explore NAD^+ and NR effects on neuronal death and AD. For the first time, we showed that both NAD^+ and NR reduce NMDA-induced AD. NR protective effect is more potent than NAD^+ and mainly restricted to the axonal compartment. We confirm differential effect of these two metabolites in an *in vivo* ischemic model. Moreover, we showed that NMDA-induced intracellular NAD^+ depletion is reverted after NR application, suggesting that axonal integrity is totally dependent on NAD^+ local metabolism.

Moreover, characterization of NR and NAD^+ effects has been performed in a complete NAD^+ depletion paradigm. Surprisingly, NAD^+ and NR have the same strong effect in this model, protecting equally neuronal death and axonal degeneration. These results suggest an adaptation of NAD^+ metabolism in this paradigm, possibly through NAD^+ conversion to NR. We next examine this extracellular pathway on cortical neurons using different pharmacological inhibitors and found that extracellular NAD^+ conversion to NR seems limited in the excitotoxic paradigm but effective in the NAD^+ depletion paradigm. These results suggest that NR and NAD^+ metabolism depend on the neurotoxic paradigm.

Our results demonstrate for the first time that NR has a strong and local neuro-protective effect on AD in several neurotoxic paradigms. These findings open new therapeutic strategies to prevent neurodegenerative diseases.

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu le Dr. Emmanuel Brouillet et le Pr. Alain Buisson d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de doctorat. J'ai conscience du temps et de l'implication que cela peut demander et je vous remercie sincèrement de l'intérêt que vous portez à mon projet. Je souhaite également remercier chaleureusement le Dr. Guilan Vodjdani et le Dr. Isabelle Dusart pour prendre part à mon jury de thèse en tant qu'examinatrices. Guilan, j'en profite pour te remercier de ton implication dans le suivi de ma thèse pendant ces trois ans. Merci pour tes précieux conseils, tes encouragements et ta gentillesse. J'ai apprécié les échanges que l'on a pu avoir sur mon travail à chaque comité de suivi: c'est de bonne augure pour le jour de la soutenance. Isabelle, merci de me faire l'honneur de présider mon jury de soutenance. Pendant ces trois années au B6, j'ai pu apprécier tes qualités humaines autant que scientifiques.

Bien évidemment, je remercie Bernard Brugg, mon directeur de thèse. Bernard, merci de m'avoir accueillie au sein de ton équipe il y a quasiment quatre ans. Merci pour la confiance que tu m'as tout de suite accordée, bien que venant d'un autre parcours. Tout au long de mon travail de thèse, j'ai eu la chance de bénéficier d'un double encadrement. Si Eric a plus géré l'avancée du projet au jour le jour, tu étais cependant toujours présent pour apporter ton regard scientifique lors de nos (nombreuses !) réunions. Merci pour ton aide pour l'écriture de l'article et la correction de ce manuscrit. Je finirais ce petit paragraphe par te dire un grand merci pour tes qualités humaines. Si l'aspect scientifique est bien évidemment primordial au travail de thèse, je suis aujourd'hui convaincue que l'aspect humain n'en est pas moins important. Je te remercie donc pour ton humour, ta gentillesse et pour m'avoir toujours soutenue lors des moments importants de ma thèse. Tu m'as permis de travailler sereinement, de manière autonome, tout en restant disponible. Enfin, merci pour ton optimisme et tes nombreux encouragements qui m'ont donnés la confiance de continuer et de persévérer !

Merci à Eric Duplus, co-encadrant de ce travail et je dirais même plus directeur officieux de cette thèse. Eric, merci pour tout. Tu m'as accueillie il y a quatre ans alors que mes connaissances en biologie étaient limitées, que mon projet professionnel n'était pas fixé. Et pourtant, malgré cela, tu as cru en moi. Tu m'a accompagné pendant les six mois de stage du master, tu m'as mené jusqu'au concours de l'école doctorale et tu m'as donnée l'envie de poursuivre l'aventure. Ce n'était pas gagné et j'espère aujourd'hui que tu ne regrettes pas le pari. Je te remercie sincèrement pour ton encadrement pendant ces quatre années. Merci pour nos échanges scientifiques, nos réunions sans fin sur les voies du métabolisme du NAD^+ et pour tes corrections sur le manuscrit. J'ai parlé de qualités humaines dans

le paragraphe précédent et je réitère mes propos à ton sujet. Les relations encadrants/doctorants peuvent s'avérer conflictuelles mais ton écoute et ta disponibilité nous ont permis de conserver une relation « paisible », basé sur une communication saine et des échanges sincères. Tout au long de ce projet, j'ai pu profiter de tes talents de pédagogues pour assimiler (en partie) les notions scientifiques qui me manquaient. Sous ton encadrement, j'ai pu évoluer, devenir de plus en plus autonome sur l'organisation des expériences et de plus en plus confiante dans mes résultats. Ces trois années de doctorat m'ont énormément appris et vont rester gravées dans ma mémoire. C'est essentiellement grâce à toi et je t'en remercie sincèrement.

Je tiens à remercie Jean-Michel Peyrin et Etienne Jacotot pour leur implication dans la direction de l'équipe DP2N.

Jean-Michel, je te remercie pour ton regard sur mon travail, pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir et pour ton expertise en microfluidique dont tu m'as fait profité à mon arrivée dans l'équipe.

Etienne, merci pour l'intérêt scientifique que tu portes à mon projet, en particulier sur les mécanismes de mort (!). Merci pour tes conseils, pour ta disponibilité et pour tes encouragements. En écrivant ces remerciements, je me souviens d'une discussion que nous avons eu il y a trois ans, quasi jour pour jour, où tu m'as convaincue de ma capacité à obtenir une bourse de thèse et à mener ce projet qui m'attendait. Aujourd'hui, on peut le dire, tu avais vu juste. Merci pour cela.

Je remercie sincèrement l'équipe du Dr. Mathias Mericksay et du Dr. Zhenlin Li pour leur collaboration (B2A, UMR8256). Mathias, merci pour ton regard critique et tes nombreux conseils vis à vis de mon projet depuis le tout début. Zhenlin, je te remercie tout particulièrement pour la gestion des souris KO Nrk2.

Je remercie également l'équipe du Pr. Denis Vivien (Cycéron, Inserm U919), en particulier Cyrille Orset et Anthony Levilly, pour leur collaboration sur le travail *in vivo* effectué pendant mon doctorat.

Je tiens à remercier le Dr. Bertrand Friguet de m'avoir accueillie au sein du laboratoire B2A. Merci à toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de croiser dans les couloirs des bâtiments A, B et C et avec qui j'ai pu échanger, travailler ou discuter. En particulier, je remercie le 6ème étage et l'ensemble des équipes Trembleau, P. Vincent et Néri.

Mentions spéciales :

- Coralie : merci pour ton investissement dans l'organisation du B6 et en particulier dans la gestion des salles de cultures. Grâce à toi, nos conditions de travail sont supportables ! Merci également pour tous tes conseils pendant ces trois années et pour toujours trouver du temps

pour m'aider et répondre à mes questions ! Enfin, merci pour ta bonne humeur et ton dynamisme. Tu fais partie des personnes qui ont marquées mon passage à Jussieu.

- Francesca et Lucie : merci pour tous les repas que nous avons pu partager, pour nos échanges sur les plats picards (!) et pour nos discussions diverses et variées. Merci également pour vos conseils en bio mol.
- Maryse : merci de t'être occupée de notre gestion des cônes et eppendorfs, mais surtout merci pour ta gentillesse et pour ton sourire ! Tu as été la première personne à me dire bonjour le matin pendant ces 3 ans, à me demander comment ça allait. Je t'en remercie sincèrement.

Je tiens également à remercier les gestionnaires : Florence Ladouce, Caroline Chapelet et Philippe Leballeur. Merci pour votre disponibilité et votre réactivité pour la gestion des commandes. Je remercie également toutes les personnes participant à l'entretien du bâtiment et qui nous permettent de travailler dans des meilleures conditions.

Benjamin… Par où commencer… je pourrais écrire des lignes et des lignes pour te dire merci mais mon manuscrit est déjà assez long alors je vais essayer de faire preuve d'esprit de synthèse (une des compétences transversales que l'on apprend pendant la thèse, soit dit en passant !). Merci pour ton soutien pendant toute ma thèse. Merci pour tes conseils. Merci pour ton aide pour les manips, pour l'analyse des résultats, pour l'utilisation de logiciels, pour l'entretien de la salle microflu, pour la gestion des stocks du laboratoire, pour les bons de commandes… Merci pour prendre le temps de me répondre dès que j'ai une question, même lorsque celle-ci s'avère être terriblement stupide et merci de ne presque pas te moquer de moi quand cela arrive ! Merci pour les immunos en face à face, les dissections en parallèle, les ensemencements en commun… Merci pour les fous rires, pour les craquages en L1 (hum… it's pas propre !)…Un immense merci pour les Benjaminades ! Merci de m'avoir supporté et d'avoir partagé notre bureau pendant ces quatre années et j'ai conscience que ce n'était pas toujours facile ! Merci pour ton écoute, pour m'avoir soutenue dans les moments de stress. Merci pour les poposes, sur la passerelle, à « les sciences », à l'institut… Merci pour tous ces moments d'échanges qui ont ponctués nos thèses et enfin merci de finir après moi ! (ahah… j'ai pas pu résister…)

Philippe, merci d'avoir toujours répondu à toutes mes questions (et il y en a eu !), que ce soit à propos d'immuno, sur l'utilisation du microscope, pour m'aider à mettre au point des macros sur image J, pour me conseiller sur des protocoles de biomol ou de westerns et sur la recette des macarons (hum… cherchez l'intrus..). Merci pour ta gentillesse et ta générosité. C'était un plaisir de travailler à tes cotés pendant ces trois années et de discuter voyages, cuisine et piano ! On est arrivé en même temps dans l'équipe et nos chemins se séparent dans quelques semaines alors je profite de ces

remerciements pour te souhaiter bonne continuation ! Je n'oublierais jamais les macarons caramel au romarin !

Josquin, merci pour ta bonne humeur ! Elle se propage à toute l'équipe (un peu comme les prions !). C'était vraiment un plaisir de travailler à tes cotés, de parler sciences mais pas que ! Merci pour le tic de langage que tu m'as passé … hum… Excellent ! Bonne continuation pour la suite de ta thèse !

Elodie, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton dynamisme ! Tu commences ta thèse alors que je finis la mienne et on a eu peu d'occasions de travailler ensemble mais j'espère qu'on pourra continuer à se voir en dehors du labo après mon départ. Ton accent du sud me manque déjà !

Gullen, merci pour ta gentillesse et pour toutes les puces que j'ai pu récupérer grâce à toi ! Merci pour ton calme et ta bonne humeur qui participe à la bonne entente au sein du labo !

Ségolène, merci pour ton dynamisme et ta bonne humeur. Merci de me donner le sourire dès que je te croise dans le couloir et merci de m'avoir nourrie le mois où on a partagé notre bureau ! Je dirais qu'un mot : « tu gères la fougères ! »

Vanessa, thank you so much for your kindness, your enthousiasm and your joy. It was always a pleasure to work with you, to share discussions during the dissections... It is really important to have somebody like you in a team, always positive and so thoughtful !

Enfin, un grand merci à Maxime qui a pris la suite de mon projet pendant son stage de M2 (NAD TEAM !). Merci pour ton aide pendant ces six derniers mois, pour avoir fixer mes cellules, avoir changer des milieux quand je n'avais pas le temps. Merci de m'avoir supporté et surtout désolé de ne pas avoir été aussi présente et disponible que je l'aurais souhaité pendant ton stage. Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur et mes craquages ! Je te souhaite bonne continuation !

Jessica, merci pour tous les moments que l'on a partagé pendant ces trois ans. Tu as toujours été disponible pour discuter autour d'un café ou d'un verre, pour parler de nos problèmes de manips, de l'avancée de nos projets et de tout le reste ! C'est simple, j'ai du mal à imaginer ce qu'aurait été cette dernière année de thèse sans toi ! On peut le dire on s'est soutenue de manière réciproque ces derniers mois et je te remercie sincèrement pour ça.

Après Jessica, Julie *of course* ! Merci pour les deux ans et demi où l'on a partagé un bureau, des manips, des discussions sur nos projets et sur pleins d'autres choses. Je me souviens d'un inventaire de labo (particulièrement peu efficace…), de nos premières dissections Cx-Hippo, d'une matinée montage de meubles Ikea, de laver des dizaines et des dizaines de plateaux, et bien évidemment des nombreuses pauses (dis, j'ai le temps d'en fumer une autre ?!), et de toutes nos soirées « out of office », à papoter des heures durant sans voir le temps filer ! Tu as été une personne décisive dans mon choix de poursuivre en thèse et je te remercie vivement pour ton soutien tout au long de ces trois ans!

Bérangère, merci pour m'avoir initié au monde de la microflu ! Merci pour ton aide et tes conseils lorsque j'étais en stage. Tu m'as tout de suite intégré dans l'équipe à mon arrivée, merci beaucoup pour cet accueil ! La volonté, le dynamisme, la persévérance (et la folie ?!) dont tu as fait preuve pendant les derniers mois de ta thèse sont une inspiration pour moi en ce moment !

Merci à mes 4 grosses ! Cela fait 7 ans (ahhhh… c'est que ça ne nous rajeunit pas…) que je partage tout avec vous. Notre amitié est vitale pour moi et a été particulièrement importante pendant ces trois années de thèse.

- Claire : Merci de ne pas me faire rire à tes blagues ! Bien que tu ne sois pas à Paris (ahhh… la province !), merci pour tous nos échanges pendant ces trois ans. Merci de rester toujours la même (mon petit comique de répétition…). Merci pour les nombreuses fois où tu m'as accueillie à Gre et qui m'ont permis de m'évader de la vie parisienne et de prendre l'air de la montagne !
- Marine : Merci de me supporter depuis 2…(wait for it…)…4 ans, 24 ans !!!! Honnêtement, comment tu fais ?? Merci pour ton soutien pendant toutes ces années ! Depuis la maternelle jusqu'à PC, en passant par la prépa, tu n'as jamais été loin… Ta force et ta volonté sans faille ont été des exemples pour moi tout ce temps et je ne serais certainement pas arrivée jusque là sans toi à mes cotés pour me motiver et m'encourager! Merci pour tous nos moments partagés…nos années de bibi, nos années en coloc, nos voyages à l'autre bout du monde, nos multiples soirées… ! Merci de rire à mes blagues, de m'écouter, de me conseiller ! Merci d'être là tout simplement !
- Maya : Je crois que tu es celle qui a été la plus proche des aléas de ma vie de thésarde ! Merci pour toutes nos soirées « thèses »/ télé/ tisane/ plaid en hiver et quais/ bières/ houmous en été ! Merci d'être toujours disponible pour m'écouter, me conseiller ! Merci pour les années de coloc ! Merci pour ton soutien dans les moments de doutes et d'angoisses ! et surtout merci pour tous les moments festifs ! … On est vraiment the cream of the cream !
- Perrine (ma préférée…) : tu as été la plus loin pendant ces trois ans et pourtant, nous sommes toujours aussi proches ! On partage les joies et les frustrations des thésardes en biologie mais également nos exploits en tricot (chut…) et nos rêves de voyages ! Merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme qui sont tellement contagieux ! Merci de m'avoir fait découvrir l'Asie, de m'avoir accueillie à Singapour et à London *of course*.

Merci aux PCéens Célia, François et Pascaline pour tous les moments que l'on a partagé à PC et toutes les soirées où on a pu échanger sur nos vies de thésards !

Merci à Pierre et Lucile pour votre disponibilité, pour toujours proposer des sorties/ soirées et pour votre gentillesse et votre générosité ! Vous êtes géniaux !

Merci à Antoine, mon coloc ! Merci de m'avoir supporté pendant ces quasi deux ans de vie commune. Merci d'être aussi facile à vivre ! Merci pour ta gentillesse et pour m'avoir fait découvrir l'univers des jeux de société ! (Attention, j'ai dit découvrir… pas aimer… nuances !). Merci à Alexis avec qui nous formons un tout nouveau trio de coloc !

Merci aux filles du cours Pasteur ! Marie, Mérie et Léa, merci pour toutes les soirées que l'on a passé depuis quatre ans, à discuter de nos thèses, de nos projets, de nos vies !

Merci à Clémentine et Agathe pour tous les moments partagés depuis le lycée ! On ne se voit pas aussi souvent qu'on le souhaiterait mais vous faites partie des personnes qui comptent énormément pour moi…

Je finis ces remerciements par ma famille.

J'ai tout d'abord une pensée pour mes grands parents.

A Méno, pour ton esprit scientifique, curieux et ton ouverture d'esprit qui ont toujours été une source d'inspiration pour moi !

A Mamie Odette, merci pour ta gentillesse et tes encouragements depuis toujours. Ta force, ta volonté, ta générosité et ton abnégation sont pour moi un véritable exemple. Tu me donnes envie de me surpasser, de ne jamais me laisser abattre… Selon moi, « faire sa mamie Odette » est le plus beau des compliments.

A mon frère, pas finaud mais si beau … (et oui, comme on dit, œil pour œil, dent pour dent et remerciement pour remerciement !). Une année après toi, c'est à mon tour de soutenir ma thèse. Promis, après, j'arrête de faire tout comme toi ! Mais c'est comme ça, tu es mon grand frère, mon modèle, mon repère ! Merci d'être toujours là pour moi, de me soutenir et de me faire rire!

A Pauline, pour ta gentillesse à mon égard et tout nos centres d'intérêt en communs ! Pour moi, tu fais déjà partie de la famille depuis longtemps ! (Ce sera officiel dans quelques semaines … Youpiii !).

Merci à vous deux de m'avoir accueillie de nombreuses fois en Bretagne pendant ses trois ans de thèse et de m'avoir changé les idées à de nombreuses reprises !!

Merci à mes parents. Vous m'avez soutenue depuis toujours. Vous m'aidez à avancer. Vous êtes toujours là pour me relever quand je tombe. Vous me donnez la force de continuer. Je n'en serais

pas là sans vous. Je vous dois tout. Merci !

Maman, merci pour ta disponibilité depuis toujours, pour tous les moments partagés. J'admire ton sens de la communication, ta gentillesse, ton empathie. Tu as toujours tout fait pour que ma vie soit la plus facile et je n'aurais jamais pu arriver jusque là sans toi.

Papa, merci pour ton soutien infaillible. Je tiens de toi un certain nombre de traits de caractères qui se sont particulièrement révélés pendant cette thèse… un sens de l'anticipation, de l'organisation, un dynamisme (mouvements perpétuels ?!)… Merci pour tes encouragements et de toujours croire en moi.

Merci à vous deux pour votre générosité et votre aide en cette fin de rédaction de manuscrit. Vous avez supporté mes moments de stress, de frustration et de colère sans rien dire… Je vous dédie ce manuscrit avec toute mon admiration et ma gratitude.

Les chiffres clés :

- 100 dissections
- 3000 puces
- 80 000 punch
- 216 000 000 noyaux quantifiés … clic…clic….clic …
- 2 500 cafés
- 1 manuscrit

TABLE DES MATIERES

RESUME **3**

ABSTRACT **5**

REMERCIEMENTS **7**

TABLE DES MATIERES **15**

ABREVIATIONS **21**

LISTE DES FIGURES **25**

INTRODUCTION **29**

CHAPITRE I : 31

LES MALADIES NEURODEGENERATIVES 31

I. Généralités **31**

I.1. Chiffres clés et enjeux sanitaires et sociétaux **31**

I.2. Les maladies neurodégénératives chroniques **33**

I.2.a. Maladie d'Alzheimer *33*

I.2.b. Maladie de Parkinson *37*

I.2.c. Maladie de Huntington *38*

I.2.d. Sclérose latérale amyotrophique (SLA) *39*

I.2.e. Scléroses en plaques *40*

I.3. Lésion neuropathologique aigüe : l'ischémie **41**

I.3.a. Les accidents vasculaires cérébraux *41*

I.3.b. L'ischémie cérébrale *42*

I.3.c. Stratégies thérapeutiques *43*

I.3.d. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'ischémie *43*

II. Mécanismes communs aux différentes pathologies **45**

II.1. Agrégation de protéines spécifiques **45**

II.1.a. Les agrégats dans les différentes maladies neurodégénératives *45*

II.1.b. Initiation de l'agrégation lors du vieillissement et des processus neurodégénératifs *46*

II.1.c. Effets cytotoxiques des structures agrégatives ? *47*

II.2. Le stress oxydant **48**

II.2.a. Caractéristiques des ROS et des RNS *51*

II.2.b. Importance physiologique des ROS et des RNS *53*

II.2.c. Implication du stress oxydant dans le vieillissement et les maladies neurodégénératives *55*

II.3. Hyperactivation des systèmes de neurotransmission **58**

II.3.a. Excitotoxicité glutamatergique *58*

II.3.b. Toxicité dopaminergique *62*

II.3.c. Homéostasie calcique *63*

II.4. Neuroinflammation **63**

II.4.a. La réponse inflammatoire *63*
II.4.b. Les processus inflammatoires dans les maladies neurodégénératives *64*
II.5. Diminution des taux en NAD^+ **66**
II.5.a. NAD^+, mitochondrie et stress oxydant *67*
II.5.b. NAD^+ et inflammation *69*
II.5.c. NAD^+ et excitotoxicité *69*
II.6. Rôles des altérations axonales dans les maladies neurodégénératives **71**
II.6.a. Rôle des altérations axonales et synaptiques dans la dispersion des lésions *71*
II.6.b. La dégénérescence axonale lors du vieillissement *72*
II.6.c. La dégénérescence axonale dans les maladies neurodégénératives *73*
CHAPITRE II : 77
LA DEGENERESCENCE AXONALE : UN DES MARQUEURS PRECOCES DES MALADIES NEURODEGENERATIVES 77
I. Les différents modèles de dégénérescence axonale **77**
I.1. La dégénérescence axonale Wallérienne **77**
I.2. Dégénérescence axonale de type *Dying Back* **78**
I.3. Déprivation en facteur trophique **79**
I.4. Le *pruning* développemental **79**
II. Les mécanismes impliqués dans les différents modèles de dégénérescence axonale **80**
II.1. Influx calcique et activation des calpaïnes **80**
II.2. Wlds : une mutation spontanée qui ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques **81**
II.2.a. La protéine Wlds *81*
II.2.b. Quels sont les domaines de la protéine Wlds nécessaires pour protéger de la dégénérescence axonale ? *82*
II.2.c. Quelle est la localisation subcellulaire de la protéine Wlds ? *83*
II.2.d. Effets de Wlds dans les maladies neurodégénératives *84*
II.3. Implication des processus apoptotiques dans la dégénérescence de l'axone ? Rôle des caspases ? **85**
III. Cascade de signalisation de la dégénérescence axonale locale **87**
III.1. Nmnat2, facteur de survie de l'axone **87**
III.2. La cascade de signalisation des MAP kinases **88**
III.3. SARM1, acteur de la dégénérescence axonale **90**
III.4. Rôle central du métabolisme du NAD^+ dans la protection de l'axone **92**
CHAPITRE III : 97
NAD^+, ACTEUR ESSENTIEL A LA SURVIE DES CELLULES 97
I. Fonctions du NAD^+ dans la cellule **97**
I.1. Implication du NAD^+ dans le métabolisme **98**
I.2. Implications du NAD^+ dans des réactions enzymatiques **99**
I.2.a. Sirtuines *99*
I.2.b. PARPs *103*
I.2.c. cADP-ribose synthases *105*

II. Métabolisme du NAD^+ 105
II.1. L'assimilation du NAD^+ dans l'organisme 105
II.2. Les différents précurseurs du NAD^+ 107
II.2.a. Voie De novo 107
II.2.b. Voie de Preiss-Handler 108
II.2.a. Voie de sauvetage 109
II.2.a. Le FK866 110
II.2.b. Le nicotinamide riboside 111
II.3. Métabolisme extracellulaire du NAD^+ et du NR 115
II.3.a. Conversion du NAD^+ en NMN 116
II.3.b. Conversion du NMN en NR 118
II.3.c. Les transporteurs de nucléosides 119
II.3.d. Un métabolisme extracellulaire du NAD^+ dans le système nerveux central ? 122
CHAPITRE IV : 125
L'EXCITOTOXICITE, UN PROCESSUS PATHOGENE COMPLEXE 125
I. Le glutamate : neurotransmetteur excitateur majoritaire 125
I.1. Le glutamate 125
I.2. Stockage du glutamate 125
I.3. Libération du glutamate 126
I.4. Les récepteurs glutamatergiques 126
I.4.a. Les récepteurs métabotropiques au glutamate 127
I.4.b. Les récepteurs ionotropiques au glutamate 128
I.5. Le recyclage du glutamate 130
I.5.a. Les transporteurs du glutamate 130
I.5.b. Le cycle glutamate/glutamine dans les astrocytes 132
I.6. Autres molécules excitotoxiques 134
II. Rôle physiologique de la neurotransmission par le glutamate 135
II.1. Les Récepteurs NMDAR 135
II.2. Voie de signalisation pro-survie 136
II.2.a. Activation de la voie PI3K/Akt 136
II.2.b. Implication de la cascade apoptotique indépendamment de la voie PI3K/Akt 137
II.2.c. Ca^{2+} et activation de CREB 137
II.2.d. Augmentation des antioxydants 138
III. Rôle toxique de la neurotransmission par le glutamate 139
III.1. Les récepteurs NMDA dans l'excitotoxicité 139
III.2. Mécanisme moléculaire associé à l'excitotoxicité 140
III.2.a. Dysfonctions mitochondriales et stress oxydant 140
III.2.b. Dérégulation calcique et activation des calpaïnes 141
III.2.c. Activation de protéines kinases de stress : SAPKs 142
III.3. Processus de mort neuronale complexe 144
III.3.a. L'apoptose et l'implication des caspases 144
III.3.b. L'autophagie et l'implication des cathepsines 146
III.3.c. La nécrose et l'implication des calpaïnes 146

III.3.d. Nécroptose et parthanatos *147*

OBJECTIF DU PROJET DE THESE **149**

MATERIELS & METHODES **151**

I. Les puces microfluidiques **151**

I.1. Principe du dispositif microfluidique **151**

I.2. Adaptation à la neurobiologie **152**

II. Culture primaire de neurones corticaux **153**

II.1. Dissection & dissociation **153**

II.2. Culture en puces microfluidiques **153**

II.3. Culture en plaques **154**

IV. Traitement pharmacologiques *in vitro* **155**

IV.1. Molécules utilisées **155**

IV.2. Principe du traitement **156**

V. Immunocytochimie **156**

V.1. Principe **156**

V.2. Anticorps utilisés **157**

VI. Analyse de la mort neuronale et de la quantification axonale **157**

VI.1. Microscopie à fluorescence **157**

VI.2. Quantification de la mort neuronale **157**

VI.3. Quantification de la dégénérescence axonale **158**

VII. Analyse de l'expression génique : **159**

VII.1. Extraction d'ARN totaux **159**

VII.2. RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) **160**

VII.2.a. Transcription inverse *160*

VII.2.b. PCR *160*

VII.3. PCR quantitative (PCRq) **161**

VIII. Dosage du NAD^+ **162**

IX. Modèle d'excitotoxicité *in vivo* **163**

IX.1. Animaux **163**

IX.2. Injection de NMDA intrastructure **163**

IX.3. Observations des lésions par Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM) **164**

IX.4. Quantification du volume des lésions **165**

X. Analyse statistique **165**

RESULTATS **167**

I. Mise au point d'un modèle d'étude de dégénérescence axonale lors d'un stress excitotoxique **167**

I.1. Caractérisation du modèle d'excitotoxicité induite par le NMDA dans les neurones corticaux **167**

I.2. Etude des mécanismes de neurodégénérescence mis en jeu **170**

II. Caractérisation des effets protecteurs du NAD^+ et du NR **174**

II.1. Effets comparés des différentes molécules du métabolisme du NAD^+ 175
II.2. Etude comparée des effets du NAD^+ et du NR *in vivo* 178
II.3. Effet local du NAD^+ et du NR sur des neurones traités au NMDA 179
III. Métabolisme intracellulaire du NR 182
III.1. Rôle des transporteurs de nucléosides (NTs) dans l'effet protecteur du NR 182
III.2. Analyse de la présence des isoformes de Nrk dans des tissus et dans des neurones corticaux en culture 183
III.2.a. En condition physiologique normale 183
III.2.b. Lors d'un stress excitotoxique..... 184
III.3. Effet de l'excitotoxicité et de l'apport exogène de NR sur les taux intracellulaires en NAD^+ 185
IV. Etude comparée des effets du NAD^+ et du NR dans un modèle de dégénérescence axonale induite par une chute des taux en NAD^+ 187
IV.1. Mise au point du modèle et caractérisation des effets du FK866 187
IV.2. Caractérisation des effets du NAD^+ et du NR lors d'une déplétion aigüe en NAD^+ 188
IV.2.a. Effets comparés du NAD^+ et de ses précurseurs..... 188
IV.2.a. Effets neuroprotecteurs du NAD^+ et du NR post-traitement..... 191
IV.3. Implication des kinases Nrk dans la métabolisation intracellulaire du NR lors d'une déplétion aigüe en NAD^+..... 191
V. Métabolisme extracellulaire du NAD^+ et de ses précurseurs.....193
V.1. Lors d'un stress excitotoxique..... 193
V.2. Lors d'une déplétion totale en NAD^+..... 194
V.3. Modulation de l'entrée du NR *via* les NTs lors d'une déplétion en NAD^+ ? 196

DISCUSSION.....201
I. Modèle excitotoxique 201
II. Etude de la DA dans les dispositifs microfluidiques 203
III. Métabolisme du NAD^+ et de ses précurseurs dans les neurones du SNC 205
IV. Quelles sont les cibles activées lors de l'augmentation des niveaux de NAD^+ ? 213
V. Le NR en tant qu'agent thérapeutique 217

ANNEXE 219
I. Annexe 1 : Evolution spatio-temporelle des maladies neurodégénératives.....219
I.1. Dispersion spatiale des stigmates neuropathologiques des maladies 219
I.1.a. Dispersion spatiale dans la maladie d'Alzheimer..... 219
I.1.b. Dispersion spatiale dans la maladie de Parkinson 221
II. Annexe 2 : Effet du NR sur la biogénèse mitochondriale 223
III. Annexe 3 : Article publié.....224
IV. Annexe 4 : Article en soumission à Journal of Cell Biology.....235

REFERENCES 263

Abréviations

3-MA	**3**-**M**ethyl **A**denine
AAE	**A**cide **A**miné Excitateur
ACMS	2-**A**mino-3-**C**arboxy**M**uconate **S**emialdehyde
AD	**A**xonal **D**egeneration
ADN	**A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique
ADP	**A**dénosine **D**i**P**hosphate
AID	**A**ctivity-regulated **I**nhibitors of **D**eath
AIF	**A**poptosis **I**nducing **F**actor
AINS	**A**nti-**I**nflammatoires **N**on-**S**teroïdiens
ALP	**A**utophagosome-**L**ysosome **P**athway
AMP	**A**dénosine **M**ono**P**hosphate
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate
APAF1	**A**poptotic **P**rotease **A**ctivating **F**actor **1**
APP	**A**myloid **P**rotein **P**recursor
ARN	**A**cide **R**ibo**N**ucléique
ATP	**A**dénosine **T**ri**P**hosphate
AVC	**A**ccident **V**asculaire **C**érébral
Aβ	**A**myloïde **β**
BDNF	**B**rain-**D**erived **N**eurotrophic **F**actor
Bmal1	**B**rain-**m**uscle-**a**rnt-**l**ike-protein **1**
CaBP	**Ca**$^{2+}$ **B**inding **P**rotein
CaMKIV	Ca^{2+}/Calmodulin-dependent protein kinase IV
CASPASE	**C**ystein **ASP**artate Prote**ASE**
CLOCK	**C**ircadian **L**ocomotor **O**utput **C**ycles **K**aput
CMP	**C**ytidine **M**ono**P**hosphate
CREB	**C**yclic-AMP **R**esponse **E**lement **B**inding **P**rotein
DCD	dérégulations calciques retardées
dKCL	déprivation de Chlorure (Cl) de Potassium (K)
DLK	**D**ual **L**eucine zipper **K**inase
DRG	**D**orsal **R**oot **G**anglion

EN-ase	**E**cto-**N**ucléotid**ase**
FADH	**F**lavine **A**dénine **D**inucléotide
FTD	**F**ronto-**T**emporal **D**ementia
GABA	**G**amma-**A**mino **B**utyric **A**cid
GDH	**G**lutamate **D**és**H**ydrogénase
GPX	**G**lutathion **P**ero**X**ydase
GS	**G**lutamine **S**ynthétase
GSH	**G**lutathion réduit
Htt	**H**untingtine
iGluR	**i**onotropic **Glu**tamate **R**eceptor
IL	**I**nter**L**eukine
IRM	**I**magerie à **R**ésonance **M**agnétique
JNK	c-**J**un **N**-terminal **K**inases
JPND	Programme conjoint européen sur les maladies neurodégénératives
MAGUK	**M**embrane-**A**ssociated **GU**anylate **K**inases
MAP-2	**M**icrotubule **A**ssociated **P**rotein-**2**
MAPK	**M**icrotubule **A**ssociated **P**rotein **K**inase
MCU	**M**itochondrial **C**a^{2+} **U**niporter
mGluR	**m**etabotropic **Glu**tamate **R**eceptor
MNA	1-**M**éthyl**N**icotin**A**mide
NA	**N**icotin**A**te
NAAD	**A**cide **N**icotinique **A**dénine **D**inucléotide
NAD^+	**N**icotinamide **A**dénine **D**inucléotide
NAM	**N**icotin**AM**ide
NaMN	**N**icotin**a**te **M**ono**N**ucléotide
Nampt	**N**icotin**am**ide **p**hosphorybosyl**t**ransférase
NAR	**A**cide **N**icotinique **R**iboside
NF-κB	**N**uclear-**F**actor-**k**appa **B**
NGC	**N**eurones en **G**rains du **C**ervelet
NGF	**N**erve **G**rowth **F**actor
NMDA	**N**-**M**éthyl **D**-**A**spartate
NMN	**N**icotinamide **M**ono**N**ucléotide
Nmnat	**N**icotinamide **m**ono**n**ucléotide **a**dénylyl**t**ransferase

NNMT	**N**icotinamide-**N**-**M**éthyl**T**ransférase
NO	**O**xyde **N**itrique
NOS	**N**itric **O**xide **S**ynthase
NOX	**N**ADPH **ox**idase
NPP-ase	**N**ucléotide **P**yro**P**hosphat**ase**
NR	**N**icotinamide **R**iboside
Nrk	**N**icotinamide **r**iboside **k**inase
NT	**T**ransporteur de **N**ucléoside
$O_2^{\bullet -}$	Radical anion superoxide
$ONOO^-$	Peroxinitrite
PAG	**P**hosphate **A**ctivated **G**lutaminase
PARP	**P**oly-**A**DP **R**ibose **P**olymerase
PBEF	**P**re-**B** cell colony-**E**nhancing **F**actor
PCRq	**PCR q**uantitative
PDMS	**P**oly-**D**i**M**éthyl**S**iloxane
PGC-1α	**P**PAR**γ** **C**oactivator **1α**
PI3K	**P**hospho**I**nositide **3**-**k**inase
PINK-1	Parkinson's disease associated kinase
PPARγ	**P**eroxysome **P**roliferator **A**ctivated **R**eceptor **γ**
PS	**P**ré**S**éniline
PSD	**D**ensité **P**ost-**S**ynaptique
PUMA	pro-apoptotic Bcl2 homology domain 3(BH3)-only member gene
RIP1	**R**eceptor-**I**nteracting **P**rotein **1**
RNS	**R**eactive **N**itrogen **S**pecies
ROS	**R**eactive **O**xygen **S**pecies
RT-PCR	**R**everse **T**ranscriptase **P**olymerase **C**hain **R**eaction
SAM	**S**terile **A**lpha **M**otif
SAP	**S**ynapse **A**ssociated **P**rotein
SAPK	**S**tress **A**ctivated **P**rotein **K**inase
SARM1	**S**terile **A**lpha and TI**R** **M**otif-containing protein **1**
SCG10	**S**uperior **C**ervical **G**anglion **10**
Sir2	**S**ilent **i**nformation **r**egulator **2**
SIRT	**Sirt**uine

SLA	**S**clérose **L**atéral **A**myotrophique
SN	**S**ubstance **N**oire
SNC	**S**ystème **N**erveux **C**entral
SNP	**S**ystème **N**erveux **P**ériphérique
SOD	**S**uper **O**xide **D**ismutase
STEP	**S**triatal-**E**nriched protein **T**yrosine **P**hosphatase
Tau	**T**ubulin **a**ssociated **u**nit
TIR	**T**oll **I**nterleukin **R**eceptor
TNF α	**T**umor **N**ecrosis **F**actor **a**lpha
TRPM	**T**ransient **R**eceptor **P**otential **M**elastatin
TUNEL	**T**erminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d**U**TP **N**ick **E**nd-**L**abeling
TVA	**A**ire **T**egmentale **V**entrale
UPS	**U**biquitin **P**roteasome **S**ystem
vATP-ase	**v**esicular **ATP-ase**
VCP	**P**rotéine **C**ontenant des **V**alosines
VFD	**V**enus **F**lytrap **D**omain
vGLUT	**v**esicular **GLU**tamate **T**ransporter
Wlds	**W**a**l**lerian **d**egeneration **s**low
x_c^-	Transporteur cystine/glutamate

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1 : Importance relative de cinq maladies neurodégénératives 32
Figure 2 : Résumé des symptômes et signes cliniques et de la neuropathologie associée dans les maladies d'Alzheimer, Parkinson, Huntington, la SLA et les scléroses en plaques. 33
Figure 3 : Perte neuronale chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer observée par IRM.....34
Figure 4 : Clivage de l'APP par les enzymes α, β et γ sécrétases puis formation des différents complexes de peptides $A\beta_{1-42}$.....35
Figure 5 : L'hyperphosphorylation de Tau entraîne son détachement des microtubules puis son agrégation et la formation des enchevêtrement neurofribrillaires. 36
Figure 6 : Les formes des scléroses en plaques. 41
Figure 7 : L'ischémie cérébrale. 42
Figure 8 : Agrégation de protéines dans les différentes maladies neurodégénératives. 45
Figure 9: Schéma récapitulant le rôle de l'agrégation protéique dans les processus neurodégénératifs. 47
Figure 10 : ROS & RNS. 51
Figure 11 : Schéma récapitulant les fonctions physiologiques des ROS et le principe du stress oxydant. 54
Figure 12 : Schéma des différents facteurs induisant l'augmentation des ROS dans les maladies neurodégénératives 56
Figure 13 : Métabolisme du glutamate en situation normale ou lors d'un stress excitotoxique. 60
Figure 14 : Les trois voies d'induction de l'excitotoxicité glutamatergique. 62
Figure 15 : Lien étroit entre le vieillissement, les dérégulations des systèmes de neurotransmission et l'apparition de maladies neurodégénératives. 63
Figure 16 : La neuroinflammation : lien entre agrégation de protéines, activation des cellules gliales et inflammation 65
Figure 17 : Effet du vieillissement sur la peroxydation des lipides, la dégradation de l'ADN, l'activité des PARPs et le taux de NAD^+ dans des tissus humains. 67
Figure 18 : Comparaison des taux de NAD(P)H, de la quantité de ROS et des niveaux de GSH entre des souris sauvages et des souris transgéniques 3x-Tg-AD 68
Figure 19 : Effet du TNF-α sur le métabolisme du NAD^+ dans un modèle murin. 69
Figure 20 : Excitotoxicité et biosynthèse de NAD^+. 70
Figure 21 : L'application de NMDA diminue les niveaux intracellulaires en NAD^+. 70
Figure 22 : Schéma récapitulant la place du NAD^+ dans les mécanismes moléculaires communs aux maladies neurodégénératives et au vieillissement. 71
Figure 23 : Effet contradictoire des plaques amyloïdes Aβ sur l'intégrité axonale. 74
Figure 24 : Altérations des axones du striatum et du palladium observées chez des souris transgéniques développant des symptômes proches de la maladies de Parkinson 75
Figure 25 : Déroulement temporel de la dégénérescence axonale de type Wallérienne 78
Figure 26 : Modèles de dégénérescence axonale : (A) Dégénérescence Wallérienne induite par axotomie ; (B) dégénérescence rétrograde de type *Dying-Back* 79
Figure 27 : Modèles de dégénérescence axonale induite par déprivation de facteurs trophiques en culture *in vitro* (C) ou lors du développement par pruning (D) 80
Figure 28 : Observation de la protection axonale conférée par *Wlds* dans trois modèles différents de dégénérescence Wallérienne 81
Figure 29 : Structure de la protéine fusion Wlds constituée de l'enzyme Nmnat1, de l'ubiquitine ligase Ube4b, de la séquence N-terminale N16 et de la séquence W18 82
Figure 30 : Localisation subcellulaire de Wlds et des enzymes Nmnat. 84
Figure 31 : Schéma représentant l'activation de la machinerie apoptotique lors d'une déprivation en facteurs trophiques localisée au niveau de l'axone 86

Figure 32 : Schéma représentant les principales protéines impliquées dans la dégénérescence axonale lors du *pruning* développemental, dans un contexte pathologique de dégénérescence Wallérienne ou de type *dying-Back* 87
Figure 33 : Cascade de signalisation des MAP Kinases....89
Figure 34 : Structure de la protéine SARM1 et modèle d'activation et d'auto inhibition lors d'une lésion....91
Figure 35 : Modèle de mécanisme de la dégénérescence axonale. 92
Figure 36 : Effet de l'application de NAD^+ exogène sur la dégénérescence axonale dans un contexte de dégénérescence Wallérienne induite par axotomie....93
Figure 37 : Le traitement de DRG avec du NAD^+ ou certains de ses précurseurs retardent la dégénérescence axonale....93
Figure 38 : Le pré-traitement de CGN avec 5 mM de NAD^+ protège de la dégénérescence axonale induite par une déprivation en KCl....94
Figure 39 : Fonction de co-facteur du NAD^+. 98
Figure 40 : Les grandes voies du métabolisme et l'implication du couple d'oxydo-réduction NAD^+/NADH....99
Figure 41 : Réactions de désacétylations de protéines par les sirtuines, dépendantes du NAD^+ 100
Figure 42 : Réaction de transfert de groupement ADP-ribose catalysée par les PARPs et mettant en jeu le NAD^+. 103
Figure 43 : Effet contradictoire de l'inhibition de PARP-1 104
Figure 44 : Formation de cADP-ribose par la réaction du NAD^+ avec l'ectoenzyme CD38....105
Figure 45 : Le FK866. 110
Figure 46 : Principales voies de biosynthèse du NAD^+ 109
Figure 47 : Le NR et les enzymes Nrk 112
Figure 48 : Effet du NR sur la dégénérescence axonale dans le SNP. 113
Figure 49 : Effet du NR *in vivo* dans un modèle de souris Alzheimer.. 114
Figure 50 : Effet protecteur du NR dans un modèle de perte auditive induite par un bruit fort et prolongé. 115
Figure 51 : Représentation schématique du métabolisme extracellulaire de l'ATP et du NAD^+ 116
Figure 52 : Liaisons pyrophosphates de l'ATP, du NAD^+, de l'Ap_nA, de l'UDP-Glucose et du pNP-TMP hydrolysées par les NPP1/2 et 3 117
Figure 53 : Structure du NAD^+ et des différents précurseurs (Nam, NMN et NR)....118
Figure 54 : Description et caractéristiques de l'ecto-5'nucleotidase CD73 et de l'ecto-nucléotide pyrophosphate/phosphodiestérase NPP1 119
Figure 55 : Topologie structurale des transporteurs de nucléosides ENTs et CNTs....119
Figure 56 : Inhibition des NTs ENT1 et ENT2 120
Figure 57 : Les substrats des différents transporteurs de nucléosides chez l'homme. 121
Figure 58 : Schéma du stockage du glutamate dans les vésicules par les transporteurs vGLUT et le gradient de protons généré par l'ATPase vésiculaire. 125
Figure 59 : Classification des récepteurs au glutamate. 127
Figure 60 : Structure des mGluR....127
Figure 61 : Schéma des différents récepteurs ionotropiques au glutamate. 128
Figure 62 : Schéma du transport du glutamate dans les cellules gliales. 132
Figure 63 : Le cycle Glutamine / Glutamate 133
Figure 64 : Schéma récapitulatif de le neurotransmission glutamatergique....135
Figure 65 : Voie de signalisation pro-survie induite par l'activité synaptique des récepteurs NMDA139
Figure 66 : Boucle de rétroaction positive amplifiant la production de radicaux libres à partir de l'activation excessive des récepteurs NMDA....141
Figure 67 : Voie de signalisation pro-mort induite par l'activité synaptique des récepteurs NMDA lors d'un phénomène d'excitotoxicité. 143
Figure 68 : Mécanismes moléculaires de l'apoptose neuronale....144
Figure 69 : Schéma illustrant les différents mécanismes moléculaires et les voies de mort impliquées dans l'excitotoxicité....148

MATERIELS & METHODES

Figure 70 : Les différentes étapes de fabrication du moule en silicium par photolitographie. 151
Figure 71 : Préparation des puces microfluidiques. 152
Figure 72 : Schéma d'une puce microfluidique constituée de trois chambres connectées par des microcanaux orientés.. 153
Figure 73 : Culture primaires de neurones corticaux dans un circuit microfluidique composé de trois chambres séparées par des micro-canaux diodés.....154
Figure 74 : Illustration du compartiment somatique par lumière transmise (Trans) et après marquage au Hoechst. 158
Figure 75 : Quantification de la dégénérescence axonale par la macro FIJI pour trois pourcentages d'axones fragmentés estimés visuellement.....158
Figure 76 : Corrélation entre l'index de fragmentation obtenu par la macro sur FIJI et le pourcentage d'axones fragmentés estimé visuellement. 159
Figure 77 : « Cycling assay » pour doser les quantités de NAD^+/NADH.....162
Figure 78 : Protocole expérimental du modèle d'excitotoxicité *in vivo*.....164
Figure 79 : IRM bruker 7T spécifique à la visualisation des lésions cérébrales des espèces murines.164

RESULTATS

Figure 80 : L'application de NMDA induit la mort des corps cellulaires et la dégénérescence des axones en activant de manière spécifique les récepteurs NMDA.....168
Figure 81 : Effet compartimentalisé du NMDA au niveau somato-dendritique. 170
Figure 82 : Les mécanismes de mort impliqués dans la neurodégénérescence induite par le NMDA ne semblent ni apoptotique, ni nécroptotique, ni dépendants des PARPs.....172
Figure 83 : Le NAD^+ et ses précurseurs ont des effet axo-protecteurs dans un modèle d'excitotoxicité *in vitro*.....175
Figure 84 : le NR retarde la dégénérescence axonale induite par le NMDA de manière plus efficace que le NAD^+.....177
Figure 85 : L'administration de NR intra-corticale diminue le volume des lésions induites par injection de NMDA. 179
Figure 86 : Effet protecteur local du NR, mais pas du NAD^+, au niveau de l'axone.....180
Figure 87 : Le NR pénètre dans la cellule *via* des NTs sensibles au dipyridamole. 183
Figure 88 : L'axo-protection induite par le NR lors d'un stress excitotoxique est associée à l'activité de l'enzyme Nrk1. 184
Figure 89 : Le traitement des neurones avec le NR induit une réplétion des niveaux intracellulaires en NAD^+ lors d'un stress excitotoxique. 186
Figure 90 : L'inhibition de Nampt par le FK866 induit une mort neuronale et une dégénérescence axonale associées à une diminution des niveaux intracellulaires en NAD+. 188
Figure 91 : Effet du NAD^+ et de ses précurseurs lors d'une déplétion en NAD^+ induite par l'inhibition de Nampt par le FK866.....190
Figure 92 : L'induction du messager *Nrk2* observée lors d'une déplétion aigüe en NAD^+ n'est pas nécessaire à l'effet protecteur du NR.....192
Figure 93 : Le métabolisme extracellulaire du NAD^+ est dépendant du stress neurotoxique. 195
Figure 94 : Modulation des ENTs lors d'une déplétion en NAD^+. 196
Figure 95 : Schéma présentant les différences d'effets du métabolisme de NAD^+, et en particulier du NR, dans les deux paradigmes neurotoxiques présentés dans ce travail. 197
Figure 96 : Schéma hypothétique de métabolisation extracellulaire compartimentalisée du NAD^+ ...198

DISCUSSION

Figure 97 : Potentiel rôle des astrocytes dans le métabolisme extracellulaire 211
Figure 98 : Métabolisme du NAD^+ au niveau axonal et au niveau somatique.....216

ANNEXE

Figure 99 : Profil de dispersion des NFTs dans la maladies d'Alzheimer 220
Figure 100 : Profil de dispersion des plaques amyloïdes Aβ dans la maladie d'Alzheimer 221
Figure 101 : Profil de dispersion des corps de Lewy (agrégats d'α-synuclein). 222
Figure 102 : L'application de NR 1mM pendant 24h induit une augmentation de la biogenèse mitochondriale mais ne modifie pas la taille des mitochondrie. 223

TABLES

Table 1 : Activité enzymatique, localisation subcellulaire et cibles des sirtuines décrites chez l'homme 103
Table 2 : Distribution et localisation des transporteurs vésiculaires du glutamate. 126
Table 3 : Caractéristiques des EAATs : localisation, expression cellulaire et propriétés 131
Table 4 : Agents pharmacologiques utilisés. 155
Table 5 : Liste des anticorps utilisés.....157
Table 6 : Liste des amorces utilisées pour les RT-PCR et qPCR. 162

INTRODUCTION

PREAMBULE

Mon projet de thèse consiste en la caractérisation comparée des effets protecteurs du NAD^+ et de ses métabolites vis à vis de la dégénérescence axonale lors d'un stress excitotoxique. Je vais donc au cours de cette introduction détailler les trois axes qui découlent de ce sujet : la dégénérescence de l'axone, le métabolisme du NAD^+ et le processus excitotoxique. Mais je souhaiterais également relier ces notions aux processus neurodégénératifs dans leur globalité. Pour comprendre quelles sont les implications de mon projet dans la recherche sur les maladies neurodégénératives, je vais débuter cette introduction avec une revue des différentes pathologies neurodégénératives afin de mettre en évidence : 1) l'importance de l'étude de ces maladies dans la société ; 2) Les caractéristiques spécifiques de cinq maladies neurodégénératives à forte prévalence ; 3) Les mécanismes communs à ces maladies, dans lesquels on retrouvera les trois axes de mon projet : une dérégulation glutamatergique, une diminution des taux de NAD^+ lors du vieillissement ou des maladies neurodégénératives et l'apparition de lésions axonales dans les étapes précoces des pathologies. Ce premier chapitre ne se veut pas exhaustif et certaines notions seront volontairement éclipsées. Le cœur de mon sujet de thèse sera appréhendé dans les chapitres II à IV. Dans le chapitre II, j'exposerais les connaissances actuelles sur les mécanismes de dégénérescence axonale et mettrait en évidence l'importance du NAD^+ dans l'intégrité de l'axone. Ensuite, à travers l'étude du métabolisme du NAD^+, nous pourrons voir l'intérêt du nicotinamide riboside en tant que précurseur du NAD^+. Enfin, je détaillerais le processus pathogène d'excitotoxicité, mécanisme commun aux maladies neurodégénératives et aux lésions cérébrales aigües.

CHAPITRE I :

LES MALADIES NEURODEGENERATIVES

Les maladies neurodégénératives forment une grande famille de pathologies chroniques affectant le système nerveux central (SNC). Elles se caractérisent par une évolution lente et par le dysfonctionnement et la perte progressive de cellules nerveuses, en particulier de neurones, localisées dans des régions spécifiques du cerveau. Ces maladies englobent la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et bien d'autres. Ces pathologies se manifestent par des signes cliniques variées : troubles cognitifs, comportementaux, moteurs et/ou sensoriels. La prévalence de ces maladies augmente d'année en année, particulièrement dans les pays développés où l'on constate un vieillissement sans précédent de la population. La recherche dans ce domaine est donc devenue un enjeu majeur et fait l'objet de programmes de recherche européen (*JPND research*) et français. Comme nous allons le voir dans la suite de ce chapitre, ces maladies partagent certaines caractéristiques et mécanismes moléculaires et cellulaires. Nous avons ainsi décidé dans le cadre de mon projet de thèse de ne pas étudier une maladie en particulier mais un processus pathogène commun à ces maladies : l'excitotoxicité. Nous reviendrons en détails sur ce processus dans le chapitre IV. Pour le moment, je souhaiterais revenir sur les maladies neurodégénératives afin de mettre en avant l'importance de la recherche dans ce domaine : la diversité de ces maladies, le lien entre vieillissement et neurodégénérescence, les mécanismes cellulaires et moléculaires communs et la place centrale de la dégénérescence axonale dans ces pathologies.

I. Généralités

I.1. Chiffres clés et enjeux sanitaires et sociétaux

Un tiers de la population européenne (soit 179 millions d'individus) est touché par au moins un trouble du cerveau. Toutes les maladies liées au système nerveux et au cerveau ont couté près de 800 milliards d'euros à l'Europe en 2010. Les enjeux dans le domaine des pathologies du système nerveux sont donc considérables tant du point de vue médical que sociétal et économique. La maladie la plus courante est la maladie d'Alzheimer : elle touche 1 personne sur 20 à partir de 65 ans, et plus d'1 personne sur 8 après 80 ans. Dans le monde, on dénombre 25 millions de personnes atteintes par cette maladie. Ce chiffre devrait doubler

d'ici à 2030 pour atteindre 50 millions dans le monde, et plus que tripler d'ici à 2050 pour atteindre 80 millions. Cette évolution phénoménale de la maladie est reliée directement au vieillissement de la population car, comme on le détaillera plus tard, il a été montré que celui-ci est l'un des principaux facteurs de risques des maladies neurodégénératives. Ainsi, nous sommes tous amenés à être affectés directement ou *via* des proches par ces pathologies. Les chiffres exposés précédemment nous montrent l'importance et l'urgence de la situation. La prise en charge des malades, l'accès aux soins, l'aide médicale et le soutien aux familles engendrent des coûts colossaux et fait des maladies neurodégénératives une préoccupation centrale. En 2007, la maladie d'Alzheimer a été désignée « grande cause nationale » après le cancer et le sida. Bénéficiant d'une médiatisation croissante ces vingt dernières années, la maladie d'Alzheimer est progressivement devenue une véritable priorité de santé publique. Plusieurs plans Alzheimer ont ainsi vu le jour depuis les dix dernières années. Depuis 2014, un nouveau programme a été mis en place en France : le plan maladies « neuro-dégénératives 2014-2019 ». Contrairement au précédent, celui-ci ne se limite pas à la maladie d'Alzheimer mais se veut transversal afin de créer davantage de synergie entre les actions de recherche, les soins et l'accompagnement des personnes concernées par une problématique commune, celle de la protection neuronale. Ce plan est doté d'un budget de 470 millions d'euros, dont la moitié est consacrée à la recherche et l'autre moitié au renforcement des dispositifs médicaux-socio existants.

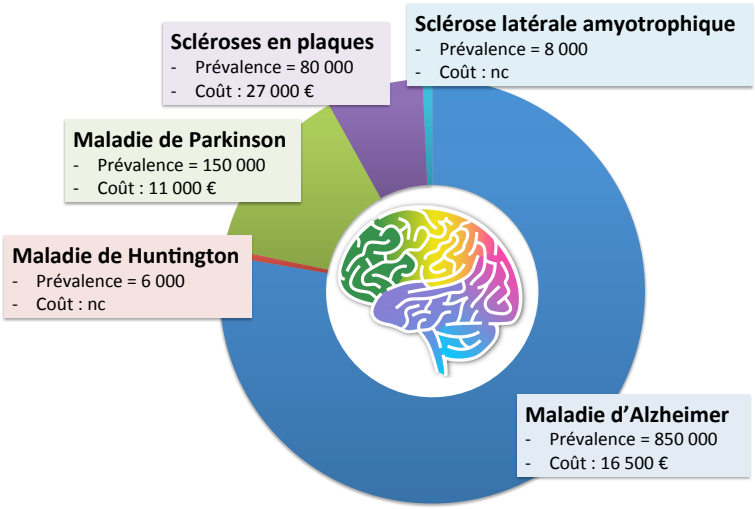


Figure 1 : Importance relative de cinq maladies neurodégénératives : prévalence et coût (par personne et par an).

La compréhension et le traitement des maladies du système nerveux sont donc au cœur des recherches effectuées en laboratoire aujourd'hui. L'enjeu est de proposer des traitements à courts termes qui permettraient, non seulement, de soulager les malades et d'aider leur

entourage mais également de prévenir les processus neurodégénératifs voire de les guérir. Le projet de thèse que je présente dans ce manuscrit s'inscrit dans cette démarche. Mon travail a ainsi pour vocation d'étudier et de faire avancer la compréhension d'un événement central des maladies neurodégénératives qu'est la dégénérescence axonale et du rôle du NAD^+ et de son métabolisme dans la prévention de celle-ci.

I.2. Les maladies neurodégénératives chroniques

Nous venons de voir l'importance de la recherche sur les maladies neurodégénératives. Avant de décrire les mécanismes moléculaires et cellulaires communs à ces maladies, je souhaite décrire les principales pathologies afin de mettre en exergue la diversité des symptômes et des signes cliniques et de montrer la difficulté d'appréhension des maladies neurodégénératives dans leur ensemble.

	Maladies Neurodégénératives	
	Symptômes	Neuropathologie
Maladie d'Alzheimer	- Trouble de la mémoire - Perte de fonctions intellectuelles supérieures	- Enchevêtrements neurofibrillaires - Plaques amyloïdes
Maladie de Parkinson	- Bradykinésie - Rigidité - Tremblements de repos	- Corps de Lewy - Neurites de Lewy
Maladie de Huntington	- Troubles moteurs - Troubles cognitifs - Troubles psychiatriques	- Inclusions nucléaires Huntingtine mutée
Sclérose latérale amyotrophique	- Paralysie progressive de l'ensemble de la musculature striée	- Dégénérescence des motoneurones
Scléroses en plaques	- Troubles de la motricité	- démyélinisation des fibres nerveuses du cerveau, de la moelle épinière et du nerf optique

Figure 2 : Résumé des symptômes et signes cliniques et de la neuropathologie associée dans les maladies d'Alzheimer, Parkinson, Huntington, la SLA et les scléroses en plaques.

I.2.a. Maladie d'Alzheimer

Comme indiqué précédemment, la maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative à plus forte prévalence. Elle a été décrite pour la première fois en 1906 par Aloïs Alzheimer. Concernant les symptômes, ils se manifestent par une perte progressive de la mémoire, touchant dans les premières années de la maladie seulement les souvenirs très

récents. Cependant, cette atteinte neurologique s'étend par la suite et touche des parties plus larges du cerveau, entrainant alors des déficits cognitifs plus sévères. Les patients manifestent alors des troubles du langage (aphasie), des difficultés à reconnaître certains stimuli (agnosie), une incapacité à exécuter certains gestes (apraxie) mais également des troubles de l'humeur (anxiété, dépression, irritabilité, etc.).

D'un point de vue neuropathologique, elle se caractérise par une lente dégénérescence des neurones qui débute au niveau de l'hippocampe puis s'étend à d'autres régions du cerveau. Deux types de lésions sont à l'origine de la neuropathologie : d'une part, l'accumulation de peptide amyloïde β (Aβ) à l'extérieur de la cellule formant des plaques amyloïdes neurotoxiques ; d'autres part, la modification de la protéine Tau qui conduit à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires menant à la désorganisation des microtubules puis à la mort du neurone.

- **Atrophie corticale**

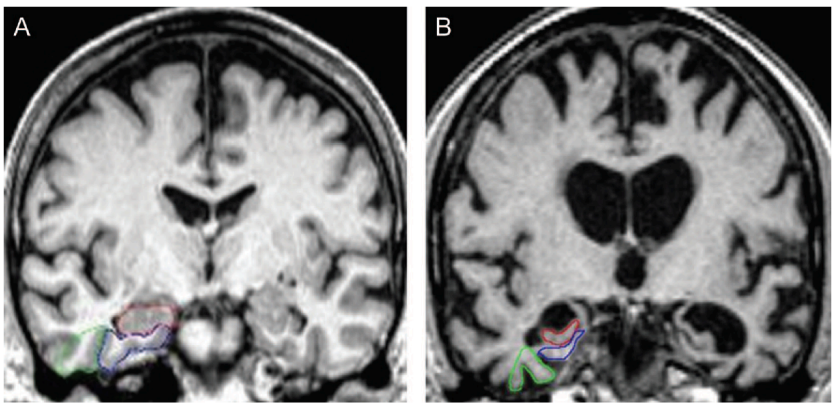


Figure 3 : Perte neuronale chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer observée par IRM. Les patients atteints de la maladie (B) présentent une atrophie corticale particulièrement au niveau de l'hippocampe et un élargissement des ventricules cérébraux par rapport au sujet contrôle (A) (Duara et al., 2008).

Grâce à l'émergence de nouvelles techniques d'imagerie médicale (IRM, PET scan), il a été montré que le volume et le poids des cerveaux de sujets malades diminuent fortement au cours de la pathologie : le cerveau peut ainsi perdre 8 à 10 % de son poids chez les sujets atteints par la maladie contre 2% chez les sujets sains. Ces pertes touchent principalement des zones spécifiques du cerveau (région de l'hippocampe, amygdale temporale et pôle temporal).

- **Les plaques amyloïdes**

Les plaques amyloïdes correspondent à l'accumulation extracellulaire du peptide $A\beta_{1-42}$. Celui-ci provient de la dégradation spécifique de la glycoprotéine membranaire APP (pour *Amyloid Protein Precursor*) par deux enzymes. En effet, la β-sécrétase et la γ-sécrétase hydrolysent conjointement cette protéine pour libérer trois fragments : le premier contenant la

partie N-terminale, le second contenant la partie C-terminale et le troisième correspondant au peptide Aβ. Cette dégradation est appelée voie amyloïdogénique et elle conduit à la formation d'une variété de peptides Aβ (De Strooper and Annaert, 2010). Parmi ceux-ci, les plus étudiés et connus sont les peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$, composés respectivement de 40 et 42 résidus d'acides aminés. L'$A\beta_{1-42}$ a tendance à s'agréger plus facilement et sa formation est augmentée de manière sélective durant la maladie. L'agrégation se déroule en plusieurs étapes et passe par la formation de différents types de complexes peptidiques : le peptide Aβ, initialement sous forme monomérique s'accumule et forme des oligomères, des fibrilles puis des plaques amyloïdes. Le rôle de ces différents complexes sur la dégénérescence des neurones n'est pas encore parfaitement connu. Les oligomères ont été montrés pour être cytotoxiques et induire directement le mort neuronale (Viola and Klein, 2015). Les plaques amyloïdes participent à l'inflammation des neurones et au déclenchement des dégénérescences neurofibrillaires (Selkoe and Hardy, 2016).

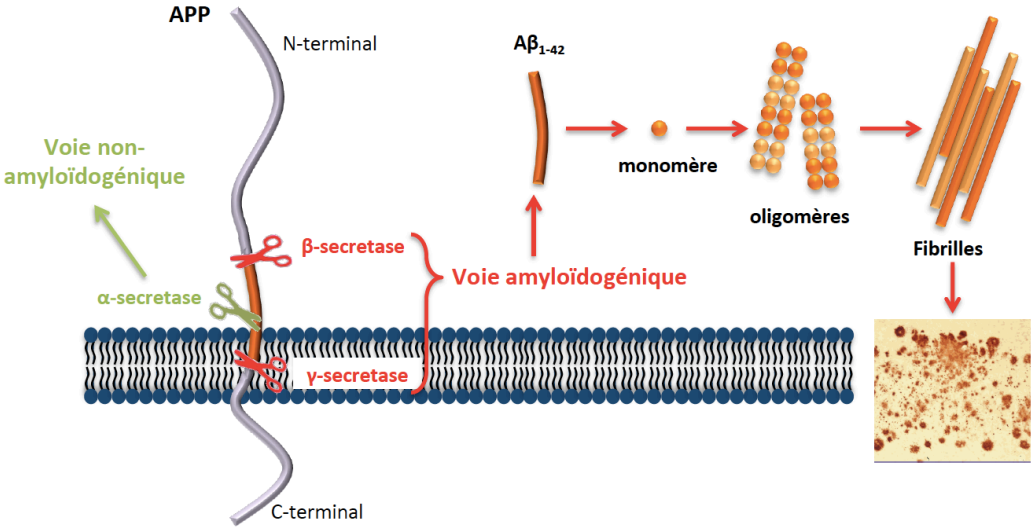


Figure 4 : Clivage de l'APP par les enzymes α, β et γ sécrétases puis formation des différents complexes de peptides $A\beta_{1-42}$.

Cependant, il a également été décrit une voie non-amyloïdogénique, durant laquelle la protéine APP est clivée par l'enzyme α-sécrétase. Dans ce cas, la coupure engendre la formation de l'APPα qui peut protéger les neurones contre la toxicité de l'amyloïde-β. Les présénilines 1 et 2 (PS1, PS2) sont deux enzymes intervenant dans l'activité de la γ-sécrétase qui sont susceptibles de modifier le clivage de l'APP (De Strooper et al., 1998; Wolfe et al., 1999).

- **Enchevêtrements neurofibrillaires Tau**

La protéine Tau (*Tubulin Associated Unit*) joue un rôle important dans la physiologie neuronale. Comme son nom l'indique, il s'agit d'une macromolécule associée à la tubuline, constituant majoritaire des microtubules impliqués dans la formation du cytosquelette des axones. Les protéines Tau se positionnent perpendiculairement à l'axone et assurent la rigidité des microtubules ainsi que le transport axonal. Chez les sujets malades, la protéine Tau est hyperphosphorylée, ce qui entraîne son détachement des microtubules, son accumulation dans le corps cellulaire et finalement la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires menant à la mort du neurone. La présence de ces lésions n'est pas spécifique à la maladie d'Alzheimer : on retrouve également ce type de dépôts dans les maladies de Parkinson, de Pick, le syndrôme de Down et les démences fronto-temporales (FTD pour *Fronto-Temporal Dementia*) (Goedert and Jakes, 2005). L'ensemble de ces maladies est regroupé sous le nom de tauopathies.

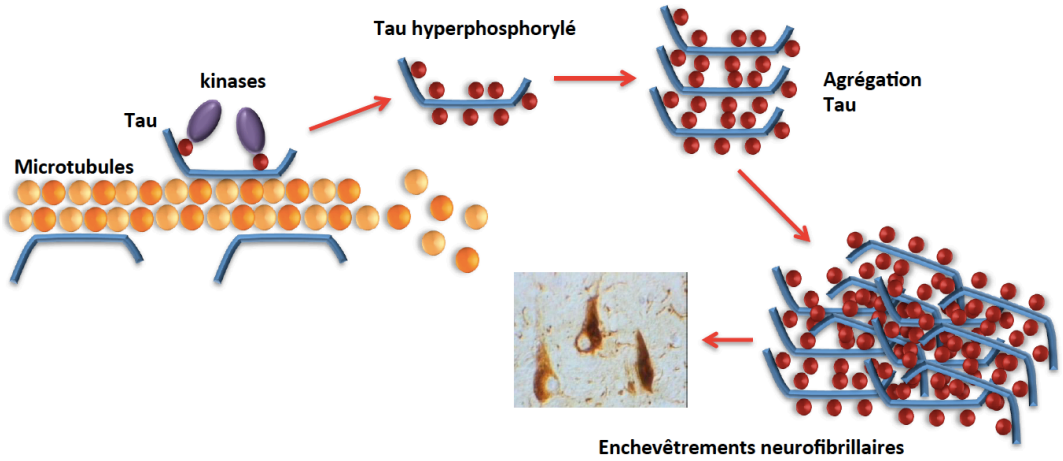


Figure 5 : L'hyperphosphorylation de Tau entraîne son détachement des microtubules puis son agrégation et la formation des enchevêtrements neurofribrillaires.

Comme je l'ai dit précédemment, mon projet de thèse ne s'inscrit pas dans l'étude d'une pathologie en particulier et je ne vais pas m'étendre sur la neuropathologie de la maladie d'Alzheimer. Cependant, je souhaiterais souligner la difficulté de compréhension des mécanismes associés à cette pathologie et leurs aspects multi-paramétriques. En effet, il existe de nombreux facteurs génétiques et environnementaux qui peuvent jouer un rôle important dans la mise en place des lésions (plaques amyloïdes et enchevêtrements neurofibrillaires) et donc dans le développement de la maladie. La forme sporadique de la maladie est la forme la plus répandue, concernant 95 à 99% des cas, mais son origine reste peu connue tandis que la forme héréditaire qui se définit par une apparition précoce de la maladie est liée à des mutations génétiques spécifiques de l'APP et des gènes codant PS1 et PS2. En ce qui concerne les facteurs environnementaux, ils sont nombreux et leur rôle respectif n'est pas

encore totalement élucidé. Cependant, nous savons aujourd'hui que l'âge (directement lié à la maladie), le sexe (les femmes présentent un risque accru), le niveau d'éducation, un taux élevé de cholestérol, des carences vitaminiques et l'hypertension artérielle peuvent tous influer sur le développement de la pathologie.

I.2.b. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurologique la plus fréquente : on dénombre 150 000 cas en France. Elle débute généralement entre 50 et 70 ans et elle a été dépistée en 1817 par l'anglais James Parkinson. Elle se caractérise par l'apparition de troubles moteurs : akinésie (lenteur des mouvements), une rigidité ou hypertonie des muscles, et des tremblements lents et peu amples, signe prédominant de la pathologie. Ces symptômes évoluent de manière lente sur une dizaine d'années et s'aggravent progressivement entrainant finalement une invalidité et une perte d'autonomie pour les personnes atteintes. Aujourd'hui, les seuls traitements de la maladie de Parkinson sont symptomatiques. Ils permettent une amélioration des conditions de vie et une diminution des symptômes mais ils ne sont efficaces que sur une partie des patients et ils ne permettent pas la guérison des malades. De nombreuses recherches restent à effectuer pour d'une part diagnostiquer plus tôt la maladie et d'autres part trouver des solutions thérapeutiques pour bloquer l'évolution de la pathologie et guérir les patients atteints. D'un point de vue neuropathologique, la maladie de Parkinson se manifeste par la dégénérescence de neurones principalement dopaminergiques présents dans la substance noire et qui projettent leur axone dans le striatum. Ces neurones produisent la dopamine, neurotransmetteur indispensable dans le contrôle des mouvements du corps. Leur dégénérescence au sein de la substance noire induit alors la perte de la neurotransmission dopaminergique dans le striatum et l'apparition des premiers symptômes. Cette perte neuronale est à relier avec l'apparition d'inclusions protéiques intracellulaires, appelés corps de Lewy, constitués par l'accumulation d'α-synucléine.

La maladie de Parkinson se manifeste de manière sporadique et serait liée à l'influence de plusieurs facteurs environnementaux. Ainsi, il a été montré que l'utilisation ou la proximité avec un composé présent dans les pesticides et les insecticides, le MPP^+, peut provoquer chez les personnes concernées l'apparition de la maladie (Langston and Ballard, 1983). Par ailleurs, il a également été suspecté que l'exposition aux métaux et les traumatismes crâniens sont des facteurs de risques de la pathologie. Finalement, des études cliniques semblent montrer que le vieillissement peut être directement relié à la maladie de Parkinson : le

risque de développer la maladie étant significativement accrue après 60 ans (en 1997, la prévalence passait de 0,6% entre 65 et 69 ans à 3,5% entre 85 et 89 ans) (De Rijk et al., 1997). Cependant, quelques formes familiales de la maladie ont été décrites et mettent en cause des mutations spécifiques, pouvant impliquer l'α-synucléine, la parkine (*PARK2*), l'ubiquitine hydrolase L1 (*UCH-L1*), la *leucine-rich repeat kinase 2* (*LRRK2*), la *PTEN-induced putative kinase 1* (*PINK-1*) et un senseur de stress oxydant (*DJ-1*) dont nous reparlerons ultérieurement (Lubbe and Morris, 2014). Ces protéines sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires telles que la physiologie synaptique, la mitochondrie, le stress oxydant ou encore le système ubiquitine protéasome (UPS pour *Ubiquitin-Proteasome System*) (Martin et al., 2010).

I.2.c.Maladie de Huntington

La maladie de Huntington est une maladie héréditaire et orpheline qui se traduit par une dégénérescence neurologique entrainant d'importants troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques. Elle fut décrite pour la première fois en 1872 par Georges Huntington. D'un point de vue clinique, la maladie de Huntington se déclare généralement entre 35 et 42 ans et conduit à la mort 15 à 20 ans après le début de la pathologie. On dénombre 4 à 8 cas pour 100000 personnes, soit environ 6000 malades en France. Les symptômes se manifestant dans la maladie évoluent continuellement au cours du temps. L'un des premiers signes de la maladie, survenant la plupart du temps avant les troubles moteurs, est le changement de personnalité du sujet malade. Celui-ci peut se traduire par une apathie, une agressivité, une irritabilité voire une dépression qui peuvent être difficile à gérer pour l'entourage. Des troubles cognitifs sont également un signe de la maladie : un ralentissement des processus intellectuels est décrit ainsi que des troubles du langage. Le signe caractéristique de la maladie de Huntington est l'apparition de mouvements choréiques typiques (la maladie de Huntington est d'ailleurs également connue sous le nom de chorée de Huntington). Ces mouvements sont décrits comme involontaires, imprévisibles, brefs, irréguliers, arythmiques, assez stéréotypés, de grande amplitude, associés à une hypotonie et à une incoordination motrice à l'origine de troubles de l'équilibre et de difficultés de la marche. Les sujets atteints par la maladie présentent également des troubles de l'élocution et de déglutition. On comprend donc la portée fortement et rapidement handicapante de cette maladie. Aujourd'hui, il n'y a aucun traitement connu et les patients succombent en général de complications induites par les différentes manifestations de la maladie.

Contrairement aux deux précédentes pathologies majoritairement sporadiques, la maladie de Huntington est une maladie à expansion de glutamine qui se transmet de manière héréditaire autosomique dominante. Le gène associé à la maladie, appelé *IT15*, est localisé sur le bras court du chromosome 4. Il contient une répétition du codon CAG qui est polymorphe et instable. La mutation de ce gène entraine la maladie lorsque l'expansion de la répétition dépasse 40 codons CAG, induisant alors le développement d'un nombre élevé de résidus glutamine dans la partie N-terminale de la protéine huntingtine. Une des caractéristiques de cette maladie est le phénomène d'anticipation. En effet, il a été montré que le nombre de répétitions CAG tend à augmenter au cours des générations successives. De plus, il existe une forte corrélation inverse entre la taille de la répétition CAG dans le gène *IT15* et l'âge d'apparition des symptômes : plus la répétition CAG est longue, plus les symptômes se déclarent précocement (Gusella and MacDonald, 2000). D'un point de vue neuropathologique, la maladie de Huntington se manifeste principalement par une dégénérescence des neurones du striatum, tout d'abord dans le noyau caudé puis dans le putamen. La perte neuronale évolue progressivement et finit par atteindre le cortex cérébral aux stades tardifs de la maladie. Cette perte neuronale est liée à la formation d'inclusions protéiques nucléaires et cytoplasmiques de la huntingtine mutée. En effet, la mutation entraîne un changement conformationnel de la protéine qui a alors tendance à s'accumuler et à s'agréger. Cependant, les mécanismes précis qui sont impliqués dans le processus pathogénique de la huntingtine mutée demeurent mal connus. La manière dont la mutation de la huntingtine, protéine ubiquiste ayant de nombreuses fonctions biologiques dans la cellule, provoque l'apparition et l'évolution de la maladie mène à des considérations qui dépassent le cadre de ce manuscrit.

I.2.d. Sclérose latérale amyotrophique (SLA)

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), également appelée maladie de Charcot, touche environ 8000 personnes en France (soit 1/10 000). Il s'agit d'une maladie neurodégénérative gravissime touchant principalement le système moteur. La maladie se déclare à l'âge adulte entre 40 et 80 ans et évolue très rapidement en 3 à 5 ans vers la paralysie complète et le décès du malade par paralysie des muscles respiratoires. En effet, la pathologie se caractérise par une dégénérescence des motoneurones qui conduisent l'information du cerveau jusqu'aux muscles. La perte de ces neurones entraine l'affaiblissement et l'atrophie des muscles, affectant ainsi la dextérité et la démarche.

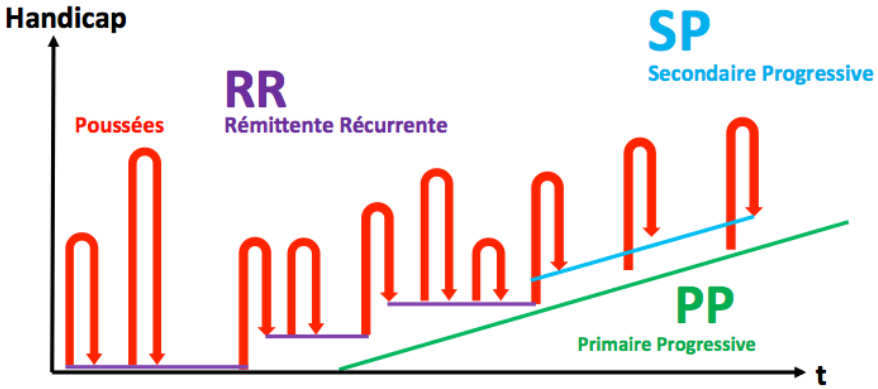
Les patients manifestent également des signes bulbaires : difficulté de langage et de déglutition. Il n'y a actuellement pas de traitement curatif de la maladie mais plusieurs traitements symptomatiques sont aujourd'hui utilisés pour améliorer le confort de vie des patients et leur permettre une autonomie un peu plus longue. Tandis qu'une majorité des cas (90%) de SLA apparaissent de manière sporadique, on dénombre également environ 10% de forme familiale de la maladie. Différentes mutations sur plusieurs gènes ont été identifiées pour leur rôle dans l'apparition de la SLA dans les formes familiales. Parmi celles-ci, on peut citer les mutations du gène *SOD1* (superoxide dismutase), décrit comme un antioxydant essentiel au fonctionnement cellulaire ; du gène *TDP-43*, répresseur transcriptionnel dont la forme hyper-phosphorylée, ubiquitinylée et clivée est également impliquée dans les formes familiales de FTD; du gène *C9ORF72*, codant une protéine décrite dans le cytoplasme des neurones ainsi que dans les terminaisons synaptiques et impliquées dans les formes familiales de FTD et de SLA. (Kiernan et al., 2011)

Encore une fois, on se retrouve confronté à une maladie aux conséquences tragiques pour laquelle aucun traitement n'est aujourd'hui établi. Les voies moléculaires conduisant à la dégénérescence des motoneurones observés chez les patients ne sont pas clairement identifiées. Les mécanismes impliqués dans la maladie semblent donc complexes et englobent un ensemble de processus neuronaux, tels que les facteurs génétiques, l'agrégation de protéines, le stress oxydatif, l'excitotoxicité, des dysfonctionnements mitochondriaux, des perturbations du transport axonal, des défauts de l'appareil de Golgi ou encore l'implication des cellules gliales (Kiernan et al., 2011).

I.2.e.Scléroses en plaques

La sclérose en plaques est une maladie du SNC dans laquelle le système immunitaire est défaillant. Elle se caractérise par une réaction inflammatoire entrainant la destruction de la gaine de myéline qui protège les axones et facilite l'influx nerveux. Des attaques inflammatoires répétées au niveau de cette gaine vont donc altérer le transfert de cet influx nerveux et entraîner des troubles moteurs, des troubles sensitifs, des troubles de l'équilibre et des troubles visuel. Cette maladie concerne 80 000 personnes en France et se manifeste entre 20 et 50 ans. Contrairement aux autres maladies décrites précédemment, la sclérose en plaques peut se présenter sous deux formes différentes. La plupart du temps, la maladie se manifeste par poussées successives, de quelques jours à plusieurs semaines, durant lesquelles les différents symptômes se manifestent. Ces phases sont suivies par une rémission du

sujet mais peuvent laisser des séquelles irréversibles. Il s'agit de la forme rémittente et elle concerne 85% des cas. La seconde forme est dite progressive : elle apparaît généralement plus tardivement et il n'y a aucune phase de rémission observée. Quelque soit la forme de la pathologie, celle ci se révèle irrémédiablement handicapante pour les sujets atteints et influe sur l'espérance de vie des personnes affectées (diminution de 5 à 10 ans).



SEP	Mécanisme pathologique prédominant	Accumulation du handicap
RR	inflammation	par palliers
SP/PP	neuro-dégénérescence	progressive

Figure 6 : Les formes des scléroses en plaques. La forme rémittente caractérisée par des poussées et des zones de rémission (RR) et la forme progressive sans phase de rémission (PP). (tiré de https://blog.servier.fr/bientot-un-traitement-pour-toutes-les-formes-de-la-sclerose-en-plaques/)

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer les mécanismes impliqués dans la destruction de la gaine de myéline et le dysfonctionnement de la réponse immunitaire. Des causes génétiques et environnementales, infectieuses ou non, ont déjà été proposées (Ascherio and Munger, 2007a, 2007b) et de nombreuses équipes de recherche travaillent aujourd'hui pour identifier les voies moléculaires engagées dans le décours de la maladie et ainsi développer des traitements efficaces.

I.3. Lésion neuropathologique aigüe : l'ischémie

I.3.a. Les accidents vasculaires cérébraux

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont définis comme des déficits neurologiques soudain d'origine vasculaire. L'AVC est une maladie fréquente et grave, représentant la quatrième cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte (Go et al., 2013). L'AVC est également la deuxième cause de démence après la

maladie d'Alzheimer (Murray and Lopez, 1997). Les handicaps acquis par les malades sont liés à des déficits moteurs (paralysies) ou sensitifs, à des troubles du langage (aphasie) et également à des troubles cognitifs. Ces séquelles fortement handicapantes sont conservées chez environ 70% des patients qui survivent à un AVC.

I.3.b. L'ischémie cérébrale

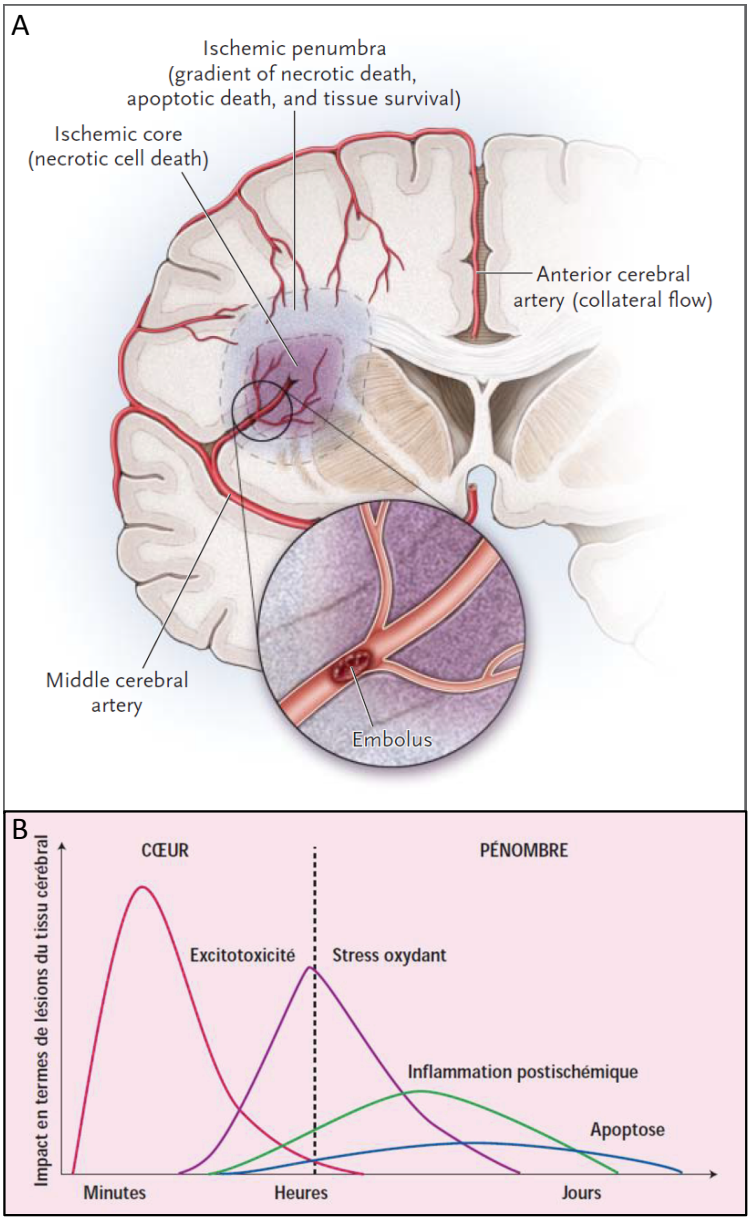


Figure 7 : L'ischémie cérébrale. (A) Schéma représentant le processus ischémique induit par l'obstruction d'une artère par un caillot (embolie). Initialement, la lésion est restreinte à une région spécifique appelée cœur de l'ischémie puis elle se propage et forme la pénombre. (B) Impact au cours du temps du processus ischémique et mécanismes moléculaires observés (Deplanque, 2006).

Les AVC sont dus, dans 87% des cas, à une ischémie cérébrale (également connue

sous le nom d'infarctus cérébral). L'ischémie se caractérise par une occlusion vasculaire cérébrale, causée par la compression d'une artère, par l'obstruction d'une artère par un caillot sanguin, par une hémorragie ou l'hypoperfusion d'un tissu cérébral. L'interruption locale du flux sanguin bloque l'apport en oxygène et en glucose dans la région ischémique induisant un déséquilibre métabolique. L'ischémie cérébrale peut être transitoire ou prolongée. Dans le premier cas, le flux sanguin est rapidement rétabli et le patient ne conserve que peu de séquelles de l'AVC. Dans le second cas, la lésion induite par l'ischémie se propage depuis le cœur ischémique jusqu'aux régions cérébrales adjacentes, appelées pénombre. Les tissus touchés subissent alors des modifications structurelles et morphologiques lourdes pouvant conduire à la mise en place de différents mécanismes de mort, tels que la nécrose ou l'apoptose. Ces modifications peuvent atteindre à la fois la substance grise et la substance blanche, et des phénomènes de dégénérescence axonale sont associés à ces cas d'ischémie cérébrale (Lama et al., 2011; Ueno et al., 2010).

I.3.c.Stratégies thérapeutiques

Comme nous l'avons mentionné, les déficits moteurs et cognitifs causés par l'AVC peuvent s'avérer lourdement handicapants si l'ischémie cérébrale n'est pas prise en charge très rapidement. Ainsi, en situation d'ischémie, le cerveau perd en moyenne 1,9 millions de neurones chaque minute. Cette notion d'urgence thérapeutique est résumée sous la formule « Time is brain » (Saver, 2006).

Beaucoup d'études effectuées sur des modèles animaux ont mis en évidence des traitements neuroprotecteurs lors d'ischémie. Cependant, ceux-ci ne se révèlent pas efficaces lors d'essais cliniques sur l'homme. La prévention et le traitement des ischémies cérébrales font l'objet de nombreuses études encore aujourd'hui et la découverte d'une stratégie thérapeutique contre les AVC est un enjeu majeur de la recherche en neurosciences.

I.3.d. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'ischémie

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la neurodégénérescence liés aux ischémies est essentielle. Le déséquilibre métabolique, induit par la privation en oxygène et en glucose de certaines régions cérébrales, engendre une cascade d'événements altérant le fonctionnement de la neurotransmission et de la mitochondrie ainsi que l'homéostasie calcique (Neumar, 2000; Pinard, 1998). Parmi ces

événements :

- La rupture de l'équilibre énergétique est associée à une dépolarisation neuronale, qui entraîne une libération excessive de neurotransmetteurs. Ce processus déclenche une excitotoxicité glutamatergique, que nous allons définir en tant que mécanisme commun aux maladies neurodégénératives. Ce phénomène, au cœur de mon projet, fait l'objet du chapitre IV de l'introduction.
- La dérégulation du système glutamatergique influe directement sur l'homéostasie calcique. L'augmentation de l'influx calcique provoque alors de nombreuses modifications délétères pour la cellule.
- Des dysfonctionnements massifs de la mitochondrie ont été reportés. En effet, le déficit énergétique induit par l'ischémie ainsi que la dérégulation calcique entrainent une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire et de la synthèse de l'ATP et une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) (Nita et al., 2001) et des espèces réactives de l'azote (RNS pour *Reactive Nitrogen Species*) (Nandagopal et al., 2001). Le stress oxydant est un événement majeur de l'ischémie cérébrale.

Les 5 maladies neurodégénératives passées en revue dans cette partie présentent des spécificités propres et soulèvent la complexité d'appréhension des maladies neurodégénératives dans leur ensemble. Les symptômes des différentes maladies se manifestent par des troubles aussi bien moteurs, sensitifs, cognitifs et/ou psychiatriques. L'épidémiologie diffère en fonction des pathologies. Certaines, comme la maladie de Huntington sont essentiellement liées à des facteurs génétiques, d'autres se manifestent de manière sporadiques et sont multifactorielles. La plupart se caractérisent par une progression lente et surviennent à un âge avancé. Le taux d'incidence de ces pathologies au sein de notre population est très variable. Cependant, des similitudes ressortent également de cette revue : le rôle du vieillissement, de l'agrégation de protéines spécifiques, du stress oxydatif ainsi que des dysfonctionnement de la transmission neuronale et de la neuroinflammation. Ces similitudes, plus ou moins marquées selon les pathologies, se retrouvent également dans les lésions cérébrales aigües survenant notamment lors d'AVC et d'ischémies. Il semble pertinent de relier ces mécanismes et de les étudier de manière transversale pour une meilleure compréhension des processus neurodégénératifs. C'est dans cet objectif que la suite de ce chapitre s'inscrit.

II. Mécanismes communs aux différentes pathologies

II.1.Agrégation de protéines spécifiques

II.1.a. Les agrégats dans les différentes maladies neurodégénératives

Comme nous avons pu le voir précédemment, les maladies neurodégénératives se définissent selon différentes caractéristiques. Entre autres, il a été observé l'agrégation de protéines spécifiques dans les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et la SLA. Ces agrégats correspondent à l'accumulation de peptides ou protéines, ces dernières comportant généralement une modification de conformation et un mauvais repliement. Les protéines mal repliées sous forme monomérique ont la capacité d'interagir et de former des structures plus complexes, allant du dimère aux agrégats fibrillaires, en passant par des intermédiaires oligomériques. Dans la plupart des maladies neurodégénératives, les agrégats forment des structures appelées fibrilles d'amyloïdes : ce sont des structures filamenteuses d'une largeur d'environ 10nm et d'une longueur comprise entre 0,1 et 10µm, reconnaissables par une organisation en feuillets β.

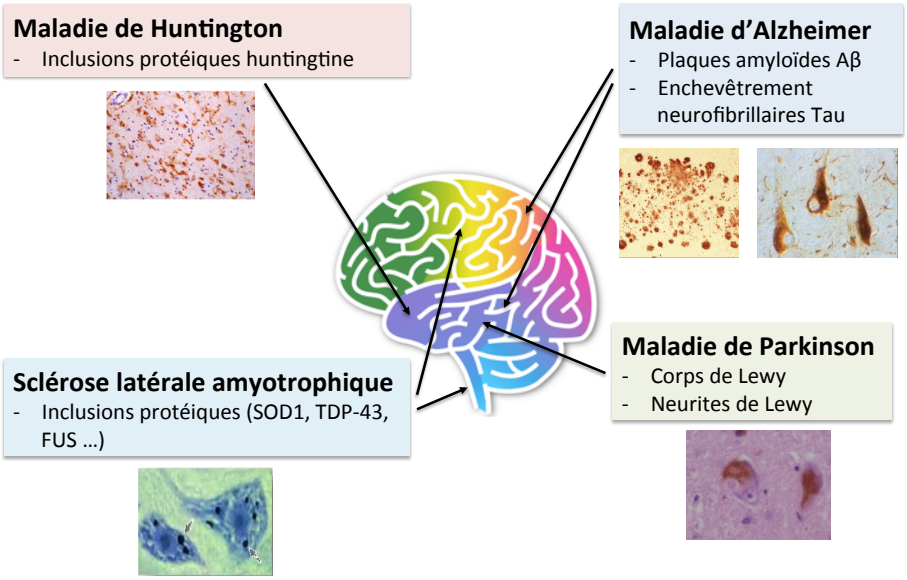


Figure 8 : Agrégation de protéines dans les différentes maladies neurodégénératives. (Bertram et al., 2005)

Les fibrilles d'amyloïdes les plus caractérisées sont celles formées à partir du peptide β-amyloïde impliqué dans la maladie d'Alzheimer. Dans cette pathologie, les agrégats sont à l'extérieur de la cellule et proviennent du clivage de l'APP (p.33). On observe également des agrégats intracellulaires dus à l'accumulation de la protéine Tau, appelés enchevêtrements neurofibrillaires. Les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent, quant à eux, des

inclusions protéiques localisées dans le cytoplasme proche du noyau et appelées corps de Lewy. Ces inclusions ont également été observées dans les neurites où elles sont alors appelées neurites de Lewy. Ces agrégats sont constitués en majorité de protéines d'α-synucléine accumulées mais il a également été détecté de l'ubiquitine, une protéine interagissant avec la synucléine appelée synphiline-1, des protéines constituant le protéasome et le cytosquelette. Dans le cas de la maladie de Huntington, une mutation spécifique code une protéine huntingtine mutée présentant une répétition de glutamine. L'agrégation de la huntingtine mutée forme des inclusions nucléaires et cytoplasmiques. Les formes familiales de la SLA induites par une mutation de SOD1 présentent également des agrégats de SOD1 ubiquitinylés qui peuvent être reliés à la pathologie.

II.1.b. Initiation de l'agrégation lors du vieillissement et des processus neurodégénératifs

On constate donc un processus commun d'agrégation protéique dans plusieurs maladies neurodégénératives menant à la formation de structures fibrillaires d'amyloïdes dans la plupart des cas. Quel est le déclencheur d'un tel processus agrégatif ?

Un des premiers facteurs déclenchant le processus d'agrégation est l'augmentation de concentration de protéines spécifiques : plus il y a de protéines, plus la probabilité qu'elles soient mal repliées et qu'elles interagissent entre elles est grande. Ce phénomène est favorisé lors de mutations spécifiques. Par exemple, des cas familiaux de la maladie de Parkinson présentent un triplicata du locus de l'α-synucléine (Singleton et al., 2003); les sujets atteints du syndrôme de Down ont une copie supplémentaire du locus de l'APP sur le chromosome 21 (Singleton et al., 2004).

Le mauvais repliement des protéines peut également être un facteur de l'agrégation. Au cours du vieillissement, de nombreuses fonctions de la cellule se détériorent et perdent en efficacité. Ainsi, la capacité des cellules à éliminer les protéines mal repliées diminue et ce *via* le déclin de l'UPS et de la voie autophagosome-lysosome (ALP pour *Autophagosome-Lysosome Pathway*). De plus, le vieillissement est associé à une augmentation de l'inflammation et du stress oxydant, deux processus sur lesquels nous reviendrons plus loin. Ces phénomènes entrainent de nombreuses modifications protéiques : oxydation, nitration, phosphorylation, ubiquitination et clivage protéolytique. Parmi celles-ci, l'oxydation des protéines peut faciliter la formation d'agrégats comme le montre la capacité de l'α-synucléine oxydée à s'agréger (Conway et al., 2001). La phosphorylation des protéines a également été

décrite dans plusieurs pathologies pour induire la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires.

Ainsi le processus agrégatif peut être déclenché par une diversité de facteurs génétiques et moléculaires dépendant, dans une majorité des cas, du vieillissement de la cellule. Mais, quelles sont les conséquences de ces agrégats protéiques sur les cellules?

II.1.c. Effets cytotoxiques des structures agrégatives ?

Le lien entre l'agrégation protéique et les dégénérescences neuronales observées au cours des maladies neurodégénératives est sujet à controverse.

En effet, plusieurs études ont montré que les agrégats protéiques pouvaient avoir des effets protecteurs sur la cellule et jouer un rôle bénéfique dans les pathologies. En particulier, plusieurs études montrent que les inclusions protéiques de huntingtine mutée ne sont pas toxiques *in vivo* (Slow et al., 2005), voire réduisent les quantités intracellulaires de huntingtine mutée et diminuent la mort neuronale (Arrasate et al., 2004).

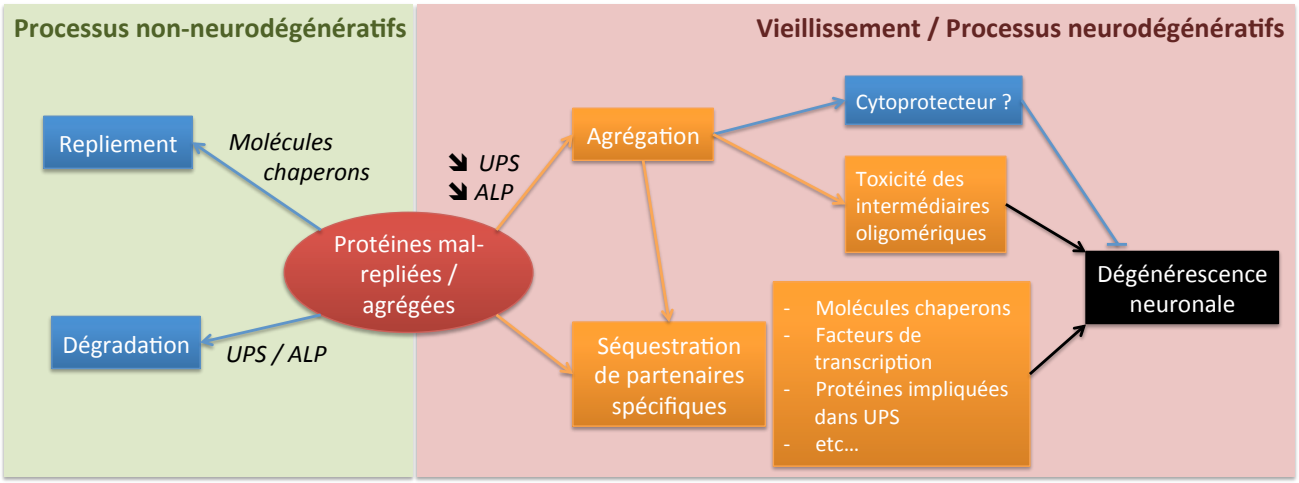


Figure 9: Schéma récapitulant le rôle de l'agrégation protéique dans les processus neurodégénératifs. En condition physiologique normale, le mauvais repliement des protéines est pallié par l'action de molécules chaperons, du système UPS et de l'ALP. Lors du vieillissement ou de processus neurodégénératifs, ces deux systèmes sont moins efficaces et le mauvais repliement des protéines mène à une agrégation cytotoxique et à la séquestration de partenaires spécifiques essentiels pour le bon fonctionnement de la cellule.

Cependant, un grand nombre d'études ont mis en avant des effets neurotoxiques de l'agrégation protéique :

- L'agrégation protéique peut induire une perte de fonction des protéines impliquées (Hsu et al., 2014).

- Les structures intermédiaires de type oligomérique peuvent endommager la membrane plasmique en formant des pores à travers les bicouches lipidiques (Cecchi and

Stefani, 2013; Kagan, 2012). De plus, ces structures sont des cibles du protéasome, le sollicitant pour leur dégradation. Elles sont donc susceptibles de bloquer le protéasome et de modifier son activité (Emmanouilidou et al., 2010; Tseng et al., 2008). Très récemment, Woerner *et al.* ont montré que les agrégats localisés au niveau cytoplasmique peuvent interférer avec le transport nucléocytoplasmique des protéines et des ARN et contribuer à la dégénérescence cellulaire (Woerner et al., 2016).

- Outre leur toxicité intrinsèque, les agrégats protéiques participent à la neurodégénérescence *via* la séquestration de partenaires essentiels à la cellule : molécules chaperons qui participent à la stabilité et au bon repliement des protéines ; protéines impliquées dans l'UPS ; facteurs de transcription et/ou ARN.

La toxicité des agrégats protéiques et la séquestration de partenaires essentiels au fonctionnement de la cellule suggèrent l'importance de l'agrégation protéique dans les processus de neurodégénérescence. Parmi les cibles thérapeutiques susceptibles de pallier à cette agrégation, il est important de noter le rôle des molécules chaperons dans le bon repliement des protéines mais également celui du système UPS et de l'ALP.

II.2. Le stress oxydant

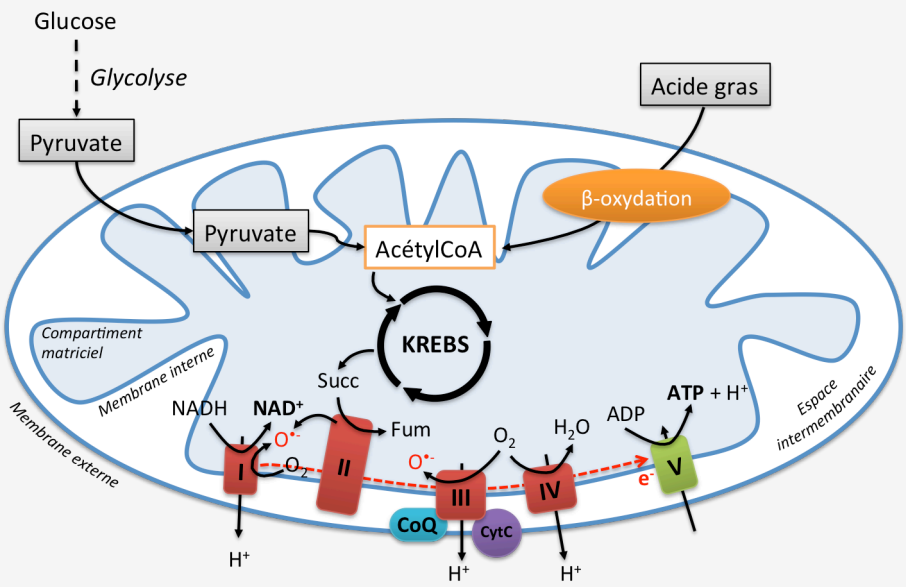
L'apport en oxygène est indispensable pour répondre à la demande énergétique de la plupart des tissus biologiques. Mais les réactions impliquant l'oxygène peuvent donner lieu à la formation d'espèces chimiques radicalaires, dont les effets peuvent être nocifs pour les cellules. Le cerveau est un organe particulièrement vulnérable aux effets des ROS et des RNS, étant donné son métabolisme oxydatif important. En effet, bien que celui-ci ne représente que 2% du poids total de notre corps, le cerveau participe de l'ordre de 20% à la consommation globale en oxygène. Le stress oxydant est engendré par un déséquilibre de l'état redox de la cellule, dû à la fois à une surproduction de ROS et de RNS et à un dysfonctionnement du système antioxydant. Nous allons donc nous intéresser aux effets du stress oxydant sur le fonctionnement cellulaire, à son rôle dans les processus neurodégénératifs et, plus spécifiquement, à son implication dans les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et dans la SLA.

LES MITOCHONDRIES

Les mitochondries sont des organites présents dans la plupart des cellules eucaryotes, qui contribuent à des fonctions cellulaires cruciales dans le métabolisme énergétique. Les mitochondries participent à l'essentiel de la production d'ATP dans les cellules *via* le cycle de Krebs, la β-oxydation et le processus de phosphorylation oxydative au niveau de la chaîne respiratoire. Les mitochondries régulent également le catabolisme des acides aminés ainsi que le stockage du calcium. Les mitochondries sont constituées de deux membranes (externe et interne) délimitant un espace intermembranaire et un compartiment matriciel.

La membrane interne supporte la chaîne respiratoire et joue ainsi un rôle essentiel dans la respiration mitochondriale. Les enzymes du cycle de Krebs sont chargées de l'oxydation des acétylCoA, provenant de la dégradation des sucres par la pyruvate déshydrogénase et de la β-oxydation des acides gras, en dioxyde de carbone CO_2 et équivalents réducteurs sous forme de NADH et $FADH_2$. La chaîne respiratoire mitochondriale, dont la fonction essentielle est de réoxyder les co-enzymes réduits au cours du catabolisme, est constituée d'un ensemble de cinq sous-unités :

- NADH déhydrogénase (Complexe I)
- Succinate déhydrogénase (Complexe II)
- Coenzyme Q-cytochrome réductase (Complexe III)
- Cytochrome C oxydase (Complexe IV)
- FoF_1-ATP synthase (Complexe V).



Les mitochondries sont des organites semi-autonomes, pouvant ainsi synthétiser leurs propres protéines. Cependant, ce système est limité et la régulation des protéines mitochondriales dépend également du génome nucléaire. Le facteur de transcription PGC-1α (PPARγ Coactivator 1α; PPARγ : *Peroxysome Proliferator Activated Receptor γ*) est ainsi essentiel dans la régulation de plusieurs fonctions mitochondriales, telle que la biogenèse des mitochondries.

La chaîne respiratoire permet la réduction de l'oxygène moléculaire par transfert d'électrons à travers les différents complexes. Ce transfert se fait notamment à partir des équivalents réduits NADH et $FADH_2$ issus du cycle de Krebs. Ce flux d'électrons est associé à un transfert actif de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire constituant un gradient électro-chimique qui participe à l'établissement du potentiel de la membrane mitochondriale. Les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire fonctionnent ainsi comme pompes à protons pour la formation de ce gradient. L'ATP est alors généré par dissipation du gradient de protons à travers la FoF_1-ATP synthase (complexe V). Il est important de noter que le NADH est le co-enzyme majoritairement produit lors du catabolisme oxydatif et qu'il participe de façon importante à la production de l'ATP et à la formation du potentiel de membrane mitochondriale grâce à sa ré-oxydation au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire.

Les mitochondries forment un réseau dynamique d'organites. Elles sont capables de se déplacer rapidement dans la cellule grâce au réseau de microtubules et sont également susceptibles de fusionner et de fissionner. Ce processus est essentiel dans le fonctionnement cellulaire.

Des dysfonctions sévères des mitochondries (dysfonctions de la chaîne respiratoire, stress oxydant, réduction des taux en ATP, dérégulation calcique, modification de la perméabilité membranaire, perturbation de la dynamique mitochondriale…) peuvent engendrer des pathologies graves, communément regroupées sous le terme maladies mitochondriales. Beaucoup de ces dysfonctions ont été décrites lors du vieillissement et dans des pathologies liées au vieillissement et sont ainsi impliquées de manière plus globale dans les maladies neurodégénératives discutées précédemment.

II.2.a. Caractéristiques des ROS et des RNS

- **Les différentes espèces réactives de l'oxygène et de l'azote**

La molécule d'oxygène possède deux électrons non-appariés dans sa couche électronique externe, ce qui en fait une espèce chimique extrêmement réactive susceptible, par perte d'un de ses électrons, de former des radicaux. Les ROS sont un groupe de molécules dérivées de l'oxygène, extrêmement réactives et peu stables. Parmi les ROS, on trouve des radicaux libres comme le radical anion superoxide, $O_2^{\bullet -}$, le radical hydroxyl ($^{\bullet}OH$), et des non-radicaux comme le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2.

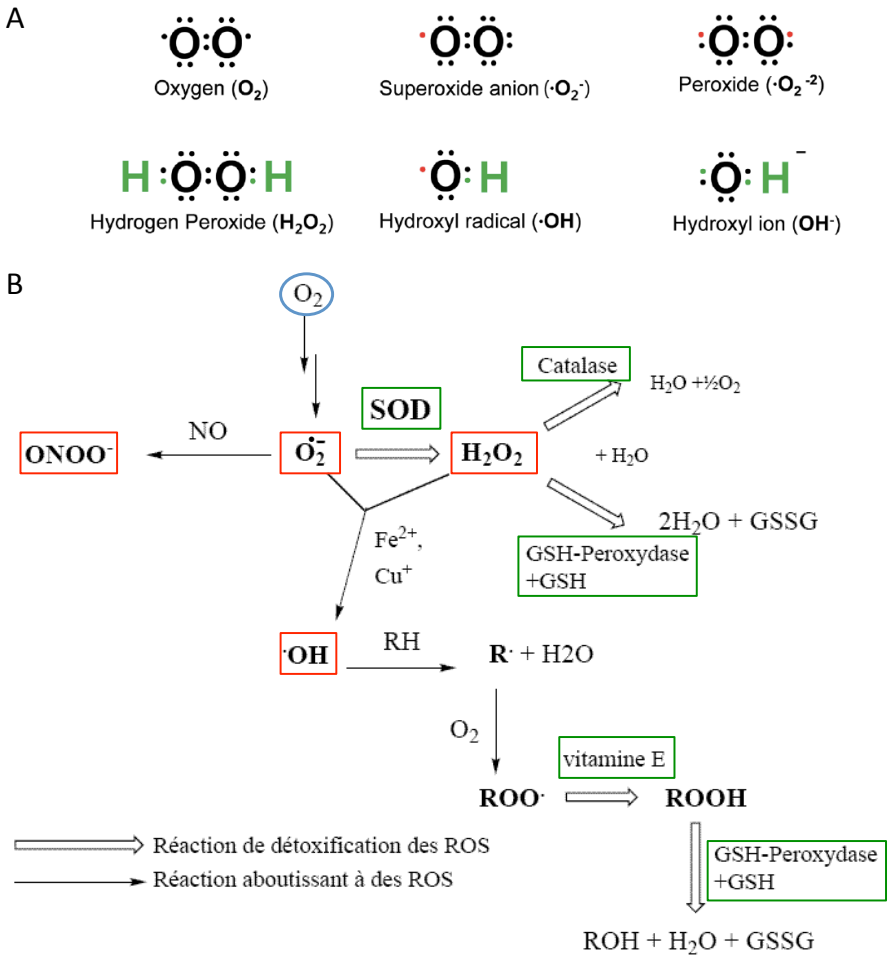


Figure 10 : ROS & RNS. A) Les principales ROS (Kim et al., 2015). B) Réactions de formation des ROS et des RNS.

Par l'action de la superoxyde dismutase (SOD), $O_2^{\bullet -}$ peut être transformé en H_2O_2, plus stable. H_2O_2 peut à son tour générer la formation du radical hydroxyle $^{\bullet}OH$ lors d'une réaction catalysée par les ions ferreux. D'autre part, l'oxyde nitrique (NO), source des RNS, réagit spontanément avec l'anion syperoxyde $O_2^{\bullet -}$ pour forme le peroxynitrite $ONOO^-$. $^{\bullet}OH$ et $ONOO^-$ ont été décrits comme très réactifs et majoritairement responsables des effets

cytotoxiques.

- **La formation des ROS et des RNS**

Les ROS peuvent être générées par l'intermédiaire de sources endogènes ou de sources exogènes. Parmi les sources exogènes, on peut citer les rayons UV, les rayons ionisants, certains médicaments dont le mécanisme d'action est régulé par la production de ROS mais également des toxines ou des produits chimiques présents dans l'environnement.

Les mitochondries sont les sources endogènes majoritaires de production de ROS dans la plupart des cellules. Cette production se fait *via* les différents complexes de la chaine respiratoire (cf encadré), dont le rôle dans la production des ROS dépend du type cellulaire et des conditions physiologiques. Le complexe I et le complexe III sont les sources majoritaires de $O_2^{\bullet -}$ dans la mitochondrie. De plus, le complexe I est décrit comme particulièrement important dans la production des ROS dans les situations pathologiques, par exemple lors du vieillissement ou de maladies neurodégénératives (Zorov et al., 2014).

Une autre source endogène importante est le complexe enzymatique transmembranaire NADPH oxydase (Nox), qui produit des molécules de $O_2^{\bullet -}$ en catalysant le transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire. (Babior, 2004).

L'oxyde nitrique (NO) est produit dans les cellules par l'action d'un groupe d'enzymes appelées synthases de l'oxyde nitrique (NOS pour *Nitric Oxide Synthase*).

- **Les antioxydants**

Les niveaux cellulaires en ROS peuvent être diminués grâce à l'action d'enzymes antioxydantes : SOD (cytosolique et mitochondriale), la catalase (peroxysomale), les thiorédoxines et les glutathion peroxydases (GPX, cytosolique et mitochondriale) (Gandhi and Abramov, 2012). Parmi les 8 isoformes de GPX présentes chez les mammifères, la GPX 1 a été décrite comme l'enzyme antioxydante majoritaire dans le cerveau, exprimée essentiellement dans les cellules gliales. En outre, J. Power et P. Blumbergs ont montré en 2009 que les cellules gliales exprimant la GPX1 sont impliquées dans la dégradation des corps de Lewy caractéristiques de la maladie de Parkinson et de la démence à corps de Lewy (Power and Blumbergs, 2009). Il a également été décrit des antioxydants non enzymatiques tels que le glutathion réduit (GSH), la vitamine E et la vitamine C (Dasuri et al., 2013). Le NADPH est également un élément essentiel dans la formation des antioxydants. En effet, ce dernier est un donneur d'ion hydrure participant à la régulation des taux de GSH dans les cellules *via* le cycle du glutathion.

II.2.b. Importance physiologique des ROS et des RNS

- **Fonctions physiologiques des ROS**

Bien que des concentrations élevées en ROS puissent entrainer la dégradation de lipides, de protéines et de l'ADN, il a largement été montré que des niveaux intermédiaires en ROS sont nécessaires pour certaines fonctions physiologiques importantes.

En particulier, les ROS sont essentielles dans la signalisation cellulaire. Ainsi, les ROS issues des Nox jouent un rôle dans la signalisation cellulaire du système cardio-vasculaire (Zou, Ping Song, 2012) et participent au mécanisme de défense du système immunitaire (Babior, 2004). De plus, l'augmentation de ces ROS provoque l'activation de la voie des MAP kinase (MAPK pour *mitogen-activated protein kinase*) et de la voie PI3K/Akt (pour phosphoinositide 3-kinase /Akt). L'activation des ces voies module de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'expression génique, la croissance, la prolifération, la migration cellulaire et l'apoptose.

Les ROS sont également impliquées dans l'activation de facteurs de transcription qui régulent les réponses cellulaires aux ROS. Ainsi, l'augmentation des ROS entraine une régulation des antioxydants afin de contrer cette augmentation. Par exemple, Nrf2, le principal facteur de transcription activé par le stress oxydant, régule l'expression de plusieurs protéines antioxydantes telles que SOD et GPX (de Vries et al., 2008). Les mécanismes de défense face à une augmentation des ROS sont également activés par le facteur de transcription NF-κB (pour Nuclear-Factor-kappa B). Ce dernier a été décrit pour activer des gènes cibles impliqués dans la survie cellulaire, la croissance, la différentiation et l'inflammation. Ainsi, des niveaux moyens en ROS déclenchent l'activation de NF-κB qui à son tour conduit à l'activation transcriptionnelle de protéines anti-apoptotiques et de gènes impliqués dans la régulation des niveaux de ROS mitochondriaux tels que SOD2 (Bubici et al., 2006). Le facteur de transcription P53, suppresseur de tumeur, a un rôle plus mitigé face à la production de ROS car il peut participer à la fois à des mécanismes de mort et de survie. En effet, P53 est connu comme initiateur de l'apoptose mais il présente un rôle pro-survie en régulant plusieurs antioxydants lorsque les niveaux intracellulaires en ROS augmentent (Hussain et al., 2004).

Dans leur ensemble, ces différentes études montrent que bien que des niveaux élevés de ROS soient toxiques pour la cellule, des taux modérés jouent un rôle fondamental dans plusieurs voies de pro-survie, que ce soit *via* l'activation de voies des signalisation MAPK et

PI3K/Akt ou *via* l'activation de facteurs de transcription.

- **Stress oxydant & dysfonctionnements mitochondriaux**

Comme nous venons de le voir, il existe un équilibre entre la production de ROS et la synthèse / activité des antioxydants en condition physiologique normale. Le stress oxydant correspond donc à un déséquilibre entre ces 2 paramètres, aboutissant à une accumulation de ROS. Les ROS sont capables de cibler différents substrats dans la cellule, engendrant une oxydation de protéines, d'ADN et d'ARN ainsi qu'une peroxydation de lipides. Les ROS et les RNS sont également importantes dans la régulation de la fonction mitochondriale, entres autres dans la modulation de l'activité de la chaîne respiratoire par l'inhibition du complexe IV et par la modification de l'équilibre redox NAD^+/NADH. Elles sont également impliquées dans la modulation de l'activité de nombreuses enzymes du métabolisme influant ainsi sur le cycle de Krebs. L'excès de ROS et de RNS conduit donc en grande partie à l'altération de fonctions mitochondriales et au développement de processus neurodégénératifs.

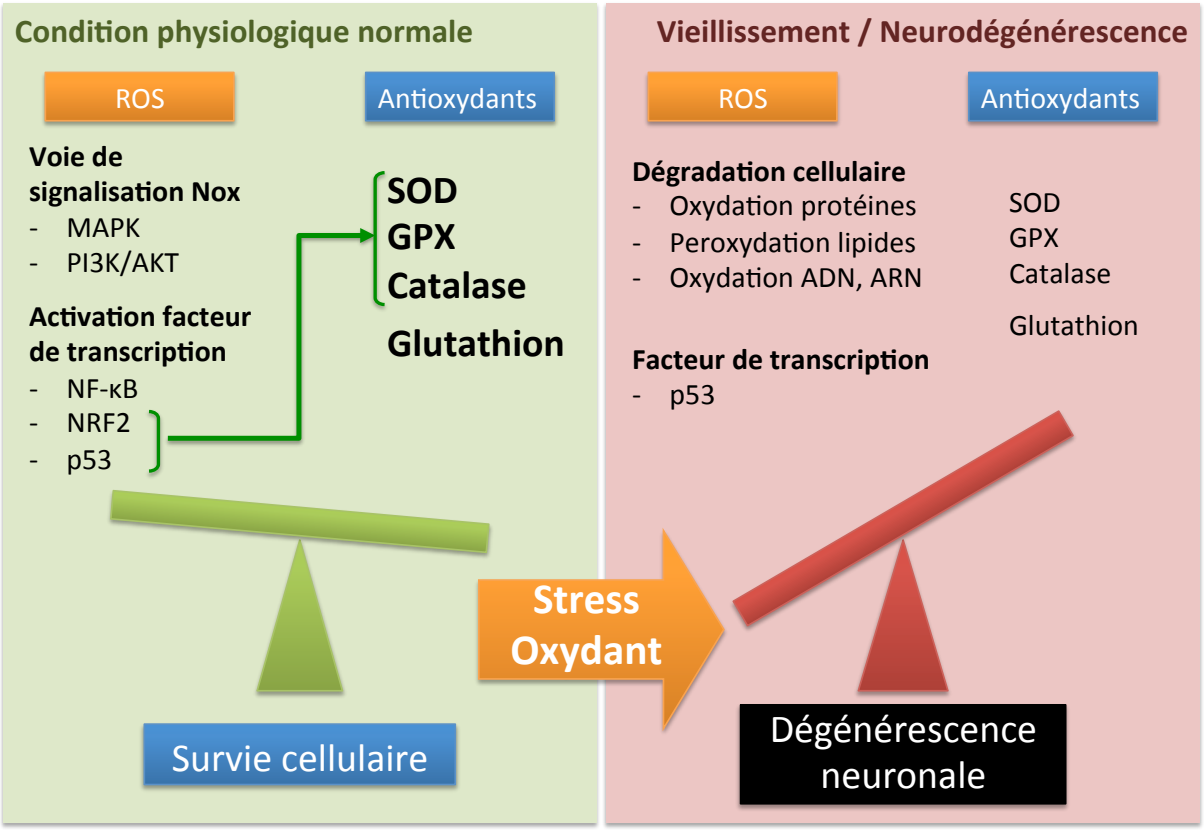


Figure 11 : Schéma récapitulant les fonctions physiologiques des ROS et le principe du stress oxydant.

En particulier, le stress oxydant est un phénomène commun aux maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et à la SLA. Le lien stress oxydant/dysfonctionnement mitochondrial/neurodégénérescence est donc indéniable mais la

nature de ce lien est encore relativement mal connue. Le stress oxydant est-il la conséquence d'autres processus dégénératifs, tels que l'agrégation de protéines, dont nous venons de discuter, ou de l'excitotoxicité ? Ou est-il, au contraire, le déclencheur de ces processus dégénératifs ?

II.2.c. Implication du stress oxydant dans le vieillissement et les maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives mentionnées dans le paragraphe précédent se manifestent pour la plupart à un âge avancé. Nous avons vu dans la description de ces maladies que le vieillissement était un facteur de risque pour chacune d'entre elles. En effet, lors du vieillissement, un grand nombre de fonctions cellulaires est altéré. Les dysfonctionnements mitochondriaux, le stress oxydant et l'inflammation sont autant de facteurs que l'on retrouve lors du vieillissement et qui conduisent à un déclin cognitif et à d'autres pathologies. Nous allons donc discuter de la manière dont le stress oxydant se manifeste dans les différentes maladies neurodégénératives.

- **Agrégations protéiques, dysfonctions mitochondriales et stress oxydant**

Une production excessive de ROS a été décrite dans plusieurs pathologies neurodégénératives en lien avec l'agrégation de protéines spécifiques. Ainsi, la présence de plaques amyloïdes dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer a été reliée à des dysfonctionnements mitochondriaux et à une défaillance énergétique, induisant un stress oxydant (Caspersen, 2005; Manczak et al., 2006). De même, dans des modèles murins de la maladies de Parkinson, il a été montré que l'expression d'α-synucléine mutée est toxique et induit des dysfonctions de la mitochondrie, une augmentation des ROS et une mort cellulaire (Devi et al., 2008; Martin, 2006). De plus, des signes d'augmentation de ROS (dégradation de l'ADN nucléaire et mitochondrial) ont été observés dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Wang et al., 2005a). La dynamique mitochondriale est également affectée par les agrégats protéiques comme cela a été décrit dans la maladie de Huntington (Bossy-Wetzel, 2009) et d'Alzheimer (Wang et al., 2008a, 2010) où ceux-ci induisent la fragmentation des mitochondries et l'augmentation de la production de ROS. Une activité réduite de la chaîne respiratoire est également une conséquence de l'agrégation protéique impliquée dans la formation de ROS. Des cerveaux de malades parkinsoniens montrent une activité réduite du complexe I de la chaîne respiratoire, conduisant à une augmentation de ROS et à une dégénérescence neuronale (Blesa et al., 2015). La même observation est faite au

sein de cerveaux de patients atteints de la maladie de Huntington pour lesquels l'activité de la chaîne respiratoire et en particulier celle du complexe II est fortement diminuée (Kwong et al., 2006).

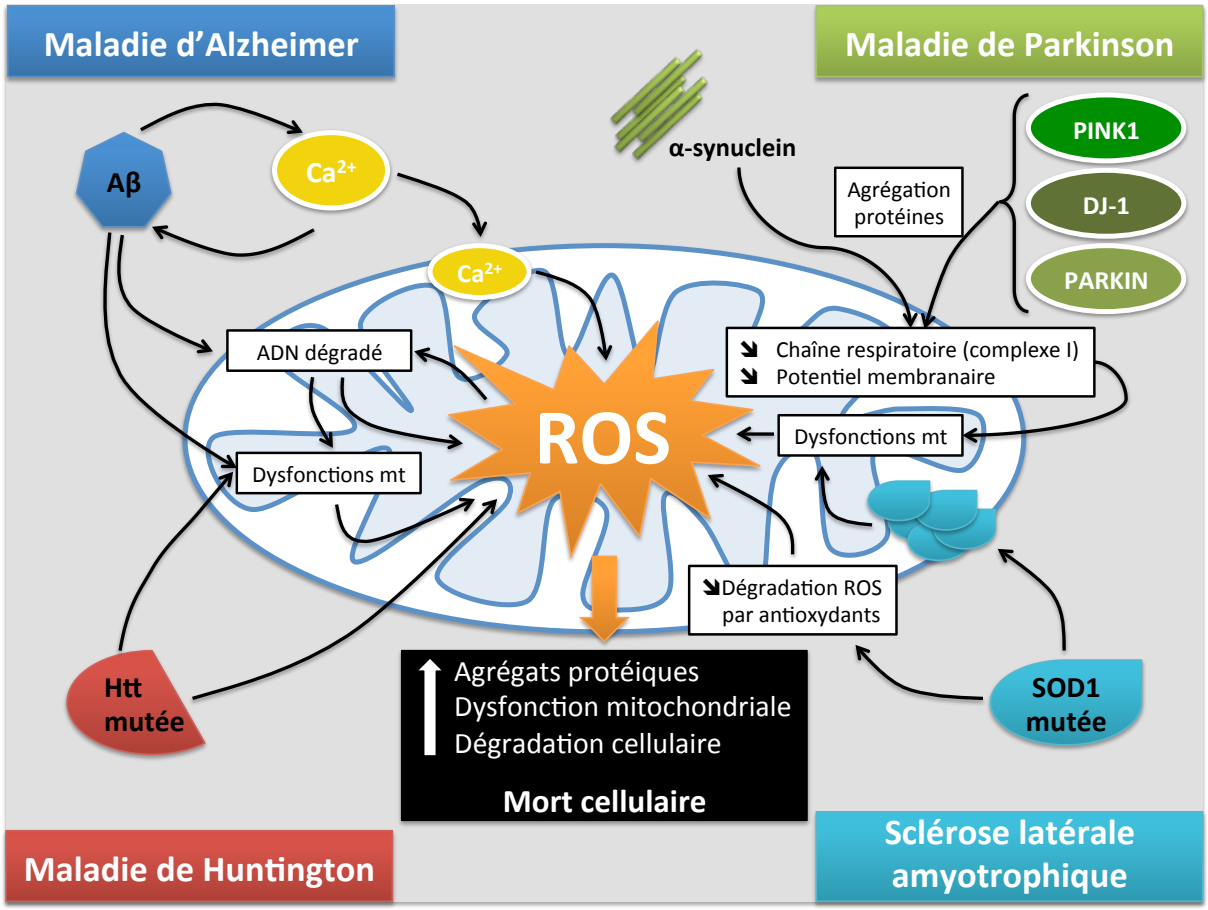


Figure 12 : Schéma des différents facteurs induisant l'augmentation des ROS dans les maladies neurodégénératives (inspiré de (Patten et al., 2010)).

Ces dysfonctions mitochondriales se retrouvent dans la SLA, où l'agrégation de la protéine mutée SOD1 bloque l'activité de la chaîne respiratoire (Beal et al., 1997; Vijayvergiya, 2005; Zimmerman et al., 2007). Dans la maladie de Parkinson, plusieurs gènes codant pour des protéines associées à des fonctions mitochondriales ont été identifiés: *PINK1*, *PARK2* (codant Parkine) et *PARK7* (codant DJ-1). Des mutations du gène *PINK1*, dans un modèle cellulaire de la maladie de Parkinson (Liu et al., 2009b) ou la perte de Parkine dans un modèle de souris déficiente (Palacino et al., 2004) provoquent des dysfonctions mitochondriales et induisent un stress oxydant. De plus, la perte de DJ-1 dans des neuroblastes murins est associée à l'augmentation de ROS mitochondriales, une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire et une réduction du potentiel membranaire mitochondrial (Krebiehl et al., 2010). Une fois de plus, le rôle de ces protéines peut être associé à la présence d'agrégats. L'équipe de Z. Zhang a ainsi décrit en 2009 que les trois protéines PINK1/Parkin/DJ-1 peuvent interagir et former

un complexe stimulant la dégradation de protéines agrégatives, empêchant leur accumulation et bloquant leur effets toxiques (Xiong et al., 2009).

Les dysfonctionnements de la mitochondrie induits par les agrégats de protéines dans les maladies neurodégénératives présentées dans ce chapitre sont étroitement associés avec une augmentation délétère du stress oxydant. Cependant, il est intéressant de noter que les ROS peuvent également provoquer l'accumulation d'agrégats, comme c'est le cas dans un modèle murin d'Alzheimer où une altération du métabolisme oxydatif induit la formation de plaques Aβ (Magill et al., 2010).

- **Homéostasie calcique et stress oxydant**

La dérégulation de l'homéostasie calcique, facteur important dans les maladies neurodégénératives que nous évoquerons dans un prochain paragraphe, entraîne une augmentation du stress oxydant, lié à une dégradation des mitochondries, et en particulier à une augmentation de la perméabilisation membranaire. Ainsi, la mutation de la protéine huntingtine, directement localisée sur la membrane externe de la mitochondrie, augmente la sensibilité à la perméabilisation induite par les flux calciques et le relargage de cytochrome c (Lin and Beal, 2006). La dérégulation de l'homéostasie calcique observée dans la maladie d'Alzheimer est également un facteur important dans la production de ROS, l'agrégation d'Aβ et la dégradation des mitochondries (Isaacs et al., 2006; Wang et al., 2014a). Sachant que les oligomères d'Aβ provoquent à leur tour un influx calcique, on observe donc une boucle de rétroaction délétère pour la cellule (Alberdi et al., 2010).

- **Rôle des antioxydants**

Comme nous l'avons vu précédemment, le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la formation de ROS / RNS et l'action des antioxydants. Une réduction de l'activité des antioxydants entraîne immanquablement une augmentation du stress oxydant. C'est ce qui est décrit dans la SLA, dont on sait qu'environ 10% des cas sont dus à une mutation du gène codant SOD1, antioxydant essentiel dans le maintien des niveaux de ROS. La protéine SOD1 non-fonctionnelle provoque ainsi une augmentation du stress oxydant (Ferrante et al., 1997; Rosen et al., 1993; Zimmerman et al., 2007). Cependant, des mutations de SOD1 peuvent également conduire à un gain de fonction en entrainant une production accrue de ROS *via* le relargage de cuivre (Cleveland and Rothstein, 2001).

Le stress oxydant et la production de ROS et de RNS sont donc des processus centraux dans le décours des maladies neurodégénératives. L'utilisation d'antioxydants en tant que cibles thérapeutiques a fait l'objet de nombreuses études sur des modèles animaux dans un

premier temps, puis d'essais cliniques sur l'homme. Bien que la majorité des études sur les modèles animaux suggèrent une efficacité des antioxydants pour lutter contre la neurodégénérescence, la plupart des essais cliniques sur l'homme montrent peu, voire pas, d'effets positifs dans le traitement des maladies neurodégénératives (Kim et al., 2015). Il semblerait donc que lutter contre la production de ROS ne suffise pas à contrer les mécanismes de neurodégénérescence dans leur ensemble. Prévenir la formation de ROS semble donc être nécessaire mais pas suffisant pour traiter les maladies neurodégénératives. D'autres mécanismes sont à prendre en compte tels que l'hyperactivation des systèmes de neurotransmission et les processus inflammatoires.

II.3. Hyperactivation des systèmes de neurotransmission

L'hyperactivation des systèmes de neurotransmission est à l'origine de nombreux phénomènes de toxicité neuronale. Cette hyperactivation peut avoir différentes causes, telles qu'une dérégulation des systèmes glutamatergiques, dopaminergiques ou de la signalisation calcique. Ce phénomène complexe, généralement connu sous le terme d'excitotoxicité, a été caractérisé à la fois lors de lésions aigües, telles que les ischémies cérébrales, les traumatismes crâniens ou les états épileptiques mais également lors de lésions chroniques telles que les maladies neurodégénératives. Ce processus est particulièrement important dans le cadre de mon projet de thèse car mon modèle majoritaire s'appuie sur ce phénomène. Pour cette raison, j'ai décidé de consacrer le dernier chapitre de mon introduction à l'étude du système de transmission glutamatergique depuis la définition du glutamate et de ses récepteurs jusqu'à l'implication du système dans la neurodégénérescence en passant par les différents acteurs moléculaires mis en jeu. Pour le moment, je me limiterai à l'implication des systèmes de neurotransmission dans les maladies neurodégénératives faisant l'objet de ce chapitre.

II.3.a. Excitotoxicité glutamatergique

Le glutamate, avec l'aspartate, est le neurotransmetteur excitateur majoritaire dans le cerveau, capable de se lier à des canaux ioniques activés par des ligands spécifiques, également appelés récepteurs ionotropiques au glutamate (iGluRs) et à des récepteurs couplés

à des protéines G, également appelés récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs). La concentration intracellulaire en glutamate est de l'ordre du millimolaire tandis que la concentration dans le compartiment extracellulaire est beaucoup plus faible, inférieure au micromolaire. L'augmentation des concentrations extracellulaires en glutamate donne lieu à une excitotoxicité *via* l'activation excessive des iGluRs. Le maintien des taux en glutamate se fait en partie par la recapture de neurotransmetteurs par les cellules gliales. Cette recapture peut se faire *via* des transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAATs), présents au niveau de la membrane des astrocytes, des microglies mais également de certains neurones. Le transport du glutamate peut également se faire *via* le transporteur cystine/glutamate (x_c^-), majoritairement microglial, qui relargue une molécule de glutamate dans le compartiment extracellulaire en échange d'une molécule de cystine. (Lewerenz and Maher, 2015; Miladinovic et al., 2015)

Il existe donc plusieurs voies d'induction de l'excitotoxicité :

- La libération excessive de glutamate observée après une lésion aigüe ou qui peut être mimée par l'apport d'excitotoxines exogènes.

- L'accumulation du glutamate dans la fente synaptique engendrée par une altération de la recapture du glutamate par les transporteurs astrogliaux.

- L'altération de la transmission synaptique par un mécanisme intracellulaire indirect, impliquant des dysfonctions du métabolisme énergétique et des mitochondries.

Il est difficile d'estimer la contribution de l'excitotoxicité glutamatergique dans les processus neurodégénératifs. Cependant, de nombreuses études ont déjà permis d'élucider le rôle du glutamate, de ses récepteurs et de ses transporteurs dans le phénomène de dérégulation glutamatergique et *a fortiori* dans les pathologies.

- **Libération excessive du glutamate :**

Ce phénomène a été principalement décrit lors de lésions aigües, telles que les ischémies cérébrales, les traumatismes crâniens ou les états épileptiques. Ainsi, lors d'un traumatisme crânien, le choc provoque des lésions dans des structures cérébrales spécifiques ainsi que la rupture de la barrière hémato-encéphalique. Ces dégâts sont à l'origine de mécanismes dégénératifs secondaires tels que l'inflammation, le stress oxydant mais également la libération du glutamate des compartiments intracellulaires. Ce dernier mécanisme induit une excitotoxicité aigüe (Freire, 2012). Si l'on bloque les récepteurs au glutamate en utilisant un antagoniste, le MK-801, la perte neuronale et les déficits cognitifs induits par le traumatisme sont réduits (Sönmez et al., 2015).

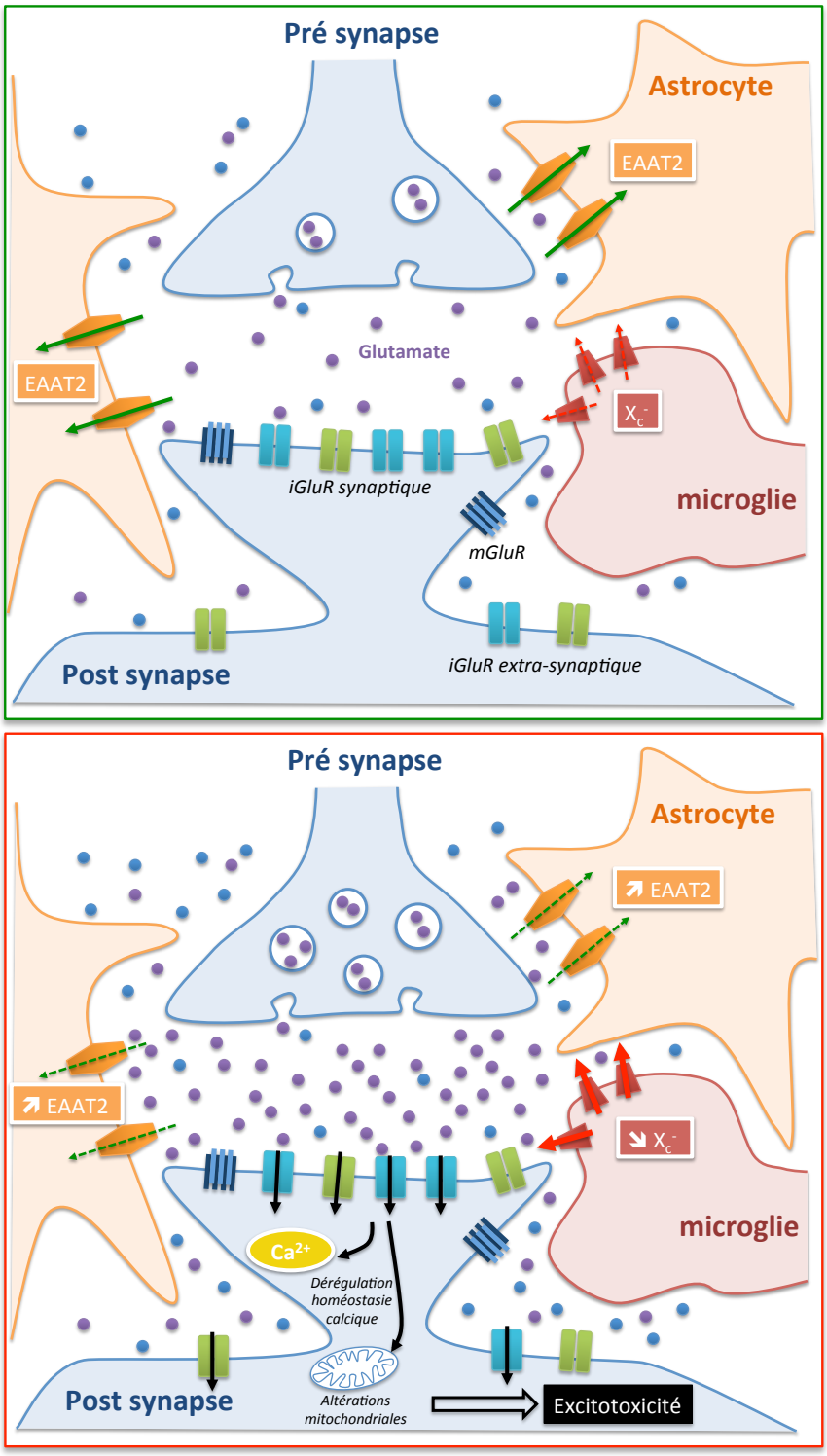


Figure 13 : Métabolisme du glutamate en situation normale ou lors d'un stress excitotoxique.

- **Altération de la recapture du glutamate :**

La recapture du glutamate se fait majoritairement par les cellules gliales *via* les EAATs tandis que l'efflux du glutamate se fait *via* le système x_c^-. De nombreuses études, post-mortem à partir de cerveaux de patients ou *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux, ont montré que ces transporteurs, décrits à la membrane des astrocytes, sont fortement

régulés dans plusieurs maladies neurodégénératives. Ainsi, une diminution des ARNm codant EAAT2 a été observée chez des patients Huntington (Arzberger et al., 1997). Des souris transgéniques, exprimant la forme mutée de l'APP et modélisant la maladie d'Alzheimer, ont quant à elles, une activité réduite des transporteurs EAAT1 et EAAT2 mais pas de modifications du niveau d'expression des ARNm correspondant, suggérant que la forme mutée de l'APP modifie le transport des acides aminés excitateurs de manière post-traductionnelle ce qui contribue à la toxicité glutamatergique (Masliah et al., 1996). L'excitotoxicité glutamatergique semble également impliquée dans la SLA. En effet, des études effectuées sur des patients atteints de la maladie ont montré une augmentation des niveaux de glutamate dans le liquide céphalo-rachidien, cette augmentation étant très probablement due à une perte du transporteur EAAT2 dans le cortex moteur et la moelle épinière (Rothstein et al., 1990, 1995; Spreux-Varoquaux et al., 2002). De plus, la sous-unité xCT du transporteur x_c^- semble régulée positivement dans des modèles murins de SLA (Albano et al., 2013) et de la maladie d'Alzheimer (Schallier et al., 2011).

- **Dysfonctions du métabolisme énergétique et des mitochondries :**

Nous avons vu dans le paragraphe sur le stress oxydant que les processus neurodégénératifs étaient liés à des dysfonctionnements mitochondriaux, dus en partie à l'augmentation des ROS. Il semblerait que des dérégulations de la transmission neuronale puissent être induits par ces dysfonctionnements de la mitochondrie et du métabolisme énergétique (Albin and Greenamyre, 1992; Beal, 1992). En effet, le potentiel de membrane est maintenu par la pompe à protons ATPase Na^+/K^+. Un déficit énergétique entraine la diminution de l'ATP, augmentant ainsi le potentiel de membrane au repos. La dépolarisation partielle de la membrane ainsi générée peut entrainer le départ du Mg^{2+}, bloquant les canaux des récepteurs NMDA, et ainsi faciliter l'activation par le glutamate. Il est important de noter que les défauts énergétiques survenant lors des processus neurodégénératifs sont étroitement liés à une dérégulation de l'homéostasie calcique que nous aborderons juste après. Cette voie indirecte conduisant à une excitotoxicité glutamatergique pourrait être impliquée dans des maladies neurodégénératives chroniques telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington (Duchen, 2012; Turski and Turski, 1993).

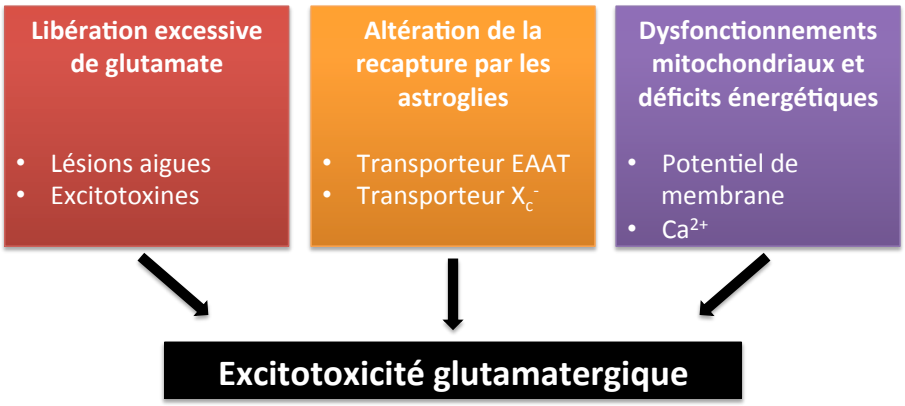


Figure 14 : Les trois voies d'induction de l'excitotoxicité glutamatergique.

II.3.b. Toxicité dopaminergique

La dopamine est un neurotransmetteur appartenant à la famille des catécholamines, jouant un rôle complexe dans le SNC et intervenant dans de nombreuses fonctions, telles que la coordination motrice, la mémoire, les mécanismes de récompenses, … Il existe deux sous familles de récepteurs à la dopamine : les récepteurs D_1 (D_1 et D_5) et les récepteurs D_2 (D_2, D_3 et D_4). La dopamine est synthétisée principalement dans deux régions relativement restreintes du cerveau, qui sont la substance noire (SN) et l'aire tegmentale ventrale (TVA). Ces régions ont pour cibles les ganglions de la base (ou noyaux de la base), comprenant entre autres le striatum. La toxicité induite par une dérégulation du système dopaminergique et de ses récepteurs dans cette région du cerveau est centrale dans le décours de la maladie de Parkinson. En effet, il a été décrit deux voies principales au sein des ganglions de la base : la voie directe, associée aux récepteurs dopaminergiques de type D_1 où l'activation de ces récepteurs provoque la libération de neurotransmetteurs GABA dans les terminaisons striato-nigrales entre les neurones de la SN et du striatum ; et la voie indirecte, impliquant principalement les récepteurs de type D_2, dont l'activation inhibe la libération de GABA dans les terminaisons striato-pallidale entre les neurones du palladium et du striatum (Gerfen et al., 1990). L'équilibre entre ces deux voies permet l'exécution correcte des mouvements. Dans la pathologie de Parkinson, la perte de neurones dopaminergiques déséquilibre le système *via* l'hyperactivation de la voie inhibitrice, ce qui induit de la bradykinésie, symptôme majeur de la maladie (Albin et al., 1989; Obeso et al., 2000; Penney and Young, 1983). Les dysfonctionnements du système dopaminergique sont donc à la base de la maladie de Parkinson mais ont également été décrits dans d'autres processus pathologiques, tels que la maladie de Huntington (Rangel-Barajas et al., 2015).

II.3.c. Homéostasie calcique

La signalisation calcique relie l'excitabilité membranaire aux différentes fonctions biologiques des neurones. A l'interface entre l'électrophysiologie et la signalisation moléculaire, les canaux calciques jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus neuronaux tels que la plasticité synaptique. Plusieurs acteurs participent au maintien de la concentration intracellulaire en Ca^{2+}. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer les canaux calciques voltage dépendants, les canaux ioniques mitochondriaux (MCU pour *Mitochondrial* Ca^{2+} *Uniporter*) et les protéines se liant au Ca^{2+} (CaBPs pour Ca^{2+} *Binding Protein*) (Bezprozvanny, 2009). Lors du vieillissement, de nombreux mécanismes impliquant l'homéostasie calcique sont altérés. Les niveaux des CaBPs sont fortement réduits ce qui induit une dérégulation des concentrations en Ca^{2+} et rend les neurones plus vulnérables aux pathologies neurodégénératives (Toescu and Verkhratsky, 2007). De plus, l'activation des calpaïnes, provoquées par des concentrations cytosoliques élevées en Ca^{2+}, est observée lors du vieillissement et dans des cas sporadiques de maladie d'Alzheimer, de Parkinson et de la SLA. Les calpaïnes sont des protéases dépendantes du Ca^{2+} qui participent à la dégénérescence neuronale (Vosler et al., 2009). Beaucoup d'études soutiennent le rôle central de l'homéostasie calcique dans les maladies neurodégénératives, en particulier dans la maladie d'Alzheimer (Bezprozvanny and Mattson, 2008).

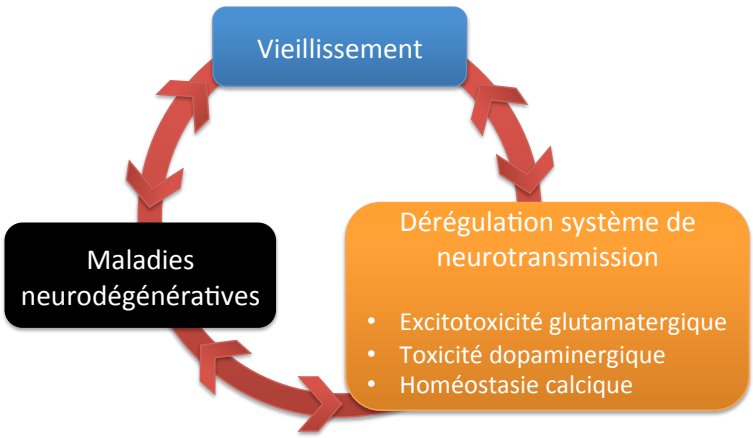


Figure 15 : Lien étroit entre le vieillissement, les dérégulations des systèmes de neurotransmission et l'apparition de maladies neurodégénératives.

II.4.Neuroinflammation

II.4.a. La réponse inflammatoire

La neuroinflammation est utilisée pour décrire la réponse inflammatoire qui a lieu

dans le SNC après une lésion. Cette réponse met en jeu le système immunitaire inné et est principalement caractérisée par l'accumulation et l'activation de cellules gliales (astrocytes et microglie). Ainsi, pour faire face à une infection ou à une lésion, le système immunitaire déclenche une réponse inflammatoire mettant en jeu à la fois des composants cellulaires et moléculaires : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs), phagocytes, système du complément, cytokines et chimiokines (Morales et al., 2014).

En réponse à un stimulus nocif, une réponse inflammatoire aigüe se met en place immédiatement par l'activation des cellules gliales permettant une réponse défensive rapide de l'organisme et le rétablissement de la zone endommagée. Cependant, si le stimulus persiste dans le temps, la réaction inflammatoire devient chronique et peut provoquer des dommages importants. En résumé, la neuroinflammation peut avoir des effets aussi bien bénéfiques que délétères en fonction de la durée de la réaction inflammatoire.

Les maladies neurodégénératives ont ainsi été décrites pour présenter des réactions inflammatoires chroniques, reposant, entre autres, sur des niveaux élevés en cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, le facteur de nécrose tumoral α (TNF-α pour *Tumor Necrosis Factor*), mais également sur l'augmentation de la production des ROS. La réaction inflammatoire chronique a également été associée à l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Kortekaas et al., 2005), et plusieurs études montrent qu'elle contribue à la dégénérescence neuronale (Hirsch et al., 2005).

II.4.b. Les processus inflammatoires dans les maladies neurodégénératives

Comme je l'ai déjà mentionné, le vieillissement est un facteur de risque central dans la plupart des maladies neurodégénératives. Il a été montré que dans les cerveaux de personnes âgées, les niveaux de cytokines pro-inflammatoires sont augmentés tandis que ceux des cytokines anti-inflammatoires sont diminués, créant ainsi un déséquilibre et augmentant le risque de développer une pathologie neurodégénérative. Cette réaction inflammatoire se manifeste également par une activation démesurée des microglies (Lynch, 2010).

La prolifération et l'activation de la microglie dans le SNC ont été documentées dans l'analyse post-mortem de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. De plus, une concentration importante de cytokines pro-inflammatoires a été décrit autour des dépôts d'amyloïdes Aβ et des enchevêtrements neurofibrillaires, associés eux mêmes à des zones de dégénérescence (Akiyama et al., 2000). L'analyse post-mortem des cerveaux de

patients atteints de la maladie de Parkinson et de la maladie de Huntington a également révélé une prolifération gliale ainsi que l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans les zones proches des agrégats protéiques et des neurones en cours de dégénérescence (Frank-Cannon et al., 2009; Hirsch et al., 2005). Il existe donc un lien étroit entre agrégation protéique, activation gliale et inflammation dans les maladies neurodégénératives.

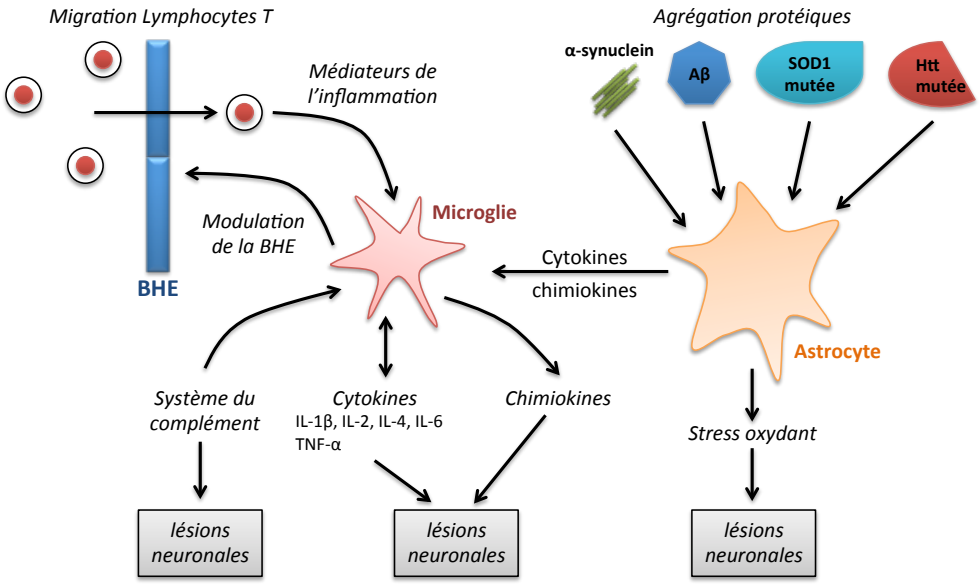


Figure 16 : La neuroinflammation : lien entre agrégation de protéines, activation des cellules gliales et inflammation (schéma d'après (More et al., 2013)).

Par ailleurs, des études épidémiologiques ont établi un lien entre la prise d'anti-inflammatoires non-steroïdiens (AINS) et la maladie d'Alzheimer. Ainsi, cette étude montre que la prise d'AINS sur des longues durées a des effets protecteurs contre le développement de la maladie, retardant la manifestation des symptômes et réduisant les risques d'apparition de la pathologie (Vlad et al., 2009). Les mêmes effets ont été décrits sur la prise d'AINS, en l'occurrence l'ibuprofène, quant aux risques de développer la maladie de Parkinson (Gao et al., 2011). Ces résultats sont à prendre avec du recul car les différents médicaments expérimentés (salicylate, aspirine, meloxicam, indométacine, paracétamol, diclofénac, ibuprofène, etc.) ne présentent pas tous les mêmes résultats positifs. Ceci peut s'expliquer car chaque médicament a un profil pharmacologique et des spécificités différentes. D'autre part la réponse neuroinflammatoire n'est pas spécifique d'une condition dégénérative déterminée. Enfin, la plupart des médicaments neuroinflammatoires ont des effets secondaires importants, essentiellement gastriques et cardiaques. La prise de ces molécules à long terme doit donc être contrôlée.

La neuroinflammation est donc un processus majeur dans le décours des maladies neurodégénératives, étroitement lié aux autres mécanismes moléculaires mis en jeu : agrégation protéique, stress oxydant et défaut des systèmes de neurotransmission. Elle est centrale dans des maladies inflammatoires telles que la sclérose en plaques, qui peut se manifester chez des sujets jeunes, mais elle est également essentielle dans les maladies neurodégénératives liées au vieillissement comme nous venons de le voir. L'inflammation est donc à prendre en compte dans les recherches de stratégies thérapeutiques dans ce domaine.

II.5.Diminution des taux en NAD^+

Nous venons de décrire plusieurs processus moléculaires inhérents aux maladies neurodégénératives, qui ne sont pas indépendants les uns des autres. Cependant, les relations de cause à effet entre ces processus restent peu connues à ce jour. Il semble important de continuer les recherches dans ce domaine pour approfondir nos connaissances sur les mécanismes mis en jeu et trouver des cibles thérapeutiques efficaces pour lutter contre les maladies neurodégénératives. Dans cette perspective, plusieurs études ont mis en avant le rôle du dinucléotide NAD^+.

Le NAD^+ est un coenzyme impliqué dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction prenant part au métabolisme énergétique, essentiellement au catabolisme. Mais il joue également un rôle central en tant que substrat dans plusieurs réactions enzymatiques, participant à la régulation des sirtuines, des poly-ADP-ribose polymerases (PARPs) et des ecto-enzymes CD38/157. La voie de biosynthèse principale du NAD^+ est celle reposant sur la conversion du Nicotinamide (NAM) en NAD^+, mettant en jeu la métabolisation du NAM en Nicotinamide MonoNucléotide (NMN) par l'enzyme nicotinamide phosphoribosyltransférase (Nampt) puis la conversion du NMN en NAD^+ par les enzymes nicotinamide mononucléotide adénylyltransférase (Nmnat). Cette voie est appelée voie de sauvetage car elle recycle le NAM, produit de la réaction du NAD^+ avec différents substrats, pour synthétiser à nouveau du NAD^+. Le NAD^+ et son métabolisme sont au cœur de mon projet de thèse. J'ai donc décidé d'y consacrer un chapitre entier dans ce manuscrit (cf chapitre III). Pour l'instant, je souhaite seulement mettre en exergue le rôle du NAD^+ dans les mécanismes moléculaires que nous venons d'aborder afin de justifier son étude dans le cadre des processus neurodégénératifs liés au vieillissement.

II.5.a. NAD$^+$, mitochondrie et stress oxydant

Nous avons vu que le stress oxydant était lié à l'augmentation de la production des ROS et à des dysfonctionnements mitochondriaux. Durant le vieillissement, le fonctionnement des mitochondries se dégrade et rend l'organisme vulnérable à différents processus neurodégénératifs. Depuis plusieurs années, de nombreuses équipes ont corrélé ces dysfonctions mitochondriales au taux intracellulaire de NAD$^+$. Ainsi, les niveaux de NAD$^+$ ont été décrits pour diminuer dans différents tissus de souris âgées, tels que le foie et les muscles squelettiques, mais également chez *C.elegans* (Gomes et al., 2013; Mouchiroud et al., 2013; Yoshino et al., 2011). Un des mécanismes pouvant expliquer le lien entre vieillissement et diminution des taux de NAD$^+$ est l'implication des PARPs. Celles-ci sont des cibles du NAD$^+$ présentes dans le noyau et décrites pour leur rôle dans la réparation de l'ADN. Elles semblent être activées lors du vieillissement chez des souris et chez *C.elegans* (Mouchiroud et al., 2013). Quel est le lien entre l'activation des PARPs et le vieillissement ?

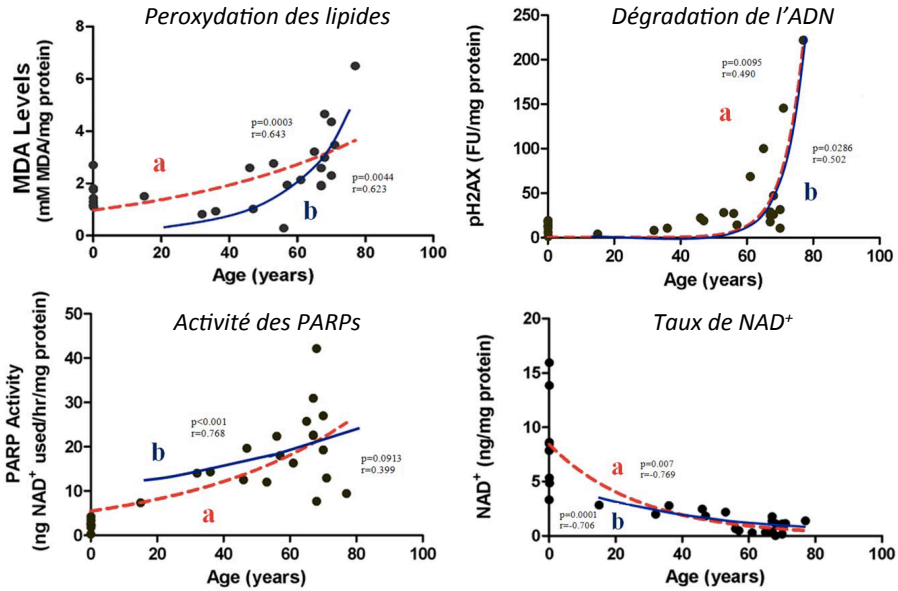


Figure 17 : Effet du vieillissement sur la peroxydation des lipides, la dégradation de l'ADN, l'activité des PARPs et le taux de NAD$^+$ dans des tissus humains. a) et b) : courbe de corrélation de Pearson (Massudi et al., 2012).

L'équipe de G. Guillemin s'est penché sur cette question en comparant diverses fonctions métaboliques chez des tissus humains de personnes âgées et de nouveaux nés (Massudi et al., 2012). Ils ont montré qu'au cours du vieillissement, la peroxydation des lipides ainsi que la dégradation de l'ADN étaient plus importantes. Ils ont confirmé les résultats obtenus dans les modèles animaux en observant une augmentation de l'activité des PARPs et une diminution des niveaux de NAD$^+$.

Ces résultats suggèrent que le vieillissement des cellules provoque une dégradation de

l'ADN, activant les PARPs et diminuant les niveaux intracellulaires en NAD^+. Cette diminution en NAD^+ est directement associée avec une baisse d'activité des sirtuines, et en particulier de SIRT1. SIRT1 est une autre cible du NAD^+, également localisée dans le noyau, qui influe sur plusieurs fonctions cellulaires et en particulier sur la biogénèse mitochondriale *via* l'activation du facteur de transcription PGC1-α. Lors de l'invalidation de *PARP1* chez la souris, il a été observé une augmentation des niveaux en NAD^+, de l'activité de SIRT1 et une amélioration du métabolisme chez ces souris (Bai et al., 2011).

Ainsi, la diminution du NAD^+, associée à l'activation des PARPs, entraine une régulation négative de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif, induit une dégradation du complexe I de la chaîne respiratoire et provoque des dysfonctions majeures des mitochondries (Imai and Guarente, 2014). En 2013, il a été montré que l'augmentation des niveaux de NAD^+ ou l'utilisation d'inhibiteurs de PARPs empêche l'altération des mitochondries et permet même de prolonger la durée de vie chez des modèles de *C.elegans* (Mouchiroud et al., 2013).

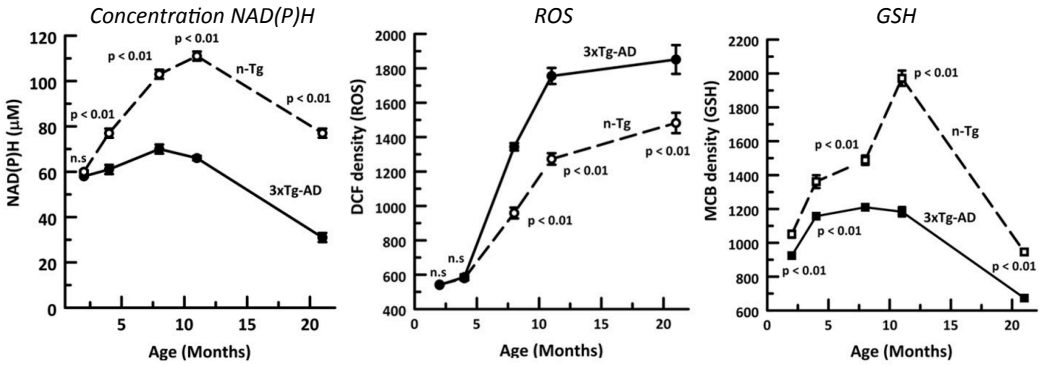


Figure 18 : Comparaison des taux de NAD(P)H, de la quantité de ROS et des niveaux de GSH entre des souris sauvages et des souris transgéniques 3x-Tg-AD (Ghosh et al., 2012).

Enfin, une étude sur des cultures de neurones issus de souris transgéniques 3xTg-AD, présentant des altérations physiologiques et moléculaires mimant la maladie d'Alzheimer, a montré que les niveaux de NAD^+ sont plus faibles chez ces souris, que la production de ROS est plus importante et que les niveaux en GSH sont plus faibles (Ghosh et al., 2012). Ce résultat suggère que la modulation des taux de NAD^+ est un facteur essentiel dans la pathologie d'Alzheimer. De plus, cette même étude montre que les taux de calcium intracellulaires sont deux fois plus importants dans les cellules de souris transgéniques que dans celles des souris sauvages, confirmant le rôle central de l'homéostasie calcique dans les pathologies neurodégénératives.

L'ensemble de ces études montre que la diminution des niveaux en NAD^+ observée

lors du vieillissement altère un grand nombre de fonctions mitochondriales, telles que la chaîne respiratoire. Réciproquement, il est important de noter que le rapport NAD^+/NADH est dépendant du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Une perturbation de cette dernière entraîne un déséquilibre du couple redox et modifie les taux de NAD^+ dans la mitochondrie, accélérant la détérioration des mitochondries.

II.5.b. NAD^+ et inflammation

La diminution des niveaux de NAD^+ lors du vieillissement peut également s'expliquer par une altération de sa voie de biosynthèse, en particulier de l'activité de l'enzyme Nampt. L'équipe de S. Imai a ainsi observé que les niveaux de Nampt diminuent avec l'âge (Yoshino et al., 2011). De façon intéressante, ils ont également montré que TNF-α, une cytokine majeure impliquée dans les réactions inflammatoires, diminue les niveaux en Nampt et en NAD^+ dans des cultures primaires d'hépatocytes (Yoshino et al., 2011), suggérant fortement que l'inflammation chronique décrite lors du vieillissement et des processus neurodégénératifs induit une perturbation du métabolisme du NAD^+. L'utilisation de précurseurs de la voie de biosynthèse du NAD^+ tel que le NMN permet de pallier à cette diminution des taux de NAD^+ (Yoshino et al., 2011).

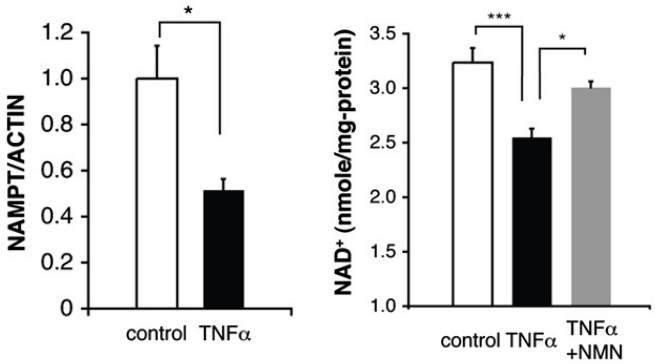


Figure 19 : Effet du TNF-α sur le métabolisme du NAD^+ dans un modèle murin. Le traitement avec du TNF-α diminue les niveaux de Nampt et le taux de NAD^+ intracellulaire. L'apport de NMN, précurseur du NAD^+ prévient de cette dérégulation (Yoshino et al., 2011).

II.5.c. NAD^+ et excitotoxicité

Nous avons vu que l'excitotoxicité glutamatergique est un processus pathogène décrit dans plusieurs maladies neurodégénératives. Plusieurs études ont montré que ce processus est associé à une diminution des taux intracellulaires en NAD^+. Ainsi, lors d'un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris, il a été observé une diminution des niveaux

intracellulaires en NAD^+ ainsi que de l'enzyme Nampt (appelée également PBEF pour *Pre-B cell colony-Enhancing Factor*). Cette étude a d'autre part montré que des souris hétérozygotes *Pbef* +/- sont plus vulnérables à la lésion induite par l'ischémie, soulignant l'importance de la voie de biosynthèse du NAD^+ dans le processus d'excitotoxicité (Zhang et al., 2010).

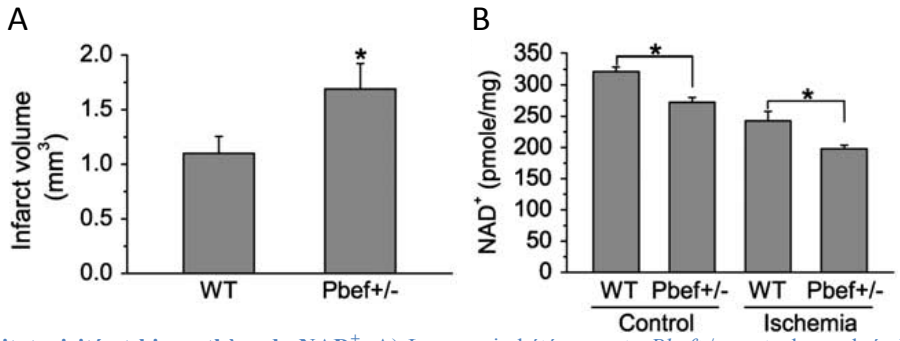


Figure 20 : Excitotoxicité et biosynthèse de NAD^+. A) Les souris hétérozygote *Pbef*+/- sont plus vulnérables à la lésion induite par ischémie. B) Les taux intracellulaires en NAD^+ mesurés dans le cortex sont diminués chez les souris *Pbef*+/- par rapport aux souris WT (Zhang et al., 2010).

Parallèlement, l'équipe de C. Alano a étudié l'excitotoxicité induite par l'application de NMDA dans des cultures de neurones primaires. Ils ont observé une diminution des taux de NAD^+ 4h après traitement. Celle-ci peut être partiellement rétablie par l'application d'inhibiteurs de PARPs (PJ34 ; DPQ) mais pas par l'application d'antioxydants (Trolox ; 7NI), suggérant que la baisse des taux en NAD^+ est liée à l'activation des PARPs mais précède temporellement le stress oxydant (Kim et al., 2011a).

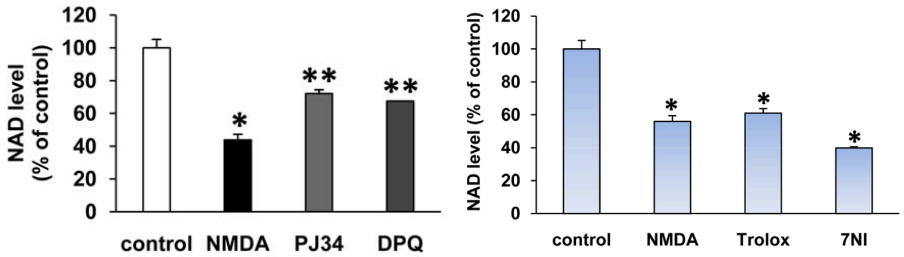


Figure 21 : L'application de NMDA diminue les niveaux intracellulaires en NAD^+. Cette diminution peut être partiellement bloquée par des inhibiteurs de PARPs (PJ34 et DPQ) mais pas par l'application d'antioxydants (Trolox et 7NI) (Kim et al., 2011a).

Le NAD^+ a donc un rôle central dans les processus moléculaires impliqués dans le vieillissement et les maladies neurodégénératives. L'augmentation des taux intracellulaires en NAD^+, par l'utilisation de précurseurs spécifiques ou d'inhibiteurs de PARPs, permettrait de lutter contre le développement des processus neurodégénératifs. Dans le chapitre III, nous reviendrons dans le détail sur le rôle du NAD^+ dans la cellule et l'implication de son métabolisme dans les processus neurodégénératifs.

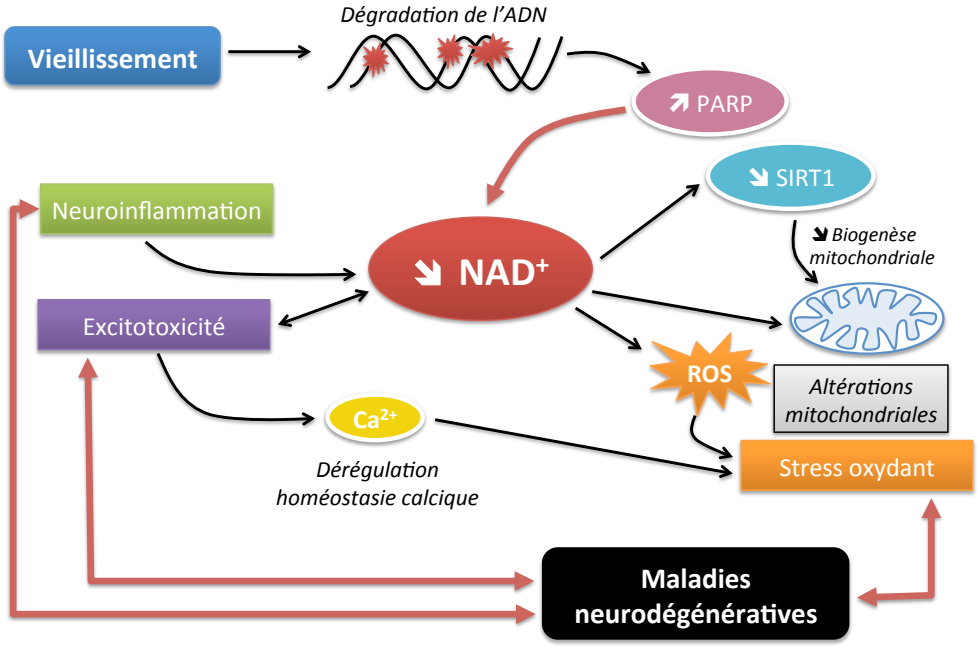


Figure 22 : Schéma récapitulant la place du NAD^+ dans les mécanismes moléculaires communs aux maladies neurodégénératives et au vieillissement.

II.6. Rôles des altérations axonales dans les maladies neurodégénératives

II.6.a. Rôle des altérations axonales et synaptiques dans la dispersion des lésions

Pour l'instant, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires communs aux différentes maladies neurodégénératives et intervenant également lors d'ischémies cérébrales. Comme nous l'avons évoqué en début de chapitre, les maladies neurodégénératives sont des maladies chroniques à progression lente dans la plupart des cas. La gravité des symptômes et des signes cliniques devient de plus en plus importante au cours du temps, allant jusqu'à la perte d'autonomie des malades, et éventuellement le décès. Nous avons vu que ces différents signes cliniques sont corrélés avec des atteintes localisées dans des régions spécifiques du cerveau. Ces atteintes seraient par la suite susceptibles de s'étendre en se propageant de manière non homogène vers d'autres régions cérébrales.

De nos jours, le diagnostic des maladies neurodégénératives se fait encore trop souvent tardivement, alors que les lésions cérébrales ont déjà atteints plusieurs régions du cerveau et provoquent des dommages irréversibles. Le développement de méthodes de diagnostics plus précoces permettrait la mise au point de traitements curatifs efficaces.

La propagation non uniforme des altérations dans le temps et l'espace peut être corrélée dans une certaine mesure avec la formation des agrégats protéiques. Cette notion a été particulièrement étudiée par l'équipe de H. Braak durant les 20 dernières années. Ils ont

ainsi montré que les agrégats protéiques observés dans certaines maladies neurodégénératives se propagent selon un profil de dispersion spécifique et non homogène. Leurs observations quant aux profils de dispersion des agrégats protéiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et de Parkinson sont détaillées en annexe. Une des hypothèses pouvant expliquer ces résultats est la propagation des lésions *via* les réseaux neuronaux. En effet, il existe des voies neuronales spécifiques dans le cerveau reliant préférentiellement certains types de neurones entre eux, sans dépendre de la proximité spatiale. Ceci est possible grâce à la polarité des cellules neuronales composées d'un corps cellulaire, le soma, et d'un prolongement, l'axone, dont la longueur peut atteindre 20 000 fois la taille du corps cellulaire (Wang et al., 2012a). L'axone peut donc atteindre des régions très éloignées du soma, dans le système périphérique par exemple, et créer des connexions synaptiques permettant la transmission de l'influx nerveux. L'intégrité axonale est donc essentielle pour le bon fonctionnement du cerveau : une lésion sur un axone peut induire la dégénérescence du neurone mais également affecter des neurones secondaires connectés, propageant de cette manière une altération neuronale. De nombreuses études ont tenté d'éclaircir le rôle de l'axone et des synapses dans les processus dégénératifs. De plus, il a été montré, dans le cadre des maladies neurodégénératives, que la mort neuronale n'est pas directement associée à l'apparition des premiers symptômes (Lesné et al., 2006, 2008). Au contraire, il semblerait que, dans ces pathologies, la mort neuronale soit un processus tardif qui survient bien après l'apparition des symptômes et qui soit précédé d'altérations plus modérées, telles que les pertes synaptiques et la dégénérescence axonale (Arendt, 2009; Callahan and Coleman, 1995; Selkoe, 2002).

II.6.b. La dégénérescence axonale lors du vieillissement

Les altérations axonales sont donc un événement majeur dans la dispersion des lésions dans le cadre des maladies neurodégénératives. Comme nous l'avons déjà discuté, le vieillissement est le principal facteur de risque dans la plupart de ces pathologies et de nombreuses études ont montré que la perte axonale était l'une des caractéristiques notables du vieillissement. On peut donc se demander quelles sont les modifications structurelles ou fonctionnelles que subissent les axones au cours du vieillissement ?

L'étude d'échantillons de cerveaux humains a montré que les fibres de la substance blanche sont vulnérables au vieillissement. En effet, on estime que la matière blanche d'une personne de 80 ans est réduite de 45% par rapport à une personne de 20 ans (Marner

et al., 2003). Les raisons de cette perte sont mal connus mais une hypothèse est l'altération de la substance blanche par des micro-ischémies endommageant la myéline et entrainant la dégénérescence des oligodendrocytes (Pantoni, 2002). L'intégrité de la gaine de myéline est un élément essentiel dans le maintien de l'axone. Elle permet la protection de l'axone et elle garantit une transmission de l'influx nerveux rapide et efficace (Sherman and Brophy, 2005). La démyélination est donc une cause importante de déficits cognitifs chez les sujets âgés. La diminution des projections axonales a été identifiée dans plusieurs autres régions du cerveau. Il a notamment été montré que les axones impliqués dans la voie perforante entre le cortex entorhinal et le gyrus denté (sous-région de l'hippocampe) sont moins nombreux chez des rats âgés (Barnes and McNaughton, 1980). Ce résultat a été confirmé chez l'homme pour lequel la matière blanche parahippocampique, comprenant entre autre la voie perforante, est fortement réduite chez les personnes âgées (Rogalski et al., 2012; Stoub et al., 2012).

La dégénérescence axonale est donc une caractéristique majeure du vieillissement, que l'on retrouve dans les maladies neurodégénératives. On comprend ainsi que le vieillissement est un facteur de risque de ces maladies car il peut contribuer à la manifestation des symptômes, à partir du moment où un certain niveau de dégénérescence axonale et synaptique a été atteint. De plus, le cerveau d'une personne âgée est plus vulnérable et sera moins capable de compenser les différentes altérations induites par la maladie.

II.6.c. La dégénérescence axonale dans les maladies neurodégénératives

- **La dégénérescence axonale dans la maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'accumulation de peptides amyloïdes Aβ et d'enchevêtrements neurofibrillaires Tau, la dégénérescence des neurites et la perte des synapses (Adalbert et al., 2009; Tsai et al., 2004). Ces événements précédent la mort neuronale, qui survient seulement à des stades tardifs de la pathologie (Adalbert and Coleman, 2013). Des études d'imagerie par IRM sur l'homme ont montré des altérations de la matière blanche dans les stades précoces de la maladie, précédant les stigmates typiques de la matière grise caractérisés dans les stades plus tardifs (Di Paola et al., 2010). Dans des modèles murins, il a été montré des altérations axonales, notamment des apparitions de varicosités, à proximité de plaques amyloïdes (Tsai et al., 2004). Cependant, une autre étude effectuée sur des souris transgéniques a montré que la progression de la pathologie, *via* la formation d'agrégats protéiques, ne bloque pas les projections axonales, bien que celles-ci puissent

présenter des dystrophies importantes lorsqu'elles passent à travers les plaques amyloïdes (Adalbert et al., 2009). Les axones à proximité de plaques sont ainsi capables de rester fonctionnels jusqu'à un an après l'apparition des plaques. Ces éléments sont en faveur d'une progression lente de la pathologie. Enfin, il est probable que les axones humains soient plus vulnérables aux dégâts causés par l'Aβ car ceux ci sont beaucoup plus longs que ceux de la souris, et donc plus susceptibles de croiser des plaques, et leur durée de vie est également plus importante (Adalbert and Coleman, 2013).

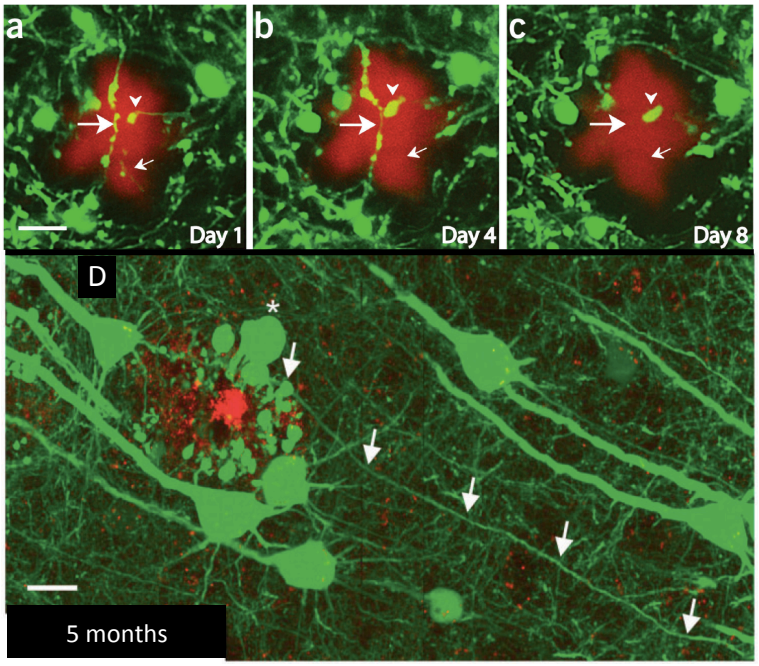


Figure 23 : Effet contradictoire des plaques amyloïdes Aβ sur l'intégrité axonale. (a-b-c) : L'axone croisant une plaque amyloïde forme des varicosités puis dégénère en 8 jours tandis que d'autres études montrent des axones intacts pendant 5 mois à proximité de plaques amyloïdes (D) (Adalbert et al., 2009; Tsai et al., 2004).

- **La dégénérescence axonale dans la maladie de Parkinson**

La dégénérescence axonale joue un rôle majeur dans les stades initiaux de la maladie de Parkinson et pourrait bien être une des caractéristiques principales de la pathologie. En effet, de nombreuses évidences à partir d'études de cerveaux humains post-mortem, d'imagerie fonctionnelle, de modèles transgéniques ou d'utilisation de neurotoxines montrent que la dégénérescence axonale est un événement précoce de la maladie de Parkinson et pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour traiter la pathologie aux stades peu avancés (Burke and O'Malley, 2013). Ainsi, des souris transgéniques, manifestant des signes cliniques proches de ceux de la maladie de Parkinson, tels que l'hypokinésie, sont caractérisées par un maintien du nombre de neurones dopaminergiques mais par des axones fragmentés, présentant des dystrophies sévères (Li et al., 2009).

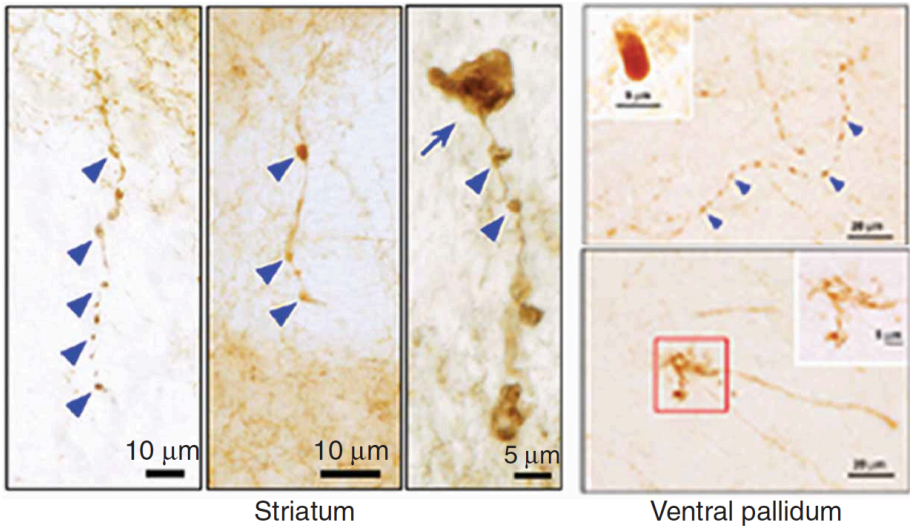


Figure 24 : Altérations des axones du striatum et du palladium observées chez des souris transgéniques développant des symptômes proches de la maladies de Parkinson : apparition de blebs et dystrophie des axones (Li et al., 2009).

- **La dégénérescence axonale dans la SLA**

Les altérations axonales sont également caractéristiques des stades précoces de la SLA. Dans des modèles murins mutés SOD1, Il a été montré une vulnérabilité des axones spécifique du type neuronal. En effet, les axones venant des neurones moteurs « *fast fatiguables* » sont plus susceptibles de dégénérer que les axones des neurones moteurs lents (Pun et al., 2006). De plus, de manière intéressante, des souris sauvages âgées présentent des rétractions axonales au niveau de la jonction neuro-musculaire, dégénérescence qui peut être contrée par des stratégies anti-vieillissement, utilisées dans d'autre modèles, telles que la restriction calorique ou l'exercice physique (Valdez et al., 2010).

La dégénérescence axonale est donc un processus majeur et précoce lors des maladies neurodégénératives, qui est déjà sous-jacent lors du vieillissement des individus. Les données discutées dans ce dernier paragraphe mettent en évidence l'importance de l'étude et la compréhension de ce phénomène afin de mettre en œuvre de nouvelles pistes thérapeutiques, ciblant les maladies neurodégénératives à des stades peu avancés avant l'apparition de symptômes sévères et de la mort neuronale.

Ce premier chapitre nous permet de voir que les maladies neurodégénératives dans leur ensemble, englobant les maladies chroniques et celles plus aigües telles les ischémies, sont des pathologies complexes dont l'impact dans nos sociétés actuelles est considérable. Différentes sur plusieurs aspects, celles-ci peuvent tout de même se caractériser par des mécanismes moléculaires communs, tels que l'agrégation protéique, le stress oxydant, les défauts dans les systèmes de transmission et la neuroinflammation. Tous ces mécanismes sont

étroitement liés au niveau intracellulaire en NAD^+, suggérant que la diminution des taux de NAD^+ est un élément essentiel dans l'apparition des pathologies neurodégénératives. En outre, la dégénérescence axonale est également un élément majeur dans les pathologies, participant à la dispersion spatio-temporelle des lésions neuronales.

Nous allons donc dans le prochain chapitre détailler les connaissances actuelles sur la dégénérescence axonale : des modèles d'études utilisés jusqu'aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce processus. Puis, nous verrons le rôle crucial du NAD^+ dans la protection de l'axone, ce qui nous amènera au chapitre III sur les fonctions du NAD^+ dans la cellule. L'étude du NAD^+, de ses fonctions au sein de la cellule et de son métabolisme permettra de mettre en avant son rôle potentiel en tant que cible thérapeutique dans le cadre des recherches sur les processus neurodégénératifs. Enfin, le dernier chapitre sera consacré à la définition d'un modèle d'étude de la dégénérescence neuronale, basé sur l'excitotoxicité glutamatergique.

CHAPITRE II :

LA DEGENERESCENCE AXONALE : UN DES MARQUEURS PRECOCES DES MALADIES NEURODEGENERATIVES

Comme nous l'avons vu précédemment, la dégénérescence axonale est un événement précoce dans l'évolution de la neurodégénérescence.

I. Les différents modèles de dégénérescence axonale

I.1. La dégénérescence axonale Wallérienne

Lors d'une lésion brutale et localisée de l'axone, la dégénérescence de la portion distale de l'axone (déconnectée du reste du neurone) est appelée dégénérescence Wallérienne. Ce processus, commun au SNC et SNP, a été décrit pour la première fois en 1850 par Augustus V. Waller sur des fibres nerveuses de grenouille (Waller, 1850). L'axone déconnecté du corps cellulaire préserve son activité électrique pendant un à deux jours mais va ensuite rapidement dégénérer selon une suite d'événements définie : détérioration du réticulum endoplasmique, désintégration des neurofilaments, renflements des mitochondries, désassemblage du réseau de microtubules, apparition de varicosités (appelés « *Blebs* » en anglais) puis finalement fragmentation de l'axone. Les débris sont ensuite éliminés et digérés par des cellules de types macrophages.

La dégénérescence Wallérienne a longtemps été décrite comme un processus passif dont le mécanisme serait régulé en partie par une augmentation des flux calciques dans les neurones et par l'activation des calpaïnes. Mais, nous savons aujourd'hui que la dégénérescence axonale est en réalité contrôlée par un mécanisme actif, complexe mettant en jeu de nombreux acteurs moléculaires. Nous parlerons de ce mécanisme de manière plus détaillée dans la suite de ce chapitre.

La dégénérescence Wallérienne a été mise en évidence dans le SNP mais elle a également été décrite dans le SNC. En effet, ce type de dégénérescence peut avoir lieu lors de traumas, d'accidents vasculaires cérébraux, d'infections ou de maladies auto-immunes, dès lors que l'axone est lésé localement (Raff et al., 2002).

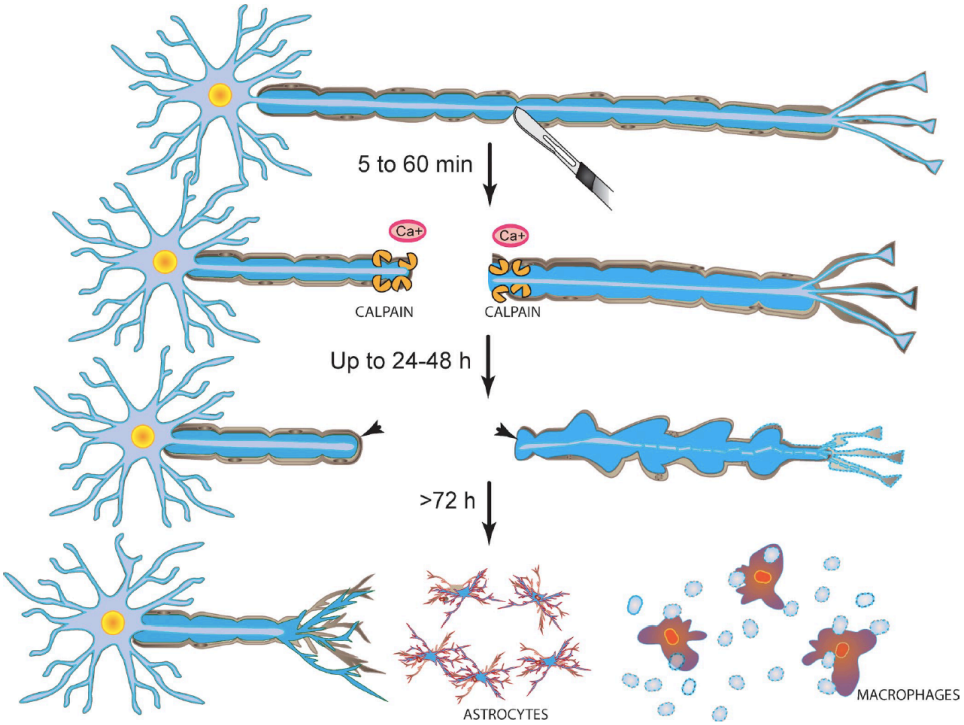


Figure 25 : Déroulement temporel de la dégénérescence axonale de type Wallérienne : les segments proximaux et distaux proches de la lésion montrent après 5 à 60 minutes une dégénérescence axonale aigüe proche de la lésion initiale. Celle ci est principalement induite par un influx calcique et l'activation des calpaïnes. Ce processus est suivi par la rétraction de l'axone et l'apparition de *« blebs »*. Pendant 24 à 48h il y a une phase de latence où il n'y a que peu de signes de fragmentation. Puis, 72h après lésion la portion distale développe rapidement des renflements dus à l'effondrement de la cytoarchitecture axonale puis se fragmente. Les débris sont alors éliminés par les phagocytes. La portion proximale subit soit une dégénérescence rétrograde soit tente de se reconnecter par régénérescence (Wang et al., 2012a).

I.2. Dégénérescence axonale de type *Dying Back*

Dans le contexte de l'étude des maladies neurodégénératives, pour lesquelles il n'y a pas de localisation spécifique de l'agression ni de déconnexion de l'axone et du corps cellulaire, il a été décrit un processus de rétraction de l'axone, différent de la dégénérescence Wallérienne et désigné sous le terme de dégénérescence axonale de type *« Dying-Back »*. Le *Dying-Back* se caractérise par une dégénérescence de l'axone progressive qui s'étend sur une longue période (de plusieurs semaines à plusieurs mois), qui commence dans la partie distale de l'axone puis qui s'étend vers le corps cellulaire. Ce processus a été en premier lieu proposé pour expliquer plusieurs pathologies du SNP telles que la maladie des motoneurones, et les neuropathies associées au diabète (Sima et al., 1983), à l'alcoolisme (Walsh and McLeod, 1970) et au sida (De La Monte et al., 1988). La dégénérescence axonale de type *Dying-Back* pourrait également s'appliquer aux maladies neurodégénératives du SNC telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. On comprend bien que dans ce cadre, la section d'un axone est un événement rare et que les dommages de l'axone sont plus vraisemblablement dus à des altérations métaboliques ou du transport axonal, à la présence

d'agents neurotoxiques ou à des anomalies héréditaires.

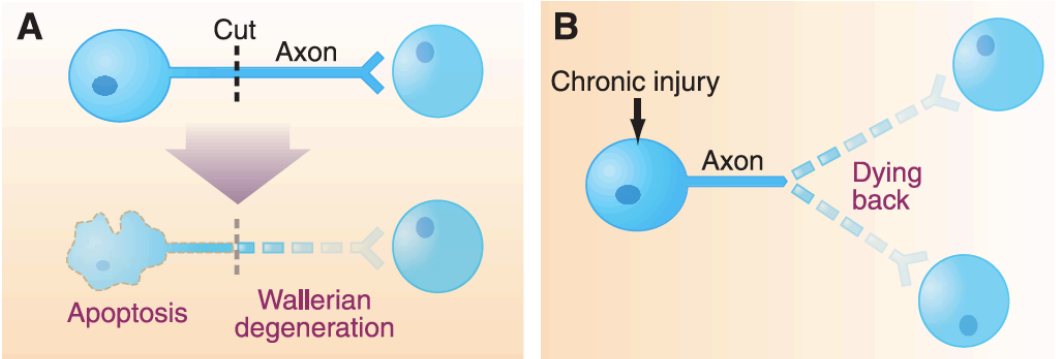


Figure 26 : Modèles de dégénérescence axonale : (A) Dégénérescence Wallérienne induite par axotomie ; (B) dégénérescence rétrograde de type *Dying-Back* (Raff et al., 2002)**.**

Ainsi, la dégénérescence de l'axone peut être associée à l'agrégation de protéines spécifiques, tels que les plaques amyloïdes Aβ, les corps de Lewy constitués d'α-synucléine ou les enchevêtrements neurofibrillaires Tau. Les agrégats altèrent alors l'intégrité de l'axone *via* leur interférence avec les mécanismes du transport axonal. Par exemple, l'accumulation d'agrégats d'huntingtine mutée dans l'axone conduit à une altération du transport et précède la mort neuronale (Li et al., 2001).

I.3. Déprivation en facteur trophique

Une dégénérescence localisée, similaire à celle observée dans un modèle de type *Dying-Back*, est également décrite en culture cellulaire lorsque la partie distale d'un axone est privée de facteurs trophiques tels que le NGF pour *Nerve Growth Factor*. Dans ce contexte, cette partie de l'axone dégénère tandis que le reste du neurone survit (Campenot, 1982). Ce phénomène a été observé la première fois grâce à la mise au point de chambres de Campenot permettant l'isolement d'une partie de l'axone du reste du neurone (Campenot, 1977). Ce dispositif, qui s'adresse uniquement aux neurones issus du SNP, permet encore aujourd'hui l'étude détaillée des mécanismes moléculaires intervenant dans la dégénérescence axonale induite par déprivation de facteurs trophiques (Simon et al., 2016).

I.4. Le *pruning* développemental

La dégénérescence axonale intervient également de manière physiologique lors du développement normal. En effet, initialement, chaque neurone projette plusieurs branches axonales vers différentes régions du cerveau. Les branches situées dans les régions non appropriées vont finir par dégénérer et par être éliminées : il s'agit du processus de

« *pruning* » ou « élagage » en français. Un des mécanismes sous-jacent à ce processus, pourrait être le manque de facteurs trophiques libérés par les cellules cibles qui entrainerait la dégénérescence de la branche axonale.

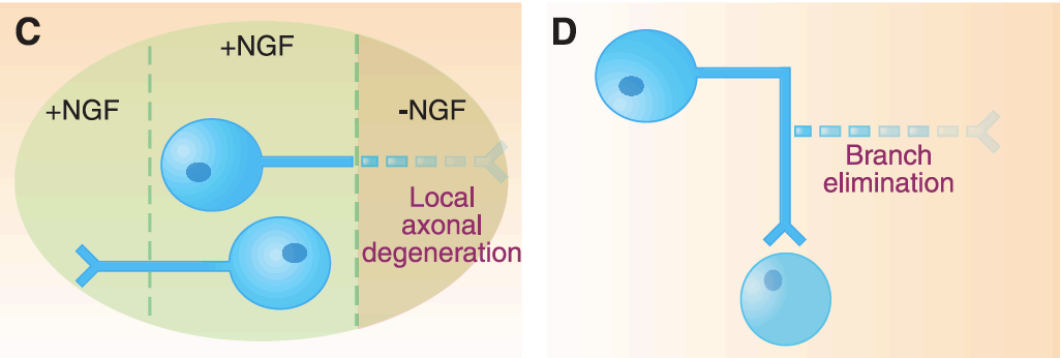


Figure 27 : Modèles de dégénérescence axonale induite par déprivation de facteurs trophiques en culture *in vitro* (C) ou lors du développement par pruning (D) (Raff et al., 2002).

Plusieurs mécanismes moléculaires semblent communs aux différents modèles: la dégénérescence axonale serait la conséquence morphologique du cumul de nombreuses altérations visant principalement l'homéostasie calcique, les mitochondries, l'agrégation protéique, le transport axonal, les voies de signalisation, l'autophagie ainsi que le système UPS (Lingor et al., 2012). Cependant, le décours temporel de ces mécanismes et la nature du processus de mort localisé au niveau de l'axone ne sont pas encore élucidés et sont au cœur de nombreuses thématiques de recherche.

II. Les mécanismes impliqués dans les différents modèles de dégénérescence axonale

II.1. Influx calcique et activation des calpaïnes

La dégénérescence axonale a longtemps été considérée comme un mécanisme passif assimilé à une nécrose localisée au niveau de l'axone. En effet, en 1979, il a été montré que l'activation de protéines dépendantes du calcium, appelées calpaïnes, mène à la dégénérescence de l'axone (Schlaepfer and Hasler, 1979). Les calpaïnes peuvent réagir avec des protéines du cytosquelette, des kinases, des phosphatases et des récepteurs membranaires et induire ainsi la désintégration des neurofilaments et des microtubules. Il a été montré depuis que l'inhibition des calpaïnes retarde la dégénérescence axonale dans un contexte de dégénérescence Wallérienne, suggérant que ces protéines jouent un rôle majeur dans ce processus (Coleman, 2005).

II.2. Wlds : une mutation spontanée qui ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques

II.2.a. La protéine Wlds

La découverte d'une mutation spontanée chez la souris *Wlds* (pour *Wallerian Degeneration Slow*) a permis de grandes avancées dans la compréhension du mécanisme de dégénérescence axonale. En effet, chez ces souris mutées, les portions distales des axones demeurent morphologiquement et fonctionnellement intactes plusieurs jours, voire plusieurs semaines, après la lésion (Lunn et al., 1989).

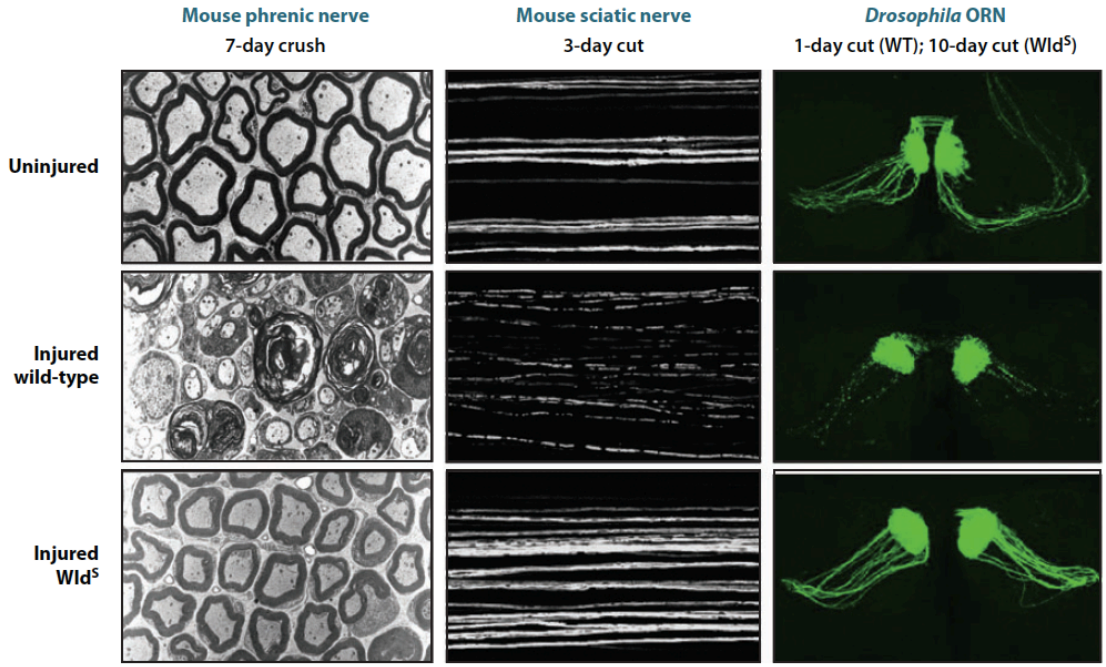


Figure 28 : Observation de la protection axonale conférée par *Wlds* dans trois modèles différents de dégénérescence Wallérienne : nerfs phréniques observés par microscopie électronique chez la souris 7 jours après axotomie, nerf sciatique observé par microscopie à fluorescence chez la souris 3 jours après axotomie et neurones des récepteurs olfactifs observés par microscopie à fluorescence 10 jours après lésion chez la drosophile (Coleman and Freeman, 2010).

Cette observation montre que la dégénérescence axonale ne serait pas un phénomène passif mais qu'il y aurait bien un mécanisme actif permettant le maintien de l'intégrité axonale de manière autonome. Pour comprendre l'effet apporté par la mutation spontanée chez la souris, l'équipe de H. Perry localisa le gène impliqué dans le retard de la dégénérescence axonale sur le chromosome 4 (Lyon et al., 1993), puis le gène *Wlds* fut séquencé quelques années plus tard. La mutation *Wlds* résulte d'un réarrangement chromosomique conduisant à la production d'une protéine chimère Wlds (Coleman et al., 1998). La partie C-terminale de cette protéine contient la séquence de Nmnat1, une enzyme clé principalement nucléaire et impliquée dans la biosynthèse du NAD^+ (Mack et al., 2001). L'extrémité N-terminale de Wlds est constituée du domaine amino-terminal de Ube4b, une

ubiquitine ligase, fusionné à 18 résidus d'acides aminés (W18) générés par la translecture du 5'UTR de *Nmnat1*.

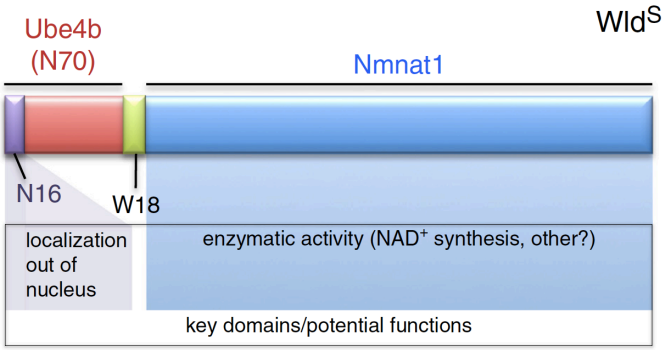


Figure 29 : Structure de la protéine fusion Wlds constituée de l'enzyme Nmnat1, de l'ubiquitine ligase Ube4b, de la séquence N-terminale N16 et de la séquence W18 (Freeman, 2014).

A partir de la structure de la protéine Wlds, on peut donc se demander quel domaine est vraiment essentiel dans la protection axonale.

II.2.b. Quels sont les domaines de la protéine Wlds nécessaires pour protéger de la dégénérescence axonale ?

Plusieurs études, dans des modèles de culture primaire *in vitro* mais également dans des modèles *in vivo,* ont été effectuées pour répondre à cette question. Théoriquement, Wlds peut protéger les neurones via les domaines Ube4b, W18 et/ou Nmnat1 ou par une combinaison des trois. Plusieurs études ont montré que l'expression de Nmnat1 pouvait retarder la dégénérescence axonale *in vitro* (Araki et al., 2004; Sasaki et al., 2009; Wang et al., 2005b). Les résultats obtenus *in vivo*, au contraire, semblent montrer que la surexpression de Nmnat1 n'est pas suffisante pour protéger les axones (Conforti et al., 2007). Cependant, même si celle ci n'est pas suffisante pour conférer la protection axonale seule, elle a été montrée dans plusieurs études chez les drosophiles et chez les souris pour être nécessaire à l'effet protecteur de Wlds (Avery et al., 2009; Yahata et al., 2009). Chez la drosophile, Nmnat1 pourrait avoir un rôle de molécule chaperonne, indispensable pour la préservation de l'intégrité axonale (Zhai et al., 2008). La protection induite par la protéine Wlds passe à la fois par le rôle enzymatique de Nmnat1 dans la biosynthèse du NAD$^+$ et par son rôle chaperon. Cependant, le domaine de Nmnat1 ne semble pas suffisant pour une protection axonale totale : cela suggère que d'autres domaines de Wlds sont essentiels. De manière intéressante, la protection axonale conférée par Wlds nécessite la présence du domaine correspondant aux 16 acides aminés du domaine amino-terminal de la protéine Ube4b (N16). Ainsi, la suppression du fragment N16 de Wlds bloque totalement l'effet protecteur

dans un modèle *in vivo* chez la souris et bloque partiellement l'effet chez la drosophile (Avery et al., 2009; Conforti et al., 2009). Ce fragment de 16 acides aminés dérivé de Ube4b, interagit avec une protéine contenant des valosines (VCP). VCP est une AAA-ATPase (ATPase associé à des activités variées), qui a un rôle majeur dans le système UPS et dans la fusion membranaire (Wang et al., 2004). VCP est également décrit pour être impliquée dans la distribution intracellulaire de Wlds. Plusieurs études suggèrent fortement que N16, via son action avec VCP, et Nmnat1 sont essentiels à la protection conférée par Wlds.

II.2.c. Quelle est la localisation subcellulaire de la protéine Wlds ?

La localisation nucléaire de Wlds a tout d'abord suggéré que son effet pouvait s'expliquer par des modifications d'expression génique et par l'activation de SIRT1, sirtuine nucléaire dépendante du NAD^+ (Araki et al., 2004). Cependant, des études récentes ont caractérisé la localisation subcellulaire de Wlds de manière plus approfondie, proposant un site d'action de Wlds en dehors du noyau. Il a ainsi été montré que les souris mutantes exprimant Nmnat1 au niveau cytoplasmique ont une protection axonale forte (Sasaki et al., 2009). Cependant, le site d'action exact de Wlds n'est pas encore identifié. Les mitochondries représentent un site potentiel d'action de Wlds. L'activation du pore de transition de perméabilité mitochondriale, ainsi que l'augmentation des niveaux calciques dans l'axone sont des événements majeurs dans la dégénérescence axonale. Leur suppression retarde fortement la dégénérescence Wallérienne (Barrientos et al., 2011; Sunio and Bittner, 1997). De plus, la surexpression de Nmnat3, isoforme mitochondriale de Nmnat, induit une forte protection (Avery et al., 2009; Yahata et al., 2009). Cependant, la surexpression d'une protéine ne présage pas de sa localisation subcellulaire précise, comme le suggère le travail de N. Yahata montrant que Nmnat3 surexprimée n'est pas localisée seulement dans la mitochondrie mais également dans le cytoplasme (Yahata et al., 2009). Par ailleurs, l'isoforme cytoplasmique Nmnat2 est également décrite comme essentielle dans l'intégrité axonale. Celle-ci est transportée dans l'axone par des vésicules liés à l'appareil de golgi mais semble particulièrement efficace pour la protection axonale lorsqu'elle est détachée de ces vésicules (Milde et al., 2013).

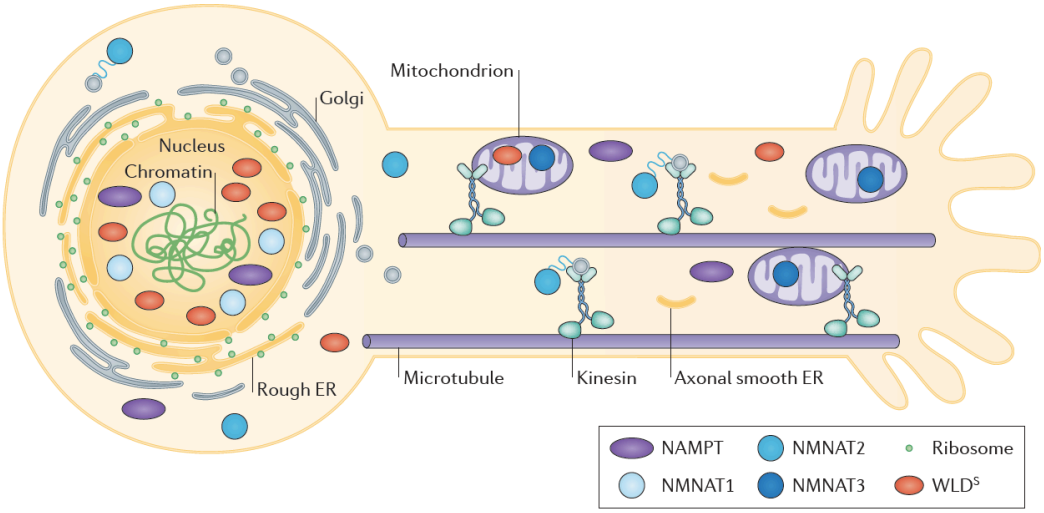


Figure 30 : Localisation subcellulaire de Wlds et des enzymes Nmnat (Conforti et al., 2014).

Wlds est donc une protéine fusion conférant une protection axonale forte dans différents modèles de dégénérescence axonale dans le SNP et dans le SNC. Son effet est principalement dû à l'activité de son domaine Nmnat1. Il a longtemps été pensé que l'activité de Wlds était associée à une action nucléaire mais plusieurs études tendent à prouver que l'effet protecteur serait plutôt lié à une action extra nucléaire de Wlds au niveau de l'axone.

II.2.d. Effets de Wlds dans les maladies neurodégénératives

La mutation spontanée *Wlds* confère une forte axo-protection lors de lésions induites par axotomie. Ainsi, initialement, Wlds a été montré pour retarder de 2-3 semaines la dégénérescence axonale d'une lésion du nerf périphérique induite par axotomie ou écrasement chez la souris (Lunn et al., 1989). Plus récemment, l'écrasement du nerf optique chez la souris a été montré pour être protégé pendant plus de deux semaines d'environ 50% (Beirowski et al., 2008). Mais, de nombreuses études ont mis en évidence des effets de Wlds dans d'autres modèles de dégénérescence axonale, notamment lors de processus neurodégénératifs. Il a été montré un fort effet axo-protecteur de Wlds dans des modèles de neuropathies induites par des agents toxiques tels que le taxol (Wang et al., 2002). La protéine Wlds se révèle également protectrice lors de stress excitotoxique induite par injection de NMDA ou par ischémie (Bull et al., 2012; Verghese et al., 2011; Zhu et al., 2013). L'intégrité axonale est également préservée par Wlds lors de processus neurodégénératifs progressifs tels que la maladie de Parkinson (Sajadi et al., 2004), le glaucome (Howell et al., 2007) ou les neuropathies motrices (Ferri, 2003). Le rôle central de Wlds dans la protection de l'axone lors

de processus neurodégénératifs variés rend pertinent l'étude et la caractérisation des mécanismes moléculaires d'axo-protection mis en jeu par cette protéine.

II.3. Implication des processus apoptotiques dans la dégénérescence de l'axone ? Rôle des caspases ?

La découverte de Wlds a donc montré que la dégénérescence de l'axonale est associée à un mécanisme actif et autonome. Cependant, la diversité des modèles de dégénérescence rend difficile la conception d'un mécanisme moléculaire unique et valide quelque soit le système étudié. Ainsi, l'implication des caspases et de l'apoptose dans la dégradation de l'axone est sujet à de nombreuses controverses. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée lié à l'activation de protéases à cystéine, appelées caspases. Ce processus sera présenté de manière plus détaillée dans le chapitre IV de cette introduction.

L'étude de Finn *et al* en 2000 s'intéresse à l'implication des caspases dans deux modèles de dégénérescence axonale induite soit par axotomie, soit par déprivation en facteurs trophiques. Dans ces deux systèmes, le processus apoptotique ne semble pas engagé. En effet, l'activation de la caspase 3 n'est pas détectée lors de la dégénérescence et l'inhibition des caspases par le z-VAD (un inhibiteur pharmacologique pan-caspase) n'a aucun effet protecteur sur la dégénérescence axonale observée (Finn et al., 2000). Cependant, des études récentes suggèrent une distinction mécanistique entre la dégénérescence axonale induite par axotomie ou par déprivation en facteurs trophiques. Le *pruning*, induit la plupart du temps par déprivation en facteurs trophiques dans les modèles *in vitro*, est associé à l'activation des caspases et donc à un processus apoptotique caspase-dépendant (Nikolaev et al., 2009; Pease and Segal, 2014; Schoenmann et al., 2010; Vohra et al., 2010). De plus, une étude parue en 2016 confirme que la dégénérescence axonale induite par déprivation en facteurs trophiques est dépendante d'un signal pro-apoptotique qui provient du corps cellulaire.

En effet, l'équipe de M. Tessier-Lavigne montre que les molécules impliquées dans la cascade apoptotique sont présentes au sein de l'axone mais requièrent une connexion avec le soma pour être activée (Simon et al., 2016). Dans cette étude, un décours temporel de la dégénérescence axonale divisé en trois étapes clés est mis en évidence : 1) la déprivation en facteurs trophiques à l'extrémité axonale déclenche un signal rétrograde vers le soma *via* des modifications des voies de signalisation impliquant Akt et JNK (c-jun-N-terminal kinase), telles que l'activation de DLK (Dual Leucine zipper Kinase); 2) Dans le noyau, ce signal, *via* les facteurs de transcription FOXO3a et c-Jun, active la machinerie apoptotique, en particulier

Puma. Ce processus peut être modulé par les facteurs anti-apoptotiques Bcl-w et Bcl-xL; 3) Un signal antérograde du soma vers l'axone déclenche ensuite la cascade apoptotique locale au sein de l'axone et provoque la dégénérescence. Ce travail représente une grande avancée dans la compréhension du mécanisme de dégénérescence axonale mais il reste spécifique au modèle de *pruning*.

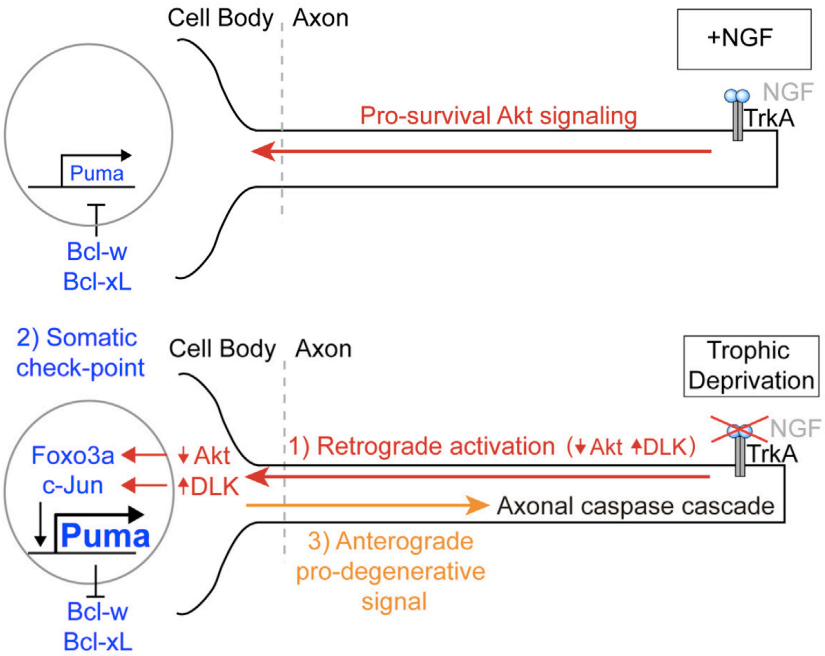


Figure 31 : Schéma représentant l'activation de la machinerie apoptotique lors d'une déprivation en facteurs trophiques localisée au niveau de l'axone (Simon et al., 2016).

D'autres études suggèrent que plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu au sein d'un même modèle de dégénérescence axonale. Par exemple, la dégénérescence axonale induite par une déprivation en KCl, mimant une dépolarisation membranaire, dans des neurones en grains du cervelet, peut être retardée par l'utilisation de z-VAD mais également par l'application de NAD^+ (Magnifico et al., 2013). De même, Schoenmann *et al* montre que l'inhibition des caspases dans un modèle de *pruning* n'est pas suffisante pour totalement protéger l'axone et que la modulation de la biosynthèse du NAD^+ est indispensable à l'intégrité axonale (Schoenmann et al., 2010). Si l'on étend l'étude de l'implication des mécanismes apoptotiques sur la neurodégénérescence, il émerge une notion de compartimentalisation de ces mécanismes. De nombreuses études insistent sur le fait que la dégénérescence du corps cellulaire et de l'axone ne semble pas être contrôlé par les mêmes mécanismes moléculaires. En effet, bien que nous venons de voir que la dégénérescence axonale peut dépendre de l'activation des caspases dans certains modèles, d'autres études, entres autres celles faites sur le rôle de la protéine Wlds, ont fait part d'un mécanisme

autonome au sein de l'axone. Ainsi, dans des modèles de neurodégénérescence induit par l'extinction de *Nmnat2*, la mort neuronale est protégée par le z-VAD tandis que la dégénérescence axonale ne l'est pas (Gilley and Coleman, 2010). De plus, le facteur anti-apoptotique Bcl-2 est susceptible de prévenir de la mort neuronale mais pas de la dégénérescence des axones lors de la neurodégénérescence de motoneurones (Sagot et al., 1995). De même, les facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak ne semblent pas impliqués dans le mécanisme de dégénérescence Wallérienne (Whitmore et al., 2003). Réciproquement, la protéine Wlds n'a aucun effet protecteur sur la dégénérescence du corps cellulaire, que ce soit sur la dégénérescence des cellules ganglionnaires rétiniennes induite par l'écrasement du nerf optique (Wang, 2007) ou lors d'un modèle expérimental de glaucome chez le rat (Beirowski et al., 2008). De même, le gène *Wlds* protègent les axones mais pas les corps cellulaires de motoneurones lésés par avulsion ou axotomie néonatale (Adalbert et al., 2006). La place centrale du NAD^+ a également été démontrée dans des études portant sur la dégénérescence axonale de type Wallérienne modélisée par une axotomie, un dysfonctionnement du transport axonal ou l'utilisation d'agents toxiques. Au contraire du *pruning*, ces modèles ne montrent pas d'implication des caspases dans les mécanismes de dégénérescence mais suggèrent la mise en place d'une cascade de signalisation locale au sein de l'axone (Gerdts et al., 2016). Le paragraphe suivant est donc consacré à cette cascade de signalisation, dont un des éléments majeurs est le métabolisme du NAD^+.

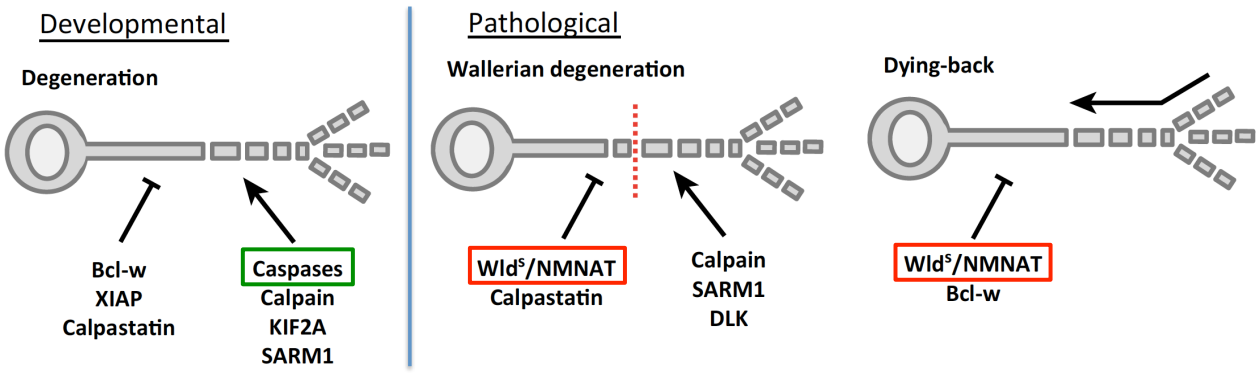


Figure 32 : Schéma représentant les principales protéines impliquées dans la dégénérescence axonale lors du *pruning* développemental, dans un contexte pathologique de dégénérescence Wallérienne ou de type *dying-Back* (Pease and Segal, 2014).

III. Cascade de signalisation de la dégénérescence axonale locale

III.1. Nmnat2, facteur de survie de l'axone

La découverte de la protéine Wlds a mis en exergue le rôle essentiel de Nmnat dans la protection axonale. Bien que ce soit l'isoforme nucléaire Nmnat1 qui soit codée par le gène *Wlds*, il semble que l'enzyme Nmnat1 endogène ne joue pas de rôle dans le maintien de l'intégrité axonale (Gilley and Coleman, 2010). Il semblerait plutôt que ce soit l'isoforme cytoplasmique Nmnat2, pouvant être transporté de manière antérograde dans l'axoplasme, qui soit un acteur central de la dégénérescence axonale. La dégradation de Nmnat2 pourrait conduire à la destruction de l'axone en perturbant le transport axonal. Ainsi, Nmnat2 serait un facteur de survie, dont la diminution pourrait déclencher un mécanisme local de dégénérescence axonale. Gilley et Coleman ont ainsi démontré en 2010 que le knockdown de *Nmnat2* dans des cultures primaires de neurones est suffisant pour induire une dégénérescence axonale sans autres lésions (Gilley and Coleman, 2010). Il semblerait donc que l'épuisement en Nmnat2 soit un événement initiateur du mécanisme de destruction axonale. L'expression de Wlds ou la surexpression de Nmnat1 dans le compartiment axonal permet donc le maintien de l'activité de Nmnat dans le neurone et le protège de la dégénérescence axonale.

III.2. La cascade de signalisation des MAP kinases

Récemment, plusieurs études ont été effectuées afin d'identifier des gènes susceptibles d'être impliqués dans la dégénérescence axonale. En 2009, les équipes de J. Milbrandt et A. DiAntonio ont ainsi identifié DLK (ou MAP3K12), une MAPK kinase kinase (MAPKKK).

Les souris mutées pour DLK ont une dégénérescence axonale retardée lors d'une transection du nerf sciatique (Miller et al., 2009). DLK agit en amont des MAP kinase JNK mais pas des MAP kinase p38 car l'inhibition pharmacologique de JNK induit une protection axonale comparable à celle obtenue après ablation de DLK (Miller et al., 2009). Les mêmes résultats ont été obtenus dans le cadre de l'étude de la dégénérescence axonale en réponse à la vincristine, molécule utilisée dans les chimiothérapies qui provoque des neuropathies du SNP (Miller et al., 2009; Yang et al., 2015). Deux autres kinases de la famille des MAPKKK ont été identifiées pour promouvoir la dégénérescence axonale : MEKK4 (MAP3K4) et MLK2 (MAP3L10). L'invalidation combinée des 3 MAPKKK conduit à une très forte protection de l'intégrité axonale *in vitro* et *in vivo* démontrant que l'activité de ces enzymes est une étape majeure du mécanisme de destruction de l'axone. Ces trois MAPKKKs activent les MAPKKs MKK4 et MKK7 qui à leur tour vont activer la famille des MAPKs (JNK1-3). La voie de signalisation des MAPK est donc au cœur du mécanisme de dégénérescence axonale. Le schéma ci dessus présente la voie de signalisation des MAPK intervenant dans le

contexte de l'intégrité axonale : les kinases mises en jeu sont encadrées en rouge. De plus, il est intéressant de noter que la kinase Akt régule l'activation de MKK4, *via* sa phosphorylation, après une lésion de l'axone. L'inhibition d'Akt accélère ainsi la dégénérescence de l'axone (Yang et al., 2015).

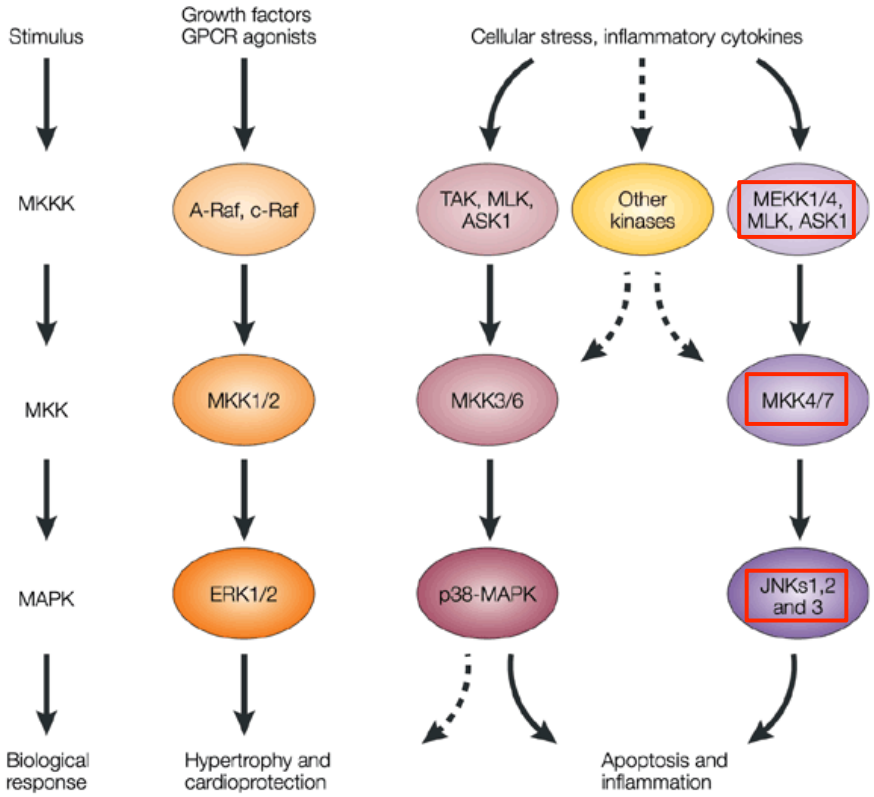


Figure 33 : Cascade de signalisation des MAP Kinases (Vlahos et al., 2003).

Les JNK ont des fonctions biologiques variées dans la réponse au stress, l'apoptose et la prolifération cellulaire (Leppä and Bohmann, 1999). Une des cibles des JNK potentiellement intéressante dans notre contexte est SCG10 (*Superior Cervical Ganglion 10*). En effet, les niveaux en SCG10 diminuent fortement après axotomie dans les neurones du SNP. De plus, le knockdown de SCG10 a tendance à accélérer la dégénérescence axonale (Eun et al., 2012; Shin et al., 2014). SCG10 est une protéine directement liée à la tubuline, qui prend part à la stabilisation des microtubules dans l'axone. La phosphorylation de SCG10 par JNK diminue fortement l'affinité de SCG10 pour la tubuline, provoquant ainsi le démantèlement des microtubules et la désintégration du cytosquelette. D'autres cibles sont encore à découvrir et à définir.

Ces études ont donc montré le rôle central de l'activation de la voie de signalisation des MAPK dans le processus de dégénérescence axonale. Cependant, plusieurs interrogations restent en suspens : Existe t-il d'autres liens entre dégénérescence axonale et activation de la

voie MAPK ? Quelles sont les autres cibles de JNK ayant part au mécanisme de destruction de l'axone ?

III.3. SARM1, acteur de la dégénérescence axonale

Aucune étude n'a pour l'instant établi de manière détaillée le lien entre lésion de l'axone et activation de la voie des MAPK. Cependant, depuis quelques années, la protéine SARM1 (*Sterile Alpha and TIR motif-containing protein 1*) a été identifiée pour jouer un rôle essentiel dans le processus de dégénérescence axonale. En effet, chez la drosophile, une mutation du gène *dSarm* provoque un retard significatif de la dégénérescence axonale des neurones du bulbe olfactif induit par axotomie (Osterloh et al., 2012). De même, dans des cultures primaires murines, le knockdown de *SARM1* protège de la dégénération induite par une lésion de l'axone (Gerdts et al., 2013). Enfin, *in vivo*, les souris KO *SARM1* présentent des axones restants intacts jusqu'à 14 jours après transection du nerf sciatique. Ce résultat est comparable à la protection induite par la surexpression de Nmnat dans le même modèle.

Quelle est la fonction moléculaire de SARM1 ? SARM1 est une protéine intracellulaire qui a été principalement décrite à la membrane externe des mitochondries. Cependant, sa localisation à la mitochondrie ne semble pas indispensable à son rôle dans la dégénérescence de l'axone (Gerdts et al., 2013). SARM1 n'a pas de fonction enzymatique connue mais est composée de plusieurs domaines d'interactions qui participent à la fois à sa régulation et à son activité. SARM1 est constitué d'un domaine C-terminal TIR (pour *Toll Interleukin Receptor*), de deux domaines SAM (pour *Sterile Alpha Motif*) et d'une région N-terminale.

Le domaine N-terminal a une fonction auto inhibitrice, qui restreint l'activité pro-destructrice de la protéine. Ainsi, il a été montré que le retrait du domaine N-terminal de la protéine induisait une dégénérescence axonale en l'absence d'autres lésions à la fois chez les mammifères et chez la drosophile. Les domaines SAM et TIR fonctionnent coopérativement dans l'induction de la dégénérescence axonale. Les domaines SAM permettent la multimérisation de plusieurs protéines SARM1 entre elles alors que le domaine TIR participe aux interactions avec d'autres protéines. Le mécanisme d'action de la protéine n'est pas encore totalement connu mais une des hypothèses est schématisée dans la Figure 34. Ainsi, la lésion de l'axone induirait un changement conformationnel de la protéine qui permettrait la dimérisation des domaines TIR. Ce dimère serait alors susceptible d'agir sur diverses protéines ayant part à la dégénérescence de l'axone. Cette hypothèse est confortée par

des études récentes montrant que la dimérisation forcée des domaines TIR est suffisante pour déclencher une dégénérescence rapide de l'axone (Gerdts et al., 2013; Yang et al., 2015). SARM1 a donc un rôle crucial dans le mécanisme de destruction de l'axone. Cette protéine agit localement au sein de l'axone où son activité est suffisante pour induire la dégénérescence de celui-ci.

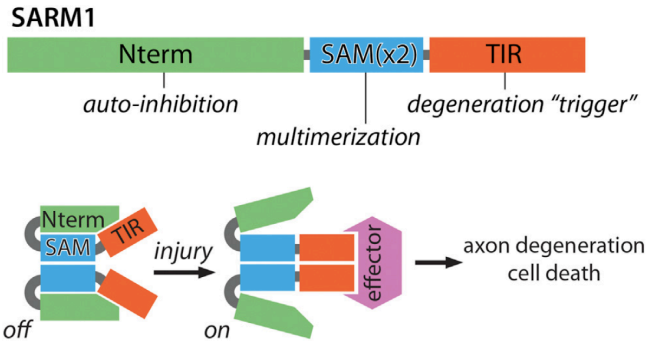


Figure 34 : Structure de la protéine SARM1 et modèle d'activation et d'auto inhibition lors d'une lésion (Gerdts et al., 2016).

Il a été montré dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* que l'activation de SARM1 déclenche une diminution des taux de NAD^+ dans les cellules (Gerdts et al., 2015). De manière intéressante, si l'on augmente les niveaux de NAD^+ en surexprimant les enzymes de sa voie de biosynthèse Nampt et Nmnat ou en ajoutant un précurseur du NAD^+, on bloque totalement la dégénérescence axonale induite par SARM1. De plus, nous avons vu précédemment que l'activité de Nmnat2 était cruciale pour la survie de l'axone. Est ce que la lésion de l'axone provoque une diminution de Nmnat2 qui entraine une baisse des niveaux en NAD^+ ? A quelle étape se place SARM1 ? Plusieurs résultats tendent à prouver que Nmnat2 a une fonction d'inhibiteur de SARM1. En effet, les souris double KO *Nmnat2/SARM1* sont en bonne santé tandis que les souris KO *Nmnat2* meurent au stade embryonnaire. Le rôle inhibiteur de SARM1 par Nmnat2 n'est pas nécessaire dans le cas du double KO puisque SARM1 y est absent (Gilley et al., 2015). D'après ces différents résultats, on comprend un peu mieux le rôle que peuvent avoir Wlds et Nmnat1 axonal dans la protection de l'axone. Celui-ci peut s'expliquer à deux niveaux : d'une part, Wlds et Nmnat1 axonal se substituent à Nmnat2 pour inhiber l'activation de SARM1 et d'autres part, ils permettent la synthèse de NAD^+ pour pallier à la diminution des taux de NAD^+ déclenchée par SARM1.

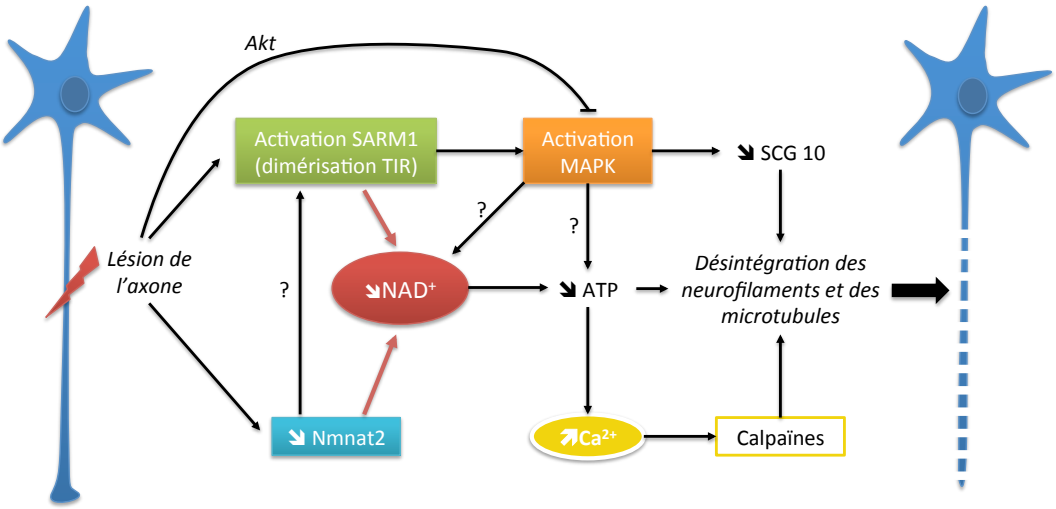


Figure 35 : Modèle de mécanisme de la dégénérescence axonale (d'après (Gerdts et al., 2016)**).**

Le schéma ci-dessus (Figure 35) récapitule les différents acteurs de la cascade de signalisation donnant lieu à la dégénérescence des axones. La lésion de l'axone provoque la diminution des taux en Nmnat2 et l'activation de SARM1. Le lien temporel entre les deux événements n'est pas encore résolu mais les deux conduisent à une diminution des taux en NAD^+. L'activation de SARM1 déclenche la voie de signalisation des MAPK qui conduit à la phosphorylation de SCG10, entrainant le démantèlement des microtubules et la désintégration du cytosquelette. Parallèlement, la chute des taux en NAD^+ provoque la chute des niveaux en ATP, l'influx calcique dans la cellule, l'activation des calpaïnes et finalement la fragmentation de l'axone. Certaines étapes de ce schéma restent hypothétiques, voire non définies. Cependant, le rôle central du NAD^+ et de Nmnat2 est incontestable. Dans la partie suivante, nous nous focaliserons sur les effets du NAD^+ et de son métabolisme dans la protection de l'axone.

III.4. Rôle central du métabolisme du NAD^+ dans la protection de l'axone

Comme nous venons de le voir dans ce chapitre, la dégénérescence de l'axone induite par différents types de lésions ou de stress peut être retardée par l'expression de Wlds ou d'enzymes de la voie de biosynthèse du NAD^+. Suite à la découverte de la mutation spontanée *Wlds*, de nombreux laboratoires de recherche ont étudié l'effet du NAD^+ lors de la dégénérescence de l'axone.

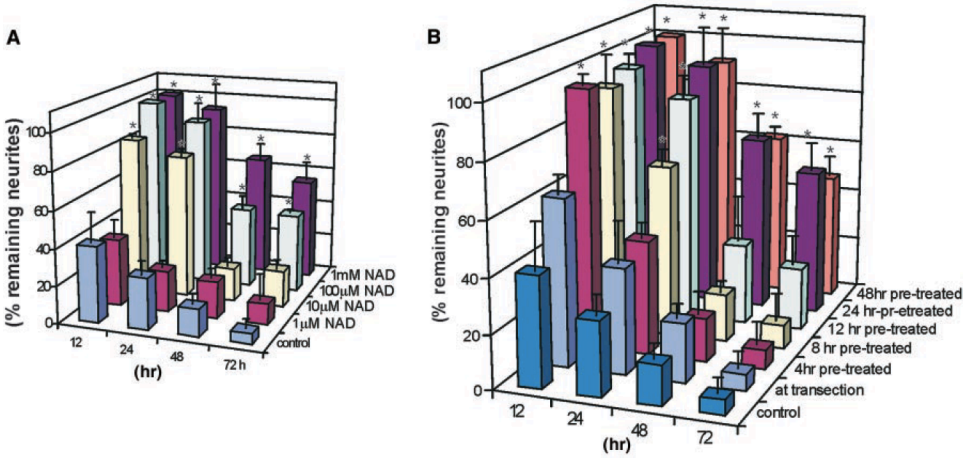


Figure 36 : Effet de l'application de NAD$^+$ exogène sur la dégénérescence axonale dans un contexte de dégénérescence Wallérienne induite par axotomie. (a) Effet du NAD$^+$ appliqué en pré-traitement de 24h avant l'axotomie pour différentes concentrations. La fragmentation axonale est déterminée à 12h, 24h, 48h et 72h. (b) Effet de la durée de pré-traitement avec 1mM de NAD$^+$ (Araki et al., 2004)

En particulier, l'équipe de Milbrandt a montré pour la première fois en 2004 que la dégénérescence axonale observée après axotomie de neurones des ganglions rachidiens (DRG pour *Dorsal Root Ganglion*) était retardée par l'application de NAD$^+$ exogène (Araki et al., 2004). Ils ont ainsi montré que le prétraitement de ces neurones du SNP avec 1mM de NAD$^+$ pendant 24h ou 48h diminuait la dégénérescence axonale observée 72h après axotomie d'environ 50% (Figure 36).

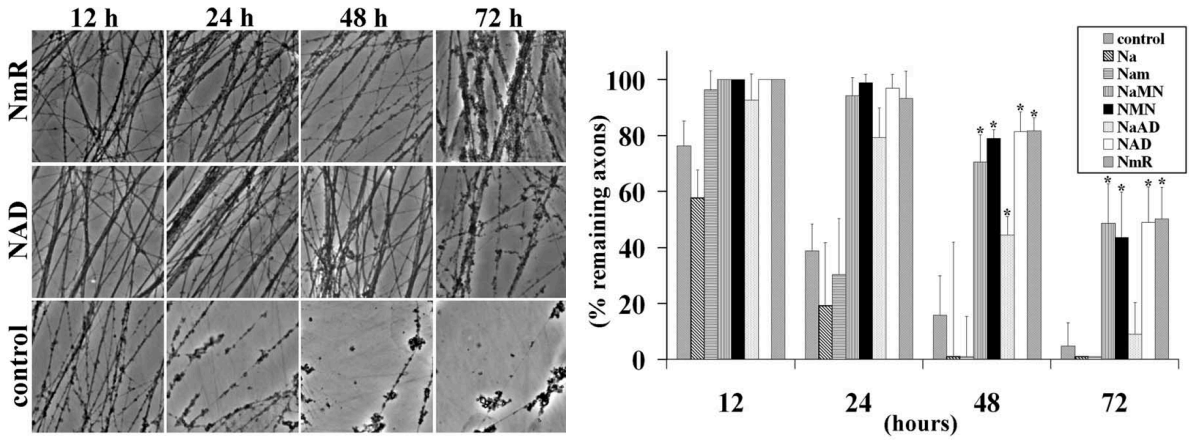


Figure 37 : Le traitement de DRG avec du NAD$^+$ ou certains de ses précurseurs retardent la dégénérescence axonale. A gauche : images à 12h, 24h, 48h et 72h représentant les neurones de DRG après axotomie et après application exogène de NAD$^+$ ou de NR. A droite : Analyse quantitative de la dégénérescence axonale observée sur les neurones de DRG lésés par axotomie. Le NAD$^+$, le NaMN, le NMN et le NR retardent la dégénérescence axonale jusqu'à 72h après axotomie (Sasaki et al., 2006).

La même équipe a montré en 2006 que certains précurseurs de la voie de biosynthèse du NAD$^+$ avaient également un effet protecteur vis à vis de la dégénérescence axonale induite par axotomie sur des DRG. Nous reviendrons plus en détails sur la voie de biosynthèse du NAD$^+$ dans le chapitre suivant mais on peut déjà noter que, parmi les précurseurs, le

Nicotinate Mononucléotide (NaMN), le Nicotinamide Mononucléotide (NMN) et le Nicotinamide Riboside (NR) présentent les mêmes effets protecteurs que le NAD^+ (Sasaki et al., 2006) (Figure 37).

Une autre étude parue en 2005 corrobore l'effet axo-protecteur du NAD^+ dans le SNP et montre que celui-ci peut avoir un effet local sur l'intégrité axonale, alors que l'axone est déjà déconnecté du corps cellulaire. En effet, l'application de NAD^+ 3 ou 5 heures après axotomie prévient de la dégénérescence des axones de DRG (Wang et al., 2005b). Ce résultat confirme que le processus de dégénérescence axonale est indépendant du corps somatique et suggère un effet local du NAD^+ associé au compartiment axonal.

Beaucoup de ces études ont été effectuées sur des neurones du SNP. Depuis quelques années, le laboratoire dans lequel j'effectue ma thèse s'est penché sur l'étude de la dégénérescence axonale et de la déconnection synaptique sur des neurones du SNC. Ainsi, S. Magnifico a mis au point pendant sa thèse un modèle de dégénérescence axonale de type *Dying-Back* au sein d'un dispositif microfluidique, basé sur une dépolarisation membranaire induite par une déprivation en KCl dans des neurones en grains du cervelet (CGN). Le pré-traitement pendant 24h de ces neurones avec 5mM de NAD^+ prévient, ou tout du moins, retarde la dégénérescence axonale (Magnifico et al., 2013).

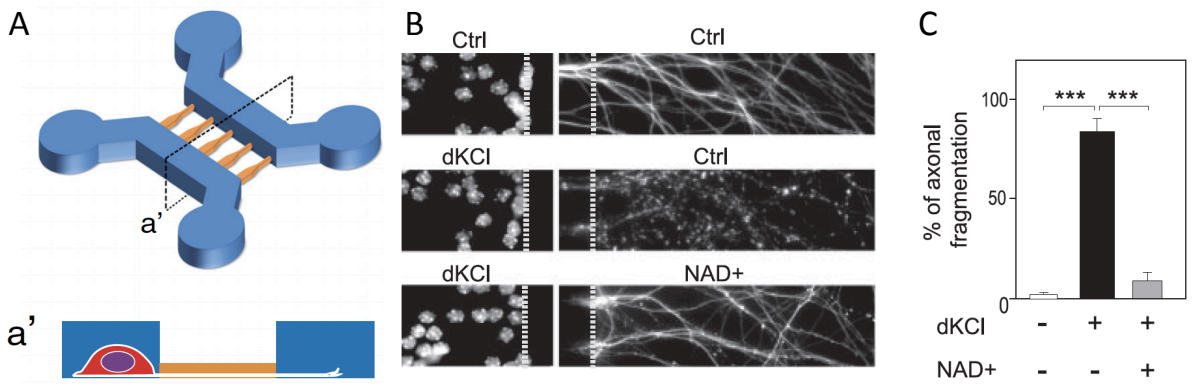


Figure 38 : Le pré-traitement de CGN avec 5 mM de NAD^+ protège de la dégénérescence axonale induite par une déprivation en KCl. (A) dispositif microfluidique composé de deux chambres séparées par des micros canaux ne laissant passer que les prolongements axonaux. Les neurones de CGN sont ensemencés dans la chambre proximale (à gauche) et les axones rejoignent la chambre distale (droite). (a') Vue transversale du dispositif microfluidique. (B) observation de la dégénérescence axonale après déprivation en KCl dans le compartiment proximal. Le NAD^+ est appliqué en pré-traitement 24h avant le stress dans le compartiment distal. (C) Quantification de la dégénérescence axonale pour les différentes conditions (Magnifico et al., 2013).

Toujours au sein de mon laboratoire de thèse, B. Deléglise et S. Magnifico ont étudié la dégénérescence axonale induite par l'application du peptide amyloïdogénique $A\beta_{25-35}$ sur des neurones corticaux cultivés dans des dispositifs microfluidiques. Ils ont montré que le pré-traitement des neurones avec 5mM de NAD^+ protège complétement de la dégénérescence axonale observée (Deléglise et al., 2014).

Le NAD^+ a donc un effet protecteur important vis à vis du processus de dégénérescence axonale dans différents modèles du SNP et du SNC.

CHAPITRE III :

NAD^+, ACTEUR ESSENTIEL A LA SURVIE DES CELLULES

L'importance du NAD^+ et de son caractère essentiel provient historiquement d'une pathologie appelée pellagre et dont la fréquence, au début des années 1900, fut très importante dans les régions rurales des Etats-Unis. Cette maladie se caractérise par l'apparition de trois types de symptômes : dermatite, diarrhée et démence qui sont la conséquence d'un défaut nutritionnel. En effet, J. Goldberger a découvert qu'une modification du régime alimentaire en remplaçant les produits à base de maïs par du lait, des œufs et de la viande permettait de guérir et de prévenir la pathologie (Goldberger et al., 1914). Plus tard, le Nicotinamide (NAM), le Nicotinate (NA) et le tryptophane ont été identifiés en tant que molécules capables de prévenir de la pellagre (Koehn and Elvehjem, 1937; Krehl, 1995; Spies et al., 1939). Le NAM et le NA, regroupés sous le terme de niacine ou vitamine B3, participent à la biosynthèse du NAD^+ en 2 ou 3 réactions enzymatiques tandis que la conversion du tryptophane en ce coenzyme requiert 7 étapes enzymatiques. Ainsi, la pellagre est une pathologie liée à une déficience en NAD^+. Aujourd'hui, cette maladie est devenue rare dans les pays développés mais a permis de mieux comprendre l'importance du NAD^+ et de ses précurseurs dans le métabolisme.

I. Fonctions du NAD^+ dans la cellule

Le NAD^+ est un coenzyme d'oxydoréduction présent dans toutes les cellules vivantes. Il est impliqué dans plus de 2000 réactions d'oxydo-réduction *via* le transfert d'ions hydrure lors de la réduction du NAD^+ en NADH (Opitz and Heiland, 2015). Le NAD^+ est également impliqué en tant que co-substrat dans plusieurs réactions enzymatiques mettant en jeu les sirtuines, les PARPs et les cADP-ribose synthases. Au cours du vieillissement et lors de processus neurodégénératifs, une diminution des concentrations intracellulaires en NAD^+ est observée, pouvant provoquer des dysfonctionnements cellulaires importants et ainsi mettre en jeu la survie des cellules. L'étude de la régulation et du métabolisme du NAD^+ est aujourd'hui au centre des préoccupations scientifiques dans le but de développer des stratégies préventives ou thérapeutiques vis à vis de diverses pathologies liées à l'âge ou neurodégénératives.

I.1. Implication du NAD^+ dans le métabolisme

Le NAD^+ et ses formes phosphorylées et réduites, $NADP^+$, NADH et NADPH ont un rôle central dans le métabolisme cellulaire et la production énergétique. Ainsi, le NAD^+ participe aux réactions d'oxydo-réduction en tant que donneur d'ions hydrures (NADH et NADPH) et en tant qu'accepteur (NAD^+ et $NADP^+$). Le couple NAD^+/NADH est majoritairement impliqué dans les réactions du catabolisme, telles que la dégradation des carbohydrates, des lipides, des protéines ou de l'alcool tandis que la couple $NADP^+$/NADPH est impliqué dans les réactions de l'anabolisme, participant ainsi à des voies de biosynthèse de macromolécules telles que les acides gras ou le cholestérol (Bogan and Brenner, 2008; Imai and Guarente, 2014). La plupart des méthodes de dosage biochimique utilisées actuellement ne permettent pas de distinguer les taux de NAD(H) de ceux de sa forme phosphorylées NADP(H). Cet élément est à prendre en compte dans l'analyse des résultats observés dans la littérature.

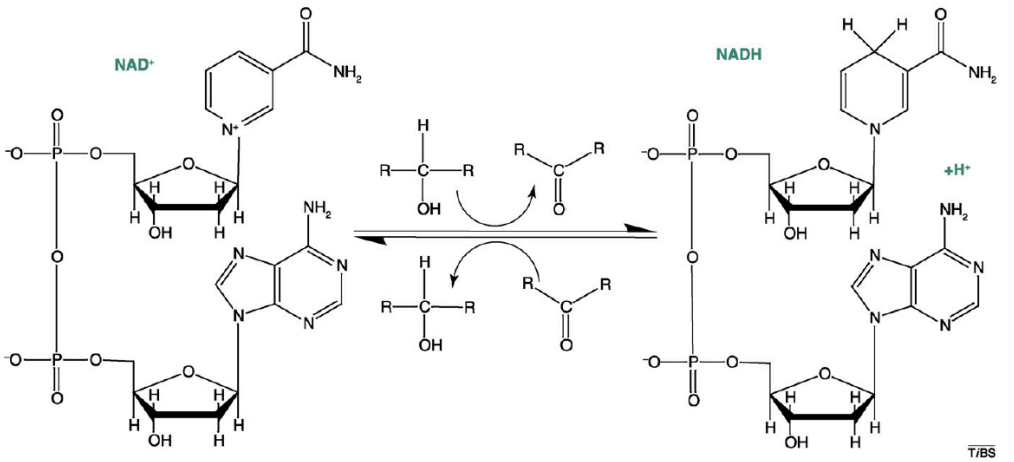


Figure 39 : Fonction de co-facteur du NAD^+. Transfert réversible d'ions hydrures permettant la conversion d'une fonction alcool en fonction cétone (Belenky et al., 2007a).

La conversion du NAD^+ en NADH est une étape clé dans les grandes voies métaboliques. Dans la glycolyse, elle permet la métabolisation du glucose en pyruvate. Dans le métabolisme mitochondrial, la réduction du NAD^+ en NADH est essentiel lors de l'oxydation de l'acetyl-coenzyme A (CoA) en dioxyde de carbone par le cycle de Krebs. Dans ces réactions, NAD^+ et NADH (ou $NADP^+$/NADPH) changent de degré d'oxydation mais ne sont pas consommés : les taux de NAD^+ totaux ne sont pas altérés. Cependant, il est important de noter que le NAD^+ peut être converti en $NADP^+$ par l'action de la protéine kinase NAD (NADK).

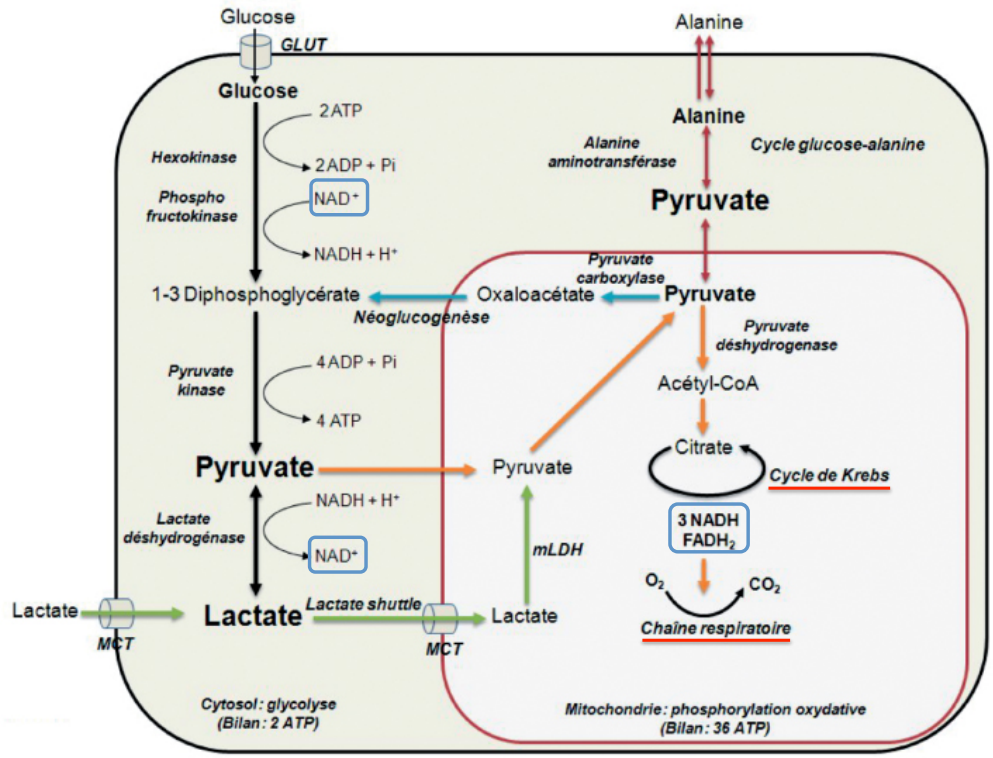


Figure 40 : Les grandes voies du métabolisme et l'implication du couple d'oxydo-réduction NAD^+/NADH.

I.2. Implications du NAD^+ dans des réactions enzymatiques

La fonction oxydo-réductrice du couple NAD^+/NADH est essentielle dans le métabolisme énergétique mais elle ne permet pas d'expliquer les modulations des taux de NAD^+ observés au cours du vieillissement et des stades précoces des maladies neurodégénératives. Depuis plusieurs décennies, le NAD^+ est apparu pour contribuer à plusieurs réactions enzymatiques. Trois familles d'enzymes peuvent ainsi cliver le NAD^+ : les sirtuines, les PARPs et les cADP-ribose synthases. L'utilisation du NAD^+ par ces enzymes est particulièrement importante car, en plus de moduler les taux de NAD^+ disponibles, cela influe sur un grand nombre de fonctions cellulaires dont nous allons discuter dans les paragraphes suivants.

I.2.a. Sirtuines

Les sirtuines sont une classe d'enzymes, principalement décrites pour leurs fonctions désacétylase ou ADP-ribosylase dépendante du NAD^+. Cependant, d'autres activités désacylases ont également été identifiées à ce jour, telles que la désuccinylation, la démalonylation ou encore la déglutarylation (Choudhary et al., 2014). Les sirtuines éliminent

donc les groupements acyles des résidus lysine de différentes protéines. Lors de cette réaction, le NAD^+ est clivé en NAM et en ADP-Ribose. L'ADP ribose reçoit le groupement acyle et génère ainsi l'O-acetyl-ADP ribose. Les sirtuines ont été nommées ainsi pour leur similitude avec Sir2 (pour *Silent Information Regulator 2*), initialement identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevesiae*, pour son implication dans l'extinction de gènes essentiels au fonctionnement du cycle cellulaire et à l'intégrité génomique. Sir2 a ainsi été montré pour moduler le métabolisme des levures, mais également des bactéries et des drosophiles, et avoir des effets bénéfiques sur le vieillissement et la longévité (Guarente, 2000; Kaeberlein et al., 1999). En particulier, Sir2 aurait un rôle essentiel dans l'augmentation de la durée de vie dans un contexte de restriction calorique (Cantó et al., 2015). L'activité désacétylase des sirtuines a été découverte ultérieurement.

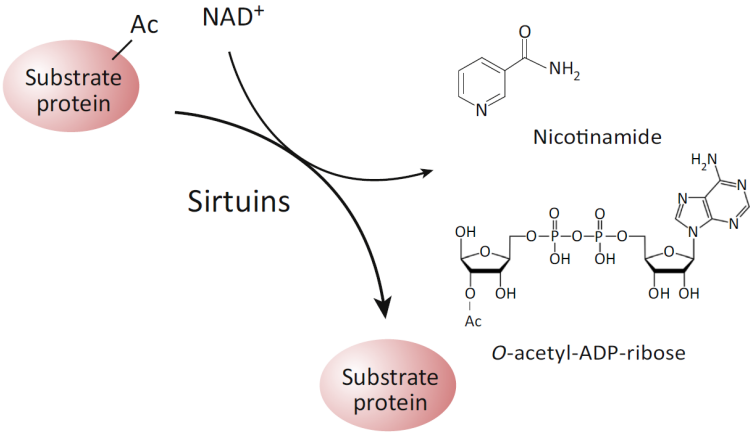


Figure 41 : Réactions de désacétylations de protéines par les sirtuines, dépendantes du NAD^+ (Imai and Guarente, 2014).

Chez les mammifères, les sirtuines se retrouvent sous la forme de sept orthologues localisés dans différents compartiments subcellulaires. SIRT1, SIRT6, SIRT7 sont nucléaires, SIRT2 est cytoplasmique et SIRT3, SIRT4 et SIRT5 sont mitochondriales. Les cibles des sirtuines sont nombreuses au sein de la cellule et leur désacétylation dépend du niveau en NAD^+ dans les différents compartiments cellulaires (Donmez, 2012).

- **SIRT1**

SIRT1, sirtuine la plus étudiée à ce jour, est un facteur primordial dans la régulation épigénétique en ciblant des histones spécifiques et en participant à la régulation de la transcription *via* son action désacétylase sur plusieurs facteurs de transcription (P53, PGC-1α, FOXO3a…). Les facteurs de transcription de la famille FoxO, cibles de la voie de signalisation PI3K/Akt ont un rôle important dans le contrôle de la prolifération, de la différentiation, de l'apoptose, dans la réparation de l'ADN et dans la défense contre le stress

oxydant. Une autre cible de SIRT1 est le facteur de transcription PGC1-α, décrit comme l'un des principaux régulateurs de la biogenèse et de la respiration mitochondriale. L'activation de PGC-1α a également été décrite pour limiter la production de ROS lors de processus neurodégénératifs (St-Pierre et al., 2006). SIRT1 peut également désacétyler p53, un suppresseur de tumeur, réduisant ainsi ses effets pro-apoptotiques. SIRT1 apparaît donc comme une enzyme essentielle pour l'intégrité génomique et l'adaptation métabolique. Son activation est étroitement liée aux taux intracellulaires de NAD^+ dans le noyau. Ces derniers sont susceptibles de varier selon le degré auquel le NAD^+ est consommé mais également selon son niveau de biosynthèse. A ce sujet, il a été montré dans plusieurs études que la concentration en NAD^+ suit un rythme circadien, variant ainsi d'un facteur 4 au cours d'une même journée. Cette variation dépend de la régulation circadienne d'une des enzymes de biosynthèse du NAD^+ appelée Nampt. Le niveau d'expression de cette enzyme est modulé par un complexe constitué de CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) et Bmal1 (*Brain-muscle-Arnt-like-protein 1*) (Ramsey et al., 2009). SIRT1 influe sur ce processus en provoquant la désacétylation de Bmal1 et des histones des séquences promotrices des gènes de la régulation circadienne. Il existe donc une boucle de rétroaction entre le métabolisme du NAD^+, l'activité de SIRT1 et le rythme circadien (Asher et al., 2008; Nakahata et al., 2009). Parmi les autres fonctions de SIRT1, cette enzyme a été décrite comme essentielle dans plusieurs processus neurodégénératifs, que ce soit dans la protection axonale induite par NAD^+ lors d'une axotomie dans le SNP (Araki et al., 2004) ou dans des modèles murins de maladies neurodégénératives (Donmez and Outeiro, 2013).

- **SIRT2**

SIRT2, présente dans le cytoplasme, est co-localisée avec les microtubules et est capable de désacétyler l'α-tubuline, composant principal des microtubules, mais également les facteurs de transcriptions FOXO1 et FOXO3a. Contrairement aux autres sirtuines, SIRT2 a des effets plus controversés. Ainsi, dans un modèle de dégénérescence Wallérienne, la surexpression de SIRT2 empêche l'hyperacétylation des microtubules et la protection contre la dégénérescence axonale. La délétion de *SIRT2*, quant à elle, améliore la résistance à la dégénérescence axonale dans des cellules en grains du cervelet (Suzuki and Koike, 2007). De plus, l'inhibition de SIRT2, par des outils génétiques ou pharmacologiques, protège de la toxicité induite par les agrégats d'α-synucléine dans des modèles murins de la maladie de Parkinson (Outeiro et al., 2007).

- **SIRT3**

SIRT3, présente à la mitochondrie, est également essentielle pour le métabolisme de la cellule. Elle cible des protéines mitochondriales dont l'activité influe sur la protection vis à vis du stress oxydatif et sur différents intermédiaires du métabolisme cellulaire. Ainsi, SIRT3, comme SIRT1, influe sur la biogenèse mitochondriale *via* l'activation de PGC-1α. De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de SIRT3 dans la prévention de la neurodégénérescence. SIRT3 est nécessaire pour les effets protecteurs conférés par la restriction calorique sur la perte d'audition associée au vieillissement (Someya et al., 2010). De plus, SIRT3 joue un rôle essentiel dans l'intégrité de l'axone. Dans les modèles de dégénérescence axonale *in vitro*, l'axoprotection conférée par l'application de NAD^+ exogène est reliée à l'activation de SIRT3 (Sébastien Magnifico et al. 2013). Plus récemment dans un modèle de perte auditive *in vivo* chez la souris, SIRT3 a également été décrite comme un composant essentiel de l'effet protecteur induit par la protéine fusion Wlds ou par le précurseur du NAD^+ : le Nicotinamide Riboside (NR) (Brown et al., 2014).

- **SIRT4 & SIRT5**

SIRT4 et SIRT5 sont également présentes à la mitochondrie. SIRT4 inhibe la glutamate déshydrogénase (GDH) mitochondriale par son activité ADP-ribosylase. Cette activité a notamment été montrée pour diminuer la sécrétion d'insuline dans les cellules pancréatiques β murines (Haigis et al., 2006). SIRT5 a été très peu étudiée et peu de cibles ont été caractérisées pour l'instant.

- **SIRT6**

SIRT6, sirtuine nucléaire, semble importante dans la stabilité et le maintien de l'ADN, entre autres par son action désacétylase sur l'ADN β-polymérase qui participe à la réparation de l'ADN. Les souris $SIRT6^{-/-}$ présentent ainsi des signes pathologiques multiples similaires à ceux observés durant le vieillissement (Mostoslavsky et al., 2006).

- **SIRT7**

SIRT7 interagit avec l'ARN polymérase I (Pol I) et avec les histones, régulant de manière positive la transcription de l'ADN. La délétion de SIRT7 arrête la prolifération cellulaire et déclenche la machinerie apoptotique (Ford et al., 2006).

Les sirtuines par leur action pléiotrope sur la cellule constituent un domaine d'étude essentiel dans la compréhension du métabolisme cellulaire et des processus de neurodégénérescence.

	Activité enzymatique	Localisation subcellulaire	Cibles
SIRT1	Désacétylase ADP-ribosylase (faible)	Noyau	Histones, FOXO, PGC-1α, p53
SIRT2	Désacétylase	Cytoplasme Noyau	α-Tubulin, FOXO
SIRT3	Désacétylase	Mitochondrie	PGC-1α
SIRT4	Désacétylase ADP-ribosylase	Mitochondrie	GDH
SIRT5	Désuccinylase Démalonylase Déglutarylase Désacétylase (faible)	Mitochondrie	-
SIRT6	Myristoylase Désacétylase (faible) ADP-ribosylase (faible)	Noyau	ADN β-polymérase
SIRT7	Désacétylase	Noyau	ARN polymérase I

Table 1 : Activité enzymatique, localisation subcellulaire et cibles des sirtuines décrites chez l'homme (Nakagawa and Guarente, 2014)

I.2.b. PARPs

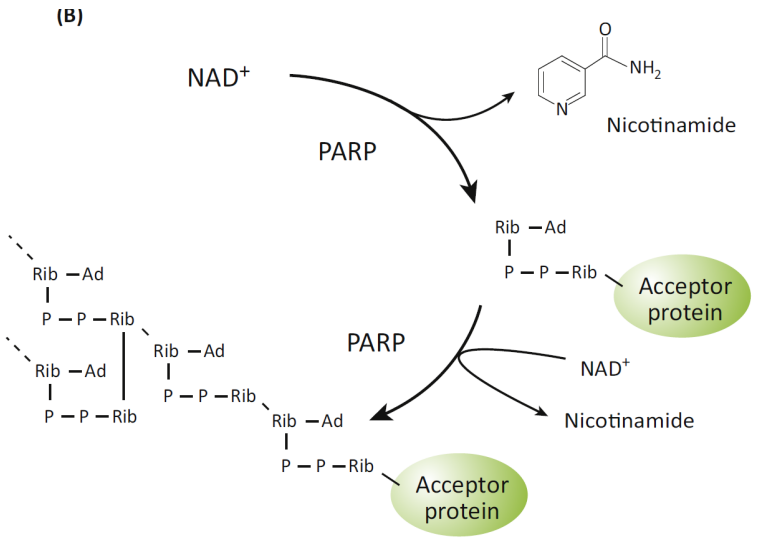


Figure 42 : Réaction de transfert de groupement ADP-ribose catalysée par les PARPs et mettant en jeu le NAD$^+$ (Imai and Guarente, 2014).

Le NAD$^+$ est également impliqué dans des réactions enzymatiques mettant en jeu des ADP-ribose transférases (ARTs) et poly(ADP-ribose) polymérases (PARPs). Ces protéines catalysent le transfert d'un ou plusieurs ADP-ribose et mènent à la modification de protéines par l'ajout de groupements ADP-ribosyl ou par la formation de longues chaines de poly ADP-ribose (PAR). Les PARPs forment une famille de 17 membres, partageant le même domaine catalytique. Parmi ces membres, les plus étudiés sont les enzymes PARP1 et PARP2. Celles-

ci ont été décrites pour être les plus abondantes et pour être responsables de la majorité de l'activité enzymatique des PARPs dans les cellules. Ce sont des enzymes nucléaires ubiquistes impliquées dans le maintien de la structure de la chromatine et du métabolisme de l'ADN (Houtkooper et al., 2010). Elles sont ainsi fortement activées lors de la dégradation de l'ADN et conduisent à une importante consommation en NAD^+.

Dans le cadre de stratégies thérapeutiques en oncologie, des inhibiteurs sélectifs des PARPs sont actuellement en développement afin d'induire spécifiquement la mort des cellules cancéreuses. Cependant, au regard du métabolisme en NAD^+, une sur-activation des PARPs peut conduire à un épuisement des taux de NAD^+, fragilisant également la survie de la cellule. Les inhibiteurs de PARPs ont ainsi également été décrits pour avoir un rôle protecteur dans des modèles de neurodégénérescence induite par excitotoxicité *in vitro* (Goebel and Winkler, 2006) et par ischémie *in vivo* (Greco et al., 2015). Dans le premier chapitre, nous avons ainsi vu que la diminution des taux de NAD^+ caractéristique du vieillissement et des processus neurodégénératifs était due à une sur-activation des PARPs. Une revue parue en 2015 reprend en détail l'implication de PARP1 dans les pathologies neurodégénératives et en particulier dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Martire et al., 2015).

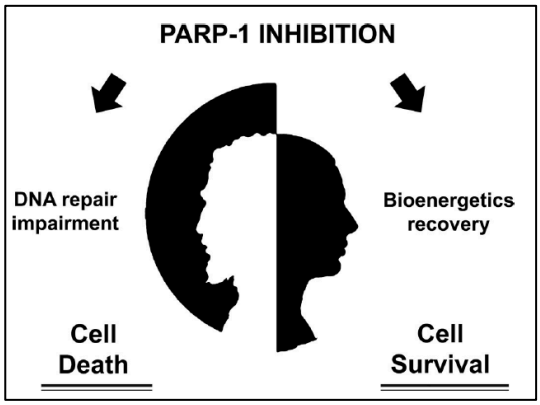


Figure 43 : Effet contradictoire de l'inhibition de PARP-1 : l'inhibition de PARP1 peut conduire d'un coté au dysfonctionnement de la réparation de l'ADN et donc à la mort cellulaire et d'un autre coté au maintien des taux de NAD^+ et à la survie cellulaire (Martire et al., 2015).

Les PARPs ont donc un rôle complexe et central dans le maintien de l'intégrité de l'ADN et dans la régulation des taux intracellulaires en NAD^+. La recherche actuelle sur le développement d'inhibiteurs sélectifs est donc cruciale, en ce qu'elle permettrait de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques en oncologie et également dans le domaine des maladies neurodégénératives.

I.2.c.cADP-ribose synthases

Les cADP ribose synthases sont deux ectoenzymes communément nommées CD38 et CD157. Par leur réaction avec le NAD^+, elles génèrent le cADP-ribose, qui joue un rôle très important dans la mobilisation du calcium intracellulaire.

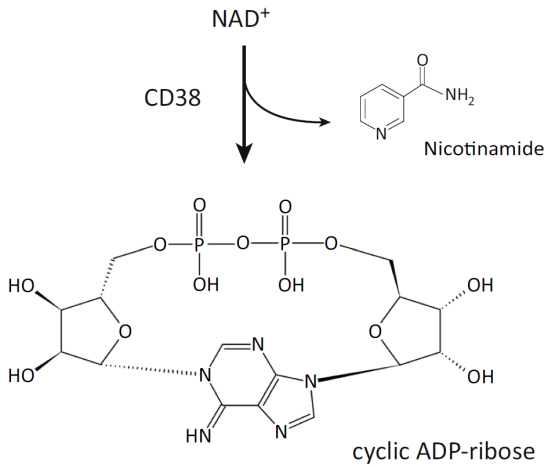


Figure 44 : Formation de cADP-ribose par la réaction du NAD^+ avec l'ectoenzyme CD38 (Imai and Guarente, 2014).

CD38 est également importante dans la régulation du métabolisme du NAD^+ : les souris déficientes en CD38 présentent des niveaux plus élevés en NAD^+ dans plusieurs tissus, y compris le cerveau (Aksoy et al., 2006). De plus, CD38 a été montrée pour être impliquée dans la régulation de l'activation des cellules microgliales, jouant ainsi un rôle important dans la neuroinflammation et les processus de réparation du cerveau (Mayo et al., 2008). Plus récemment, il a été montré en 2015 que les signes de la pathologie d'Alzheimer semblent être atténués chez des souris déficientes en CD38 (Blacher et al., 2015). Le rôle de CD38 dans la régulation du métabolisme du NAD^+, la signalisation calcique et les processus de neuroinflammation suggèrent une place centrale de cette enzyme dans l'étude des processus neurodégénératifs. La modification de son activité ou de son expression pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement des pathologies neurodégénératives.

II. Métabolisme du NAD^+

II.1.L'assimilation du NAD^+ dans l'organisme

Nous avons vu dans les deux premiers chapitres de cette introduction que le NAD^+ est un élément clé dans de nombreux processus neurodégénératifs et qu'il est impliqué dans la neuroprotection, en particulier dans le maintien de l'intégrité axonale. Le NAD^+ apparaît donc

comme un agent thérapeutique très intéressant. Celui-ci peut être biosynthétisé à partir de cinq précurseurs présents dans l'alimentation : le NA, le NAM, le nicotinamide riboside (NR) et l'acide nicotinique riboside (NAR) qui sont aujourd'hui tous référencés en tant que constituants de la niacine ou vitamine B3 ; Le tryptophane est également un précurseur qui permet la synthèse *de novo* du NAD^+ en plusieurs étapes constituant ainsi la voie dite de la kynurénine. Parmi les constituants de la niacine, le rôle du NR dans le métabolisme du NAD^+ a été établi relativement récemment grâce à l'identification, chez la levure et les mammifères, de protéines kinases capables de phosphoryler le NR et donc appelées Nicotinamide Riboside Kinase (Bieganowski et al., 2004). Au sein de notre alimentation, le NR est essentiellement présent dans le lait et ses produits dérivés. Très récemment, il a été montré que ce nucléoside constitue 40% des précurseurs du NAD^+ contenu dans le lait de vache (Trammell et al., 2016). Le NR est également l'un des métabolites intermédiaires de l'assimilation du NAD^+ alimentaire au niveau intestinal. En effet, chez le rat, il a été montré que des enzymes à activité pyrophosphatase présentes dans les sécrétions intestinales permettent le clivage du NAD^+ en NMN et 5'-AMP. Le NMN est ensuite très rapidement hydrolysé en NR, puis plus lentement en NAM. Ces travaux suggèrent que les enzymes impliquées dans cette conversion sont présentes à la membrane ou dans le compartiment intracellulaire des cellules intestinales (Baum et al., 1982; Gross and Henderson, 1983). De manière surprenante, la concentration de NAM détecté dans le plasma sanguin est très faible ([NAM]=340nM (Jacobson et al., 1995)) alors que les concentrations nécessaires pour augmenter les niveaux de NAD^+ en culture cellulaire *in vitro* sont supérieures à 1mM (Hara et al., 2007; Revollo et al., 2004). De même, les concentrations de NA sont très faibles dans le plasma ([NA]=80nM) (Jacobson et al., 1995). Au contraire, les concentrations de NMN sont beaucoup plus importantes ([NMN]=50-80µM) et suggèrent une place centrale du NMN dans l'assimilation du NAD^+ dans l'organisme (Revollo et al., 2007). Ce résultat est cohérent avec la présence d'une isoforme de l'enzyme Nampt (également appelé PBEF), permettant la conversion du NAM en NMN, dans le milieu extracellulaire (Revollo et al., 2007). Il a ainsi été récemment montré que cette activité extracellulaire de Nampt est nécessaire pour préserver les niveaux hypothalamiques de NAD^+ (Yoon et al., 2015). Cependant, cette observation ne fait pas l'unanimité car certaines équipes ont échoué à détecter du NMN dans le sang (Hara et al., 2011) et les étapes d'assimilation du NAD^+ et de ses précurseurs par l'organisme ne sont pas complétement élucidées.

En particulier, le transport du NAD^+ et de ses précurseurs à travers la membrane

plasmique fait l'objet d'un grand nombre d'études. Des transporteurs ont été identifiés pour le tryptophane (SLC7A5 et SLC36A4) et pour le NA (SLCA8 et SLC22A13) (Bahn et al., 2008; Gopal et al., 2007; Kanai et al., 1998; Muralidharan Pillai and Meredith, 2011). L'assimilation du NR et du NAR nécessiterait des transporteurs de nucléosides de type équilibratif, comme cela a été décrit par l'équipe de N. Nikiforov à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques (Nikiforov et al., 2011). En ce qui concerne le NAD^+, il faut savoir que son instabilité et sa polarité rendent son entrée dans la cellule difficile. Peu de données existent sur le transport direct du NAD^+ chez les mammifères. Le récepteur $P2X_7$ contribue au transport de la partie adénosine de la molécule de NAD^+ dans un modèle de culture d'astrocytes (Okuda et al., 2010). De plus, plusieurs connexines, décrites à la membrane de cellules astrocytaires, semblent participer au transport du NAD^+ dans un modèle de neurodégénérescence induit par l'activation des PARPs (Okuda et al., 2013). Au niveau neuronal, la connexine 43 permet la libération du NAD^+ vers le compartiment extracellulaire (Bruzzone et al., 2001). Cet efflux de NAD^+ permet son interaction avec l'ecto-enzyme CD38, ancrée à la membrane. Ces données suggèrent que le NAD^+ n'est pas transporté facilement à l'intérieur des cellules neuronales et corroborent l'efficacité relative du NAD^+ observée dans différents modèles. Ainsi, les concentrations nécessaires pour augmenter les taux de NAD^+ et/ou induire un effet protecteur dans des modèles *in vitro* de culture cellulaire sont comprises entre 1mM et 15mM alors que la concentration intracellulaire de NAD^+ estimée dans les cellules de mammifères est de l'ordre de 300-500µM (Houtkooper et al., 2010; Yamada et al., 2006).

Considérant ces résultats, il semble intéressant de se pencher sur les différents précurseurs de la voie de biosynthèse du NAD^+ dont la biodisponibilité, l'assimilation et la métabolisation pourraient être plus favorables à la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques.

II.2.Les différents précurseurs du NAD^+

II.2.a. Voie De novo

Le NAD^+ peut être synthétisé *de novo* à partir du tryptophane. Celui-ci est tout d'abord converti en N-formylkynurénine par l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) ou par la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO). L'activité des ces deux enzymes donne lieu à des métabolites de la voie kynurénine qui modulent l'activité des systèmes immunitaire, reproducteur et nerveux central. Il s'agit de l'étape limitante de cette voie de biosynthèse. Une

seconde étape importante est la modification spontanée du 2-amino-3-carboxymuconate semialdehyde (ACMS). Celui-ci se condense et se réarrange en quinolinate, qui est un précurseur de la synthèse du NAD^+ (Houtkooper et al., 2010).

La voie *de novo* a récemment été montrée comme indispensable au maintien du taux de NAD^+ intracellulaire ainsi qu'à la survie de neurones humains en culture. Cependant, de nombreuses études ont mis en avant un effet controversé du tryptophane du à la toxicité de certains intermédiaires de la voie, tels que l'acide quinolinique. En effet, bien qu'un effet protecteur du tryptophane soit observé lorsque les concentrations utilisées sont limitées, celui-ci peut cependant s'avérer neurotoxique dans certains modèles (Braidy et al., 2011). L'utilisation du tryptophane pour augmenter rapidement les taux de NAD^+ ne semble donc pas pertinente.

II.2.b. Voie de Preiss-Handler

Outre la voie *de novo*, la source de NAD^+ la plus importante dans l'alimentation est l'acide nicotinique (NA), un des composants la vitamine B3. Celui-ci est converti en NAD^+ selon la voie de Preiss-Handler mettant en jeu deux intermédiaires métaboliques : l'acide nicotinique mononucléotide (NAMN) et l'acide nicotinique adénine dinucléotide (NAAD). L'enzyme clé de cette conversion est la Nmnat qui transforme le NAMN en NAAD. Il existe 3 isoformes de cette enzyme que nous avons déjà largement évoqué dans le chapitre II pour leur rôle dans la dégénérescence axonale. Chacune de ces isoformes possède une localisation subcellulaire spécifique : Nmnat1 est nucléaire, Nmnat2 est cytosolique tandis que Nmnat3 est mitochondriale (Cantó et al., 2015). Un autre précurseur utilise cette voie de métabolisation : il s'agit du NAR qui par l'action des Nrk, que nous détaillerons par la suite, est converti en NAMN. Ce nouveau précurseur a été découvert très récemment par C. Brenner et son équipe mais son rôle dans le métabolisme du NAD^+ reste assez peu étayé dans la littérature aujourd'hui (Tempel et al., 2007).

Le NA est donc un précurseur important dans la synthèse du NAD^+. Cependant, bien qu'il ait été largement utilisé dans le traitement des dyslipidémies, il a été décrit en 2005 pour provoquer des effets secondaires tels que des rougeurs. Ces effets sont dus à son interaction avec le récepteur GPR109A présent au niveau des cellules immunitaires (Benyó et al., 2005).

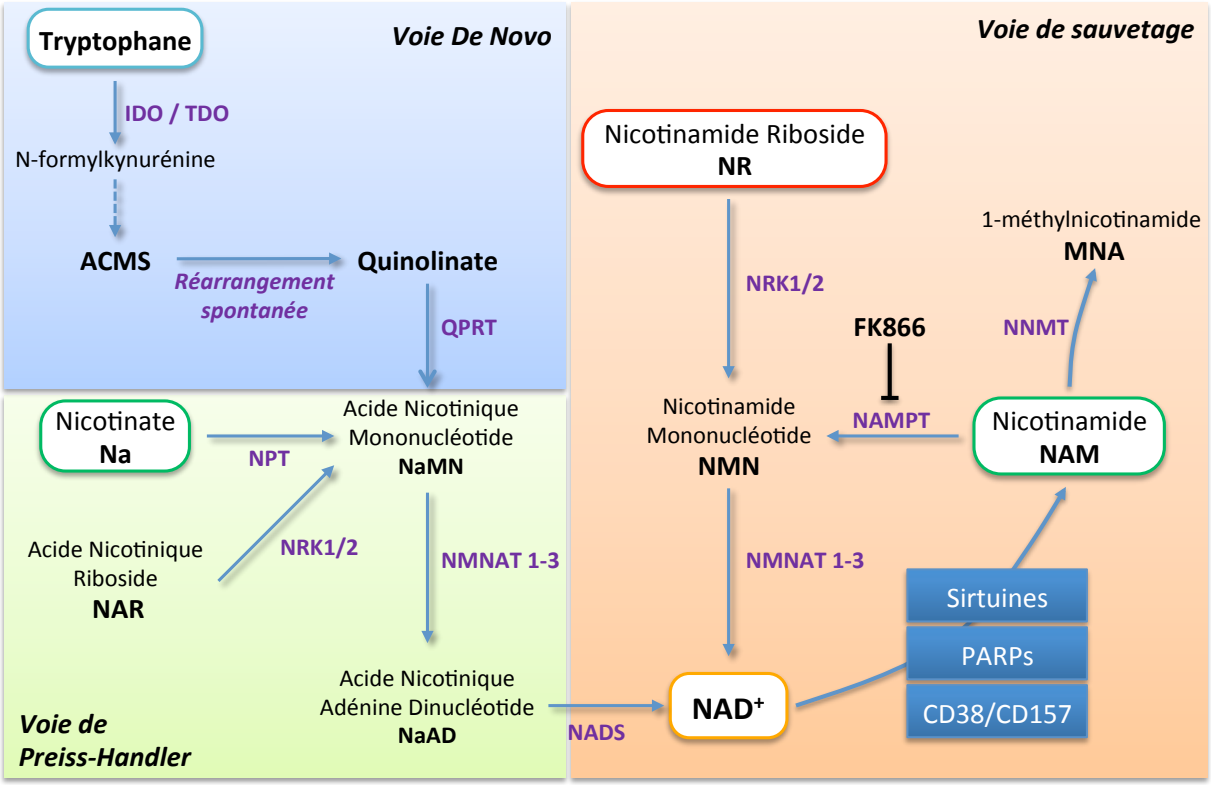


Figure 45 : Principales voies de biosynthèse du NAD$^+$: 1) Voie *de novo* à partir du tryptophane ; 2) Voie de Preiss-Handler à partir du nicotinate ; 3) Voie de sauvetage mettant en jeu le nicotinamide, produit des réactions du NAD$^+$ avec les sirtuines, les PARPs et les ecto-enzymes CD38 et CD157 ; 4) Voie de biosynthèse du NAD$^+$ à partir du nicotinamide riboside.

II.2.a. Voie de sauvetage

La voie de sauvetage est ainsi nommée car elle permet le maintien des taux de NAD$^+$ dans la cellule *via* le recyclage du NAM, produit des réactions du NAD$^+$ avec les sirtuines, les PARPs et l'ectoenzyme CD38. Ainsi, le NAM régule ces réactions en inhibant leur activité mais également en augmentant le niveaux en NAD$^+$. Le NAM est métabolisé en NAD$^+$ *via* l'activité de la Nampt qui convertit le NAM en NMN, puis par celle de Nmnat, déjà discuté précédemment qui convertit le NMN en NAD$^+$. Le NAM est la source principale de NAD$^+$ dans les cellules des mammifères. Cependant, son effet est controversé en ce qu'il représente à la fois un précurseur du NAD$^+$ et un inhibiteur des réactions enzymatiques utilisant le NAD$^+$ comme co-substrat. Ainsi, bien qu'il ait été montré pour prévenir les déclins cognitifs et la pathologie dans un modèle de souris transgéniques Alzheimer (Liu et al., 2013), le NAM n'a pas d'effets protecteurs dans un modèle de dégénérescence axonale induite par axotomie dans le SNP, dans lequel le NAD$^+$ est axoprotecteur (Sasaki et al., 2006).

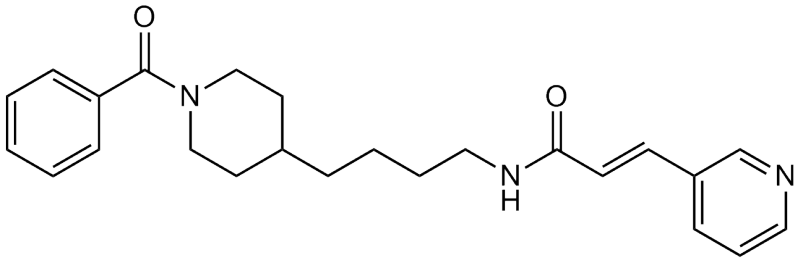
L'enzyme nicotinamide-N-méthyltransférase (NNMT) catalyse la formation du 1-méthylnicotinamide (MNA) à partir du NAM, en utilisant le S-adénosylméthionine (SAM) en

tant que donneur de groupement méthyle. Cette voie a été relativement peu étudiée. Pourtant, l'expression de la NNMT a récemment été montrée pour être augmentée dans des maladies neurodégénératives (Williams et al., 2005) et dans des cas d'obésité ou de diabète (Kraus et al., 2015; Lee et al., 2005; Yaguchi et al., 2005). La voie de conversion du NAM en MNA par le NNMT pourrait également être essentielle dans la survie des cellules cancéreuses (Ulanovskaya et al., 2013) et dans l'allongement de la durée de vie liée à l'activité des sirtuines (Schmeisser et al., 2013). Cette dernière étude, effectuée chez les nématodes montre également que la réaction du MNA avec l'aldéhyde oxydase, GAD-3, conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène, augmentant ainsi de manière transitoire les niveaux de ROS.

II.2.a. Le FK866

La voie de sauvetage du NAD^+ peut être bloquée par l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme Nampt, permettant la métabolisation du NMN à partir du NAM, appelé FK866. Cet inhibiteur non compétitif spécifique de Nampt induit donc une diminution des taux intracellulaires de NAD^+ ainsi que la mort cellulaire (Hasmann and Schemainda, 2003).

A



B Table 1 *Effect of FK866 on NAD(P)$^+$ synthesis rate (pmol/mg protein/6 h) of HepG2 cells*[a]

Precursor	Treatment	Nicotinic acid	Nicotinamide	NAD(P)$^+$
Nicotinamide	Vehicle	23 ± 4	10 ± 2	370 ± 25
Nicotinamide	8 h 10 nM FK866	21 ± 3	16 ± 2	11 ± 2

Figure 46 : Le FK866 (A) Structure du FK866. (B) Effet du FK866 sur les niveaux de NAD^+ dans des cellules HepG2 (Hasmann and Schemainda, 2003).

D'un point de vue thérapeutique, cette molécule a été étudiée dans le cadre de traitements en oncologie pour induire la dégénérescence de cellules tumorales. En effet, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont identifiés le FK866 comme un agent anti-tumoral efficace. Cependant, les résultats des essais cliniques ne sont pas concluants : il n'y a pas de diminution des tumeurs et certains patients présentent des effets secondaires importants (Von Heideman et al., 2010; Holen et al., 2008). Une explication de ce résultat serait que des précurseurs du NAD^+ présents dans le compartiment extracellulaire rentrent dans la cellule et

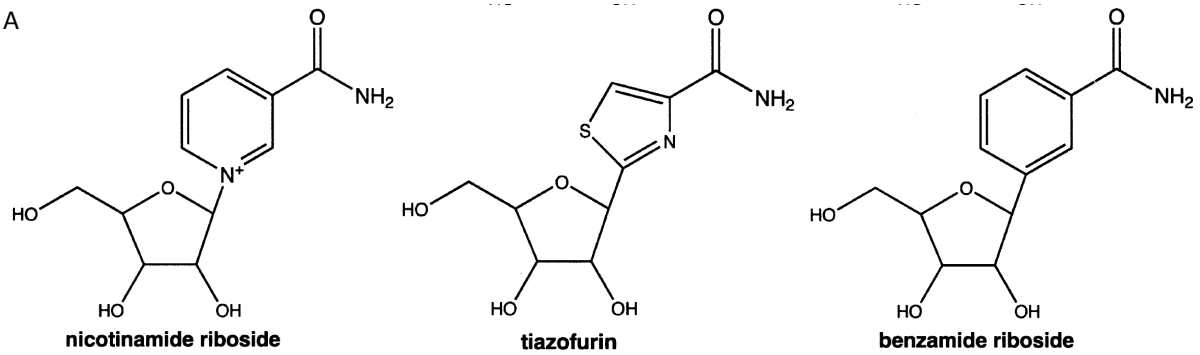
activent d'autres voies de biosynthèse, permettant ainsi le maintien des niveaux intracellulaires en NAD^+ en contrant le blocage de la synthèse du NAD^+ à partir du NAM. Une des voies potentiellement impliquée dans le maintien des niveaux de NAD^+ est celle du NR.

II.2.b. Le nicotinamide riboside

- **Historique de la découverte du NR et des Nrk**

Le NR a été historiquement identifié en tant que précurseur du NAD^+ chez la bactérie *Haemophilus Influenza* dans les années 1950 (Gingrich and Schlenk, 1944) car celle-ci n'exprime ni la voie de biosynthèse *de novo* à partir du tryptophane ni les enzymes nécessaires à la métabolisation du NA et du NAM en NAD^+. Le NR, riboside dérivé de la pyridine, possède deux analogues, la tiazofurine et le benzamide riboside, décrits en tant qu'agents anti-cancéreux. La conservation du NR et de sa métabolisation en NAD^+ depuis les bactéries jusqu'aux levures et aux mammifères a été mise en évidence relativement tardivement par l'équipe de C. Brenner. En 2004, les enzymes participant à la conversion du NR en NMN ont été caractérisées chez la levure et chez les mammifères (Bieganowski et al., 2004). Ainsi, bien que la protéine kinase Nrk mise en évidence chez la bactérie ne semble pas avoir d'orthologue chez la levure, C. Brenner et son équipe ont découvert un gène codant une protéine qui possède une activité enzymatique similaire à l'enzyme bactérienne, ce gène fut par conséquent dénommé *nrk1*. Chez l'homme, deux orthologues du gène de levure furent identifiés, l'un code la protéine kinase Nrk1, composée de 199 résidus d'acides aminés, et l'autre, code la protéine kinase Nrk2. Cette dernière, identique pour 57% à Nrk1, est une forme épissée de 230 résidus d'acides aminés issue d'une protéine de 186 acides aminés, impliquée dans la myogenèse et appelée ITGB1BP3 (pour *muscle integrin β1 binding protein*). La purification de la protéine Nrk1 chez la levure et des protéines Nrk1 et Nrk2 chez l'homme a révélé une grande spécificité pour la phosphorylation du NR et de la tiazofurine. Ainsi, Nrk1, que ce soit chez la levure ou chez l'humain, agit plus spécifiquement sur la tiazofurine que sur son substrat naturel le NR. La kinase Nrk2, quant à elle, présente la même activité que ce soit avec le NR, la tiazofurine ou l'uridine. Chez les mammifères, l'isoforme Nrk1 est exprimée de manière ubiquitiste tandis que l'expression de l'isoforme Nrk2 est restreinte au cœur, au muscle et au foie (Cantó et al., 2012).

A



B

Table 1. Specific Activity (nmole mg^{-1} min^{-1}) of human Nrk1, Nrk2, and yeast Nrk1 for Phosphorylation of Nucleoside Substrates

	Nicotinamide riboside	Tiazofurin	Uridine	Cytidine
Human Nrk1	275 ± 177	538 ± 277	19.3 ± 1.77	35.5 ± 6.44
Human Nrk2	2320 ± 200	2150 ± 2100	2220 ± 170	222 ± 88
Yeast Nrk1	535 ± 600	1129 ± 1344	15.2 ± 3.44	82.9 ± 4.44

Figure 47 : Le NR et les enzymes Nrk (A) Structure du NR et des ses analogues, le tiazofurine et le benzamide riboside. (B) Acitivité spécifique des enzymes Nrk1 et Nrk2 chez l'humain et de l'enzyme Nrk1 chez la levure (Bieganowski et al., 2004).

- **Effet biologique du nicotinamide riboside**

La voie métabolique permettant la conversion du NR en NAD^+ semble pertinente car elle permet le maintien des taux de NAD^+ lorsque les cellules ne sont plus capables de métaboliser le NAM ou le NA (Grozio et al., 2013; Nikiforov et al., 2011). De plus, le NR a été montré pour augmenter rapidement et efficacement les niveaux intracellulaires en NAD^+ chez les mammifères (Yang et al., 2007). Dans un modèle de restriction calorique chez *Saccharomyces cerevisiae*, le NR a été montré pour avoir un rôle essentiel dans la prolongation de la durée de vie (Lu et al., 2009). Dans un autre modèle chez la levure dans lequel le NA est absent du milieu de culture, le NR permet également un allongement de la durée de vie dépendant de Sir2 (Belenky et al., 2007b). Plus récemment, le NR a été montré pour améliorer le métabolisme oxydatif *via* l'activation de SIRT1 et de SIRT3. Par ce biais, le nucléoside empêche la prise de poids des souris soumises à un régime gras (Cantó et al., 2012). De manière similaire, la prise alimentaire de NR est capable de retarder la progression de myopathies mitochondriales, en induisant une augmentation de la biogénèse mitochondriale (Khan et al., 2014). L'apport du NR dans l'alimentation permet également une amélioration des dysfonctions de la chaîne respiratoire ou de l'intolérance à l'exercice, caractéristique d'un modèle murin de pathologie touchant la mitochondrie (Cerutti et al., 2014). Les études effectuées jusqu'à présent révèlent des effets bénéfiques du NR, qui par l'augmentation des taux intracellulaires en NAD^+, influe sur le métabolisme et le fonctionnement des mitochondries.

- **Effet neuroprotecteur du nicotinamide riboside**

Le métabolisme du NAD^+ a une place centrale dans les processus de neuroprotection et en particulier ceux associés à une dégénérescence de l'axone. Le NR, décrit comme un précurseur efficace du NAD^+, représente donc un agent thérapeutique potentiel dans la prévention des processus neurodégénératifs. Plusieurs études ont, d'ores et déjà, mis en lumière des effets protecteurs du NR dans différents modèles. En 2006, Sasaki a montré un effet axoprotecteur du NR, comparable à celui du NAD^+, sur des neurones du SNP lésés par axotomie, permettant le maintien de l'axone jusqu'à 72h après l'axotomie. Dans cette même étude, une forte induction de l'ARNm *Nrk2* est observée 14 jours après axotomie du nerf sciatique (Sasaki et al., 2006).

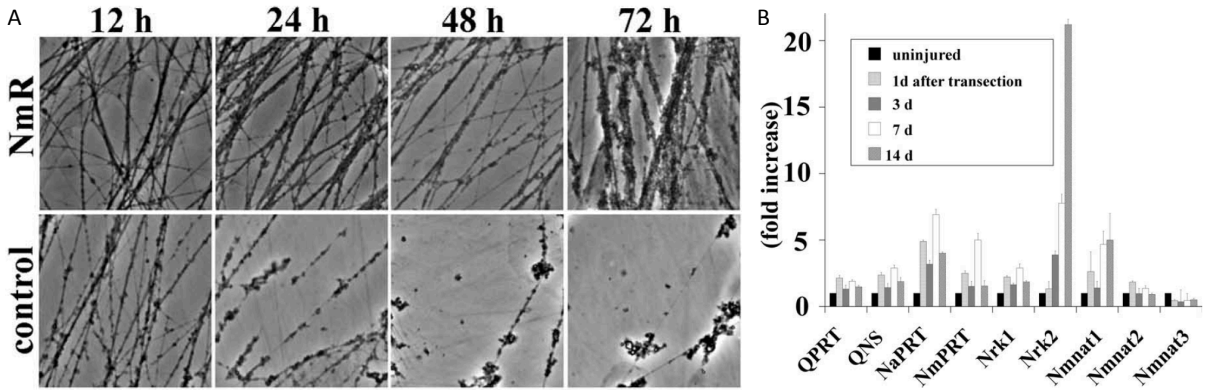


Figure 48 : Effet du NR sur la dégénérescence axonale dans le SNP. A) Le traitement de DRG avec du NR retarde la dégénérescence axonale induite par axotomie. B) Forte induction du messager *Nrk2* 14 jours après axotomie du nerf sciatique, comparé aux autres enzymes impliquées dans le métabolisme du NAD^+ (Sasaki et al., 2006).

Le NR a également été étudié *in vivo* sur un modèle de souris Alzheimer (Tg-2576). Dans cette étude, l'apport de 250 mg/kg par jour de NR dans l'alimentation des souris pendant 3 mois a montré une amélioration des défauts cognitifs induits par la pathologie. En effet, les souris alimentées avec le NR sont plus performantes vis à vis d'un test de cognition basé sur l'exploration d'un nouvel objet. De plus, les niveaux intracellulaires en NAD^+ sont significativement augmentés et la quantité de plaque $A\beta_{1-42}$ sensiblement diminuée. Enfin, l'ARNm codant PGC-1α, que nous avons déjà mentionné en tant que cible de SIRT1 et SIRT3 et pour son rôle dans la biogenèse mitochondriale, est induit d'environ 30% (Gong et al., 2013).

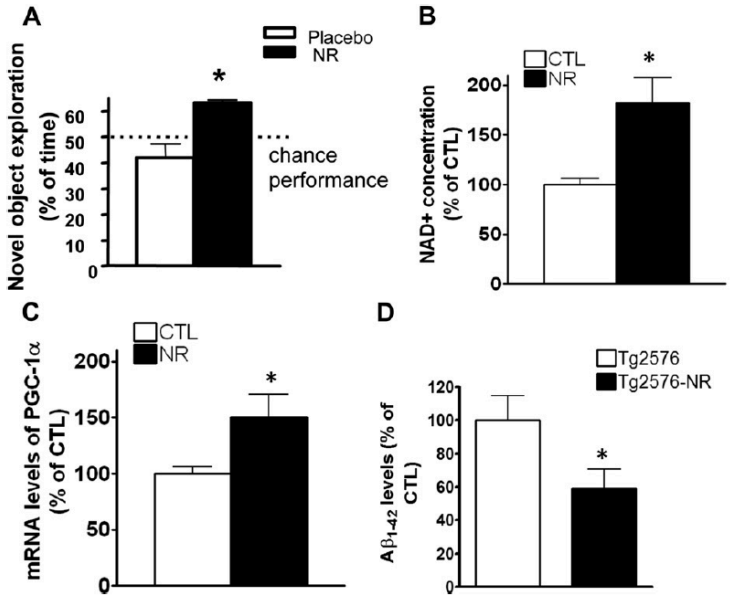


Figure 49 : Effet du NR *in vivo* dans un modèle de souris Alzheimer. (A) Le NR améliore les déficits cognitifs des souris Alzheimer, quantifiés par un test de reconnaissance d'un nouvel objet. L'alimentation des souris avec du NR pendant 3 mois permet l'augmentation des niveaux en NAD^+ dans le cerveau (B), ainsi que l'induction du messager *PGC-1α* (C), permettant ainsi la diminution des quantités d'$A\beta_{1-42}$ détectés dans le cerveau (D) (Gong et al., 2013).

Très récemment, l'effet du NR a été étudié sur la perte d'audition induite par un bruit intense et prolongé. L'injection de 1000 mg/kg de NR, deux fois dans la journée, pendant 5 jours avant l'exposition au bruit et jusqu'à 48h après l'exposition au bruit réduit significativement la perte auditive. L'effet du NR dans ce modèle est totalement dépendant de SIRT3, comme on l'avait déjà signalé au paragraphe I.2.a. D'un point de vue cellulaire, le traitement avec le NR empêche la rétraction des neurites induite par un bruit prolongé (Brown et al., 2014).

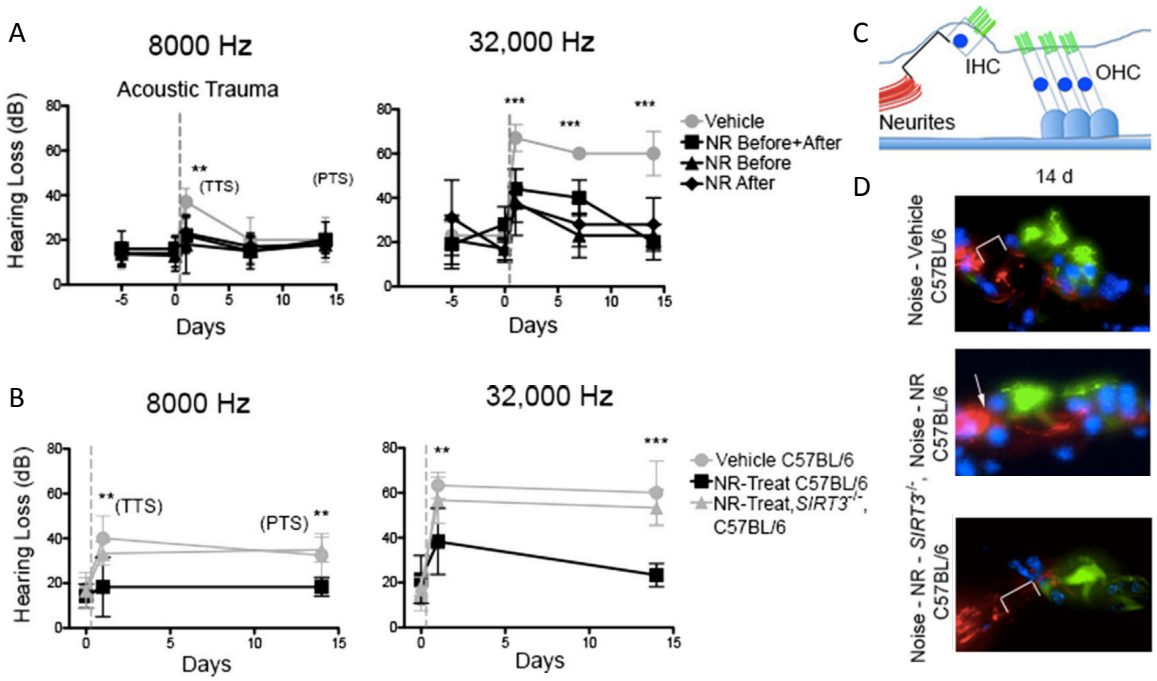


Figure 50 : Effet protecteur du NR dans un modèle de perte auditive induite par un bruit fort et prolongé. A) le traitement deux fois par jour avec du NR 5 jours avant (before), 5 jours avant et 14 jours après (before+after) ou 14 jours après (after) l'exposition au bruit prévient de la perte auditive. B) : l'effet protecteur du NR passe par l'activité de SIRT3. C) schéma représentant la rétraction des cellules ciliées internes lors d'un bruit prolongé. D) Le NR prévient de la rétraction des cellules ciliées internes, *via* l'activité de SIRT3 (Brown et al., 2014).

Même si elles restent peu nombreuses aujourd'hui, ces études sont prometteuses quant au potentiel du NR en tant qu'agent thérapeutique dans la prévention des pathologies neurodégénératives.

II.3. Métabolisme extracellulaire du NAD^+ et du NR

L'apport exogène de NAD^+ ou de NR induit des effets bénéfiques sur les organismes. Ces molécules sont capables de retarder des processus dégénératifs en évitant la diminution des taux de NAD^+ observée dans les cellules lésées. Les mécanismes d'assimilation et de métabolisation de ces molécules font l'objet de plusieurs études chez les bactéries, la levure et les mammifères. Ainsi, alors que le NR semble transporté à travers la membrane plasmique par des transporteurs de nucléosides, l'influx du NAD^+ dans les cellules est plus controversé. Comment expliquer alors les effets du NAD^+ exogène ? L'existence d'une voie de métabolisation extracellulaire du NAD^+ en NR a été suggérée dans le SNP et dans des lignées cellulaires (Bogan et al., 2009; Nikiforov et al., 2011; Di Stefano et al., 2014). Cette voie est déjà largement définie en ce qui concerne le métabolisme de l'adénosine triphosphate (ATP), nucléotide essentiel dans les réactions métaboliques intracellulaires. En effet, l'ATP peut être converti en ADP, AMP puis en adénosine dans le milieu extracellulaire *via* l'activité d'enzymes spécifiques. Ce métabolisme extracellulaire est particulièrement important en neurobiologie où l'adénosine a été décrit comme un modulateur essentiel de la transmission synaptique (Benarroch, 2010a). La conversion de l'ATP en ADP et AMP est effectuée par des ecto-enzymes dont les nucléosides triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) et les nucléotides pyrophasphatases/phosphodiestérases (E-NPPs). La conversion de l'AMP en adénosine est effectuée par l'ecto-enzyme 5'-nucléotidase (5'-eNT), ancrée à la membrane (Zimmermann et al., 2012). Enfin, les différents métabolites de l'ATP dans les cellules peuvent activer plusieurs récepteurs purinergiques. L'adénosine active préférentiellement les récepteurs de type P1, tandis que l'ATP et l'AMP peuvent activer des récepteurs de types P2 : les récepteurs P2X ionotropiques et les récepteurs P2Y métabotropiques (Abbracchio et al., 2009). D'autres effecteurs naturels ont été décrits dans le milieu extracellulaire pour réagir avec les E-NPPs. Il s'agit de dinucléotides, dénommés Ap_nA, qui possèdent deux

groupements adénosine liés par une chaîne de 1 à 6 phosphates. L'AP_4A (di-adénosine tetraphosphaste) peut notamment être converti en ATP par les E-NPPs.

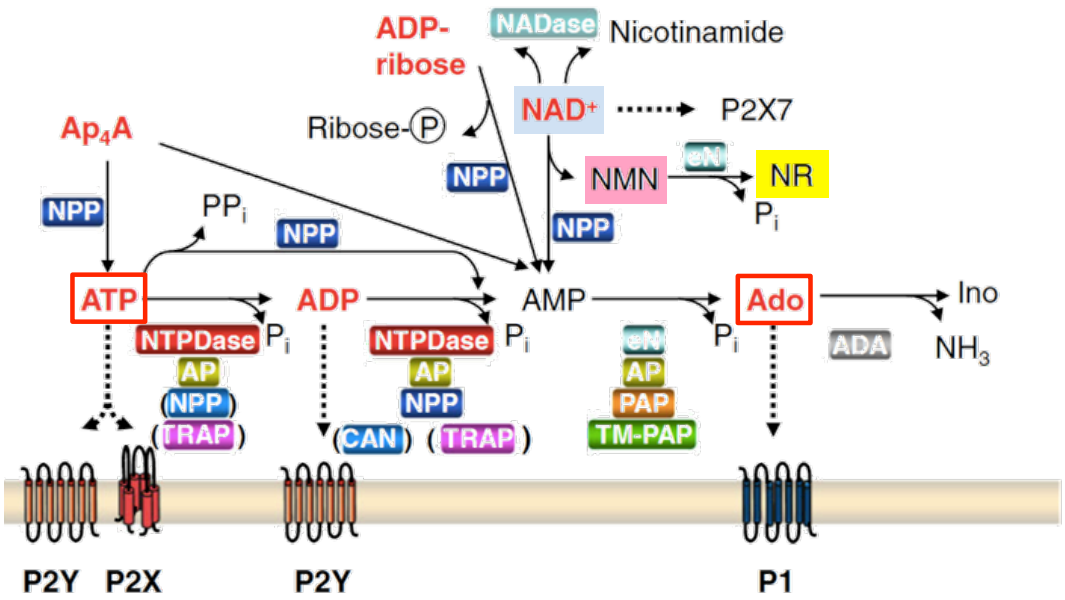


Figure 51 : Représentation schématique du métabolisme extracellulaire de l'ATP et du NAD^+ (Zimmermann et al., 2012).

II.3.a. Conversion du NAD^+ en NMN

La famille des E-NPP est constituée de sept protéines dont seulement trois sont capables d'hydrolyser des nucléotides : NPP1, NPP2 (Autotaxin) et NPP3 (Zimmermann et al., 2012). Ils s'agit de protéines transmembranaires de types II caractérisées par 1 domaine transmembranaire (TM) et localisées à la surface externe de la membrane plasmique (Zimmermann, 2000).

Elles possèdent une activité pyrophosphatase sur les nucléotides : l'ATP possède deux sites de clivage menant à la formation, soit de l'ADP, soit de l'AMP tandis que l'hydrolyse du NAD^+ donne lieu à la formation d'une molécule de NMN et d'une molécule d'AMP (Aleo et al., 2001). L'activité de ces enzymes peut être bloquée par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. Ainsi, le pyrodoxyl phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS), initialement utilisé en tant qu'inhibiteur des récepteurs purinergiques de types P2 (Burnstock, 2007), est un inhibiteur des E-NPP, plus particulièrement de NPP1 et NPP3 (Grobben et al., 1999a; Vollmayer et al., 2003a). L'AP_4A peut bloquer l'activité des E-NPP lors de la conversion de l'ATP ou du NAD^+, respectivement, en AMP et NMN car il agit en tant que substrat compétiteur (Vollmayer et al., 2003a). Ces deux inhibiteurs ont été montrés pour annuler les effets protecteurs induits par l'application de NAD^+ dans les deux modèles de dégénérescence évoqués précédemment (Nikiforov et al., 2011; Di Stefano et al., 2014),

suggérant que la conversion extracellulaire du NAD^+ en NMN est nécessaire au rôle du NAD^+.

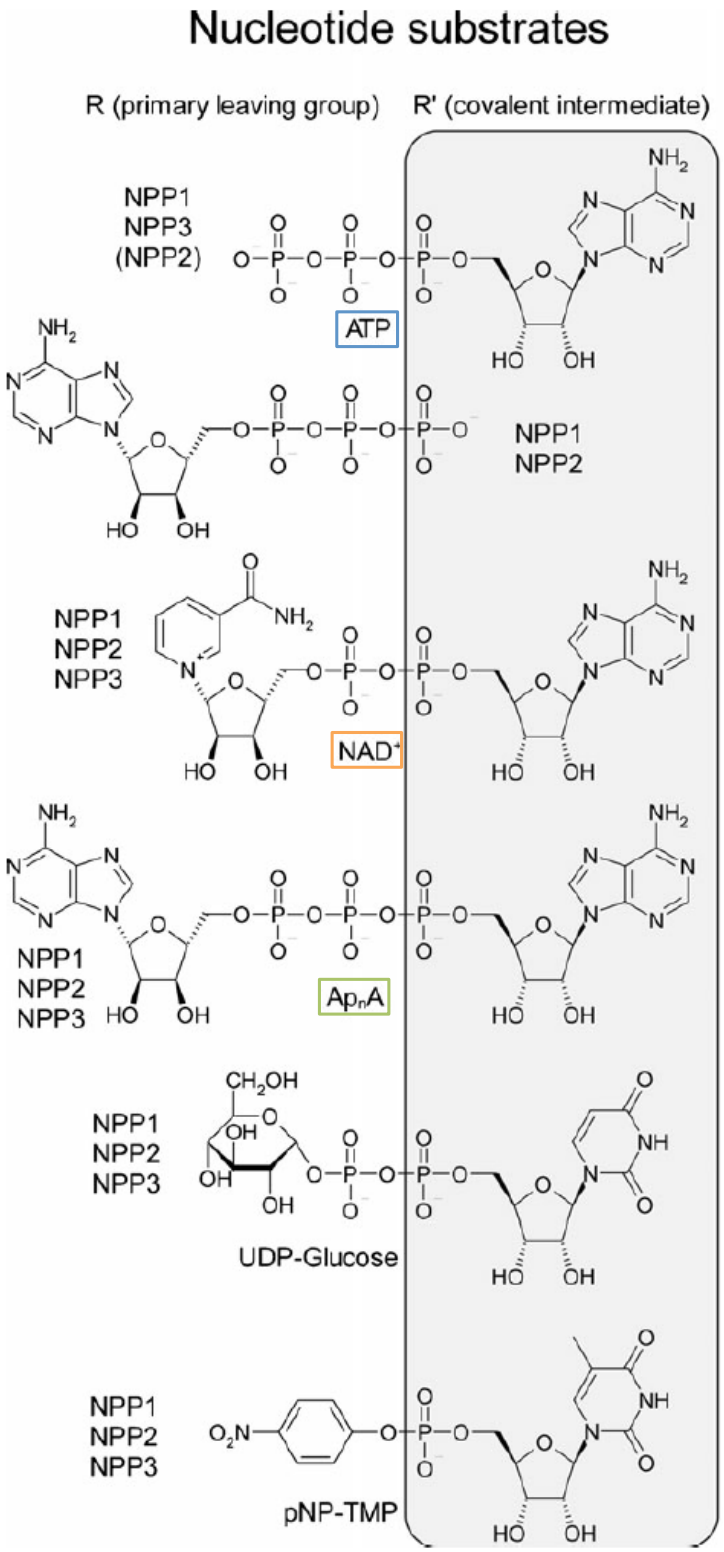


Figure 52 : Liaisons pyrophosphates de l'ATP, du NAD^+, de l'Ap_nA, de l'UDP-Glucose et du pNP-TMP hydrolysées par les NPP1/2 et 3 (Zimmermann et al., 2012).

II.3.b. Conversion du NMN en NR

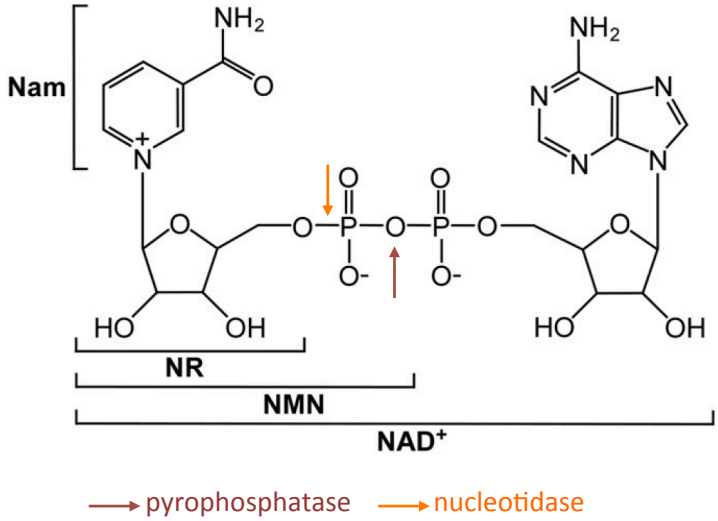


Figure 53 : Structure du NAD$^+$ et des différents précurseurs (Nam, NMN et NR). Conversion du NAD$^+$ en NMN par une pyrophosphatase. Conversion du NMN en NR par une nucléotidase.

La seconde étape de la voie extracellulaire est la formation du nucléoside par l'action de nucléotidases. Chez la levure, deux enzymes ont été identifiées pour être responsable de la conversion du NMN en NR. Isn1, IMP-specific 5'-nucléotidase, et Sdt1, pyrimidine 5'-nucléotidase, sont responsables de la déphosphorylation des mononucléotides de type pyridinique (Bogan et al., 2009). Chez les mammifères, ces enzymes présentent 7 isoformes : 6 cytosoliques et une ecto-enzyme 5'-eNT, communément appelée CD73 (Cardoso et al., 2015). La déphosphorylation de l'AMP et du NMN est effectuée *via* l'action de CD73, donnant ainsi lieu à la formation d'adénosine et de NR (Zimmermann et al., 2012). CD73 est une protéine de 70 kDa ancrée à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un groupement phosphatidyl-inositol glycosylé (GPI). CD73 possède une forte affinité pour l'AMP (Km=3/19µM) mais d'autres substrats ont également été décrits avec des affinité plus réduites, tels que le cytosine monophosphate (CMP) (Km=35/360µM) (Hunsucker et al., 2005). Dans le contexte de l'étude de la conversion extracellulaire du NMN, le CMP peut inhiber l'activité nucléotidase de CD73 en tant que substrat compétiteur. Le CMP a été montré pour annuler les effets du NMN sur des lignées cellulaires et sur des neurones du SNP (Nikiforov et al., 2011; Di Stefano et al., 2014), suggérant que la conversion du NMN en NR est nécessaire à son rôle protecteur.

Family name and EC number	Protein name	Full name, aliases, historical names	Gene name	MA	# Cystine bridges	Major substrates	Final product	Substrate affinity (K_m), µM
Ecto-5′-nucleotidase (EC 3.1.3.5)	eN	CD73, ecto-5′-nucleotidase, eNT, low K_m 5′-NT	*5NTE* (*ENT5*)	GPI	4	NMP	Nucleoside, P_i	AMP 1–50
						NMN	NR, P_i	
Ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase (EC 3.6.1.9) (EC 3.1.4.1)	NPP1	PC-1, NPPγ, PDNP1	*ENPP1*	N	16 (a)	*NPP1 to NPP3:*		
						NTP, NDP	NMP, PP_i, Pi	ATP ~50–500
						Dinucleoside polyphosphates	NMP + Np_{n-1}	Ap_nA ~1–20
						NAD^+	AMP + nicotinamide mononucleotide	–

Figure 54 : Description et caractéristiques de l'ecto-5'nucleotidase CD73 et de l'ecto-nucléotide pyrophosphate/phosphodiestérase NPP1 (Zimmermann et al., 2012)

II.3.c. Les transporteurs de nucléosides

La conversion extracellulaire du NAD+ induit l'augmentation des niveaux de NR dans le milieu extracellulaire. Un transporteur spécifique du NR, Nrt1, a été décrit chez la levure pour permettre l'entrée du NR dans les cellules (Belenky et al., 2008). Chez les mammifères, les nucléosides de type purique et pyrimidique ainsi que certaines nucléobases peuvent pénétrer dans les cellules via plusieurs transporteurs aux nucléosides (NTs). Les NTs se regroupent dans deux grandes familles: les transporteurs équilibratifs de nucléosides (ENTs) aussi appelés SLC29 et les transporteurs concentratifs de nucléosides (CNTs) également nommés SLC28 (Baldwin et al., 1999). Les récepteurs purinergiques de type P1, que nous avons évoqué précédemment, sont également susceptibles de transporter des nucléosides tels que l'adénosine (Abbracchio et al., 2009).

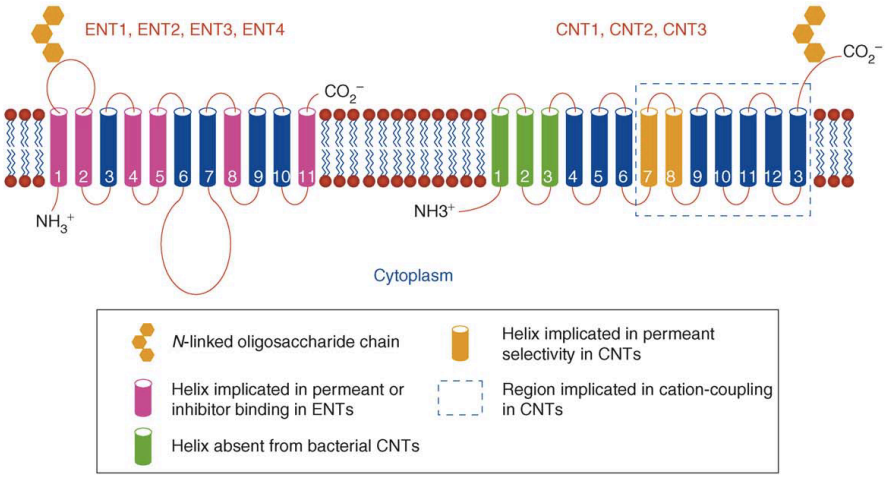
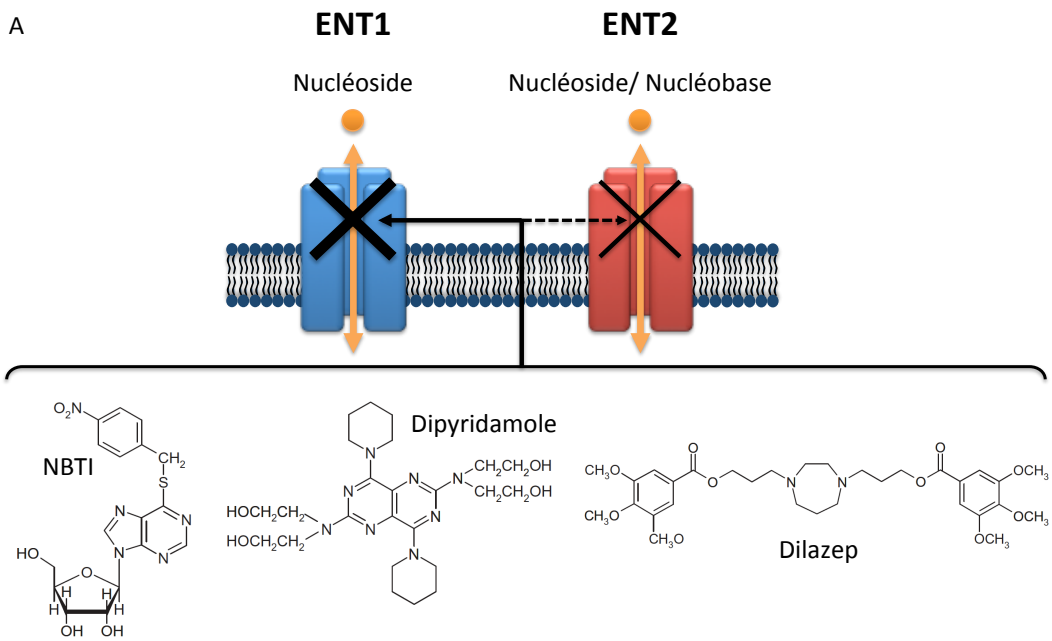


Figure 55 : Topologie structurale des transporteurs de nucléosides ENTs et CNTs. Les ENTs possèdent 11 domaines transmembranaires et sont inhibés par le NBTI. Les CNTs possèdent 13 domaines transmembranaires et participent aux flux sodiques (King et al., 2006).

- **ENTs : SLC29**



B

Inhibitor (units of concn.)	Inhibition of mENT1		Inhibition of mENT2	
	Oocytes (IC_{50})	Ehrlich cells (K_i)	Oocytes (IC_{50})	Ehrlich cells (K_i)
NBMPR (nM)	1.4 (0.8–2.3)	0.16 ± 0.03	> 10000	16000 ± 3000
Dipyridamole (nM)	75 (36–158)	66 ± 17	2204 (481–10100)	371 ± 36
Adenosine (μM)	131 (46–373)	47 ± 2	265 (109–644)	61 ± 7

Figure 56 : Inhibition des NTs ENT1 et ENT2. (A) Inhibiteurs spécifiques de ENT1 et ENT2 (inspiré de (Baldwin et al., 2004)). (B) Valeurs d'IC50 obtenues par l'inhibition du transport de l'uridine par ENT1 et ENT2 dans des oocytes; et valeurs de Ki obtenues par l'inhibition du transport de l'uridine par ENT1 et ENT2 dans des cellules murines.

Les ENTs sont des protéines à onze domaines transmembranaires qui permettent le transport de nucléosides ou nucléobases. Il existe quatre différents ENTs : ENT1/ENT2/ENT3/ENT4, tous largement distribués chez les mammifères et détectés dans le cerveau. ENT1 (SLC29A1) et ENT2 (SLC29A2) sont les deux transporteurs les mieux caractérisés et les plus abondants. Ils semblent avoir des fonctions centrales au sein de la cellule. ENT1 permet le transport d'une large variété de nucléosides de type purique et pyrimidique mais pas de l'uridine. Son activité est inhibée par le nitrobenzylthioinosine (NBTI ou NBMPR) ainsi que par les vasodilatateurs dipyridamole et dilazep (King et al., 2006; Young et al., 2013). ENT2 permet également le transport de nucléosides de types purique et pyrimidique, avec une affinité apparente plus faible que celle de ENT1. L'activité de ENT2 est très peu sensible au NBTI (Baldwin et al., 2004) et elle est faiblement inhibée par le dipyridamole (Kiss et al., 2000; Ward et al., 2000).

- **CNTs : SLC28**

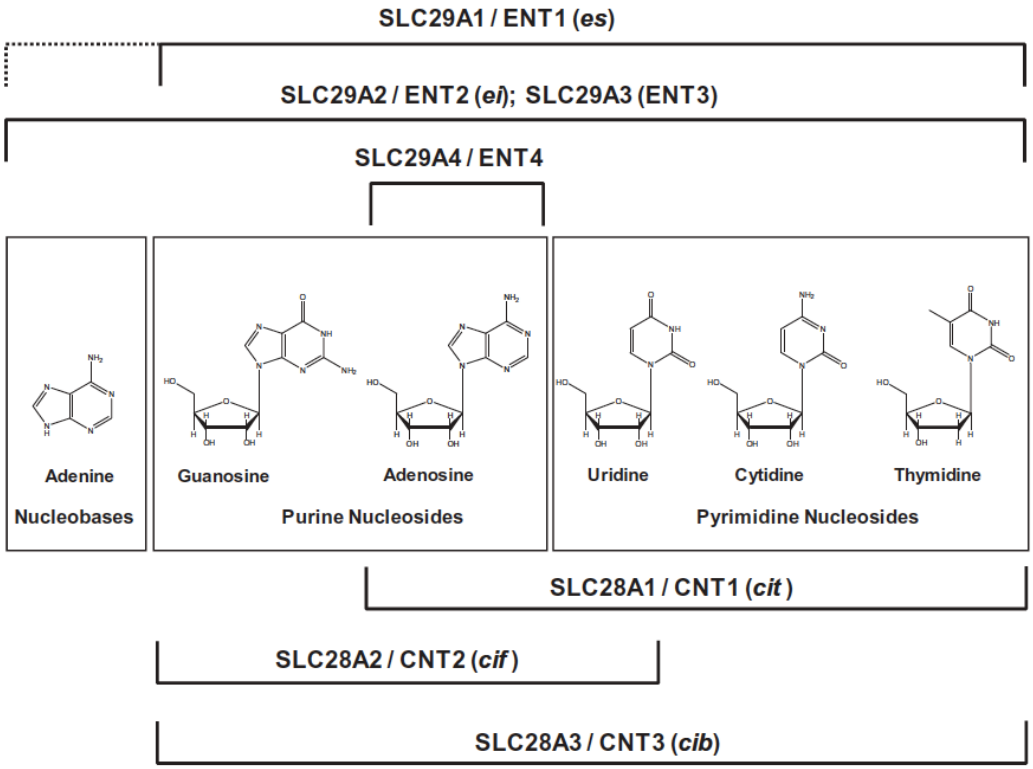


Figure 57 : Les substrats des différents transporteurs de nucléosides chez l'homme (Young et al., 2013).

Les CNTs forment une famille de 3 protéines : CNT1/CNT2/CNT3 dont l'activité dépend des flux sodiques. Ces NTs sont encore assez peu caractérisés aujourd'hui et leur structure est mal connue. Ces NTs ont été décrits pour être insensibles au NBTI et aux autres inhibiteurs des ENT1/2 (Young et al., 2013).

- **Effet biologique des NTs et rôle des inhibiteurs**

Les nucléosides de type purique et pyrimidique ont une fonction biologique primordiale. En tant que précurseurs des nucléotides (par exemple de l'ATP) et des acides nucléiques, ils sont indirectement impliqués dans la régulation énergétique, la synthèse des protéines et la réplication de l'ADN. Le contrôle des niveaux de nucléosides dans les compartiments intra et extra-cellulaires est donc crucial. Si l'on s'intéresse plus spécifiquement aux fonctions biologiques neuronales, on peut remarquer que les NTs permettent le transport de l'adénosine, qui a une grande influence sur les neurones du SNP et SNC. Notamment le contrôle des concentrations extracellulaires en nucléosides permet de réguler l'activité neuro-modulatrice de ces composés. De plus, sous des conditions physiologiques de stress, telles qu'après une ischémie cérébrale, une lésion ou une inflammation, des niveaux élevés en adénosine déclenche une protection contre la

neurodégénérescence (Cunha, 2001). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques aux NTs permet donc de moduler la réponse à un stress.

Dans le cadre du métabolisme extracellulaire du NAD^+ et du NR, les inhibiteurs des NTs permettent le blocage de l'entrée dans la cellule du NR, et donc du NAD^+ après sa conversion en NR. Ainsi, le traitement de lignées cellulaires avec du NBTI et du dipyridamole inhibent les effets protecteurs du NAD^+, du NMN et du NR (Nikiforov et al., 2011). Dans le SNP, le dipyridamole a été montré pour bloquer les effets du NAD^+ et du NMN (Di Stefano et al., 2014).

II.3.d. Un métabolisme extracellulaire du NAD^+ dans le système nerveux central ?

Il existe donc une voie extracellulaire de métabolisation du NAD^+ en NR chez la levure et dans différents modèles tels que des lignées cellulaires humaines ou des neurones murins du SNP. Pour l'instant, aucune étude n'a caractérisé cette voie dans sa globalité dans le SNC. Est ce que cette voie métabolique existe dans le SNC ? Qu'en est-il de la distribution subcellulaire des différents acteurs du métabolisme extracellulaire décrits précédemment ?

En 2008, l'équipe de H. Zimmermann s'est intéressée à la distribution des ectonucléotidases dans le cerveau des rongeurs. Ils ont montré que CD73 et les E-NPP sont présents dans toutes les régions cérébrales. La précision de la distribution reste assez limitée et la localisation des ectonucléotidases peut être considérée à la fois au niveau des neuropiles et/ou des cellules gliales. Ces enzymes sont donc susceptibles de participer à la communication neurones-neurones ou neurones-glie. Cependant, les données concernant les activités de ces enzymes et leur contribution relative dans le cerveau restent très peu détaillées. Au pH physiologique, CD73 et les E-NTPDases ont été décrites pour avoir l'activité la plus importante, supérieure à celle des E-NPP (Langer et al., 2008). En ce qui concerne la distribution des NTs, une étude en 2013 s'est intéressée à leur expression relative dans les neurones et astrocytes de souris (Li et al., 2013). Celle-ci montre que tous les ENTs ainsi que CNT2/3 sont exprimés à la fois dans les neurones et les astrocytes mais que CNT1 ne semble pas être exprimée dans ces deux types cellulaires. Au regard de ces résultats, les différents métabolites de la voie extracellulaire semblent être présents au sein du SNC.

Il ne faut pas oublier que des transporteurs de nucléotides de types purinergiques P2, tel que $P2X_7$, ont également été identifiés dans le SNC et seraient susceptibles de participer au transport du NAD^+ ou de ses métabolites à travers la membrane plasmique (Okuda et al., 2010). Des connexines présentes à la membrane des astrocytes seraient également

capables de faire pénétrer le NAD^+ dans les cellules (Okuda et al., 2013). Cependant, bien que des connexines aient été décrites au niveau des cellules neuronales (Cheung et al., 2014), aucune donnée n'a été mise en évidence sur leur potentielle activité quant au transport du NAD^+.

Le métabolisme extracellulaire du NAD^+ et de ses précurseurs constitue un moyen de clairance du NAD^+ présent dans le compartiment interstitiel et participe au maintien des niveaux de NAD^+ dans les cellules. Etudier et comprendre ce métabolisme est essentiel pour améliorer nos connaissances sur les effets du NAD^+ et de ses précurseurs et ainsi mettre en place des stratégies thérapeutiques efficaces.

CHAPITRE IV :

L'EXCITOTOXICITE, UN PROCESSUS PATHOGENE COMPLEXE

I. Le glutamate : neurotransmetteur excitateur majoritaire

I.1. Le glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majoritaire dans le SNC. Il est synthétisé localement au sein du SNC et est impliqué dans de nombreuses fonctions telles que le développement, les processus d'apprentissage et de mémoire, la croissance axonale et la plasticité synaptique. Le cerveau humain contient 6-9 µmol/g de glutamate dans différents régions cérébrales (Perry et al., 1971), faisant de cet acide aminé libre le plus abondant dans le SNC. L'action excitatrice du glutamate sur les cellules nerveuses a été démontrée il y a plus de cinquante ans par Curtis *et al.* (Curtis et al., 1960).

I.2. Stockage du glutamate

Le glutamate est stocké dans des vésicules synaptiques dans la terminaison présynaptique *via* des transporteurs vésiculaires au glutamate (vGLUT). L'assimilation du glutamate dans ces vésicules dépend du gradient de protons H^+ transmembranaire généré par l'ATPase vésiculaire.

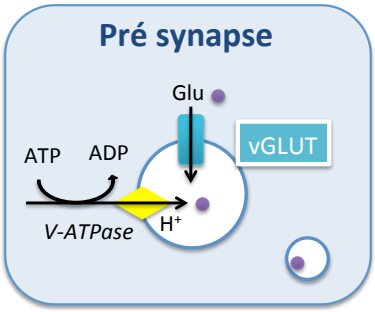


Figure 58 : Schéma du stockage du glutamate dans les vésicules par les transporteurs vGLUT et le gradient de protons généré par l'ATPase vésiculaire.

Trois isoformes du transporteur vGLUT ont été identifiées et caractérisées dans le SNC : vGLUT1-3. vGLUT1 et vGLUT2 sont spécifiquement exprimés dans les extrémités présynaptiques glutamatergiques tandis que vGLUT3 est exprimé dans les somas et dendrites des neurones glutamatergiques ou non glutamatergiques et dans les astrocytes. Bien que plusieurs études aient suggéré une expression complémentaire et différentielle de vGLUT1 et vGLUT2, ces deux transporteurs peuvent occasionnellement être co-exprimés dans les mêmes terminaisons synaptiques. (Benarroch, 2010b)

Gène	Transporteur	Distribution	Localisation
SCL17A7	**VGlut1**	Néocortex (couches I-III) Cortex pyriforme Cortex entorhinal Striatum Thalamus Cervelet	Présynaptique
SLC17A6	**VGlut2**	Néocortex (couche VI) Bulbe olfactif Gyrus denté Noyau accumbens Hypothalamus Tronc cérébral	présynaptique
SLC17A8	**VGlut3** Moins présent que VGlut1 et VGlut2	Néocortex Hippocampe Noyau de raphé Substance noire	Présynaptique & somatodendritique

Table 2 : Distribution et localisation des transporteurs vésiculaires du glutamate (Benarroch, 2010b).

I.3. Libération du glutamate

Sous l'influx d'un potentiel d'action, les vésicules migrent et fusionnent avec la membrane pré-synaptique. Le glutamate est libéré dans la fente synaptique et peut alors agir sur plusieurs types de récepteurs : les récepteurs métabotropiques (mGluR) et les récepteurs ionotropiques (iGluR).

I.4. Les récepteurs glutamatergiques

Il existe une grande variété de récepteurs au glutamate, qui sont classés dans deux grandes familles :

- Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) qui permettent la modulation de l'excitabilité cellulaire et de la transmission synaptique *via* une voie de signalisation secondaire.
- Les récepteurs ionotropiques au glutamate (iGluR) qui sont des canaux ioniques.

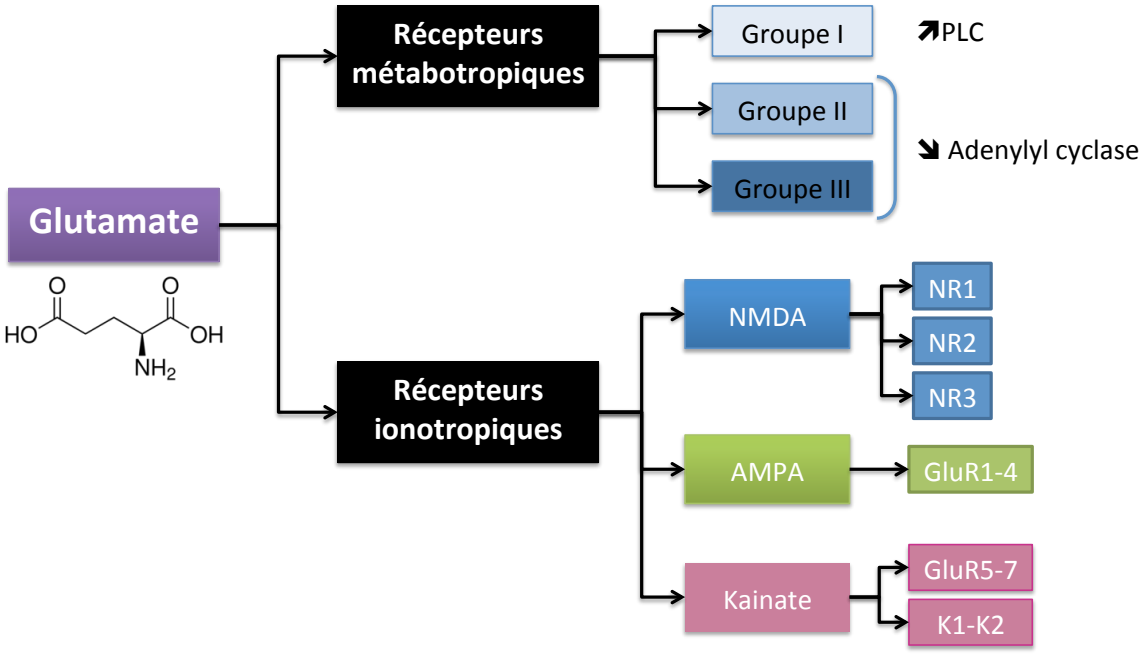


Figure 59 : Classification des récepteurs au glutamate. On distingue deux familles : Les récepteurs ionotropiques iGluR qui sont des canaux ioniques et les récepteurs métabotropiques mGluR couplés à des protéines G.

I.4.a. Les récepteurs métabotropiques au glutamate

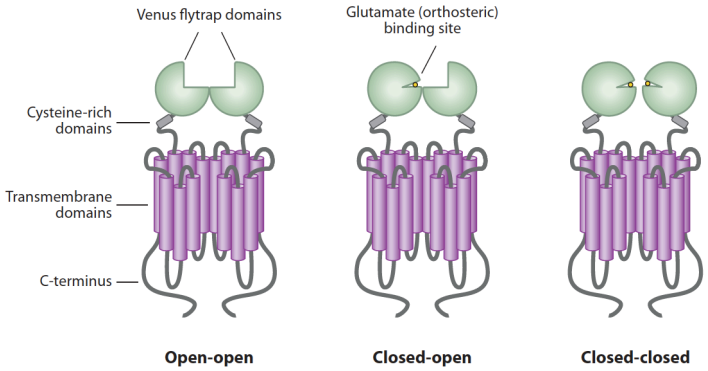


Figure 60 : Structure des mGluR. La liaison de glutamate dans le domaine VFD provoque le changement conformationnel du récepteur et active des voies intracellulaires (Niswender and Conn, 2010).

Les récepteurs métabotropiques sont des récepteurs transmembranaires couplés à des protéines G. Il existe huit récepteurs mGluR, classés en trois groupes en fonction de leurs actions sur la transduction du signal. Les récepteurs du groupe I (mGlu1 et mGlu5) sont couplés à la protéine Gq et activent la phospholipase C alors que les récepteurs du groupe II (mGlu2 et mGlu3) et III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 et mGlu8) sont couplés à la protéine Gi et inhibent l'adénylate cyclase. Les mGluR sont composés de sept domaines transmembranaires, un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire. L'activation des récepteurs couplés aux protéines G par un stimulus extracellulaire induit des changements

conformationnels permettant l'activation de la protéine G associée et l'interaction avec des effecteurs responsables de messagers intracellulaires. Les mGluR possèdent un domaine extracellulaire, riche en cystéine, appelé VFD (pour *Venus flytrap domain*) qui contient le site de liaison du glutamate et qui permet la formation d'homodimères reliés par des ponts disulfures. La liaison d'agoniste des mGluR dans les domaines VFD induit des changements conformationnels et donc des réponses biologiques variées (Niswender and Conn, 2010). Les mGluR sont répartis dans différentes localisations subcellulaires au niveau neuronal et astrocytaire. Les récepteurs du groupe I, majoritairement post-synaptique, augmentent l'excitabilité synaptique en interagissant avec les iGluR ou les canaux ioniques. Les récepteurs du groupe II et III sont principalement pré-synaptiques et inhibent la neurotransmission.

I.4.b. Les récepteurs ionotropiques au glutamate

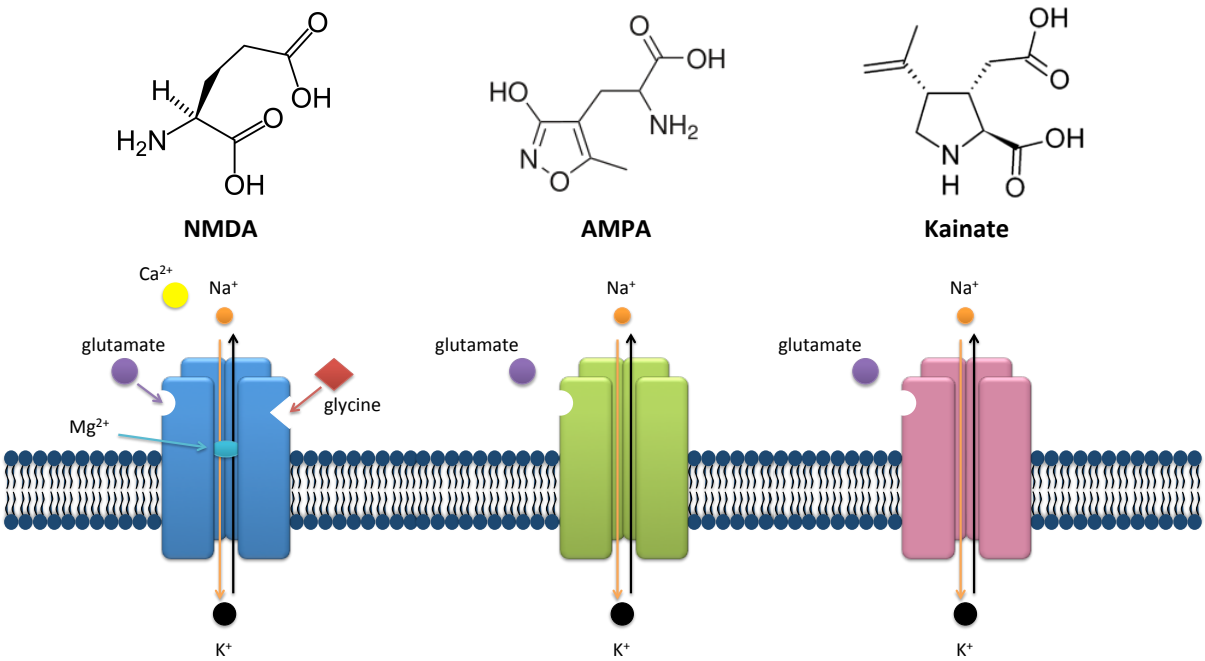


Figure 61 : Schéma des différents récepteurs ionotropiques au glutamate. Les récepteurs AMPA et Kainate participe à l'influx sodique lorsqu'ils sont activés par le glutamate. Les NMDAR participent à l'influx sodique et calcique. L'activation des AMPAR provoque le départ des ions Mg^{2+} bloquant les NMDAR. Les NMDAR possédent des sites de liaisons pour la glycine, un agoniste indispensable à l'activation des récepteurs.

Les iGluR incluent les récepteurs de type α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), kainate et N-methyl-D-aspartic acid (NMDA). Ce sont des récepteurs canaux transmembranaires composés de quatre sous-unités, qui permettent l'entrée de cations, principalement des ions Na^+ pour les récepteurs AMPA et kainate mais des influx calciques sont également régulés par les récepteurs NMDA (NMDAR).

- **Les récepteurs AMPA**

Les récepteurs AMPA forment des tétramères composés de quatre sous unités, nommés GluR1-GluR4 (elles peuvent être également désignées sous le nom de GluA1-GluA4 ou GluR-A-GluR-D). Ces canaux sont perméables au sodium (flux entrant) et potassium (flux sortant) et pour la plupart imperméables au calcium. L'activation des récepteurs AMPA induit une dépolarisation locale de la membrane post-synaptique permettant le départ du Mg^{2+} des récepteurs NMDA. Cette levée d'inhibition des ions magnésium permet alors au glutamate d'activer l'entrée calcique *via* ces récepteurs NMDA. (Wright and Vissel, 2012)

Les récepteurs AMPA sont essentiellement localisés à la membrane post-synaptique. L'expression de ces récepteurs à la surface, *via* endocytose ou diffusion latérale, est cruciale dans la transmission synaptique et également dans les phénomènes de plasticité synaptique (Santos et al., 2009).

- **Les récepteurs Kainate**

Les récepteurs Kainate sont composés de sous-unités issues de deux familles : GluR5-GluR6-GluR7 et K1-K2, formant des homo- ou hétérotétramères. Les sous-unités K1 et K2 sont toujours associées à une sous-unité de type GluR qui permet une expression à la surface membranaire. De plus, les sous-unités GluR possèdent un site d'édition leur conférant une imperméabilité aux ions calciques.

Ils sont principalement localisés à la membrane pré-synaptique des synapses de types glutamatergiques et GABAergiques. Aux synapses glutamatergiques, les récepteurs Kainate régulent la libération du glutamate (Kerchner et al., 2002). Ces récepteurs ont également été décrits à la membrane post-synaptique, où ils jouent alors un rôle excitateur.

- **Les récepteurs NMDA**

L'activation des NMDAR joue un rôle très important dans la plasticité synaptique et dans l'apprentissage. Au contraire des autres iGluR, l'activité des NMDAR est inhibée par des ions magnésium Mg^{2+} qui bloque le canal au potentiel membranaire physiologique. Lors d'une dépolarisation, l'activation des récepteurs AMPA permet le départ des ions Mg^{2+} et l'activation des NMDAR. Ces récepteurs sont perméables aux ions Na^{+}, mais leurs effets biologiques sont essentiellement dus à l'influx des ions Ca^{2+} (Hardingham, 2009).

Structurellement, les NMDAR sont des hétérotétramères, généralement constitués de deux sous-unités NR1 et deux sous-unités NR2 ou NR3. Les sous-unités NR1 sont essentielles pour le fonctionnement du récepteur et elles sont issues de différents épissages alternatifs qui peuvent influencer les propriétés du canal. De plus, ces sous-unités possèdent

deux sites de liaison pour les co-agonistes glycine ou D-sérine. La liaison de la glycine est indispensable au fonctionnement du récepteur NMDA. Les sous-unités NR2, quant à elles, possèdent le site de liaison au glutamate en N-terminal et confèrent les spécificités de propriétés des différents canaux : sensibilité au glutamate, conductance, sensibilité à l'inhibition par le magnésium, cinétique d'activation, temps de désactivation… (Gielen et al., 2009). Il existe plusieurs antagonistes au récepteur NMDA bloquant l'influx calcique lors de la neurotransmission, parmi lesquelles le MK-801 et la mémantine.

L'activation des NMDAR, associés à la synapse avec d'importants complexes protéiques, déclenche des voies de signalisation pro-survie ou pro-mort, que l'on discutera dans la seconde partie de ce chapitre. Il est important de noter que des NMDAR extrasynaptiques ont été également décrits dans de nombreuses études. Il semble que les deux localisations des ces récepteurs leur donnent des fonctions bien particulières qui ne sont pas encore totalement élucidées (Hardingham and Bading, 2010).

I.5. Le recyclage du glutamate

I.5.a. Les transporteurs du glutamate

- **Les transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAATs)**

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de cette introduction, la concentration de glutamate cytoplasmique est beaucoup plus importante que celle du compartiment extracellulaire. Le maintien de cette différence est essentiel pour ne pas se retrouver au dessus du seuil d'excitotoxicité. Celui-ci est effectué par des transporteurs aux acides aminés excitateurs dépendant du Na^+ (EAATs). Nous allons revenir sur leurs caractérisations dans ce paragraphe.

La recapture du glutamate extracellulaire est donc un processus crucial pour le maintien d'une bonne transmission synaptique. Il y a cinq transporteurs transmembranaires au glutamate identifiés chez les humains : EAAT1-5. EAAT1 et EAAT2 sont exprimés au niveau astrocytaire, EAAT3 et EAAT4 au niveau neuronal et EAAT5 au niveau des cellules de la rétine. Il a récemment été montré que les EAATs sont constitués de trois sous-unités, couplées à l'ATPase-Na^+-K^+, formant ainsi un complexe macromoléculaire (Rose et al., 2009). Le transport d'une molécule de glutamate est associé avec le transfert de 3 Na^+ et 1 H^+ vers le compartiment intracellulaire et le départ d'1 K^+ du compartiment intracellulaire vers l'extérieur. De plus, les transporteurs EAAT4 et EAAT5 sont également couplés à un flux

d'ions Cl^- (Benarroch, 2010b).

Sous-type de transporteur	Localisation dans le SNC	Expression cellulaire	Propriétés
EAAT1	Importante dans le cervelet Détecté dans le cortex et la moelle épinière	Astrocytes	Principal sous-type exprimé lors du développement du SNC
EAAT2	Cerveau et moelle épinière	Principalement dans les astrocytes Neurones Oligodendrocytes	Responsable de plus de 90% de la recapture du glutamate total
EAAT3	Cerveau Principalement dans le cortex, l'hippocampe, les ganglions de la base et le cervelet	Terminaison post-synaptique Détecté dans les astrocytes	Expression membranaire régulée par le cholestérol et les kinases intracellulaires
EAAT4	Corps cellulaire et dendrites des cellules de Purkinje, détecté dans l'hippocampe, le néocortex	Terminaison post-synaptique Détecté dans les astrocytes	Forte conductance du Cl^-
EAAT5	Rétine	Cônes Bâtonnets	Forte conductance du Cl^-

Table 3 : Caractéristiques des EAATs : localisation, expression cellulaire et propriétés (Kim et al., 2011b).

Les transporteurs astrocytaires, et en particulier EAAT2, sont responsables de la plus grande partie de la recapture du glutamate et ont donc plusieurs rôles importants dans la cellule :

1) La fin de la transmission synaptique

2) La prévention de l'accumulation toxique de glutamate dans le compartiment extracellulaire

3) L'apport en glutamate dans les astrocytes permettant la synthèse de glutamine, impliquée dans la détoxification *via* l'utilisation de l'ammoniaque et dans le cycle glutamine-glutamate.

4) L'indication des besoins métaboliques des neurones et l'activation de la glycolyse dans les astrocytes.

Les transporteurs neuronaux, EAAT3 et EAAT4, sont fonctionnels sur certaines synapses glutamatergiques où ils contrôlent l'activation des récepteurs métabotropiques post-synaptiques et limitent les effets indirects du glutamate sur les synapses avoisinantes.

Plusieurs facteurs modulent l'activité des EAATs tels que le trafic intracellulaire ou les modifications post-traductionnelles. L'activité intrinsèque et les taux de EAATs à la

membrane sont régulés par leur interaction avec des protéines d'échafaudage et l'activité de protéines kinases ou phosphatases. Des facteurs de croissances, des neuropeptides ou des cytokines tels que TNF-α peuvent également réguler le trafic membranaire et l'activité des EAATs (Benarroch, 2010b).

L'altération de ces transporteurs peut déclencher des réponses neurotoxiques diverses. Nous avons vu dans le premier chapitre leurs implications dans le vieillissement et certaines maladies neurodégénératives.

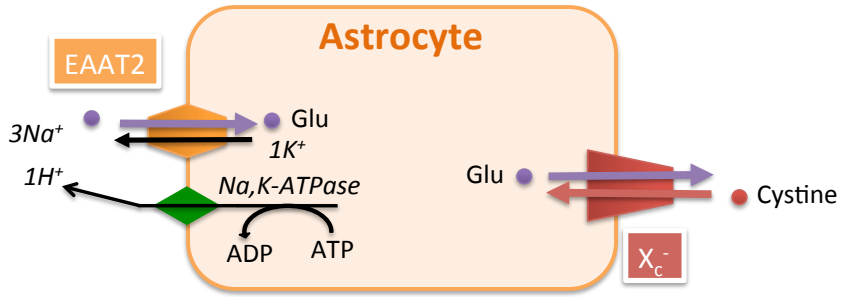


Figure 62 : Schéma du transport du glutamate dans les cellules gliales. Le glutamate est recapturé par les transporteurs EAATs mais peut être libéré dans la fente synaptique par le transporteur x_c^-.

- **Le transporteur x_c^-**

Le transport du glutamate peut également s'effectuer *via* un antiport cystine/glutamate (x_c^-), présent à la membrane des cellules gliales et particulièrement important dans la régulation des niveaux en glutamate dans le compartiment non-synaptique extracellulaire. Ce système x_c^- libère une molécule de glutamate dans la fente synaptique en échange d'une molécule de cystine et il est composé de deux sous-unités. La cystine transportée dans la cellule est ensuite réduite en cystéine, qui permet la production intracellulaire de l'antioxydant GSH (Miladinovic et al., 2015). Comme nous l'avons déjà mentionné, le GSH permet de neutraliser les ROS et de prévenir le stress oxydant dans le SNC.

I.5.b. Le cycle glutamate/glutamine dans les astrocytes

Le rôle de récupération du glutamate extracellulaire par les astrocytes est essentiel : il s'agit d'une des fonctions les plus importantes des astrocytes dans le SNC.

- **La glutamine synthase**

Une fois intégré dans les astrocytes *via* son transport par les EAATs, le glutamate est pris en charge par la glutamine synthétase (GS). Celle-ci utilise de l'ATP et de l'ammoniaque pour convertir le glutamate en glutamine. Environ 90% du glutamate libéré dans la fente synaptique est converti en glutamine par la GS. Cette réaction se réalise dans les astrocytes péri-synaptique où elle permet la désactivation du glutamate et la détoxification de la cellule *via* l'assimilation de l'ammoniaque.

- **Les transporteurs de la glutamine**

La glutamine ainsi formée est ensuite transportée par les astrocytes jusque dans la fente synaptique puis recapturée par les neurones. Les transporteurs de glutamine appartiennent à la grande famille des SLCs (*Solute carriers* = transporteurs solubles) et ont été décrits en tant que transporteurs dépendant du Na^+. Au niveau des astrocytes, la glutamine est véhiculée vers la fente synaptique par des transporteurs du système N, qui permettent le transfert d'un acide aminé et d'un ion sodium Na^+ en échange de protons H^+. Au niveau neuronal, la glutamine est recapturée par des transporteurs du système A (Chaudhry et al., 2002).

- **La glutaminase**

La glutamine introduite dans la terminaison pré-synaptique est finalement convertie en glutamate *via* l'action de la glutaminase, enzyme activée par la PAG (pour *Phosphate Activated Glutaminase*) (Bak et al., 2006). Il s'agit de la dernière étape du cycle Glutamine/Glutamate.

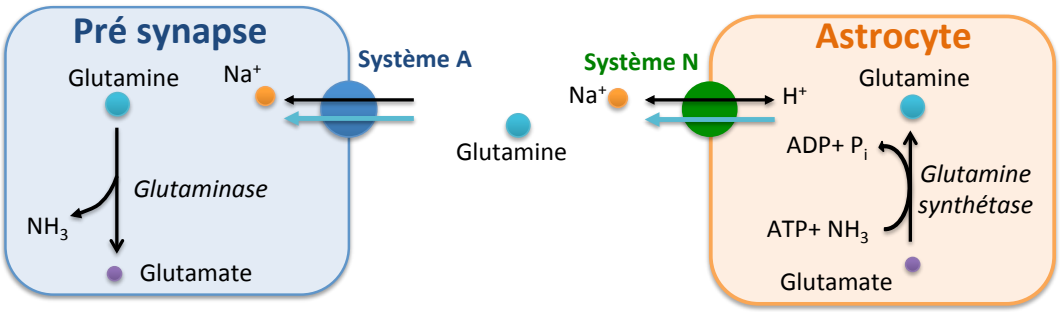


Figure 63 : Le cycle Glutamine / Glutamate.

I.6. Autres molécules excitotoxiques

Le système glutamatergique est donc un processus complexe faisant intervenir de nombreux acteurs moléculaires. Nous avons vu dans le premier chapitre de ce manuscrit que des altérations de ce système peuvent induire une toxicité neuronale appelée excitotoxicité. Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principalement impliqué dans l'excitotoxicité mais il existe d'autres excitotoxines endogènes ou exogènes que je vais rapidement répertorier (Doble, 1999).

- **Excitotoxines endogènes**
  - le glutamate.
  - l'aspartate (Asp) et son dérivé le N-acétylaspartyl-glutamate. L'aspartate est environ dix fois moins présent que le glutamate dans le cerveau mais certaines études ont mis en avant son rôle non négligeable dans la neurotransmission et dans le maintien du système glutamatergique (Lewerenz and Maher, 2015).
  - l'acide cystéique et ses dérivés l'acide L-homocystéique, l'acide L- cystéinesulfonique et l'acide L-cystéinesulfinique.
  - l'acide quinolinique. Il s'agit d'un métabolite de la voie de la kynurénine, impliqué dans la biosynthèse de NAD^+ *de novo*. L'acide quinolinique peut agir en tant qu'agoniste du NMDAR. Cependant son rôle dans le neurotransmission est limité, étant donné sa concentration 5000 à 15000 fois plus faible que celle du glutamate (Lewerenz and Maher, 2015).

- **Excitotoxines exogènes**
  - D'origine naturelle (plantes, champignons, algues) : acromélate, acide domoïque, acide iboténique, acide kaïnique, acide quisqualique, B-methyl-amino-L-alanine, B-oxalyl-amino-L-alanine, willardine.
  - Issues de la synthèse organique :
    - ⇒ N-methyl-D-aspartate (NMDA) qui est un analogue de l'aspartate et un agoniste spécifique des récepteurs NMDA sans affinité pour les transporteurs au glutamate.
    - ⇒ l'AMPA qui est un analogue de l'acide iboténique, acide aminé hétérocyclique.

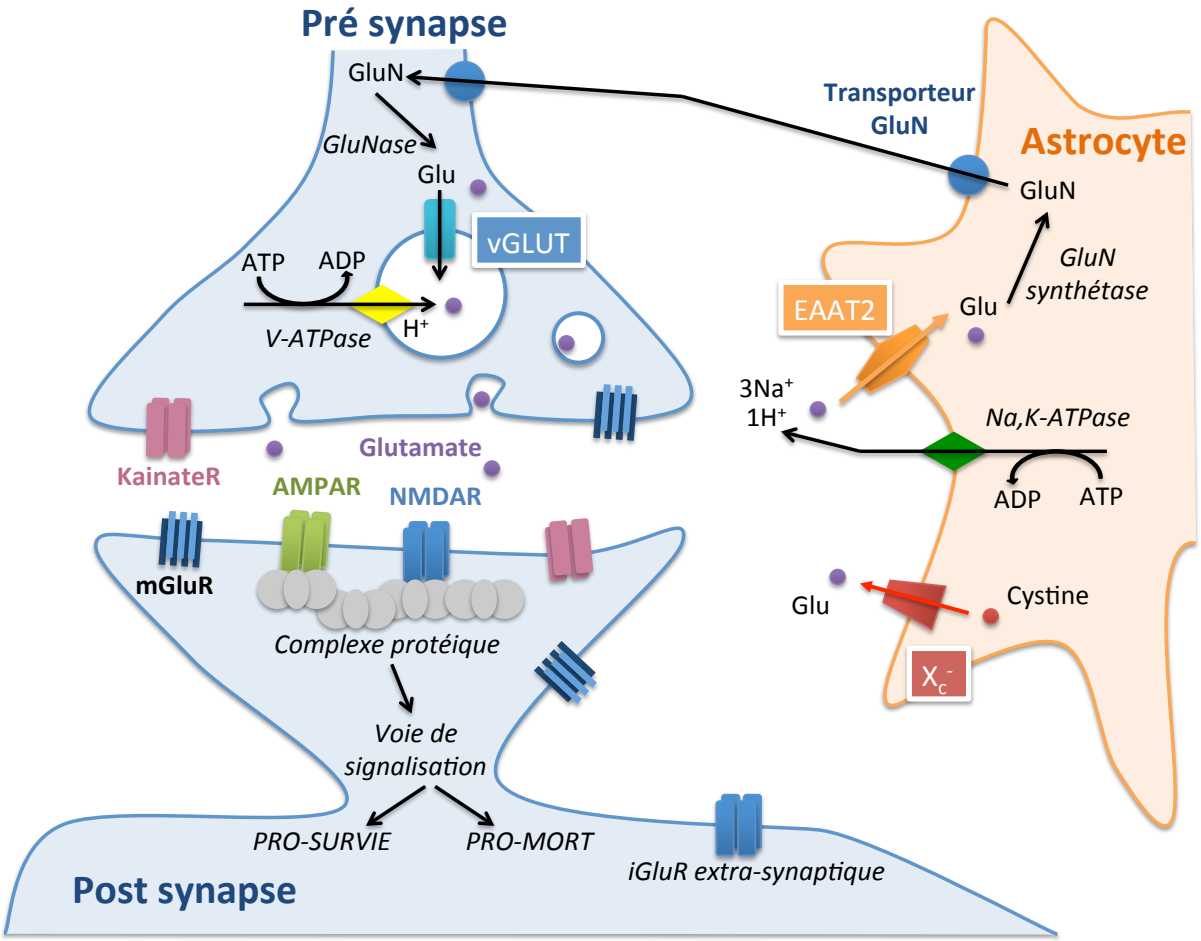


Figure 64 : Schéma récapitulatif de le neurotransmission glutamatergique.

II. Rôle physiologique de la neurotransmission par le glutamate

II.1.Les Récepteurs NMDAR

Nous avons vu que les récepteurs au NMDA (NMDAR) sont les récepteurs ionotropiques au glutamate permettant l'influx calcique lors d'une dépolarisation de la membrane post-synaptique. A la synapse, ces récepteurs sont liés à des complexes protéiques *via* l'extrémité C-terminal des sous-unités NR1 et NR2 (Collins et al., 2006). Ce complexe permet la localisation des récepteurs dans des zones spécifiques, telles que la densité post-synaptique (PSD) et ainsi la connexion avec plusieurs molécules impliquées dans diverses voies de signalisation. L'extrémité C-terminal de la sous-unité NR2 est ainsi associée à un groupe de protéines, appelé MAGUKs (pour *membrane-associated guanylate kinases*), qui inclut PSD-95, SAP-102 (pour *synapse-associated protein*) et PSD-93. Ces protéines contiennent des domaines d'interactions PDZ, permettant l'association avec d'autres protéines. Cette structure complexe très organisée permet le rapprochement d'enzymes

impliquées dans la transduction du signal avec les récepteurs à la surface des synapses. Par exemple, l'altération de l'interaction entre les NMDAR et PSD-95 prévient les effets toxiques liés à une ischémie dans un modèle murin (Aarts et al., 2002). De plus, des molécules dépendantes du Ca^{2+} peuvent être amenées à proximité du site d'entrée du Ca^{2+} au niveau des NMDAR afin d'activer une réponse biologique spécifique.

Les récepteurs NMDAR peuvent contrôler et activer des voies de signalisation diverses et jouer ainsi un rôle essentiel dans la plasticité, le développement et la transmission synaptique. Cependant, une activation excessive de ces récepteurs peut également mener à une mort neuronale et est impliquée dans divers processus neurodégénératifs. Ceci suggère donc que l'activation des NMDAR doit être bien maitrisée : une activation trop importante induit une excitotoxicité mais une activation trop faible bloque des voies de signalisation pro-survie.

II.2. Voie de signalisation pro-survie

L'activation modérée des NMDAR déclenche l'activation de voie de signalisation pro-survie. En effet, l'activation des NMDAR est associée à l'activation de la voie PI3K/Akt, la suppression de gènes pro-mort, l'activation de CREB et l'augmentation d'antioxydants.

II.2.a. Activation de la voie PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt est une voie de signalisation essentielle contribuant aux effets pro-survie des NMDAR (Papadia et al., 2005). L'entrée de Ca^{2+} et l'activation de Ca^{2+}/Calmoduline déclenche la voie PI3K/Akt. Akt favorise la survie cellulaire et la croissance *via* la phosphorylation et donc l'activation ou la non-activation de ses nombreuses cibles :

- Phosphorylation et inactivation de GSK3β, contribuant à la neuroprotection induite par les NMDAR (Soriano, 2006).
- Inactivation de BAD, molécule pro-apoptotique membre de la famille des Bcl-2. Il s'agit d'un antagoniste de Bcl2-Bcl-K_L provoquant la mort cellulaire. Sa phosphorylation met fin à son interaction avec les molécules pro-survie Bcl2 et Bcl-K_L (Downward, 1999).
- Suppression de l'activité de p53, réduisant l'expression de Bax et la mort neuronale (Lau and Bading, 2009; Yamaguchi et al., 2001).

- Akt modifie également l'expression de gènes *via* la phosphorylation des facteurs de transcriptions FoxO (*forkhead box O*) et la sortie de FOXO du compartiment nucléaire (Brunet et al., 1999). Les FoxOs contrôlent l'expression de gènes pro-morts tels que ceux codant pour Fas ligand et Bim (pour *Bcl2-interacting mediator*) (Gilley et al., 2003). Ceux-ci sont régulés négativement lors de l'activation de Akt. La phosphorylation de FoxO inactive également le gène *FOXO1*, induisant une régulation négative des gènes cibles de FoxO (Al-Mubarak et al., 2010).

II.2.b. Implication de la cascade apoptotique indépendamment de la voie PI3K/Akt

L'activation des NMDAR peut également limiter les processus apoptotiques *via* la suppression de la transcription de gènes codant des composés clés de la cascade apoptotique. Ainsi, il a été montré que l'activité synaptique supprime l'activité de *puma* (*pro-apoptotic Bcl2 homology domain 3(BH3)-only member gene*) (Léveillé et al., 2010). L'expression de *puma* est suffisante pour induire la mort neuronale et nécessaire dans la mort apoptotique provoquée par le blocage des NMDAR. En effet, la suppression de *puma* inhibe la cascade apoptotique en amont de la libération du cytochrome c. De plus, d'autres gènes codant pour des composants de la cascade apoptotique sont également supprimés lors de l'activation des récepteurs NMDA tels que APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*), la caspase 9 et la caspase 3 (Léveillé et al., 2010). Ces changements transcriptionnels permettent ainsi une activation très limitée des caspases 9 et 3 qui s'accompagne d'une inhibition du processus apoptotique et d'un maintien de l'activité électrique et de la viabilité des neurones (Léveillé et al., 2010).

II.2.c. Ca^{2+} et activation de CREB

Une autre voie de signalisation très importante dans les effets pro-survie des NMDAR est l'activation du facteur de transcription CREB (pour *cyclic-AMP response element binding protein*) induite par l'augmentation des niveaux de Ca^{2+} dans le noyau et l'activation de la protéine CaMKIV (*Ca^{2+}/Calmodulin-dependent protein kinase IV*). En effet, l'entrée massive de Ca^{2+} lors de l'activation des NMDAR induit l'augmentation des niveaux intranucléaires de Ca^{2+} qui contrôle l'expression d'un nombre important de gènes (Hardingham et al., 2001). CREB est un facteur de transcription jouant un rôle essentiel dans la survie neuronale, mais également dans d'autres processus tels que la plasticité synaptique, l'addiction, la

neurogenèse, la mémoire et l'apprentissage (Carlezon et al., 2005; Mantamadiotis et al., 2002; Mayr and Montminy, 2001). Il a été montré que l'activation de CREB dans des neurones hippocampiques est nécessaire à la neuroprotection face à des phénomènes apoptotiques et excitotoxiques (Papadia et al., 2005).

Parmi les gènes régulés par les niveaux intranucléaires en Ca^{2+}, un ensemble de dix gènes, rassemblés sous le terme AID (pour *activity-regulated inhibitors of death*), a été identifié pour participer à la neuroprotection à la fois dans des études basées sur des modèles animaux mais également dans des études *in vitro* (Zhang et al., 2007). Certains de ces gènes sont des cibles potentielles de CREB et participeraient à la neuroprotection *via* un mécanisme commun lié à l'augmentation de la résistance des mitochondries face au stress oxydatif et à d'autres processus toxiques, comme cela a été décrit pour *btg2* (Lau and Bading, 2009).

Une autre cible de l'activation de le voie Ca^{2+}/CREB est la modulation du gène codant le facteur trophique BDNF (pour *brain-derived neurotrophic factor*). Celui-ci a été montré pour être induit lors de l'activation des NMDAR (Hardingham et al., 2002). BDNF a des effets protecteurs connus et peut prévenir de la mort neuronale induite par l'inhibition des récepteurs NMDA (Hansen et al., 2004).

II.2.d. Augmentation des antioxydants

Enfin, la protection contre le stress oxydatif est également un mécanisme mis en place lors de l'activation des récepteurs NMDA (Papadia et al., 2008). En effet, l'activité synaptique des NMDAR contrôle la vulnérabilité des neurones à la toxicité induite par le stress oxydant. Elle déclenche des modifications dans le système thioredoxine-peroxiredoxine qui contribuent à des effets protecteurs. En particulier, l'activité synaptique augmente l'activité de la thioredoxine et induit la réduction des peroxiredoxines oxydées, deux enzymes antioxydantes importantes. Ces effets sont associés à des modifications de l'expression de certains gènes, tels que *TXNIP*, cible de FoxO, *Srxn1* (sulfiredoxin) et *Sesn2* (Sesrin2) (Papadia et al., 2008). Plus récemment, il a été montré que le glutathion (GSH dans sa forme réduite) est également impliqué lors de l'activation des récepteurs NMDA. Ainsi, l'inhibition de récepteurs NMDA par le MK-801 dans un modèle murin induit une réduction des niveaux en GSH dans le cerveau (Baxter et al., 2015).

Ces résultats suggèrent donc que les effets pro-survie de l'activation des NMDAR sont à relier avec la régulation des antioxydants.

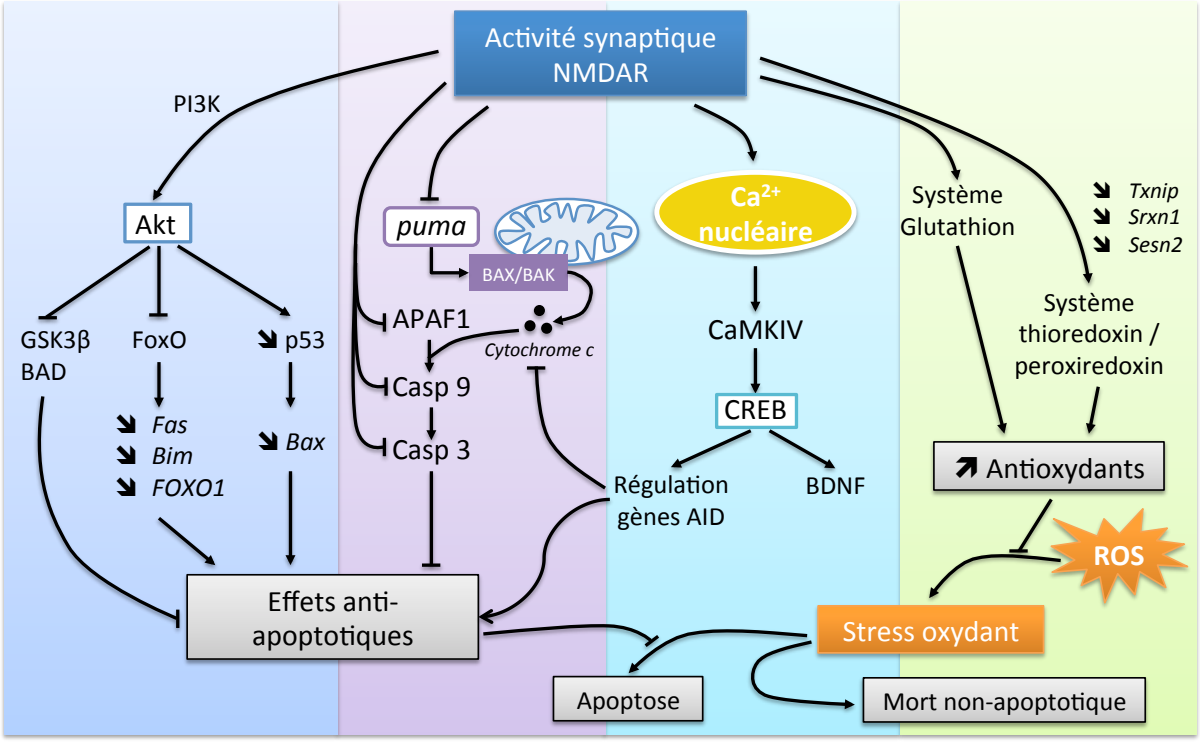


Figure 65 : Voie de signalisation pro-survie induite par l'activité synaptique des récepteurs NMDA (inspiré de (Hardingham, 2009; Hardingham and Bading, 2010).

III. Rôle toxique de la neurotransmission par le glutamate

III.1. Les récepteurs NMDA dans l'excitotoxicité

L'activation des NMDAR par le glutamate déclenche donc des voies de signalisation protectrices, essentielles pour la survie des cellules. Cependant, lorsque les récepteurs sont activés de manière excessive, en l'occurrence lorsque la concentration en glutamate dans le compartiment extracellulaire est élevée et perdure dans le temps, des voies de signalisation toxiques se déclenchent. Un déséquilibre dans le maintien des concentrations extracellulaires en glutamate induit donc un processus toxique appelé excitotoxicité. Il existe plusieurs voies d'induction de l'excitotoxicité, que nous avons mentionné dans le premier chapitre, et que je vais brièvement rappeler. L'excitotoxicité peut être induite par :

- La libération excessive de glutamate observée après une lésion aigüe ou qui peut être mimée par l'apport d'excitotoxines exogènes.

- L'accumulation du glutamate dans la fente synaptique engendrée par une altération de la recapture du glutamate par les transporteurs astrogliaux.

- L'altération de la transmission synaptique par un mécanisme intracellulaire indirect, impliquant des dysfonctions du métabolisme énergétique et des mitochondries.

Les récepteurs au NMDA sont particulièrement importants dans le processus d'excitotoxicité car ils sont très perméables au Ca^{2+} et ils ont une désensibilisation incomplète. L'activation de ces récepteurs est ainsi la cause majeure de la mort neuronale lors de traumatismes crâniens provoqués par une ischémie, une hypoxie ou un choc (Arundine and Tymianski, 2004). De plus, comme nous l'avons discuté dans chapitre I, les maladies neurodégénératives sont également caractérisées par une excitotoxicité glutamatergique liée à l'activation des NMDAR. L'influx calcique important associé à l'activation de ces récepteurs déclenche différents mécanismes intracellulaires menant à la mort neuronale. Je vais donc dans la suite de ce paragraphe me concentrer sur ces mécanismes puis discuter du type de mort engendré par les processus excitotoxiques.

III.2. Mécanisme moléculaire associé à l'excitotoxicité

III.2.a. Dysfonctions mitochondriales et stress oxydant

Lors du processus d'excitotoxicité glutamatergique, l'assimilation de calcium par la mitochondrie engendre des dysfonctions importantes (Nicholls et al., 2007; Stout et al., 1998). Ainsi, la membrane mitochondriale se dépolarise, induisant une inhibition de la production d'ATP et même une chute des taux d'ATP *via* la modification de l'ATPase. Cette diminution de l'ATP empêche à son tour une régulation correcte du calcium intracellulaire. De plus, il est admis que l'assimilation excessive de Ca^{2+} entraîne la production de ROS qui déclenche des dysfonctionnements mitochondriaux et des dérégulations calciques retardées (DCD pour *delayed Ca^{2+} deregulation*). Cependant, d'autres études ont montrées que l'augmentation de ROS, induit par le processus d'excitotoxicité, se manifeste après les DCD et que la source de la production de superoxyde n'est pas seulement mitochondriale (Vesce et al., 2004). Ainsi les ROS pourraient être générées par les NOX, source non-mitochondriale dont nous avons discuté dans le premier chapitre. En effet, il a été montré que l'activation des NOX est la source principale de production de superoxyde après l'activation des NMDAR et, qui plus est, que l'inhibition de ce processus est neuroprotecteur (Brennan et al., 2009).

L'activation de nNOS (pour *neuronal Nitric Oxid Synthase*), directement associée à l'influx calcique et à l'activation des récepteurs NMDA, déclenche également plusieurs événements en aval tels que des dysfonctions mitochondriales, la signalisation associée à la

MAPK p38 et l'activation du canal TRPM (pour *transient receptor potential melastatin*) (Forder and Tymianski, 2009). nNOS est relié à l'extrémité N-Terminal du domaine PDZ de PSD-95, lui même relié à la sous-unité NR2 du NMDAR *via* son extrémité C-terminal, plaçant ainsi nNOS à proximité des NMDAR. L'activation de nNOS induit la production d'oxyde nitrique (NO), intrinsèquement toxique et qui peut se combiner avec d'autres ROS, tels que le radical anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ pour former des peroxynitrites $ONOO^-$. Ces deux molécules, NO et $ONOO^-$, peuvent dégrader des éléments macromoléculaires, inhiber la chaîne respiratoire mitochondriale et provoquer la dépolarisation mitochondriale (Arundine and Tymianski, 2004). Ainsi, la dégradation de l'ADN provoquée par $ONOO^-$ induit une activation excessive des PARPs qui à son tour entraîne une chute des niveaux de NAD^+ dans la cellule et qui déclenche également la libération de facteurs apoptotiques tel que AIF (*apoptosis activating factor*) (Andrabi et al., 2008; Kauppinen and Swanson, 2007). Une autre cible importante de la production de NO associée à l'activation des NMDAR est le canal TRPM7. La formation de $ONOO^-$ active TRPM7 qui permet alors le passage d'ions Ca^{2+}, formant ainsi une boucle de rétroaction positive (Aarts et al., 2003).

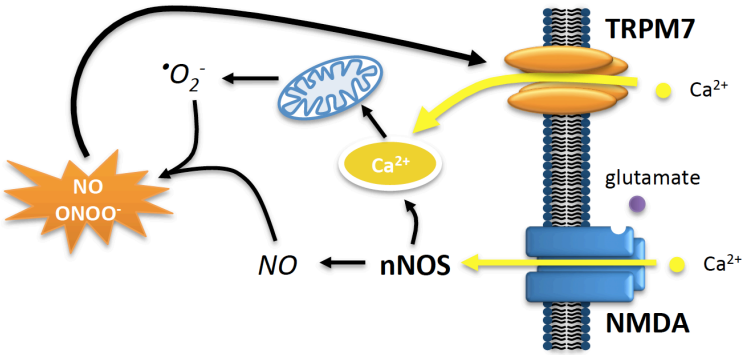


Figure 66 : Boucle de rétroaction positive amplifiant la production de radicaux libres à partir de l'activation excessive des récepteurs NMDA (d'après (Forder and Tymianski, 2009)).

III.2.b. Dérégulation calcique et activation des calpaïnes

Un autre processus associé à l'influx important de Ca^{2+} dans la cellule lors de l'activation des NMDAR est l'activation des calpaïnes. Ce sont des cystéines protéases dépendantes du calcium ayant pour cibles différents substrats qu'elles peuvent dégrader. Dans les neurones, l'efflux de calcium est réalisé par la pompe PMCA (*plasma membrane* Ca^{2+}-*ATPase*) et l'échangeur NCXs (Na^+-Ca^{2+} *exchangers*). L'entrée excessive de Ca^{2+} lors d'une excitotoxicité glutamatergique peut endommager ces deux systèmes (Bano et al., 2005; Pottorf et al., 2008). Ainsi, l'activation des calpaïnes entraine le clivage de l'isoforme majoritaire NC3X localisée à la membrane plasmique, empêchant l'efflux calcique dans des

neurones en grains du cervelet (CGN) (Bano et al., 2005). La pompe PMCA utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter le Ca^{2+} à l'extérieur de la cellule. Lors d'un stress excitotoxique, la pompe PMCA est inactivée *via* des mécanismes associés aux calpaïnes (Pottorf et al., 2008). Les calpaïnes sont également capables de raccourcir l'extrémité C-terminal du récepteur métabotropique mGluR1α induisant ainsi des altérations de la voie de signalisation PI3K/Akt, dont nous avons discuté précédemment, et la relocalisation de ces récepteurs des dendrites vers l'axone. Ce récepteur, initialement protecteur lors du processus d'excitotoxicité, devient toxique pour la cellule après cette modification par les calpaïnes (Xu et al., 2007a). Enfin une autre cible des calpaïnes lors de l'activation des NMDAR est la protéine STEP (*striatal-enriched protein tyrosine phosphatase*). Le clivage de cette protéine par les calpaïnes induit l'activation de la kinase p38 associée à d'autres mécanismes que l'on va aborder dans le paragraphe suivant. Il a été montré que l'inhibition du clivage de STEP est neuroprotecteur et supprime l'activation de p38 (Xu et al., 2010).

III.2.c. Activation de protéines kinases de stress : SAPKs

L'activation des NMDAR déclenche également d'autres voies de signalisation associées à l'activation de protéines kinases, regroupées sous le terme SAPKs (pour *stress-activated protein kinases*). Parmi ces protéines, la kinase p38 ainsi que la famille des JNKs sont impliquées dans la mort neuronale induite par excitotoxicité glutamatergique. En effet, il a été montré dans des cultures neuronales murines que l'inhibition de p38 protège de la mort neuronale induite par excitotoxicité (Legos et al., 2002; Soriano et al., 2009). De même, dans des modèles d'ischémie *in vivo*, l'inhibition de JNK diminue le volume de la lésion (Borsello et al., 2003a). Outre la protéine STEP évoquée précédemment, il semblerait que RhoA, GTPase appartenant à la famille des protéines Rho, soit également impliquée dans l'activation de p38 lors d'un stress excitotoxique (Semenova et al., 2007).

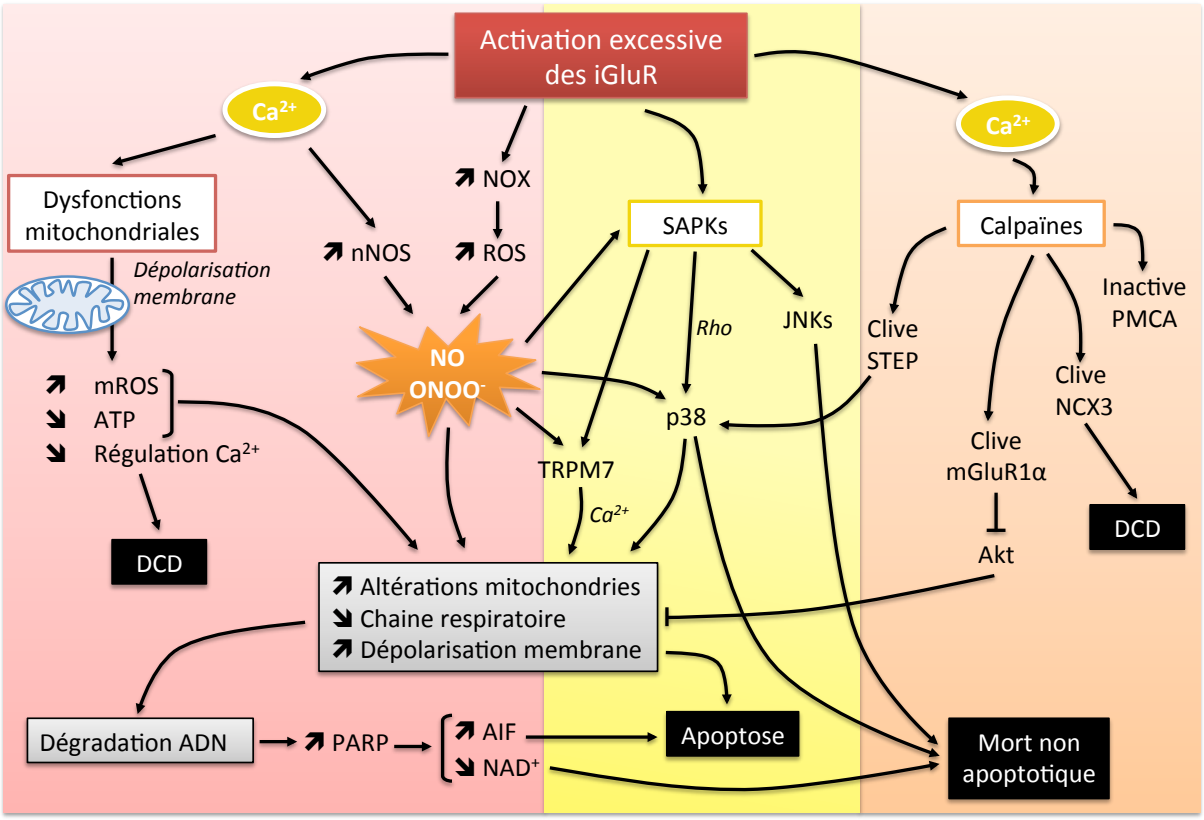


Figure 67 : Voie de signalisation pro-mort induite par l'activité synaptique des récepteurs NMDA lors d'un phénomène d'excitotoxicité (inspiré de (Hardingham, 2009)).

On constate donc que les mécanismes impliqués dans le processus d'excitotoxicité sont variés et complexes. Il est donc difficile de savoir laquelle de ces voies est la plus importante. Ceci peut dépendre de plusieurs facteurs, tels que le type cellulaire mais également l'intensité du stress excitotoxique. En effet, il a été suggéré qu'un stress très important, induisant une augmentation aigüe des niveaux de Ca^{2+}, provoquerait des dysfonctions mitochondriales et énergétiques rapides, menant à une dérégulation retardée de calcium. Par contre, un stress plus modéré, induisant une dépolarisation incomplète de la membrane mitochondriale pourrait mener à la libération de facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c ou l'AIF, et activer la cascade apoptotique. L'activation des SAPKs pourrait également être associée à un stress plus modéré et à un mécanisme de mort plus lent (Hardingham, 2009).

Ainsi, en fonction de l'intensité du stress et de la nature des acteurs moléculaires impliqués, les processus de mort peuvent également être sujets à discussion. Nous allons détailler dans le prochain paragraphe les différents types de morts ayant lieu lors d'un phénomène d'excitotoxicité.

III.3. Processus de mort neuronale complexe

Il existe plusieurs voies de mort neuronale qui impliquent chacune des molécules bien spécifiques. Toutes ces voies ont été associées à des phénomènes d'excitotoxicité. Dans ce paragraphe, je vais donc succinctement passer en revue les différents types de voies afin de discuter de leurs implications relatives dans le stress excitotoxique.

III.3.a. L'apoptose et l'implication des caspases

L'apoptose est la forme de mort cellulaire programmée la mieux caractérisée, qui a lieu lors du développement embryonnaire et post-natal. L'apoptose peut également survenir lors de conditions pathologiques et est impliquée dans différentes maladies neurodégénératives. D'un point de vue morphologique, l'apoptose se caractérise par des modifications du noyau : il est observé une compaction de la chromatine et une condensation nucléaire menant à la pycnose et la fragmentation de la cellule. De plus, ces changements s'accompagnent d'une rétraction du cytoplasme et d'une distorsion de la membrane en plis, qui finissent par casser et former des corps apoptotiques.

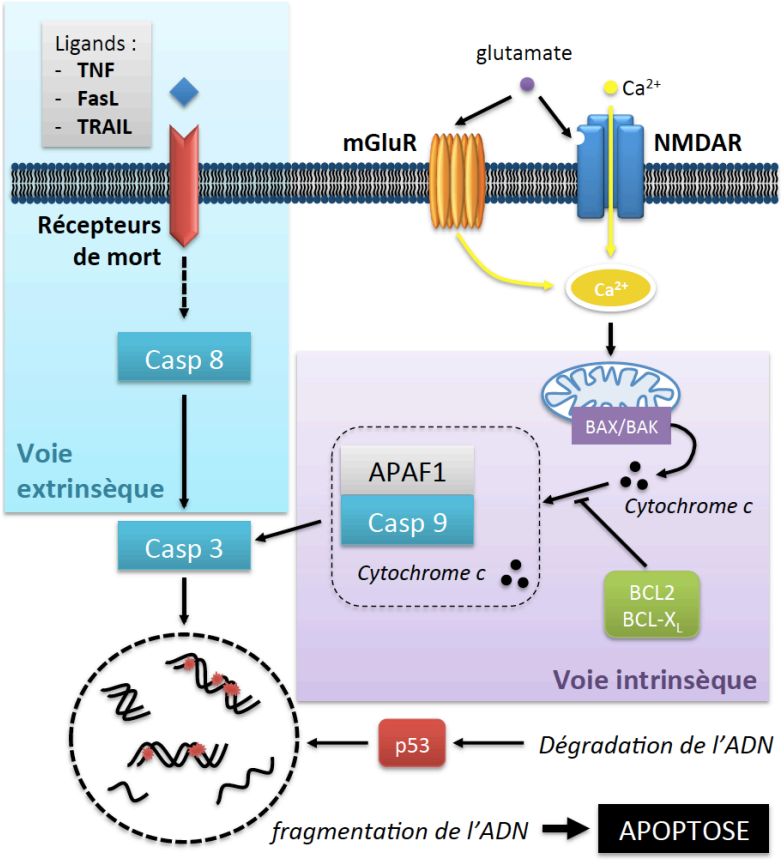


Figure 68 : Mécanismes moléculaires de l'apoptose neuronale.

Le processus apoptotique peut être activé par deux voies principales : la voie intrinsèque qui dépend de l'intégrité de la mitochondrie et la voie extrinsèque qui est activée pas des signaux extracellulaires résultant de l'activation de récepteurs de mort à la membrane plasmique. Les caspases, protéases à cystéine, sont impliquées dans ces deux voies. On distingue les caspases initiatrices (1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 et 13), activées selon le signal de départ et les caspases exécutrices (3, 6, 7 et 14), qui interviennent pour activer les protéases et endonucléases afin de détruire la cellule. La voie intrinsèque fait intervenir la pro-caspase 9 qui se lie à la protéine adaptatrice APAF-1 dont l'activation est dépendante du relargage de cytochrome c. Cela forme un complexe appelé apoptosome qui permet l'activation de la pro-caspase 9 en caspase 9 par clivage. La caspase 9 peut alors activer la pro-caspase 3. La voie extrinsèque passe par l'activation de récepteurs de mort par des ligands spécifiques, tels que TNF (*Tumor Necrosis Factor*), FasL (Fas Ligand) et TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) et met en jeu la pro-caspase 8.

Des études sur des cerveaux humains ayant subi une ischémie montrent la présence du processus apoptotique, *via* l'activation des caspases 3 et 9 et la libération du cytochrome c, essentiellement dans la zone autour de la lésion (Duan et al., 2010; Mitsios et al., 2007; Rami et al., 2003; Sairanen et al., 2009). De plus, ces marqueurs de l'apoptose sont également observés dans des modèles animaux (Benchoua et al., 2001; Kang et al., 2000). L'inhibition pharmacologique des caspases a ainsi été montrée pour protéger le cerveau contre les ischémies et réduire les altérations comportementales chez les rongeurs (Braun et al., 2007; Fink et al., 1998; Hara et al., 1997; Rabuffetti et al., 2000). Il est important de noter que lors d'ischémies cérébrales aigües, l'apoptose a lieu essentiellement dans la zone de pénombre, c'est à dire au bord de la lésion où les niveaux en oxygène et en énergie sont suffisants pour permettre la mise en place du processus apoptotique (Benchoua et al., 2001; Broughton et al., 2009; Ferrer et al., 2003). La sévérité et le type de lésion ischémique (ischémie globale, aigüe, permanente ou transitoire) vont fortement influencer l'activation des différentes caspases et l'efficacité neuroprotectrice de leur inhibition (Li et al., 2000; Manabat et al., 2003). La voie extrinsèque est également activée durant le processus d'excitotoxicité, comme le suggère la présence des récepteurs FasL et TRAIL ainsi que l'activation de la caspase 8 (Benchoua et al., 2001; Martin-Villalba et al., 1999). De plus, il a été montré que la suppression de la caspase 8 neuronale réduit la mort induite sur des neurones hippocampiques après injection de kainate (Krajewska et al., 2011) et que l'inhibition de la caspase 8 est neuroprotectrice dans plusieurs modèles d'excitotoxicité (Feng et al., 2003; Inoue et al., 2006).

L'implication de l'apoptose a été largement étudiée dans les modèles d'excitotoxicité. Cependant, la pluralité des processus excitotoxiques pouvant avoir lieu et la multiplicité des voies apoptotiques intervenant rendent difficile la mise en place de solutions thérapeutiques efficaces. De plus, d'autres types de mort ont été caractérisés lors de processus excitotoxiques.

III.3.b. L'autophagie et l'implication des cathepsines

L'autophagie est un processus catabolique, complémentaire du protéasome, induisant la dégradation de protéines et d'organelles. Morphologiquement, elle est caractérisée par la présence d'autophagosomes : vacuoles cytosoliques à membrane double ou multiple, contenant du cytosol et/ou des organelles comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Les autophagosomes fusionnent avec le compartiment lysosomal pour former les autolysosomes dans lesquels les constituants sont dégradés notamment par les cathepsines B et D.

L'autophagie a été montrée pour survenir dans différents modèles d'excitotoxicité *in vitro* (Borsello et al., 2003b). *In vivo*, l'inhibition de l'autophagie par la 3-Methyladenine (3-MA) ou l'inhibition de la cathepsine B réduit significativement la taille de la lésion induite par l'injection de Kainate intra-striatal (Wang et al., 2006, 2008b). De même, dans des modèles postnataux d'ischémie sévère, le traitement avec la 3-MA est fortement protecteur alors que l'inhibition des caspases par le Q-VD-Oph ou le Z-VAD-fmk n'assure aucune protection (Puyal and Clarke, 2009).

L'autophagie est donc un processus augmenté dans la plupart des modèles d'excitotoxicité à la fois *in vivo* et *in vitro* (Puyal et al., 2012). L'autophagie déclenche généralement un processus apoptotique mais certains modèles de mort cellulaire ne dépendent que du processus autophagique.

III.3.c. La nécrose et l'implication des calpaïnes

La nécrose est un mécanisme de mort survenant fréquemment dans les lésions aigües ischémiques ou traumatiques. Morphologiquement, elle se caractérise par un gonflement de la mitochondrie et du noyau, une dissolution des organelles et une condensation perinucléaire de la chromatine. Ceci est suivi d'une rupture des membranes nucléaires et cytoplasmiques et d'une dégradation de l'ADN. Elle s'accompagne souvent de processus inflammatoires causés

par la libération du contenu cytosolique. Les acteurs principaux de la nécrose neuronale sont les calpaïnes, dont nous avons vu le rôle essentiel dans la toxicité induite par l'activation des NMDAR.

L'activation des calpaïnes a ainsi été décrite dans différents modèles d'ischémies, s'accompagnant par la suite de modifications morphologiques des cellules spécifiques de la nécrose (Han, 2002; Zhu et al., 2005). L'inhibition des calpaïnes a ainsi été démontrée pour être neuroprotectrice dans plusieurs études (Kambe et al., 2005). De plus, l'invalidation des gènes codant les calpaïnes 1 et 2 protège également d'un stress excitotoxique glutamatergique dans un modèle *in vitro* (Amini, 2008).

III.3.d. Nécroptose et parthanatos

Ces différentes études montrent donc l'implication des trois voies de mort dans l'excitotoxicité glutamatergique et il a été montré des interconnexions entre ces voies. Ainsi, le terme « nécroptose » est apparu il y a quelques années pour décrire un mécanisme de mort morphologiquement proche de la nécrose mais initié par l'activation de récepteurs de mort (Galluzzi et al., 2011). La nécroptose est caspase-indépendante et survient après l'activation des récepteurs RIP1 (pour *Receptor-Interacting Protein 1*). Les cellules peuvent être protégées de la nécroptose par la nécrostatine-1, inhibiteur spécifique de RIP1 (Kroemer et al., 2009). Cet inhibiteur a ainsi été montré pour être neuroprotecteur dans des modèles d'excitotoxicité (Degterev et al., 2008; Northington et al., 2011).

Par ailleurs, comme nous l'avons déjà mentionné, l'activation des PARP est également un événement intervenant dans la mort cellulaire associé à l'excitotoxicité. Une activation excessive des PARP induit une forte diminution des taux de NAD^+ et donc de l'ATP, menant à une mort cellulaire spécifique, appelé dans certaines études « parthanatos » (Wang et al., 2009). Ce processus de mort se rapproche d'une forme de nécrose programmée mais également d'apoptose caspase-indépendante *via* la libération d'AIF (Wang et al., 2012b). L'inhibition des PARP a été montrée pour être fortement neuroprotectrice dans des modèles d'excitotoxicité (Kaundal et al., 2006).

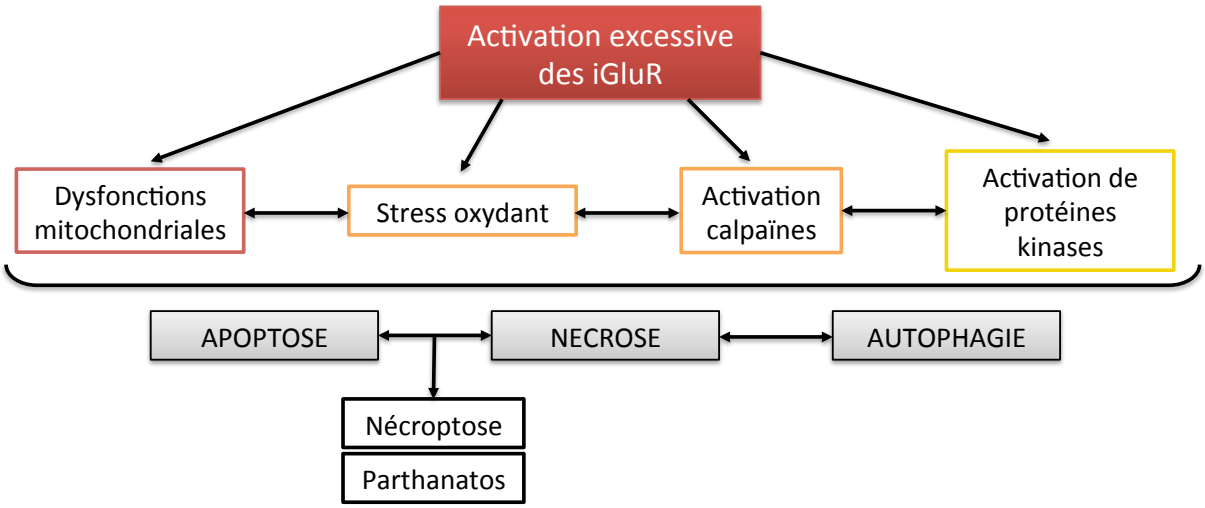


Figure 69 : Schéma illustrant les différents mécanismes moléculaires et les voies de mort impliquées dans l'excitotoxicité.

L'excitotoxicité est donc un processus pathogène complexe, fondé sur un déséquilibre du système glutamatergique. Comme nous l'avons mentionné dans le premier chapitre, ce processus est commun aux lésions cérébrales aigües tels que les AVC et aux maladies neurodégénératives. Il représente donc un modèle d'étude intéressant pour la caractérisation des mécanismes de neuroprotection dans le SNC, et en particulier de protection de l'axone.

OBJECTIF DU PROJET DE THESE

Comme mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, la dégénérescence axonale est un événement majeur du processus de neurodégénérescence observé dans la majorité des pathologies du système nerveux. Bien que les mécanismes impliqués dans l'intégrité axonale soient nombreux, le NAD^+ et les enzymes participant à sa biosynthèse semblent avoir un rôle primordial dans le maintien de l'axone.

L'objectif de ce projet de thèse est l'étude et la caractérisation des effets protecteurs du NAD^+ et du NR dans la dégénérescence axonale induite lors de processus neurodégénératifs.

Dans ce cadre, la première étape de ma thèse a été de mettre au point un modèle d'étude de neurodégénérescence communément impliqué dans plusieurs maladies neurodégénératives. Pour cela, nous avons choisi l'induction d'un stress excitotoxique par le NMDA sur des neurones corticaux mis en culture dans des dispositifs microfluidiques. Ce système permet l'observation et le traitement des compartiments subcellulaires, somato-dendritritique d'un coté et axonal de l'autre, de manière indépendante. Ce stress neurotoxique nous offre un modèle d'étude simple de la dégénérescence axonale sur une population neuronale unique, permettant une discrimination nette des effets des différentes molécules pharmacologiques testées.

La seconde étape a été de comparer et de caractériser les effets du NAD^+ et des précurseurs de sa voie de biosynthèse dans notre modèle, ce qui a permis de mettre en évidence le rôle protecteur important du NR dans la prévention de la dégénérescence axonale et de confirmer le lien étroit existant entre métabolisme du NAD^+ et intégrité axonale. Nous avons également initié une collaboration afin de tester et de comparer les effets du NAD^+ et du NR dans un modèle d'excitotoxicité *in vivo*, ce qui a permis de conforter les observations faites *in vitro*.

La troisième partie de mon projet s'est focalisée sur l'importance du métabolisme du NAD^+ et notamment sa conversion NR dans l'axoprotection. La mise au point d'un second modèle de neurodégénérescence induit par une diminution aigüe des taux intracellulaires en NAD^+ nous a ainsi permis de mettre en évidence que le métabolisme du NAD^+ est dépendant du stress neurotoxique.

L'ensemble des résultats obtenus pendant ma thèse fait l'objet d'un article en cours de soumission.

MATERIELS & METHODES

I. Les puces microfluidiques

I.1. Principe du dispositif microfluidique

- **Production du moule en silicium**

Les premières étapes de fabrication des dispositifs microfluidiques sont réalisées par photolithographie. Brièvement, un substrat composé de verre ou de silicium est recouvert d'une résine photosensible. **L**a résine est ensuite exposée à un rayonnement UV à travers un masque, qui délimite ainsi le motif que l'on souhaite reproduire sur la résine : il s'agit de l'étape d'insolation. L'étape suivante, dite de révélation, consiste à transférer le motif sur le silicium par réactions chimiques ou bombardements ioniques puis à dissoudre le reste de résine. Dans le cadre des dispositifs microfluidiques, ces deux étapes doivent être effectuées à deux reprises: une fois pour créer les microcanaux et une seconde fois pour produire les chambres.

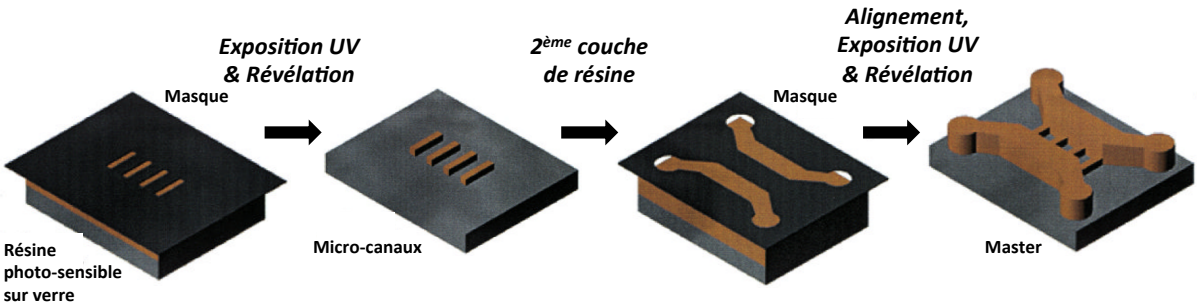


Figure 70 : Les différentes étapes de fabrication du moule en silicium par photolitographie.

- **Préparation des puces microfluidiques**

Les puces microfluidiques sont fabriquées à partir d'un mélange de Poly-Diméthylsiloxane (PDMS, Sylgard 184) et de 10% de réticulant (Sylgard 184) dégazé sous vide puis versé sur une réplique en résine SU8. Les puces sont chauffées à 70°C pendant 3h30 pour permettre la réticulation puis sont nettoyées avec de l'isopropanol avant d'être traitées pendant 3 min dans un générateur de plasma à oxygène. Ce traitement est également effectué sur des lamelles en verre. Le plasma à oxygène provoque une modification transitoire de la surface du PDMS (oxydation des groupements silanes par destruction des groupements méthyls et greffage des groupements silanol) et du verre. Le contact entre la lamelle de verre et la puce permet la formation de liaisons covalentes entre les deux matériaux. Le plasma rend transitoirement la surface du PDMS hydrophile. L'hydrophilie des surfaces amenées à être en

contact avec le milieu de culture est maintenue par addition d'eau dans les puits. Les puces sont placées dans des boites de Pétri puis stérilisées sous rayonnement UV pendant 20 min. L'eau des puits est remplacée par de la Poly-D-Lysine (PDL) (10 µg/mL, Sigma) pendant une nuit à 37°C pour permettre l'adhésion des cellules.

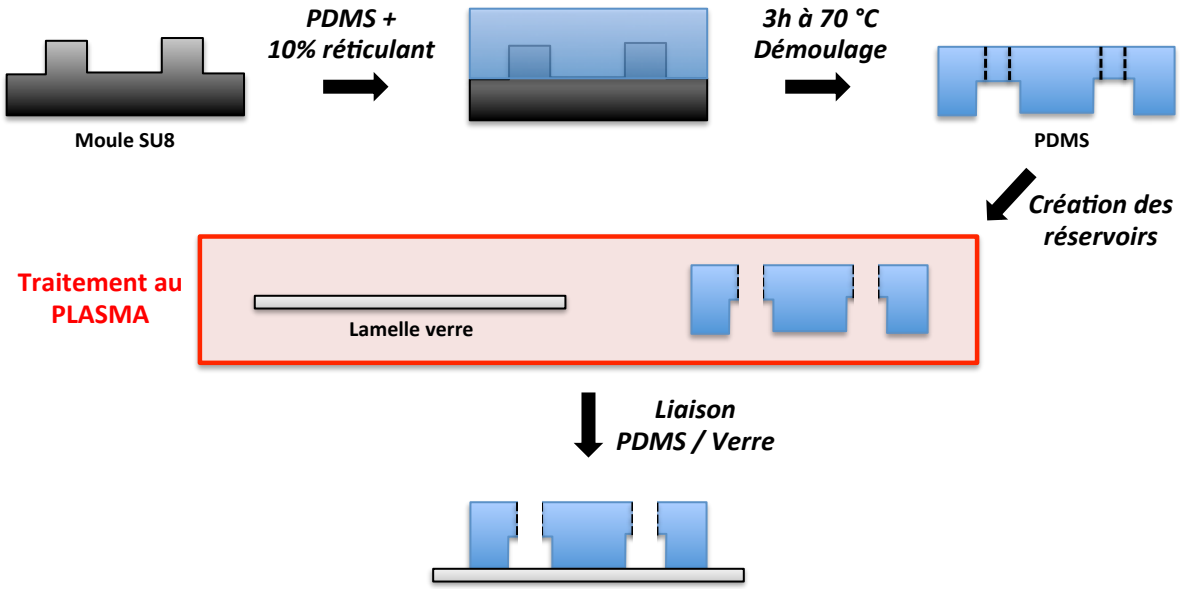


Figure 71 : Préparation des puces microfluidiques.

I.2. Adaptation à la neurobiologie

Les dispositifs microfluidiques ainsi fabriqués sont généralement constitués de deux chambres séparées par des microcanaux. La chambre de gauche est appelée chambre « proximale » ou somato-dendritique. La chambre de droite est appelée chambre « distale » ou axonale. Les microcanaux font 3µm de hauteur et 450µm de longueur. Ils ont une forme d'entonnoir, avec l'extrémité de gauche faisant 15µm de largeur tandis que l'extrémité de droite fait seulement 3µm. La forme diodée des microcanaux permet le passage unidirectionnel des axones de la chambre proximale vers la chambre distale à travers. Dans le cadre de mon projet, les puces que j'ai utilisées avaient une troisième chambre, dite « centrale » permettant une bonne isolation fluidique des deux compartiments (Figure 72). La mise en place d'une surpression dans le compartiment du milieu permet de n'avoir aucune dilution entre les traitements des deux compartiments proximal et distal. Toutes les chambres sont accessibles par l'expérimentateur par des réservoirs reliant l'extrémité d'une chambre à la surface de la puce en PDMS. Le volume de chaque réservoir est de 60µl tandis que le volume d'une chambre fait 300nl. Le renouvellement du milieu est assuré par l'écoulement généré lors du remplissage des réservoirs, et le « gazage » (oxygène et CO2) se fait au travers de l'épaisseur du PDMS qui est un polymère poreux.

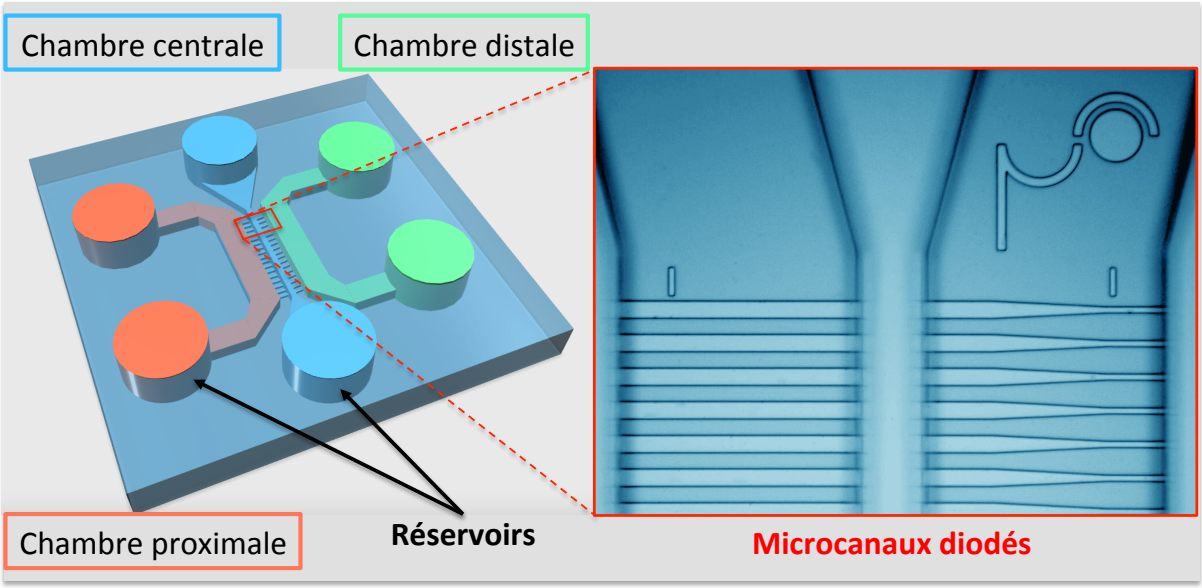


Figure 72 : Schéma d'une puce microfluidique constituée de trois chambres connectées par des microcanaux orientés. Chaque chambre est accessible par l'expérimentateur *via* des réservoirs à chaque extrémité.

II. Culture primaire de neurones corticaux

II.1.Dissection & dissociation

Les structures corticales sont prélevées sur des embryons de souris *Swiss* au stade embryonnaire E14. La dissection est effectuée dans une solution saline de PBS$^-$ (Phosphate-Buffered Saline, w/o Ca, Mg ; ThermoFisher #14190094) + glucose 0,1% (w/v). Après prélèvement, les structures sont rincées avec du PBS$^-$ puis dissociées à l'aide d'une solution contenant de la papaïne (20U/ml, Sigma) pendant 10 min à 37°C dans du DMEM-Glutamax (DMEM-High glucose-Glutamax supplement- pyruvate ; ThermoFisher #31966021). La papaïne est inhibée par l'ajout de SVF 10% (v/v) puis les cellules sont resuspendues dans 5mL de DMEM contenant de la DNase-I (100U/mL, Sigma). Les cellules sont dissociées mécaniquement puis centrifugées à deux reprises à 700g pendant 7 min et enfin resuspendues dans un milieu de culture contenant du DMEM-Glutamax, des antibiotiques (pénicilline 100U/mL ; streptomycin 100 µg/mL), du SVF 5% et les suppléments N2 et B27 (densité cellulaire : 50.10^6 cellules/mL).

II.2.Culture en puces microfluidiques

Les cellules sont ensemencées dans la chambre proximale (environ 85.10^3 cellules/chambre). Après adhérence des cellules, du milieu de culture est ajouté dans chaque

compartiment microfluidique. Les puces sont placées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO_2 pour une période de 10 à 15 jours *in vitro* (JIV). Le milieu de culture est totalement renouvelé à JIV6.

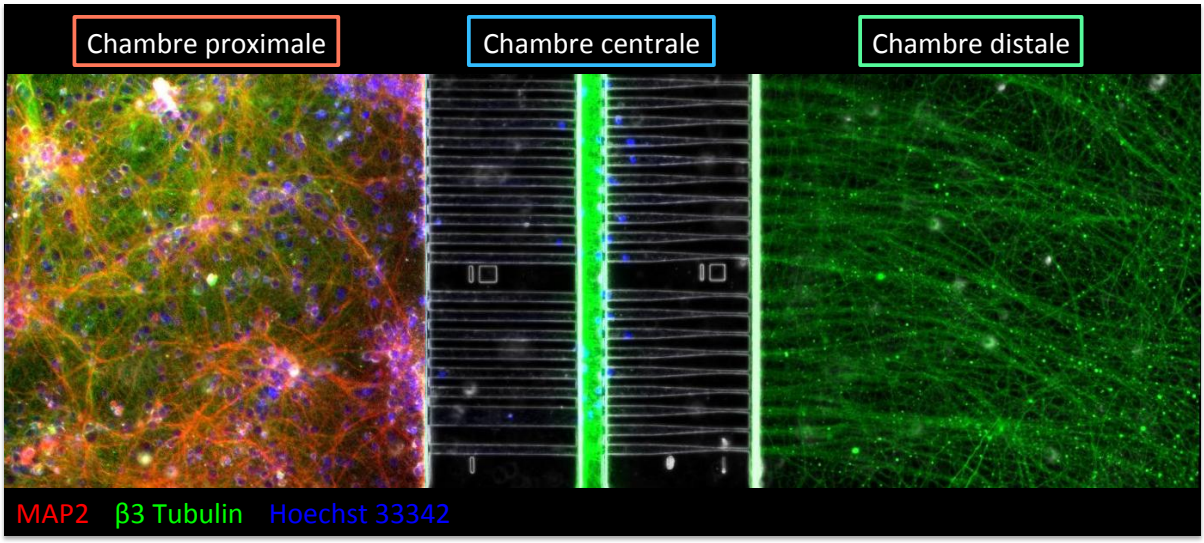


Figure 73 : Culture primaires de neurones corticaux dans un circuit microfluidique composé de trois chambres séparées par des micro-canaux diodés.

II.3.Culture en plaques

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits (coatées avec de la PDL 10 µg/mL minimum 2h avant) à une densité de 300 000 cellules dans 400µL de milieu de culture. Les plaques sont placées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO_2 pour une période de 10 à 15 JIV. Lorsque les cellules ont bien adhéré, environ 24h après l'ensemencement, le milieu de culture est entièrement renouvelé par 1mL de milieu frais. Puis le milieu est renouvelé à moitié à JIV6.

IV. Traitement pharmacologiques *in vitro*

IV.1. Molécules utilisées

Au cours de ma thèse, les agents pharmacologiques utilisés ont été :

Abréviation	Nom	Concentration utilisée	Solvant solution	Fournisseur	Référence
NMDA	N-Methyl-D-aspartic acid	10-100 µM	H_2O	Sigma	#M3262
FK866	(E)-N-[4-(1-benzoylpiperidin-4-yl)butyl]-3-(pyridin-3-yl)acrylamide	10 µM	DMSO	Sigma	#F8557
NAD^+	β-Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate	50 µM-15 mM	H_2O	Sigma	#N3014
NMN	β-Nicotinamide mononucleotide	50 µM-5 mM	H_2O	Sigma	#N3501
NR	Nicotinamide Riboside	50 µM-5 mM	H_2O	Chromadex	Niagen
NAM	Nicotinamide	50 µM-5 mM	H_2O	Sigma	#N0636
NBTI	*S*-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine	50 µM	DMSO	Sigma	#N2255
DIP	Dipyridamole	50 µM	DMSO	Sigma	#D9766
CMP	Cytidine 5'-monophosphate disodium salt	25 mM	Dilué dans DMEM	Sigma	#C1006
AP_4A	P^1,P^4-Di(adenosine-5') tetraphosphate ammonium salt	1 -10 mM	H_2O	Sigma	#D1262
MK-801	Dizocilpine	10-50 µM	DMSO	Tocris	#0924
QVDOPh	N-(2-Quinolyl)-L-valyl-L-aspartyl-(2,6-difluorophenoxy) methylketone	50 µM	DMSO	MP Bio	#03OPH109
Idn-6556	Emricasan	10 µM	DMSO	Theraptosis	-
PJ34	2-(Dimethylamino)-N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)acetamide hydrochloride	50 µM	H_2O	Selleckchem	#S7300
Veliparib	ABT-488 /2-((*R*)-2-Methylpyrrolidin-2-yl)-1*H*-benzimidazole-4-carboxamide	50 µM	H_2O	Selleckchem	#S1004
DRB	5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside	80 µM	DMSO	Sigma	#D1916

Table 4 : Agents pharmacologiques utilisés.

IV.2. Principe du traitement

Après onze jours de culture (JIV11), les circuits destinés à être traités sont sélectionnés après observation en microscopie à lumière transmise. Les critères de sélection sont les suivants : survie somatique > 80%, densité somatique et axonale, longueur totale des axones ≥ 600 µm, 80% des micro-canaux occupés et absence de ″ballonnement″ des segments d'axone. L'application des traitements s'effectue par renouvellement complet du milieu de culture de la chambre considérée ou des deux chambres, en générant un flux par différence de 10µl entre les réservoirs (30µL > 40µL). Les circuits non traités sont également soumis à un renouvellement du milieu de culture de manière à limiter les effets dus aux flux générés. Comme indiqué précédemment, les flux générés dans la chambre centrale permettent l'isolation fluidique entre les deux chambres de manière à traiter indépendamment le compartiment proximal du compartiment distal. Concrètement, le flux généré dans la chambre centrale est 40µL > 50µL. Les traitements sont effectués entre JIV11 et 13. Les traitements effectués lors d'une cinétique longue (72h) peuvent être renouvelés toutes les 24h en fonction des durées de demi-vie des molécules.

V. Immunocytochimie

V.1. Principe

Après traitement, les circuits sont fixés pendant 20 min à l'aide d'une solution de PBS^--paraformaldéhyde 4%-Sucrose 4% (w/v). Pour permettre une pénétration complète du PFA dans les circuits, un flux de 10µL est généré dans chaque chambre. Les cellules sont ensuite rincées 10 min avec du PBS^- avant l'immunocytochimie.

Toutes les incubations sont réalisées à température ambiante. L'introduction des réactifs dans chaque circuit est réalisée grâce à la création d'un flux en diagonale par différence de volumes entre les réservoirs des chambres du dispositif. Après rinçage au PBS^-, les cellules sont perméabilisées et saturées en les incubant pendant 30 min avec une solution de PBS^- contenant du Triton-X100 0.2% (v/v) et de la BSA 1% (w/v). Les cellules sont ensuite incubées dans du PBS^- en présence d'anticorps primaires pendant 1h. Après rinçage au PBS^-, les cellules sont mises en présence d'anticorps secondaires couplés à un fluorochrome pendant 1h à l'obscurité. Lors d'utilisation d'anticorps primaires directement couplés à un fluorochrome, les cellules sont incubées à l'abri de la lumière pendant 2h. Après

un nouveau rinçage, les noyaux des corps cellulaires sont marqués par incubation des cellules dans une solution de PBS$^-$ contenant l'agent intercalant Hoescht 33342 (2µg/mL) pendant 10 minutes. Un dernier rinçage avec du PBS$^-$ est effectué avant l'acquisition d'images.

V.2. Anticorps utilisés

Les anticorps utilisés sont :

Nom	Dilution	Fournisseur	Référence
Anti-Beta III Tubulin Antibody, Alexa Fluor® 488 Conjugate	1/500 ème	Millipore	# AB15708A4
Anti-MAP2-Alexa555 (Clone AP20)	1/500 ème	Millipore	# MAB3418A5
Anti-Microtubule-Associated Protein 2 (MAP2)	1/500 ème	Millipore	#AB5622
Monoclonal Anti-β-Tubulin Isotype III antibody produced in mouse	1/500 ème	Sigma	#T5076

Table 5 : Liste des anticorps utilisés.

VI. Analyse de la mort neuronale et de la quantification axonale

VI.1. Microscopie à fluorescence

Les acquisitions d'image sont réalisées à l'aide d'un microscope Axioobserver Z1 (Zeiss) équipé d'une caméra CCD refroidie 12 bits (CoolsnapHQ2, Ropert Scientific) et piloté par le logiciel métamorph. Une série de 12 à 20 images est obtenue par circuit (6-10 images par chambre).

VI.2. Quantification de la mort neuronale

L'état des somas est quantifié à partir du pourcentage de noyaux condensés après marquage au Hoechst. Pour chaque circuit, le nombre total de noyaux est mesuré ainsi que le nombre de noyaux condensés. Le ratio $Noyaux_{condensés}/Noyaux_{Totaux}$ donne une indication de la mort neuronale. Pour les comparaisons entre les différentes conditions testées, la moyenne du ratio obtenu pour chaque circuit est effectuée (entre 3 et 5 circuits par conditions).

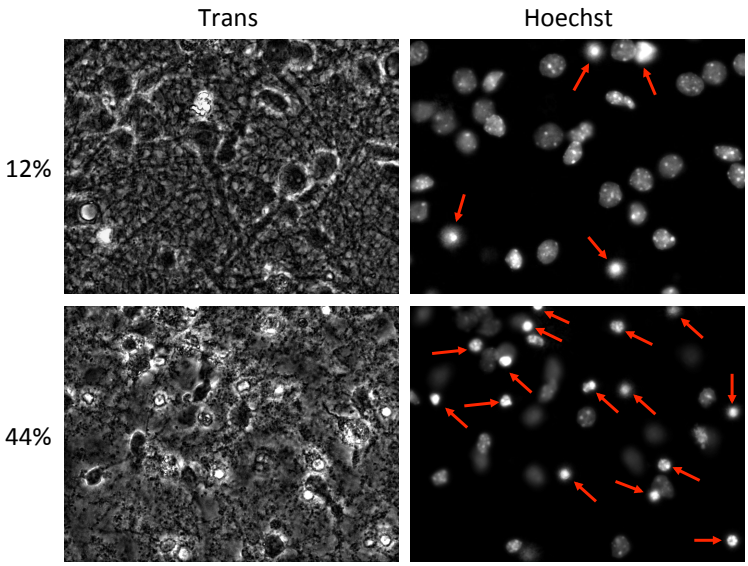


Figure 74 : Illustration du compartiment somatique par lumière transmise (Trans) et après marquage au Hoechst. Les noyaux condensés sont identifiés par une flèche rouge. Les deux photos du dessus correspondent à des cellules non traitées avec un % de noyaux condensé de 12%. Les cellules du dessous correspondent à des cellules traitées au NMDA 100µM pendant 24h ce qui induit une augmentation du % de noyaux condensés à 44%.

VI.3. Quantification de la dégénérescence axonale

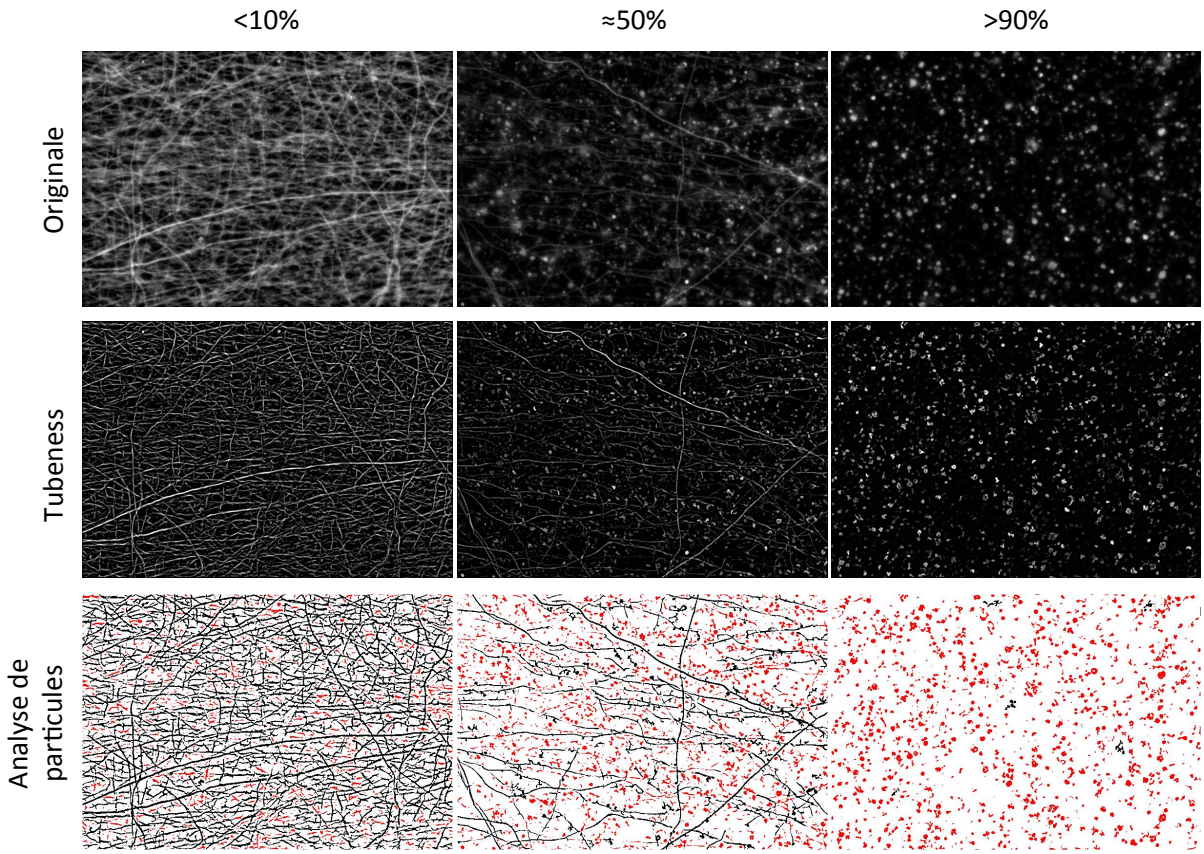


Figure 75 : Quantification de la dégénérescence axonale par la macro FIJI pour trois pourcentages d'axones fragmentés estimés visuellement. La première ligne correspond aux photos originales après réduction du bruit de fond. La seconde ligne représente les photos après le plugin Tubeness. La troisième correspond aux images seuillées par le filtre OtsuThresholding : les segments rouges représentent les particules dont la circularité est supérieure à 0,2.

La dégénérescence axonale est quantifiée à l'aide du logiciel FIJI. A partir du travail effectué par Kilinc *et al* (Kilinc et al., 2011), une macro a été mise au point permettant de réaliser un traitement de chaque image en effectuant les étapes suivantes : 1-Réduction du bruit de fond, 2-*Plugin Tubeness* qui permet de mettre en avant les segments longitudinaux d'une image, 3-*Plugin Otsu thresholding* permettant l'obtention d'une image binarisée, 4-Mesure de l'aire totale des particules de l'image puis 5-Mesure de l'aire des particules dont la circularité est supérieure à 0,2.

Le ratio $Aire_{c>0,2}/Aire_{Totale}$ permet d'obtenir un index de fragmentation (IF) compris entre 0 et 1 que l'on peut corréler de manière quasi-linéaire avec le pourcentage d'axones fragmentés estimé visuellement. Les indices inférieurs à 0,2, autour de 0,5 et supérieurs à 0,8 correspondent, respectivement, à moins de 10%, environ 50% et plus de 90 % d'axones fragmentés.

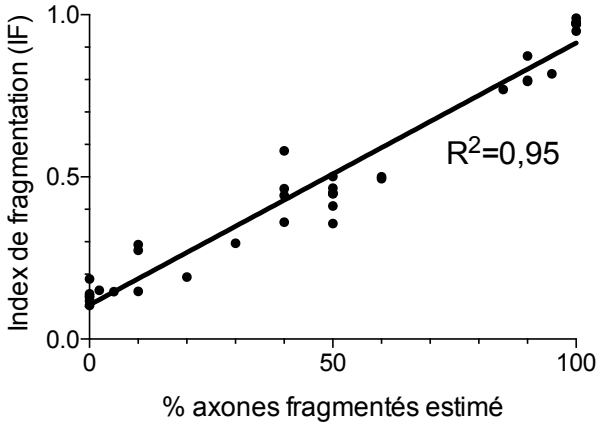


Figure 76 : Corrélation entre l'index de fragmentation obtenu par la macro sur FIJI et le pourcentage d'axones fragmentés estimé visuellement.

VII. Analyse de l'expression génique :

VII.1. Extraction d'ARN totaux

Les extractions d'ARN totaux ont été effectuées à partir des cellules mises en culture dans des plaques 24 puits ou de tissus murins prélevés chez des souris adultes. La lyse et l'extraction d'ARN ont été effectuées en suivant les indications du kit RNeasy (Qiagen, #74104).

Brièvement, les cellules sont lysées par l'ajout de 100µL de tampon de lyse contenant du guadinium thiocyanate, un chaotrope inhibant l'activité de la RNase (ribonucléase). Les tissus murins sont lysés mécaniquement et broyés à l'aide d'un pilon (Dutscher #45011) puis

l'extraction des ARN et des protéines est effectué dans une solution contenant du thiocyanate et du phénol (Qiazol, Qiagen #79306). Les traces de phénol sont ensuite retirées par ajout de chloroforme et centrifugation. Les étapes suivantes de l'extraction sont communes quelque soit la nature de l'échantillon.

Les lysats obtenus sont ainsi mélangés à de l'éthanol 70% exempt de RNase et DNase puis ajoutés à une colonne chromatographique échangeuse d'ions et centrifugés plusieurs fois à 8000g pendant 15s avec des tampons de rinçage. Les échantillons sont traités à la DNase-I (0,34 Kunitz units/mL, RNase-Free DNase Set, Qiagen #79254) afin d'éliminer toutes traces de contaminations par de l'ADN génomique. Puis, l'élution est effectuée avec 50µL d'eau exempt de RNase. Les ARN sont ensuite dosés par mesure de l'absorbance à 260nm à l'aide d'un spectrophotomètre BioSpecNano (Thermo Scientific). La pureté des ARN extraits est évaluée par la mesure du rapport $\frac{Abs_{260nm}}{Abs_{280nm}}$, qui doit être compris entre 1,7 et 2.

VII.2. RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

VII.2.a. Transcription inverse

Les ADN complémentaires (ADNc) sont obtenus par incubation de 1µg d'ARN totaux, en présence d'oligo$(dT)_{12\text{-}18}$ (25 µg/ml) et d'un mélange des 4 désoxyribonucléotides (dNTP ; 0,5 mM chacun) dans un volume de 12µl (le volume final de la réaction sera de 20 µl). Le mélange est incubé à 65°C pendant 5 min puis refroidi rapidement sur glace afin de dénaturer les polynucléotides. Après ajout du tampon réactionnel et de dithiothréitol (DTT, 10 mM), le mélange est incubé pendant 2 min à 42°C afin de permettre l'hybridation des amorces oligo(dT) aux queues polyA des ARN messagers (ARNm). La transcriptase inverse est alors ajoutée (SuperScript II RT, Invitrogen #18064) et le mélange incubé pendant 50 min à 42°C permettant ainsi la polymérisation des brins d'ADNc aux ARNm initiaux. La réaction est inactivée par incubation pendant 15 min à 70°C. Afin d'éliminer les ARNm, le mélange réactionnel est mis en présence de ribonucléase H issue d'*E.Coli* (RNase H, 2U, Invitrogen) pendant 20 min à 37°C.

VII.2.b. PCR

Afin d'amplifier de manière spécifique chaque ADNc par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), 2 µL du mélange réactionnel issu de la transcription inverse et contenant les ADNc sont incubés en présence de 2,5µL de solution tampon (PCR Buffer 10X : 200mM

Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), des 4 dNTP (200µM chacun), de $MgCl_2$ (1,5mM), de chaque amorce (0,5µM chacun), et de *Taq* Polymerase (2,5U) dans un volume final de 25µL. La réaction de PCR commence par une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min puis 30 cycles comprenant 45 sec à 94°C pour séparer les deux brins d'ADN (dénaturation), 30 sec à T_a pour hybrider les brins d'ADNc avec les amorces et 1 min à 72°C pour permettre la polymérisation de l'ADN grâce à la *Taq* Polymérase, la réaction est achevée par une incubation supplémentaire de 10 min à 72°C. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (w/v) dans une solution TBE 1X (Tris 0,1M, acide Borique 90mM, EDTA 1mM) pendant 1h à 50V puis coloration du gel dans une solution de TBE 1X et bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) pendant 10 min à température ambiante.

VII.3. PCR quantitative (PCRq)

Les PCRq sont effectuées avec un appareil LightCycler 480 prenant en charge des plaques de 96 puits. La réaction de PCR est, dans ce cas, réalisée dans un volume final de 10 µl en ajoutant 4µl de cDNA dilué au 1/50 dans H_2O avec 6µL de master mix comprenant : 5 µL de Light Cycler 480 SYBRGreen I Master (Roche #4887352001) et 0,5µL de chaque amorces (5µM chacune). La réaction est initiée par une incubation de 5 min à 95°C puis 40 cycles de 10 sec à 95°C, 15 sec à T_a et 15 sec à 72°C. La réaction est terminée par 10 sec à 40°C. Les données sont analysées à l'aide du logiciel « LightCycler 480 SW 1.5 ».

Gène	Amorces		Taille amplicon (pb)	T_a
β-Actin	sens	5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	228	63
	antisens	5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'		
HPRT	sens	5'-ATTATGCCGAGGATTTGGAA-3'	94	60
	antisens	5'-CCCATCTCCTTCATGACATCT-3'		
ENT1	sens	5'-AGCCTGTGCAGTTGTCATTTT-3'	153	60
	antisens	5'-TCTTCCTTTTGGCTCCTCTCC-3'		
ENT2	sens	5'-CGAGTCGGTGCGGATTCTG-3'	149	60
	antisens	5'-GCACGGCACAGAAGGAATTG-3'		
ENT3	sens	5'-ATAGCAGCGTTTACGGCCTC-3'	127	60
	antisens	5'-CACTGGATGCTGCCAGGTC-3'		
ENT4	sens	5'-TTTGGCAGTGTGCCCATGA-3'	127	60
	antisens	5'-TGCAGTAGGCCACAGCAGAG-3'		
CNT1	sens	5'-TCGCTGGCTCAAAGCATCAC-3'	120	60
	antisens	5'-ACTGGAACGCAACGAATCCTG-		

CNT2	sens	5'-AGGCCTGGAACTCATGGAAG-3'	402	60
	antisens	5'-GAGTCCTACGAACACCCGCT-3'		
CNT3	sens	5'-GGTTCCCTAGGAATCGTGATCG-	340	60
	antisens	5'-CCAATTGCAGTTCAGCGTTGG-3'		
CD73	sens	5'-ACGTGCTGTTTTTGGATGCC-3'	157	60
	antisens	5'-TCAATCAGTCCTTCCACACCG-3'		
Nrk1	sens	5'-AGGGAAGACGACACTGGCTA-3'	141	63
	antisens	5'-AGCGCTTCAAGCACATCATA-3'		
Nrk2	sens	5'-CACCTCAGGACCAGTCACCT-3'	94	60
	antisens	5'-CTGTTGGTCAGGGTGGTCTT-3'		

Table 6 : Liste des amorces utilisées pour les RT-PCR et qPCR.

VIII. Dosage du NAD^+

Les dosages du NAD^+ ont été effectués en utilisant le kit EnzyChrom NAD^+/NADH Assay (Euromedex, #E2ND-100). Le principe du dosage est un « cycling assay », composé de plusieurs réactions en chaîne : l'oxydation du lactate en pyruvate par la lactate déshydrogénase induit la réduction du NAD^+ en NADH, qui a son tour va participer à la réduction du réactif MTT. L'intensité du produit formé formazan (MTTred), détecté par colorimétrie, est proportionnel à la concentration de NAD^+ présente initialement dans l'échantillon.

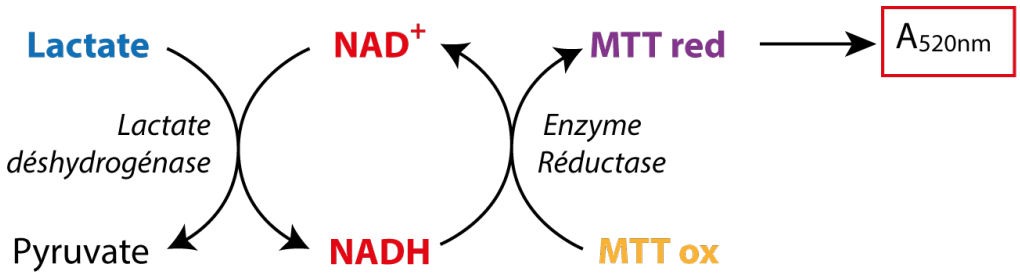


Figure 77 : « Cycling assay » pour doser les quantités de NAD^+/NADH.

Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS^- froid et resuspendues avec 100µL d'un tampon d'extraction sélectif du NAD^+ et contenant de l'acide perchlorique. Les échantillons sont chauffés 5 min à 60 °C puis centrifugés 5 min à 14000rpm. Les surnageants sont récupérés et neutralisés avec de la soude et du tampon phosphate. Une courbe d'étalonnage de quatre points (0/3/6/10 µM) est réalisée à partir de 1mM de solution NAD^+ de référence. La réaction de dosage est effectuée en mettant en présence le lactate, le MTT, la lactate déshydrogénase et une réductase (permettant la réduction du MTT) avec les

échantillons récupérés dans une plaque de 96 puits transparente. La quantité de produit formé (MTTred) est suivie par mesure de l'absorbance à 520 nm pendant 20 min. La concentration de NAD^+ dans chacun des échantillons est obtenue grâce à la courbe d'étalonnage. Trois réplicats sont effectués par expérience et trois expériences indépendantes sont réalisées (n=3).

IX. Modèle d'excitotoxicité *in vivo*

Le modèle d'excitotoxicité *in vivo* a été réalisé en collaboration avec la plateforme ESRP (pour *Experimental Stroke Research Platform*) co-fondée par le Pr. Denis Vivien et le Dr. Cyrille Orset.

IX.1. Animaux

Les expériences ont été réalisées sur 20 souris C57/Black6N en accord avec le conseil communautaire européen et la législation française sur l'expérimentation animale. Les souris sont profondément anesthésiées avec 5% d'isoflurane puis maintenues sous anesthésie avec 2% d'isoflurane dans un mélange 70%/30% N_2O/O_2 pendant la chirurgie. La température rectale est maintenu à 37 ± 0.5 °C durant toute la procédure chirurgicale à l'aide d'un système de chauffage régulé par rétroaction.

IX.2. Injection de NMDA intrastructure

Les injections corticales bilatérales (coordonnées : 0.5mm postérieur, 2.0mm latérale, -0.5mm ventrale par rapport au bregma) de NMDA (5 nmoles dans 0,33µL), co-injectées ou non avec du NAD^+ ou du NR (50 nmoles) ont été réalisées par placement des animaux dans un cadre stéréotaxique. Les solutions sont injectées à l'aide d'une micropipette fabriquée à partir de micropipettes hématologiques (calibrées à 15 mm/µl; assistant ref 555/5; Hecht, Sondheim-Rhoen, Germany). Après craniotomie, les micropipettes sont lentement implantées dans le cortex, puis l'injection est effectuée pendant 1 à 3 minutes en vérifiant que la solution ne reflue pas. La micropipette est maintenue 1minute en place avant d'être retirée lentement.

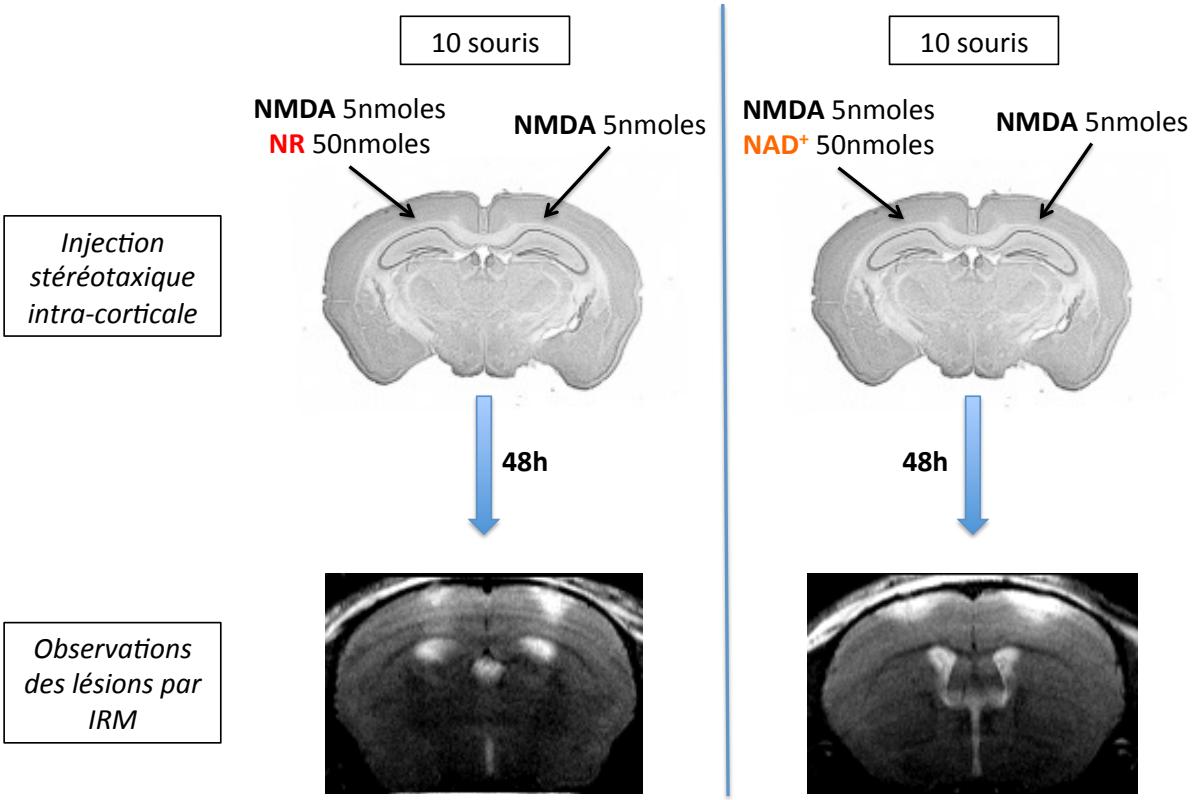


Figure 78 : Protocole expérimental du modèle d'excitotoxicité *in vivo*. J0 : injection stéréotaxique intra-corticale de NMDA 5nmoles avec ou sans NR 50 nmoles ou NAD^+ 50 nmoles ; J2 : observations des lésions par IRM.

IX.3. Observations des lésions par Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM)

Figure 79 : IRM bruker 7T spécifique à la visualisation des lésions cérébrales des espèces murines.

Les lésions induites par les injections sont observées 48h après la chirurgie par IRM (7T IRM, Brucker), en suivant une séquence de type T2. Les animaux sont maintenus sous anesthésie avec 2% d'isoflurane dans un mélange 70%/30% N_2O/O_2 pendant toute la durée d'acquisition des images.

IX.4. Quantification du volume des lésions

Les images obtenues par IRM sont analysées *via* le logiciel FIJI. Chaque hémisphère est analysé de manière indépendante. L'aire des lésions est mesurée pour chaque image en utilisant l'outil de sélection polygonale sous FIJI. L'aire totale, correspondant à la somme des aires mesurées précédemment, est converti en volume sachant qu'un voxel (=pixel^3) équivaut à 0,07mm*0,07mm*0,5mm.

X. Analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées avec des tests non-paramétriques : Mann Whitney pour comparer deux conditions ou Kruskall-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn's pour comparer plusieurs conditions (>2).

* p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p–value < 0.001.

RESULTATS

I. Mise au point d'un modèle d'étude de dégénérescence axonale lors d'un stress excitotoxique

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, le phénomène d'excitotoxicité est un processus caractéristique de différents types de pathologies, aigües comme les traumatismes crâniens ou chroniques comme les maladies neurodégénératives. Nous avons donc choisi de développer un modèle *in vitro* basé sur un stress excitotoxique afin d'étudier les effets du NAD^+ et du NR. Sachant que le NAD^+ a le plus souvent été impliqué dans le retardement de la dégénérescence axonale, notamment lors de l'axotomie, nous avons développé un modèle permettant d'observer la dégénérescence de l'axone indépendamment de la mort somatique et de pouvoir étudier les effets protecteurs locaux du NAD^+ et du NR au niveau somato-dendritique et axonal.

I.1. Caractérisation du modèle d'excitotoxicité induite par le NMDA dans les neurones corticaux

Le stress excitotoxique peut être induit par l'application de glutamate ou d'autres excitotoxines qui miment une libération excessive de glutamate et entrainent l'hyperactivation des récepteurs au glutamate. Dans le cadre de ce projet, nous avons décidé d'utiliser l'excitotoxine synthétique NMDA. Contrairement à l'application du glutamate qui peut activer différents types de récepteurs, comme mentionné dans l'introduction, et qui peut être capturé par les cellules gliales, l'application exogène du NMDA induit une activation spécifique des récepteurs NMDA (NMDAR). Cette activation des NMDAR est primordiale dans les fonctions physiologiques et excitotoxiques de la neurotransmission glutamatergique. En particulier les NMDAR régulent l'influx calcique dans le compartiment post-synaptique. Afin de modéliser un processus excitotoxique sur des neurones corticaux mis en culture dans les puces microfluidiques décrites dans la partie Matériels & Méthodes, le traitement du compartiment somato-dendritique avec du NMDA 100µM a été réalisé. Les effets de ce traitement ont été suivis au cours du temps (4/8/24/48h). La mort des cellules, déterminée par la quantification du nombre de noyaux condensés par rapport au nombre total de noyaux marqués à l'aide de l'agent intercalant Hoescht 33342, est comprise entre 15 et 20% en condition contrôle.

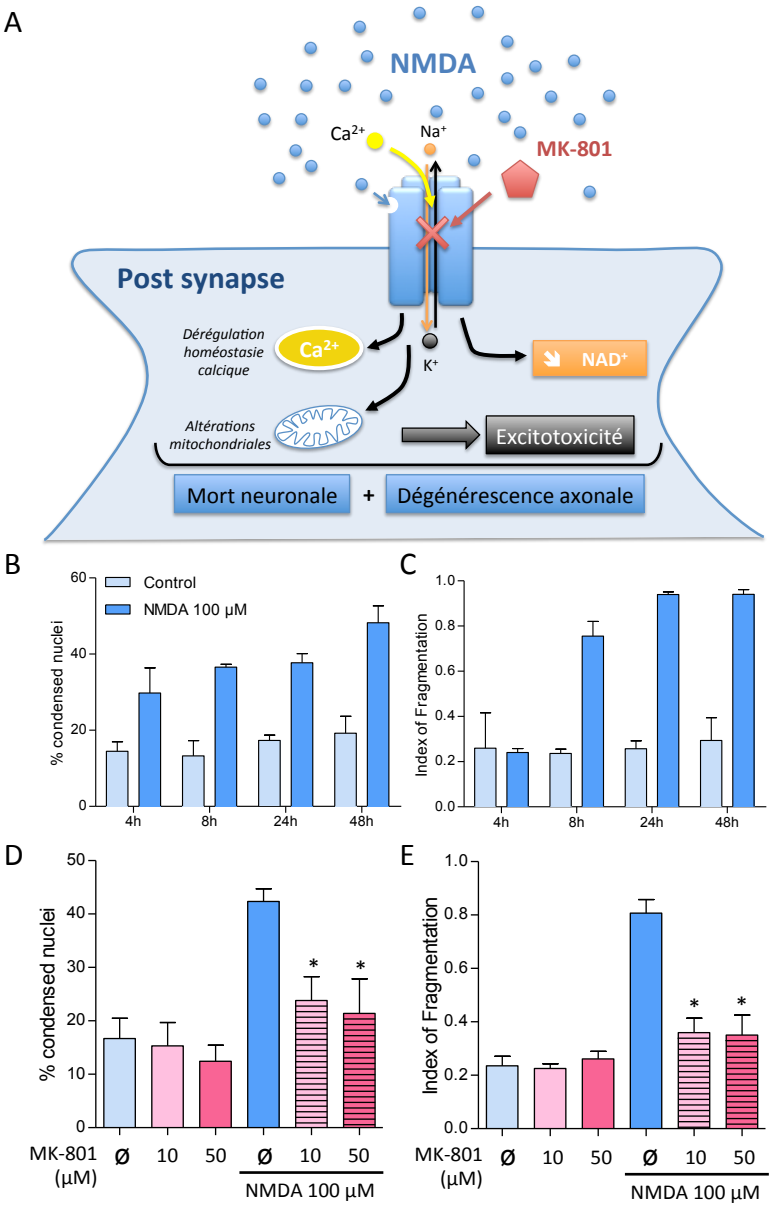


Figure 80 : L'application de NMDA induit la mort des corps cellulaires et la dégénérescence des axones en activant de manière spécifique les récepteurs NMDA. (A) Schéma représentant l'excitotoxicité glutamatargique induite par l'apport de NMDA exogène en excès. L'activation aigüe des NMDAR provoque une dérégulation calcique, des dysfonctions mitochondriales, active des protéines kinases et entraîne une diminution des niveaux intracellulaires en NAD+. (B-C) L'application de 100µM de NMDA dans le compartiment somato-dendritique induit une mort neuronale dès 4h et une dégénérescence axonale dès 8h (n=3). (B) Quantification de la mort neuronale à partir du pourcentage de noyaux condensés ; (C) Quantification de la dégénérescence axonale *via* la mesure de l'index de fragmentation. (D-C) Le blocage des NMDAR par le MK-801 empêche l'effet excitotoxique du traitement au NMDA. Les neurones sont co-traités avec du NMDA 100µM et du MK-801 10/50 µM pendant 8h (n=3). (D) Quantification de la mort neuronale ; (E) Quantification de la dégénérescence axonale.

Comme le montre la figure 80.B, l'effet du NMDA sur la dégénérescence somatique est rapidement observé (30% de noyaux condensés 4h après traitement). Cet effet s'accentue légèrement à 8h et 24h après traitement (40%) et atteint 48% à 48h. L'index de fragmentation IF, indiquant la fragmentation des axones, est compris entre 0,2 et 0,3 en condition contrôle mais augmente considérablement dès 8h de traitement (IF=0,8) avant d'atteindre un plafond

dès 24h de traitement (IF>0,9 à 24 et 48h) (Figure 80.C). Ces résultats corroborent l'effet du NMDA ou du glutamate observé dans d'autres études sur des cultures de neurones corticaux murins (Bi et al., 2012; Hosie et al., 2012; Kim et al., 2011a; Liu et al., 2009a). Afin de se placer dans les conditions optimales où l'effet du NMDA est maximal et permet une discrimination nette des effets d'autres agents pharmacologiques, la majorité des expériences ultérieures a été effectuée avec une dose de 100µM de NMDA pendant 8h ou 24h. L'activation des NMDAR peut être inhibée par l'antagoniste spécifique MK-801 (Chung et al., 2005). Afin de vérifier la spécificité de la neurodégénérescence observée, le co-traitement du compartiment somato-dendritique avec 100µM de NMDA et 10 ou 50µM de MK-801 a été réalisé pendant 8h. Aucun effet toxique du NMDA n'est observé dans ces conditions : l'intégrité des neurones corticaux, évaluée par la condensation nucléaire et la dégénérescence axonale, n'est significativement pas affectée par le traitement en comparaison aux neurones observés en condition contrôle (Figure 80.D-E). L'effet du NMDA est donc spécifique de l'activation des NMDAR.

Par ailleurs, Hosie *et al* ont montré en 2012, grâce à l'utilisation de dispositifs microfluidiques, que les NMDAR sont détectables dans le compartiment somatique mais pas dans le compartiment axonal (Hosie et al., 2012). Nous avons voulu évaluer la compartimentalisation de l'effet du NMDA en appliquant 100µM soit uniquement dans le compartiment proximal (comme effectué dans les expériences précédemment décrites), soit uniquement dans le compartiment distal. Comme le montre la Figure 81, l'application de NMDA localisée sur les axones n'engendre d'effet ni sur la mort neuronale, évaluée par la condensation nucléaire et par l'intégrité du cytosquelette marqué à l'aide d'un anticorps dirigé contre MAP2 (microtubule-associated protein 2) ni sur la dégénérescence des axones évaluée par l'intégrité de la β_3-tubuline. Cela atteste de l'absence de NMDAR à la membrane des axones. De plus, ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il confirme l'isolation fluidique obtenue grâce au dispositif microfluidique et la possibilité de traitements indépendants des corps cellulaires et des axones.

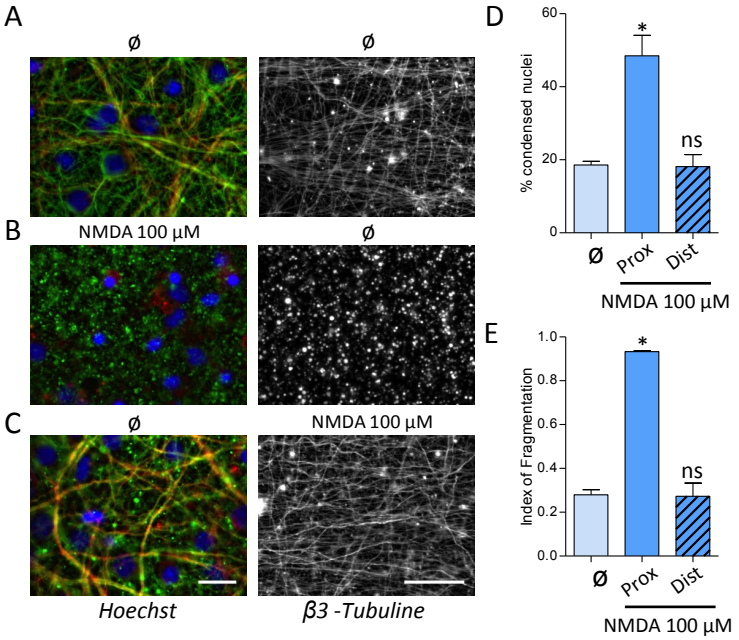


Figure 81 : Effet compartimentalisé du NMDA au niveau somato-dendritique. Les neurones sont traités avec du NMDA 100µM soit dans le compartiment proximal, soit dans le compartiment axonal pendant 24h. (A-C) Immunocytochimie des compartiments somato-dendritique (gauche) et axonal (droite) des cellules traitées ou non avec le NMDA. Les noyaux somatiques sont marqués à l'aide d'un anticorps dirigé contre MAP2 (microtubule associated protein 2) et par le Hoechst 33342. Les axones sont marqués à l'aide d'un anticorps dirigé contre la β_3-Tubuline (échelle : 20µm). (D) Quantification de la mort neuronale axonale en condition contrôle ou après traitement au NMDA (n=3). (E) Quantification de la dégénérescence axonale en condition contrôle ou après traitement au NMDA (n=3).

I.2. Etude des mécanismes de neurodégénérescence mis en jeu

Les premières expériences réalisées montrent donc un effet toxique extrêmement fort du NMDA sur les neurones. Bien que le cœur de ma thèse soit majoritairement orienté sur l'étude de la dégénérescence axonale, nous avons essayé de définir le mécanisme de mort neuronale observé dans ce modèle d'excitotoxicité. Les données bibliographiques dans ce domaine sont nombreuses mais aucune certitude ne ressort quant au type de mort induit par un stress excitotoxique. Au contraire, la multiplicité des modèles semble s'accompagner d'une multiplicité des mécanismes de mort (Puyal et al., 2013). L'observation morphologique des noyaux marqués au Hoechst ne permet pas de discriminer directement le type de mort. Afin d'évaluer le caractère apoptotique de la mort observée, j'ai utilisé deux inhibiteurs de caspases : 1) le QVDOPh est un inhibiteur pan-caspase, ciblant simultanément les trois voies apoptotiques majoritaires (caspases 9/3, caspases 8/10 et caspase 12) (Caserta et al., 2003) ; 2) l'IDn est un inhibiteur pan-caspase irréversible initialement décrit pour bloquer l'activation des caspases et le processus apoptotique dans les cellules du foie (Linton et al., 2005; Natori et al., 2003). Cet inhibiteur a également été testé dans des essais cliniques, notamment pour la préservation de foies humains lors de transplantation (Baskin-Bey et al., 2007). Le QVDOph

et l'IDn ont été démontrés efficaces sur la dégénérescence induite par la vincristine dans des lignées cellulaires Hela à des doses respectives de 50µM et 10µM (données non publiées). L'application de ces deux inhibiteurs aux mêmes doses a été effectuée en pré-traitement de 1h puis en co-traitement de 8h avec le NMDA. Comme le montre la Figure 82.A/B, aucun des deux inhibiteurs ne protège les neurones de la condensation nucléaire et de la dégénérescence des axones. Ces résultats suggèrent que le processus neurodégénératif observé dans ce modèle n'est pas dépendant des caspases. Ceci peut paraître étonnant étant donné l'observation de noyaux condensés pouvant être assimilés d'un point de vue morphologique à des corps apoptotiques (cf Chapitre IV).

Une hypothèse pourrait être la mise en place d'un mécanisme de mort plus complexe mettant en jeu d'autre processus tel que la nécroptose ou la parthanatos. Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre IV, la nécroptose peut être inhibée par la nécrostatine-1 de manière spécifique, comme cela a été montré dans des études *in vitro* sur des lignées cellulaires (Xu et al., 2007b), sur des cultures primaires murines (Li et al., 2008) et *in vivo* dans des modèles d'ischémie/reperfusion (Northington et al., 2011). J'ai donc testé l'application de trois doses différentes de nécrostatine-1 (20/50/100 µM) en pré-traitement de 1h puis en co-traitement de 8h avec le NMDA 100µM. Les résultats obtenus ne semblent pas indiquer d'effet protecteur de cet inhibiteur sur la neurodégénérescence observée (Figure 82.C/D). Cependant, il s'agit de données préliminaires qui devront être approfondies. L'étude effectuée par Li *et al* sur des neurones corticaux de rats montre que l'effet de la nécrostatine-1 est relativement faible. L'utilisation de doses plus fortes pourrait permettre de dégager des résultats plus probants mais l'apparition d'effets non-spécifiques ne peut pas être exclue aux doses élevées.

L'implication des PARPs dans le mécanisme neurodégénératif induit par l'activation des récepteurs ionotropiques au glutamate a également été documentée. L'inhibition des PARPs par des inhibiteurs sélectifs tels que PJ34 a été montré pour diminuer le volume de lésions induites par ischémie dans des modèles murins (Greco et al., 2015; Kaundal et al., 2006). Cependant, PJ34 ne protège que très faiblement contre la mort neuronale induite par le NMDA sur des neurones de la rétine de rats (Goebel and Winkler, 2006). Le véliparib (ABT-488) est un inhibiteur spécifique des PARP1 et PARP2 initialement décrit en cancérologie (Penning et al., 2009) et testé en essai clinique pour le traitement de tumeurs solides cancéreuses (LoRusso et al., 2016) et de tumeurs du SNC chez les enfants (Su et al., 2014).

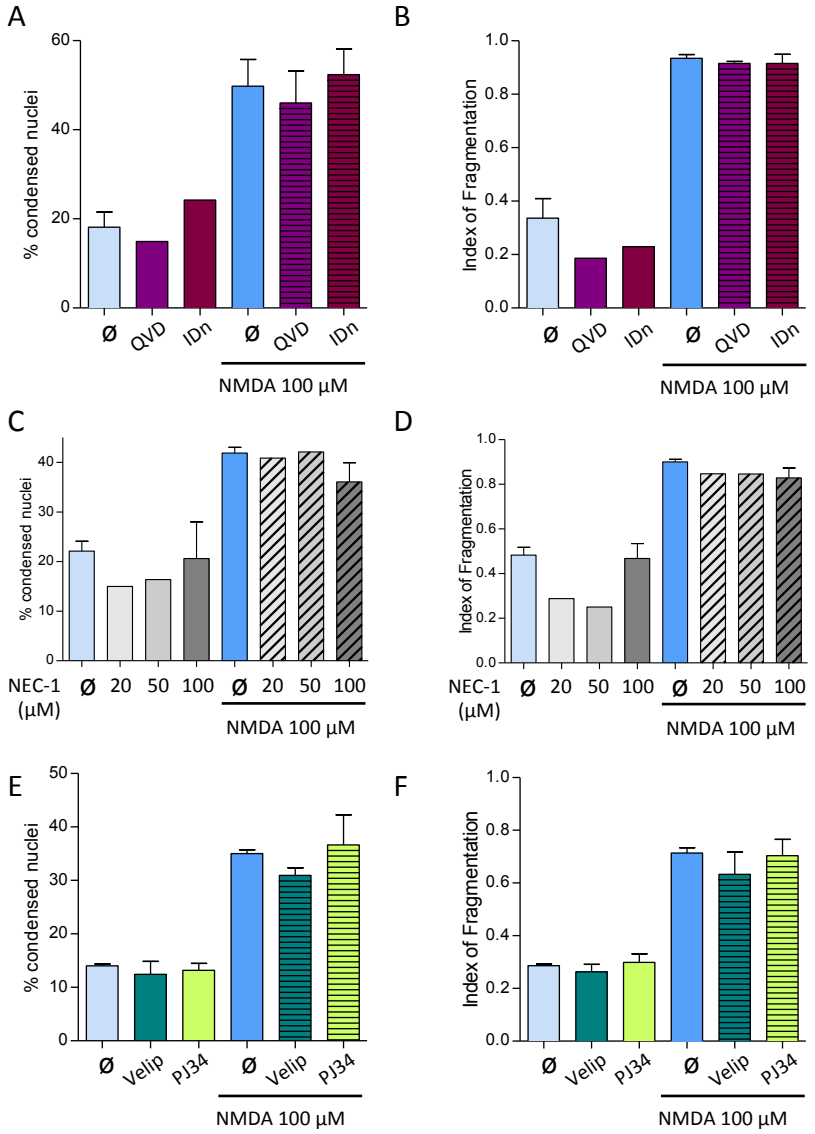


Figure 82 : Les mécanismes de mort impliqués dans la neurodégénérescence induite par le NMDA ne semblent ni apoptotique, ni nécroptotique, ni dépendants des PARPs. (A-B) Co-traitement des neurones avec deux inhibiteurs pan-caspase (QVDOPh 50µM et IDn 10µM) et avec 100µM de NMDA pendant 8h. Aucun effet significatif observé sur la mort neuronale (A) et la dégénérescence des axones (B) (n=2). (C-D) Co-traitement des neurones avec NEC-1 20/50/100µM, inhibiteur spécifique de la nécroptose, et 100µM de NMDA. Aucun effet observé sur la mort neuronale (C) et sur la dégénérescence axonale avec 20 et 50µM de NEC-1. Léger effet à confirmer avec une dose forte de 100µM de NEC-1 (n=1). (E-F) Co-traitement des neurones avec deux inhibiteurs spécifiques des PARP 1 et 2 (Veliparib et PJ34, 50µM). Aucun effet significatif observé sur la mort neuronale (E) et la dégénérescence des axones (F) (n=2).

Afin d'étudier l'implication des PARPs dans le phénomène de mort observé après traitement au NMDA, j'ai utilisé ces deux inhibiteurs spécifiques des PARP 1 et 2, PJ34 et Véliparib, à 50µM. Comme pour les deux expériences précédentes, j'ai prétraité pendant 1h les neurones avant de co-traiter avec le NMDA 100µM. Aucun des deux inhibiteurs de PARP n'a d'effet sur la mort neuronale et la dégénérescence des axones observés à 8h post-traitement (Figure 82.E/F). Encore une fois, ces résultats sont préliminaires et ne permettent pas de conclure définitivement quant à l'implication des PARPs. Il semble cependant que le

mécanisme de mort induit par l'application du NMDA ne soit ni apoptotique, ni nécroptotique ni dépendant de l'activation des PARPs. D'autres voies seraient à tester, notamment celle impliquant les calpaïnes et la voie de l'autophagie. Les calpaïnes sont au centre de nombreux mécanismes moléculaires dans la nécrose mais également dans la dégénérescence axonale. J'ai décidé volontairement de ne pas aller plus loin dans l'étude des mécanismes de mort mais de me concentrer sur les mécanismes impliqués dans la dégénérescence axonale.

II. Caractérisation des effets protecteurs du NAD^+ et du NR

Le NAD^+ dont nous avons évoqué en détails les fonctions au sein de la cellule a été largement étudié dans divers modèles biologiques pour ses effets protecteurs. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le NAD^+ est susceptible de protéger de la dégénérescence axonale et de la déconnexion synaptique *in vitro* dans le SNP et le SNC (Deléglise et al., 2013, 2014; Sasaki et al., 2006). En particulier, les effets du NAD^+ ont été présentés comme protecteurs dans des modèles d'excitotoxicité. L'étude de Wang *et al.* a notamment montré que l'excitotoxicité induite par l'application de glutamate est diminuée par le traitement des cellules avec du NAD^+ (Wang et al., 2014b). L'effet du NAM, précurseur de la voie de sauvetage du NAD^+, a également été démontré dans deux modèles *in vitro* d'ischémie ou d'excitotoxicité glutamatergique (Bi et al., 2012).

Plusieurs études, effectuées sur lignées cellulaires et dans le SNP, évoquent le fait que le NAD^+ pourrait être converti en NR et que le NR pourrait être le précurseur capable d'être transporté dans la cellule pour y être converti en NAD^+ (Nikiforov et al., 2011; Di Stefano et al., 2014). Des effets protecteurs du NR ont ainsi été mis en évidence dans le SNP et dans plusieurs études *in vivo* (Brown et al., 2014; Gong et al., 2013; Sasaki et al., 2006). Cependant, son effet dans un modèle d'excitotoxicité et en particulier sur la dégénérescence des axones n'a pas été caractérisé. De plus, la pertinence de la conversion du NAD^+ en NR décrite dans le SNP n'a pas été évaluée dans le SNC. Le premier objectif de mon projet a donc été de comparer les effets du NR et du NAD^+ dans le modèle d'excitotoxicité mis au point afin d'explorer l'efficacité relative de ces deux molécules dans le SNC.

La première étape a été de co-traiter les neurones avec le NMDA et les précurseurs du NAD^+ afin de comparer leur effet. Les doses utilisées ont été de 100µM pour le NMDA, 5mM pour le NAD^+, 5mM pour le NAM, 5mM pour le NMN et 1mM pour le NR. Dans notre système, aucune des molécules n'a d'effet sur la mort neuronale observée 24h après traitement, mais des effets quant à l'intégrité de l'axone sont quantifiables. Le NR apporte la plus grande protection face à la dégénérescence axonale (90%) à une concentration de 1mM. En comparaison, le NMN protège de 55%, le NAD^+ de 30% et le NAM ne semble pas efficace dans notre modèle (seulement 15% de protection non significative) (figure 83.B). La suite des expériences s'est focalisée sur la comparaison des effets du NAD^+ et du NR.

II.1.Effets comparés des différentes molécules du métabolisme du NAD$^+$

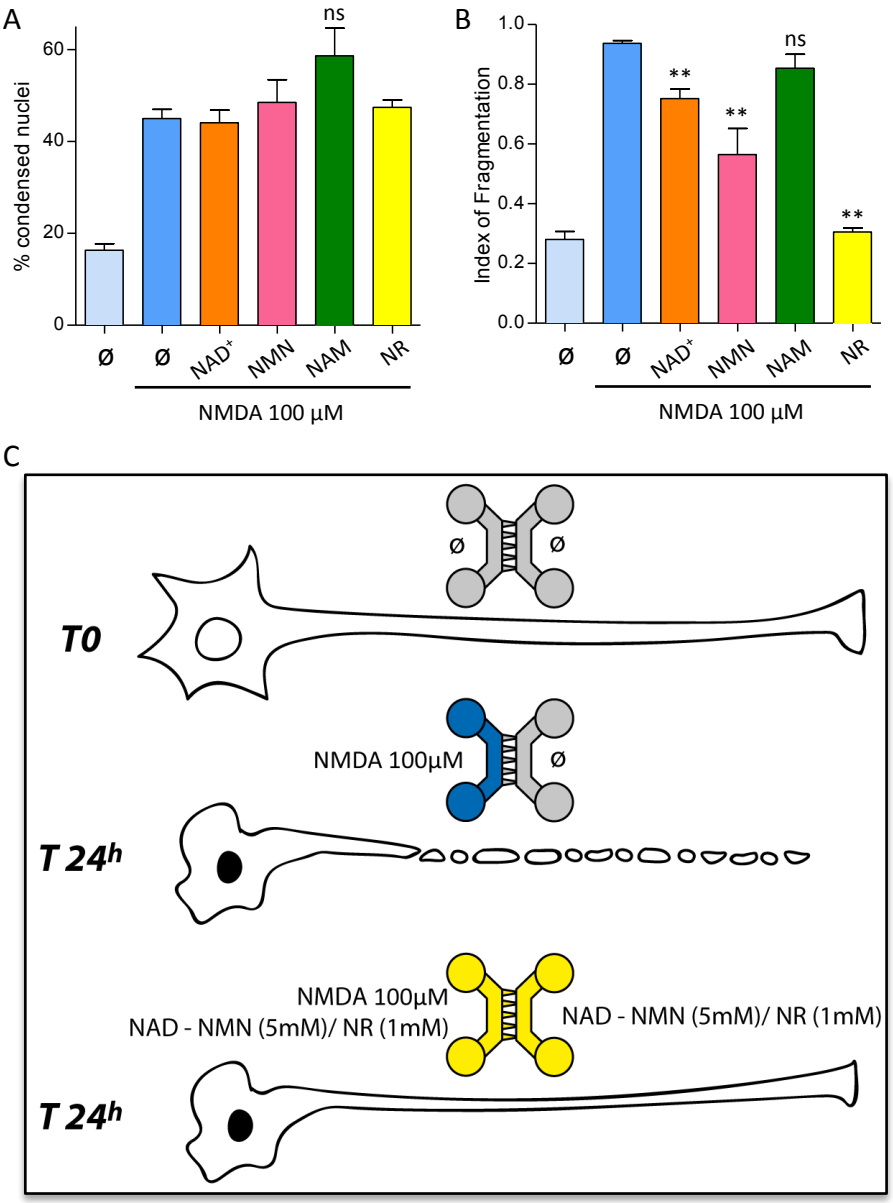


Figure 83 : Le NAD$^+$ et ses précurseurs ont des effets axo-protecteurs dans un modèle d'excitotoxicité *in vitro*. Les neurones sont co-traités avec du NMDA 100µM appliqué dans le compartiment somato-dendritique et les différents précurseurs du NAD$^+$ appliqués séparément dans les deux chambres au doses suivantes : NAD$^+$ 5mM/ NMN 5mM/ NAM 5mM/ NR 1mM. Aucune des molécules testées ne protège de la mort induite par le NMDA mais elles réduisent la dégénérescence axonale. (A) Quantification de la mort neuronale (n=3-6) ; (B) Quantification de la dégénérescence axonale (n=3-6), ** Pvalue<0,01 (par rapport à la condition NMDA) (C) Schéma représentant la mort neuronale et la dégénérescence axonale induite par le NMDA et l'effet protecteur localisé au niveau de l'axone du NAD$^+$, du NMN et du NR.

Afin de déterminer si les effets du NAD$^+$ et du NR préviennent ou seulement retardent la dégénérescence axonale comme cela avait été montré dans le SNP lors d'une axotomie (Sasaki et al., 2006), l'effet des deux molécules a été suivi au cours du temps (4/8/24/48/72h). Les neurones corticaux mis en culture dans les dispositifs microfluidiques ont été co-traités

avec du NMDA 100µM et du NAD^+ 5mM ou du NR 1mM. Ni le NAD^+ ni le NR ne protège contre la mort neuronale évaluée par la condensation des noyaux marqués au Hoechst 33342 et par l'immunomarquage du MAP2 (figure 84.A/C). Cependant, un effet protecteur est observé quant à la dégénérescence axonale induite par le NMDA : le NAD^+ et le NR semblent retarder la dégénérescence axonale jusqu'à 24h pour le NAD^+ et jusqu'à 48h pour le NR (Figure 84.B/C). Ce premier résultat suggère un effet purement axo-protecteur du NAD^+ et du NR, corroborant les observations effectuées par l'équipe de Milbrandt lors d'une axotomie dans le SNP (Araki et al., 2004; Sasaki et al., 2006).

Cependant, dans une précédente étude de stress excitotoxique induit par un co-traitement glutamate 30µM/Glycine 3µM pendant 24h sur des neurones corticaux, le pourcentage de noyaux condensés ainsi que le pourcentage de noyaux présentant des signes de fragmentation de l'ADN (marquage TUNEL) étaient significativement diminués lors d'un traitement avec du NAD^+ 15mM (Wang et al., 2014b). Nous avons effectué le traitement des neurones avec des doses moins élevées de NMDA et sur des cinétiques plus longues pour évaluer l'effet du NAD^+ et du NR dans des conditions moins aigües. Les données obtenues avec des doses de 1µM et 10µM pendant 72h de traitement confirme que ni le NAD^+ ni le NR ne sont protecteurs vis à vis de la mort neuronale (Figure 84.D/F).

De plus, les doses efficaces de NAD^+ utilisées dans la littérature pouvant atteindre 10 à 15mM, nous avons décidé d'évaluer plus précisément la différence d'efficacité du NAD^+ et du NR en appliquant différentes concentrations en co-traitement avec le NMDA 100µM. La dégénérescence axonale observée à 24h montre une protection maximale du NR pour une dose de 1mM (90%) tandis que la dose de NAD^+ de 15mM n'est pas suffisante pour arriver à la même protection (60% de protection) (Figure 84.E). De plus, le NAD^+ n'est pas significativement protecteur pour des doses inférieures à 5mM tandis que le NR est significativement protecteur dès 100µM.

Les résultats obtenus lors de ce travail confirme les effets protecteurs du NAD^+ et démontre pour la première fois un effet plus efficace du NR dans un modèle de neurodégénérescence *in vitro* dans le SNC.

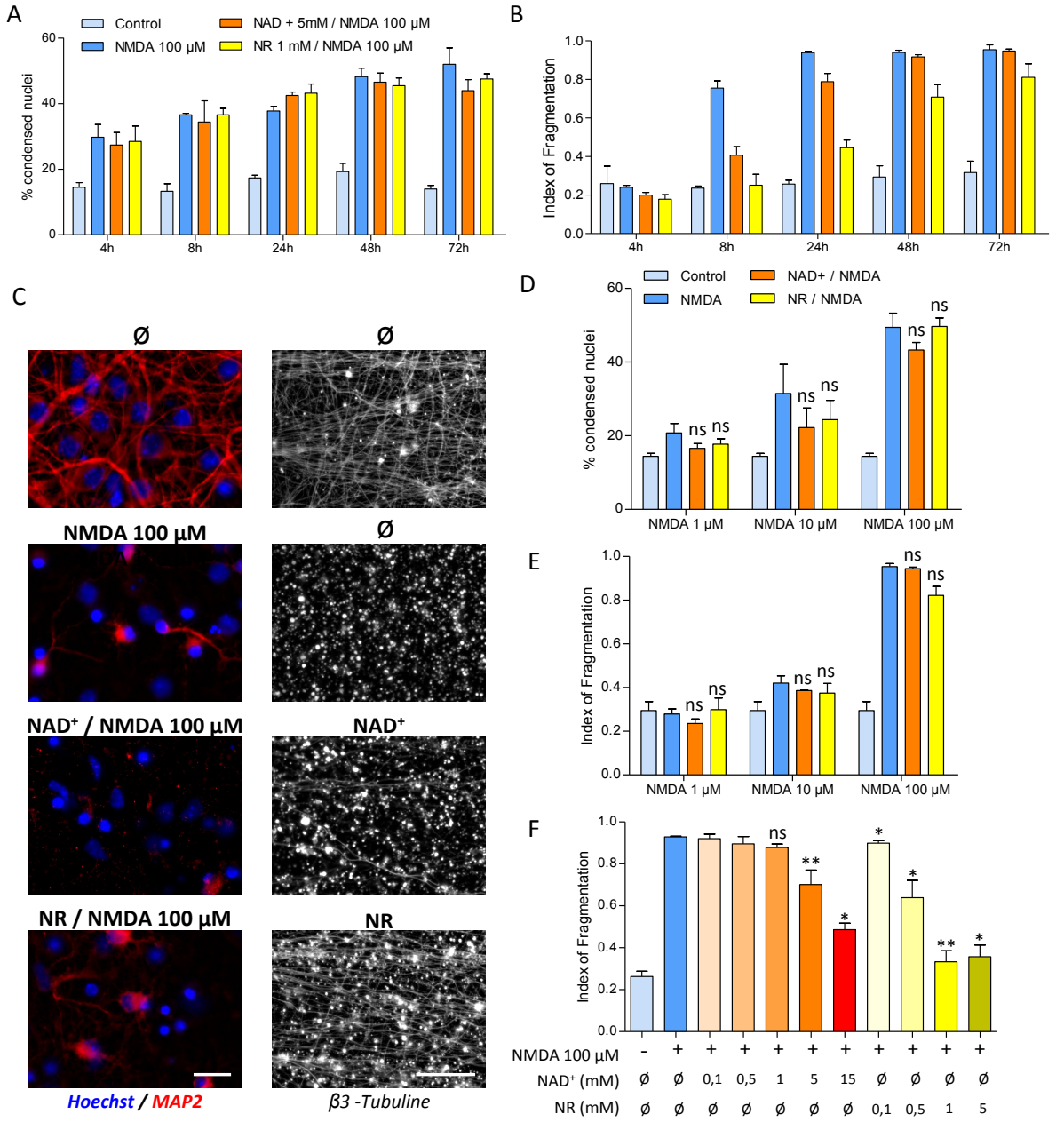


Figure 84 : le NR retarde la dégénérescence axonale induite par le NMDA de manière plus efficace que le NAD$^+$. (A-B) Effet du NAD$^+$ 5mM et du NR 1mM sur la mort neuronale et la dégénérescence axonale pour différentes durées de traitement au NMDA (4/8/24/48/72h) ; (A) Quantification de la mort neuronale ; (B) Quantification de la dégénérescence axonale (n=3). (C) Immunocytochimie sur des cellules traitées avec du NMDA et du NAD$^+$ ou du NR comme indiqué. Marquage MAP2 et Hoechst 33342 dans la chambre somato-dendritique (gauche). Marquage β_3-tubuline dans la chambre axonale (droite) (échelle : 20µm). (D-F) Aucun effet du NAD$^+$ et du NR observé après 72h de co-traitement avec trois doses de NMDA (1/10/100 µM) sur la mort neuronale et la dégénérescence axonale (n=3). (E) Quantification de la dégénérescence axonale sur des neurones co-traités avec du NMDA 100µM et différentes doses de NR (0,1/0,5/1/5 mM) et de NAD$^+$ (0,1/0,5/1/5/15 mM).

II.2. Etude comparée des effets du NAD^+ et du NR *in vivo*

Depuis le début de mon projet de thèse en 2013, plusieurs autres équipes ont étudié les effets du NR, confirmant son rôle dans l'extension de la durée de vie chez la levure (Mei and Brenner, 2015) et mettant en évidence des rôles protecteurs : dans un modèle *in vivo* chez la souris Alzheimer 3xTg-AD (Gong et al., 2013) et dans un modèle de perte auditive (Brown et al., 2014). Nous avons ainsi voulu valider nos résultats obtenus *in vitro* en testant et en comparant les effets du NAD^+ et du NR *in vivo*. Pour cela, nous avons mis en place un modèle *in vivo* mimant une ischémie cérébrale par l'induction d'un stress excitotoxique. Le métabolisme du NAD^+ a été démontré essentiel dans des modèles d'ischémie. Ainsi, l'enzyme Nampt permettant la métabolisation du NAM en NMN est nécessaire pour limiter le volume des lésions induites dans un des ces modèles (Zhang et al., 2010). De plus, l'administration de NAM en intra-péritonéale entraine une diminution des lésions induites par occlusion artérielle dans le cerveau (Liu et al., 2009a) et l'administration intra-nasale de NAD^+ chez des rats soumis à une ischémie cérébrale focale diminue le volume des lésions observées (Ying, 2007). Aucune donnée n'existe sur les effets du NR dans des modèles *in vivo* d'excitotoxicité.

Nous avons initié une collaboration avec le Pr. Denis Vivien, directeur du laboratoire de recherche SP2U au centre Cycéron à Caen et spécialiste des modèles d'ischémie et d'accidents vasculaires cérébraux (AVC), et avec le Dr. Cyrille Orset, chercheur au laboratoire SP2U et co-fondateur d'une plateforme spécialisée dans les modèles expérimentaux d'AVC (ESRP pour *Experimental Stroke Research Platform*). Un des modèles expérimentaux maitrisé par la plateforme ESRP est l'étude de lésions cérébrales par IRM après injection de NMDA intra-structure (Jullienne et al., 2011). Ce modèle semble particulièrement pertinent pour répondre à la problématique de mon projet de thèse car il permet de faire le parallèle direct avec les effets observés *in vitro* dans les dispositifs microfluidiques.

Comme indiqué dans la partie Matériels & Méthodes, l'injection bilatérale de 5nmol de NMDA ou de 5nmol de NMDA et 50nmol de NR ou NAD^+ a été réalisée sur 20 souris. Les lésions induites par l'injection de NMDA ont été observées par IRM 48h après traitement. Les résultats indiqués figure 85 montrent la différence de volume des lésions observées après injection de NMDA ou lors d'une co-injection de NMDA/NR ou de NMDA/NAD^+. Le volume moyen des lésions après injection de NMDA est de 1,04mm^3 tandis que le volume moyen observé après traitement au NAD^+ est de 1mm^3 et celui après traitement au

NR est de 0,55mm^3. Le NR permet une diminution des lésions de 47% tandis que le NAD$^+$ ne semble pas influer sur le volume des lésions (moins de 5% de différence sur le volume des lésions observés). Ainsi, le NAD$^+$ ne semble par conférer de protection significative tandis que le NR permet une diminution de moitié des lésions induites par le NMDA. Ces résultats confirment l'efficacité de protection plus importante du NR par rapport au NAD$^+$.

Ces résultats suggèrent pour la première fois un effet protecteur du NR dans un modèle d'ischémie *in vivo*.

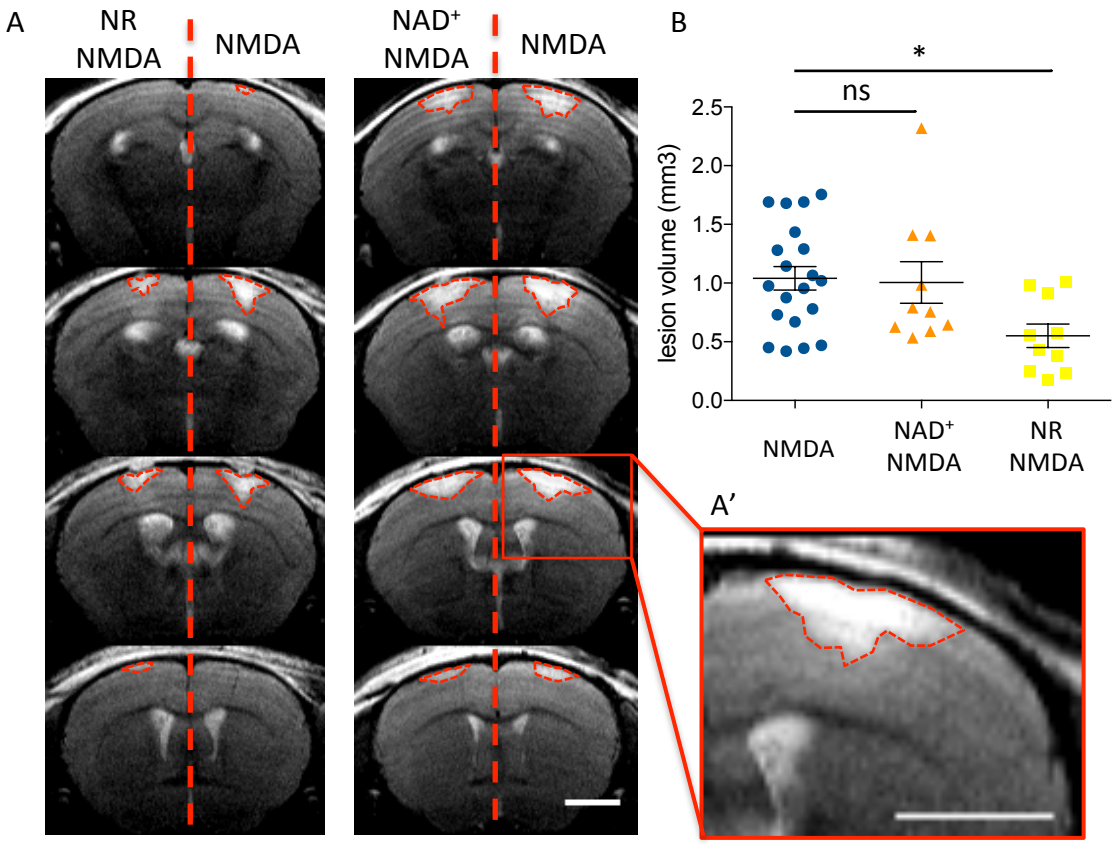


Figure 85 : L'administration de NR intra-corticale diminue le volume des lésions induites par injection de NMDA. (A) Images obtenues par IRM des cerveaux de deux souris injectées avec 5nmol de NMDA dans l'hémisphère gauche et 5nmol de NMDA + 50nmol de NAD$^+$ ou de NR dans l'hémisphère droit (les hémisphères sont inversés dans les images IRM). (A') Zoom sur la lésion induite par l'injection de NMDA intra-corticale, délimitées par les pointillés rouges. (B) Volume des lésions mesuré pour chaque acquisition par IRM. La comparaison est effectuée entre les 20 lésions effectuées avec du NMDA seul et les 10 lésions effectuées avec du NMDA et du NAD$^+$ ou avec du NMDA et du NR (n=10-20 ; *pvalue<0,05 ; échelle=2mm).

II.3. Effet local du NAD$^+$ et du NR sur des neurones traités au NMDA

Lors du stress excitotoxique *in vitro* induit par l'application de NMDA sur des neurones corticaux mis en culture dans les puces microfluidiques, on constate un effet majeur du NAD$^+$ et du NR sur la dégénérescence axonale. Cela soulève des interrogations sur la compartimentalisation des effets : cet effet est-il localisé au niveau axonal ? Le compartiment somato-dendritique est-il nécessaire à cet effet ?

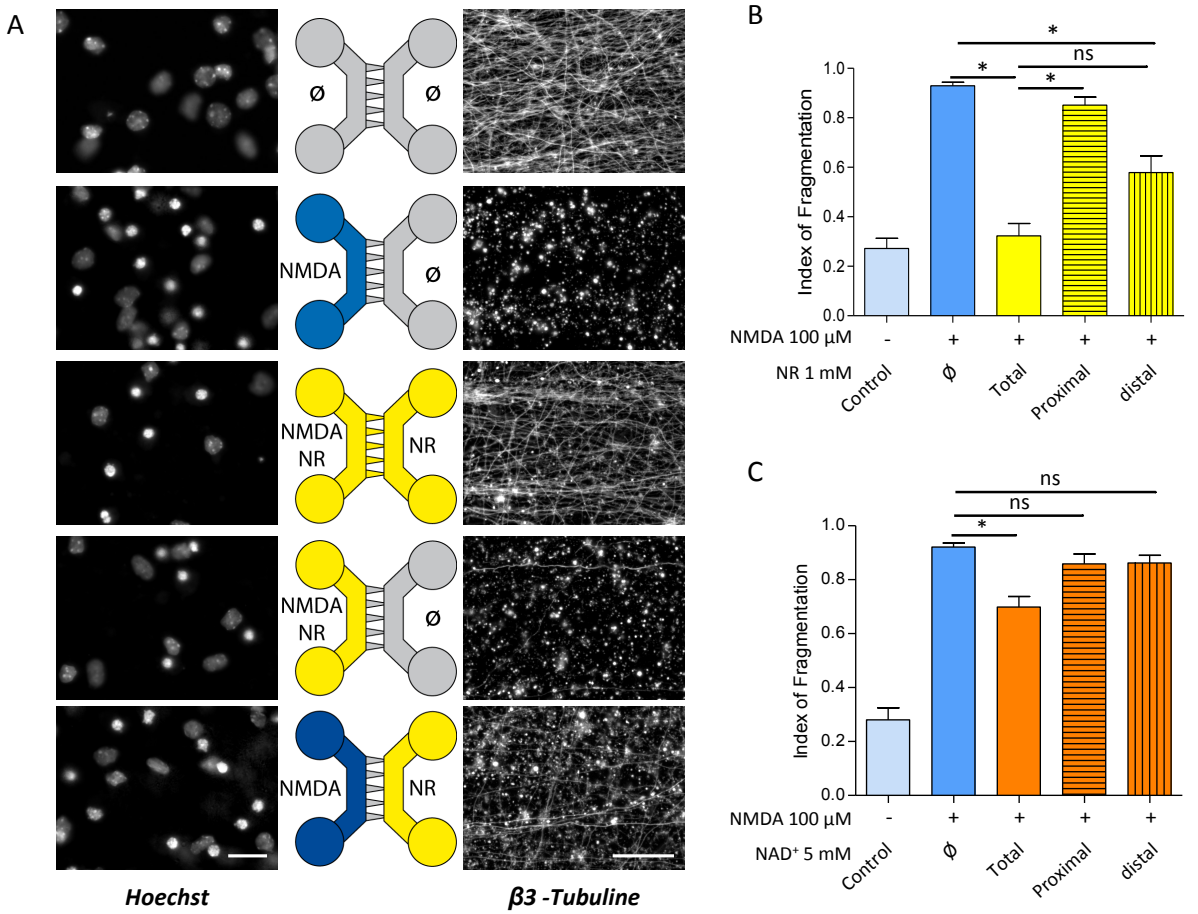


Figure 86 : Effet protecteur local du NR, mais pas du NAD$^+$, au niveau de l'axone. (A) Immunocytochimie des cellules traitées avec du NMDA 100µM et du NR 1mM comme indiqué sur les vignettes. Marquage Hoechst 33342 dans le compartiment somato-dendritique (gauche). Marquage β_3-Tubuline dans le compartiment axonal (droite) (échelle=20µm). (B) Quantification de la dégénérescence axonale lors d'un co-traitement avec du NMDA proximal et du NR appliqué dans les deux chambres, seulement dans la chambre proximale ou seulement dans la chambre distale (n=4). (C) Quantification de la dégénérescence axonale lors d'un co-traitement avec du NMDA proximal et du NAD$^+$ appliqué dans les deux chambres, seulement dans la chambre proximale ou seulement dans la chambre distale (n=3-4).

Afin d'approfondir ces notions, nous avons traité de manière indépendante la chambre proximale et la chambre distale. Ainsi, nous avons appliqué le NAD$^+$ et le NR, soit uniquement sur les somas et les dendrites, soit uniquement sur les axones. Comme indiqué dans la partie Matériels & Méthodes, la chambre centrale permet une meilleure isolation fluidique grâce à la mise en place d'une surpression. Les résultats obtenus avec une dose de NR 1mM en co-traitement avec du NMDA 100µM indiquent que le NR reste axo-protecteur lorsqu'il est appliqué uniquement au niveau des axones (50% de protection). L'effet du NR est minime lorsqu'il est appliqué uniquement sur les somas et dendrites (12%) mais est optimal lorsqu'il est appliqué dans les deux compartiments (90% de protection). Lorsque le NAD$^+$ est appliqué uniquement sur les somas et dendrites ou uniquement sur les axones, l'effet axo-protecteur n'est plus significatif. De même que pour le NR, l'effet est optimal lors d'une application du NAD$^+$ sur les deux compartiments (35% de protection). Ces

résultats suggèrent un effet localisé du NR au niveau des axones et vraisemblablement une métabolisation locale du NR mais ne permettent pas de conclure quant à la localisation subcellulaire de la métabolisation du NAD^+. Il est important de noter que les effets du NAD^+ et du NR sont maximaux quand les molécules sont appliquées sur les deux compartiments. Un signal venant du soma et impliqué dans la dégénérescence des axones n'est pas à exclure. Plusieurs interrogations émergent de ce résultat à propos de la métabolisation intracellulaire du NR et du NAD^+.

III. Métabolisme intracellulaire du NR

Les premiers résultats obtenus au cours de ce travail suggèrent un effet axo-protecteur du NR local, plus efficace que celui du NAD^+. Les effets observés peuvent-ils s'expliquer par une conversion du NR en NAD^+ intracellulaire ou sont-ils dus à des effets propres du NR ? Pour répondre à ces interrogations, nous nous sommes intéressés à la métabolisation intracellulaire du NR.

III.1. Rôle des transporteurs de nucléosides (NTs) dans l'effet protecteur du NR

La première question qui se pose est de savoir si l'effet axo-protecteur du NR nécessite que celui-ci pénètre dans le neurone. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, plusieurs transporteurs aux nucléosides (NTs pour Nucleoside Transporteurs) seraient susceptibles de réguler l'entrée du NR. Le dipyridamole est un agent pharmacologique susceptible d'inhiber le transporteur ENT1 et dans une moindre mesure le transporteur ENT2 (Kiss et al., 2000; Ward et al., 2000). Il a ainsi été utilisé pour bloquer les effets protecteurs du NR dans des lignées cellulaires (Nikiforov et al., 2011) et dans le SNP (Di Stefano et al., 2014). Nous avons donc voulu étudier cette voie d'entrée du NR dans notre modèle. Pour cela, nous avons en premier lieu analysé la présence de NTs dans les neurones corticaux en culture. Pour rappel, deux types de NTs ont été décrits : les NTs équilibratifs (ENTs), dont il existe 4 isoformes, et les NTs concentratifs (CNTs), dont il existe 3 isoformes. La quantification des ARNm pour chacune de ces isoformes a été réalisée à partir de neurones corticaux mis en culture en puits pendant 11 JIV. La Figure 87.B montre que les transcrits codant les isoformes ENT1/ ENT2/ ENT3 et ENT4 sont exprimés en condition basale dans des neurones corticaux. Les ARNm codant les isoformes CNT2 et CNT3 ne semblent pas présents et celui codant l'isoforme CNT1 est très faiblement exprimé (données non présentées). L'expérience suivante mise en place pour examiner l'entrée du NR dans la cellule a été d'utiliser l'inhibiteur dipyridamole dans notre modèle et d'étudier l'effet du NR dans cette condition. Pour cela, le co-traitement des neurones avec du NR 1mM, du NMDA 100µM et du dipyridamole 50µM a été effectué puis analysé 24h post-traitement. Nous montrons que l'effet axo-protecteur du NR est bloqué par le dipyridamole : l'effet protecteur d'environ 90% avec le NR seul est ramené à 20% lors de l'inhibition des NTs ENT1 et ENT2

(Figure 87.C). Le NR pénètre donc majoritairement dans le neurone *via* des NTs sensibles au dipyridamole.

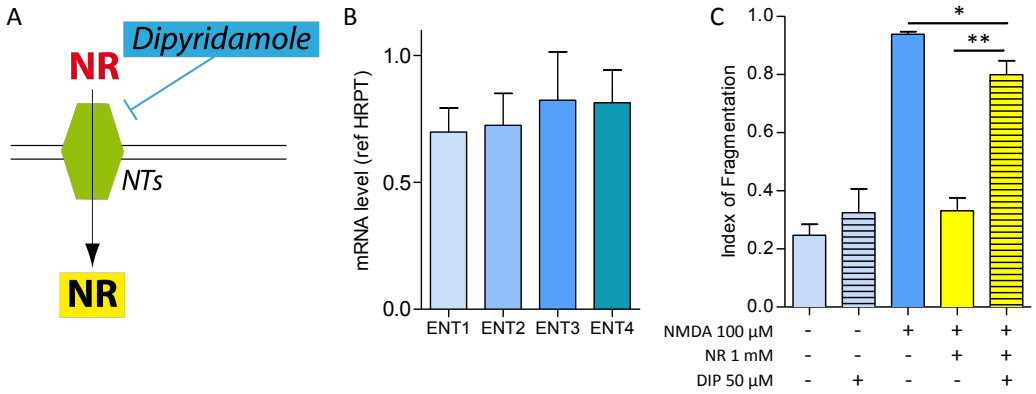


Figure 87 : Le NR pénètre dans la cellule *via* des NTs sensibles au dipyridamole. (A) Schéma représentant l'entrée du NR *via* des NTs inhibés par le dipyridamole. (B) Niveau d'expression des différentes isoformes des ENTs obtenu par PCRq (n=3). (C) Quantification de la dégénérescence axonale observé sur des neurones co-traités au NMDA 100µM, NR 1mM et dipyridamole 50µM pendant 24h, comme indiqué sur le graphique (n=3).

III.2. Analyse de la présence des isoformes de Nrk dans des tissus et dans des neurones corticaux en culture

Le NR est-il métabolisé en NAD^+ dans le compartiment intracellulaire ? La métabolisation du NR, décrite par l'équipe de C. Brenner, s'effectue en deux étapes : 1) conversion en NMN *via* l'activité des kinases Nrk1 et/ou Nrk2 puis 2) conversion en NAD^+ *via* l'activité de l'enzyme Nmnat.

III.2.a. En condition physiologique normale

Très peu de données existent sur la présence des kinases Nrk1 et 2 dans le cerveau. En 2012, Cantó *et al.* ont mesuré la présence des ARN messagers codant Nrk1 et Nrk2 dans différents tissus murins. Leurs résultats semblent indiquer une expression du transcrit *Nrk1* dans le cerveau mais peu, voire pas, d'expression du transcrit *Nrk2*. Cependant, l'analyse effectuée par Cantó *et al.* est réalisée à partir d'un lysat total de cerveau, ce qui peut parfois diluer la concentration des transcrits. De plus, Sasaki *et al.* ont observé une induction du transcrit *Nrk2* après axotomie du nerf sciatique dans le SNP (Sasaki et al., 2006). Afin de vérifier et d'affiner ces différents résultats, nous avons voulu évaluer la présence des transcrits codant ces deux kinases dans plusieurs tissus prélevés sur des souris : cortex, hippocampe, cervelet, cœur, foie, muscles. Les résultats obtenus par PCRq sont présentés Figure 88.B/C. De manière cohérente avec ce qui avait déjà été décrit, nous constatons que le messager *Nrk1* est constitutivement exprimé dans tous les tissus analysés, en particulier, ce messager semble

très présent dans le foie. Le messager *Nrk2* est présent dans le cœur, le foie et les muscles squelettiques mais il ne semble pas détectable dans les régions cérébrales testées (cortex, hippocampe, cervelet). Ces données suggèrent que le NR serait converti en NMN par la kinase Nrk1 dans le milieu intracellulaire.

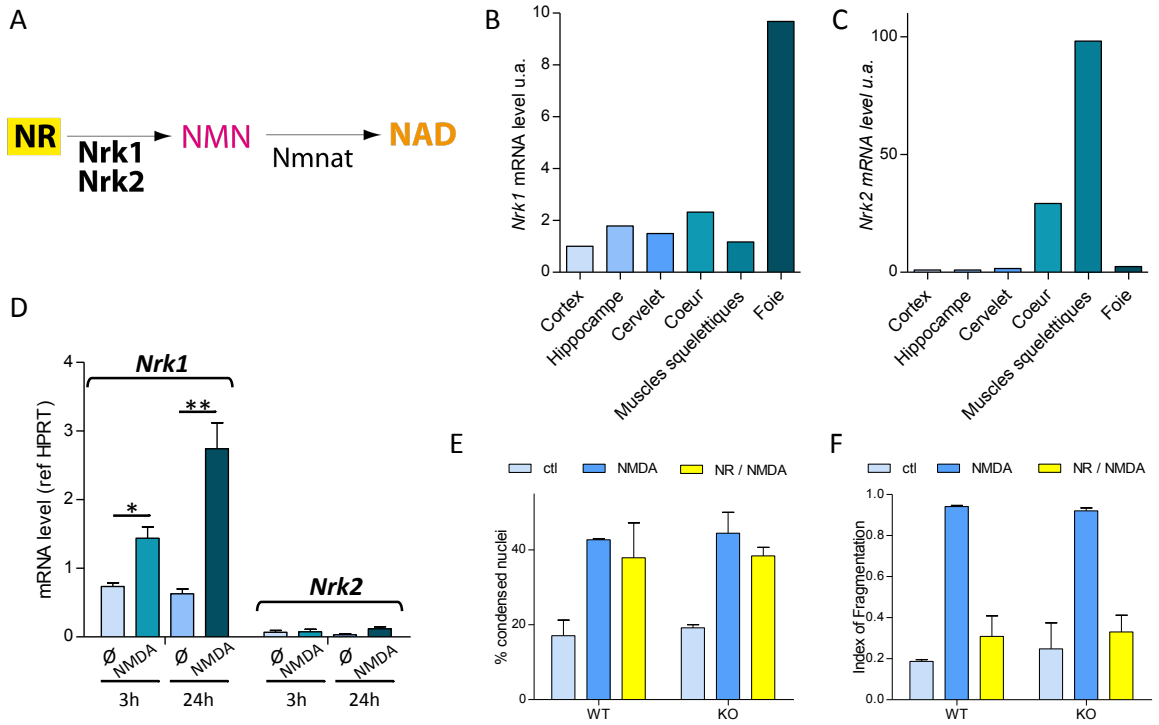


Figure 88 : L'axo-protection induite par le NR lors d'un stress excitotoxique est attribuable à l'activité de l'enzyme Nrk1. (A) Schéma représentant la métabolisation intracellulaire du NR en NAD^+ *via* sa conversion en NMN par les kinases Nrk1 et Nrk2. (B-C) Niveaux d'expression des ARN messagers *Nrk1* (B) et *Nrk2* (C) dans différents tissus murins. (D) Niveaux d'expression des messagers *Nrk1* et *Nrk2* dans des neurones corticaux soumis à un stress excitotoxique pendant 3h ou 24h (n=2). (E-F) Effet du NR dans les souris KO *Nrk2* comparées aux souris WT : (E) Quantification de la mort neuronale ; (F) Quantification de la dégénérescence des axones (n=2).

III.2.b. Lors d'un stress excitotoxique

Cependant, on ne peut exclure une induction du messager *Nrk2* lors d'une situation non physiologique, comme le suggère le résultat obtenu par l'équipe de Milbrandt en 2006 après axotomie du nerf sciatique dans le SNP (Sasaki et al., 2006). Nous avons donc voulu évaluer la présence des messagers *Nrk1* et *Nrk2* dans notre modèle de stress excitotoxique. Les données obtenues par PCRq sont présentées Figure 88.D/F. Le traitement des neurones avec du NMDA 100µM pendant 24h ne semble pas induire l'expression du messager *Nrk2* mais augmente l'expression du messager *Nrk1*. De plus, nous avons pu avoir accès à des souris KO *Nrk2*, en collaboration avec l'équipe de M. Mericksay et Z. Li (équipe « Génétique et physiopathologie des tissus musculaires », UMR 8256). L'effet du NR lors d'un stress excitotoxique dans des neurones corticaux de souris KO *Nrk2* reste le même comme indiqué

Figure 88.E/F. Ceci confirme que le messager *Nrk2* n'est pas nécessaire à l'effet protecteur du NR et suggère l'implication de Nrk1 dans la conversion du NR en NAD^+, conclusion se trouvant renforcée par le fait que le messager *Nrk1* est induit dans notre modèle de stress excitotoxique.

III.3. Effet de l'excitotoxicité et de l'apport exogène de NR sur les taux intracellulaires en NAD^+

Les résultats précédents, suggérant la conversion du NR en NMN, soulèvent la question de la modulation des niveaux intracellulaires en NAD^+ dans notre modèle et de l'effet de l'apport exogène de NR. Comme nous l'avons mentionné au cours de l'introduction, plusieurs études ont mis en évidence une déplétion en NAD^+ intracellulaire dans des conditions d'excitotoxicité *in vitro* et *in vivo* (Kim et al., 2011a; Liu et al., 2008, 2009a). Afin de confronter ces résultats à notre modèle, nous avons effectué le dosage du NAD^+ intracellulaire à partir de cultures de neurones corticaux en plaques. Les résultats indiqués Figure 89.A montrent que le stress excitotoxique induit par le NMDA 100µM pendant 24h entraîne une diminution des niveaux de NAD^+ de 36%. Nous avons ensuite montré que le traitement des neurones avec du NR 1mM restaure les niveaux intracellulaires en NAD^+ à leur état initial. La présence de l'enzyme Nmnat, permettant la conversion du NMN en NAD^+, a déjà été décrite chez les mammifères (Berger et al., 2005; Koch-Nolte et al., 2011). On peut donc en conclure que l'apport de NR dans le milieu de culture des neurones corticaux entraine sa métabolisation en NMN par Nrk1 puis conduit à l'augmentation des taux intracellulaires en NAD^+, permettant ainsi le maintien de ces taux dans notre modèle de stress excitotoxique.

La conversion intracellulaire du NR en NAD^+ suggère que l'effet axo-protecteur du NR est lié à une augmentation des taux intracellulaires de NAD^+.

Ces résultats permettent de décrire le métabolisme du NR dans notre modèle d'excitotoxicité. Comme présenté Figure 89.B, le NR pénètre dans le neurone via des NTs sensibles au dipyridamole. Il est ensuite converti en NMN par la kinase Nrk1. Finalement, l'augmentation des niveaux intracellulaires en NAD^+ après traitement des neurones avec le NR suggère que cette molécule constitue un précurseur efficace capable de maintenir les taux en NAD^+ dans des cellules soumises à un stress excitotoxique.

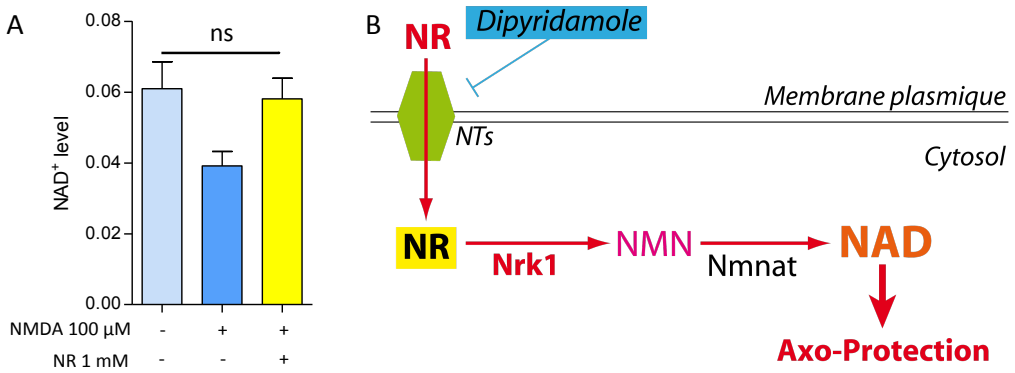


Figure 89 : Le traitement des neurones avec le NR induit une réplétion des niveaux intracellulaires en NAD$^+$ lors d'un stress excitotoxique. (A) Dosage du NAD$^+$ intracellulaire effectué sur des neurones traités ou non avec du NMDA 100µM et du NR 1mM pendant 24h. (B) Schéma représentant le métabolisme du NR lors de son application sur des neurones soumis à un stress excitotoxique.

Les résultats obtenus dans la première partie de mon projet de thèse mettent en avant l'effet protecteur du NR dans un système de neurodégénérescence dans le SNC. Le modèle utilisé met en jeu des mécanismes de mort neuronale complexes non protégés par les molécules impliquées dans le métabolisme du NAD$^+$. Cependant, ce modèle dévoile des effets localisés du NAD$^+$ et du NR, capables de protéger spécifiquement de la dégénérescence axonale, et suggère que le maintien de l'intégrité axonale, du moins dans ce modèle, dépend des taux de NAD$^+$ axoplasmique.

IV. Etude comparée des effets du NAD^+ et du NR dans un modèle de dégénérescence axonale induite par une chute des taux en NAD^+

Afin d'approfondir la compréhension du mécanisme de protection du NAD^+ et du NR et d'étudier de manière plus précise le lien entre métabolisme du NAD^+ et intégrité du neurone, nous avons mis au point un second modèle de neurodégénérescence, uniquement associé à une déplétion de la cellule en NAD^+. En effet, en 2015, l'équipe de Milbrandt a montré dans un modèle d'axotomie que la dégénérescence de l'axone dépendait des niveaux intracellulaires en NAD^+ (Gerdts et al., 2015). Ainsi, la diminution des taux de NAD^+ induite par l'activation de Sarm-1 lors de l'axotomie provoque une dégénérescence de l'axone qui peut être prévenue par l'apport de NAD^+ dans le milieu de culture. Nous avons ainsi utilisé un modèle basé sur le traitement des neurones corticaux avec le FK866 qui par l'inhibition de l'enzyme Nampt, convertissant le NAM en NMN, induit une forte déplétion en NAD^+ et peut nuire à l'intégrité cellulaire (Bi et al., 2012; Grozio et al., 2013). Cet inhibiteur a fait l'objet de nombreuses études majoritairement dans le cadre de traitement en oncologie mais également dans l'exploration des effets du métabolisme du NAD^+ dans des modèles *in vitro*. Le traitement des neurones corticaux par le FK866 constitue donc un second modèle de neurodégénérescence induit par un seul facteur : le blocage de la biosynthèse du NAD^+ à partir du NAM.

IV.1. Mise au point du modèle et caractérisation des effets du FK866

Le traitement des neurones corticaux en puces microfluidiques avec du FK866 a été effectué pendant 24, 48 ou 72h. Nous avons effectué le dosage du NAD^+ intracellulaire pour les trois durées de traitement (Figure 90). On constate une diminution des taux de NAD^+ qui s'accentue au cours du temps et atteint 95% après 72h de traitement. L'analyse du pourcentage de noyaux condensés et la mesure de l'index de fragmentation ont également été réalisées en suivant la même cinétique, ce qui nous a permis de corréler la déplétion en NAD^+ avec la neurodégénérescence. Le traitement des neurones par le FK866 10µM induit une forte dégénérescence axonale et une mort neuronale à 72h : le pourcentage de noyaux condensés augmente ainsi de 10% en condition contrôle à 60% après 72h de traitement ; de même, l'index de fragmentation passe de 0,25 à 0,8 (Figure 90.C/D). D'un point de vue temporel, il

est intéressant de noter que la déplétion en NAD^+ est déjà très importante à 24h alors que les effets sur l'intégrité neuronale ne sont visibles qu'à partir de 48h. Comme attendu, il semble donc que la chute des taux de NAD^+ précède la neurodégénérescence. Ce résultat confirme que le modèle mis au point correspond bien à une dégénérescence du neurone induite par la diminution des niveaux intracellulaires en NAD^+.

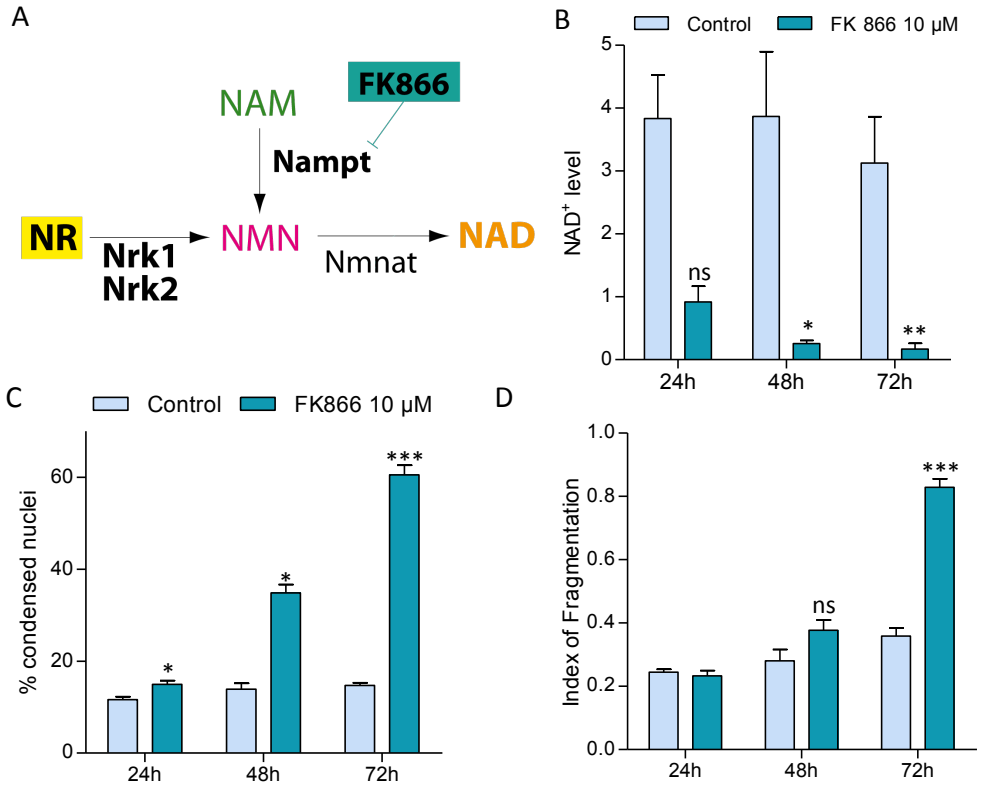


Figure 90 : L'inhibition de Nampt par le FK866 induit une mort neuronale et une dégénérescence axonale associées à une diminution des niveaux intracellulaires en NAD^+. (A) Schéma représentant le métabolisme du NAD^+, en particulier l'inhibition par le FK866 de la conversion du NAM et NMN par l'enzyme Nampt. (B) Dosage du NAD^+ intracellulaire après traitement des neurones avec 10µM de FK866 pendant 24, 48 et 72h (n= 3-5, *pvalue<0,05 ; **pvalue<0,001) ; (C) Quantification de la mort neuronale induite par l'application de FK866 10µM ; (D) Quantification de la dégénérescence axonale induite par l'application de FK866 10µM (n=4).

IV.2. Caractérisation des effets du NAD^+ et du NR lors d'une déplétion aigüe en NAD^+

IV.2.a. Effets comparés du NAD^+ et de ses précurseurs

Les effets des précurseurs de la voie de biosynthèse du NAD^+ ont été étudiés dans ce système. Des tests ont été effectués en amont afin de trouver la dose minimale efficace des précurseurs (données non présentées). Les résultats obtenus ont montré que des doses de 50µM pour le NAD^+, le NAM, le NMN, le NR étaient suffisantes pour protéger de la neurodégénérescence induite par le FK866 10µM. De manière surprenante, les effets

protecteurs observés diffèrent par rapport à ceux décrits lors du stress excitotoxique. En effet, dans ce second modèle, le NAD^+, le NMN et le NR protègent à la fois de la mort neuronale et de la dégénérescence des axones (Figure 91.A/B). La protection observée est comprise entre 90% et 100% et il n'y a pas de différence d'efficacité entre les 3 molécules. Il convient de noter que l'effet du NAM est quant à lui non significatif. Une protection d'environ 50% vis à vis de la condensation nucléaire et de la dégénérescence axonale est néanmoins observée. Ce résultat peut s'expliquer puisque le FK866 bloque l'enzyme permettant la synthèse de NMN, et donc de NAD^+, à partir du NAM. Le NAM, appliqué de manière exogène sur les neurones, n'est ainsi pas capable de lutter contre la diminution des taux intracellulaires en NAD^+ et donc contre la neurodégénérescence induite par le FK866.

Au contraire, l'efficacité quasi totale du NAD^+, du NMN et du NR suggère une métabolisation extrêmement efficace de ces molécules dans ce paradigme, en comparaison à leur effet décrit lors d'un stress excitotoxique et présenté dans la première partie des résultats.

Ces différences d'efficacité entre les deux modèles testés se résument pas ces trois observations :

1) le NAD^+ et ses précurseurs préviennent de la mort neuronale et de la dégénérescence des axones lors d'une déplétion totale en NAD^+ mais seulement de la dégénérescence des axones en excitotoxicité;

2) les doses efficaces pour observer un effet protecteur diffèrent d'un facteur 100 (5mM dans le modèle de stress excitotoxique contre 50µM lors d'une déplétion totale en NAD^+) ;

3) le NAD^+, tout comme le NMN, est aussi efficace que le NR lors d'une déplétion totale en NAD^+.

Le premier point peut être relié à la différence des mécanismes de neurodégénérescence mis en jeu dans les deux modèles. Comme nous l'avons discuté auparavant, le stress excitotoxique induit par le NMDA provoque des dommages sur la cellule associés à divers paramètres tels qu'une dérégulation calcique, des dysfonctions mitochondriales, l'apparition du stress oxydant, l'activation de protéines kinases et la modulation des niveaux en NAD^+. Cette mort multifactorielle ne semble pas être sauvée par les molécules du métabolisme du NAD^+. Au contraire, le paradigme de neurodégénérescence induit par le FK866 est uniquement dépendant de la déplétion en NAD^+. Dans ce cadre, l'apport de NAD^+ ou de NR cible directement les causes de la dégénérescence et peut prévenir de la mort neuronale. Cependant, ces considérations ne permettent pas d'expliquer pourquoi les doses utilisées sont beaucoup plus faibles et pourquoi le NAD^+ est aussi efficace que le NR. En effet, ces

observations suggèrent plutôt une adaptation particulière du métabolisme du NAD^+ dans le paradigme de déplétion totale en NAD^+ comparé au modèle d'excitotoxicité. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette adaptation : l'expression des enzymes de la voie de biosynthèse du NAD^+ est-elle régulée lors de la neurodégénérescence induite par le FK866 ? La métabolisation extracellulaire de ces molécules dépend-elle du paradigme neurotoxique ?

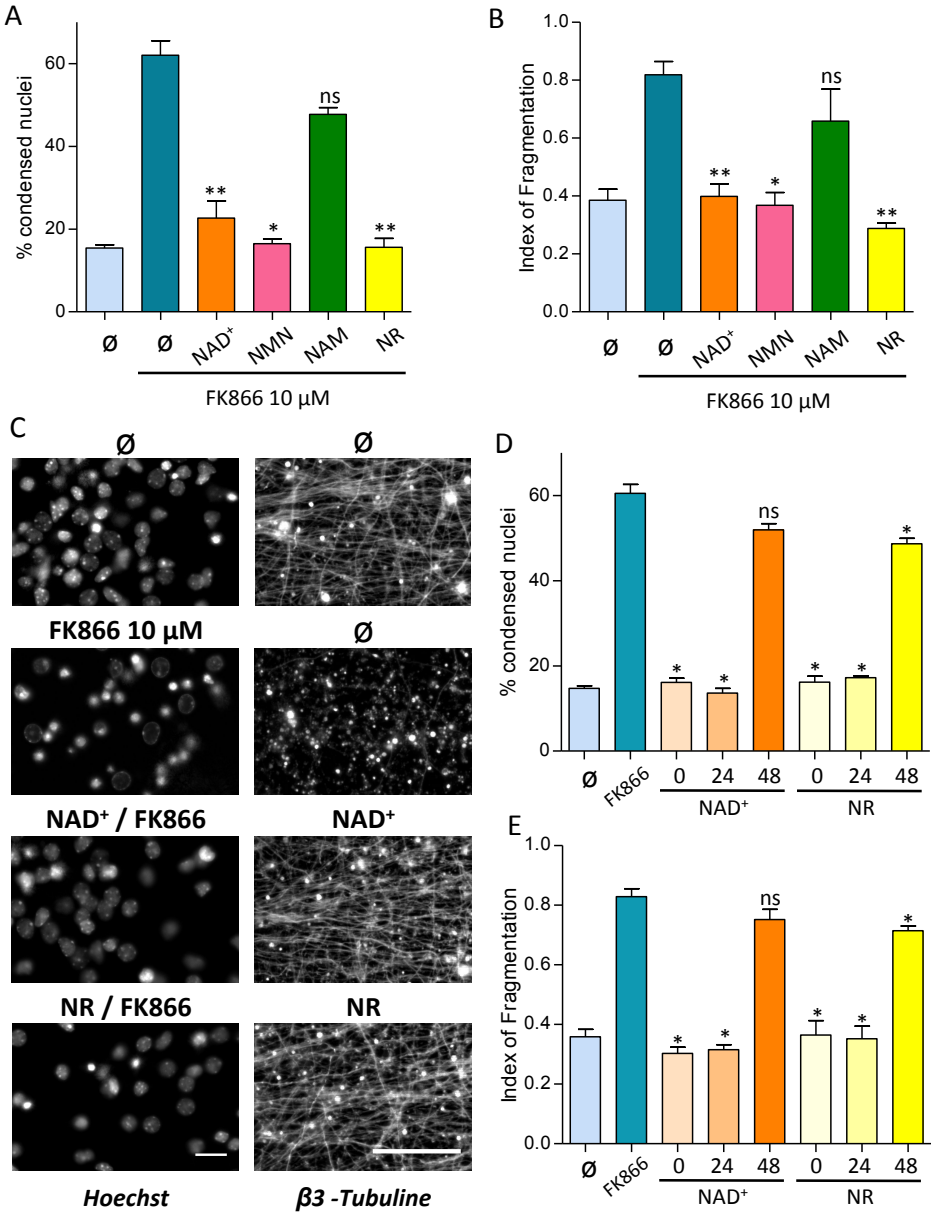


Figure 91 : Effet du NAD^+ et de ses précurseurs lors d'une déplétion en NAD^+ induite par l'inhibition de Nampt par le FK866. Le traitement des neurones avec 50µM de NAD^+, de NMN ou de NR protège totalement de la neurodégénérescence induite par l'application de FK866 pendant 72h. (A) Quantification de la mort neuronale ; (B) Quantification de la dégénérescence axonale (n=3-7, *pvalue<0,05 ; **pvalue<0,001). (C) Immunocytochimie de cellules traitées avec du FK866 10µM, du NAD^+ ou du NR 50µM, comme indiqué, pendant 72h. Marquage Hoechst dans le compartiment somato-dendritique (gauche). Marquage β_3-Tubuline dans le compartiment axonal (droite) (échelle=20µm). (D-E) Effet du NAD^+ et du NR lors d'un co-traitement avec du FK866, 24h post-traitement ou 48h post-traitement. (D) Quantification de la mort neuronale ; (E) Quantification de la dégénérescence axonale (n=3).

IV.2.a. Effets neuroprotecteurs du NAD^+ et du NR post-traitement

Avant de s'intéresser à ces questions, il est important de noter que la cinétique de dégénérescence mise en jeu dans ce modèle est beaucoup plus longue que dans le modèle d'excitotoxicité. Nous avons vu dans la caractérisation du modèle que la déplétion en NAD^+ survenait précocement par rapport à la neurodégénérescence. Nous avons voulu tester l'application du NAD^+ et du NR 24h et 48h post-traitement afin de mettre en évidence un potentiel effet de ces molécules alors que la diminution du NAD^+ dans le neurone est déjà significative. Les résultats présentés Figure 91.D/E montrent que la protection induite par une application du NAD^+ ou du NR 24h post-traitement reste maximale. Cependant, si l'application est effectuée 48h après le traitement au FK866, on perd environ 80% de la protection induite par le NAD^+ et le NR. Ceci suggère une fenêtre d'intervention comprise entre 24h et 48h pour sauver les neurones de la dégénérescence induite par la diminution brutale des taux de NAD^+. Ce résultat est particulièrement intéressant dans le cadre de stratégies thérapeutiques puisqu'il permettrait de mettre en place un traitement qui bloque totalement la neurodégénérescence alors que la diminution des taux de NAD^+ est déjà détectable.

IV.3. Implication des kinases Nrk dans la métabolisation intracellulaire du NR lors d'une déplétion aigüe en NAD^+

Ces résultats obtenus à partir d'un modèle de déplétion des taux de NAD^+ suggèrent fortement que les effets comparés du NAD^+ et du NR dépendent du paradigme neurodégénératif. Nous nous sommes donc intéressés à la voie de métabolisation du NR afin de déceler une potentielle régulation de cette voie dans le modèle FK866.

Nous avons ainsi étudié la présence des enzymes Nrk1 et Nrk2 lors d'une déplétion aigüe en NAD^+. Des neurones corticaux, mis en culture dans des puits, ont été traités avec du FK866 pendant 24, 48 et 72h. L'analyse des deux messagers codant Nrk1 et Nrk2 a été réalisée par PCRq. Contrairement aux résultats obtenus après traitement au NMDA, une induction du messager *Nrk2* est observée après 72h de traitement au FK866 (augmentation de 3,7x). En ce qui concerne les niveaux de l'ARNm *Nrk1*, on retrouve une induction du messager dès 24h de traitement au FK866 (augmentation de 1,6x), ce qui corrobore les résultats obtenus dans notre modèle d'excitotoxicité. Après 72h de traitement, les niveaux du messager ont augmenté (augmentation de 3,6x) mais il n'y a plus de différence observée entre

la condition contrôle et le traitement au FK866 (Figure 92.A/B). L'induction du messager *Nrk2* est extrêmement intéressante et rejoint le résultat obtenu par l'équipe de Milbrandt en 2006, qui avait montré une induction de ce messager après axotomie du nerf sciatique (Sasaki et al., 2006). Cette induction influe-t-elle sur la neuroprotection conférée par le NAD^+ et le NR ? Le traitement des neurones corticaux mis en culture dans des dispositifs microfluidiques et co-traités avec du FK866 10µM et du NR 50µM a été réalisé à partir de souris WT et de souris KO *Nrk2*. De manière surprenante, aucune différence d'efficacité du NR n'est observée. L'induction du messager *Nrk2* ne semble donc pas nécessaire à l'effet protecteur induit par le NR.

Le dosage des niveaux intracellulaires en NAD^+ lors du traitement des neurones avec du NR montre une augmentation des taux en NAD^+ très importante, menant à des niveaux intracellulaires en NAD^+ 2,7 fois plus élevés qu'en condition contrôle, confirmant une métabolisation du NR extrêmement forte.

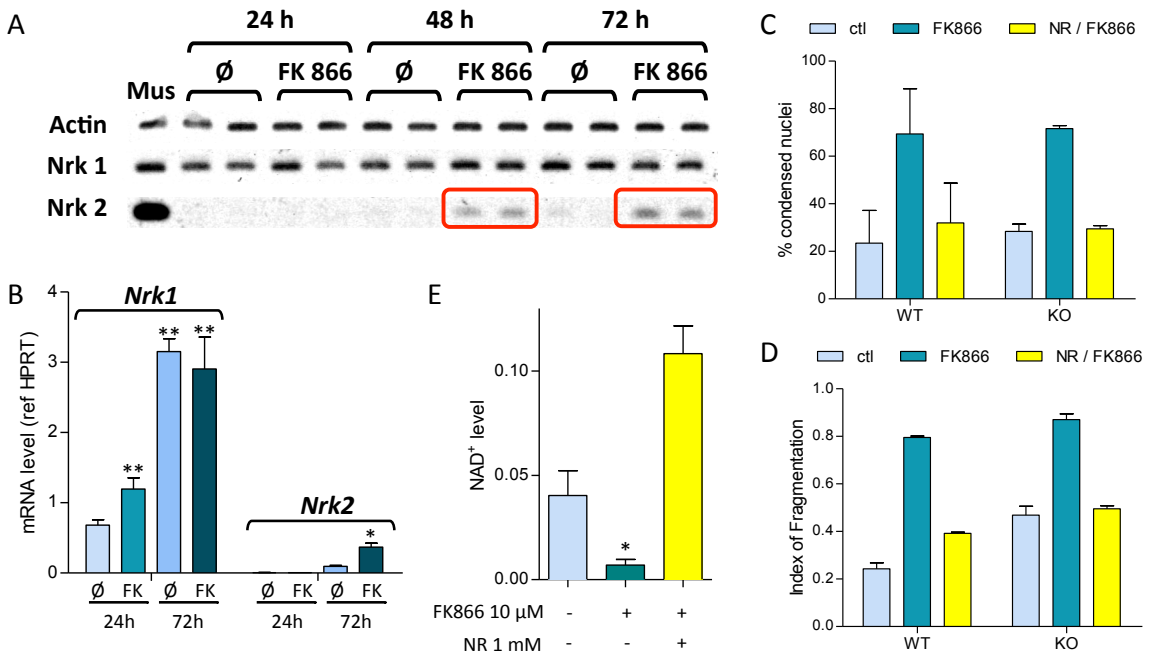


Figure 92 : L'induction du messager *Nrk2* observée lors d'une déplétion aigüe en NAD^+ n'est pas nécessaire à l'effet protecteur du NR. (A) Electrophorèse en gel d'agarose montrant le niveau d'expression des messagers *Nrk1* et *Nrk2* dans des neurones corticaux soumis à une forte déplétion en NAD^+ induite par le FK866 10µM pendant 24h, 48h et 72h : pas de modulation de l'expression du messager *Nrk1* mais induction du messager *Nrk2* après 48h et 72h de traitement. (B) Quantification des niveaux des ARNm *Nrk1* et *Nrk2* obtenus par PCRq (n=2-3). (C-D) Neurodégénérescence observée après traitement au FK866 10µM seul ou en pré-traitement avec du NR 50µM dans des souris WT ou des souris KO *Nrk2* (n=2); (C) Quantification de la condensation nucléaire ; (D) Quantification de la dégénérescence axonale. (n=2). (E) Dosage des niveaux intracellulaires en NAD^+ après co-traitement des neurones corticaux avec 10µM de FK866 et 1mM de NR (n=3).

V. Métabolisme extracellulaire du NAD^+ et de ses précurseurs

Lors de la description du métabolisme du NAD^+ dans le chapitre III, nous avons évoqué une voie de métabolisation extracellulaire étudiée chez la levure (Bogan et al., 2009) mais également sur des lignées cellulaires humaines et des neurones murins du SNP permettant la conversion du NAD^+ en NMN puis en NR à l'extérieur de la cellule (Nikiforov et al., 2011; Di Stefano et al., 2014). Des NTs permettent ensuite l'entrée du NR dans les cellules, comme nous l'avons démontré précédemment. Cette voie met en évidence l'importance du NR dans le métabolisme du NAD^+ mais à l'heure actuelle aucune donnée ne prouve son existence dans le SNC. Dans l'optique d'améliorer notre compréhension des différences d'effet protecteur du NAD^+ et du NR et afin de rendre compte de la pertinence de cette voie extracellulaire dans le SNC, nous avons étudié les différentes étapes dans les deux paradigmes neurotoxiques présentés dans ce projet. Cette voie nécessite deux activités enzymatiques : les nucléotides pyrophosphatases (NPP-ase) participent à la conversion du NAD^+ en NMN ; les nucléotidases (NT-ase) participent à la conversion du NMN en NR. Comme nous l'avons vu en introduction, ces enzymes ont été décrites dans le métabolisme de l'ATP et de l'adénosine au niveau du SNC et notamment au niveau des cellules gliales astrocytaires. Cependant le rôle de ces enzymes n'a encore été décrit ni dans la conversion du NAD^+ en NR dans le SNC, ni dans le processus d'axo-protection. L'activité NT-ase peut être inhibée par un excès de CMP (Hunsucker et al., 2005) tandis que l'activité NPP-ase peut être inhibée par l'AP4a (Vollmayer et al., 2003b).

V.1. Lors d'un stress excitotoxique

Dans le contexte d'un stress excitotoxique, nous avons voulu étudier l'effet du NAD^+ et du NMN lorsque les différentes étapes de la voie extracellulaire sont bloquées à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques. La Figure 93.B montre l'effet de l'inhibiteur des pyrophosphatases (AP_4A), des 5'-nucléotidases (CMP) et des NTs (dipyridamole) en co-traitement avec le NAD^+. De manière surprenante, aucun des trois agents pharmacologiques n'influe sur l'effet protecteur du NAD^+. Contrairement aux données décrites dans la littérature, l'effet axo-protecteur du NAD^+ lors d'un stress excitotoxique ne semble pas être lié à une métabolisation extracellulaire en NR. Au contraire, l'effet protecteur du NMN est diminué lors du co-traitement avec les inhibiteurs CMP et dipyridamole, passant de 56% à

18% et 22% respectivement comme le montre la Figure 93.C. La conversion du NMN en NR semble donc essentielle à l'effet axo-protecteur du NMN. Ces résultats suggèrent une différence de métabolisation entre le NMN et le NAD^+ lors d'un stress excitotoxique.

V.2. Lors d'une déplétion totale en NAD^+

Nous avons effectué les mêmes traitements dans le cadre d'une neurodégénérescence associée à la diminution des taux de NAD^+ dans la cellule. Le co-traitement des neurones avec du NAD^+ et du CMP lors d'une déplétion en NAD^+ induite par le FK866 met en évidence la conversion du NAD^+ en NR dans ce paradigme (Figure 93.D). Le CMP bloque la protection axonale du NAD^+ : celle-ci passe de 86% à 20%. L'effet de l'AP_4A, inhibiteur des nucléotides pyrophosphatases, est moins concluant. La protection de 86% induite par le NAD^+ passe à 65% lors du co-traitement avec 1mM de AP_4A, diminuant ainsi de 20% l'effet protecteur du NAD^+. Une dose plus élevée de cet inhibiteur (10mM) a également été testée mais celle-ci se révèle toxique dans notre modèle. L'effet protecteur du NMN est également bloqué par le co-traitement avec le CMP, passant de 100% à 10% de protection (Figure 93.E). La conversion extracellulaire du NAD^+ et du NMN dans ce modèle semble donc être impliquée dans les effets protecteurs de ces deux molécules.

L'effet du dipyridamole a également été testé dans ce paradigme. Celui-ci a peu d'influence sur l'effet protecteur du NAD^+ (perte de 20% de protection de la dégénérescence axonale). La protection induite par le NMN est, quant à elle, diminuée de 40% lors du co-traitement avec le dipyridamole. Enfin, le dipyridamole bloque partiellement l'effet protecteur du NR dans ce paradigme : celui-ci passe de 92% à 53% de protection. De manière surprenante, il semblerait donc que l'inhibition des transporteurs ENT1 et ENT2 ne soit pas suffisante pour bloquer totalement l'entrée du NR dans la cellule lors de la diminution des niveaux en NAD^+ par le FK866. L'efficacité d'entrée du NR pourrait être augmentée par la présence d'autres NTs à la membrane des neurones, corroborant les résultats indiquant une augmentation très importante du NAD^+ dans ce paradigme ainsi qu'une protection contre la neurodégénérescence totale pour des doses faibles de NAD^+ ou de NR (50µM).

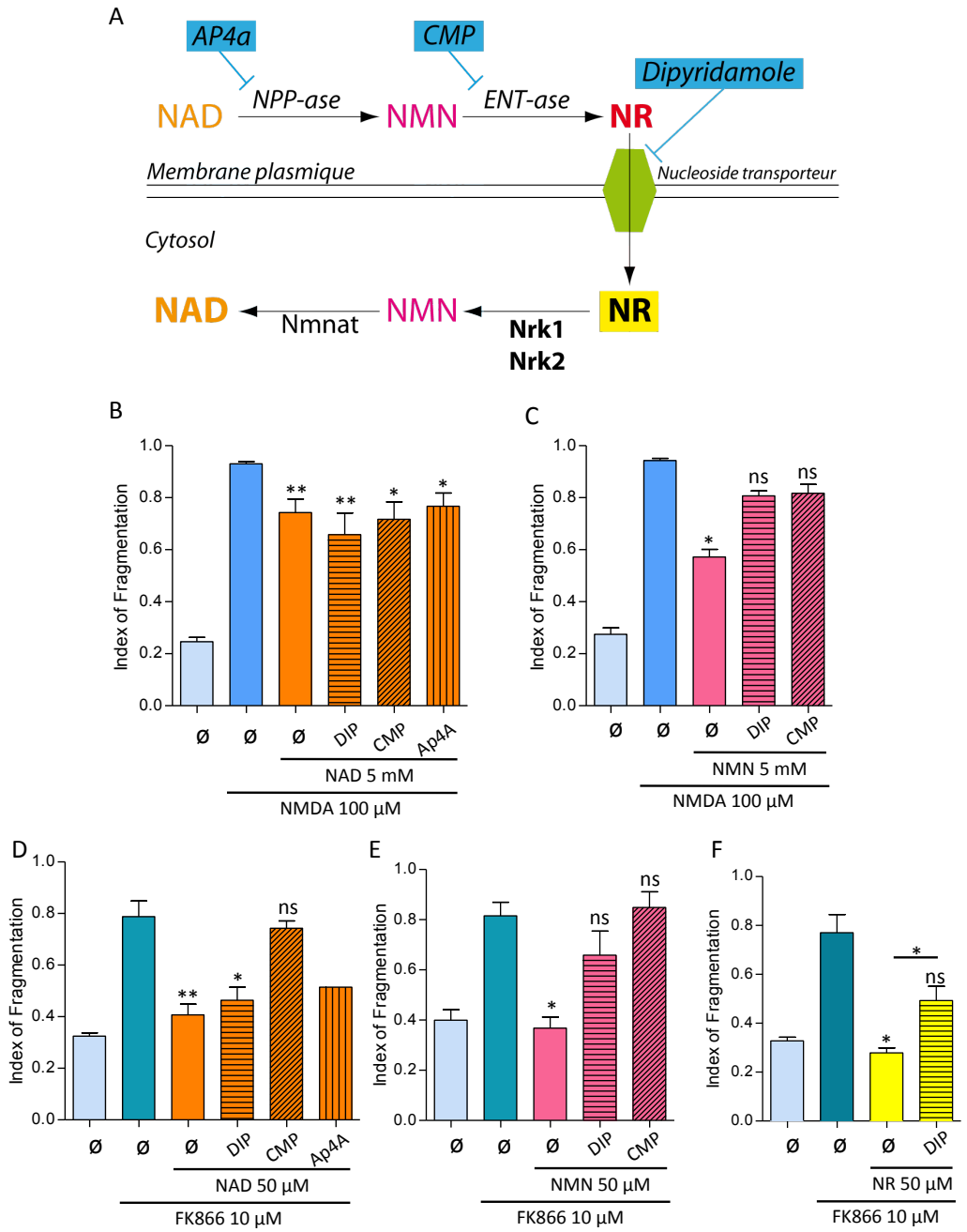


Figure 93 : Le métabolisme extracellulaire du NAD$^+$ est dépendant du stress neurotoxique. (A) Schéma représentant le métabolisme extra et intracellulaire du NAD$^+$ et de ses précurseurs NMN et NR. La conversion extracellulaire du NAD$^+$ en NMN est régulée par des nucléotides pyrophosphatases, pouvant être inhibées par l'AP$_4$A. La conversion du NMN en NR est régulée par des ecto-nucléotidases, décrites pour être bloquées par le CMP. L'entrée du NR dans la cellule se fait *via* des transporteurs de nucléosides, dont certains sont inhibés par le dipyridamole. (B) Quantification de la dégénérescence axonale observée dans des cultures de neurones co-traités avec du NMDA 100µM et du NAD$^+$ 5mM avec différents inhibiteurs de la voie extracellulaire (Dipyridamole 50µM, CMP 25mM, AP$_4$A 1mM) (n=3). (C) Quantification de la dégénérescence axonale observée dans des cultures de neurones co-traités avec du NMDA 100µM et du NMN 5mM avec différents inhibiteurs de la voie extracellulaire (Dipyridamole 50µM, CMP 25mM) (n=3). (D) Quantification de la dégénérescence axonale observée dans des cultures de neurones co-traités avec du FK866 10µM et du NAD$^+$ 50µM avec différents inhibiteurs de la voie extracellulaire (Dipyridamole 50µM, CMP 25mM, AP$_4$A 1mM) (n=1-3). (E) Quantification de la dégénérescence axonale observée dans des cultures de neurones co-traités avec du FK866 10µM et du NMN 50µM avec différents inhibiteurs de la voie extracellulaire (Dipyridamole 50µM, CMP 25mM) (n=3). (F) Quantification de la dégénérescence axonale observée dans des cultures de neurones co-traités avec du FK866 10µM, du NR 50µM et du dipyridamole 50µM (n=3). (*pvalue<0,05 ;**pvalue<0,01)

V.3. Modulation de l'entrée du NR *via* les NTs lors d'une déplétion en NAD^+ ?

Nous avons analysé le niveau d'expression des ARNm des différents NTs lors du paradigme de déplétion en NAD^+ afin de mettre en évidence une potentielle régulation de ces messagers dans ce modèle pouvant expliquer l'effet partiel du dipyridamole. Les résultats présentés dans ce paragraphe sont préliminaires et des expériences complémentaires sont en cours de réalisation. La Figure 94 présente les niveaux d'expression des ENTs après traitement au FK866 pendant 24h et 72h. A partir de ces données, il semble que les transcrits codant les NTs ENT1, ENT2 et ENT4 soient plus exprimés lorsque que la cellule est soumise à une forte déplétion en NAD^+ (augmentation respectives de 1.5x, 3x et 2x). Les nucléosides, et en particulier le NR, seraient alors en mesure de pénétrer plus efficacement dans les neurones.

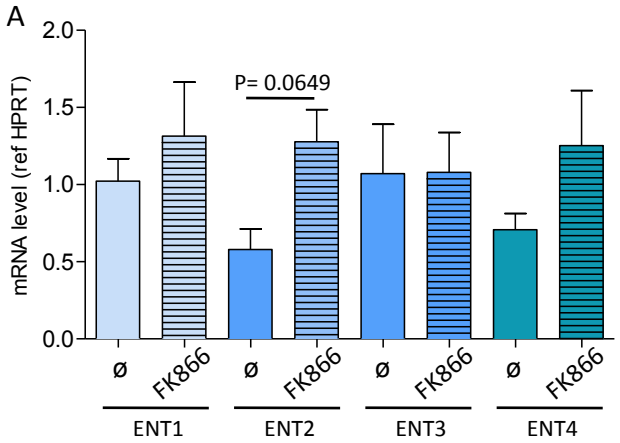


Figure 94 : Modulation des ENTs lors d'une déplétion en NAD^+. (A) Quantification des niveaux d'expression des messagers *ENT1, ENT2, ENT3* et *ENT4* dans des neurones corticaux soumis à une forte déplétion en NAD^+ induite par le FK866 10µM pendant 72h par PCRq (n=3).

Ces résultats suggèrent la conversion du NAD^+ et du NMN en NR dans un paradigme de déplétion totale en NAD^+. L'entrée du NR dans la cellule semble nécessiter des NTs en partie insensibles au dipyridamole. En considérant l'ensemble des résultats obtenus, la voie extracellulaire décrite dans le SNP et dans des lignées cellulaires serait valide dans le modèle de déplétion totale en NAD^+ dans le SNC.

De manière surprenante, la métabolisation extracellulaire du NAD^+ est dépendante du paradigme neurotoxique. Deux hypothèses peuvent être formulées :

1) L'expression des enzymes impliquées dans la conversion extracellulaire du NAD^+ ainsi que des NTs permettant le transport du NR est régulée lors d'une déplétion totale en NAD^+.

2) La métabolisation extracellulaire du NAD^+ est dépendante du compartiment subcellulaire.

En ce qui concerne la première hypothèse, nos résultats suggèrent que l'activité nucléotidase, inhibée par le CMP, est présente dans les deux modèles. Cependant, les résultats sur l'activité pyrophosphatase demandent à être complétés : l'expression des NPP-ase serait-elle augmentée lors d'une déplétion en NAD^+, permettant ainsi de prévenir la chute des taux intracellulaires en NAD^+ ? Une analyse plus fine de la présence de l'activité pyrophashatase serait requise, par exemple *via* l'utilisation d'autres inhibiteurs des NPP-ase. Enfin, il semble que les niveaux des transcrits codant les NTs ENT2 et ENT4 soient augmentés, ce qui va dans le sens d'une régulation positive de cette voie de métabolisation dans le modèle de neurodégénérescence induite par le FK866.

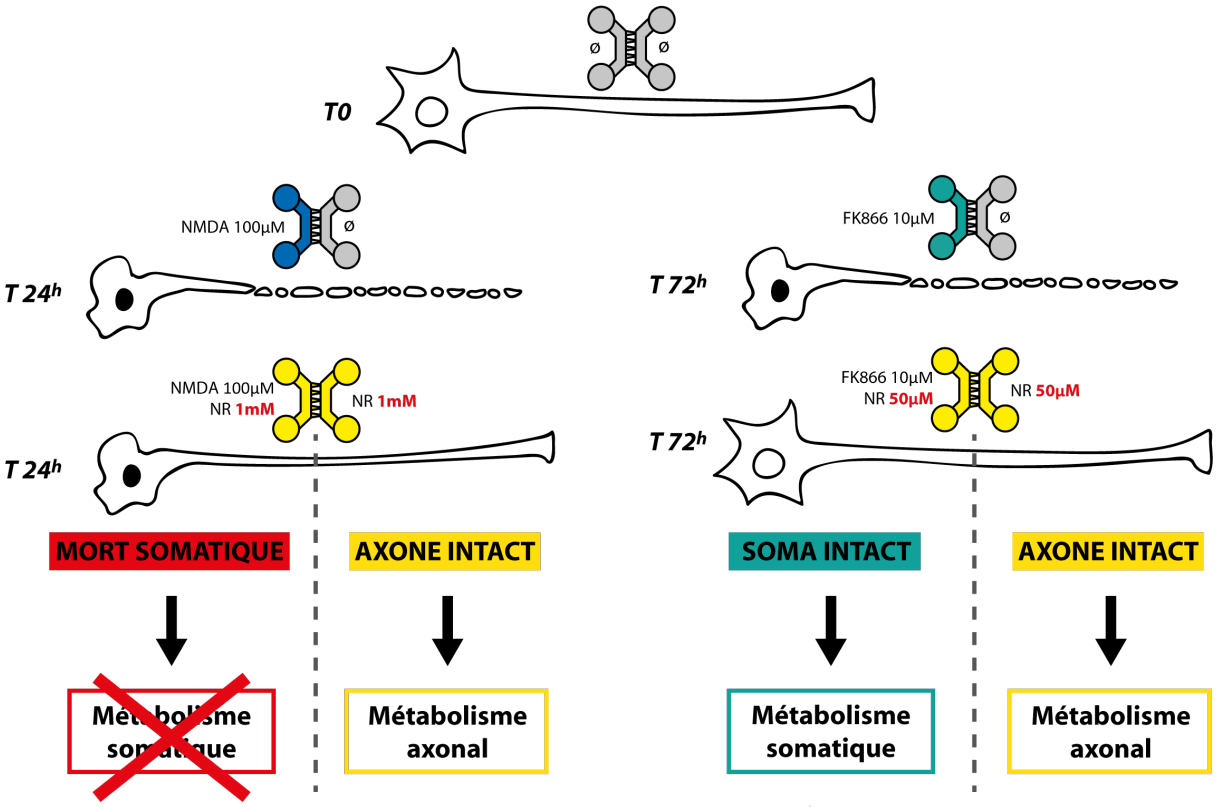


Figure 95 : Schéma présentant les différences d'effets du métabolisme de NAD^+, et en particulier du NR, dans les deux paradigmes neurotoxiques présentés dans ce travail.

Pour la seconde hypothèse, il est important de bien exposer les différences entre ces deux modèles. La nature du stress est la première différence notable : l'excitotoxicité est multifactorielle tandis que le FK866 induit une neurodégénérescence uniquement associée à la diminution des taux de NAD^+. Ainsi, alors que le NAD^+ et le NR faillissent à sauver de la mort neuronale lors du stress excitotoxique, ils protègent totalement l'intégrité neuronale lors

du stress induit par le FK866. Nous avons donc un premier modèle dans lequel le NR et le NAD^+ protègent uniquement les axones et les corps cellulaires dégénèrent et un second modèle dans lequel les deux compartiments subcellulaires restent intègres (Figure 95).

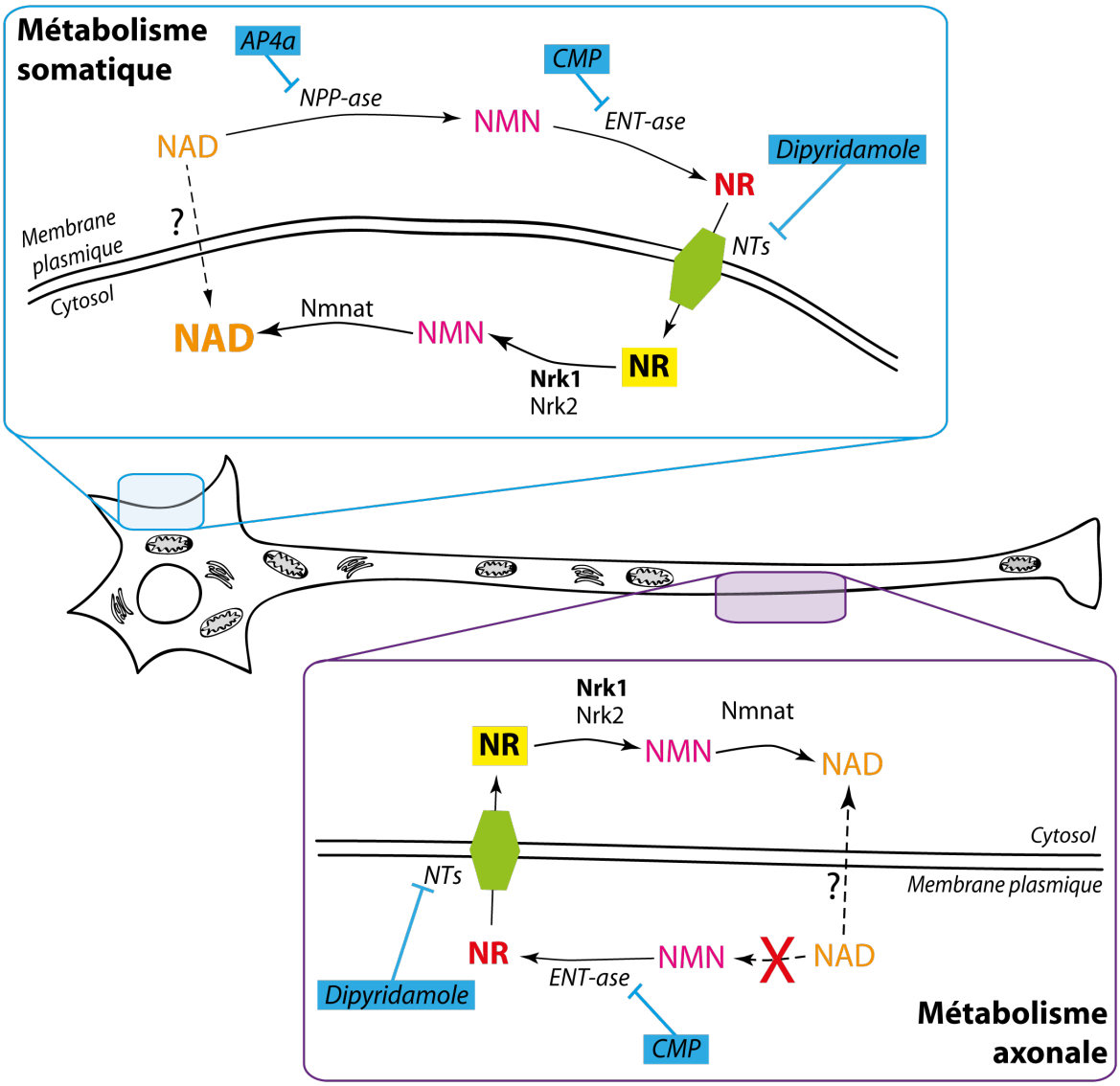


Figure 96 : Schéma hypothétique de métabolisation extracellulaire compartimentalisée du NAD^+ : la conversion du NAD^+ en NMN serait possible uniquement dans le compartiment somatique.

La métabolisation du NAD^+ pourrait dépendre du compartiment subcellulaire. En effet, lorsque le soma n'est pas sauvé par le NR et le NAD^+ (c'est-à-dire dans notre modèle d'excitotoxicité), l'analyse de la voie extracellulaire montre que le NAD^+ n'est pas converti en NR par les nucléotidases tandis que lorsque le soma est sauvé (dans le modèle de déplétion en NAD^+), le NAD^+ est converti en NR. Dans le premier cas, les effets du NAD^+ et du NR se font majoritairement au niveau du compartiment axonal tandis que dans le second cas, ils peuvent se faire au niveau des deux compartiments subcellulaires. Cela suggère fortement que

le NAD^+ ne peut être converti en NR dans le compartiment axonal alors qu'il peut l'être dans le compartiment somatique. Cette différence de métabolisation est peut-être due à l'absence ou à la non-activité des pyrophosphatases dans le compartiment axonal. La Figure 96 présente un schéma récapitulatif de la métabolisation extracellulaire compartimentalisée du NAD^+. Afin de confirmer cette hypothèse, il semble important d'étudier la localisation subcellulaire des NPP-ase ainsi que des NTs: sont-ils exprimés au niveau des corps cellulaires ou des axones ?

DISCUSSION

Ce projet de doctorat a pour objectif de caractériser les effets protecteurs du NAD^+ et de mettre en évidence les effets du NR dans un modèle de dégénérescence axonale. Comme démontré au cours des résultats, un effet protecteur important du NR a été mis en évidence dans deux modèles de dégénérescence *in vitro* et dans un modèle *in vivo*. Qui plus est, le NR semble être plus efficace que le NAD^+ et que d'autres précurseurs lors d'un stress excitotoxique. Ces résultats suscitent beaucoup d'interrogations sur le mécanisme d'action du NR et donc sur la métabolisation du NAD^+ et de ses précurseurs dans le SNC.

I. Modèle excitotoxique

Comme nous l'avons souligné dans les résultats, la première étape du projet a été de mettre au point un modèle d'étude permettant de suivre un processus dégénératif commun aux maladies neurodégénératives. Nous avons choisi de nous intéresser à l'excitotoxicité par ajout de NMDA car celui-ci avait déjà été utilisé dans de nombreuses études *in vitro*, dont certaines pour lesquelles un effet bénéfique du NAD^+ sur la neurodégénérescence avait été décrit (Wang et al., 2014b). Nous nous sommes placés dans des conditions où la toxicité est optimale afin d'analyser l'effet protecteur des différents composés testés. Ainsi, l'index de fragmentation axonale mesuré aux alentours de 0,2 en situation contrôle atteint 0,9 lors de l'application de NMDA 100µM pendant 24h, correspondant à une dégénérescence axonale maximale. Bien que cela ne fasse pas partie de l'objectif initial du projet, j'ai souhaité caractériser le type de mort mis en jeu lors du processus dégénératif observé. Pour cela, j'ai testé différents inhibiteurs des grandes voies de mort cellulaire. Après analyse de la condensation des noyaux marqués par le Hoechst 33342, les résultats obtenus avec des inhibiteurs des caspases, des PARPs et de RIP1 suggèrent que la mort observée n'est respectivement ni de l'apoptose dépendante des caspases, ni de la parthanatos, ni de la nécroptose. Ces résultats contrastent avec les précédentes études effectuées sur des modèles d'excitotoxicité. Une mort de type apoptotique a ainsi été observée après traitement de neurones corticaux pendant 24h avec du glutamate 30µM et de la glycine 3µM (Wang et al., 2014b). De plus, le prétraitement de neurones corticaux avec de la nécrostatine-1 100µM protège de la mort neuronale induite par un traitement de 2h avec du NMDA 100µM (Li et al., 2008). Enfin, PJ34, inhibiteur spécifique de PARP1, prévient des effets toxiques de

l'application de kaïnate 10µM pendant 1h sur des tranches organotypiques de moelle épinière de rat (Mazzone and Nistri, 2011). Pour expliquer les différences observées, il est important de noter que chaque modèle de stress excitotoxique étudié est diffèrent : 1) l'agent pharmacologique utilisé n'est pas toujours le même et il est, par exemple, possible que l'application de kaïnate active d'autres voies de signalisation que le NMDA. En effet, nous avons vu qu'il existait des récepteurs ionotropiques spécifiques pour ces excitotoxines ; 2) les doses et les temps de traitement peuvent avoir un impact important sur les mécanismes de mort cellulaire. Une dose forte aura tendance à déclencher un mécanisme simple tel que de la nécrose tandis qu'une dose plus faible appliquée sur une cinétique plus longue peut induire un mécanisme plus complexe tel que l'apoptose ; 3) enfin, dans les études citées ci-dessus, l'effet des inhibiteurs est rarement total. Ceci peut être dû aux doses utilisées ou à une efficacité relative des inhibiteurs mais également à la mise en place d'autres voies de mort restant actives. En effet, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre IV, l'excitotoxicité induit des modifications cellulaires complexes et peut activer plusieurs mécanismes de mort en parallèle. L'absence de résultats avec les inhibiteurs testés lors du stress excitotoxique peut s'expliquer par la multiplicité des voies de mort activées. D'autres inhibiteurs sont ainsi en cours de test : 1) le 3-méthyl adénine, inhibiteur de la PI3K kinase, permettrait de mettre en évidence un rôle de l'autophagie dans notre modèle (Wang et al., 2008b); 2) l'inhibition des calpaïnes par la calpastatine ou la calpeptine permettrait d'envisager un aspect nécrotique de la mort neuronale observée, comme cela a été suggéré dans plusieurs modèles d'excitotoxicité (Bevers et al., 2009; Nimmrich et al., 2010).

Dans la seconde partie de mon projet, la neurodégénérescence est induite par la déplétion totale des taux de NAD^+ intracellulaire en inhibant l'enzyme Nampt, impliquée dans la production de NAD^+ à partir de NAM. Comme pour le stress excitotoxique, le traitement des neurones pendant 72h avec du FK866 10µM correspond à une importante dégénérescence axonale (IF=0,85). Cependant, les noyaux observés après traitement au FK866 présentent une morphologie particulière : outre la présence de noyaux condensés (environ 60% après traitement), une condensation périnucléaire est également observée sur certains noyaux, suggérant la mise en place de mécanismes de mort à caractère nécrotique (Puyal et al., 2013).

Les effets du NAD^+ et du NR ont été caractérisés dans ces deux modèles. De manière surprenante, ces effets ne sont pas les mêmes en fonction du stress neurotoxique. Alors que ces molécules ne protègent que de la dégénérescence de l'axone lors du stress excitotoxique,

elles sont capables de prévenir complètement de la neurodégénérescence lors du traitement au FK866. Notre hypothèse pour expliquer cette différence est l'aspect multifactoriel de la mort induite par le NMDA, qui provoque notamment une dérégulation de l'influx calcique, une augmentation du stress oxydant et une diminution des taux en NAD^+. Les molécules précurseurs de la biosynthèse du NAD^+ ne permettent pas de prévenir tous ces dysfonctionnements et ont donc seulement des effets partiels sur l'intégrité cellulaire. En revanche, lors du traitement avec le FK866, la dégénérescence induite est uniquement associée à une diminution brutale et quasi complète des taux de NAD^+. Le maintien de ces taux par l'application de précurseurs du NAD^+ permet donc le maintien total de l'intégrité cellulaire. La protection quasi totale de la dégénérescence axonale par le NR suggère fortement que l'intégrité de l'axone est uniquement dépendante des niveaux en NAD^+. Cependant, il est important de noter que lors du stress induit par le FK866, les taux de NAD^+ sont très bas dès 24h de traitement alors que l'axone ne dégénère pas. Il est donc peu probable que la dégénérescence axonale observée dès 8h de traitement lors du stress excitotoxique soit uniquement due à une diminution des taux de NAD^+. La neurodégénérescence doit vraisemblablement être accélérée par les autres facteurs impliqués dans le stress induit par le NMDA. Néanmoins, la protection axonale induite par le NR et le NAD^+ suggère que la déplétion en NAD^+ est un événement précoce qui se place en amont des autres effecteurs, tels que l'activation de la voie de signalisation des MAPK par exemple (Gerdts et al., 2015, 2016). Ainsi, l'application du NAD^+ et du NR bloque la cascade de signalisation induisant la dégénérescence axonale lors du stress excitotoxique. Il serait intéressant d'étendre ces observations à d'autres modèles de neurodégénérescence, tels qu'une déprivation en facteurs trophiques ou un modèle d'hypoxie *in vitro*, ce qui pourrait permettre une caractérisation encore plus précise des mécanismes de protection conférée par le NAD^+ et ses précurseurs.

II. Etude de la DA dans les dispositifs microfluidiques

Le deuxième point déterminant dans mon projet a été le choix du type de culture neuronale étudié. L'équipe dans laquelle j'ai effectuée mon doctorat a développé depuis plusieurs années des dispositifs microfluidiques pour la culture de neurones. L'acquisition de cette technique nécessite un certain savoir-faire et a été améliorée par les différents expérimentateurs qui ont travaillé au sein de l'équipe. Aujourd'hui, ces dispositifs sont utilisés en routine et permettent la mise en place de cultures primaires neuronales simples ou

en réseaux connectés. De manière pratique, ce dispositif miniature permet le « screening » d'un grand nombre de molécules pharmacologiques lors d'une seule expérience, *via* le traitement d'environ 80 circuits par culture. Dans le cadre de mon projet, j'ai choisi les cultures primaires de neurones corticaux non connectés, permettant ainsi l'étude d'une population neuronale unique sans avoir à tenir compte des interactions synaptiques entre deux types cellulaires distincts. De plus, l'accès à la chambre distale que seuls les axones peuvent atteindre permet de quantifier la dégénérescence axonale de manière précise et donne la possibilité de traiter de manière indépendante la chambre somato-dendritique de la chambre axonale. Cela m'a permis de mettre en évidence un métabolisme localisé du NR et du NAD^+.

Maintenant que les effets du NAD^+ et du NR sont établis avec certitude sur la dégénérescence axonale, il serait intéressant de confronter ces deux molécules à un modèle de déconnexion synaptique. En effet, la déconnexion synaptique a été décrite comme un événement précoce des processus neurodégénératifs (Arendt, 2009; Callahan and Coleman, 1995; Selkoe, 2002). La mise en évidence d'effets protecteurs des molécules du métabolisme du NAD^+ lors de ce processus conforterait l'intérêt de ces molécules d'un point de vue thérapeutique. Plusieurs modèles de réseaux connectés en dispositifs microfluidiques sont maitrisés au sein de mon équipe, et en particulier les réseaux cortex-hippocampe et cortex-striatum. Dans un premier temps, ceux-ci pourraient être utilisés afin d'évaluer les effets du NAD^+ et du NR sur la dégénérescence des synapses induite par un stress excitotoxique. Au préalable, une mise au point serait nécessaire pour définir la dose de NMDA et la cinétique de traitement optimum afin d'induire seulement une déconnexion pré-synaptique sans altérations des segments axonaux ou des neurones secondaires. Dans un second temps, l'étude *in vitro* de la voie perforante impliquée dans la maladie d'Alzheimer pourrait être mise en place pour se rapprocher d'un modèle physio-pathologique. Dans ce modèle, la déconnexion synaptique peut être induite par l'application d'oligomères de peptides $A\beta_{1-42}$ sur les neurones corticaux mis en culture dans la chambre proximale et connectés avec des neurones hippocampiques présents dans la chambre distale. Ce modèle a déjà été caractérisé par B. Deléglise (Deléglise et al., 2014). Plusieurs arguments sont en faveur d'un effet protecteur du NAD^+ dans la déconnexion synaptique. En effet, en 2013, l'application de NAD^+ a été montrée pour prévenir de la perte synaptique induite par axotomie dans un réseau cortico-striatal mis en culture en puces microfluidiques (Deléglise et al., 2013). De plus, très récemment, une équipe a mis en évidence le rôle du NAD^+ dans l'activité synaptique. Ainsi, l'activité du répresseur transcriptionnel CtBP1, ancré à la synapse, serait régulée par l'activité neuronale *via* la

modification des niveaux intracellulaires en NAD^+ et en NADH (Ivanova et al., 2015).

III. Métabolisme du NAD^+ et de ses précurseurs dans les neurones du SNC

Nous avons mis en évidence que l'effet protecteur du NR se traduisait par une augmentation des niveaux intracellulaires en NAD^+. Nous avons démontré que la voie de synthèse du NAD^+ à partir du NR semblait associée à l'activité de la kinase Nrk1, et non Nrk2. Pour rappel, les kinases Nrk permettent la conversion du NR en NMN. La non-implication de la kinase Nrk2 a pu être mise en évidence grâce aux expériences effectuées sur les souris KO *Nrk2* (collaboration avec M. Mericksay et Z. Li). En effet, nous avons montré que l'invalidation du gène *Nrk2* ne modifiait en aucune mesure les effets protecteurs du NR lors d'un stress excitotoxique mais également lors d'une déplétion aigüe en NAD^+ induite par le FK866. De plus, le messager *Nrk2* n'est pas présent dans les tissus cérébraux testés ni dans les cellules corticales. Au contraire, le messager *Nrk1* semble exprimé dans tous les tissus et une induction de ce transcrit est observé lors d'un stress excitotoxique de 24h. Le résultat suggérant une induction de *Nrk2* après le traitement au FK866 amène, quant à lui, à plus de discussion. En effet cette induction, déjà démontrée lors de l'axotomie du nerf sciatique dans le SNP (Sasaki et al., 2006), n'a pas de fonction identifiée dans notre modèle. La protéine Nrk2 correspond à la forme épissée d'une protéine appelée ITGB1BP3 (pour *muscle integrin β1 binding protein*), ce qui suggère une autre fonction de Nrk2 en tant que protéine de liaison aux intégrines (Li et al., 2002, 2003). Dans l'introduction, nous avons également mentionné une activité de Nrk2 avec d'autres nucléosides, tels que la tiazofurine et l'uridine (Bieganowski et al., 2004). L'induction du messager *Nrk2* observée pourrait donc s'expliquer par l'implication de cette kinase dans d'autres mécanismes indépendant du NAD^+ et du NR.

La synthèse de NAD^+ à partir de NMN nécessite l'activité des enzymes Nmnat, dont il existe trois isoformes chez les cellules de mammifère : Nmnat1-3, respectivement localisées dans le noyau, l'appareil de golgi et la mitochondrie (Berger et al., 2005; Emanuelli et al., 2001; Schweiger et al., 2001). Les différentes localisations de ces enzymes suggèrent une synthèse de NAD^+ dépendante du compartiment subcellulaire. Ceci peut se traduire par une différence des niveaux de NAD^+ dans les différents compartiments cellulaires. En effet, dans les astrocytes, les « pools » de NAD^+ sont majoritaires dans le cytosol (60-70%) tandis que dans les neurones, les niveaux en NAD^+ sont quasiment équivalents entre le cytosol et les

mitochondries (Alano and Swanson, 2007). L'efficacité catalytique de Nmnat1 a été montrée pour être la plus importante (Km=20,1µM (Revollo et al., 2004)), bien supérieure à celle de Nmnat3 (Sorci et al., 2007), suggérant un rôle important de cette enzyme au niveau nucléaire. De manière surprenante, l'activité enzymatique des Nmnat n'a pas seulement été décrite dans la synthèse de NAD^+ mais également dans la réaction réciproque, produisant ainsi du NMN et de l'AMP à partir du NAD^+ (Berger et al., 2005). Cependant, cette réaction semble minoritaire *in vivo* et donc non essentielle dans notre problématique (Lau et al., 2009). Dans notre modèle, il semblerait intéressant d'étudier la localisation des trois enzymes Nmnat ainsi que leur rôle dans la protection induite par le NR. La surexpression de Nmnat1 et de Nmnat3 permet de protéger des axones de DRG après axotomie et ce quelle que soit la localisation subcellulaire des enzymes, c'est à dire Nmnat1 nucléaire ou cytoplasmique et Nmnat3 mitochondriale ou nucléaire (Sasaki et al., 2006). De plus, nos résultats sur la compartimentalisation des effets du NAD^+ et du NR suggèrent fortement une métabolisation locale du NR, qui ne nécessiterait pas d'activité nucléaire spécifique. Ceci irait dans le sens d'une synthèse du NAD^+ pouvant s'effectuer dans un compartiment subcellulaire présent dans l'axone et suggèrerait un rôle des enzymes Nmnat2 et/ou Nmnat3. Le rôle de Nmnat3 est approfondie dans une revue parue en 2012 qui suggère le transport du NMN à travers la membrane mitochondriale et la synthèse locale du NAD^+ dans la mitochondrie à partir du NMN *via* l'activité de Nmnat3 (Stein and Imai, 2012). Afin d'étayer ces notions, il serait intéressant d'étudier la localisation subcellulaire des enzymes Nrk dans nos cultures de neurones corticaux. L'utilisation d'anticorps spécifiques des Nrk1 et Nrk2 ou de protéines de fusion permettrait de confirmer et de préciser la distribution uniforme de Nrk1 et Nrk2 mise en évidence en 2006 par Sasaki *et al.* sur des lignées cellulaires HEK293T (Sasaki et al., 2006). La localisation subcellulaire des différentes enzymes de la biosynthèse du NAD^+ est à relier aux cibles du NAD^+ ayant un rôle dans l'intégrité cellulaire, et en particulier dans la protection axonale. L'implication des différentes cibles sera discutée dans le paragraphe suivant. En ce qui concerne la métabolisation du NR en NAD^+, il me semble important de souligner qu'une seconde voie métabolique a été suggérée chez les levures et chez les mammifères (Belenky et al., 2007b, 2009). Ainsi, le NR peut également être converti en NAM par l'enzyme PNP (purine nucléoside phosphorylase). Le NAM libéré par cette réaction peut être alors converti en NAD^+ par la voie de sauvetage décrite en introduction. Cependant, cette voie ne semble pas majoritaire dans notre modèle d'excitotoxicité car l'application exogène de NAM a très peu, voire pas, d'effet comparé à l'effet protecteur très fort du NR et

à l'effet modéré du NMN et du NAD^+. De plus, l'hypothèse d'une conversion intracellulaire du NR en NAM peut être exclue car nous avons montré un effet optimal du NR dans le modèle de traitement au FK866 où la conversion du NAM en NAD^+ est totalement bloquée. La conversion intracellulaire du NR en NAD^+ *via* Nrk1 semble donc être prédominante mais les résultats obtenus pendant mon doctorat ne permettent pas de conclure quant à la localisation subcellulaire de cette conversion. Je me suis en effet plus intéressé à la métabolisation extracellulaire du NAD^+ et de ses précurseurs.

Avant de discuter de ce point, je souhaiterais revenir brièvement sur l'absence d'effet du NAM dans mon modèle. En effet, ce résultat peut paraître relativement surprenant. Pour rappel, le NAM est converti en NAD^+ par la voie de sauvetage comprenant deux réactions enzymatiques mettant en jeu l'enzyme Nampt puis les Nmnat dont nous venons de discuter. L'enzyme Nampt est présente sous deux formes : une intracellulaire, iNampt, et une extracellulaire eNampt. L'enzyme Nampt est exprimée au niveau neuronal. En effet, j'ai montré que l'inhibition de son activité par le FK866 induit une forte diminution des niveaux de NAD^+ dans les cellules ainsi qu'une dégénérescence neuronale. Pour quelles raisons l'apport exogène de NAM n'a aucun effet dans notre modèle? Au premier abord, cela n'a aucun sens car le NAM a toujours été décrit comme la source majoritaire de NAD^+, avant le NA (Collins, 1972; Collins and Chaykin, 1971). De plus, de nombreuses études ont mis en évidence un effet protecteur du NAM. Entres autres, une étude parue en 2013 met en avant des effets du NAM prévenant les déficits cognitifs dans un modèle *in vivo* de souris Alzheimer et ralentissant ainsi la maladie (Liu et al., 2013). Le NAM a également été décrit comme un précurseur protecteur dans des modèles d'ischémie (Liu et al., 2009a). Cependant, il ne faut pas oublier que le NAM est le produit des réactions enzymatiques du NAD^+ avec différents substrats (sirtuines, PARPs, CD38/157). Des taux de NAM trop importants dans les cellules peuvent inhiber ces réactions et donc bloquer les effets protecteurs des cibles moléculaires du NAD^+ (Denu, 2005). De plus, dans notre modèle de culture cellulaire, le milieu dans lequel sont cultivés les neurones murins (DMEM glutamax) contient déjà du NAM à une concentration de 33µM. L'ajout de NAM de manière exogène augmente donc de façon non négligeable les niveaux de celui-ci et pourrait annuler les effets protecteurs potentiels de celui-ci.

Les différences d'effets obtenus avec le NAD^+ et ses différents précurseurs dans les deux modèles mis en place posent des questions sur l'efficacité relative de ces molécules et sur leur métabolisation dans les cultures corticales. En effet, lors d'un stress excitotoxique, le NR

apporte une protection comprise entre 80 et 90% à une concentration de 1mM tandis que le NMN et le NAD^+ apportent une protection d'environ 50% à des concentrations plus importantes, respectivement 5 et 15mM. La possibilité d'une voie de conversion du NAD^+ en NR dans le compartiment extracellulaire permettrait d'expliquer la différence d'effets entre le NR et les autres métabolites. Cette voie métabolique, détaillée en introduction, reposerait sur la conversion du NAD^+ en NMN par des enzymes à activité pyrophosphatase/ phosphodiestérase (NPP-ase) puis par la conversion du NMN en NR par des enzymes à activité 5'-nucléotidase (NT-ase). Le NR pénètre ensuite dans les cellules *via* des transporteurs aux nucléosides NTs. De façon surprenante, nos résultats suggèrent une métabolisation extracellulaire dépendante du stress neurotoxique. En effet, lors du stress excitotoxique, l'effet faible du NAD^+ ne semble pas dépendre d'une métabolisation par les NPP-ase ni par les NT-ase. L'activité NT-ase est par contre essentielle pour l'effet protecteur du NMN dans ce modèle. Ces résultats suggèrent donc que le NAD^+ n'est pas converti en NR dans ce modèle mais utilise une autre voie métabolique pour conférer sa protection limitée sur la dégénérescence axonale. Au contraire, lors d'une déplétion totale des cellules en NAD^+, l'activité NT-ase est essentielle pour les effets du NMN et du NAD^+. En effet, dans ce cas, le traitement avec le CMP, décrit comme un inhibiteur de CD73 (ecto-5'-nucléotidase ou 5'eNT-ase), annule les effets protecteurs de ces deux molécules. L'activité 5'-nucléotidase semble donc essentielle pour les effets du NMN dans les deux modèles testés. CD73 est une enzyme spécifique des nucléotides majoritairement impliquée dans la production extracellulaire d'adénosine à partir de l'AMP (Zimmermann et al., 2012). L'adénosine est susceptible de se lier à des récepteurs purinergiques présents aux synapses et ainsi de moduler la transmission synaptique. CD73 est capable d'hydrolyser des ribo- ou désoxyribonucléoside 5'-monophosphate telles que le CMP, l'UMP, l'IMP ou le GMP. Plus récemment, il a été montré que CD73 est capable d'hydrolyser le NMN en NR (Zimmermann et al., 2012). L'analyse enzymatique par immunohistochimie a démontré une activité ecto-nucléotidase de cette enzyme présente dans différentes régions du cerveau (cortex, ganglions de la base, système limbique) (Zimmermann, 1996), confirmant le potentiel intérêt de cette enzyme dans notre problématique. La présence du messager *CD73* a également été montrée dans des neurones corticaux (données non présentées, obtenues au cours de mon doctorat) et également dans des astrocytes (Okuda et al., 2010), suggérant alors un rôle potentiel des astrocytes dans la métabolisation extracellulaire du NAD^+. CD73 présente une forte affinité pour le CMP qui, à forte concentration, inhibe la réaction de CD73 avec le NMN. Dans mes modèles,

l'inhibition par le CMP est efficace à une dose de 25mM, ce qui corrobore les données déjà décrites dans la littérature (Di Stefano et al., 2014). Cependant, l'invalidation de *CD73* avec des siARN ou des vecteurs viraux pourrait être effectuée afin de confirmer avec certitude l'implication de cette enzyme dans l'effet axo-protecteur conféré par le NAD^+ et le NMN. La plupart des études se focalisent sur CD73 car, parmi les 7 isoformes de NT-ase décrites chez les mammifères, CD73 est la seule ancrée sur la face externe de la membrane plasmique (Cognato and Bonan, 2010). Il est cependant important de prendre en compte l'existence d'alkaline phosphatases (APs), autres enzymes ancrées à la membrane et susceptibles d'hydrolyser l'ATP, l'ADP et l'AMP en adénosine (Zimmermann et al., 2012). Parmi les quatre APs décrites chez les mammifères, TNAP (*Tissue Non-specific AP*) est celle susceptible d'intervenir dans notre modèle car elle a été décrite pour son implication dans la signalisation purinergique de cellules neuronales (Ohkubo et al., 2000) et également pour promouvoir la croissance axonale de neurones hippocampiques (Díez-Zaera et al., 2011). Un effet de TNAP ou d'autres APs ne peut donc être exclu, même si aucune donnée ne semble indiquer une inhibition des APs par le CMP.

La voie extracellulaire de conversion du NAD^+ en NR met également en jeu dans le SNP des enzymes NPP-ase dont l'activité pyrophosphatase, décrite pour convertir l'ATP en ADP ou AMP, permettrait la métabolisation du NAD^+ en NMN dans notre modèle. Il existe 7 isoformes de ces enzymes présentes dans les tissus cérébraux mais dont la localisation spécifique n'est pas clairement définie (Langer et al., 2008). Toutes les isoformes sont transmembranaires, mise à part NPP2 (également appelée autotaxine) qui est une forme sécrétée. NPP1 est l'isoforme majoritaire dans le cerveau avec le Km le plus élevé (≈1µM) (Gómez-Villafuertes et al., 2014). L'AP_4A, membre de la famille des diadénosine oligophosphate, est un substrat de l'AP_4A hydrolase qui possède une activité pyrophosphatase. L'AP_4A a été décrit pour inhiber l'activité pyrophosphatase nécessaire à la conversion du NAD^+ en NR dans le SNP et dans des lignées cellulaires humaines (Nikiforov et al., 2011; Di Stefano et al., 2014). Dans nos modèles, l'AP_4A 1mM n'a quasiment aucun effet sur la protection conférée par le NAD^+ lors de la déplétion en NAD^+ induite par le FK866. L'utilisation d'une dose plus élevée à 10mM a également été testée mais celle-ci s'est révélée toxique en situation contrôle (données non présentées). L'AP_4A est une biomolécule produite naturellement par les cellules dont plusieurs rôles ont été décrits dans le système nerveux. En particulier, l'AP_4A peut activer les récepteurs purinergiques P2 et influer sur la

signalisation extracellulaire (Hoyle et al., 2001). Des effets protecteurs ont ainsi été mis en évidence par l'utilisation de doses faibles d'AP_4A (100nm) dans un modèle d'ischémie chez le rat (Wang et al., 2003). Au contraire, des doses fortes pourraient avoir des effets délétères et augmenter la vulnérabilité neuronale *via* la diminution des niveaux de dinucléotides (Asensio et al., 2007). Ces résultats avec l'AP_4A ne nous permettent donc pas de conclure quant à l'implication de la conversion du NAD^+ en NMN dans nos modèles neurotoxiques. Le PPADS est un inhibiteur des NPP-ase décrit dans la littérature pour bloquer les effets du NAD^+, qui pourrait être testé dans notre modèle afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus avec l'AP_4A (Grobben et al., 1999b; Nikiforov et al., 2011).

Nous avons mis en évidence l'existence une voie extracellulaire de conversion du NAD^+ en NR dépendante du stress neurotoxique. Ce résultat peut s'expliquer par un métabolisme local du NAD^+ en NR présent au niveau somatique mais absent au niveau axonal. La conversion du NAD^+ en NR observée lors du traitement au FK866 pourrait s'expliquer par la présence des NPP-ase au niveau des corps cellulaires (compartiment subcellulaire dont l'intégrité est préservée) tandis que l'absence de cette conversion lors du stress excitotoxique serait due à la non-expression de ces enzymes au niveau des axones (seul le compartiment axonal est capable d'être maintenu lors du stress excitotoxique). L'analyse de la localisation subcellulaire des NPP-ase dans notre modèle permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Les cultures primaires sont constituées à 90% de neurones corticaux murins et d'environ 10% d'astrocytes mais l'utilisation des dispositifs microfluidiques empêche le passage des astrocytes dans les microcanaux et donc l'envahissement par les cellules gliales de la chambre distale. Ainsi, les astrocytes, présents uniquement dans le compartiment somato-dendritique, pourraient porter une activité NPP-ase contribuant à la conversion du NAD^+ en NR. Pour étudier cette seconde hypothèse, la mise en place de co-culture neurones-astrocytes au niveau du compartiment distal est en cours dans mon laboratoire. Si les astrocytes sont impliqués dans le métabolisme extracellulaire du NAD^+, leur présence dans la chambre distale serait susceptible de potentialiser les effets protecteurs du NAD^+ lors d'un stress excitotoxique, en permettant sa conversion extracellulaire en NR. Cela expliquerait l'effet différentiel du NR et du NAD^+ observé en fonction du stress neurotoxique.

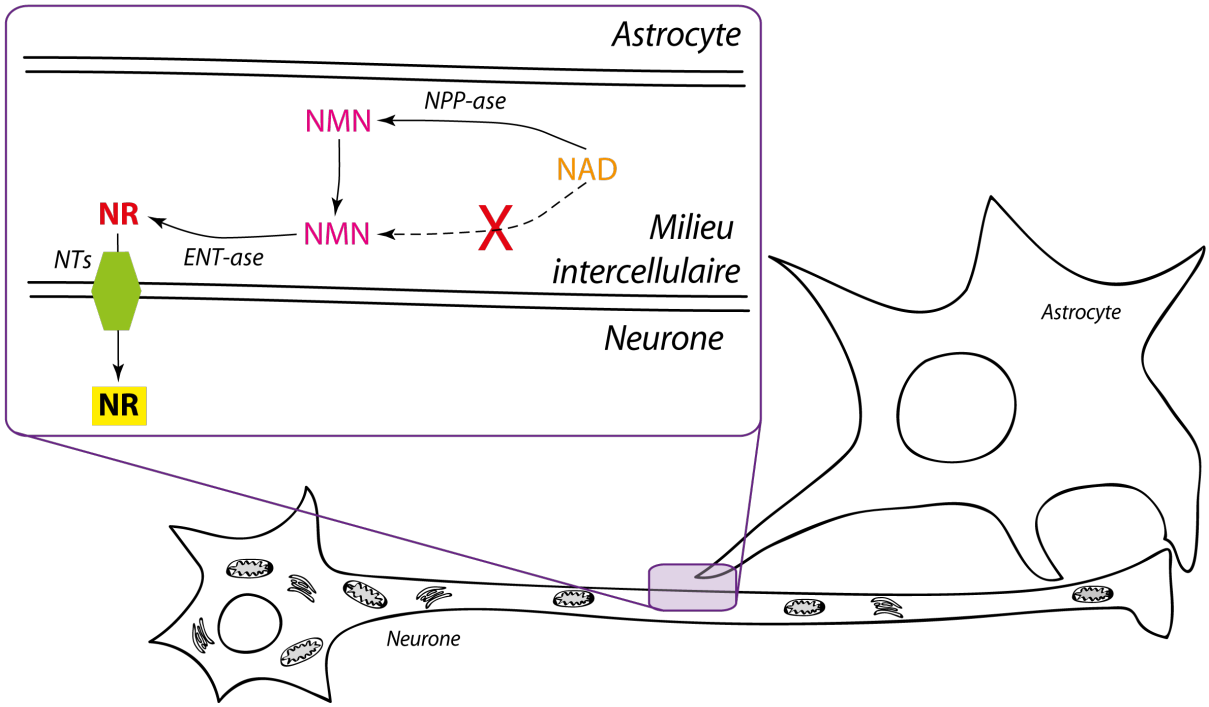


Figure 97 : Potentiel rôle des astrocytes dans le métabolisme extracellulaire

Les astrocytes pourraient donc avoir un impact sur les mécanismes de protection axonale mis en évidence dans mon travail. Cette considération est confortée par l'étude récemment publiée démontrant l'importance du métabolisme du NAD^+ dans les astrocytes (Harlan et al., 2016). L'application de NMN et de NR sur des co-cultures motoneurones/astrocytes protège de la dégénérescence des motoneurones induite par la proximité avec des astrocytes mutés dans un gène de suceptibilité à la SLA. Ils ont également mis en évidence la présence des enzymes Nampt et Nmnat dans les astrocytes, suggérant une biosynthèse du NAD^+ au sein des astrocytes. Ces résultats appuient les observations préliminaires effectuées dans mon laboratoire montrant que le messager *Nrk1* est exprimé dans les astrocytes et ce de manière plus importante que dans les neurones (données non présentées). Dans l'ensemble, ces données suggèrent une métabolisation du NR en NAD^+ également dans les astrocytes.

Un autre point très important est le transport des différentes molécules testées à travers la membrane plasmique. Durant mon doctorat, je me suis intéressée au transport du NR par les transporteurs aux nucléosides NTs. Deux membres de la famille des NTs, ENT1 et ENT2, peuvent être inhibés par le dipyridamole, connu pour son rôle de vasodilatateur. Dans le modèle excitotoxique, le dipyridamole inhibe totalement les effets protecteurs du NR et du NMN démontrant que le transport du NR à travers la membrane plasmique se fait par des NTs sensibles au dipyridamole. Dans ce modèle, aucun effet du dipyridamole n'est

observé en ce qui concerne la protection conférée par le NAD^+. Ceci corrobore les données obtenues avec le CMP et suggère fortement que l'effet protecteur du NAD^+ dans ce modèle s'explique par la mise en place d'une autre voie métabolique ou par un transport indépendant du NR. L'existence d'une telle voie dans le SNC est relativement controversée jusqu'à présent. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être formulées dont je vais discuter dans ce paragraphe. Une première hypothèse serait la conversion du NAD^+ en NAM par l'ecto-enzyme CD38 puis le passage du NAM à travers la membrane plasmique. Cependant, cette hypothèse reste peu probable compte tenu de l'effet non protecteur du NAM lors d'un stress excitotoxique. Une seconde hypothèse est le passage direct du NAD^+ à travers la membrane plasmique par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques aux nucléotides. Comme évoqué en introduction, aucun transporteur permettant l'influx de NAD^+ n'a été décrit avec certitude. La connexine 43 a été principalement décrite pour permettre l'efflux de NAD^+. Récemment, l'équipe de H. Nagasawa s'est intéressée à l'influx du NAD^+ à travers des connexines et lors de l'activation de récepteurs purinergiques de type P2 dans des cultures astrocytaires murines (Okuda et al., 2013). Pour rappel, les récepteurs de type P2 peuvent être activés par des nucléotides, en particulier par l'ATP et l'ADP. Dans leur modèle de dégénérescence induite par l'activation des PARPs, ils démontrent que l'entrée de NAD^+ peut être bloquée par l'inhibition de certaines connexines mais ils excluent l'implication du récepteur $P2X_7$, de la connexine 43 et de la pannexine 1 (Px1) en utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces protéines transmembranaires ou par invalidation des gènes par siARN. Ces résultats obtenus au niveau astrocytaire ouvrent de nouvelles voies sur l'importance du métabolisme extracellulaire du NAD^+. Il serait extrêmement intéressant de tester l'implication de ces récepteurs et connexines sur l'entrée du NAD^+ dans les cellules neuronales.

Dans le modèle de déplétion totale en NAD^+, les effets protecteurs du NR, du NMN et du NAD^+ ne sont inhibés que partiellement par l'application de dipyridamole, suggérant que le transport du NR à travers la membrane plasmique peut s'effectuer *via* des NTs non sensibles au dipyridamole. Les résultats obtenus par l'analyse des transcrits des NTs suggèrent une régulation positive des transporteurs ENT2 et ENT4 lors d'une déplétion totale en NAD^+. Or, nous avons vu en introduction que le dipyridamole inhibait essentiellement ENT1 et partiellement ENT2, laissant l'entrée du NR *via* d'autres transporteurs envisageable.

IV. Quelles sont les cibles activées lors de l'augmentation des niveaux de NAD^+ ?

Nous venons de discuter de la complexité du métabolisme du NAD^+ dans les milieux extracellulaire et intracellulaire. Cette complexité se traduit par une diversité des cibles du NAD^+ potentiellement activées lors des modifications de concentrations intracellulaires de NAD^+. Comme mentionné en introduction, le NAD^+ est un acteur essentiel dans le métabolisme énergétique *via* son rôle d'oxydant dans le couple NAD^+/NADH. Qui plus est, le NAD^+ est un substrat crucial des réactions enzymatiques mettant en jeu les sirtuines, les PARPs et les ecto-enzymes CD38/CD157. Le NAD^+ peut influer sur ces réactions selon sa concentration dans les différents compartiments subcellulaires. On peut donc se demander quelles sont les cibles impliquées dans les effets protecteurs du NAD^+ vis à vis de la dégénérescence axonale.

Nous avons vu que les enzymes Nmnat nécessaires à la production du NAD^+ étaient décrites dans différents compartiments subcellulaires. Nmnat1, nucléaire, semble particulièrement importante dans le cadre de la protection contre la dégénérescence axonale puisqu'il s'agit de l'isoforme constitutive de la protéine Wlds, dont le rôle dans la protection axonale a été mis en évidence dans de nombreux modèles de neurodégénérescence. En 2004, l'équipe de J. Milbrandt a montré qu'une des cibles nucléaires du NAD^+ pourrait être SIRT1. En effet, l'invalidation par siARN de SIRT1 diminue les effets protecteurs induit par le NAD^+ sur la dégénérescence axonale induite par axotomie sur des DRG, alors que l'invalidation des autres sirtuines n'a aucun effet (Araki et al., 2004). Cependant, peu de temps après, les travaux menés par Z. He dans un modèle similaire, suggèrent que SIRT1 n'est pas nécessaire pour la protection de la dégénérescence axonale induite par l'application de NAD^+ ou par la surexpression de Nmnat1 ou Wlds (Wang et al., 2005b). En effet, aucune différence dans les quantifications de dégénérescence axonale n'est observée entre des souris $Sirt1^{+/+}$ ou des souris $Sirt1^{-/-}$. Dans un modèle de dégénérescence axonale induit par déplétion en KCl sur des neurones en grains du cervelet (CGN), l'inhibition de SIRT1 par l'Ex527 n'influe pas sur les effets protecteurs du NAD^+ (Magnifico et al., 2013). L'implication de SIRT1 dans la protection de la dégénérescence axonale semble donc controversée. Une hypothèse expliquant pourquoi SIRT1, qui est pourtant une cible privilégiée du NAD^+ dans de nombreux autres modèles dégénératifs (Bai et al., 2011; Cattelan et al., 2014; Cerutti et al., 2014), ne semble pas jouer un rôle dans la dégénérescence de l'axone est l'aspect local du mécanisme

moléculaire mis en jeu. En effet, nous avons vu à plusieurs reprises que l'intégrité de l'axone dépendait d'un mécanisme indépendant et autonome. Dans mon projet, j'ai montré que les axones pouvaient demeurer intègres alors que les corps cellulaires et les dendrites dégénéraient. De plus, Wang *et al* ont montré que l'apport de NAD^+ exogène est susceptible de prévenir de la dégénérescence axonale après déconnexion de l'axone du corps somatique par axotomie (Wang et al., 2005b). L'implication de SIRT1 dans la protection de l'axone dans ce modèle peut donc être mise en doute car il n'y plus de lien physique entre le soma et l'axone et donc SIRT1 ne peut interférer sur des mécanismes ayant lieu au niveau de l'axone. Dans notre modèle de stress excitotoxique, l'implication de SIRT1 peut faire débat car il n'y a pas de déconnexion réelle entre les somas et les axones et la dégénérescence somatique n'est que partielle (environ 50% après 24h de traitement au NMDA 100µM). Nous avons vu que l'intégrité axonale était liée à l'expression de l'enzyme Nmnat2 présente dans le cytoplasme et généralement associée à l'appareil de Golgi. La biosynthèse du NAD^+ peut donc s'effectuer localement au niveau de l'axone et activer des cibles présentes dans le compartiment axonal, telles que SIRT2. Cette sirtuine a principalement été décrite pour son action désacétylase sur les microtubules. Sa surexpression a ainsi été montrée pour abolir l'hyperacétylation des microtubules et diminuer la résistance à la dégénérescence axonale. Au contraire, l'invalidation de *SIRT2* augmente l'acétylation des microtubules et améliore la résistance à la dégénérescence axonale (Suzuki and Koike, 2007). Plusieurs études tendent à montrer que SIRT3, localisée dans la mitochondrie, serait davantage impliquée dans le maintien de l'intégrité axonale. Ainsi, dans son étude sur des CGN, S. Magnifico montre que la surexpression de SIRT3 protège de la dégénérescence axonale (Magnifico et al., 2013). De plus, il a été montré une induction de SIRT3 observée dans des cultures corticales murines soumises à un stress excitotoxique (Kim et al., 2011a). Enfin, nous avons expliqué en introduction que l'effet protecteur du NR dans un modèle de perte auditive était associé à l'activation de SIRT3 (Brown et al., 2014). Ce résultat met en évidence le rôle essentiel de SIRT3 dans les effets protecteurs du NR. L'invalidation de *SIRT1*, *SIRT2* et *SIRT3* par siARN ou par l'utilisation de souris KO nous permettrait de mettre en évidence l'implication relative de ces trois sirtuines dans les deux modèles de neurodégénérescence utilisés pendant mon doctorat. J'ai précédemment indiqué que la mort neuronale non protégée lors du stress excitotoxique rendait peu probable l'implication d'enzymes nucléaires dans le mécanisme de protection. Cependant, lors de l'expérience consistant à étudier l'effet compartimentalisé du NAD^+ et du NR, nous avons constaté que l'effet axo-protecteur était potentialisé lorsque les

deux molécules étaient appliquées dans les deux compartiments. Malgré la dégénérescence du corps cellulaire, ces observations tendent à inclure un effet somatique dans la protection axonale observée. Une hypothèse serait l'activation de PGC-1α par SIRT1, au niveau nucléaire, qui augmenterait alors la biogenèse mitochondriale. Pour vérifier ces hypothèses, j'ai quantifié le nombre et la taille des mitochondries après 24h de traitement avec du NR : ces expériences préliminaires ne montrent pas de différence quant à la taille des mitochondries observées après traitement au NR par rapport au contrôle. Cependant, il semble que le nombre total de mitochondries soit plus élevé dans les neurones traités au NR. Ce résultat montre une biogenèse des mitochondries induite par le NR et suggère l'implication de PGC-1α dans l'effet du NR. Ces données méritent d'être confirmées et des expériences complémentaires sont actuellement en cours (résultats en Annexe 2 : Effet du NR sur la biogénèse mitochondriale). De plus, dans le cas où SIRT1 est impliquée dans l'effet du NAD^+, des travaux ont montré que le gène *sirt3* est une cible du facteur de transcription PGC-1α dans les adipocytes (Giralt et al., 2011). Un effet du NAD^+ via SIRT1/PGC-1α puis une augmentation de SIRT3 pourrait ainsi être envisagé.

Les mécanismes moléculaires mis en jeu par la protection axonale induite par les molécules du métabolisme du NAD^+ sont complexes. Les résultats obtenus pendant mon doctorat permettent de préciser certains aspects de ce mécanisme et ouvrent également de nombreuses perspectives, notamment sur l'amélioration des stratégies neuroprotectrices, préventives et thérapeutiques, liées au maintien des taux de NAD^+ intracellulaires.

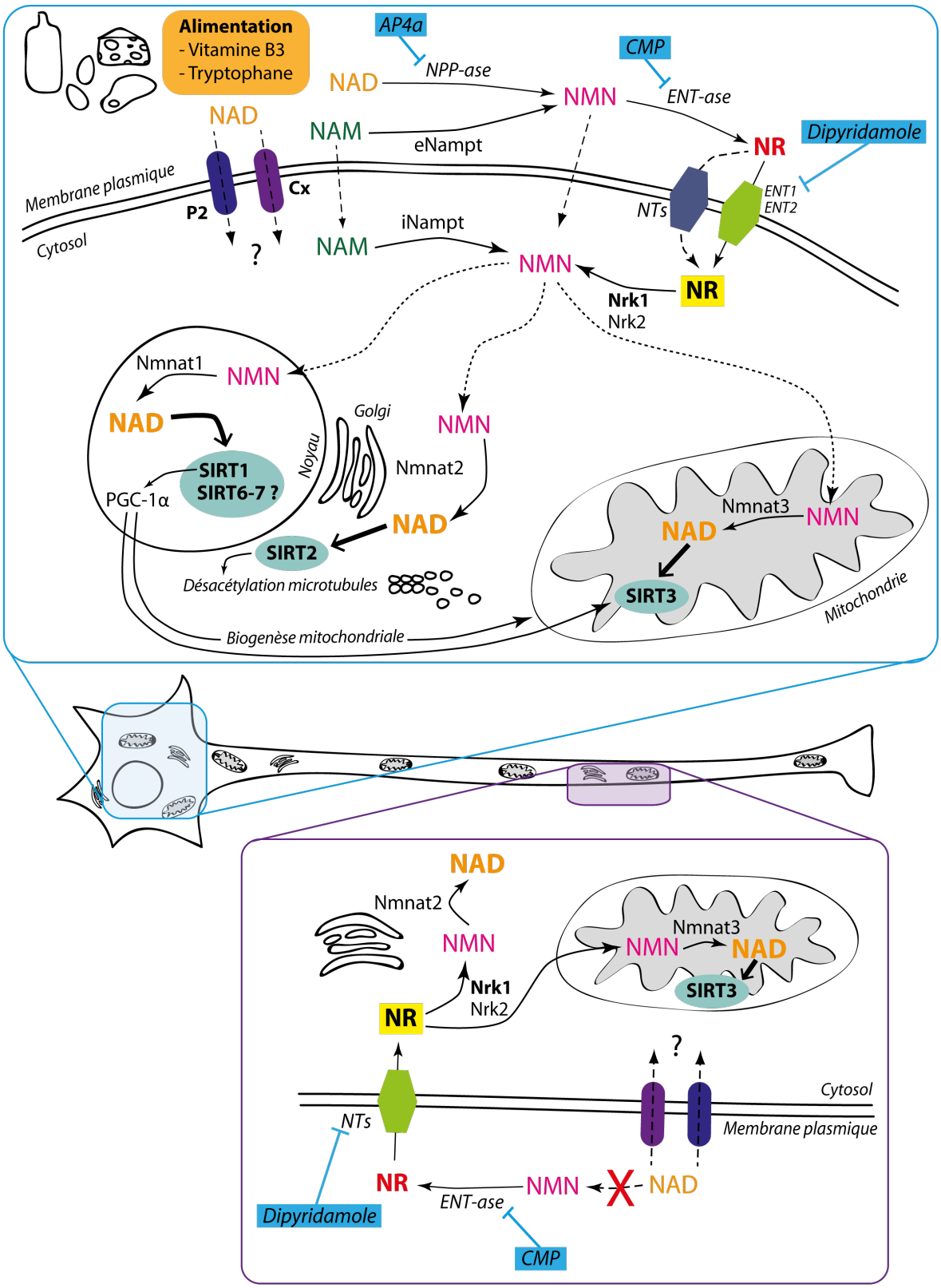


Figure 98 : Métabolisme du NAD$^+$ au niveau axonal et au niveau somatique.

V. Le NR en tant qu'agent thérapeutique

Nous avons également souhaité étudier les effets du NAD^+ et du NR *in vivo*. Pour cela, la collaboration avec D. Vivien et C. Orset du laboratoire « Sérine Protéases et Physiopathologie de l'Unité neurovasculaire » nous a permis de tester l'effet du NAD^+ et du NR lors d'une co-injection intra-corticale avec du NMDA et du NAD^+ ou du NR. Des effets du NAD^+ ont déjà été révélés dans des modèles d'ischémies : l'administration intra-nasale de NAD^+ diminue fortement les lésions cérébrales induites par une ischémie focale transitoire (Ying, 2007). Si le NR s'avère être plus efficace que le NAD^+ dans la neuroprotection dans des modèles d'ischémie *in vivo* proches de la physiologie, cela appuierait le potentiel de l'utilisation du NR en tant qu'agent thérapeutique dans le traitement des AVC par exemple. Malgré les résultats encourageants obtenus *in vivo*, un point reste à discuter. En effet, nous avons vu que le NR ne protégeait pas de la mort neuronale induite par le NMDA *in vitro* mais seulement de la dégénérescence des axones, ce qui suggère que l'effet protecteur du NR sur la lésion induite par injection de NMDA intra-corticale se situerait majoritairement au niveau du neuropile. Cependant, un effet sur la mort somatique dans le modèle *in vivo* ne peut être exclu. Celui-ci pourrait s'expliquer par la présence d'autres types cellulaires en contact avec les neurones des couches corticales touchées, tels que des cellules gliales. Les astrocytes, dont nous avons discuté précédemment, pourraient ainsi représenter un support de potentialisation des effets protecteurs du NR *in vivo*.

Si l'on prend encore plus de recul et qu'on s'intéresse à l'effet du NR dans d'autres modèles neurodégénératifs *in vivo*, plus éloignés de mon projet, nous avons vu que le NR peut avoir des effets protecteurs sur des fonctions biologiques variées. Ainsi, il est capable d'améliorer des déficits cognitifs dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer (Gong et al., 2013), de protéger contre la perte auditive (Brown et al., 2014), et il représente également un traitement efficace contre les myopathies mitochondriales (Khan et al., 2014). Dans ces différentes études, le NR est soit intégré dans l'alimentation des souris, soit injecté de manière intra-péritonéale quotidiennement. La question de l'assimilation du NR est donc soulevée par ces résultats. Puisque le NR a des effets bénéfiques dans ces différents modèles neurodégénératifs, il semblerait que celui-ci puisse traverser la barrière intestinale et la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou qu'il soit converti en des molécules qui le soient. En introduction, nous avons vu que la concentration de NMN dans le plasma sanguin est relativement élevée. Cela suggère que le NMN est relativement stable dans la circulation

sanguine. Cependant, la concentration de NR dans le plasma n'a pas encore été déterminée : est-il métabolisé en NMN à la barrière intestinale ou est-il stable dans le sang ? Aucune étude n'a démontré aujourd'hui sous quelle forme le NR est transporté du tube digestif au cerveau. Parmi les différentes études sur l'effet du NR *in vivo*, certaines ont démontré que l'apport du NR par l'alimentation induit une augmentation des niveaux de NAD^+ dans le cerveau (Gong et al., 2013). D'autres au contraire ne permettent pas d'observer de différence sur les taux de NAD^+ dans le cerveau mais uniquement dans d'autres organes ou tissus périphériques tels que le muscle, le foie et le tissu adipeux brun (Cantó et al., 2012). Le suivi des quantités de NR et de NAD^+ et des autres molécules impliquées dans le métabolisme du NAD^+ dans différents tissus au cours du temps après injection permettrait de préciser ces notions. Même si des étapes de l'assimilation et du métabolisme du NR doivent encore être élucidées, nous savons aujourd'hui que cette molécule, présente en quantité dans le lait et ses produits dérivés, influe sur la biosynthèse du NAD^+ dans l'organisme et agit de manière bénéfique sur l'intégrité neuronale.

Finalement, j'ai montré au cours de mon doctorat que le NR a des effets protecteurs indéniables lors de l'induction de la neurodégénérescence induite par excitotoxicité et par déplétion totale en NAD^+ *in vitro* ainsi que lors d'une injection intracorticale de NMDA *in vivo*. Ce précurseur du NAD^+ relativement peu étudié jusqu'à présent représente donc un agent thérapeutique à fort potentiel. La poursuite des recherches dans ce domaine est indispensable pour améliorer la caractérisation des effets du NR et de son métabolisme dans le SNC.

ANNEXE

I. Annexe 1 : Evolution spatio-temporelle des maladies neurodégénératives

I.1. Dispersion spatiale des stigmates neuropathologiques des maladies

De nombreuses études ont montré que les altérations ne progressent pas uniformément dans le temps et l'espace au cours des maladies neurodégénératives. L'analyse de coupes de cerveaux post mortem de patients atteints de maladies neurodégénératives a mis en évidence que l'accumulation des agrégats protéiques n'est pas non plus homogène dans l'ensemble du cerveau aux stades initiaux des maladies et qu'elle ne progresse pas de manière uniforme non plus. La relation entre dispersion des agrégats protéiques et progression des altérations n'est pas élucidé à ce jour. Cependant, il semble évident qu'étudier la dispersion des agrégats est un moyen pour suivre la progression des altérations et de la maladie.

I.1.a. Dispersion spatiale dans la maladie d'Alzheimer

Nous allons tout d'abord nous intéresser à la dispersion spatiale dans la maladie d'Alzheimer. Celle-ci a été principalement étudiée par l'équipe de Heiko Braak, dont le profil de dispersion tire son nom, même si les premières données datent de 1991 (Arnold et al.). La maladie d'Alzheimer se caractérise par l'accumulation de deux types d'agrégats protéiques : les plaques amyloïdes Aβ et les dégénérescences neurofibrillaires Tau.

H.Braak a décrit 6 stades de progression de la maladie d'Alzheimer selon la progression des agrégats protéiques Tau. La formation des dégénérescences neurofibrillaires (NFTs) commencerait dans le cortex transentorhinal (stade I) et s'étendrait ensuite dans le cortex entorhinal et l'hippocampe (stade II) puis dans les aires associatives adjacentes du néocortex temporal (stade III) pour ensuite progresser plus encore dans les aires associatives néocorticales notamment dans le cortex insulaire (Stade IV), les NFTs s'étendraient ensuite en direction frontale, superolatérale et occipitale et envahiraient la région peristriée (stade V) pour enfin envahir tout le néocortex et les aires striées (Stade VI) (Braak et al., 2006). Des travaux récents ont permis de découvrir des marqueurs des enchevêtrements neurofibrillaires de Tau encore plus précocement sur des cerveaux de jeunes patients, montrant ainsi que la pathologie Tau pourrait être initiée encore plus tôt dans le locus coeruleus avant même d'apparaître dans le cortex transentorhinal (Braak and Del Tredici, 2011).

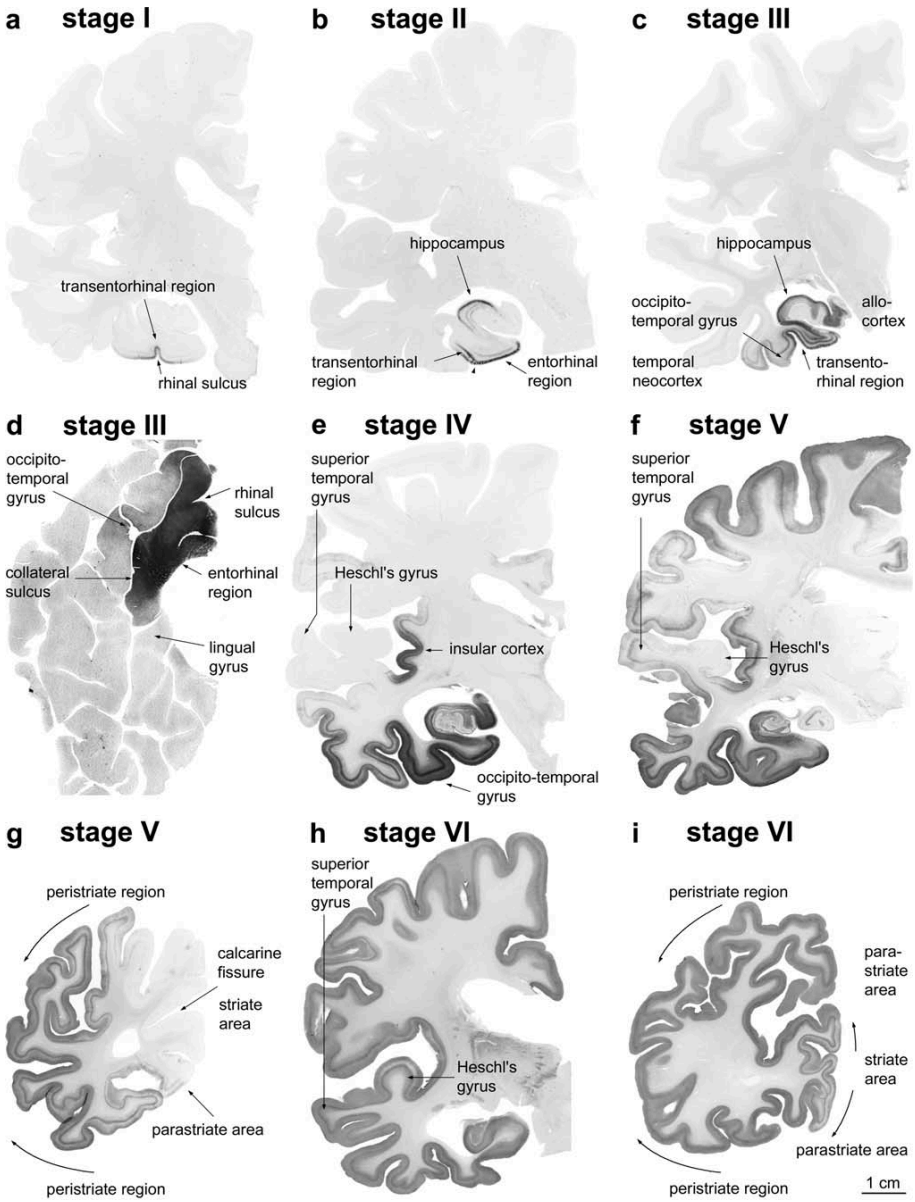


Figure 99 : Profil de dispersion des NFTs dans la maladies d'Alzheimer (immunomarquage contre les NFTs avec l'anticorps AT8 contre Tau phosphorylée) (Braak et al., 2006).

Des études sur des souris transgéniques Alzheimer montrent le même profil de dispersion des agrégats protéiques Tau, initié dans des zones restreintes du cerveau puis s'étendant de manière non uniforme à d'autres régions (Granic et al., 2010; Hurtado et al., 2010).

La dispersion spatiale des agrégats de peptides amyloïdes Aβ a également été étudiée et montre des stades de progression différents. Elle semble initiée dans le néocortex temporal (stade I), puis s'étend ensuite dans la région enthorinal, le cortex insulaire, et l'hippocampe (Stade II). Dans le stade III, elle envahit les régions sous-corticales : noyaux diencéphaliques (notamment le thalamus), striatum, structures cholinergiques du prosencéphale basal. On retrouve ensuite des agrégats dans la substance noire, le noyau rouge, le colliculus supérieur

et inférieur, le noyau olivaire inférieur et la zone réticulaire intermédiaire (Stade IV) qui vont finir par se propager dans le cervelet et d'autres noyaux du tronc cérébral comme le locus coeruleus, le noyau tegmental dorsal, le noyau raphé oral et central (stade V) (Thal et al., 2002).

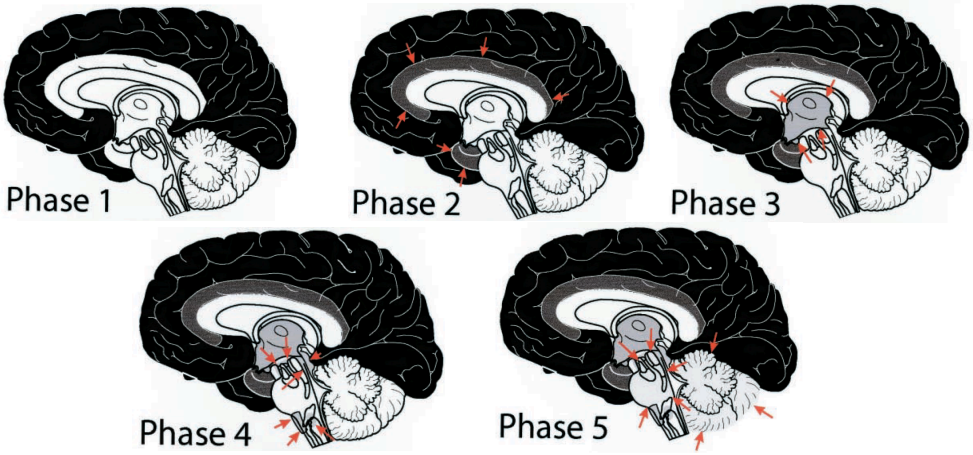


Figure 100 : Profil de dispersion des plaques amyloïdes Aβ dans la maladie d'Alzheimer (Thal et al., 2002)

Il est intéressant de noter que les deux agrégats protéiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer n'ont pas le même profil de dispersion. La relation existant entre l'accumulation de ces deux protéines est sujet à controverse et fait l'objet, encore aujourd'hui, de nombreuses études. De plus, la corrélation entre agrégation protéique, altération neuronale et signes cliniques n'a pas encore été élucidée.

I.1.b. Dispersion spatiale dans la maladie de Parkinson

Nous avons vu que la maladie de Parkinson se manifestait par une dégénérescence ciblée des neurones dopaminergiques présents dans la substance noire et projetant dans le striatum. Cependant l'analyse détaillée de cerveaux post mortem de patients atteints de la pathologie a permis de suivre le profil de dispersion des agrégats d'α-synuclein, composant les corps de Lewy et les neurites de Lewy. L'équipe de H.Braak a ainsi montré une neuropathologie spatialement plus étendue de la maladie de Parkinson. Celle ci serait initiée, dans la plupart des cas, au niveau du système olfactif et gastro intestinal (stade I-II). Les stigmates se dispersent ensuite le long de voies axonales du nerf vagal vers le tronc cérébral jusqu'à atteindre la substance noire (stade III-IV). Puis on retrouve les agrégats protéiques dans les structures mediotemporales et limbiques et en dernier lieu dans le néocortex (stade V-VI) (Braak and Del Tredici, 2008; Braak et al., 2003a, 2003b).

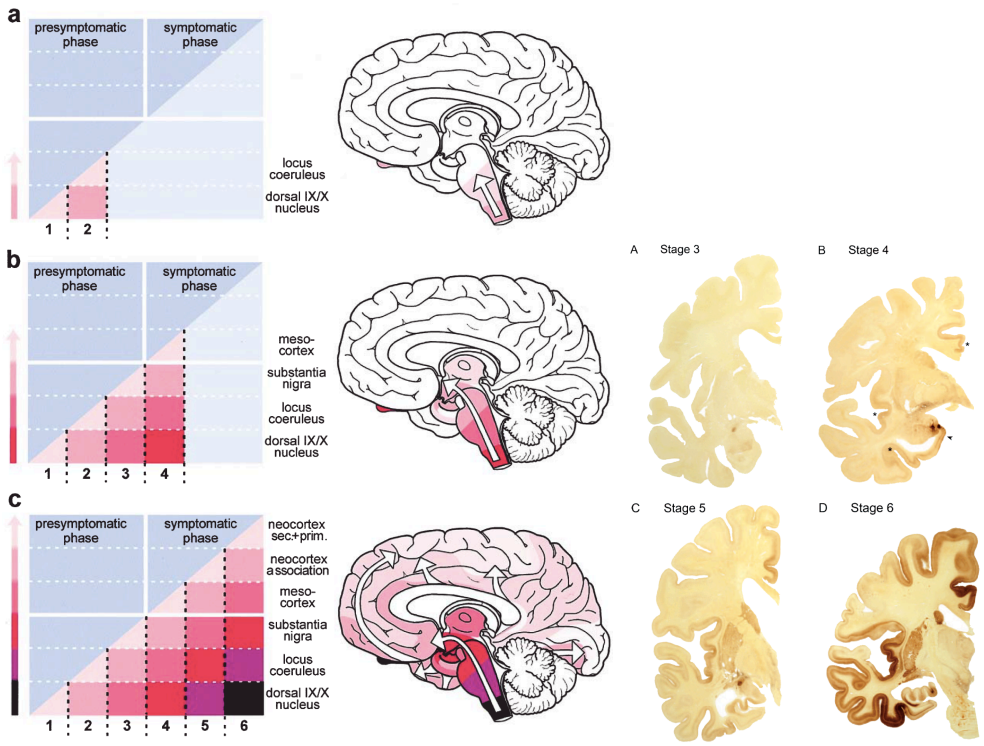


Figure 101 : Profil de dispersion des corps de Lewy (agrégats d'α-synuclein) (Braak and Del Tredici, 2008; Braak et al., 2003a)**.**

Je me suis concentrée sur ces deux maladies neurodégénératives principales car elles ont été les plus étudiées dans ce cadre de dispersion spatiale des agrégats de protéines et des altérations neuronales. Cependant, ces résultats n'excluent pas que la même évolution spatiale non uniforme se retrouve dans d'autres maladies neurodégénératives. De plus, ces données histopathologiques montrent une apparition successive des stigmates dans différentes régions cérébrales mais ne donnent pas d'indications quant aux mécanismes de propagation de ces stigmates.

II. Annexe 2 : Effet du NR sur la biogénèse mitochondriale

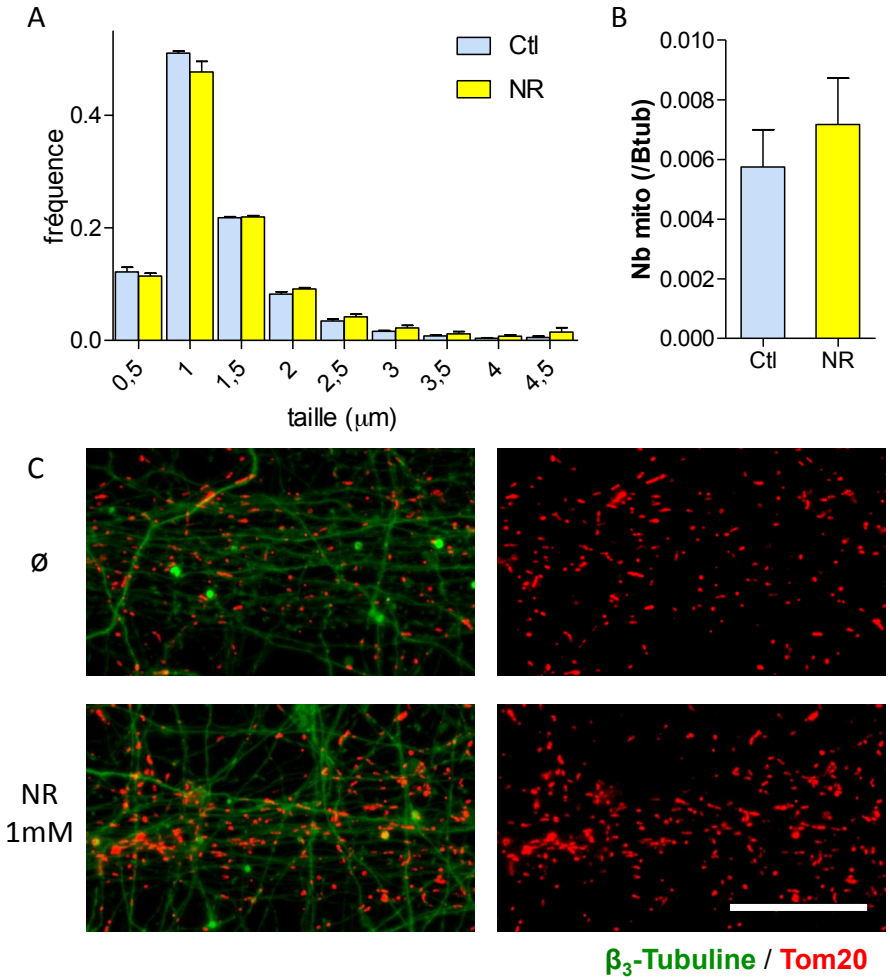


Figure 102 : L'application de NR 1mM pendant 24h induit une augmentation de la biogenèse mitochondriale mais ne modifie pas la taille des mitochondrie. (A) Distribution de taille des mitochondries dans les conditons contrôle et NR 1mM. (B) Quantification du nombre de mitochondries par rapport au marquage de β3-Tubuline. (C) Immunocytochime du compartiment axonal des cellules traitées ou non avec du NR 1mM pendant 24h. Les axones sont marqués à l'aide d'un anticorps dirigé contre la β_3-Tubuline. Les mitochondries sont marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre Tom-20. (échelle = 20µm ; n=2).

III. Annexe 3 : Article publié

β-amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network

Bérangère Deleglise[1,2,3,4†], Sebastien Magnifico[3,4†], Eric Duplus[1,2,3,4], Pauline Vaur[1,2,4], Vanessa Soubeyre[3,4], Morgane Belle[3,4], Maeva Vignes[3,4,5,6], Jean-Louis Viovy[5,6], Etienne Jacotot[1,2,4,7], Jean-Michel Peyrin[1,2,3,4] and Bernard Brugg[1,2,3,4*]

Deleglise et al. Acta Neuropathologica Communications 2014, 2:145

Deleglise *et al. Acta Neuropathologica Communications* 2014, **2**:145
http://www.actaneurocomms.org/content/2/1/145

ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS

RESEARCH Open Access

β-amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network

Bérangère Deleglise[1,2,3,4†], Sebastien Magnifico[3,4†], Eric Duplus[1,2,3,4], Pauline Vaur[1,2,4], Vanessa Soubeyre[3,4], Morgane Belle[3,4], Maeva Vignes[3,4,5,6], Jean-Louis Viovy[5,6], Etienne Jacotot[1,2,4,7], Jean-Michel Peyrin[1,2,3,4] and Bernard Brugg[1,2,3,4*]

Abstract

Introduction: Recent histopathological studies have shown that neurodegenerative processes in Alzheimer's and Parkinson's Disease develop along neuronal networks and that hallmarks could propagate trans-synaptically through neuronal pathways. The underlying molecular mechanisms are still unknown, and investigations have been impeded by the complexity of brain connectivity and the need for experimental models allowing a fine manipulation of the local microenvironment at the subcellular level.

Results: In this study, we have grown primary cortical mouse neurons in microfluidic (μFD) devices to separate soma from axonal projections in fluidically isolated microenvironments, and applied β-amyloid (Aβ) peptides locally to the different cellular compartments. We observed that Aβ application to the somato-dendritic compartment triggers a "dying-back" process, involving caspase and NAD^+ signalling pathways, whereas exposure of the axonal/distal compartment to Aβ deposits did not induce axonal degeneration. In contrast, co-treatment with somatic sub-toxic glutamate and axonal Aβ peptide triggered axonal degeneration. To study the consequences of such subcellular/local Aβ stress at the network level we developed new μFD multi-chamber devices containing funnel-shaped micro-channels which force unidirectional axon growth and used them to recreate *in vitro* an oriented cortico-hippocampal pathway. Aβ application to the cortical somato-dendritic chamber leads to a rapid cortical pre-synaptic loss. This happens concomitantly with a post-synaptic hippocampal tau-phosphorylation which could be prevented by the NMDA-receptor antagonist, MK-801, before any sign of axonal and somato-dendritic cortical alteration.

Conclusion: Thanks to μFD-based reconstructed neuronal networks we evaluated the distant effects of local Aβ stress on neuronal subcompartments and networks. Our data indicates that distant neurotransmission modifications actively take part in the early steps of the abnormal mechanisms leading to pathology progression independently of local Aβ production. This offers new tools to decipher mechanisms underlying Braak's staging. Our data suggests that local Aβ can play a role in remote tauopathy by distant disturbance of neurotransmission, providing a putative mechanism underlying the spatiotemporal appearance of pretangles.

Keywords: Microfluidics, Neuronal network, Axonal degeneration, Tau, Synapse loss

* Correspondence: bernard.brugg@upmc.fr
†Equal contributors
[1]Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), 75005 Paris, France
[2]CNRS UMR 8256, Biological Adaptation and Ageing, Team 5: Degenerative Processes in Neurons and Networks, F-75005 Paris, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2014 Deleglise et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Deleglise et al. Acta Neuropathologica Communications 2014, 2:145
http://www.actaneurocomms.org/content/2/1/145

Introduction

The two main hallmarks of Alzheimer's disease (AD) are extracellular deposits composed of β-amyloid peptide (senile plaques) and intracellular filamentous aggregates composed of self-assembled hyperphosphorylated Tau proteins (neurofibrillary tangles, NFTs). Histopathological studies show that these hallmarks spread, each in their own stereotyped fashion, within specific regions of the brain during disease evolution [1,2]. This progression follows neuro-anatomical pathways and could be the sign of nexopathy-related processes [3]. A large body of evidence indicates that neurons affected in AD follow a dying-back pattern of degeneration, where abnormalities in synaptic function and axonal integrity long precede somatic cell death [4,5]. Since neurons are highly polarized, this raises the question whether local Aβ and Tau protein abnormalities in the vicinity of different neuronal subparts (somatic, dendritic, axonal) lead to local degenerative processes or could initiate distant dysfunction within neurons or even within neuronal networks, through (trans-) synaptic alterations. However, though various mechanisms initiating local primary dysfunctions have been described, the molecular or structural reasons underlying distant breakdown of specific networks and the relationship between amyloid and Tau pathology are still unclear.

Recent advances in the development of microfluidic devices (μFD) facilitate microenvironment development adapted to neuronal structures and subdomains with easy access and control [6,7]. We have previously designed and developed a μFD system to polarize neuronal networks using funnel-shaped micro-channels, also called axonal diodes, allowing the reconstruction of an orientated functional cortico-striatal neuronal network *in vitro* [8]. In the present study, we used a similar μFD-based approach to study the molecular mechanism of neurodegenerative processes in compartmentalized neurons and neuronal networks. By compartmentalizing axon terminals from cell bodies of cortical neurons, we demonstrate that axons are partially resistant to axonal Aβ-peptide exposure, while somatic treatments trigger an anterograde degeneration signal in axons, inducing a *dying-back* pattern. We then reconstructed an oriented cortico-hippocampal network in μFD, and showed that somato-dendritic deposits of Aβ on cortical neurons trigger a rapid cortical presynaptic disconnection concomitant with a glutamate-dependent postsynaptic hippocampal tau-phosphorylation before any axonal and somatic cortical degeneration.

Results

Somato-dendritic exposure of cortical neurons to Aβ-peptide induces an axonal dying back pattern

We wondered whether localized β-amyloid deposition on different subcellular compartments (somato-dendritic or axonal) lead to local degenerative signals or to a global neuronal degeneration. Axons were compartmentalized from the somato-dendritic compartment by seeding cortical neurons in μFD devices comprising two chambers connected through asymmetrical micro-channels (2C-μFD diodes). When seeded in the left chamber, cortical neurons projected their axons from the somato-dendritic compartment to the distal compartment through filtering micro-channels (Figure 1a-a',b). Analysis of dendrites (MAP2, red) and nuclear chromatin visualization (DAPI, blue) indicated that the seeded cortical neurons were healthy after two weeks in culture (Figure 1b, Additional file 1: Figure S1a). Somato-dendritic application of fibrillar Aβ25-35, mimicking amyloid plaques, induced axonal degeneration process (Figure 1c, g). While somato-dentritic application of aggregated Aβ did not affect somatic and dendritic viability (MAP2, red; DAPI, blue; Figure 1c) some local synaptic damage was evidenced in the somatic chamber (MAP2, blue; Vglut1, red; Additional file 1: Figure S1b). Addition of NAD^+, pharmacological inhibitors of c-Jun N-terminal kinases (JNK, SP600125), or caspases inhibitor (z-VAD-fmk), to the axonal compartment significantly reduced Aβ-induced axonal degeneration (Figure 2). In contrast, distal axonal application of aggregated Aβ failed to induce any significant axonal degeneration in our paradigm (Figure 1d-g). Interestingly, while low dose of somato-dendritic glutamate treatment did not trigger axonal degeneration *per se* (Figure 1e-g, tubulin, grey), the combination of distal Aβ application with this sub-toxic dose of glutamate to the somato-dendritic compartment triggered a massive axonal fragmentation (Figure 1f-g). This suggests that axonal resistance toward local Aβ deposition is tightly controlled by the somato-dendritic behavior and that upstream neurotransmitter dysfunction may precipitate neuronal network collapse.

Cortical somato-dendritic β-amyloid peptide exposure induces a rapid disconnection of cortico-hippocampal synapses, which precedes axonal degeneration

To decipher whether local Aβ might induce remote toxic effect on synapses we used 2C-μFD "axonal diodes" chips that allows reconstructing oriented neuronal networks [8], to create a unidirectional cortico-hippocampal network. When primary cortical neurons (Cx) were cultured at high density in the left chamber of the device and hippocampal neurons (Hi) were seeded at low density in the right chamber (Figure 3a), cortical neurons projected axons (Figure 3b-c; α-tubulin, green) through the funnel-shaped micro-channels and established synapses with hippocampal neurons in the right chamber (Figure 3b-d; MAP2, blue; α-synuclein, red). Thanks to the funnel-shaped μ-channels, hippocampal neurons did not project axons backwards. While hippocampal neurons cultured alone showed few presynaptic cluster along their dendritic shaft (insert in Figure 3b and d), Hippocampal neurons grown in contact

Deleglise *et al. Acta Neuropathologica Communications* 2014, **2**:145
http://www.actaneurocomms.org/content/2/1/145

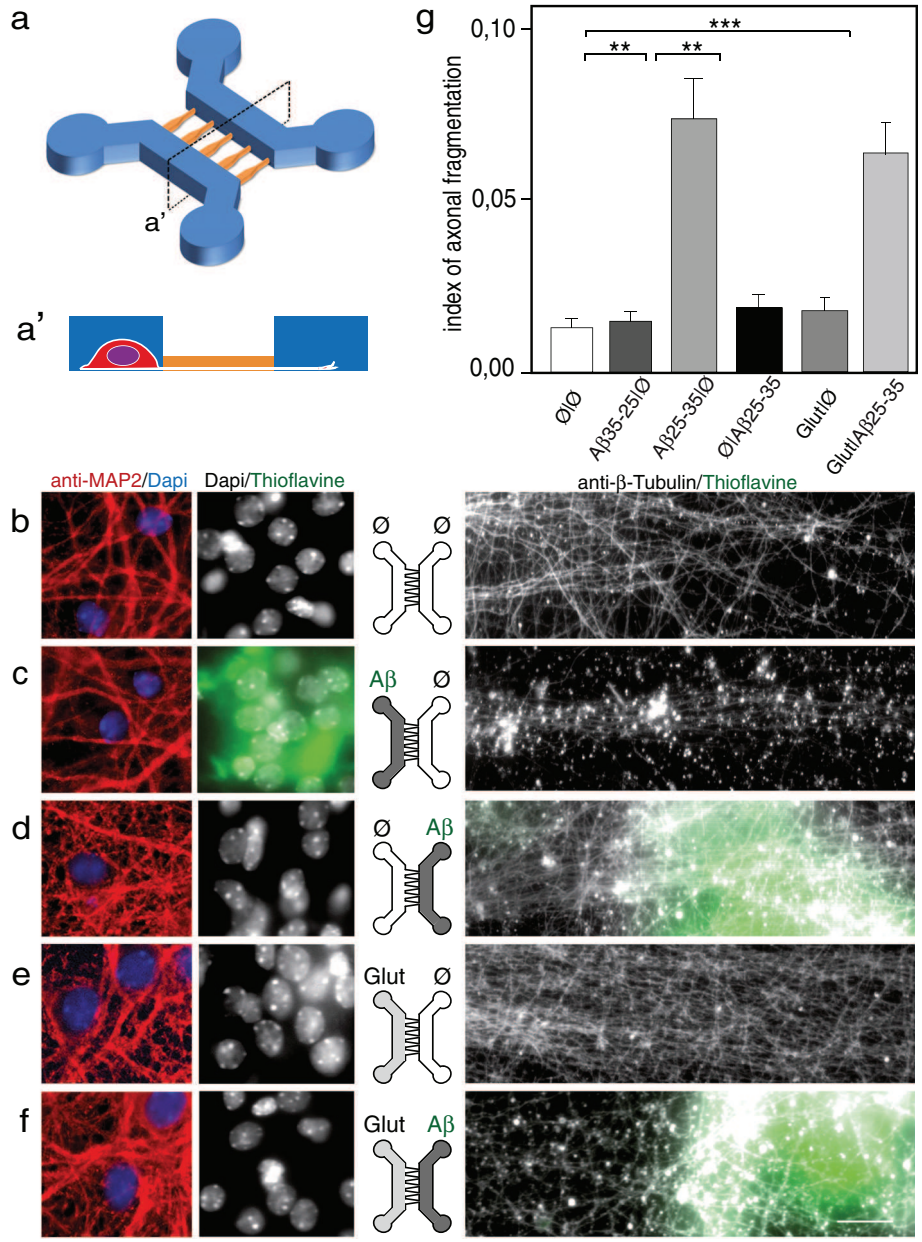


Figure 1 Somatic applications of Aβ peptides induce a dying-back pattern. a. Schematic representation of a two-chamber microfluidic device (2-C μFD) with two cell culture chambers interconnected by funnel-shaped micro-channels [8] (**a'**: cross-section of the microfluidic device. A neuron is represented. Note that only axons can reach the right chamber). **b-f**. Fluorescence microscopy analysis of axonal degeneration vs somatic status after addition of Aβ peptide in the left (soma) vs right (distal part of axons) chambers. Cortical neurons were grown for 12 days in two-compartment chips and each chamber was treated for 48 h with Aβ peptides as indicated. The two left micrographs show the somato-dendritic chamber after staining with anti-MAP2 (red), DAPI (blue) and Thioflavine S (green). The right rectangular micrographs show the distal chamber after immunostaining with anti-α-tubulin and labeling with Thioflavine S. Each central scheme represents the device with indicated localization of treatment (left chamber vs right chamber): **b)** control cultures (Ø/Ø), **c)** somato-dendritic treatment with Aβ 25–35 peptide (Aβ/Ø, 30 μM), **d)** axonal treatment with Aβ 25–35 peptide (Ø/Aβ, 30 μM), **e)** somato-dendritic treatment with glutamate (Glut/Ø, 10 μM), **f)** somato-dendritic treatment with glutamate combined with axonal treatment Aβ 25–35 (Glut/Aβ, 10 μM/30 μM). Scale bar: 20 μm. **g)** Quantification of axonal fragmentation. Aβ25-35, glutamate (Glut), and control Aβ35-25 were added, or not (Ø), to the chamber as indicated. Axonal fragmention index was calculated as described in Methods section (n = 3; **P < 0.01; ***P < 0.001, ANOVA).

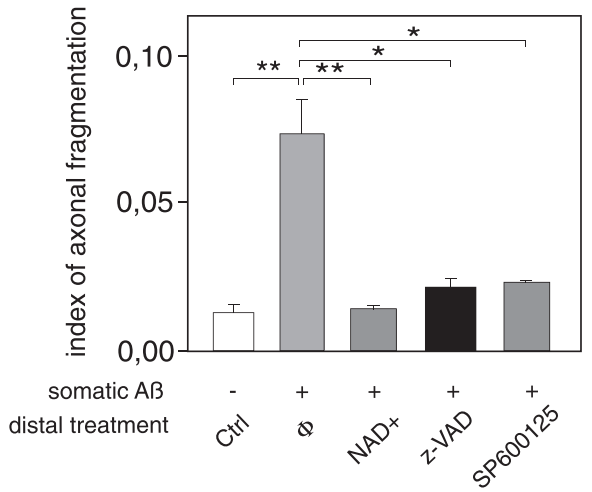


Figure 2 Axonal administration of NAD+, broad-spectrum caspase inhibitor, and JNK inhibitor reduces Aβ-induced axonal degeneration. Cortical (Cx) neurons were cultured for 12 days in μFD chambers as in Figure 1. Somatic Aβ peptide treatment (48 h) induced a strong axonal fragmentation, which could be reversed by pre-treatment of the axonal compartment with 5 mM NAD^+, 50 μM z-VAD-fmk or 50 μM SP600125 (n = 5; *P < 0.01; **P < 0.001, ANOVA).

with cortical fibers showed high density presynaptic clusters as evidenced by dense α-synuclein (Figure 3d) or VGLUT1 (not shown) staining along the hippocampal dendrites. Application of Aβ25-35 peptide to the Cx compartment induced cortico-hippocampal synapse loss in the Hi compartment within 24 h (Figure 3c-e), whereas cortical axons and soma showed no obvious sign of degeneration (Figure 3c). Similar results were obtained with nanomolar doses of oligomeric or fibrillar Aβ1-42 (Figure 3e) suggesting that this process does not rely on the aggregation state of the peptides. While cortical fibers were still intact 24 h after Aβ (peptide or oligomer) application, at 48 h after treatment, connected axons started to degenerate (Figure 4). We thus observed that the first structural alteration following somato-dendritic Aβ deposits is a distant synapse loss that is followed by delayed axonal degeneration, reminiscent of a dying back process.

Selective cortical Aβ peptide exposure induces Tau Thr231 phosporylation in a distant fluidically isolated hippocampal neuron through synaptic NMDA receptor-dependent neurotransmission

It is known that a direct exposure of hippocampal neurons to extracellular soluble Aβ oligomers induce *in vivo* and *in vitro* intracellular Tau hyperphosphorylation ($tauHP^+$) and trigger decreased microtubule stability and NFT formation [9]. We consequently examined whether Aβ deposits (oligomeric or fibrillar Aβ1-42, or Aβ25-35) in the Cx chamber could induce distant post-synaptic Tau phosphorylation in the Hi chamber. The antibody recognizing the phospho-threonine 231 epitope detects one of the earliest phosphorylation changes observed in AD patients [10]. After 24 h of Aβ treatment in the Cx chamber we found that phosphorylation levels of Tau Thr231 increased in post-synaptic hippocampal neurons (Figure 5; pTau T231, pseudo-colors). Tau Thr231 phosphorylation was particularly concentrated in the cell bodies and proximal dendrites of hippocampal neurons, rather than in distal dendrites and axons. This effect appeared to be glutamate dependent as phosphorylation was prevented by hippocampal pre-treatment with the NMDA receptor antagonist, MK801 (Figure 5e). Hence, Aβ-mediated disturbance of glutamatergic neurotransmission and concomitant synapse loss can induce Tau phosphorylation in connected hippocampal neurons and subsequently axonal degeneration of cortical fibers, and therefore initiates progressive neuronal network collapse (Figure 6).

Discussion

A large body of evidence indicates that neurons affected in AD follow a dying-back pattern of degeneration, where such loss of axonal integrity precede somatic cell death and has a profound effect on neuronal network function. However, the molecular mechanism underlying dying-back of neurons and its consequences on the neuronal network in AD remain elusive and difficult to study *in vivo*. Using a new μFD system [8], we modeled for the first time *the* perforant pathway, known to be affected early in AD [1,2]. Somato-dendritic Aβ cortical application within cortico-hippocampal network leads to a rapid presynaptic collapse before cortical axonal or somatic loss [4,5]. Since these synapses were not exposed to Aβ, this suggests that local somato-dendritic Aβ deposits have fast remote toxicity on the unchallenged synapses. This could be due either to a self-propagation [11] and to rapid distribution of Aβ through axonal transport [12] or to the induction of a signal in the soma, which is transmitted through the neuron. We recently described similar distant synapto-toxicity following axotomy [13]. Although no short-term morphological alteration of postsynaptic hippocampal neurons was observed, the Aβ-induced remote loss of cortical presynapses was concomitant to Tau Thr231 phosphorylation in the interconnected postsynaptic hippocampal neurons, and occurred well before axonal and somatic degeneration of cortical neurons. Thus local Aβ deposits generate fast propagation of degenerative signals across networks leading to early dysfunctions in remote areas. Our results show that local somato-dendritic (but not axonal) Aβ triggers distal-to-proximal axonal degeneration before any somato-dendritic abnormalities, a process reminiscent of dying-back pattern observed in various neurodegenerative syndromes [14]. Thus Aβ toxicity depends not only

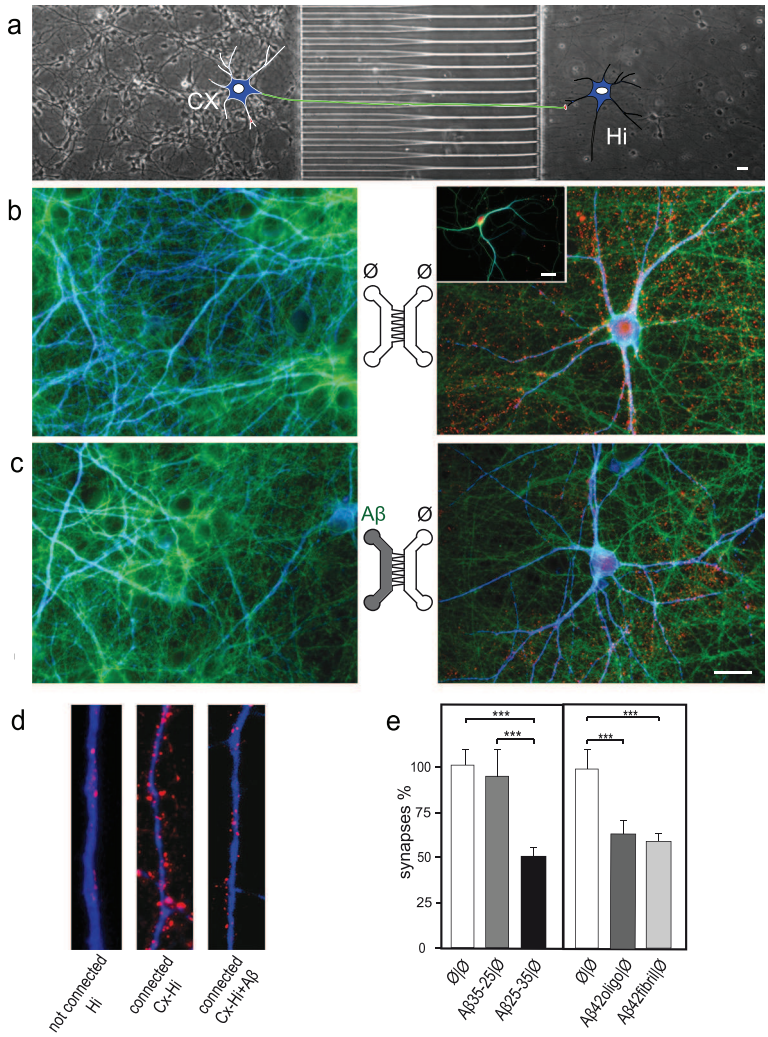


Figure 3 Cortical Aβ-peptide exposures induce early synaptic loss in a reconstructed cortical-hippocampal network. a. Phase contrast picture of the microfluidic device comprising funnel-shaped micro-channels allowing unidirectional axonal growth. Cortical neurons (Cx) were seeded in the left chamber, hippocampal neurons (Hi) in the right chamber, and were cultured for 14 days to reconstruct a cortical-hippocampal network. A cartoon representing one cortical neuron connected to one hippocampal neuron is inserted for clarity. **b-e**. Effect of Aβ42 oligomers and Aβ25-35 peptides on synaptic connections. Cortical and hippocampal neurons were cultured in μFD chambers as shown in a. b,c) Representative fluorescence micrographs from somato-dendritic compartment of Cx neurons (left panels) and from Hi neurons in the distal chamber receiving cortical fibers (right panels). Cx chambers were treated with sham (**b**, Ø/ Ø) or Aβ25-35 (**c**, Aβ /Ø). Neurons, axons and synapses were immunodetected using anti-MAP2 (blue), anti-α-tubulin (green), and anti-α-synuclein (red) respectively. Scale bar: 20 μm. Similar presynaptic patterns were observed with anti-synaptophysin labeling (not shown). **d)** Representative higher magnification showing presynaptic clusters (anti-α-synuclein, red) affixed to hippocampal dendrites (anti-MAP2, blue) in hippocampal neurons cultured alone (Hi) connected as in **b** (Hi-Cx) and connected plus treated with Aβ as in **c** (Hi-Cx + Aβ). **e)** Quantification of presynaptic structures affixed to hippocampal dendrites after cortical exposure to oligomeric Aβ1-42 (10 nM), fibrillar Aβ1-42 (10 nM), Aβ25-35 peptides (10 μM), and Aβ35-25 peptides (10 μM). (n = 3; **P < 0.01; ***P < 0.001, ANOVA).

on direct contact but also on the location of its subcellular deposition. Axons are relatively resistant to direct Aβ exposure, which is in line with our recent observation showing that axonal endings are resistant to direct pro-apoptotic insults [6]. Our observation with JNK and caspase pharmacological inhibitors suggest that both enzyme families are implicated locally (within axon) in the process of axonal degeneration, as already observed with other neuronal death inducers [6]. We also shows, for the first time, that axonal addition of NAD^+ is protective against Aβ-peptide induced axonal degeneration (Figure 2). Since NAD^+ is a well-established axo-protectant in the context of Wallerian degeneration, this raises the question whether there might be a NAD_+ controlled molecular pathway implicated in both Aβ-induced axon degeneration and Wallerian degeneration. Therefore NAD^+ related

Deleglise *et al. Acta Neuropathologica Communications* 2014, **2**:145
http://www.actaneurocomms.org/content/2/1/145

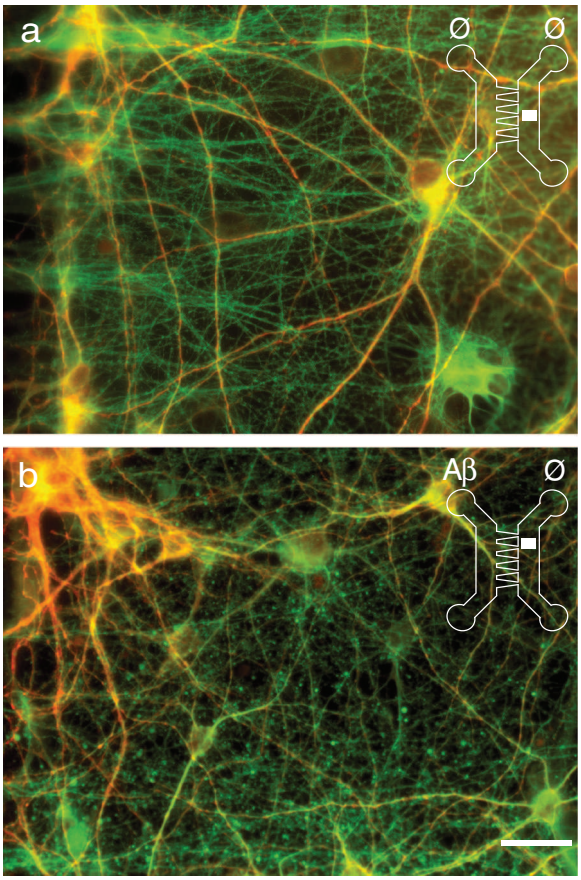


Figure 4 Exposure of cortical somata to Aβ-peptide induces an axonal loss in a reconstructed cortical-hippocampal network. Cortical (Cx) and hippocampal (Hi) neurons were cultured for 14 days in μFD chambers as in Figure 2. Hippocampal neurons and projecting cortical axons were immunodetected using anti-MAP2 (red), anti-α-tubulin (green). Cx chambers were treated with sham (**a**, Ø/ Ø) or 10 μM Aβ42 oligomers (**b**, Aβ /Ø) for 48 hours. Representative fluorescence micrographs from the distal hippocampal chamber receiving cortical fibers. Scale bar: 20 μm.

pathways might offer interesting targets to slow down dying back induced processes.

In some AD patients, increased Aβ is associated with complex disturbances of neuronal activity (e.g. epileptic activity) [15] and neurotransmission dysfunctions have been described in early phases of AD models [16,17]. Such local circuit disturbance might potentially lead to a broader network disruption in remote areas through neuronal projections. Interestingly, we observed that a mild somatic glutamatergic stress exacerbates distant axonal toxicity of Aβ. This suggests that cumulative and multi-focal stresses might play an important role in disease progression, by switching from local (and probably recoverable) minor dysfunctions to extended neuronal alterations like permanent synaptic, axonal or even cell bodies loss. Several non-exclusive mechanisms may account for AD-related spatiotemporal progression in the brain. This may involve neurotrophic factors withdrawal, aberrant neurotransmission, synaptic loss, excitotoxicity and prion-like spread of pathogenic misfolded proteins like trans-synaptic spread of Aβ [3]. Interestingly, in our paradigm, blocking NMDA receptors on hippocampal neurons during cortical somato-dendritic Aβ treatment prevented Tau Thr231 phosphorylation. These results are consistent with studies reporting that Aβ could potentiate potassium-evoked glutamate release from neurons [18,19].

Conclusion

While brain complexity, with its interconnected neuronal loops, complicates the *in vivo* analysis of pathophysiological initiation and spreading mechanisms, we were able for the first time to evaluate the distant effects of local cortical β-amyloid deposits on neuronal subcompartments and networks in μFD-based reconstructed cortico-hippocampal networks. We show that a strictly local somato-dendritic amyloid trigger is sufficient to recapitulate a dying-back process, and to initiate an oriented neuron-to-neuron progression of pathological events. Aβ peptide accumulation in the somato-dendritic compartment of cortical neurons leads to a fast anterograde propagation of degenerative signals toward endings, resulting in presynaptic collapse. This fast loss of cortical presynapses is associated with early trans-synaptic dysfunction such as NMDAR-dependent tau phosphorylation in postsynaptic hippocampal neurons. Hence, reconstructed cortico-hippocampal μFD networks offer a new tool to decipher mechanisms that could underlie dying back and Braak's staging.

Methods

Primary culture in microfluidic chips

Microfluidic chips were realized as described in [8]. The design used for network reconstruction comprises two culture chambers each connected to two reservoirs and separated by a series of 500 μm-long asymmetrical micro-channels (3 μm high, tapering from 15 μm to 3 μm) [8]. E16 embryos (Swiss mice, Janvier, France) were micro-dissected in GBSS (without $CaCl_2$ and $MgCl_2$) + 0.1% glucose (Merck), digested with papain (20U/mL) and mechanically dissociated in DMEM containing DNAse. 120.10^3 cortical cells and 45.10^3 hippocampal cells were seeded in the chamber on contact with the wide and narrow sides of micro-channels, respectively. Cells were cultured in DMEM glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (PAA), N2, streptomycin/penicillin and B27 (Invitrogen). The culture medium was renewed every 3–5 days. Cortical axon entered the micro-channels and reached the hippocampi-containing chamber in 4–5 days. The cortico-hippocampal oriented network was maintained routinely up to 2–3 weeks *in vitro*.

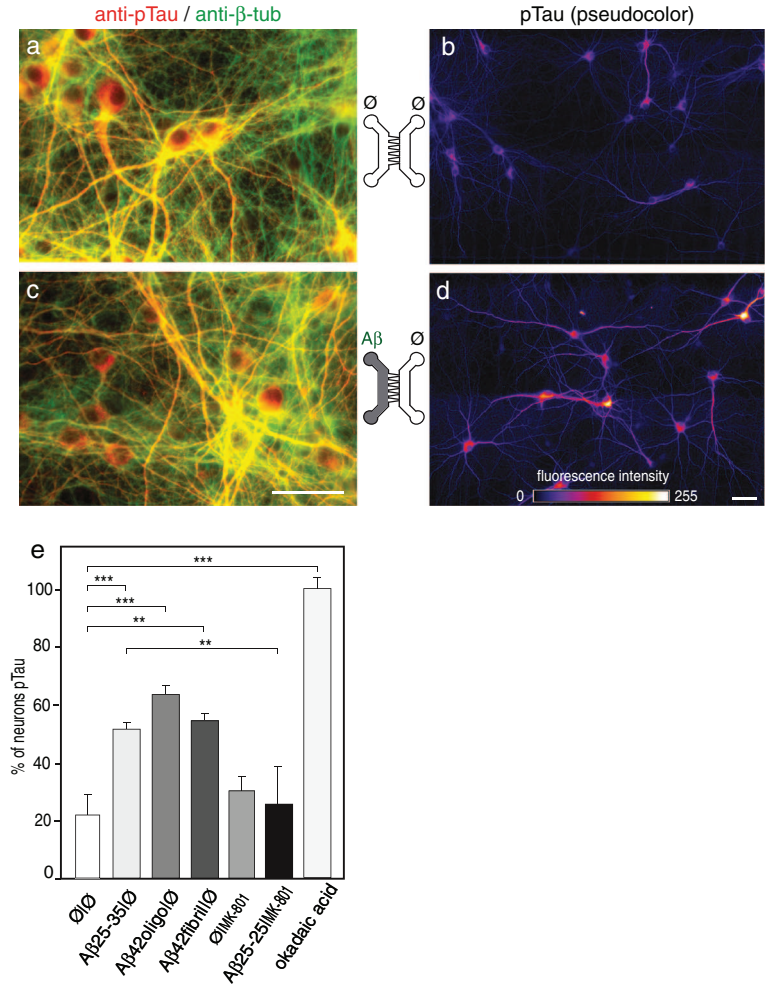


Figure 5 Cortical Aβ peptide deposition induces glutamate-dependent hippocampal Tau phosphorylation. Cortical (Cx) and hippocampal (Hi) neurons were cultured in μFD chambers as in Figure 2a. **a**,**c**. Representative fluorescence micrograph ofcortical neurons (left μFD chamber) after immunostaining of phosphorylated Tau (pTau Thr231, red; β-tubulin, green). Effect of Aβ42 oligomers and Aβ25-35 peptides on synaptic connections. Cortical and hippocampal neurons were cultured in μFD chambers as shown in a. b,c) Representative fluorescence micrographs from somato-dendritic compartment of Cx neurons (left panels) and from Hi neurons in the distal chamber receiving cortical fibers (right panels). **b**,**d**. Representative fluorescence micrograph of hippocampal neurons receiving cortical axons after immunostaining of pTau (Thr231; pseudo-colors). **b)** Control conditions (Ø/Ø), **d**) cortical treatment with Aβ25-35 (10 nM) for 24 h. Scale bar: 20 μm. **e**. Quantification of pTau-positive hippocampal neurons after 24 h cortical exposure to fibrillar Aβ25-35, oligomeric Aβ42 or fibrillar Aβ42 (10 nM, each) in the presence or absence of the NMDAR antagonist MK801 (10 μM). The results were compared to pTau-positive neurons induced by exposure of Hi neurons to okadaic acid (1 nM, 24 h) (n = 3 **P < 0.01; ***P < 0.001, ANOVA).

Oligomeric and fibrillar Aβ peptide preparations

Oligomeric and fibrillar forms of Aβ1-42 (Tocris Bioscience, MN, USA), were produced according to [20] and controlled by electron microscopy (Additional file 2: Figure S2). Briefly, lyophilized peptides were solubilized at 1 mM in 1, 1, 1, 3, 3, 3,-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma Aldrich). After 30 min of incubation at RT, HFIP was evaporated overnight and peptides were dried (Speed Vac, 1 h 4°C). Then, Aβ peptide stock solution were obtained byresolubilizationet 5 mM in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich). To obtain oligomers, Aβ stock solution was diluted at 100 μM in phenol-free DMEM-F12 medium (Life technologies), incubated 24 h at 4°C and centrifuged at 20 000 g (10 min; 4°C) before supernatant (soluble Aβ fraction) collection. To obtain fibrils, Aβ stock solution was diluted at 100 μM in HCl 10 mM and then incubated at 4°C for 24 h.

Electron microscopy

Aβ sample aliquots (10 μM) were allowed to adsorb onto carbon-coated 200-mesh copper grids (EMS, PA, USA) for 2 minutes before blotting off. Then, grids were incubated for 45 seconds in uranyl acetate 2.5% (w/v) to

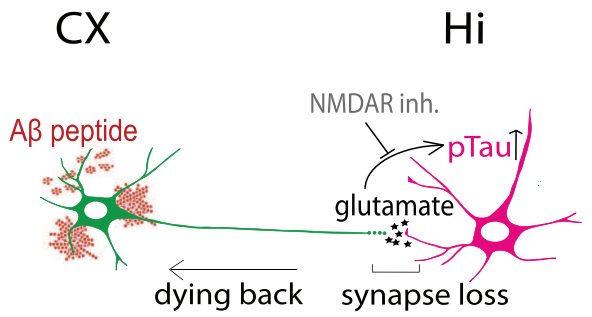


Figure 6 Hypothetical model of synaptic, post-synaptic and axonal pathological events induced by Aβ in a cortico-hippocampal neuronal network. β-amyloid application to the somato-dendritic compartment triggers a so-called "dying-back" leading to a rapid cortical presynaptic loss concomitant with a post-synaptic hippocampal Tau-phosphorylation which could be prevented by the NMDA-receptor antagonist, MK-801, before any sign of axonal and somato-dendritic cortical alteration.

produce a negatively stained protein loaded grid. Images were recorded on a Zeiss 912 omega electron microscope (Carl Zeiss Group, Oberkochen, Germany).

Treatments

The following compounds were used: Aβ1-42 peptide (1428, Tocris), Aβ25-35 peptide (H-1192, Bachem), control Aβ35-25 peptide (H2964, Bachem), glutamate (G8415, Sigma), MK-801 (0924, Tocris),5 mM NAD^+ (Sigma), 50 μM z-VAD-fmk (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and 50 μM SP 600125 (Sigma). Oligomeric and fibrillar forms of Aβ1-42 were produced according to [20] and controlled by electron microscopy. To ensure fluidic isolation between compartments, a hydrostatic pressure difference was generated by over-pressurizing the non-treated chamber as described in [21].

Immunofluorescence detection

Cultures were fixed (4% PFA, 20 min RT) and immunostained as described in [13]. Primary antibodies included anti-α-tubulin-FITC (F2168, sigma), anti-MAP2 (M4403, Sigma), anti-Synaptophysin (S5768, Sigma), anti-Vglut1, anti-α-synuclein (4179, cell signaling), anti-pTau Thr231 (44746G, Invitrogen). Species-specific secondary antibodies (coupled to Alexa 350, 488, 555) were used (Invitrogen). Images were acquired with an Axio-observer Z1 (Zeiss) fitted with a cooled CCD camera (CoolsnapHQ2, Ropert Scientific) and images were analyzed using ImageJ.

Quantification of axonal fragmentation

For axonal fragmentation analysis and quantification we used fluorescence microscopy (immuno-detection of tubulin), phase contrast, and picture analysis according to a previously described protocol [22]. Briefly, we used a macro developed in NIH ImageJ software that utilizes the Otsu thresholding algorithm, and a particle analyzer algorithm of ImageJ. The total area of axonal regions with circularity greater than 0.9 was determined and normalized by the total axonal area, which was measured from the thresholded image. This ratio, termed fragmentation index, is an indicator of the average axonal fragmentation level and is used in statistical comparisons. Indices of 0.005, 0.083, and 0.157 correspond to <5%, 50%, and >95% fragmentation, respectively.

Quantification of synapse loss

Synaptic disconnection was assessed through fluorescence microscopy by counting α-synuclein clusters affixed to MAP2 positive hippocampal dendrites. Images were all obtained with the same acquisition parameters. The images were similarly processed with ImageJ software before being used for quantification: the brightness/contrast of all control images was optimized manually to eliminate the background and to maximize the signal. The means of the minimum and maximum intensities were then calculated in the control condition, after which these settings were applied to all images. The images of the three α-synuclein/α-Tubulin/MAP2 stainings were merged and the resulting image was used to define the zone where hippocampal dendrites were sufficiently innervated by cortical fibres. α-synuclein/MAP2 merges were then used for quantification.

Quantification of Tau phosphorylation

Tau phosphorylation was assessed by counting the number of neurons presenting pTau levels above a fixed threshold. Images were all obtained using the same acquisition parameters. The images were similarly processed with ImageJ software before being used for quantification: the brightness/contrast of all control images was optimized manually to eliminate the background and to maximize the signal. The means of the minimum and maximum intensities were then calculated in the control condition, after which these settings were applied to all images. All pTau images were then processed with the "Lookup Tables, fire" plugin to visualize the intensity of pTau staining with pseudo-colours. The number of neurons above a fixed colour threshold was then counted and normalized by the total number of neurons to have the percentage of hyperphosphorylated tau neurons.

Statistical analysis

Differences were assessed by ANOVA, followed, when appropriate, by a post-hoc Bonferoni test. For all analysis * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p–value < 0.001.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Dendritic morphology of cortical neurons before and after Aβ peptide treatment. Cortical (Cx) neurons were cultured for 14 days in μFD chambers as in Figure 1. Dendrites and

pre-synaptic clusters of cortical neurons were immuno-detected using anti-MAP2 (blue), anti-VGLUT1 (red). Cx chambers were treated with sham (**a**, Ø/ Ø) or 10 μM Aβ42 oligomers (**b**, Aβ /Ø) for 48 hours. Representative fluorescence micrographs of the cortical chamber are shown. Scale bar: 20 μm.

Additional file 2: Figure S2. Aβ morphology analysed by electron microscopy. Negative stain of TEM images of either Aβ1-42 oligomers **(a)** or fibrils **(b)** and Aβ25-35 aggregates **(c)**.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments
This work was supported by "Foundation plan Alzheimer 2010-13", ANR "PrionSensiTNF: Blan-1312-02" 2011–14 and ANR "Neuroscreen: 2011-RPIB-008-01" 2012–16. B.D. was funded by an MNRT fellowship.

Author details
[1]Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), 75005 Paris, France. [2]CNRS UMR 8256, Biological Adaptation and Ageing, Team 5: Degenerative Processes in Neurons and Networks, F-75005 Paris, France. [3]CNRS UMR 7102, Neurobiologie des Processus Adaptatifs, F-75005 Paris, France. [4]Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 6, F-75005 Paris, France. [5]Institut Curie, Laboratory of Macromolecules and Microsystems in Biology and Medicine, F-75005 Paris, France. [6]CNRS UMR 168, F-75005 Paris, France. [7]Institute of Reproductive and Developmental Biology, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK.

Received: 16 August 2014 Accepted: 14 September 2014
Published online: 25 September 2014

References
1. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretzschmar H, Del Tredici K (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. Acta Neuropathol 112(4):389–404
2. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology 58(12):1791–1800
3. Warren JD, Rohrer JD, Schott JM, Fox NC, Hardy J, Rossor MN (2013) Molecular nexopathies: a new paradigm of neurodegenerative disease. Trends Neurosci 36(10):561–569
4. Terry RD (2000) Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol 59(12):1118–1119
5. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ (2007) Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. Neurology 68(18):1501–1508
6. Magnifico S, Saias L, Deleglise B, Duplus E, Kilinc D, Miquel MC, Viovy JL, Brugg B, Peyrin JM (2013) NAD + acts on mitochondrial SirT3 to prevent axonal caspase activation and axonal degeneration. FASEB J 27(12):4712–4722
7. Millet LJ, Gillette MU (2013) New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. Trends Neurosci 35(12):752–761
8. Peyrin JM, Deleglise B, Saias L, Vignes M, Gougis P, Magnifico S, Betuing S, Pietri M, Caboche J, Vanhoutte P, Viovy JL, Brugg B (2011) Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. Lab Chi 11(21):3663–3673
9. Mairet-Coello G, Courchet J, Pieraut S, Courchet V, Maximov A, Polleux F (2013) The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of Abeta oligomers through Tau phosphorylation. Neuron 78(1):94–108
10. Luna-Munoz J, Chávez-Macías L, García-Sierra F, Mena R (2007) Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 12(4):365–375
11. Jucker M, Walker LC (2013) Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. Nature 501(7465):45–51
12. Song HL, Shim S, Kim DH, Won SH, Joo S, Kim S, Jeon NL, Yoon SY (2014) beta-amyloid is transmitted via neuronal connections along axonal membranes. Ann Neurol 75(1):88–97
13. Deleglise B, Lassus B, Soubeyre V, Alleaume-Butaux A, Hjorth JJ, Vignes M, Schneider B, Brugg B, Viovy JL, Peyrin JM (2013) Synapto-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. PLoS One 8(8):e71103
14. Adalbert R, Coleman MP (2013) Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. Neuropathol Appl Neurobiol 39(2):90–108
15. Palop JJ, Mucke L (2009) Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. Arch Neurol 66(4):435–440
16. Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L (2007) Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. Neuron 55(5):697–711
17. Palop JJ, Mucke L (2010) Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. Nat Neurosci 13(7):812–818
18. Kabogo D, Rauw G, Amritraj A, Baker G, Kar S (2008) ss-amyloid-related peptides potentiate K + –evoked glutamate release from adult rat hippocampal slices. Neurobiol Aging 31(7):1164–1172
19. Liang Z, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX (2009) Dysregulation of tau phosphorylation in mouse brain during excitotoxic damage. J Alzheimers Dis 17(3):531–539
20. Stine WB, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ (2003) In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. J Biol Chem 278(13):11612–11622
21. Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL (2005) A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. Nat Methods 2(8):599–605
22. Kilinc D, Peyrin JM, Soubeyre V, Magnifico S, Saias L, Viovy JL, Brugg B (2011) Wallerian-like degeneration of central neurons after synchronized and geometrically registered mass axotomy in a three-compartmental microfluidic chi. Neurotox Res 19(1):149–161

doi:10.1186/s40478-014-0145-3
Cite this article as: Deleglise *et al.*: β-amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. *Acta Neuropathologica Communications* 2014 **2**:145.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

IV. Annexe 4 : Article en soumission à Journal of Cell Biology

Nicotinamide riboside but not NAD^+ strongly delays axonal degeneration in excitotoxicity

Pauline Vaur[1], Mathias Mericskay[1,2], Zhenlin Li[1], Denis Vivien[3], Cyrille Orset[3], Etienne Jacotot[1], Bernard Brugg[1] and Eric Duplus[1]

1 Sorbonne Universités, Université Pierre & Marie Curie (UPMC), CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS),Unité Mixte de Recherche "Biological Adaptation and Ageing" (UMR8256), Paris, France
2 Université Paris-Saclay, Inserm, Université Paris Sud, Unité Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire, Châtenay-Malabry, France
3 Université de Caen Normandie, Inserm, GIP Cycéron, Unité Sérine Protéases et Physiopathologie de l'Unité Neurovasculaire, Caen, France

Correspondence should be addressed to
Eric DUPLUS,
Laboratoire Adaptation Biologique et Vieillissement, UMR 8256,
Université P. & M. Curie-CNRS, case courrier 12,
9 Quai St Bernard, 75005 Paris, France.
Phone number: +33 1 44 27 25 01; Fax number: +33 1 44 27 26 69
E-mail: eric.duplus@upmc.fr

Condensed Title
NAD^+ and NR in excitotoxicity-induced axonal degeneration

ABSTRACT

NAD^+ depletion is a common phenomenon in neurodegenerative pathologies. Excitotoxicity occurs in multiple neurological disorders and NAD^+ was shown to prevent neuronal degeneration in this process but its role is still debated. Also, recent description of extracellular NAD^+ conversion to nicotinamide riboside (NR) in cell lines raises interest about NR effect. Here, we showed that intracortical administration of NR but not NAD^+ reduced brain damage induced by NMDA co-injection. Using cortical neurons, we also found that extracellular NR delayed NMDA-induced axonal degeneration (AxD) with a very strong efficiency compared to extracellular NAD^+ suggesting that NAD^+ and NR effects involve independent mechanisms. Surprisingly, using an inhibitor of NAD^+ biosynthesis FK866, both NAD^+ and NR were able to prevent from neuronal death and AxD, with the same efficiency. In this case, NAD^+ effect is dependent of its extracellular conversion to NR that is further metabolized inside the cell. Taken together, our findings demonstrate that NR is a better neuroprotective agent than NAD^+.

Key words: *NAD^+, Nicotinamide riboside, Axonal degeneration, excitotoxicity, FK866*

INTRODUCTION

Axonal degeneration (AxD) is an early and major event in acute cerebral injury and in chronic neurodegenerative diseases, such as Alzheimer and Parkinson diseases (Benarroch, 2015; Burke and O'Malley, 2013; Kanaan et al., 2013; Selkoe, 2002). Preserving axonal integrity, by stopping neurodegenerative expansion and preventing irreversible neuronal damages, could represent a new therapeutic strategy in brain disorders prevention. Several evidences support that AxD proceeds *via* a mechanism different of neuronal cell body death, and could be associated with nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) metabolism (Araki et al., 2004; Magnifico et al., 2013; Sasaki et al., 2006; Wang et al., 2005b). Few decades ago, a spontaneous mutation named *Wlds,* which delayed axotomy induced AxD in neurons derived from the peripheral nervous system (PNS), was discovered in mice (Lyon et al., 1993). *Wlds* codes a fusion protein Wlds that contains nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (Nmnat) 1 complete sequence, an enzyme involved in NAD^+ biosynthesis from nicotinamide mononucleotide (NMN) (Coleman and Freeman, 2010). Since then, several studies revealed a protective effect of Nmnat overexpression or exogenous NAD^+ application in axotomy induced AxD in the PNS (Araki et al., 2004; Sasaki et al., 2006; Wang et al., 2005b; Yahata et al., 2009). The molecular cascade and the time course of events in AxD have been recently explored intensively. Axonal lesion in dorsal root ganglia induces a loss of Nmnat2 expression and SARM1 activation, triggering MAPK signaling pathway, NAD^+ depletion and subsequent AxD (Gerdts et al., 2013, 2015; Gilley and Coleman, 2010). These results highlight the essential role of NAD^+ metabolism in AxD of PNS-derived neurons. Whether a similar relationship exists between NAD^+ metabolism and AxD in the central nervous system (CNS) has been poorly explored yet.

A strong NAD^+ depletion in neurons has been recently revealed during excitotoxicity (Kim et al., 2011a; Liu et al., 2008, 2009a; Zhang et al., 2010). Excitotoxicity is a common process taking place in most neurodegenerative disorders affecting CNS and is the main cell death mechanism involved in ischemia and hypoxia. Moreover, excitotoxicity has been shown to

induce AxD in CNS-derived neurons (Chung et al., 2005; Hosie et al., 2012). Essential role of NAD^+ biosynthesis during excitotoxic stress was confirmed by studies demonstrating a neuroprotective effect of NAD^+ repletion *via* NAD^+ biosynthesis enzymes overexpression or application of either extracellular NAD^+ or its precursors (Bi et al., 2012; Kim et al., 2011a; Liu et al., 2009a). In this paper, we aim to investigate and characterize the role of NAD^+ metabolism in axonal integrity in CNS-derived neurons during excitotoxicity. As exogenous NAD^+ transport across plasma membrane is very controversial, extracellular NAD^+ protective effect has been recently described to be due to its extracellular conversion to one of its biosynthesis precursors, nicotinamide riboside (NR) (Nikiforov et al., 2011; Di Stefano et al., 2014). This extracellular conversion pathway is mediated by ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP-ase) and ectonucleotidase (ENT-ase) activities, already characterized for extracellular ATP conversion (Zimmermann, 2000). No current studies have investigated whether extracellular NAD^+ conversion to NR is required for NAD^+ protective effect regarding excitotoxicity induced AxD in CNS-derived neurons. Examining NR involvement in NAD^+ protective effects could provide clarification on this matter and highlight therapeutic benefit of this NAD^+ precursor. Indeed, NR is a component of vitamin B3, recently characterized in yeast and mammals (Bieganowski et al., 2004) and present in milk and dairy products (Trammell et al., 2016). NR could enter the cells through nucleoside transporters (NT), and then be converted to NMN and NAD^+ through the action of NR kinases (Nmrk1/2) and Nmnat enzymes respectively. Few studies highlight NR protective effect in neurons, thus raising interest on this molecule. It has been reported that NR delays AxD after axotomy in dorsal root ganglion neurons (Sasaki et al., 2006). More recently, NR has been shown to confer protection against noise-induced hearing loss and prevents neurite retraction of inner hair cells (Brown et al., 2014). NR positive effects have also been examined in mouse model of Alzheimer's disease where alimentation with NR prevents cognitive decline and amyloid-b peptide aggregation in the pathology (Gong et al., 2013).

In this paper, we performed a comparative study of NAD^+ and NR effect and examined NAD^+ extracellular conversion in cortical neurons during an excitotoxic stress. We found that NR has a strong protective effect on NMDA-induced neurodegeneration, both *in vitro* and *in vivo*. More specifically, NR, but not NAD^+, had a strong effect on NMDA-induced AxD involving a local NR metabolism within the axon. This result is supported by the examination of the extracellular pathway suggesting that NAD^+ efficiency in AxD protection is impaired in excitotoxicity, due to a NAD^+ limited conversion to NR.

RESULTS

NMDA treatment on neuronal cell bodies induces neuronal death and axonal degeneration

In order to study NAD^+ and NR protective effects on AxD, we cultured cortical neurons in microfluidic devices comprising three chambers connected to each other (Deléglise et al., 2013). When seeded in the left chamber, cortical neurons projected their axons from the proximal to the distal chamber through asymmetrical filtering micro-channels, whereas the somata and dendrites were confined in the left chamber. As a consequence of such compartimentalization the right chamber of the microfluidic device contained only axons. The central chamber, if down pressurized, acts as a sink or siphon and ensures optimal fluidic isolation of the distal axonal and somato-dendritic chambers (Fig. 1a,b).

Analysis of dendrites (MAP2, red),

nuclear chromatin (Hoescht 33342, blue) and axons (β3-Tubulin) indicated that the seeded cortical neurons were healthy after two weeks in culture (Fig. 1c).

Somato-dendritic application of 100µM NMDA in the proximal chamber induced dendrite degeneration, visualized by a loss of MAP2 immunostaining and nuclear condensation associated with a severe AxD visualized by the punctiform pattern of β3-Tubulin immunostaining observed in the distal chamber (Fig. 1c-g). By contrast, local application of NMDA to axons in the distal chamber had no effect on neurons, according to the fact that NMDA receptors (NMDAR) are exclusively localized at the somato-dendritic compartment (Hosie et al., 2012) (Fig. 1e-g). NMDAR involvement in NMDA-induced neurodegeneration was confirmed by using the non-competitive NMDAR antagonist MK-801. Both nuclear condensation and AxD after 8h NMDA treatment were fully blocked by the co-addition of 10 or 50 µM MK-801 (Fig.1h,i).

NR has a stronger neuroprotective effect than NAD^+ during excitotoxicity both *in vitro* and *in vivo*

To evaluate and compare the potential neuroprotective properties of NAD^+ and NR, cortical neurons were co-treated with 100 µM NMDA in the presence or absence of 5 mM NAD^+ or 1 mM NR. Then, nuclear condensation and AxD were quantified over time. As shown in figure 2a, after 24h of treatment, no inhibition of dendrite degeneration (MAP2) nor inhibition of nuclear condensation were observed after NAD^+ or NR treatment whereas both molecules delayed AxD (Fig. 2a-c). NAD^+ protection was weak (67% of protection compared to NMDA effect after 8h of treatment, 22% after 24h) whereas NR fully protected axon after 8 hours and still provided 72% protection after 24h NMDA treatment (Fig. 2c). NAD^+ and NR efficiencies were also compared carrying out a dose-range assay in cortical neurons co-treated with 100 µM NMDA during 24h (Fig. 2d). NAD^+ started to delay AxD from 5 mM when NR was efficient from a ten times weaker dose (0.5 mM) (33% *vs* 43% of protection) with a maximum effect at 1mM. We asked whether the absence of protection of NAD^+ and NR on NMDA-induced nuclear condensation was due to the high-dose of NMDA (100 µM) leading to strong deleterious effects. Then, we challenged 5 mM NAD^+ or 1 mM NR with a lower 10 µM NMDA concentration during 24h (Fig. S1). A lower nuclear condensation was observed with 10 µM NMDA (30%) compared to that obtained with 100 µM NMDA (53%) but neither NAD^+ nor NR had any protective effect on this phenomenon.

Considering different neuroprotective effects of NAD^+ compared to NR in our excitotoxicity model *in vitro*, we then asked if NAD^+ and NR could have neuroprotective effect in an *in vivo* excitotoxicity experimental setting. For this purpose, we carried out co-injection of NMDA (5 nmol) and NAD^+ or NR (50 nmol each) into mouse cortical structures as described before (Jullienne et al., 2011). Surprisingly, the volume of the NMDA-induced lesion as measured by magnetic resonance imaging (MRI) was significantly reduced after NR co-injection, whereas NAD^+ did not reveal a significant protection (Fig.2e,f).

Thus, NR has a more potent neuroprotective effect than NAD^+ in NMDA-induced neurodegeneration both *in vitro* and *in vivo*.

NR has a local protective effect mainly restricted to axonal compartment

Previous results have shown that NAD^+ is able to delay Wallerian degeneration after axotomy on PNS derived neuronal cells. Furthermore, both NAD^+ and Wlds protein prevent AxD in a soma-independent fashion (Cohen et al., 2012; Wang et al., 2005b). Since NAD^+ and NR protect exclusively AxD in our model, we wondered if NAD^+ and NR act locally at the axonal level or also depend on

the somatic compartment. NAD^+ or NR were applied either on both compartments or either on somato-dendritic or on axonal compartment simultaneously with somato-dendritic addition of 100 µM NMDA. Axonal application of NR partially protected axons from NMDA-induced degeneration (50% protection), whereas somato-dendritic application did not prevent it (Fig.3a-f). Local NAD^+ treatment revealed no significant protective effects (Fig. 3g), but for both molecules NR and NAD^+ the protection was increased or detected when applied on both compartments respectively. These findings indicate that local axonal treatment with NAD^+ or NR is required for axono-protection, and that somatic NAD^+ or NR treatment is not sufficient to fully prevent AxD, however helps to increase axonal protection induced by axonal treatment.

NR is converted to NAD^+ in cortical neurons

We next explored the assumption that NR protective effect could be related to its intracellular conversion to NAD^+ (Fig. 4a). First, we asked whether NR enters into cortical neurons to be further metabolized to NAD^+. NR is a nucleoside supposed to cross plasma membrane through NT as it was previously described in other cells (Nikiforov et al., 2011; Di Stefano et al., 2014). Among all NT isoforms already identified, analysis of expression of their corresponding mRNA in our neuronal cell culture model indicated that all equilibrative nucleoside transporter (ENT1-4) transcripts were expressed (Fig. 4b). However, none of concentrative nucleoside transporter (CNT1-3) mRNA could be detected. Dipyridamole (DP) was described as a potent pharmacological inhibitor of both ENT1 and to a lesser extent ENT2 activities (Griffith and Jarvis, 1996). Furthermore, NR cell entry was prevented using DP in human cell lines (Nikiforov et al., 2011). Co-treatment of cortical neurons with 100 µMNMDA, 1 mM NR and 50 µM DP almost completely prevented NR-induced axonal protection (axonal protection decreased by 68%, from 88% to 20%), suggesting that NR axo-protective effect requires DP-sensitive transport through plasma membrane (Fig. 4c). Intracellular NR could be converted to NAD^+ involving first NMN synthesis catalyzed by Nmrk1/2 (Fig.4a). We analyzed Nmrk1 and Nmrk2 mRNA expression by RT-qPCR from both specific mouse brain areas and from cortical neurons in culture. We showed in figure 4d that Nmrk1 mRNA was constitutively expressed in all tissues whereas Nmrk2 mRNA was absent in all brain areas (cortex, hippocampus, cerebellum) (Fig. 4d). However, Nmrk2 transcript was highly expressed in heart and striated skeletal muscles as described previously (Cantó et al., 2012). Nmrk1 but not Nmrk2 mRNA was also expressed in cultured cortical neurons (Fig. 4e). Nmrk2 mRNA has been shown to be induced in PNS neurons after sciatic nerve axotomy (Sasaki et al., 2006). To investigate a potential induction of Nmrk2 after an excitotoxic insult in cortical neurons, Nmrk2 mRNA was quantified after 100 µM NMDA treatment for 24h. We found a very low induction of Nmrk2 transcript but a significant 4-fold increase of Nmrk1 mRNA. NMN, the product of Nmrk1/2 is a well-known substrate for Nmnat enzymes leading to NAD^+ biosynthesis. We next evaluated NAD^+ levels in neurons during excitotoxic challenge. A treatment of cortical neurons with 100 µM NMDA treatment for 24h induced intracellular NAD^+ decrease by 36% and this effect was reverted by co-treatment with 1 mM NR (Fig. 4f). Altogether, these results suggest that extracellular NR conversion into intracellular NAD^+ is an important pathway to maintain axoplasmic NAD^+ level which in turn could delay excitotoxicity-induced AxD.

Extracellular NAD^+ involve different pathway from NR to prevent excitotoxicity-induced AxD

Extracellular NAD^+ has a lower axo-protective effect compared to NR in our model. As reported previously in cell lines and PNS

derived neuronal cells, NAD^+ can be converted extracellularly to NMN by ENPP-ase and then to NR by 5'-ENT-ase (Fig. 5a). We wondered if either extracellular conversion of NAD^+ to NR is required for NAD^+-mediated axonal protection or if this effect is independent of NR action. For this purpose, we investigated ENT-ase activity in cortical neurons, using high concentration of cytidine monophosphate (CMP), a competitive inhibitor of this enzyme (Zimmermann, 2000). First, we co-treated or not cortical neurons with 100 µM NMDA and 5 mM NMN for 24h. We showed that extracellular NMN significantly reduced NMDA-induced AxD (58% of protection) and that 25mM CMP reversed the protective effect of NMN (Fig. 5b). This result indicates that NMN needs to be converted to NR to mediate axonal protection. NMN effect was also prevented when cortical neurons were co-treated with NMDA and the ENT1/2 inhibitor DP confirming that NMN is converted to nucleoside NR before to be transported through plasma membrane to prevent NMDA-induced AxD. Surprisingly, both CMP and DP had no effect on the axonal protection conferred by NAD^+ (Fig. 5c), suggesting that NAD^+ conversion to NR is not required to explain NAD^+ protective effect. Regarding all these results, we showed that NAD^+ and NR involve different mechanisms of action to prevent excitotoxicity-induced AxD.

<u>NAD^+ and NR protect neurons with the same efficiency after FK866-induced NAD^+ depletion</u>

Among all the isoforms of ENPP-ase and 5'-ENT-ase, some are described to be expressed in the CNS and could be regulated depending of physiological or neurodegenerative conditions (Gómez-Villafuertes et al., 2014).

To test whether the extracellular conversion of NAD^+ to NR efficiency does explain the difference between NAD^+ and NR in axonal protection level, first we compared NAD^+ and NR neuronal protection efficiency in another well known neurotoxic insult. Actually, we induced NAD^+ depletion by using FK866, a specific inhibitor of the enzyme Nampt involved in nicotinamide (NAM) to NMN conversion (Fig. 6a) (Hasmann and Schemainda, 2003). Application of 10 µM FK866 to the somato-dendritic compartment, performed over 72 hours, induced a rapid decrease of NAD^+ levels from 24h of treatment in cortical neurons (Fig. 6b). This drop in NAD^+ level induced nuclear condensation and AxD after a 72h FK866 treatment (Fig. 6c,d). Co-treatment of cortical neurons with 10 µM FK866 and NAD^+ or NR (50 µM) fully prevented both nuclear condensation and AxD (Fig. 6d-f). In addition, it is very interesting to note that efficient NAD^+ and also NR concentrations were lower than those used in the NMDA-induced neurodegeneration model (50 µM for both in FK866 model and 5 mM NAD^+ or 1 mM NR for NMDA model) (Fig. 2a-d ; Fig. 6d-f). These results suggest that both NAD^+ and NR could use different ways to prevent degenerative processes between the NMDA and FK866 stresses. NAD^+ and NR remained fully protective when applied 24h post-treatment while NAD^+ depletion was already observed, but dropped to 20% of protection when applied 48 hours later (Fig. 6e,f). These findings highlight the existence of a short time lapse where neuronal integrity can be rescued even if neurotoxic insult already occurred. Taken together, these data show that NAD^+ and NR have the same neuroprotective effect in FK866-induced NAD^+ depletion.

<u>Extracellular NAD^+ conversion into NR is needed to prevent FK866-induced neurodegeneration</u>

We next evaluated the metabolic pathway from extracellular NAD^+/NMN/NR to intracellular NAD^+ in FK866-induced neurodegeneration model. First, cortical neurons were co-treated with 50 µM FK866, 50 µM NR and 50 µM DP for 72h and axonal fragmentation was investigated. DP prevented only partially NR protective effect (axonal

protection reduced by 40%) when this effect was totally prevented in NMDA stress (Fig. 4c and 7a). This discrepancy suggests that, when FK866 is used, NR could be transported by different NT, some of them that are not inhibited by DP. As previously described, NAD^+ and NMN, also prevented FK866-induced neurodegeneration and, in the same way as NR, these effects were partially prevented by DP (Fig. 7b-c). Altogether these results indicate that extracellular NAD^+, NMN and NR need some DP-sensitive but also DP-insensitive NT. As NAD^+ may use the same NT as NR, we wondered if both extracellular NAD^+ and NMN need to be converted to NR before to be transported through plasma membrane. This hypothesis was further confirmed as CMP fully blocked the axo-protective effect of NAD^+ and NMN indicating that both molecules need 5'-ENT-ase activity to be converted to nucleoside and mediate their axo-protective effect (Fig. 7b-c). All these results demonstrate that NAD^+, NMN and NR use a similar pathway to prevent FK866-induced neurodegeneration when NAD^+ uses a different mechanism from NR in NMDA condition.

DISCUSSION

NAD and NR protective effect in excitotoxicity

Excitotoxicity is a process commonly described in several brain disorders, such as stroke, traumatic brain injuries or neurodegenerative diseases (Alzheimer, Parkinson, etc.). High glutamate release activates ionotropic glutamate receptor, as NMDAR, and triggers disruption of ion homeostasis, leading to energetic dysfunction and oxidative stress. Major events related to excitotoxicity are therefore mitochondrial dysfunction, NAD^+ depletion and metabolic deregulation. Moreover, neuronal stress induced DNA damages lead to PARP activation and emphasize NAD^+ depletion. Therefore, NAD^+ metabolism implication in excitotoxicity needed to be further characterized.

Few *in vitro* studies already highlighted interest of NAD^+ and its precursors, as well as NAD^+ biosynthesis enzymes (Nampt/PBEF, Nmnat), in excitotoxicity induced neuronal degeneration prevention (Bi et al., 2012; Ghosh et al., 2012; Kim et al., 2011a; Liu et al., 2009a; Verghese et al., 2011; Wang et al., 2014b). Nevertheless, all these results are very confused and dependent of the excitotoxicity model. For instance, exogenous NAM only protects neuronal degeneration after 6h or 12h of glutamate/NMDA treatment but has no more significant effect after 24h (Liu et al., 2009a). Furthermore, only weak NAD^+ protective effects have been observed regarding neuronal sustainability after 100 µM glutamate application, even with strong NAD^+ doses up to 15 mM (Bi et al., 2012; Wang et al., 2014b). Our results showing neither NAD^+ nor NR protective effects on NMDA induced somatic degeneration seems therefore consistent with these previously described studies. Surprinsingly, our work demonstrated that NR and NAD^+ have differential effects on NMDA induced AxD *in vitro*. Actually, NR at a dose of 1 mM is highly efficient to prevent AxD when NAD^+ 5 mM is weaker. We observed a similar result *in vivo* where NR injection, but not NAD^+, significantly reduces NMDA-induced lesions (Fig. 2e-f). Our result is very interesting regarding CNS-derived neurons as extracellular NAD^+ and also NR were demonstrated protective in PNS-derived neurons injured by axotomy (Sasaki et al., 2006). Cellular and molecular mechanisms involved in AxD are not fully described yet and may depend on lesions or pathological conditions. Several studies have already highlighted a specific mechanism, distinct from somatic degeneration process, where NAD^+ metabolism is essential (M. Coleman et al., 2011). NR-induced NAD repletion highlights how NAD^+ is an important parameter during excitotoxicity-induced AxD

mechanism. Indeed, NR enters the cell through NT, and is then converted to NMN and NAD^+, in compliance with NAD^+ level measurement performed in our study (Fig. 4c, f). Intracellular NR could be metabolized to NMN by two isoforms of Nmrk (Nmrk1/2). Previous results have described that Nmrk2 mRNA is induced after sciatic nerve lesion and this induction could be involved in further NR metabolism to prevent AxD (Sasaki et al., 2006). We have shown that Nmrk1 mRNA is induced by NMDA treatment and that Nmrk2 is also slightly induced by NMDA or FK866 treatment (Fig. 4e & Fig. S2). However, NR is always able to prevent nuclear condensation and AxD in KO Nmrk2 mice-derived neurons treated with FK866 10 µM for 72h indicating that Nmrk2 is not involved in NR metabolism and effect (Fig. S2).

Recent study on PNS-derived neurons injured by axotomy reveals a fall in cytoplasmic Nmnat2 leading to axonal NMN accumulation, described as deleterious and accelerating AxD (Di Stefano et al., 2014). In our model, no NMN or NR toxicity has been observed. On the contrary, we report strong axonal protection with both molecules, supporting total conversion of NR to NAD^+ and suggesting no Nmnat2 alterations. This hypothesis was confirmed by analysis of different *Nmnat* mRNA in cortical neurons treated or not with NMDA 100µM for 3h and 24h. We showed that all transcripts coding Nmnat 1-3 are expressed with a higher level for Nmnat2 and Nmnat3. Moreover, all isoforms are induced after 24h of treatment (Fig. S3). All these results suggest that NMN may not be toxic because it is further converted to NAD^+ by Nmnat enzymes.

Our model present similarities with axotomy, where NAD^+ metabolism is essential for axonal integrity, as we observed NAD^+ repletion and local NR effect, but NAD^+ depletion is not the only factor involved in NMDA-induced AxD. Indeed, FK866-induced NAD^+ depletion leads to AxD only after 72h of treatment whereas AxD is observed after 24h NMDA treatment, suggesting that NAD^+ depletion is crucial but not sufficient to induce AxD in excitotoxicity.

Optimal NAD^+ and NR axo-protective effect are observed when drugs are applied on both compartments, suggesting axonal protection potentiation through a somatic signal. Indeed, only 40 to 50% of nuclei are reported to be condensed after NMDA treatment and intact somas could therefore mediate a positive signal to the axons. Mitochondria transport within the axon was recently shown to participate to axonal integrity (Zhou et al., 2016). Hence, we might assume that an increase of mitochondria biogenesis and/or an axonal transport of mitochondria have a role in NAD^+ and NR effects.

<u>NAD to NR extracellular conversion</u>

Very strong NAD^+ concentrations are needed for NAD^+ axonal protective effects. Indeed, we show that 5 mM NAD^+ is required for a limited NMDA induced AxD prevention (33%) (Fig. 2g) when 15 mM NAD^+ leads to only 65% of protection. It could be explained by difficulty for NAD^+ to be transported through plasma membrane. Indeed, no NAD^+ transporters have been identified in mammals yet. In 1999, NAD^+ increase after extracellular NAD^+ treatment was firstly observed in cell lines but no direct NAD^+ transport has been characterized (Zocchi et al., 1999). Meanwhile, evidences suggest that connexin 43 hemichannel could be involved in NAD^+ influx and efflux through plasma membrane (Bruzzone et al., 2000), as ^{32}P radiolabeled NAD^+ was shown to enter the cells. Nevertheless, a prior conversion of NAD^+ to another molecule, which would then enter the cells could not be excluded.

Recently, extracellular NAD^+ to NR conversion and NR transport through NT have been reported in cell lines and PNS-derived neurons (Nikiforov et al., 2011; Di Stefano et al., 2014). Extracellular conversion of NAD^+ to NAM by ADP-ribose synthase CD38 has also

been described. Nevertheless, this pathway could be excluded in excitotoxicity model as NAM exogenous application has no significant effect on NMDA-induced AxD (Fig. S4).

We show that CMP, a potent ENT-ase competitive inhibitor, can block NMN axo-protective effect (67% inhibition), suggesting that NMN to NR conversion and ENT-ase activity are essential in AxD prevention. Surprinsingly, no inhibition of NAD^+ effect by CMP is reported. So, the weak NAD^+ axo-protective effect could be due to its direct transport by hemichannels or connexin like transporters or by another pathway, not described yet. However, NAD^+ axo-protective effect in FK866 induced NAD^+ depletion paradigm is almost fully inhibited by CMP (87% inhibition) indicating that extracellular NAD^+ to NR conversion seems to be dependent on neurotoxic processes. Considering that NMN conversion to NR is essential in both systems, it seems that ENPP-ase activity could be determinant in NAD^+ extracellular conversion. Few hypotheses could clarify differences observed between excitotoxicity model and NAD^+ depletion paradigm. Specific subcellular localization of ENPP-ase activity at somatic level could explain why NAD^+ cannot be converted to NR when somatic degeneration is observed, as in excitotoxicity stress (Fig. 8). On the other hand, total neuronal integrity conferred by NAD^+ in FK866 induced neuronal degeneration show that extracellular NAD^+ can be converted to NR at somatic level. Another hypothesis could be the regulation of ENPP-ase activity or expression according to neuronal stresses. ENPP2 neuronal expression has already been shown induced in neuron-astrocyte co-cultures in some specific stress conditions (Freitas et al., 2010). A negative regulation of ENPP-ase activity by NMDA could explain the differential effects between NAD^+ and NR observed both *in vitro* and *in vivo*.

Finally, it is interesting to note differences in efficient concentrations used for NAD^+ and its precursors in the two neurotoxic systems studied in this paper. Indeed, efficient doses of NAD^+, NMN and NR against NMDA induced AxD are around millimolar whereas weaker doses from 50 µM are sufficient to prevent FK866 induced neuronal degeneration (Fig. 2d & Fig.6,7). Neuronal cells seem therefore more sensitive to NAD^+ and its precursors in FK866 induced NAD^+ depletion paradigm. Potentiation of NR transport in this model could explain these observations. We showed that DP, able to specifically inhibit ENT1 and to a lesser extent ENT2, blocks almost totally NR effects in NMDA induced AxD (Fig. 4c). However, DP inhibition of NR effect in FK866 paradigm is less effective (40%) (Fig. 7b). In this context, DP-insensitive NT, not present or inactive in NMDA induced excitotoxicity, could mediate NR transport when FK866 is applied. Indeed, several NT have been characterized and can mediate different nucleoside transport (Young, 2016). Hence, NR transport could depend specifically on some NT. ENT2 and ENT4 mRNA induction observed after 72h FK866 treatment in our system deeply support this hypothesis (Fig. S5).

In summary, our study reveals strong NR protective effect on AxD in both *in vitro* and *in vivo* excitotoxic models. We demonstrate for the first time that excitotoxicity induced AxD in CNS-derived neurons is dependent on NAD^+ level, as it has been previously attested in PNS-derived neurons injured by axotomy. Extracellular NAD^+ can be converted to NR by ecto-enzymes present in CNS, but specific neurotoxic conditions, such as excitotoxicity, could impair this extracellular conversion and limit NAD^+ AxD prevention conferring further interest for the development of NR-based therapies.

MATERIALS AND METHODS

Microfluidic chip production

The three compartment chip master ("3C") was constructed as described before (Deléglise et al., 2013). For chip production, polydimethylsiloxane (Sylgard 184, PDMS, Dow Corning, Midland, MI, USA) was mixed with a curing agent (9:1 ratio) and degassed under vacuum. The resulting preparation was poured onto a polyester resin replicate and reticulated at 70 °C for, at least, 2 hours. The elastomeric polymer print was detached and 2 reservoirs were punched for each macro-channel. The polymer print and a glass cover slip, previously cleaned with isopropanol and dried, were treated for 3 minutes in an air plasma generator (98% power, 0,6mBar, Diener Electronic, Ebhausen, Germany) and bonded together. The chips were placed under UV for 20 minutes and then coated with a solution of poly D-lysine (10 µg/ml, Sigma #P7280, St. Louis, MO, USA) overnight and washed with Dulbecco's phosphate buffer saline (D-PBS) (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen #14190169, Waltham, MA, USA) before cell seeding.

Primary neuronal culture

All animals were ethically maintained and used in compliance with the European Policy on Ethics. Cortices were micro-dissected from E14 embryos of swiss mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) in D-PBS supplemented with 0.1 % (w/v) Glucose (Invitrogen). Dissected structure were digested with papain (15 U/mL in DMEM, Sigma #76220) during 5 min at 37°C. After papain inactivation with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, GE Healthcare, Buckinghameshire, UK), structures were mechanically dissociated with a pipette in DMEM Glutamax-1 (Invitrogen #31966) containing DNAse-I (Sigma # D5025). After two centrifugation at 700g during 7 min, cells were resuspended in a cell culture medium containing DMEM Glutamax-1, penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 µg/mL) (Invitrogen #15140), 5% (v/v) FBS, N2 supplement (Invitrogen #17502048) and B-27 supplement (Invitrogen #17504-044) to a final density of 50 million cells/mL. Cortical cells were then seeded in the somatic compartment. Cell culture medium was then added equally to the four reservoirs. Microfluidic chips were placed in plastic Petri dishes containing H2Oand 10% (w/v) ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) (Sigma) to prevent evaporation and incubated at 37°C in a humid 5 % CO_2 atmosphere. The culture medium was renewed every six days. Upon differentiation, 2 or 3 days after seeding, cortical axons entered the micro-channels and reached the second chambers after 4 to 5 days. Cortical axons continued growing thereafter.

Pharmacological Treatments

Cells were pretreated and/or treated between 11 and 13 days *in vitro*. For all the treatments, the culture medium was totally renewed from all compartments with fresh culture medium containing pharmacological drugs. To ensure fluidic isolation, a differential hydrostatic pressure between compartments was maintained.

The following compounds were used: N-methyl-D-aspartic acid (NMDA, 100 µM) (Sigma #M3262), FK866 (10 µM) (Sigma #F8557), NAD^+ (Sigma #N3014), NMN (Sigma #N3501), NR (Chromadex, Irvine, CA, USA), NAM (Sigma #N0636), Dipyridamole (DP, 50µM) (Sigma #D9766), CMP (25 mM) (Sigma #C1006), (+) MK-801-maleate (10/50 µM) (Tocris Bioscience #0924, Bristol, UK).

Immunofluorescence detection and image acquisition

At various times, cultures were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) (Euromedex #15714-S, Souffelweyersheim, France) + 4% (w/v) sucrose (Sigma #S0389) for 20 minutes at room temperature. Cells were then washed once with PBS for 10 min and

permeabilized for 30 minutes with D-PBS containing 0,2% (v/v) TritonX-100 (Sigma) and 1 % (w/v) BSA (Sigma). Immunostaining was performed as described before (Magnifico et al., 2013) using the following conjugated antibodies diluted in D-PBS: Anti-βIII tubulin-Alexa Fluor 488 (1/500, Millipore # AB15708A4, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and anti-MAP2-Alexa 555 (1/500, Millipore # MAB3418A5). Cell nuclei were stained by using Hoescht 33342 (2µg/mL). The chips were then rinsed once with PBS and filled with PBS + 0.1% sodium-azide.

Images were acquired using an Axio-observer Z1 microscope (Zeiss, Wetzlar, Germany) fitted with a cooled CCD camera (CoolsnapHQ2, Ropert Scientific, Trenton, NJ, USA). The microscope was controlled with Metamorph software and images were analyzed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Quantification of axonal fragmentation and neuronal death

Axonal fragmentation was assessed using a macro developed in ImageJ software and containing the following steps: 1- Substract Background, 2- Plugin *Tubeness* (σ=1), 3- Plugin *Otsu Thresholding* , 4- Analyze of particles : measure of total particles area (A_{TOTAL}) and measure of particles whose circularity is higher than 0,2 ($A_{0,2}$). The fragmentation index is obtained as the ratio $A_{0,2}/A_{TOTAL}$, comprised between 0 and 1. This index is almost linearly correlated with fragmented axons percentages: indices under 0.2, around 0.5 and up to 0.8 correspond to less than 10%, 50% and more than 90 % of fragmented axons respectively.

Neuronal death was quantified by calculating the ratio condensing nuclei to total nuclei.

PCR and quantitative real time PCR

Primary cortical neurons were lysed at DIV 11 and tissues were lysed from 8 weeks old mice. Three wells were pooled to obtain one samples. Total RNA was isolated with RNeasy kit (Qiagen #74104, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Of total RNA, 1 µg was RNase free-DNase and retrotranscribed using SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen #18064-022) according to the manufacturer's instruction. Remaining RNA was hydrolysed using RNase H from *E. coli* (invitrogen #AM2293).

PCR amplification was performed in a thermocycler by mixing 2 µL of cDNA with 0.5 µM of forward and reverse nucleotide sequences (table) in a PCR Buffer containing dNTP mix (200 µM each), MgCl2 (1,5 mM) and 0.5 units of Taq DNA Polymerase (invitrogen #18038). Initially, the template was denaturated by heating to95°C for 5 min, followed by 30 amplification cycles. Each cycle consisted of three steps : the first for 45 sec at 94 °C, the second for 30 sec at T_a (depending of the amplified mRNA) and the third for 1 min at 72 °C for polymerization. The final step was extension at 72°C for 10 min. The PCR products were electrophoresed on 1.5 % (w/v) agarose gel and staining with ethidium bromide (0.5 µg/mL).

Quantitative PCR was performed using LightCycler480 device (Roche Applied Science), by mixing 1/50 diluted cDNA with the target-specific primers and Light Cycler 480 SYBRGreen I Master mix (Roche, #4707516001) according to the manufacturer's instructions. Amplification conditions were were initial denaturation for 5 min at 95°C followed by 40 cycles of 10 sec at 95 °C, 15 sec at T_a and 10 sec at 72 °C. Results were analyzed with LightCycler 480 SW 1.5 software. Individual PCR products were analyzed by melting-point analysis. The expression level of a gene was normalized relative to that of mouse *β-actin* or hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT)*.

Table: PCR primer sequences

Gene	Primers		Size (pb)	T_a
β-Actin	Forward	5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	228	63
	Reverse	5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'		
HRPT	Forward	5'-ATTATGCCGAGGATTTGGAA-3'	94	60
	Reverse	5'-CCCATCTCCTTCATGACATCT-3'		
ENT1	Forward	5'-AGCCTGTGCAGTTGTCATTTT-3'	153	60
	Reverse	5'-TCTTCCTTTTGGCTCCTCTCC-3'		
ENT2	Forward	5'-CGAGTCGGTGCGGATTCTG-3'	149	60
	Reverse	5'-GCACGGCACAGAAGGAATTG-3'		
ENT3	Forward	5'-ATAGCAGCGTTTACGGCCTC-3'	127	60
	Reverse	5'-CACTGGATGCTGCCAGGTC-3'		
ENT4	Forward	5'-TTTGGCAGTGTGCCCATGA-3'	127	60
	Reverse	5'-TGCAGTAGGCCACAGCAGAG-3'		
Nmrk1	Forward	5'-AGGGAAGACGACACTGGCTA-3'	141	63
	Reverse	5'-AGCGCTTCAAGCACATCATA-3'		
Nmrk2	Forward	5'-CACCTCAGGACCAGTCACCT-3'	94	60
	Reverse	5'-CTGTTGGTCAGGGTGGTCTT-3'		
Nmnat1	Forward	5'-TTCAAGGCCTGACAACATCGC-3'	94	60
	Reverse	5'-GAGCACCTTCACAGTCTCCACC-3'		
Nmnat2	Forward	5'-CAGTGCGAGAGACCTCATCCC-3'	94	60
	Reverse	5'-ACACATGATGAGACGGTGCCG-3'		
Nmnat3	Forward	5'-GGTGTGGAGGTGTGTGACAGC-3'	94	60
	Reverse	5'-GCCATGGCCACTCGGTGATGG-3'		

NAD$^+$ assay

NAD$^+$ assay was performed using EnzyChrom NAD$^+$/NADH Assay Kit (Euromedex, #E2ND-100) according to manufacturer's protocol.

In vivo NMDA-induced excitotoxicity experiments

Experiments were performed on male C57/Black6 mice (23 ± 3 g, produced and provided by our local animal facilities, France) in accordance with European communities Council (Directives of November 24, 1986 (86/609/ EEC)) and French Legislation (act no. 87-848, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) on Animal Experimentation and were approved by the local ethical committee. Mice were deeply anesthetized with isoflurane 5% and maintained under anesthesia with 2% isoflurane in a 70%/30% gas mixture (N2O/O2) during surgery. The rectal temperature was maintained at 37 ± 0.5°C throughout the surgical procedure using a feedback-regulated heating system.

A cortical unilateral injection (coordinates: 0.5 mm posterior, 2.0 mm lateral, -0.5 mm ventral to the bregma; stereotaxic atlas G. Paxinos & K.B.J. Franklin) of NMDA (5 nmoles; in 0.33 µl), co-injected or not with NAD$^+$ or NR (50 nmol) was performed after placing the animals in a stereotaxic frame. Solutions were injected by the use of a micropipette made with hematologic micropipettes (calibrated at 15 mm/µl; assistant ref 555/5; Hecht, Sondheim-Rhoen, Germany). The micropipette was removed 3 min later. Volume lesion was analyzed 48h later.

Magnetic Resonance Imaging

Experiments were carried out on a Pharmascan 7T (Bruker, Germany). T2-weighted images were acquired using a multislice multi echo sequence: TE/TR 51.3 ms/2500 ms 48 hours after injection. Lesion volumes were quantified on MRI using ImageJ software.

Statistical analysis

Differences were assessed by a Mann Whitney test to compare two conditions or a Kruskall-Wallis test to compare more than two conditions. For all analysis * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p–value < 0.001.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Professor Charles Brenner and Chromadex corporation for kindly providing nicotinamide riboside, Microbrain Biotech for technical advice and providing microfluidic chips. Pauline Vaur was funded by Ile-de-France Region DIM Cerveau & Pensée fellowship. This work was funded by ANR "Neuroscreen: 2011-RPIB-008-001" 2012-16.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interest

ABBREVIATIONS LIST

AxD: Axonal degeneration;
CMP: Cytidine monophosphate;
CNT: Concentrative nucleoside transporter;
CNS: Central nervous system;
DP: Dipyridamole;
ENPP-ase: Ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase;
ENT: Equilibrative nucleoside transporter;
ENT-ase :Ectonucleotidase;
HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase;
NAD^+: Nicotinamide adenine dinucleotide;
NAM: Nicotinamide;
NMDA: N-methyl-D-aspartate;
NMDAR: NMDA receptor
NMN: Nicotinamide mononucleotide;
Nmnat: Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase
Nmrk: Nicotinamide riboside kinase;
NR: Nicotinamide riboside;
NT: Nucleoside transporters
PNS: Peripheral nervous system

REFERENCES

Araki, T., Sasaki, Y., and Milbrandt, J. (2004). Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. Science *305*, 1010–1013.

Benarroch, E.E. (2015). Acquired axonal degeneration and regeneration Recent insights and clinical correlations.

Bi, J., Li, H., Ye, S.Q., and Ding, S. (2012). Pre-B-cell colony-enhancing factor exerts a neuronal protection through its enzymatic activity and the reduction of mitochondrial dysfunction in in vitro ischemic models. J. Neurochem. *120*, 334–346.

Bieganowski, P., Brenner, C., and Hb, R. (2004). Discoveries of Nicotinamide Riboside as a Nutrient and Conserved NRK Genes Establish a Preiss-Handler Independent Route to NAD in Fungi and Humans. *117*, 495–502.

Brown, K.D., Maqsood, S., Huang, J.-Y., Pan, Y., Harkcom, W., Li, W., Sauve, A., Verdin, E., and Jaffrey, S.R. (2014). Activation of SIRT3 by the NAD+ Precursor Nicotinamide Riboside Protects from Noise-Induced Hearing Loss. Cell Metab. *20*, 1059–1068.

Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., and De Flora A (2000). Connexin 43 hemi channels mediate Ca2+-regulated transmembrane NAD+ fluxes in intact cells. FASEB J. *15*, 10–12.

Burke, R.E., and O'Malley, K. (2013). Axon degeneration in Parkinson's disease. Exp. Neurol. *246*, 72–83.

Cantó, C., Houtkooper, R.H., Pirinen, E., Youn, D.Y., Oosterveer, M.H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P.J., Yamamoto, H., Andreux, P. a, Cettour-Rose, P., et al. (2012). The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. Cell Metab. *15*, 838–847.

Chung, R.S., McCormack, G.H., King, A.E., West, A.K., and Vickers, J.C. (2005). Glutamate induces rapid loss of axonal neurofilament proteins from cortical neurons in vitro. Exp. Neurol. *193*, 481–488.

Cohen, M.S., Ghosh, A.K., Kim, H.J., Jeon, N.L., and Jaffrey, S.R. (2012). Chemical genetic-mediated spatial regulation of protein expression in neurons reveals an axonal function for wld(s). Chem. Biol. *19*, 179–187.

Coleman, M. (2011). Molecular Signaling. How Do Axons Die? (Elsevier Inc.).

Coleman, M.P., and Freeman, M.R. (2010). Wallerian degeneration, wld(s), and nmnat. Annu. Rev. Neurosci. *33*, 245–267.

Deléglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Alleaume-Butaux, A., Hjorth, J.J., Vignes, M., Schneider, B., Brugg, B., Viovy, J.-L., and Peyrin, J.-M. (2013). Synapto-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. PLoS One *8*, e71103.

Freitas, B.C.G., Gereben, B., Castillo, M., Kall??, I., Ze??ld, A., Egri, P., Liposits, Z., Zavacki, A.M., Maciel, R.M.B., Jo, S., et al. (2010). Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells. J. Clin. Invest. *120*, 2206–2217.

Gerdts, Summers, D.W., Sasaki, Y., DiAntonio, A., and Milbrandt, J. (2013). Sarm1-mediated axon degeneration requires both SAM and TIR interactions. J. Neurosci. *33*, 13569–13580.

Gerdts, Brace, E.J., Sasaki, Y., DiAntonio, A., and Milbrandt, J. (2015). SARM1 activation

triggers axon degeneration locally via NAD+ destruction. Science (80-.). *348*, 453–457.

Ghosh, D., LeVault, K.R., Barnett, A.J., and Brewer, G.J. (2012). A reversible early oxidized redox state that precedes macromolecular ROS damage in aging nontransgenic and 3xTg-AD mouse neurons. J. Neurosci. *32*, 5821–5832.

Gilley, J., and Coleman, M.P. (2010). Endogenous Nmnat2 is an essential survival factor for maintenance of healthy axons. PLoS Biol. *8*, e1000300.

Gómez-Villafuertes, R., Pintor, J., Miras-Portugal, M.T., and Gualix, J. (2014). Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) activity in Neuro-2a neuroblastoma cells: expression changes associated with neuronal differentiation. J. Neurochem. *131*, 290–302.

Gong, B., Pan, Y., Vempati, P., Zhao, W., Knable, L., Ho, L., Wang, J., Sastre, M., Ono, K., Sauve, A.A., et al. (2013). Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α regulated β-secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models. Neurobiol. Aging *34*, 1581–1588.

Griffith, D.A., and Jarvis, S.M. (1996). Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr. *1286*, 153–181.

Hasmann, M., and Schemainda, I. (2003). FK866, a Highly Specific Noncompetitive Inhibitor of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, Represents a Novel Mechanism for Induction of Tumor Cell Apoptosis. Cancer Res. *63*, 7436–7442.

Hosie, K. a, King, A.E., Blizzard, C. a, Vickers, J.C., and Dickson, T.C. (2012). Chronic excitotoxin-induced axon degeneration in a compartmented neuronal culture model. ASN Neuro *4*, 47–57.

Jullienne, A., Montagne, A., Orset, C., Lesept, F., Jane, D.E., Monaghan, D.T., Maubert, E., Vivien, D., and Ali, C. (2011). Selective inhibition of GluN2D-containing N-methyl-D-aspartate receptors prevents tissue plasminogen activator-promoted neurotoxicity both in vitro and in vivo. Mol. Neurodegener. *6*, 68.

Kanaan, N.M., Pigino, G.F., Brady, S.T., Lazarov, O., Binder, L.I., and Morfini, G. a (2013). Axonal degeneration in Alzheimer's disease: when signaling abnormalities meet the axonal transport system. Exp. Neurol. *246*, 44–53.

Kim, Lu, H.F., and Alano, C.C. (2011). Neuronal sirt3 protects against excitotoxic injury in mouse cortical neuron culture. PLoS One *6*.

Liu, D., Pitta, M., and Mattson, M.P. (2008). Preventing NAD(+) depletion protects neurons against excitotoxicity: bioenergetic effects of mild mitochondrial uncoupling and caloric restriction. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1147*, 275–282.

Liu, D., Gharavi, R., Pitta, M., Gleichmann, M., and Mattson, M.P. (2009). Nicotinamide prevents NAD+ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral Ischemia: NAD+ consumption by sirt1 may endanger energetically compromised neurons. NeuroMolecular Med. *11*, 28–42.

Lyon, M.F., Ogunkolade, B.W., Brown, M.C., Atherton, D.J., and Perry, V.H. (1993). A gene affecting Wallerian nerve degeneration maps distally on mouse chromosome 4. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 9717–9720.

Magnifico, S., Saias, L., Deleglise, B., Duplus, E., Kilinc, D., Viovy, J.-L., Brugg, B., and Peyrin, J.-M. (2013). NAD+ acts on mitochondrial SirT3 to prevent axonal caspase activation and axonal degeneration. FASEB J. *27*, 4712–4722.

Nikiforov, A., Dölle, C., Niere, M., and Ziegler, M. (2011). Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: From entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. J. Biol. Chem. *286*, 21767–21778.

Sasaki, Y., Araki, T., and Milbrandt, J. (2006). Stimulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthetic pathways delays axonal degeneration after axotomy. J. Neurosci. *26*, 8484–8491.

Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science *298*, 789–791.

Di Stefano, M., Nascimento-Ferreira, I., Orsomando, G., Mori, V., Gilley, J., Brown, R., Janeckova, L., Vargas, M.E., Worrell, L.A., Loreto, A., et al. (2014). A rise in NAD precursor nicotinamide mononucleotide (NMN) after injury promotes axon degeneration. Cell Death Differ. *22*, 731–742.

Trammell, S.A., Yu, L., Redpath, P., Migaud, M.E., and Brenner, C. (2016). Nicotinamide Riboside Is a Major NAD+ Precursor Vitamin in Cow Milk. J. Nutr. *146*, 957–963.

Verghese, P.B., Sasaki, Y., Yang, D., Stewart, F., Sabar, F., and Beth, M. (2011). protects against acute neurodegeneration in developing CNS by inhibiting excitotoxic-necrotic cell death.

Wang, Zhai, Q., Chen, Y., Lin, E., Gu, W., McBurney, M.W., and He, Z. (2005). A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration. J. Cell Biol. *170*, 349–355.

Wang, X., Li, H., and Ding, S. (2014). The effects of NAD on apoptotic Neuronal death and mitochondrial biogenesis and function after Glutamate excitotoxicity.

Yahata, N., Yuasa, S., and Araki, T. (2009). Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase expression in mitochondrial matrix delays Wallerian degeneration. J. Neurosci. *29*, 6276–6284.

Young, J.D. (2016). The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: a 30-year collaborative odyssey. Biochem. Soc. Trans. *44*, 869–876.

Zhang, W., Xie, Y., Wang, T., Bi, J., Li, H., Zhang, L.Q., Ye, S.Q., and Ding, S. (2010). Neuronal protective role of PBEF in a mouse model of cerebral ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab. *30*, 1962–1971.

Zhou, B., Yu, P., Lin, M.-Y., Sun, T., Chen, Y., and Sheng, Z.-H. (2016). Facilitation of axon regeneration by enhancing mitochondrial transport and rescuing energy deficits. J. Cell Biol. *214*, jcb.201605101.

Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. *362*, 299–309.

Zocchi, E., Usai, C., Guida, L., Franco, L., Bruzzone, S., Passalacqua, M., and De Flora, A. (1999). Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca2+ mobilization: role of NAD+ transport across cell membranes. FASEB J. *13*, 273–283.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Somatic application of NMDA on cortical neurons induces neuronal death and axonal degeneration

a) 3D representation of microfluidic devices composed of three separated chambers connected by funnel-shaped microchannels. Cortical neurons are seeded in proximal chamber and axons reached the distal chamber after 4 to 6 days *in vitro*. Over-pressured central channel enables optimal fluidic isolation and compartimentalized treatment between somatic and axonal compartments. **b)** Light microscopy image of microchannels between proximal and distal chambers. **c-e)** Representative microscopy pictograph of somatic and axonal compartments after NMDA treatment. Cortical neurons were cultured for 11 days and treated for 24h with 100 µM NMDA. The left picture shows the somato-dendritic compartment stained with anti-MAP2 (red) and Hoechst 33342 (blue). Asterisks indicate condensed nuclei. The right picture shows the axonal compartment stained with anti-β_3-Tubulin. **c)** control condition (ø /ø); **d)** somato-dentritic treatment with NMDA (NMDA/ø); **e)**Selective axonal treatment with NMDA (ø/NMDA). Scale bar = 20µM. **f)** Quantification of nuclear condensation in control and after compartimentalized NMDA treatment. Condensed nuclei are counted after hoechst staining (n=3). **g)** Quantification of AxD in control and after compartimentalized NMDA treatment (n=3). Axonal fragmentation index was calculated as described in the method section. **h-i)** Effect of the NMDA antagonist MK-801 on NMDA-induced nuclear pycnosis and AxD: Cells were co-treated with 100 µM NMDA and 10/50 µM MK-801 in somato-dendritic compartment **h)** Quantification of somatic status (n=3);**i)** Quantification of AxD (n=3). *pvalue<0.05.

Figure 2: NR strongly prevents neurodegeneration induced by excitototoxicity both *in vitro* and *in vivo*

a-d) NAD^+ and NR reduce NMDA-induced axonal degeneration, with a more pronounced effect with NR. **a)** Fluorescence microscopy analysis of somatic status and AxD after a somato-dentritic100 µM NMDA treatment (24h), with or without co-treatment with 5 mM NAD^+ or 1 mM NR. The left picture shows the somato-dendritic compartment stained with Hoechst 33342 (blue) and anti-MAP2 (red) and the right picture shows the axonal compartment stained with anti-β3-Tubulin: **1)** control condition (ø/ø); **2)** somato-dentritic treatment with NMDA (NMDA/ø); **3)** somato-dentritic co-treatment with NMDA and NAD^+, axonal treatment with NAD^+ (NAD^+-NMDA/NAD^+); **4)** somato-dentritic co-treatment with NMDA and NR, axonal treatment with NR (NR-NMDA/NR). Scale bar = 20µM. **b-c)** Effect of 5 mM NAD^+ and 1mM NR on neuronal death after different NMDA exposure time. **b)** Quantification of somatic status by condensed nuclei (%) after Hoechst staining (n=3). **c)** Quantification of AxD (n=3). **d)** Quantification of AxD on cortical neurons after 24h of 100 µM NMDA and NR or NAD^+ co-treatment. Dose-response of NR and NAD^+ are shown (n=3). **e-f)** *In vivo* neuroprotective effect of NR after intracranial NMDA administration in mice. **e)** MRI representative images obtained 48h after intra-cortical injection of 5 nmol NMDA or 5 nmol NMDA with 50 nmol NAD^+ or NR. Lesion volume is displayed by red dotted. **f)** Quantification of lesion volume at t=48h after NMDA injection (n=20), NMDA/NAD^+ injection (n=10) and NMDA/NR injection (n=10). *pvalue<0.05; **pvalue<0.01.

Figure 3: NR protective effect is mainly restricted to axonal compartment

a-e) Fluorescence microscopy analysis of somatic status and AxD after exposure of cortical neurons to 100 µM NMDA and 1 mM NR. The left picture shows the somatic compartment stained with Hoechst 33342 and the right picture shows the axonal compartment stained with anti-β3-Tubulin. **a)**

control condition (ø/ø); **b)** somatic NMDA treatment (NMDA / ø); **c)** somatic NMDA-NR co-treatment and axonal NR treatment (NR-NMDA / NR); **d)** somatic NR-NMDA co-treatment (NR-NMDA / ø); **e)** somatic NMDA treatment and axonal NR treatment (NMDA / NR). Scale bar = 20µM. **f)** Quantification of AxD after 100 µM NMDA treatment and total, proximal or distal 1 mM NR treatment (n=3). *pvalue<0.05. **g)** Quantification of AxD after 100 µM NMDA treatment and total, proximal or distal 5 mM NAD^+ treatment (n=3). *pvalue<0.05.

Figure 4: Extracellular NR is transported through plasma membrane for neuroprotective effect and is metabolized to intracellular NAD^+

a) Schematic representation of NR metabolism in cells: NR enters the cell through concentrative (CNT) or equilibrative nucleoside transporters (ENT) and is metabolized to NAD^+ via nicotinamide riboside kinase 1/2 (Nmrk1/2) and nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (Nmnat). **b)** mRNA level of *ENT 1-4* normalized to *HPRT* transcript in cortical neurons. **c)** Dipyridamole (DP) reverts the axono-protective effect of NR in neurons treated with NMDA. Quantification of AxD after 100 µM NMDA treatment with or without 1mM NR and 50 µM DP (n=4). *pvalue<0.05; **pvalue<0.01. **d)** *Nmrk1* mRNA is constitutively expressed whereas Nmrk2 mRNA is not detectable in brain tissues. *Nmrk1* and *Nmrk2* mRNA level in brain tissues (cortex, hippocampus, cerebellum), heart, skeletal muscles and liver normalized to β-Actin transcript. **e)** NMDA treatment induces *Nmrk1* but not *Nmrk2* transcript. mRNA levels were analyzed by RT-qPCR 3 h and 24h after 100 µM NMDA treatment and normalized to *HPRT* transcript (n=3). **f)** NR treatment reverts NMDA-induced NAD^+ depletion. NAD^+ level measured in cortical neurons cultured on plates and exposed to 100 µM NMDA with or without 1 mM NR for 24h (n=4). *pvalue<0.05; **pvalue<0.01.

Figure 5: NMN but not NAD^+ needs conversion to NR and nucleoside transporters to prevent NMDA-induced AxD

a) Schematic representation of extracellular metabolism of NAD^+: NAD^+ is converted into NMN via ENPP-ase and then into NR via ENT-ase. **b)** Quantification of AxD in cortical neurons treated with 100 µM NMDA for 24h after blocking the extracellular pathway by DP, an ENT inhibitor, or CMP, an ENT-ase inhibitor. NMDA, NMN, DP and CMP were added as indicated (n=3-7). **c)** Quantification of AxD in cortical neurons treated with 100 µM NMDA for 24h after blocking the extracellular pathway by DP or CMP. NMDA, NAD^+, DP and CMP were added as indicated (n=3-7).

Figure 6: NAD^+ and NR have the same protective effect in FK866-induced total NAD^+ depletion

a) Schematic representation of FK866 effect on NAD^+ metabolism. **b)** NAD^+ level measured on cortical neurons cultured on plates exposed to 10 µM FK866 for 24, 48 and 72h (n=3-4).**c)** Quantification of somatic status and AxD in cortical neurons exposed to 10 µM FK866 (n=4). **d)** Fluorescence microscopic analysis of somatic status and AxD after somato-dentritic10 µM FK866 treatment, in presence of 50 µM NAD^+ or 50 µM NR (72h). The left picture shows the somatic compartment stained with Hoechst 33342 and the right picture shows the axonal compartment stained with anti-β3-Tubulin. **e-f)** Effect of NR or NAD^+ on neuronal death and AxD in presence of FK866: cortical neurons where treated in both chambers with 50µM NR or NAD^+ at the same time (0h) or 24 to 48 h after 10 µM FK866 treatment : **e)** Quantification of somatic status by condensed nuclei (%) after Hoechst staining (n=3); **f)** Quantification of AxD (n=3). *pvalue<0.05;

**pvalue<0.01; ***pvalue<0,001.

Figure 7: NAD^+ and NMN conversion to NR is needed to prevent FK866-induced AxD and nucleoside transporters ENT 1/2 are partially involved

a) Quantification of AxD in cortical neurons treated with 10 µM FK866 for 72h after blocking ENT1/2 by DP. FK866, NR and DP were added as indicated (n=4). **b)** Quantification of AxD in cortical neurons treated with 10 µM FK866 for 72h after blocking the extracellular pathway by DP and CMP. FK866, NMN, DP and CMP were added as indicated (n=3). **c)** Quantification of AxD in cortical neurons treated with 10 µM FK866 for 72h after blocking the extracellular pathway by DP and CMP. FK866, NAD^+, DP and CMP were added as indicated. (n=3-7). *pvalue<0.05; ***pvalue<0.001.

Figure 8: Hypothetic model of NAD^+ to NR conversion and transport in cortical neurons

Extracellular NR and NAD^+ metabolism could be dependent on the cellular compartment. NAD^+ may be converted to NR in somatic compartment while NAD^+ may not be converted to NR in axonal compartment. This discrepancy may be explained by different ENPP-ase subcellular localization or activity.

SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1: NAD^+ and NR have no effect on NMDA-induced neuronal death even at low NMDA dose

Quantification of somatic status in cortical neurons exposed to 10/100 µM NMDA and 1 mM NR or 5 mM NAD^+ co-treatment. Condensed nuclei are counted after Hoechst staining (n=3).

Figure S2: *Nmrk2* is induced after FK866 treatment but is not necessary for NR protective effect

a) Schematic representation of FK866 effect on NAD^+ metabolism. **b-c)** Cortical neurons were treated or not with 10 µM FK866 for 24, 48 or 72h. After total RNA extraction, both *Nmrk1* and *Nmrk2* mRNA were analyzed: **b)** by RT-PCR and agarose gel electrophoresis. mRNA from mouse skeletal muscle was also studied as a positive control. *Actin* mRNA was analyzed as a house-keeping gene; **c)** by RT-qPCR, results were normalized with *HPRT* gene (n=4). **d-e)** Cortical neurons from *WT* or *Nmrk2 KO* mice were co-treated or not with 10 µM FK866 and 50 µM NR or 50 µM NAD^+ for 72h: **d)** Quantification of somatic status (n=2); **e)** Quantification of AxD (n=2).

Figure S3: Level of *Nmnat 1-3* mRNA in excitotoxic conditions

mRNA levels of *Nmnat 1-3* were analyzed by RT-qPCR 3 h and 24h after 100 µM NMDA treatment and normalized to *HPRT* transcript in cortical neurons. NMDA treatment of 24h induces *Nmnat 1-3* transcript (n=3). **pvalue<0.01.

Figure S4: NAM has no protective effect in excitotoxic conditions

Quantification of AxD in cortical neurons co-treated with 100 µM NMDA and 5 mM NAM (n=3).

Figure S5: *ENT2* and *ENT4* mRNA are upregulated after FK866-induced NAD^+ depletion

Cortical neurons were treated or not with 10 µM FK866 for 72h. After total RNA extraction, relative quantification of *ENT1-4* mRNA was carried out by RT-qPCR. Results were normalized with *HPRT* gene (n=4).

Figure 1

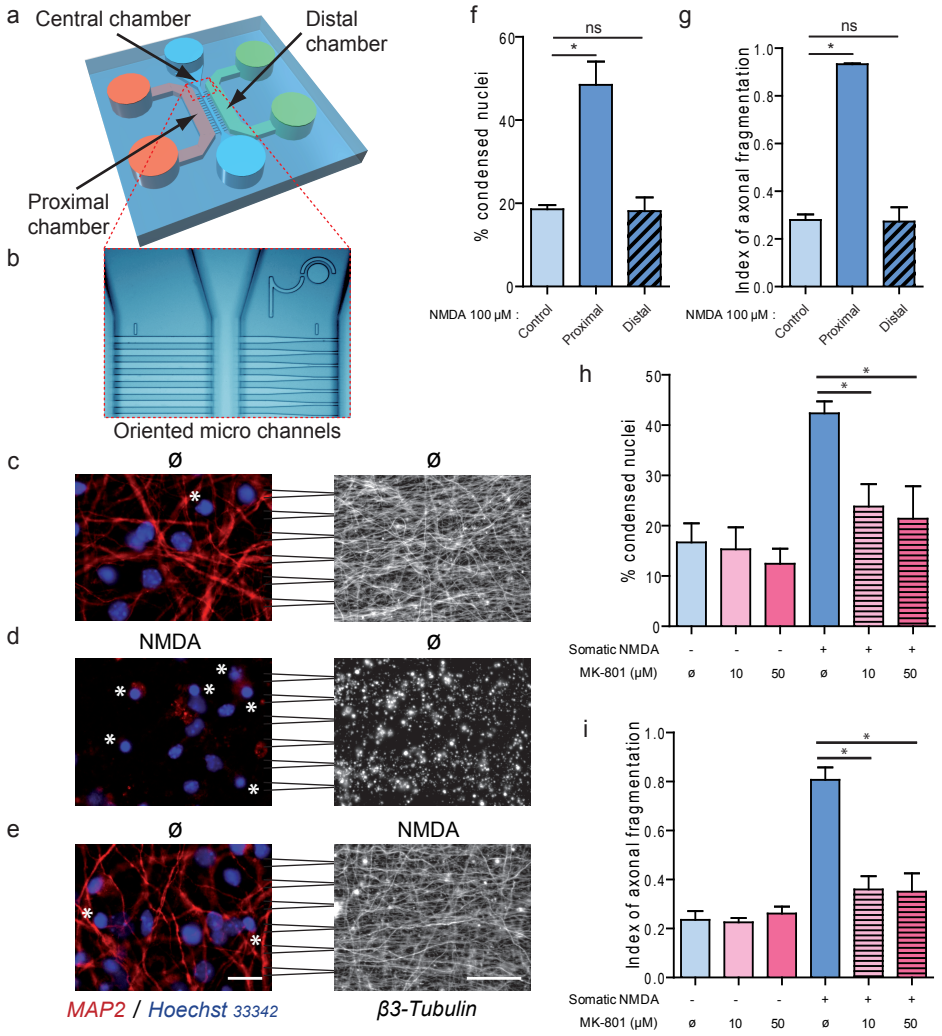

a
Central chamber
Distal chamber
Proximal chamber
b
Oriented micro channels
c
ø
ø
d
NMDA
ø
e
ø
NMDA
MAP2 / Hoechst 33342
β3-Tubulin
f
% condensed nuclei
ns
*
NMDA 100 µM :
Control
Proximal
Distal
g
Index of axonal fragmentation
ns
*
NMDA 100 µM :
Control
Proximal
Distal
h
% condensed nuclei
Somatic NMDA
MK-801 (µM)
i
Index of axonal fragmentation
Somatic NMDA
MK-801 (µM)

Figure 2

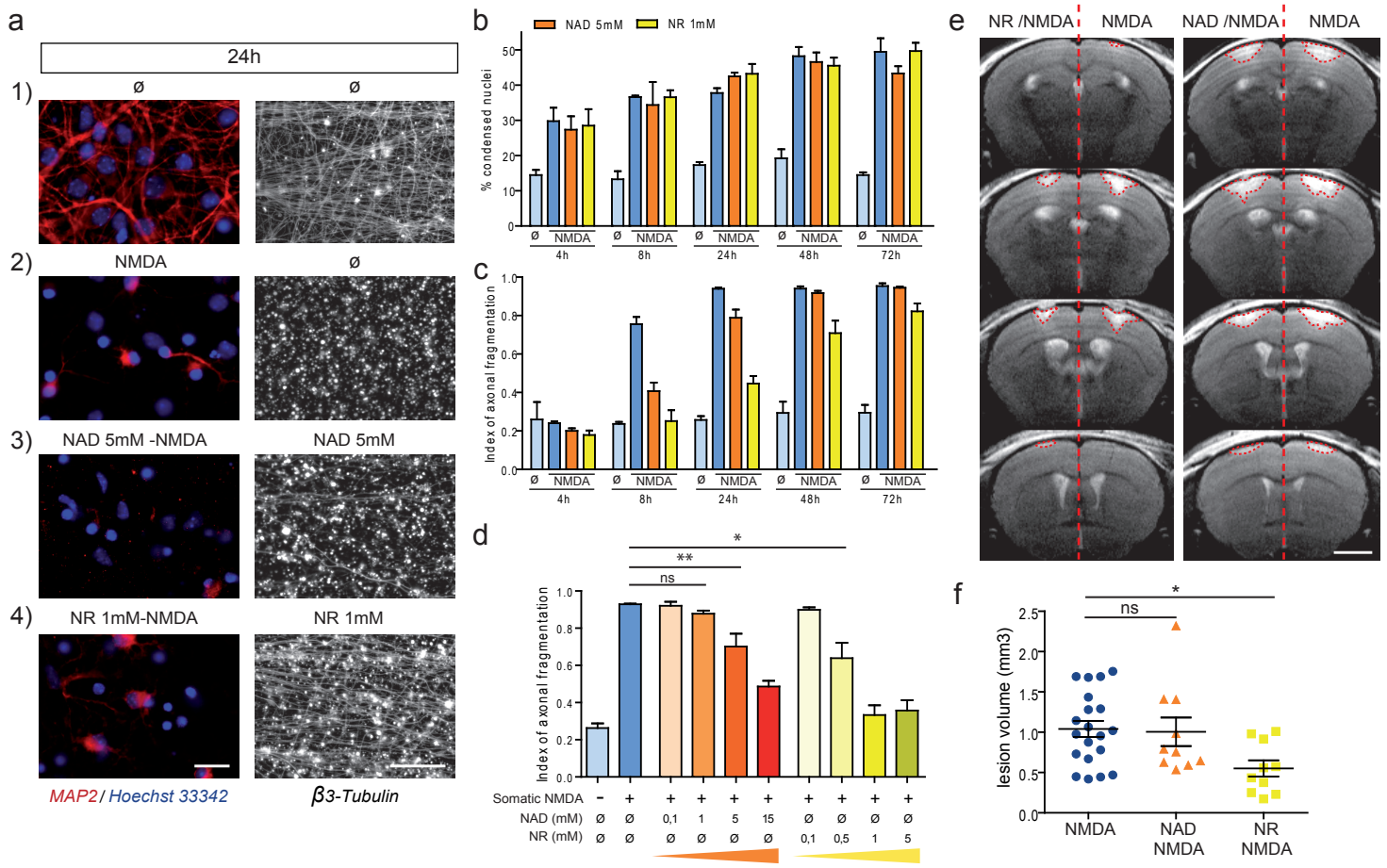

a
24h
1)
ø
ø
2)
NMDA
ø
3)
NAD 5mM -NMDA
NAD 5mM
4)
NR 1mM-NMDA
NR 1mM
MAP2 / Hoechst 33342
β3-Tubulin
b
NAD 5mM
NR 1mM
% condensed nuclei
ø
NMDA
4h
8h
24h
48h
72h
c
Index of axonal fragmentation
d
Index of axonal fragmentation
ns
**
*
Somatic NMDA
NAD (mM)
NR (mM)
e
NR /NMDA
NMDA
NAD /NMDA
NMDA
f
lesion volume (mm3)
ns
*
NMDA
NAD NMDA
NR NMDA

Figure 3

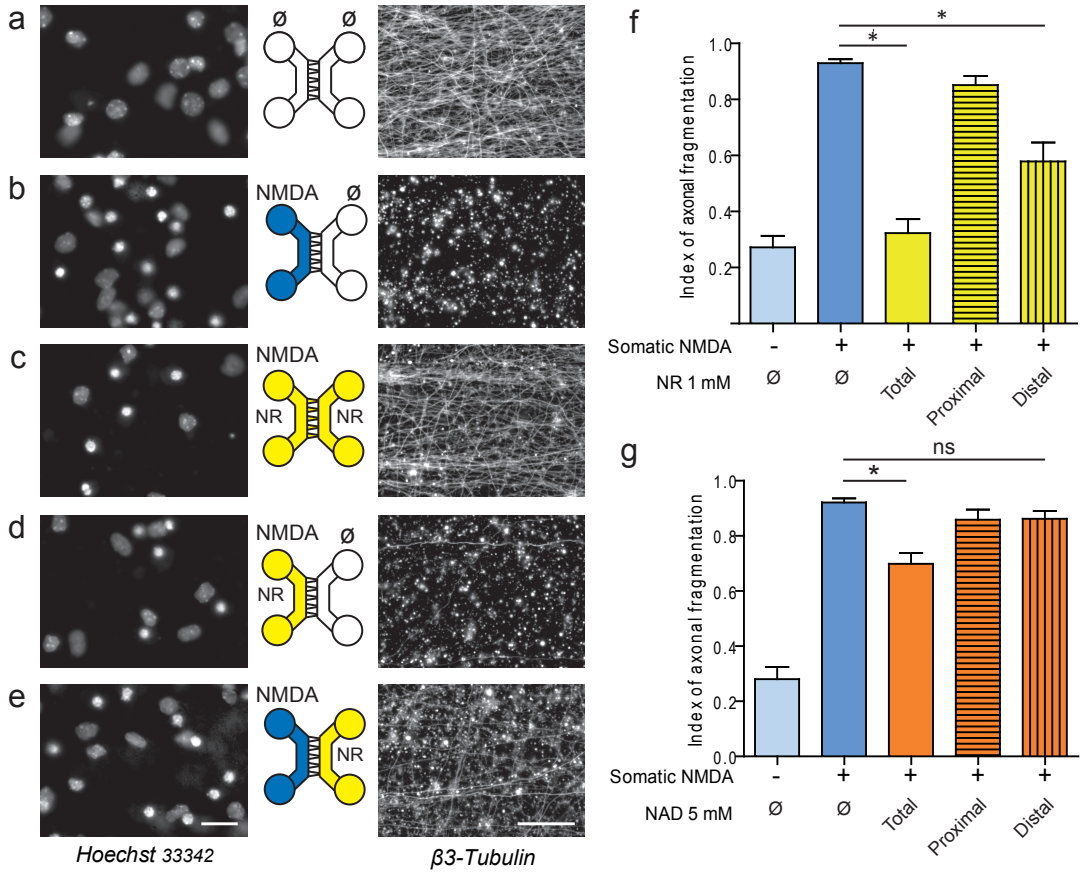

a
b
c
d
e
Ø
NMDA
NR
Hoechst 33342
β3-Tubulin
f
Index of axonal fragmentation
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
*
Somatic NMDA
NR 1 mM
Total
Proximal
Distal
g
ns
0.0
NAD 5 mM

Figure 4

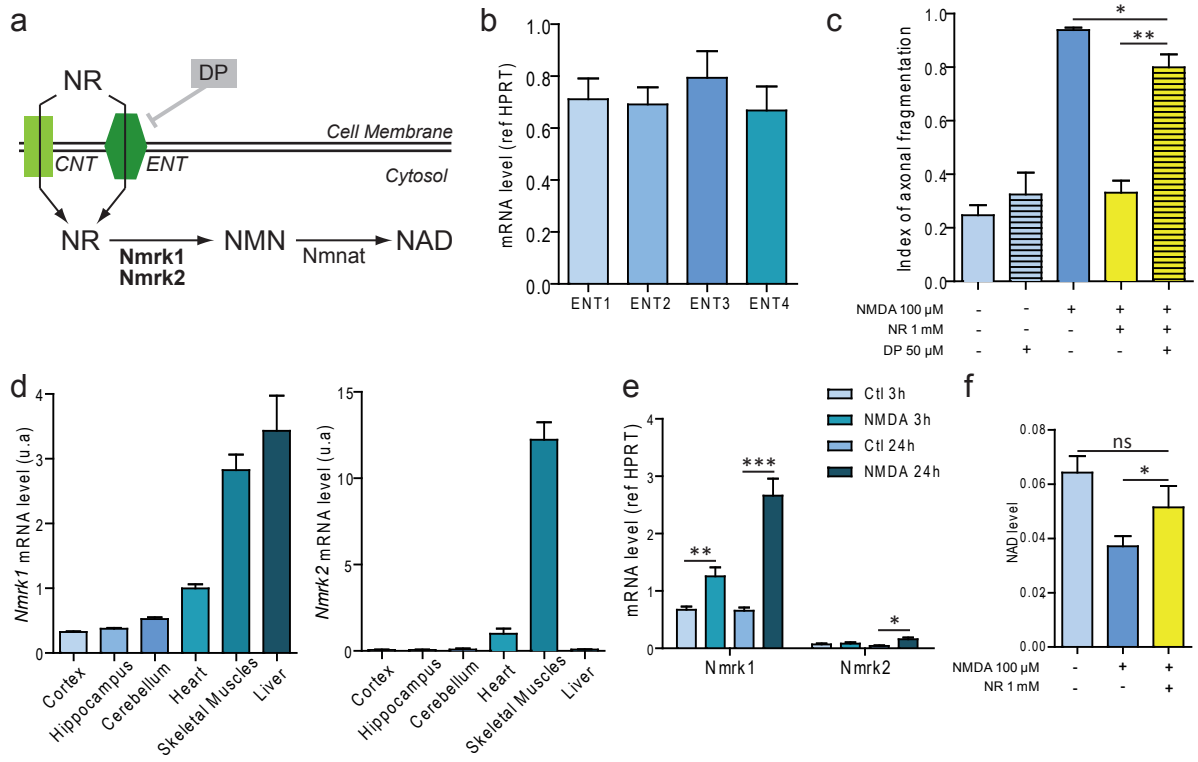

a
NR
DP
Cell Membrane
CNT
ENT
Cytosol
NR
Nmrk1
Nmrk2
NMN
Nmnat
NAD
b
mRNA level (ref HPRT)
ENT1
ENT2
ENT3
ENT4
c
Index of axonal fragmentation
NMDA 100 µM
NR 1 mM
DP 50 µM
d
Nmrk1 mRNA level (u.a)
Nmrk2 mRNA level (u.a)
Cortex
Hippocampus
Cerebellum
Heart
Skeletal Muscles
Liver
e
mRNA level (ref HPRT)
Ctl 3h
NMDA 3h
Ctl 24h
NMDA 24h
Nmrk1
Nmrk2
f
NAD level
ns
NMDA 100 µM
NR 1 mM

Figure 5

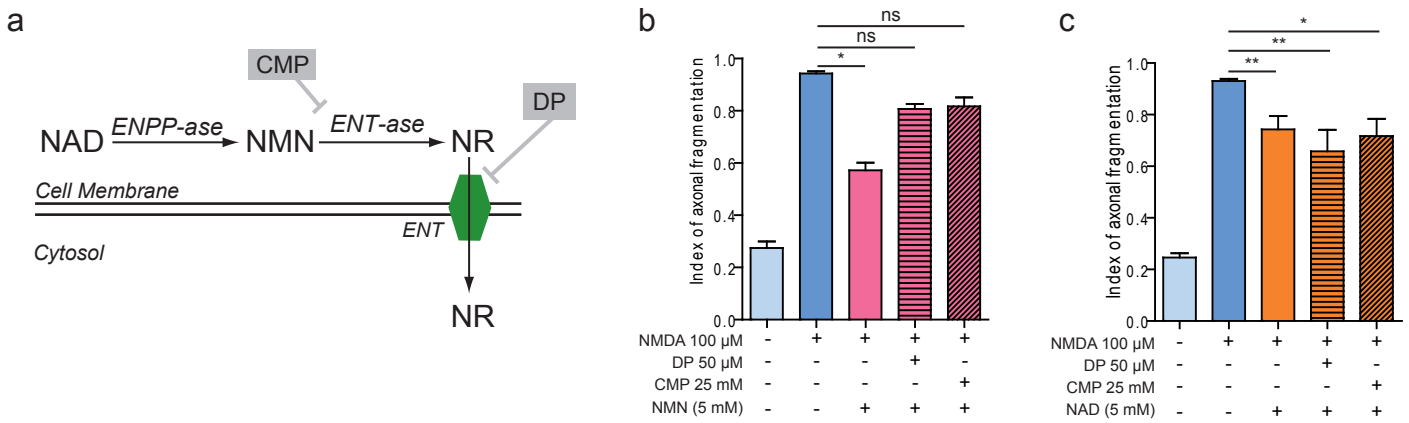

a
CMP
DP
NAD
ENPP-ase
NMN
ENT-ase
NR
Cell Membrane
ENT
Cytosol
NR
b
ns
ns
*
Index of axonal fragmentation
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
NMDA 100 µM - + + + +
DP 50 µM - - - + -
CMP 25 mM - - - - +
NMN (5 mM) - - + + +
c
*
**
**
Index of axonal fragmentation
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
NMDA 100 µM - + + + +
DP 50 µM - - - + -
CMP 25 mM - - - - +
NAD (5 mM) - - + + +

Figure 6

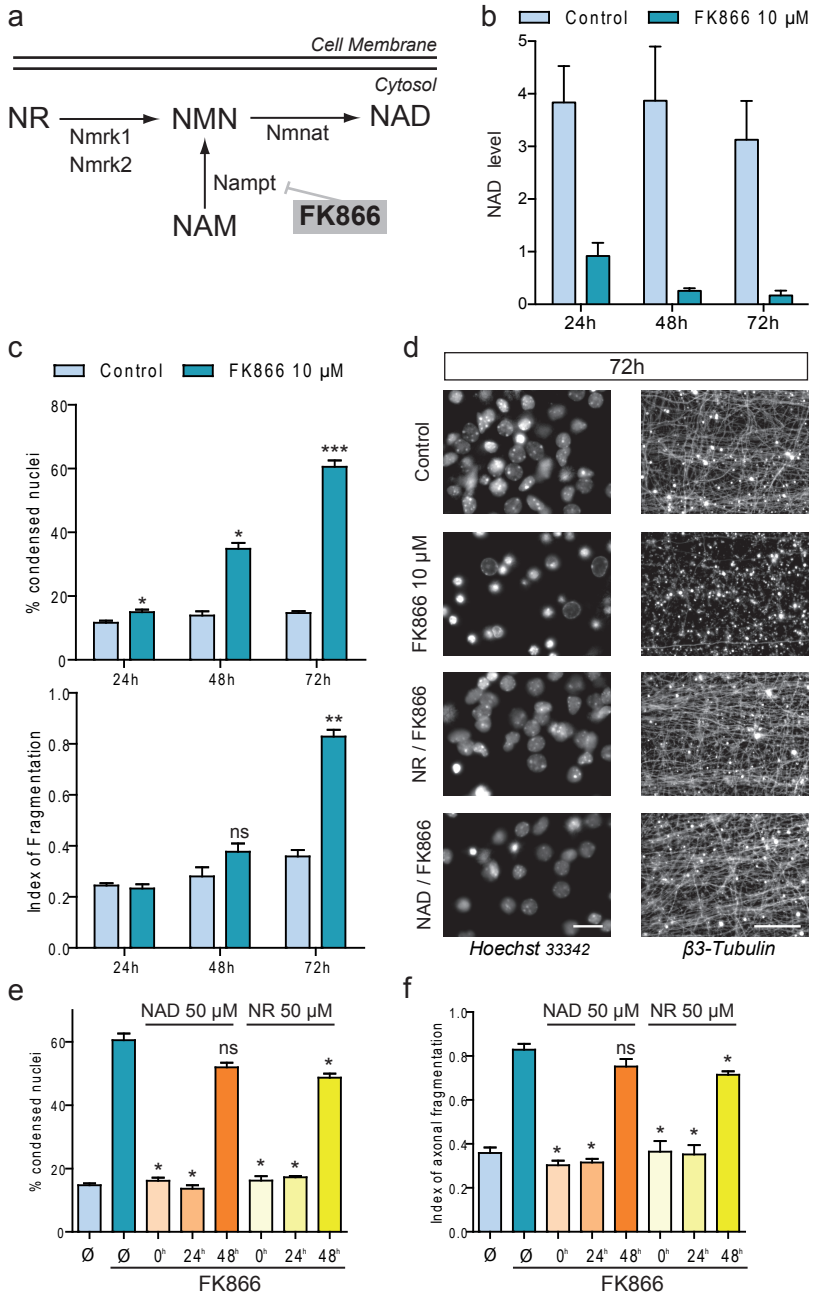

a
Cell Membrane
Cytosol
NR
Nmrk1
Nmrk2
NMN
Nmnat
NAD
Nampt
NAM
FK866
b
Control
FK866 10 µM
NAD level
24h
48h
72h
c
Control
FK866 10 µM
% condensed nuclei
Index of Fragmentation
d
72h
Control
FK866 10 µM
NR / FK866
NAD / FK866
Hoechst 33342
β3-Tubulin
e
NAD 50 µM
NR 50 µM
% condensed nuclei
FK866
f
NAD 50 µM
NR 50 µM
Index of axonal fragmentation
FK866

Figure 7

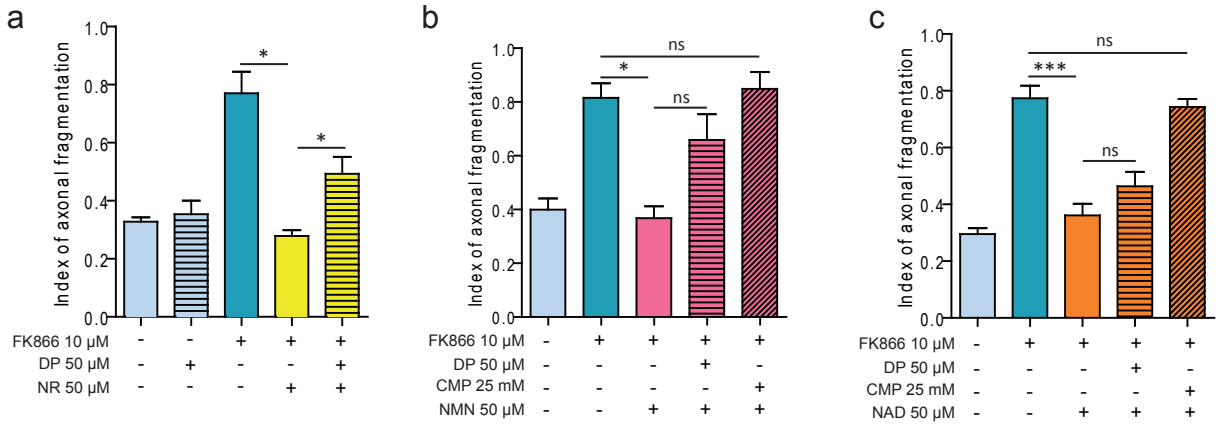

a
Index of axonal fragmentation
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
*
FK866 10 µM - - + + +
DP 50 µM - + - - +
NR 50 µM - - - + +
b
Index of axonal fragmentation
ns
*
ns
FK866 10 µM - + + + +
DP 50 µM - - - + -
CMP 25 mM - - - - +
NMN 50 µM - - + + +
c
Index of axonal fragmentation
ns
***
ns
FK866 10 µM - + + + +
DP 50 µM - - - + -
CMP 25 mM - - - - +
NAD 50 µM - - + + +

Figure 8

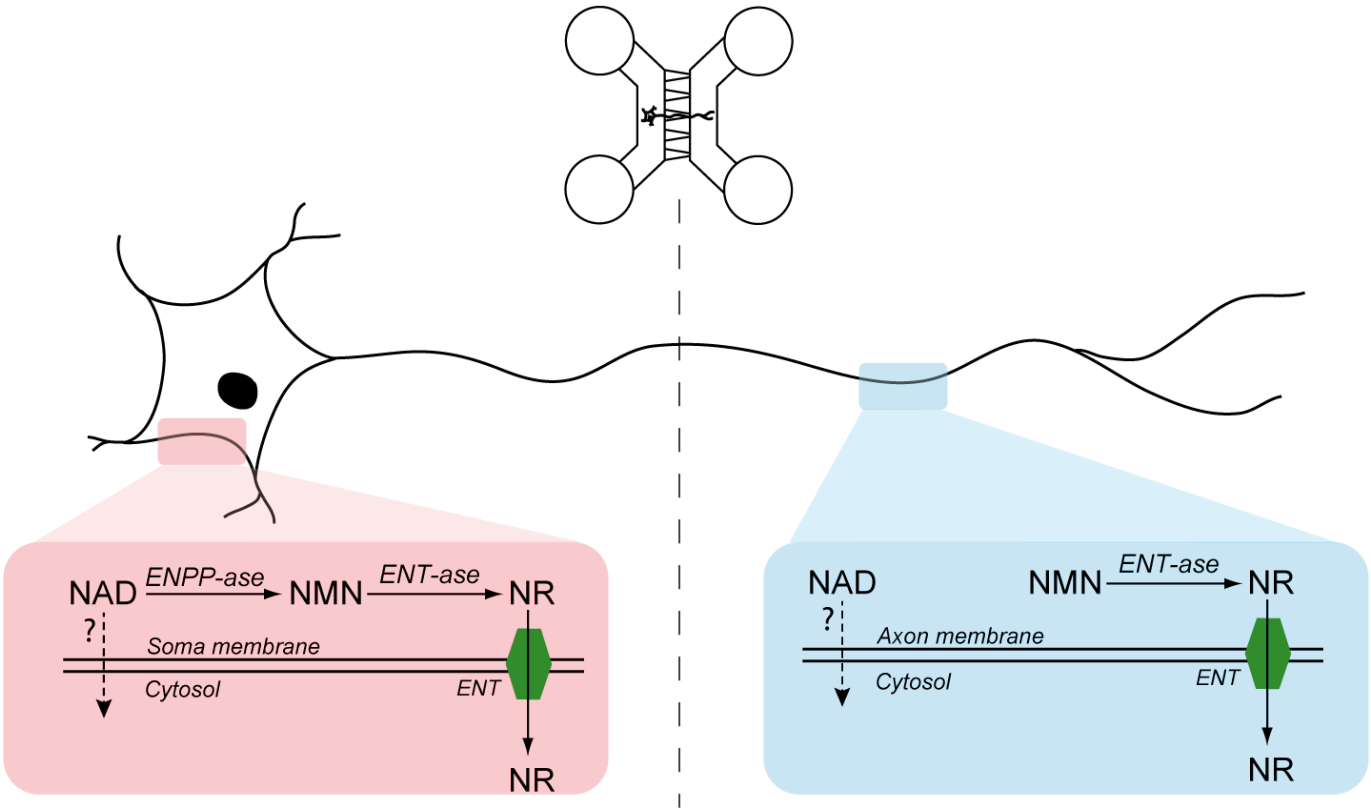

NAD
ENPP-ase
NMN
ENT-ase
NR
?
Soma membrane
Cytosol
ENT
NR
NAD
NMN
ENT-ase
NR
?
Axon membrane
Cytosol
ENT
NR

Figure S1

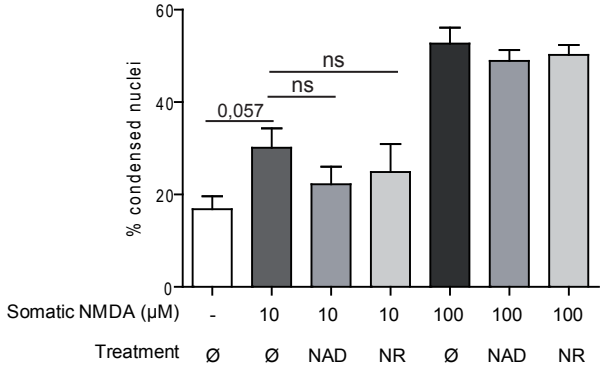


Figure S2

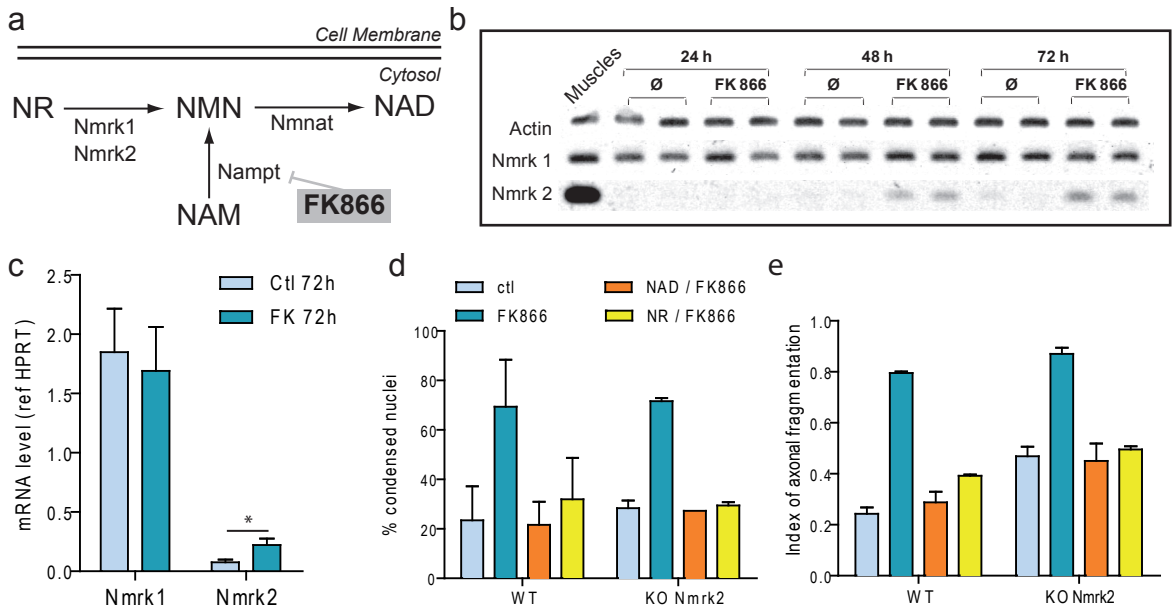


Figure S3

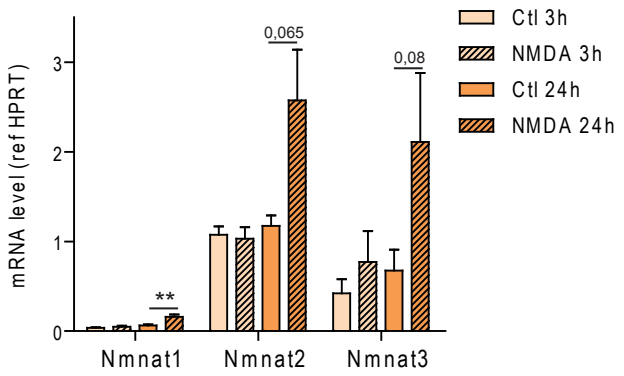


Figure S4

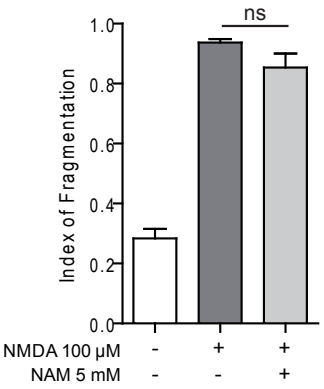
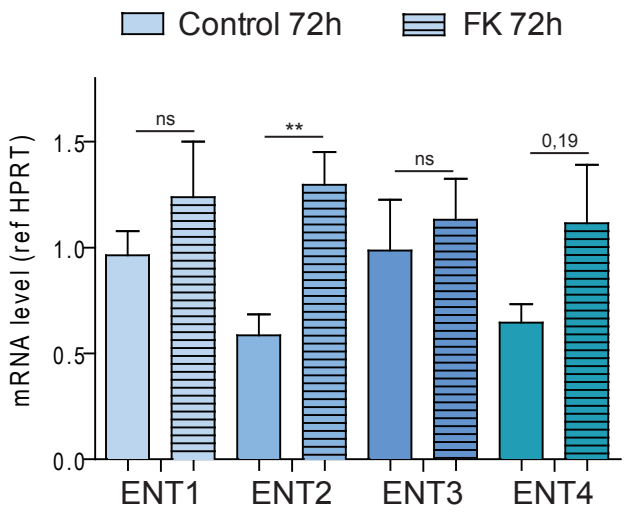


Figure S5



REFERENCES

A

Aarts, M., Liu, Y., and Li, L. (2002). Treatment of Ischemic Brain Damage by Perturbing NMDA Receptor- PSD-95 Protein Interactions. Science (80-.). *298*, 846–850.

Aarts, M., Iihara, K., Wei, W.L., Xiong, Z.G., Arundine, M., Cerwinski, W., MacDonald, J.F., and Tymianski, M. (2003). A Key Role for TRPM7 Channels in Anoxic Neuronal Death. Cell *115*, 863–877.

Abbracchio, M.P., Verkhratsky, A., Burnstock, G., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. Trends Neurosci. *32*, 19–29.

Adalbert, R., and Coleman, M.P. (2013). Review: Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. Neuropathol. Appl. Neurobiol. *39*, 90–108.

Adalbert, R., Nógrádi, A., Szabó, A., and Coleman, M.P. (2006). The slow Wallerian degeneration gene in vivo protects motor axons but not their cell bodies after avulsion and neonatal axotomy. Eur. J. Neurosci. *24*, 2163–2168.

Adalbert, R., Nogradi, A., Babetto, E., Janeckova, L., Walker, S. a, Kerschensteiner, M., Misgeld, T., and Coleman, M.P. (2009). Severely dystrophic axons at amyloid plaques remain continuous and connected to viable cell bodies. Brain *132*, 402–416.

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., et al. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease.

Aksoy, P., White, T.A., Thompson, M., and Chini, E.N. (2006). Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38. Biochem. Biophys. Res. Commun. *345*, 1386–1392.

Al-Mubarak, B., Soriano, F., and Hardingham, G. (2010). NMDAR activity suppresses FOXO1 expression via a cis- acting FOXO binding site : FOXO1 is a FOXO target gene. Nat. Neurosci. *3*, 233–238.

Alano, C., and Swanson, R. (2007). Differences among Cell Types in NAD1 Compartmentalization: A Comparison of Neurons, Astrocytes, and Cardiac Myocytes. J. Neurosci. Res. *85*, 2352–2359.

Albano, R., Liu, X., and Lobner, D. (2013). Regulation of system xc- in the SOD1-G93A mouse model of ALS. Exp. Neurol. *250*, 69–73.

Alberdi, E., S??nchez-G??mez, M.V., Cavaliere, F., P??rez-Samart??n, A., Zugaza, J.L., Trullas, R., Domercq, M., and Matute, C. (2010). Amyloid ?? oligomers induce Ca2+ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. Cell Calcium *47*, 264–272.

Albin, and Greenamyre, J.T. (1992). Alternative excitotoxic hypotheses. Neurology *42*, 733–733.

Albin, R.L., Young, A.B., and Penney, J.B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. Trends Neurosci. *12*, 366–375.

Aleo, M.F., Giudici, M.L., Sestini, S., Danesi, P., Pompucci, G., and Preti, A. (2001). Metabolic fate of extracellular NAD in human skin fibroblasts. J. Cell. Biochem. *80*, 360–366.

Amini, M. (2008). Conditional Disruption of Calpain in the CNS Alters Dendrite Morphology, Impairs LTP, and Promotes Neuronal Survival following Injury. October *141*, 520–529.

Andrabi, S.A., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2008). Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: Parthanatos. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1147*, 233–241.

Araki, T., Sasaki, Y., and Milbrandt, J. (2004). Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. Science *305*, 1010–1013.

Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. *118*, 167–179.

Arnold, S.E., Hyman, B.T., Flory, J., Damasio, A.R., and Van Hoesen, G.W. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. Cereb. Cortex *1*, 103–116.

Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., and Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. Nature *431*, 805–810.

Arundine, M., and Tymianski, M. (2004). Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. Cell. Mol. Life Sci. *61*, 657–668.

Arzberger, T., Krampfl, K., Leimgruber, S., and Weindl, A. (1997). Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *56*, 440–454.

Ascherio, A., and Munger, K.L. (2007a). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. Ann. Neurol. *61*, 288–299.

Ascherio, A., and Munger, K.L. (2007b). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. Ann. Neurol. *61*, 504–513.

Asensio, A.C., Rodriguez-Ferrer, C.R., Castaneyra-Perdomo, A., Oaknin, S., and Rotllan, P. (2007). Biochemical analysis of ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase activity in brain membranes indicates involvement of NPP1 isoenzyme in extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates in central nervous system. Neurochem. Int. *50*, 581–590.

Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., and Schibler, U. (2008). SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. Cell *134*, 317–328.

Avery, M. a, Sheehan, A.E., Kerr, K.S., Wang, J., and Freeman, M.R. (2009). Wld S requires Nmnat1 enzymatic activity and N16-VCP interactions to suppress Wallerian degeneration. J. Cell Biol. *184*, 501–513.

B

Babior, B.M. (2004). NADPH oxidase. Curr. Opin. Immunol. *16*, 42–47.

Bahn, A., Hagos, Y., Reuter, S., Balen, D., Brzica, H., Krick, W., Burckhardt, B.C., Saboli??, I., and Burckhardt, G. (2008). Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13). J. Biol. Chem. *283*, 16332–16341.

Bai, P., Cant??, C., Oudart, H., Bruny??nszki, A., Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R.H., et al. (2011). PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. Cell Metab. *13*, 461–468.

Bak, L.K., Schousboe, A., and Waagepetersen, H.S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. J. Neurochem. *98*, 641–653.

Baldwin, S.A., Mackey, J.R., Cass, C.E., and Young, J.D. (1999). Nucleoside transporters: Molecular

biology and implications for therapeutic development. Mol. Med. Today *5*, 216–224.

Baldwin, S.A., Beal, P.R., Yao, S.Y.M., King, A.E., Cass, C.E., and Young, J.D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. *447*, 735–743.

Bano, D., Young, K.W., Guerin, C.J., LeFeuvre, R., Rothwell, N.J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., and Nicotera, P. (2005). Cleavage of the plasma membrane Na+/Ca2+ exchanger in excitotoxicity. Cell *120*, 275–285.

Barnes, C.A., and McNaughton, B.L. (1980). Physiological compensation for loss of afferent synapses in rat hippocampal granule cells during senescence. J. Physiol. *309*, 473–485.

Barrientos, S.A., Martinez, N.W., Yoo, S., Jara, J.S., Zamorano, S., Hetz, C., Twiss, J.L., Alvarez, J., and Court, F.A. (2011). Axonal Degeneration Is Mediated by the Mitochondrial Permeability Transition Pore. J. Neurosci. *31*, 966–978.

Baskin-Bey, E.S., Washburn, K., Feng, S., Oltersdorf, T., Shapiro, D., Huyghe, M., Burgart, L., Garrity-Park, M., Van Vilsteren, F.G.I., Oliver, L.K., et al. (2007). Clinical trial of the pan-caspase inhibitor, IDN-6556, in human liver preservation injury. Am. J. Transplant. *7*, 218–225.

Baum, C.L., Selhub, J., and Rosenberg, I.H. (1982). The hydrolysis of nicotinamide adenine dinucleotide by brush border membranes of rat intestine. Biochem. J. *204*, 203–207.

Baxter, P.S., Bell, K.F.S., Hasel, P., Kaindl, A.M., Fricker, M., Thomson, D., Cregan, S.P., Gillingwater, T.H., and Hardingham, G.E. (2015). Synaptic NMDA receptor activity is coupled to the transcriptional control of the glutathione system. Nat. Commun. *6*, 6761.

Beal, M.F. (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? Ann. Neurol. *31*, 119–130.

Beal, M.F., Ferrante, R.J., Browne, S.E., Matthews, R.T., Kowall, N.W., and Brown, R.H. (1997). Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *42*, 644–654.

Beirowski, B., Babetto, E., Coleman, M.P., and Martin, K.R. (2008). The WldS gene delays axonal but not somatic degeneration in a rat glaucoma model. Eur. J. Neurosci. *28*, 1166–1179.

Belenky, P., Bogan, K.L., and Brenner, C. (2007a). NAD+ metabolism in health and disease. Trends Biochem. Sci. *32*, 12–19.

Belenky, P., Racette, F.G., Bogan, K.L., McClure, J.M., Smith, J.S., and Brenner, C. (2007b). Nicotinamide riboside promotes Sir2 silencing and extends lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 pathways to NAD+. Cell *129*, 473–484.

Belenky, P., Christensen, K.C., Gazzaniga, F., Pletnev, A.A., and Brenner, C. (2009). Nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside salvage in fungi and mammals quantitative basis for urh1 and purine nucleoside phosphorylase function in nad + metabolism. J. Biol. Chem. *284*, 158–164.

Belenky, P.A., Moga, T.G., and Brenner, C. (2008). Saccharomyces cerevisiae YOR071C encodes the high affinity nicotinamide riboside transporter Nrt1. J. Biol. Chem. *283*, 8075–8079.

Benarroch, E.E. (2010a). Adenosine triphosphate: A multifaceted chemical signal in the nervous system. Neurology *74*, 601–607.

Benarroch, E.E. (2010b). Glutamate transporters: Diversity, function, and involvement in neurologic disease. Neurology *74*, 259–264.

Benarroch, E.E. (2015). Acquired axonal degeneration and regeneration Recent insights and clinical correlations.

Benchoua, a, Guégan, C., Couriaud, C., Hosseini, H., Sampaïo, N., Morin, D., and Onténiente, B. (2001). Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. J. Neurosci. *21*, 7127–7134.

Benyó, Z., Gille, A., Kero, J., Csiky, M., Suchánková, M.C., Nüsing, R.M., Moers, A., Pfeffer, K., and Offermanns, S. (2005). GPR109A (PUMA-G / HM74A) mediates nicotinic acid – induced flushing. J. Clin. Invest. *115*, 3634–3640.

Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M., and Ziegler, M. (2005). Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. J. Biol. Chem. *280*, 36334–36341.

Bertram, L., Bertram, L., Tanzi, R.E., and Tanzi, R.E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. J. Clin. Invest. *115*, 1449–1457.

Bevers, M.B., Lawrence, E., Maronski, M., Starr, N., Amesquita, M., and Neumar, R.W. (2009). Knockdown of m-calpain increases survival of primary hippocampal neurons following NMDA excitotoxicity. J. Neurochem. *108*, 1237–1250.

Bezprozvanny, I. (2009). Calcium signaling and neurodegenerative diseases. Trends Mol. Med. *15*, 89–100.

Bezprozvanny, I., and Mattson, M.P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. Trends Neurosci. *31*, 454–463.

Bi, J., Li, H., Ye, S.Q., and Ding, S. (2012). Pre-B-cell colony-enhancing factor exerts a neuronal protection through its enzymatic activity and the reduction of mitochondrial dysfunction in in vitro ischemic models. J. Neurochem. *120*, 334–346.

Bieganowski, P., Brenner, C., and Hb, R. (2004). Discoveries of Nicotinamide Riboside as a Nutrient and Conserved NRK Genes Establish a Preiss-Handler Independent Route to NAD in Fungi and Humans. *117*, 495–502.

Blacher, E., Dadali, T., Bespalko, A., Haupenthal, V.J., Grimm, M.O.W., Hartmann, T., Lund, F.E., Stein, R., and Levy, A. (2015). Alzheimer's disease pathology is attenuated in a CD38-deficient mouse model. Ann. Neurol. *78*, 88–103.

Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., and Jackson-Lewis, V.R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. Front. Neuroanat. *9*, 91.

Bogan, K.L., and Brenner, C. (2008). Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD+ precursor vitamins in human nutrition. Annu. Rev. Nutr. *28*, 115–130.

Bogan, K.L., Evans, C., Belenky, P., Song, P., Burant, C.F., Kennedy, R., and Brenner, C. (2009). Identification of Isn1 and Sdt1 as glucose- and vitamin-regulated nicotinamide mononucleotide and nicotinic acid ddenine dinucleotide 5′-nucleotidases responsible for production of nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside. J. Biol. Chem. *284*, 34861–34869.

Borsello, T., Clarke, P.G.H., Hirt, L., Vercelli, A., Repici, M., Schorderet, D.F., Bogousslavsky, J., and Bonny, C. (2003a). A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. Nat. Med. *9*, 1180–1186.

Borsello, T., Croquelois, K., Hornung, J.P., and Clarke, P.G.H. (2003b). N-methyl-D-aspartate-triggered neuronal death in organotypic hippocampal cultures is endocytic, autophagic and mediated

by the c-Jun N-terminal kinase pathway. Eur. J. Neurosci. *18*, 473–485.

Bossy-Wetzel, E. (2009). MUTANT HUNTINGTIN AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION. *31*, 609–616.

Braak, H., and Del Tredici, K. (2008). Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. Neurology *70*, 1916–1925.

Braak, H., and Del Tredici, K. (2011). Alzheimer's pathogenesis: Is there neuron-to-neuron propagation? Acta Neuropathol. *121*, 589–595.

Braak, H., Rüb, U., Gai, W.P., and Del Tredici, K. (2003a). Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. J. Neural Transm. *110*, 517–536.

Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., and Braak, E. (2003b). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol. Aging *24*, 197–211.

Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretzschmar, H., and Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. Acta Neuropathol. *112*, 389–404.

Braidy, N., Guillemin, G.J., and Grant, R. (2011). Effects of kynurenine pathway inhibition on NAD + metabolism and cell viability in human primary astrocytes and neurons. Int. J. Tryptophan Res. *4*, 29–37.

Braun, J.S., Prass, K., Dirnagl, U., Meisel, A., and Meisel, C. (2007). Protection from brain damage and bacterial infection in murine stroke by the novel caspase-inhibitor Q-VD-OPH. Exp. Neurol. *206*, 183–191.

Brennan, A.M., Suh, S.W., Won, S.J., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H., and Swanson, R. a (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. Nat. Neurosci. *12*, 857–863.

Broughton, B.R.S., Reutens, D.C., and Sobey, C.G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. Stroke *40*.

Brown, K.D., Maqsood, S., Huang, J.-Y., Pan, Y., Harkcom, W., Li, W., Sauve, A., Verdin, E., and Jaffrey, S.R. (2014). Activation of SIRT3 by the NAD+ Precursor Nicotinamide Riboside Protects from Noise-Induced Hearing Loss. Cell Metab. *20*, 1059–1068.

Brunet, a, Bonni, a, Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell *96*, 857–868.

Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., and De Flora A (2000). Connexin 43 hemi channels mediate Ca2+-regulated transmembrane NAD+ fluxes in intact cells. FASEB J. *15*, 10–12.

Bruzzone, S., Franco, L., Guida, L., Zocchi, E., Contini, P., Bisso, A., Usai, C., and De Flora, A. (2001). A Self-restricted CD38-connexin 43 Cross-talk Affects NAD+ and Cyclic ADP-ribose Metabolism and Regulates Intracellular Calcium in 3T3 Fibroblasts. J. Biol. Chem. *276*, 48300–48308.

Bubici, C., Papa, S., Dean, K., and Franzoso, G. (2006). Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. Oncogene *25*, 6731–6748.

Bull, N.D., Chidlow, G., Wood, J.P.M., Martin, K.R., and Casson, R.J. (2012). The mechanism of axonal degeneration after perikaryal excitotoxic injury to the retina. Exp. Neurol. *236*, 34–45.

Burke, R.E., and O'Malley, K. (2013). Axon degeneration in Parkinson's disease. Exp. Neurol. *246*, 72–83.

Burnstock, G. (2007). Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. 659–797.

C

Callahan, L.M., and Coleman, P.D. (1995). Neurons bearing neurofibrillary tangles are responsible for selected synaptic deficits in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging *16*, 311–314.

Campenot (1977). Local control of neurite development by nerve growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. *74*, 4516–4519.

Campenot (1982). Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. Dev. Biol. *93*, 13–21.

Cantó, C., Houtkooper, R.H., Pirinen, E., Youn, D.Y., Oosterveer, M.H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P.J., Yamamoto, H., Andreux, P. a, Cettour-Rose, P., et al. (2012). The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. Cell Metab. *15*, 838–847.

Cantó, C., Menzies, K.J., and Auwerx, J. (2015). NAD+ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. Cell Metab.

Cardoso, A.M., Schetinger, M.R.C., Correia-de-Sá, P., and Sévigny, J. (2015). Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. Auton. Neurosci. Basic Clin. *191*, 25–38.

Carlezon, W.A., Duman, R.S., and Nestler, E.J. (2005). The many faces of CREB. Trends Neurosci. *28*, 436–445.

Caserta, T.M., Smith, A.N., Gultice, A.D., Reedy, M.A., and Brown, T.L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. Apoptosis *8*, 345–352.

Caspersen, C. (2005). Mitochondrial A : a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. FASEB J. *19*, 2040–2041.

Cattelan, A., Ceolotto, G., Bova, S., Albiero, M., Kuppusamy, M., De Martin, S., Semplicini, A., Fadini, G.P., de Kreutzenberg, S.V., and Avogaro, A. (2014). NAD^+-dependent SIRT1 deactivation has a key role on ischemia-reperfusion-induced apoptosis. Vascul. Pharmacol. *70*, 35–44.

Cecchi, C., and Stefani, M. (2013). The amyloid-cell membrane system. The interplay between the biophysical features of oligomers/fibrils and cell membrane defines amyloid toxicity. Biophys. Chem. *182*, 30–43.

Cerutti, R., Pirinen, E., Lamperti, C., Marchet, S., Sauve, A.A., Li, W., Leoni, V., Schon, E.A., Dantzer, F., Auwerx, J., et al. (2014). NAD+-dependent activation of Sirt1 corrects the phenotype in a mouse model of mitochondrial disease. Cell Metab. *19*, 1042–1049.

Chaudhry, F.A., Reimer, R.J., and Edwards, R.H. (2002). The glutamine commute: Take the N line and transfer to the A. J. Cell Biol. *157*, 349–355.

Cheung, G., Chever, O., and Rouach, N. (2014). Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. Front. Cell. Neurosci. *8*, 348.

Choudhary, C., Weinert, B.T., Nishida, Y., Verdin, E., and Mann, M. (2014). The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 536–550.

Chung, R.S., McCormack, G.H., King, A.E., West, A.K., and Vickers, J.C. (2005). Glutamate induces rapid loss of axonal neurofilament proteins from cortical neurons in vitro. Exp. Neurol. *193*, 481–488.

Cleveland, D.W., and Rothstein, J.D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. Nat. Rev. Neurosci. *2*, 806–819.

Cognato, G. de P., and Bonan, C.D. (2010). Ectonucleotidases and Epilepsy. Open Neurosci. J. *4*, 44–52.

Cohen, M.S., Ghosh, A.K., Kim, H.J., Jeon, N.L., and Jaffrey, S.R. (2012). Chemical genetic-mediated spatial regulation of protein expression in neurons reveals an axonal function for wld(s). Chem. Biol. *19*, 179–187.

Coleman (2005). Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. Nat. Rev. Neurosci. *6*, 889–898.

Coleman, M. (2011). Molecular Signaling. How Do Axons Die? (Elsevier Inc.).

Coleman, M.P., and Freeman, M.R. (2010). Wallerian degeneration, wld(s), and nmnat. Annu. Rev. Neurosci. *33*, 245–267.

Coleman, M.P., Conforti, L., Buckmaster, E.A., Tarlton, A., Ewing, R.M., Brown, M.C., Mary F. Lyon, A., and Perry, V.H. (1998). An 85-kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (Wld s) mouse. *95*, 9985–9990.

Collins (1972). The Management in the Mouse * of Nicotinamide and Nicotinic Acid. *217*.

Collins, and Chaykin, S. (1971). Comparative metabolism of nicotinamide and nicotinic acid in mice. Biochem. J. *125*, 117P.

Collins, M.O., Husi, H., Yu, L., Brandon, J.M., Anderson, C.N.G., Blackstock, W.P., Choudhary, J.S., and Grant, S.G.N. (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. J. Neurochem. *97 Suppl 1*, 16–23.

Conforti, Fang, G., Beirowski, B., Wang, M.S., Sorci, L., Asress, S., Adalbert, R., Silva, A., Bridge, K., Huang, X.P., et al. (2007). NAD(+) and axon degeneration revisited: Nmnat1 cannot substitute for Wld(S) to delay Wallerian degeneration. Cell Death Differ. *14*, 116–127.

Conforti, L., Wilbrey, A., Morreale, G., Janeckova, L., Beirowski, B., Adalbert, R., Mazzola, F., Di Stefano, M., Hartley, R., Babetto, E., et al. (2009). Wld S protein requires Nmnat activity and a short N-terminal sequence to protect axons in mice. J. Cell Biol. *184*, 491–500.

Conforti, L., Gilley, J., and Coleman, M.P. (2014). Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. Nat. Rev. Neurosci. *15*, 394–409.

Conway, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M., and Lansbury, P.T. (2001). Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. Science *294*, 1346–1349.

Cunha, R.A. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. Neurochem. Int. *38*, 107–125.

Curtis, D.R., Phillis, J.W., and Watkins, J.C. (1960). The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. J. Physiol. *150*, 656–682.

D

Dasuri, K., Zhang, L., and Keller, J.N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. Free Radic. Biol. Med. *62*, 170–185.

Degterev, A., Hitomi, J., Germscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., et al. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. Nat. Chem. Biol. *4*, 313–321.

Deléglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Alleaume-Butaux, A., Hjorth, J.J., Vignes, M., Schneider, B., Brugg, B., Viovy, J.-L., and Peyrin, J.-M. (2013). Synapto-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. PLoS One *8*, e71103.

Deléglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., Vignes, M., Viovy, J.-L., Jacotot, E., Peyrin, J.-M., et al. (2014). B-Amyloid Induces a Dying-Back Process and Remote Trans-Synaptic Alterations in a Microfluidic-Based Reconstructed Neuronal Network. Acta Neuropathol. Commun. *2*, 145.

Denu, J.M. (2005). Vitamin B3 and sirtuin function. Trends Biochem. Sci. *30*, 479–483.

Deplanque (2006). Correspondances en neurologie vasculaire Vol. VI, jan 2006,. *VI*, 2–4.

Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. J. Biol. Chem. *283*, 9089–9100.

Díez-Zaera, M., Díaz-Hernández, J.I., Hernández-Álvarez, E., Zimmermann, H., Díaz-Hernández, M., and Miras-Portugal, M.T. (2011). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. Mol. Biol. Cell *22*, 1014–1024.

Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. Pharmacol. Ther. *81*, 163–221.

Donmez, G. (2012). The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration. Trends Pharmacol. Sci. *33*, 494–501.

Donmez, G., and Outeiro, T.F. (2013). SIRT1 and SIRT2: Emerging targets in neurodegeneration. EMBO Mol. Med. *5*, 344–352.

Downward, J. (1999). How BAD phosphorylation is good for survival. Nat. Cell Biol. *1*, E33–E35.

Duan, S.-R., Wang, J.-X., Wang, J., Xu, R., Zhao, J.-K., and Wang, D.-S. (2010). Ischemia induces endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis in human brain. Neurosci. Lett. *475*, 132–135.

Duara, R., Loewenstein, D.A., Potter, E., Appel, J., Greig, M.T., Urs, R., Shen, Q., Raj, A., Small, B., Barker, W., et al. (2008). Medial temporal lobe atrophy on MRI scans and the diagnosis of Alzheimer disease. Neurology *71*, 1986–1992.

Duchen, M.R. (2012). Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. *464*, 111–121.

E

Emanuelli, M., Carnevali, F., Saccucci, F., Pierella, F., Amici, A., Raffaelli, N., and Magni, G. (2001). Molecular cloning, chromosomal localization, tissue mRNA levels, bacterial expression, and enzymatic properties of human NMN adenylyltransferase. J. Biol. Chem. *276*, 406–412.

Emmanouilidou, E., Stefanis, L., and Vekrellis, K. (2010). Cell-produced α-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. Neurobiol. Aging *31*, 953–968.

Eun, J., Miller, B.R., Babetto, E., Cho, Y., Sasaki, Y., and Qayum, S. (2012). SCG10 is a JNK target in the axonal degeneration pathway. *109*.

F

Feng, Y., Fratkin, J.D., and LeBlanc, M.H. (2003). Inhibiting caspase-8 after injury reduces hypoxic-ischemic brain injury in the newborn rat. Eur. J. Pharmacol. *481*, 169–173.

Ferrante, R.J., Browne, S.E., Shinobu, L. a, Bowling, a C., Baik, M.J., MacGarvey, U., Kowall, N.W., Brown, R.H., and Beal, M.F. (1997). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurochem. *69*, 2064–2074.

Ferrer, I., Friguls, B., Dalfó, E., Justicia, C., and Planas, A.M. (2003). Signalling of Apoptosis in the Penumbra Following. Neuropathology 472–481.

Ferri, A. (2003). Inhibiting Axon Degeneration and Synapse Loss Attenuates Apoptosis and Disease Progression in a Mouse Model of Motoneuron Disease. Med. Eng. Phys. *25*, 75–78.

Fink, K., Zhu, J., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Endres, M., Ma, J., Dalkara, T., Yuan, J., and Moskowitz, M. a (1998). Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. J. Cereb. Blood Flow Metab. *18*, 1071–1076.

Finn, J.T., Weil, M., Archer, F., Siman, R., Srinivasan, A., and Raff, M.C. (2000). Evidence that Wallerian degeneration and localized axon degeneration induced by local neurotrophin deprivation do not involve caspases. J. Neurosci. *20*, 1333–1341.

Ford, E., Voit, R., Liszt, G., Magin, C., Grummt, I., and Guarente, L. (2006). Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription service Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. 1075–1080.

Forder, J.P., and Tymianski, M. (2009). Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules. Neuroscience *158*, 293–300.

Frank-Cannon, T.C., Alto, L.T., McAlpine, F.E., and Tansey, M.G. (2009). Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? Mol. Neurodegener. *4*, 47.

Freeman, M.R. (2014). Signaling mechanisms regulating Wallerian degeneration. Curr. Opin. Neurobiol. *27*, 224–231.

Freire, M. (2012). Pathophysiology of neurodegeneration following traumatic brain injury. West Indian Med. J. *61*, 751–755.

Freitas, B.C.G., Gereben, B., Castillo, M., Kall??, I., Ze??ld, A., Egri, P., Liposits, Z., Zavacki, A.M., Maciel, R.M.B., Jo, S., et al. (2010). Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells. J. Clin. Invest. *120*, 2206–2217.

G

Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Buettner, S., Eisenberg, T., Vandenabeele, P., Madeo, F., and Kroemer, G. (2011). Programmed necrosis from molecules to health and disease. Int. Rev. Cell Mol. Biol. *289*, 1–35.

Gandhi, S., and Abramov, A.Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. Oxid.

Med. Cell. Longev. *2012*.

Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M., and Ascherio, A. (2011). Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. 863–869.

Gerdts, Summers, D.W., Sasaki, Y., DiAntonio, A., and Milbrandt, J. (2013). Sarm1-mediated axon degeneration requires both SAM and TIR interactions. J. Neurosci. *33*, 13569–13580.

Gerdts, Brace, E.J., Sasaki, Y., DiAntonio, A., and Milbrandt, J. (2015). SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD+ destruction. Science (80-.). *348*, 453–457.

Gerdts, J., Summers, D.W., Milbrandt, J., and DiAntonio, A. (2016). Axon Self-Destruction: New Links among SARM1, MAPKs, and NAD+ Metabolism. Neuron *89*, 449–460.

Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., and Sibley, D.R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. Science (80-.). *250*, 1429–1432.

Ghosh, D., LeVault, K.R., Barnett, A.J., and Brewer, G.J. (2012). A reversible early oxidized redox state that precedes macromolecular ROS damage in aging nontransgenic and 3xTg-AD mouse neurons. J. Neurosci. *32*, 5821–5832.

Gielen, M., Siegler Retchless, B., Mony, L., Johnson, J.W., and Paoletti, P. (2009). Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. Nature *459*, 703–707.

Gilley, J., and Coleman, M.P. (2010). Endogenous Nmnat2 is an essential survival factor for maintenance of healthy axons. PLoS Biol. *8*, e1000300.

Gilley, J., Coffer, P.J., and Ham, J. (2003). FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. J. Cell Biol. *162*, 613–622.

Gilley, J., Orsomando, G., Nascimento-Ferreira, I., and Coleman, M.P. (2015). Absence of SARM1 rescues development and survival of NMNAT2-deficient axons. Cell Rep. *10*, 1974–1981.

Gingrich, W., and Schlenk, F. (1944). Codehydrogenase I and Other Pyridinium Compounds as V-Factor for Hemophilus influenzae and H. parainfluenzae. J. Bacteriol. *47*, 535–550.

Giralt, A., Hondares, E., Villena, J. a, Ribas, F., Díaz-Delfín, J., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype. J. Biol. Chem. *286*, 16958–16966.

Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., et al. (2013). Heart disease and stroke statistics-2013 update: A Report from the American Heart Association. Circulation *127*.

Goebel, D.J., and Winkler, B.S. (2006). Blockade of PARP activity attenuates poly(ADP-ribosyl)ation but offers only partial neuroprotection against NMDA-induced cell death in the rat retina. J. Neurochem. *98*, 1732–1745.

Goedert, M., and Jakes, R. (2005). Mutations causing neurodegenerative tauopathies. Biochim. Biophys. Acta *1739*, 240–250.

Goldberger, J., Waring, C., and Willets, D. (1914). The treatment and prevention of pellagra. Public Heal. Reports *29*, 2821–2825.

Gomes, A.P., Price, N.L., Ling, A.J.Y., Moslehi, J.J., Montgomery, M.K., Rajman, L., White, J.P.,

Teodoro, J.S., Wrann, C.D., Hubbard, B.P., et al. (2013). Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. Cell *155*, 1624–1638.

Gómez-Villafuertes, R., Pintor, J., Miras-Portugal, M.T., and Gualix, J. (2014). Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) activity in Neuro-2a neuroblastoma cells: expression changes associated with neuronal differentiation. J. Neurochem. *131*, 290–302.

Gong, B., Pan, Y., Vempati, P., Zhao, W., Knable, L., Ho, L., Wang, J., Sastre, M., Ono, K., Sauve, A.A., et al. (2013). Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α regulated β-secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models. Neurobiol. Aging *34*, 1581–1588.

Gopal, E., Miyauchi, S., Martin, P.M., Ananth, S., Roon, P., Smith, S.B., and Ganapathy, V. (2007). Transport of nicotinate and structurally related compounds by human SMCT1 (SLC5A8) and its relevance to drug transport in the mammalian intestinal tract. Pharm. Res. *24*, 575–584.

Granic, I., Masman, M.F., Luiten, P.G.M., and Eisel, U.L.M. (2010). Braak staging in mouse models of Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. *177*, 1603–1605.

Greco, R., Tassorelli, C., Stefania Mangione, A., Levandis, G., Certo, M., Nappi, G., Bagetta, G., Blandini, F., and Amantea, D. (2015). Neuroprotection by the PARP inhibitor PJ34 modulates cerebral and circulating RAGE levels in rats exposed to focal brain ischemia. Eur. J. Pharmacol. *744*, 91–97.

Griffith, D.A., and Jarvis, S.M. (1996). Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr. *1286*, 153–181.

Grobben, B., Anciaux, K., Roymans, D., Stefan, C., Bollen, M., Esmans, E.L., and Slegers, H. (1999a). An Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase Is One of the Main Enzymes Involved in the Extracellular Metabolism of ATP in Rat C6 Glioma. J. Neurochem. *72*, 826–834.

Grobben, B., Anciaux, K., Roymans, D., Stefan, C., Bollen, M., Esmans, E.L., and Slegers, H. (1999b). An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma. J. Neurochem. *72*, 826–834.

Gross, C.J., and Henderson, L.M. (1983). Digestion and absorption of NAD by the small intestine of the rat. J. Nutr. *113*, 412–420.

Grozio, A., Sociali, G., Sturla, L., Caffa, I., Soncini, D., Salis, A., Raffaelli, N., De Flora, A., Nencioni, A., and Bruzzone, S. (2013). CD73 Protein as a Source of Extracellular Precursors for Sustained NAD+ Biosynthesis in FK866-treated Tumor Cells. J. Biol. Chem. *288*, 25938–25949.

Guarente, L. (2000). Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. Genes Dev. *14*, 1021–1026.

Gusella, J.F., and MacDonald, M.E. (2000). Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. Nat. Rev. Neurosci. *1*, 109–115.

H

Haigis, M.C., Mostoslavsky, R., Haigis, K.M., Fahie, K., Christodoulou, D.C., Murphy, A., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Karow, M., Blander, G., et al. (2006). SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic ?? Cells. Cell *126*, 941–954.

Han, B.H. (2002). Selective, Reversible Caspase-3 Inhibitor is Neuroprotective and Reveals Distinct Pathways of Cell Death Following Neonatal Hypoxic-ischemic Brain Injury. 1–5.

Hansen, H.H., Briem, T., Dzietko, M., Sifringer, M., Voss, A., Rzeski, W., Zdzisinska, B., Thor, F., Heumann, R., Stepulak, A., et al. (2004). Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. Neurobiol. Dis. *16*, 440–453.

Hara, H., Friedlander, R.M., Gagliardini, V., Ayata, C., Fink, K., Huang, Z., Shimizu-Sasamata, M., Yuan, J., and Moskowitz, M.A. (1997). Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 2007–2012.

Hara, N., Yamada, K., Shibata, T., Osago, H., Hashimoto, T., and Tsuchiya, M. (2007). Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells. J. Biol. Chem. *282*, 24574–24582.

Hara, N., Yamada, K., Shibata, T., Osago, H., and Tsuchiya, M. (2011). Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin does not catalyze nicotinamide mononucleotide formation in blood plasma. PLoS One *6*.

Hardingham, G.E. (2009). Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. Biochem. Soc. Trans. *37*, 1147–1160.

Hardingham, G.E., and Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 682–696.

Hardingham, G.E., Arnold, F.J., and Bading, H. (2001). Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. Nat. Neurosci. *4*, 261–267.

Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. Nat. Neurosci. *5*, 405–414.

Harlan, B.A., Pehar, M., Sharma, D.R., Beeson, G., Beeson, C.C., and Vargas, M.R. (2016). Enhancing NAD^+ salvage pathway reverts the toxicity of primary astrocytes expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. J. Biol. Chem. *291*, jbc.M115.698779.

Hasmann, M., and Schemainda, I. (2003). FK866, a Highly Specific Noncompetitive Inhibitor of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, Represents a Novel Mechanism for Induction of Tumor Cell Apoptosis. Cancer Res. *63*, 7436–7442.

Von Heideman, A., Berglund, ??ke, Larsson, R., Nygren, P., and Larsson, R. (2010). Safety and efficacy of NAD depleting cancer drugs: Results of a phase i clinical trial of CHS 828 and overview of published data. Cancer Chemother. Pharmacol. *65*, 1165–1172.

Hirsch, E.C., Hunot, S., and Hartmann, A. (2005). Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. Park. Relat. Disord. *11*, 9–15.

Holen, K., Saltz, L.B., Hollywood, E., Burk, K., and Hanauske, A.R. (2008). The pharmacokinetics, toxicities, and biologic effects of FK866, a nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis inhibitor. Invest. New Drugs *26*, 45–51.

Hosie, K. a, King, A.E., Blizzard, C. a, Vickers, J.C., and Dickson, T.C. (2012). Chronic excitotoxin-induced axon degeneration in a compartmented neuronal culture model. ASN Neuro *4*, 47–57.

Houtkooper, R.H., Cantó, C., Wanders, R.J., and Auwerx, J. (2010). The Secret Life of NAD + : An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways. Endocr. Rev. *31*, 194–223.

Howell, G.R., Libby, R.T., Jakobs, T.C., Smith, R.S., Phalan, F.C., Barter, J.W., Barbay, J.M., Marchant, J.K., Mahesh, N., Porciatti, V., et al. (2007). Axons of retinal ganglion cells are insulted in

the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. J. Cell Biol. *179*, 1523–1537.

Hoyle, C.H. V, Hilderman, R.H., Pintor, J.J., Schluter, H., and King, B.F. (2001). Diadenosine polyphosphates as extracellular signal molecules. Drug Dev. Res. *52*, 260–273.

Hsu, T.-C., Wang, C.-K., Yang, C.-Y., Lee, L.-C., Hsieh-Li, H.-M., Ro, L.-S., Chen, C.-M., Lee-Chen, G.-J., and Su, M.-T. (2014). Deactivation of TBP contributes to SCA17 pathogenesis. Hum. Mol. Genet. *23*, 6878–6893.

Hunsucker, S.A., Mitchell, B.S., and Spychala, J. (2005). The 5???-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. Pharmacol. Ther. *107*, 1–30.

Hurtado, D.E., Molina-Porcel, L., Iba, M., Aboagye, A.K., Paul, S.M., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2010). A{beta} accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model. Am. J. Pathol. *177*, 1977–1988.

Hussain, S.P., Amstad, P., He, P., Robles, A., Lupold, S., Kaneko, I., Ichimiya, M., Sengupta, S., Mechanic, L., Okamura, S., et al. (2004). p53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis. Cancer Res. *64*, 2350–2356.

I

Imai, S., and Guarente, L. (2014). NAD+ and sirtuins in aging and disease. Trends Cell Biol. *24*, 464–471.

Inoue, S., Davis, D.P., Drummond, J.C., Cole, D.J., and Patel, P.M. (2006). The combination of isoflurane and caspase 8 inhibition results in sustained neuroprotection in rats subject to focal cerebral ischemia. Anesth. Analg. *102*, 1548–1555.

Isaacs, A.M., Senn, D.B., Yuan, M., Shine, J.P., and Yankner, B.A. (2006). Acceleration of amyloid ??-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium. J. Biol. Chem. *281*, 27916–27923.

Ivanova, D., Dirks, A., Montenegro-Venegas, C., Schöne, C., Altrock, W.D., Marini, C., Frischknecht, R., Schanze, D., Zenker, M., Gundelfinger, E.D., et al. (2015). Synaptic activity controls localization and function of CtBP1 via binding to Bassoon and Piccolo. EMBO J. *34*, 1056–1077.

J

Jacobson, E.L., Dame, A.J., Pyrek, J.S., and Jacobson, M.K. (1995). Evaluating the role of niacin in human carcinogenesis. Biochimie *77*, 394–398.

Jullienne, A., Montagne, A., Orset, C., Lesept, F., Jane, D.E., Monaghan, D.T., Maubert, E., Vivien, D., and Ali, C. (2011). Selective inhibition of GluN2D-containing N-methyl-D-aspartate receptors prevents tissue plasminogen activator-promoted neurotoxicity both in vitro and in vivo. Mol. Neurodegener. *6*, 68.

K

Kaeberlein, M., Mcvey, M., and Guarente, L. (1999). Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms. 2570–2580.

Kagan, B.L. (2012). Membrane pores in the pathogenesis of neurodegenerative disease. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. *107*, 295–325.

Kambe, A., Yokota, M., Saido, T.C., Satokata, I., Fujikawa, H., Tabuchi, S., Kamitani, H., and

Watanabe, T. (2005). Spatial resolution of calpain-catalyzed proteolysis in focal cerebral ischemia. Brain Res. *1040*, 36–43.

Kanaan, N.M., Pigino, G.F., Brady, S.T., Lazarov, O., Binder, L.I., and Morfini, G. a (2013). Axonal degeneration in Alzheimer's disease: when signaling abnormalities meet the axonal transport system. Exp. Neurol. *246*, 44–53.

Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E., and Endou, H. (1998). Expression Cloning and Characterization Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Expression Cloning and Characterization of a Transporter for Large Neutral Amino Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Antigen. 2–6.

Kang, S.J., Wang, S., Hara, H., Peterson, E.P., Namura, S., Amin-Hanjani, S., Huang, Z., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Thornberry, N.A., et al. (2000). Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. J. Cell Biol. *149*, 613–622.

Kaundal, R.K., Shah, K.K., and Sharma, S.S. (2006). Neuroprotective effects of NU1025, a PARP inhibitor in cerebral ischemia are mediated through reduction in NAD depletion and DNA fragmentation. Life Sci. *79*, 2293–2302.

Kauppinen, T.M., and Swanson, R.A. (2007). The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. Neuroscience *145*, 1267–1272.

Kerchner, G.A., Wilding, T.J., Huettner, J.E., and Zhuo, M. (2002). Kainate receptor subunits underlying presynaptic regulation of transmitter release in the dorsal horn. J. Neurosci. *22*, 8010–8017.

Khan, N.A., Auranen, M., Paetau, I., Pirinen, E., Euro, L., Forsstr??m, S., Pasila, L., Velagapudi, V., Carroll, C.J., Auwerx, J., et al. (2014). Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. EMBO Mol. Med. *6*, 721–731.

Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., and Zoing, M.C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet *377*, 942–955.

Kilinc, D., Peyrin, J.-M., Soubeyre, V., Magnifico, S., Saias, L., Viovy, J.-L., and Brugg, B. (2011). Wallerian-like degeneration of central neurons after synchronized and geometrically registered mass axotomy in a three-compartmental microfluidic chip. Neurotox. Res. *19*, 149–161.

Kim, Lu, H.F., and Alano, C.C. (2011a). Neuronal sirt3 protects against excitotoxic injury in mouse cortical neuron culture. PLoS One *6*.

Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J., and Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. Exp. Neurobiol. *24*, 325–340.

Kim, K., Lee, S.G., Kegelman, T.P., Su, Z.Z., Das, S.K., Dash, R., Dasgupta, S., Barral, P.M., Hedvat, M., Diaz, P., et al. (2011b). Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. J. Cell. Physiol. *226*, 2484–2493.

King, A.E., Ackley, M.A., Cass, C.E., Young, J.D., and Baldwin, S.A. (2006). Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. Trends Pharmacol. Sci. *27*, 416–425.

Kiss, A., Farah, K., Kim, J., Garriock, R.J., Drysdale, T.A., and Hammond, J.R. (2000). Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. Biochem. J. *352 Pt 2*, 363–372.

Koch-Nolte, F., Fischer, S., Haag, F., and Ziegler, M. (2011). Compartmentation of NAD+-dependent

signalling. FEBS Lett. *585*, 1651–1656.

Koehn, C.J., and Elvehjem, C.. (1937). Concentration of Antipellegra Factor. 693–699.

Kortekaas, R., Leenders, K.L., Van Oostrom, J.C.H., Vaalburg, W., Bart, J., Willemsen, A.T.M., and Hendrikse, N.H. (2005). Blood-brain barrier dysfunction in Parkinsonian midbrain in vivo. Ann. Neurol. *57*, 176–179.

Krajewska, M., You, Z., Rong, J., Kress, C., Huang, X., Yang, J., Kyoda, T., Leyva, R., Banares, S., Hu, Y., et al. (2011). Neuronal deletion of caspase 8 protects against brain injury in mouse models of controlled cortical impact and kainic acid-induced excitotoxicity. PLoS One *6*.

Kraus, D., Pirinen, E., Pulinilkunnil, T.C., Gong, F., Wang, Y., Alhonen, L., Puigserver, P., and Kahn, B.B. (2015). Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity. *508*, 258–262.

Krebiehl, G., Ruckerbauer, S., Burbulla, L.F., Kieper, N., Maurer, B., Waak, J., Wolburg, H., Gizatullina, Z., Gellerich, F.N., Woitalla, D., et al. (2010). Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. PLoS One *5*.

Krehl, W.. (1995). GROWTH-RETARDING EFFECT OF CORN IN NICOTINIC ACID-LOW RATIONS AND ITS COUNTERACTION BY TRYPTOPHANE. October 1338–1344.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V, El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. *16*, 3–11.

Kwong, J.Q., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2006). The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. J. Neurochem. *97*, 1659–1675.

L

De La Monte, S.M., Gabuzda, D.H., Ho, D.D., Brown, R.H., Hedley-Whyte, E.T., Schooley, R.T., Hirsch, M.S., and Bhan, A.K. (1988). Peripheral neuropathy in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann. Neurol. *23*, 485–492.

Lama, S., Qiao, M., Kirton, A., Sun, S., Cheng, E., Foniok, T., and Tuor, U.I. (2011). Imaging Corticospinal Degeneration in Neonatal Rats with Unilateral Cerebral Infarction. Exp. Neurol. *228*, 192–199.

Langer, D., Hammer, K., Koszalka, P., Schrader, J., Robson, S., and Zimmermann, H. (2008). Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. Cell Tissue Res. *334*, 199–217.

Langston, J.W., and Ballard, P.A. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. N. Engl. J. Med. *309*, 310.

Lau, D., and Bading, H. (2009). Synaptic Activity-Mediated Suppression of p53 and Induction of Nuclear Calcium-Regulated Neuroprotective Genes Promote Survival through Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition. J. Neurosci. *29*, 4420–4429.

Lau, C., Niere, M., and Ziegler, M. (2009). The NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) protein family. 410–431.

Lee, Y.H., Nair, S., Rousseau, E., Allison, D.B., Page, G.P., Tataranni, P.A., Bogardus, C., and Permana, P.A. (2005). Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: Increased expression of inflammation-related genes. Diabetologia

48, 1776–1783.

Legos, J.J., McLaughlin, B., Skaper, S.D., Strijbos, P.J.L.M., Parsons, A.A., Aizenman, E., Herin, G.A., Barone, F.C., and Erhardt, J.A. (2002). The selective p38 inhibitor SB-239063 protects primary neurons from mild to moderate excitotoxic injury. Eur. J. Pharmacol. *447*, 37–42.

Leppä, S., and Bohmann, D. (1999). Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. Oncogene *18*, 6158–6162.

Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kayed, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature *440*, 352–357.

Lesné, S., Kotilinek, L., and Ashe, K.H. (2008). Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-?? assemblies have intact memory function. Neuroscience *151*, 745–749.

Léveillé, F., Papadia, S., Fricker, M., Bell, K.F.S., Soriano, F.X., Martel, M.-A., Puddifoot, C., Habel, M., Wyllie, D.J., Ikonomidou, C., et al. (2010). Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. J. Neurosci. *30*, 2623–2635.

Lewerenz, J., and Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? Front. Neurosci. *9*, 469.

Li, Li, S., Yu, Z., Shelbourne, P., and Li, X. (2001). Huntingtin Aggregate-Associated Axonal Degeneration is an Early Pathological Event in Huntington ' s Disease Mice. J Neurosci *21*, 8473–8481.

Li, B., Gu, L., Hertz, L., and Peng, L. (2013). Expression of nucleoside transporter in freshly isolated neurons and astrocytes from mouse brain. Neurochem. Res. *38*, 2351–2358.

Li, H., Colbourne, F., Sun, P., Zhao, Z., Buchan, A.M., and Iadecola, C. (2000). Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. Stroke. *31*, 176–182.

Li, J., Mayne, R., and Wu, C. (2002). A Novel Muscle-specific ? 1 Integrin Binding Protein (MIBP) that Modulates Myogenic Differentiation. J. Anat. *47*, 557–560.

Li, J., Rao, H., Burkin, D., Kaufman, S.J., and Wu, C. (2003). The muscle integrin binding protein (MIBP) interacts with a7B1 integrin and regulates cell adhesion and laminin matrix deposition. Dev. Biol. *261*, 209–219.

Li, Y., Yang, X., Ma, C., Qiao, J., and Zhang, C. (2008). Necroptosis contributes to the NMDA-induced excitotoxicity in rat's cultured cortical neurons. Neurosci. Lett. *447*, 120–123.

Li, Y., Liu, W., Oo, T.F., Wang, L., Tang, Y., Jackson-Lewis, V., Zhou, C., Geghman, K., Bogdanov, M., Przedborski, S., et al. (2009). Mutant LRRK2(R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. Nat. Neurosci. *12*, 826–828.

Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature *443*, 787–795.

Lingor, P., Koch, J.C., Tönges, L., and Bähr, M. (2012). Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. Cell Tissue Res. *349*, 289–311.

Linton, S.D., Aja, T., Armstrong, R.A., Bai, X., Chen, L.-S., Chen, N., Ching, B., Contreras, P., Diaz, J.-L., Fisher, C.D., et al. (2005). First-in-class pan caspase inhibitor developed for the treatment of liver disease. J. Med. Chem. *48*, 6779–6782.

Liu, D., Pitta, M., and Mattson, M.P. (2008). Preventing NAD(+) depletion protects neurons against

excitotoxicity: bioenergetic effects of mild mitochondrial uncoupling and caloric restriction. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1147*, 275–282.

Liu, D., Gharavi, R., Pitta, M., Gleichmann, M., and Mattson, M.P. (2009a). Nicotinamide prevents NAD+ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral Ischemia: NAD+ consumption by sirt1 may endanger energetically compromised neurons. NeuroMolecular Med. *11*, 28–42.

Liu, D., Pitta, M., Jiang, H., Lee, J.H., Zhang, G., Chen, X., Kawamoto, E.M., and Mattson, M.P. (2013). Nicotinamide forestalls pathology and cognitive decline in Alzheimer mice: Evidence for improved neuronal bioenergetics and autophagy procession. Neurobiol. Aging *34*, 1564–1580.

Liu, W., Vives-Bauza, C., Acín-Peréz-, R., Yamamoto, A., Tan, Y., Li, Y., Magrané, J., Stavarache, M.A., Shaffer, S., Chang, S., et al. (2009b). PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and alpha-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. PLoS One *4*, e4597.

LoRusso, P.M., Li, J., Burger, A., Heilbrun, L.K., Sausville, E., Boerner, S., Smith, D., Pilat, M.J., Zhang, J., Tolaney, S., et al. (2016). Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor veliparib with irinotecan in patients with advanced tumors. Clin. Cancer Res. 1–12.

Lu, S.P., Kato, M., and Lin, S.J. (2009). Assimilation of endogenous nicotinamide riboside is essential for calorie restriction-mediated life span extension in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. *284*, 17110–17119.

Lubbe, S., and Morris, H.R. (2014). Recent advances in Parkinson's disease genetics. J. Neurol. *261*, 259–266.

Lunn, E., Perry, V., Brown, M., Rosen, H., and Gordon, S. (1989). Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. Eur. J. Neurosci.

Lynch, M. a (2010). Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function. Front. Aging Neurosci. *1*, 6.

Lyon, M.F., Ogunkolade, B.W., Brown, M.C., Atherton, D.J., and Perry, V.H. (1993). A gene affecting Wallerian nerve degeneration maps distally on mouse chromosome 4. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 9717–9720.

M

Mack, T.G., Reiner, M., Beirowski, B., Mi, W., Emanuelli, M., Wagner, D., Thomson, D., Gillingwater, T., Court, F., Conforti, L., et al. (2001). Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene. Nat. Neurosci. *4*, 1199–1206.

Magill, J.C., Byl, M.F., Goldwaser, B., Instructor, M.P., Yates, B., Morency, J.R., Kaban, L.B., Guralnick, W.C., and Associate, M.J.T. (2010). Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model. *3*, 1–19.

Magnifico, S., Saias, L., Deleglise, B., Duplus, E., Kilinc, D., Viovy, J.-L., Brugg, B., and Peyrin, J.-M. (2013). NAD+ acts on mitochondrial SirT3 to prevent axonal caspase activation and axonal degeneration. FASEB J. *27*, 4712–4722.

Manabat, C., Han, B.H., Wendland, M., Derugin, N., Fox, C.K., Choi, J., Holtzman, D.M., Ferriero, D.M., and Vexler, Z.S. (2003). Reperfusion differentially induces caspase-3 activation in ischemic core and penumbra after stroke in immature brain. Stroke *34*, 207–213.

Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., and Reddy, P.H. (2006). Mitochondria are a direct site of A?? accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. Hum. Mol. Genet. *15*, 1437–1449.

Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Bleckmann, S.C., Kern, H., Kretz, O., Martin Villalba, A., Tronche, F., Kellendonk, C., Gau, D., Kapfhammer, J., et al. (2002). Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. Nat. Genet. *31*, 47–54.

Marner, L., Nyengaard, J.R., Tang, Y., and Pakkenberg, B. (2003). Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. J. Comp. Neurol. *462*, 144–152.

Martin, L.J. (2006). Parkinson's Disease -Synuclein Transgenic Mice Develop Neuronal Mitochondrial Degeneration and Cell Death. J. Neurosci. *26*, 41–50.

Martin, Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2010). The impact of genetic research on our understanding of Parkinson's disease. Prog. Brain Res. *183*, 21–41.

Martin-Villalba, a, Herr, I., Jeremias, I., Hahne, M., Brandt, R., Vogel, J., Schenkel, J., Herdegen, T., and Debatin, K.M. (1999). CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. J. Neurosci. *19*, 3809–3817.

Martire, S., Mosca, L., and d'Erme, M. (2015). PARP-1 involvement in neurodegeneration: A focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases. Mech. Ageing Dev. *146–148*, 53–64.

Masliah, E., Alford, M., Deteresa, R., Mallory, M., and Hansen, L. (1996). Deficient Glutamate Transport Is Associated. Ann. Neurol. *1*, 759–766.

Massudi, H., Grant, R., Braidy, N., Guest, J., Farnsworth, B., and Guillemin, G.J. (2012). Age-associated changes in oxidative stress and NAD+ metabolism in human tissue. PLoS One *7*, e42357.

Mayo, L., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G., Moutin, M.-J., Lund, F.E., and Stein, R. (2008). Dual role of CD38 in microglial activation and activation-induced cell death. J. Immunol. *181*, 92–103.

Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 599–609.

Mazzone, G.L., and Nistri, A. (2011). Effect of the PARP-1 inhibitor PJ 34 on excitotoxic damage evoked by kainate on rat spinal cord organotypic slices. Cell. Mol. Neurobiol. *31*, 469–478.

Mei, S.-C., and Brenner, C. (2015). Calorie restriction-mediated replicative lifespan extension in yeast is non-cell autonomous. PLoS Biol. *13*, e1002048.

Miladinovic, T., Nashed, M.G., and Singh, G. (2015). Overview of Glutamatergic Dysregulation in Central Pathologies. Biomolecules *5*, 3112–3141.

Milde, S., Gilley, J., and Coleman, M.P. (2013). Subcellular Localization Determines the Stability and Axon Protective Capacity of Axon Survival Factor Nmnat2. PLoS Biol. *11*.

Miller, B.R., Press, C., Daniels, R.W., Sasaki, Y., Milbrandt, J., and DiAntonio, A. (2009). A dual leucine kinase-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. Nat. Neurosci. *12*, 387–389.

Mitsios, N., Gaffney, J., Krupinski, J., Mathias, R., Wang, Q., Hayward, S., Rubio, F., Kumar, P., Kumar, S., and Slevin, M. (2007). Expression of signaling molecules associated with apoptosis in

human ischemic stroke tissue. Cell Biochem. Biophys. *47*, 73–86.

Morales, I., Guzman-Martinez, L., Cerda-Troncoso, C., Farias, G.A., and Maccioni, R.B. (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. Front Cell Neurosci. *8*, 112.

More, S.V., Kumar, H., Kim, I.S., Song, S.Y., and Choi, D.K. (2013). Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. Mediators Inflamm. *2013*.

Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., Pang, W.W., Fischer, M.R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M.M., et al. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. Cell *124*, 315–329.

Mouchiroud, L., Houtkooper, R.H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Cantó, C., Mottis, A., Jo, Y.-S., Viswanathan, M., Schoonjans, K., et al. (2013). The NAD+/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. Cell *154*, 430–441.

Muralidharan Pillai, S., and Meredith, D. (2011). SLC36A4 (hPAT4) is a high affinity amino acid transporter when expressed in Xenopus laevis oocytes. J. Biol. Chem. *286*, 2455–2460.

Murray, C.J., and Lopez, A.D. (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. Lancet (London, England) *349*, 1269–1276.

N

Nakagawa, T., and Guarente, L. (2014). SnapShot: sirtuins, NAD, and aging. Cell Metab. *20*, 192–192.e1.

Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., and Sassone-Corsi, P. (2009). Circadian control of the NAD+ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. Science *324*, 654–657.

Nandagopal, K., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2001). Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. J Pharmacol Exp Ther *297*, 474–478.

Natori, S., Higuchi, H., Contreras, P., and Gores, G.J. (2003). The caspase inhibitor IDN-6556 prevents caspase activation and apoptosis in sinusoidal endothelial cells during liver preservation injury. Liver Transplant. *9*, 278–284.

Neumar, R.W. (2000). Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. Ann. Emerg. Med. *36*, 483–506.

Nicholls, D.G., Johnson-Cadwell, L., Vesce, S., Jekabsons, M., and Yadava, N. (2007). Bioenergetics of Mitochondria in Cultured Neurons and Their Role in Glutamate Excitotoxicity. J. Neurosci. Res. *85*, 2352–2359.

Nikiforov, A., Dölle, C., Niere, M., and Ziegler, M. (2011). Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: From entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. J. Biol. Chem. *286*, 21767–21778.

Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D.M., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. Nature *457*, 981–989.

Nimmrich, V., Reymann, K., Strassburger, M., Sch??der, U., Gross, G., Hahn, A., Schoemaker, H., Wicke, K., and M??ller, A. (2010). Inhibition of calpain prevents NMDA-induced cell death and ??-amyloid-induced synaptic dysfunction in hippocampal slice cultures: Research paper. Br. J. Pharmacol. *159*, 1523–1531.

Niswender, C.M., and Conn, P.J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol *50*, 295–322.

Nita, D.A., Nita, V., Spulber, S., Moldovan, M., Popa, D.P., Zagrean, A.M., and Zagrean, L. (2001). Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. J Cell Mol Med *5*, 163–170.

Northington, F.J., Chavez-Valdez, R., Graham, E.M., Razdan, S., Gauda, E.B., and Martin, L.J. (2011). Necrostatin decreases oxidative damage, inflammation, and injury after neonatal HI. J. Cereb. Blood Flow Metab. *31*, 178–189.

O

Obeso, J. a, Rodríguez-Oroz, M.C., Rodríguez, M., Lanciego, J.L., Artieda, J., Gonzalo, N., and Olanow, C.W. (2000). Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. Trends Neurosci. *23*, S8–S19.

Ohkubo, S., Kimura, J., and Matsuoka, I. (2000). Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells : a key enzyme mediating P1 antagonist-sensitive ATP response. Br. J. Pharmacol. *131*, 1667–1672.

Okuda, H., Higashi, Y., Nishida, K., Fujimoto, S., and Nagasawa, K. (2010). Contribution of P2X7 receptors to adenosine uptake by cultured mouse astrocytes. Glia *58*, 1757–1765.

Okuda, H., Nishida, K., Higashi, Y., and Nagasawa, K. (2013). NAD+ influx through connexin hemichannels prevents poly(ADP-ribose) polymerase-mediated astrocyte death. Life Sci. *92*, 808–814.

Opitz, C.A., and Heiland, I. (2015). Dynamics of NAD-metabolism: everything but constant. Biochem. Soc. Trans. *43*, 1127–1132.

Osterloh, J.M., Yang, J., Rooney, T.M., Fox, A.N., Adalbert, R., Powell, E.H., Sheehan, A.E., Avery, M.A., Hackett, R., Logan, M.A., et al. (2012). dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. Science *337*, 481–484.

Outeiro, T.F., Kontopoulos, E., Altmann, S.M., Kufareva, I., Strathearn, K.E., Amore, A.M., Volk, C.B., Maxwell, M.M., Rochet, J., Mclean, P.J., et al. (2007). Sirtuin 2 Inhibitors Rescue a-Synuclein–Mediated Toxicity in Models of Parkinson's Disease. *317*, 2–5.

P

Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., and Shen, J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. J. Biol. Chem. *279*, 18614–18622.

Pantoni, L. (2002). Pathophysiology of age-related cerebral white matter changes. Cerebrovasc. Dis. *13 Suppl 2*, 7–10.

Di Paola, M., Spalletta, G., and Caltagirone, C. (2010). In vivo structural neuroanatomy of corpus callosum in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment using different MRI techniques: A review. J. Alzheimer's Dis. *20*, 67–95.

Papadia, S., Stevenson, P., Hardingham, N.R., Bading, H., and Hardingham, G.E. (2005). Nuclear Ca 2+ and the cAMP Response Element-Binding Protein Family Mediate a Late Phase of Activity-Dependent Neuroprotection. Neuroscience *25*, 4279–4287.

Papadia, S., Soriano, F.X., Léveillé, F., Martel, M.-A., Dakin, K. a, Hansen, H.H., Kaindl, A., Sifringer, M., Fowler, J., Stefovska, V., et al. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts

intrinsic antioxidant defenses. Nat. Neurosci. *11*, 476–487.

Patten, D.A., Germain, M., Kelly, M.A., and Slack, R.S. (2010). Reactive oxygen species: Stuck in the middle of neurodegeneration. J. Alzheimer's Dis. *20*.

Pease, S.E., and Segal, R.A. (2014). Preserve and protect: Maintaining axons within functional circuits. Trends Neurosci. *37*, 572–582.

Penney, J.B., and Young, a B. (1983). Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. Annu. Rev. Neurosci. *6*, 73–94.

Penning, T.D., Zhu, G., Gandhi, V.B., Gong, J., Liu, X., Shi, Y., Klinghofer, V., Johnson, E.F., Donawho, C.K., Frost, D.J., et al. (2009). Discovery of the Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor 2- [(R) -2-methylpyrrolidin-2-yl] -1 H -benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the Treatment. 514–523.

Perry, T.L., Hansen, S., Berry, K., Mok, C., and Lesk, D. (1971). FREE AMINO ACIDS AND RELATED COMPOUNDS IN BIOPSIES OF HUMAN BRAIN. J. Neurochem. *18*, 521–528.

Pinard, E. (1998). Physiopathologie de l. Arch. P *39*, 64–1027.

Pottorf, W.J., Johanns, T.M., Derrington, S.M., Strehler, E.E., Enyedi, A., and Thayer, S.A. (2008). Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca2+ pump activity in rat hippocampal neurons. October *141*, 520–529.

Power, J.H.T., and Blumbergs, P.C. (2009). Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Acta Neuropathol. *117*, 63–73.

Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L., and Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. Nat. Neurosci. *9*, 408–419.

Puyal, J., and Clarke, P.G.H. (2009). Targeting autophagy to prevent neonatal stroke damage. Autophagy *5*, 1060–1061.

Puyal, J., Ginet, V., Grishchuk, Y., Truttmann, A.C., and Clarke, P.G.H. (2012). Neuronal autophagy as a mediator of life and death: contrasting roles in chronic neurodegenerative and acute neural disorders. Neuroscientist *18*, 224–236.

Puyal, J., Ginet, V., and Clarke, P.G.H. (2013). Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: A challenge for neuroprotection. Prog. Neurobiol. *105*, 24–28.

R

Rabuffetti, M., Sciorati, C., Tarozzo, G., Clementi, E., Manfredi, A.A., and Beltramo, M. (2000). Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. J Neurosci *20*, 4398–4404.

Raff, M.C., Whitmore, A. V, and Finn, J.T. (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. Science *296*, 868–871.

Rami, A., Sims, J., Botez, G., and Winckler, J. (2003). Spatial resolution of phospholipid scramblase 1 (PLSCR1), caspase-3 activation and DNA-fragmentation in the human hippocampus after cerebral ischemia. Neurochem. Int. *43*, 79–87.

Ramsey, K.M., Yoshino, J., Brace, C.S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H.-K., Chong, J.L., Buhr, E.D., Lee, C., et al. (2009). Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD+ biosynthesis. Science *324*, 651–654.

Rangel-Barajas, C., Coronel, I., and Florán, B. (2015). Dopamine Receptors and Neurodegeneration. Aging Dis. *6*, 349–368.

Revollo, J.R., Grimm, A. a, and Imai, S. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. J. Biol. Chem. *279*, 50754–50763.

Revollo, J.R., K??rner, A., Mills, K.F., Satoh, A., Wang, T., Garten, A., Dasgupta, B., Sasaki, Y., Wolberger, C., Townsend, R.R., et al. (2007). Nampt/PBEF/Visfatin Regulates Insulin Secretion in ?? Cells as a Systemic NAD Biosynthetic Enzyme. Cell Metab. *6*, 363–375.

De Rijk, M.C., Tzourio, C., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J.M., Alpérovitch, A., and Rocca, W.A. (1997). Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *62*, 10–15.

Rogalski, E., Stebbins, G.T., Barnes, C.A., Murphy, C.M., Stoub, T.R., George, S., Ferrari, C., Shah, R.C., and deToledo-Morrell, L. (2012). Age-related changes in parahippocampal white matter integrity: A diffusion tensor imaging study. Neuropsychologia *50*, 1759–1765.

Rose, E.M., Koo, J.C.P., Antflick, J.E., Ahmed, S.M., Angers, S., and Hampson, D.R. (2009). Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. J. Neurosci. *29*, 8143–8155.

Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. a, Sapp, P., Hentati, a, Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., and Deng, H.X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature *362*, 59–62.

Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, a, Stauch, B.L., and Coyle, J.T. (1990). Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *28*, 18–25.

Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, a I., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *38*, 73–84.

S

Sagot, Y., Dubois-Dauphin, M., Tan, S. a, de Bilbao, F., Aebischer, P., Martinou, J.C., and Kato, a C. (1995). Bcl-2 overexpression prevents motoneuron cell body loss but not axonal degeneration in a mouse model of a neurodegenerative disease. J Neurosci *15*, 7727–7733.

Sairanen, T., Szepesi, R., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Saksi, J., Paetau, A., and Lindsberg, P.J. (2009). Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke. Acta Neuropathol. *118*, 541–552.

Sajadi, A., Schneider, B.L., and Aebischer, P. (2004). Wlds -Mediated Protection of Dopaminergic Fibers in an Animal Model of Parkinson Disease. Curr. Biol. *14*, 326–330.

Santos, S.D., Carvalho, A.L., Caldeira, M. V., and Duarte, C.B. (2009). Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity. Neuroscience *158*, 105–125.

Sasaki, Y., Araki, T., and Milbrandt, J. (2006). Stimulation of nicotinamide adenine dinucleotide

biosynthetic pathways delays axonal degeneration after axotomy. J. Neurosci. *26*, 8484–8491.

Sasaki, Y., Vohra, B.P.S., Lund, F.E., and Milbrandt, J. (2009). Nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase-mediated axonal protection requires enzymatic activity but not increased levels of neuronal nicotinamide adenine dinucleotide. J. Neurosci. *29*, 5525–5535.

Saver, J.L. (2006). Time is brain - Quantified. Stroke *37*, 263–266.

Schallier, A., Smolders, I., Dam, D. Van, Loyens, E., Paul, P., and Deyn, D. (2011). Region- and Age-Specific Changes in Glutamate Transport in the A PP23 Mouse Model for Alzheimer ' s Disease. *24*, 287–300.

Schlaepfer, W.W., and Hasler, M.B. (1979). Characterization of the calcium-induced disruption of neurofilaments in rat peripheral nerve. Brain Res. *168*, 299–309.

Schmeisser, K., Mansfeld, J., Kuhlow, D., Weimer, S., Priebe, S., Heiland, I., Birringer, M., Groth, M., Segref, A., Kanfi, Y., et al. (2013). Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide. Nat. Chem. Biol. *9*, 693–700.

Schoenmann, Z., Assa-Kunik, E., Tiomny, S., Minis, A., Haklai-Topper, L., Arama, E., and Yaron, A. (2010). Axonal degeneration is regulated by the apoptotic machinery or a NAD+-sensitive pathway in insects and mammals. J. Neurosci. *30*, 6375–6386.

Schweiger, M., Hennig, K., Lerner, F., Niere, M., Hirsch-Kauffmann, M., Specht, T., Weise, C., Oei, S.L., and Ziegler, M. (2001). Characterization of recombinant human nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase (NMNAT), a nuclear enzyme essential for NAD synthesis. FEBS Lett. *492*, 95–100.

Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science *298*, 789–791.

Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol. Med. *8*, 1–14.

Semenova, M.M., Mäki-Hokkonen, A.M.J., Cao, J., Komarovski, V., Forsberg, K.M., Koistinaho, M., Coffey, E.T., and Courtney, M.J. (2007). Rho mediates calcium-dependent activation of p38alpha and subsequent excitotoxic cell death. Nat. Neurosci. *10*, 436–443.

Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. Nat. Rev. Neurosci. *6*, 683–690.

Shin, J.E., Geisler, S., and DiAntonio, A. (2014). Dynamic regulation of SCG10 in regenerating axons after injury. Exp. Neurol. *252*, 1–11.

Sima, A.A., Bouchier, M., and Christensen, H. (1983). Axonal atrophy in sensory nerves of the diabetic BB-Wistar rat: a possible early correlate of human diabetic neuropathy. Ann. Neurol. *13*, 264–272.

Simon, D.J., Pitts, J., Hertz, N.T., Te, M., Molina, H., and Tessier-lavigne, M. (2016). Axon Degeneration Gated by Retrograde Activation Axon Degeneration Gated by Retrograde Activation of Somatic Pro-apoptotic Signaling. 1–15.

Singleton, Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science *302*, 841.

Singleton, A., Myers, A., and Hardy, J. (2004). The law of mass action applied to neurodegenerative disease: a hypothesis concerning the etiology and pathogenesis of complex diseases. Hum. Mol.

Genet. *13 Spec No*, R123-6.

Slow, E.J., Graham, R.K., Osmand, A.P., Devon, R.S., Lu, G., Deng, Y., Pearson, J., Vaid, K., Bissada, N., Wetzel, R., et al. (2005). Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 11402–11407.

Someya, S., Yu, W., Hallows, W.C., Xu, J., Vann, J.M., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J.M., and Prolla, T.A. (2010). Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. Cell *143*, 802–812.

Sönmez, A., Sayin, O., Gurgen, S. gulsen, and Calisir, M. (2015). Neuroprotective effects of MK-801 against traumatic brain injury in immature rats. Neurosci. Lett. *420*, 133–137.

Sorci, L., Cimadamore, F., Scotti, S., Petrelli, R., Cappellacci, L., Franchetti, P., Orsomando, G., and Magni, G. (2007). Initial-rate kinetics of human NMN-adenylyltransferases: Substrate and metal ion specificity, inhibition by products and multisubstrate analogues, and isozyme contributions to NAD+ biosynthesis. Biochemistry *46*, 4912–4922.

Soriano, F.X. (2006). Preconditioning Doses of NMDA Promote Neuroprotection by Enhancing Neuronal Excitability. J. Neurosci. *26*, 4509–4518.

Soriano, F.X., Martel, M., Papadia, S., Vaslin, A., Rickman, C., Forder, J., Tymianski, M., Duncan, R., Clarke, P., Wyllie, D.J.A., et al. (2009). Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NR2B PDZ ligand. October *28*, 10696–10710.

Spies, T., Bean, W., and Ashe, W. (1939). RECENT ADVANCES IN THE TREATMENT OF PELLAGRA AND ASSOCIATED DEFICIENCIES. Ann. Intern. Med. *12*, 1830.

Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P.F., Le Forestier, N., Marouan, A., Dib, M., and Meininger, V. (2002). Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: A reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. J. Neurol. Sci. *193*, 73–78.

St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., J??ger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., et al. (2006). Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. Cell *127*, 397–408.

Di Stefano, M., Nascimento-Ferreira, I., Orsomando, G., Mori, V., Gilley, J., Brown, R., Janeckova, L., Vargas, M.E., Worrell, L.A., Loreto, A., et al. (2014). A rise in NAD precursor nicotinamide mononucleotide (NMN) after injury promotes axon degeneration. Cell Death Differ. *22*, 731–742.

Stein, L.R., and Imai, S. (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. Trends Endocrinol. Metab. *23*, 420–428.

Stoub, T.R., Barnes, C.A., Shah, R.C., Stebbins, G.T., Ferrari, C., and deToledo-Morrell, L. (2012). Age-related changes in the mesial temporal lobe: The parahippocampal white matter region. Neurobiol. Aging *33*, 1168–1176.

Stout, a K., Raphael, H.M., Kanterewicz, B.I., Klann, E., and Reynolds, I.J. (1998). Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. Nat. Neurosci. *1*, 366–373.

De Strooper, B., and Annaert, W. (2010). Novel Research Horizons for Presenilins and γ-Secretases in Cell Biology and Disease. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *26*, 235–260.

De Strooper, B., Craessaerts, K., Annaert, W., and Leuven, F. Van (1998). deficiency of presenilin 1

inhibits the normal cleavage of APP. *391*, 387–390.

Su, J.M., Thompson, P., Adesina, A., Li, X.N., Kilburn, L., Onar-Thomas, A., Kocak, M., Chyla, B., McKeegan, E., Warren, K.E., et al. (2014). A phase I trial of veliparib (ABT-888) and temozolomide in children with recurrent CNS tumors: A pediatric brain tumor consortium report. Neuro. Oncol. *16*, 1661–1668.

Sunio, a, and Bittner, G.D. (1997). Cyclosporin A retards the wallerian degeneration of peripheral mammalian axons. Exp. Neurol. *146*, 46–56.

Suzuki, K., and Koike, T. (2007). Mammalian Sir2-related protein (SIRT) 2-mediated modulation of resistance to axonal degeneration in slow Wallerian degeneration mice: a crucial role of tubulin deacetylation. Neuroscience *147*, 599–612.

T

Tempel, W., Rabeh, W.M., Bogan, K.L., Belenky, P., Wojcik, M., Seidle, H.F., Nedyalkova, L., Yang, T., Sauve, A. a, Park, H.-W., et al. (2007). Nicotinamide riboside kinase structures reveal new pathways to NAD+. PLoS Biol. *5*, e263.

Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology *58*, 1791–1800.

Toescu, E.C., and Verkhratsky, A. (2007). The importance of being subtle: Small changes in calcium homeostasis control cognitive decline in normal aging. Aging Cell *6*, 267–273.

Trammell, S.A., Yu, L., Redpath, P., Migaud, M.E., and Brenner, C. (2016). Nicotinamide Riboside Is a Major NAD+ Precursor Vitamin in Cow Milk. J. Nutr. *146*, 957–963.

Tsai, J., Grutzendler, J., Duff, K., and Gan, W.-B. (2004). Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. Nat. Neurosci. *7*, 1181–1183.

Tseng, B.P., Green, K.N., Chan, J.L., Blurton-Jones, M., and LaFerla, F.M. (2008). A?? inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. Neurobiol. Aging *29*, 1607–1618.

Turski, L., and Turski, W.A. (1993). Towards an understanding of the role of glutamate in neurodegenerative disorders: energy metabolism and neuropathology. Experientia *49*, 1064–1072.

U

Ueno, M., Onodera, M., Naya, T., Toyama, Y., Hosomi, N., Huang, C.L., Nishiyama, Y., Kusaka, T., Miki, Y., Kohno, M., et al. (2010). Axonal damage in acute cerebral infarction showing ADC reduction. J. Neurol. *257*, 1559–1561.

Ulanovskaya, O.A., Zuhl, A.M., and Cravatt, B.F. (2013). NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink. Nat. Chem. Biol. *9*, 300–306.

V

Valdez, G., Tapia, J.C., Kang, H., Clemenson, G.D., Gage, F.H., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2010). Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 14863–14868.

Verghese, P.B., Sasaki, Y., Yang, D., Stewart, F., Sabar, F., and Beth, M. (2011). protects against acute neurodegeneration in developing CNS by inhibiting excitotoxic-necrotic cell death.

Vesce, S., Kirk, L., and Nicholls, D.G. (2004). Relationships between superoxide levels and delayed

calcium deregulation in cultured cerebellar granule cells exposed continuously to glutamate. J. Neurochem. *90*, 683–693.

Vijayvergiya, C. (2005). Mutant Superoxide Dismutase 1 Forms Aggregates in the Brain Mitochondrial Matrix of Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. J. Neurosci. *25*, 2463–2470.

Viola, K.L., and Klein, W.L. (2015). Amyloid ?? oligomers in Alzheimer???s disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. Acta Neuropathol. *129*, 183–206.

Vlad, S.C., Miller, D.R., Kowall, N.W., and Felson, D.T. (2009). Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. October *70*, 1672–1677.

Vlahos, C.J., McDowell, S.A., and Clerk, A. (2003). Kinases as therapeutic targets for heart failure. Nat. Rev. Drug Discov. *2*, 99–113.

Vohra, B.P.S., Sasaki, Y., Miller, B.R., Chang, J., DiAntonio, A., and Milbrandt, J. (2010). Amyloid Precursor Protein Cleavage-Dependent and -Independent Axonal Degeneration Programs Share a Common Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase 1-Sensitive Pathway. J. Neurosci. *30*, 13729–13738.

Vollmayer, P., Clair, T., Goding, J.W., Sano, K., Servos, J., and Zimmermann, H. (2003a). Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. Eur. J. Biochem. *270*, 2971–2978.

Vollmayer, P., Clair, T., Goding, J.W., Sano, K., Servos, J., and Zimmermann, H. (2003b). Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. Eur. J. Biochem. *270*, 2971–2978.

Vosler, P.., Brennan, C.., and Chen, J. (2009). Calpain-Mediated Signaling Mechanisms in Neuronal Injury and Neurodegeneration. *38*, 78–100.

de Vries, H.E., Witte, M., Hondius, D., Rozemuller, A.J.M., Drukarch, B., Hoozemans, J., and van Horssen, J. (2008). Nrf2-induced antioxidant protection: A promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? Free Radic. Biol. Med. *45*, 1375–1383.

W

Waller, A. (1850). Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Forg, and observations of the alterations porduced thereby in the Structure of their Primitive Fibres.

Walsh, J.C., and McLeod, J.G. (1970). Alcoholic neuropathy. Proc. Aust. Assoc. Neurol. *7*, 77–83.

Wang, L. (2007). Degeneration of Neuronal Cell Bodies Following Axonal Injury in WldS Mice. J. Neurosci. Res. *85*, 2352–2359.

Wang, Xiong, S., Xie, C., Markesbery, W.R., and Lovell, M.A. (2005a). Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. J. Neurochem. *93*, 953–962.

Wang, Zhai, Q., Chen, Y., Lin, E., Gu, W., McBurney, M.W., and He, Z. (2005b). A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration. J. Cell Biol. *170*, 349–355.

Wang, J.T., Medress, Z. a, and Barres, B. a (2012a). Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. J. Cell Biol. *196*, 7–18.

Wang, M.S., Davis, A.A., Culver, D.G., and Glass, J.D. (2002). Wlds mice are resistant to paclitaxel

(Taxol) neuropathy. Ann. Neurol. *52*, 442–447.

Wang, Q., Song, C., and Li, C.C.H. (2004). Molecular perspectives on p97-VCP: Progress in understanding its structure and diverse biological functions. J. Struct. Biol. *146*, 44–57.

Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., and Zhu, X. (2008a). Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 19318–19323.

Wang, X., Su, B., Lee, H., Li, X., Perry, G., and Smith, M.A. (2010). Impaired Balance of Mitochondria Fission and Fusion in Alzheimer Disease. *29*, 9090–9103.

Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., and Zhu, X. (2014a). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. *1842*, 1240–1247.

Wang, X., Li, H., and Ding, S. (2014b). The effects of NAD on apoptotic Neuronal death and mitochondrial biogenesis and function after Glutamate excitotoxicity.

Wang, Y., Chang, C.-F., Morales, M., Chiang, Y.-H., Harvey, B.K., Su, T.-P., Tsao, L.-I., Chen, S., and Thiemermann, C. (2003). Diadenosine tetraphosphate protects against injuries induced by ischemia and 6-hydroxydopamine in rat brain. J. Neurosci. *23*, 7958–7965.

Wang, Y., Gu, Z.L., Cao, Y., Liang, Z.Q., Han, R., Bennett, M.C., and Qin, Z.H. (2006). Lysosomal enzyme cathepsin B is involved in kainic acid-induced excitotoxicity in rat striatum. Brain Res. *1071*, 245–249.

Wang, Y., Han, R., Liang, Z.-Q., Wu, J.-C., Zhang, X.-D., Gu, Z.-L., and Qin, Z.-H. (2008b). An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. Autophagy *4*, 214–226.

Wang, Y., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: A key event in parthanatos. Exp. Neurol. *218*, 193–202.

Wang, Y., Kim, N.S., Haince, J., Kang, H., Karen, K., Andrabi, S. a, Poirier, G.G., Dawson, V.L., and Ted, M. (2012b). Poly (ADP-ribose) (PAR) Binding to Apoptosis-Inducing Factor Is Critical For PAR Polymerase-1-Dependent Cell Death (Parthanatos). Cell *4*.

Ward, J.L., Sherali, A., Mo, Z., and Tse, C. (2000). Kinetic and Pharmacological Properties of Cloned Human Equilibrative Nucleoside Transporters , ENT1 and ENT2 , Stably Expressed in Nucleoside Transporter-deficient PK15 Cells. *275*, 8375–8381.

Whitmore, A. V, Lindsten, T., Raff, M.C., and Thompson, C.B. (2003). The proapoptotic proteins Bax and Bak are not involved in Wallerian degeneration. Cell Death Differ. *10*, 260–261.

Williams, A.C., Cartwright, L.S., and Ramsden, D.B. (2005). Parkinson's disease: The first common neurological disease due to auto-intoxication? QJM - Mon. J. Assoc. Physicians *98*, 215–226.

Woerner, A.C., Frottin, F., Hornburg, D., Feng, L.R., Meissner, F., Patra, M., Tatzelt, J., Mann, M., Winklhofer, K.F., Hartl, F.U., et al. (2016). Cytoplasmic protein aggregates interfere with nucleocytoplasmic transport of protein and RNA. Science (80-.). *351*, 173–176.

Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. Nature *398*, 513–517.

Wright, A., and Vissel, B. (2012). The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. Front. Mol. Neurosci. *5*, 34.

X

Xiong, H., Wang, D., Chen, L., Choo, Y.S., Ma, H., Tang, C., Xia, K., Jiang, W., Ronai, Z., Zhuang, X., et al. (2009). Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *119*.

Xu, J., Kurup, P., Zhang, Y., Goebel-goody, S.M., Wu, P.H., Hawasli, A.H., Baum, M.L., Bibb, J. a, and Lombroso, P.J. (2010). Extrasynaptic NMDA Receptors Couple Preferentially to Excitotoxicity via Calpain-mediated Cleavage of STEP. *29*, 9330–9343.

Xu, W., Wong, T.P., Chery, N., Gaertner, T., Wang, Y.T., and Baudry, M. (2007a). Calpain-Mediated mGluR1?? Truncation: A Key Step in Excitotoxicity. Neuron *53*, 399–412.

Xu, X., Chua, C.C., Kong, J., Kostrzewa, R.M., Kumaraguru, U., Hamdy, R.C., and Chua, B.H.L. (2007b). Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. J. Neurochem. *103*, 2004–2014.

Y

Yaguchi, H., Togawa, K., Moritani, M., and Itakura, M. (2005). Identification of candidate genes in the type 2 diabetes modifier locus using expression QTL. Genomics *85*, 591–599.

Yahata, N., Yuasa, S., and Araki, T. (2009). Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase expression in mitochondrial matrix delays Wallerian degeneration. J. Neurosci. *29*, 6276–6284.

Yamada, K., Hara, N., Shibata, T., Osago, H., and Tsuchiya, M. (2006). The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal. Biochem. *352*, 282–285.

Yamaguchi, A., Tamatani, M., Matsuzaki, H., Namikawa, K., Kiyama, H., Vitek, M.P., Mitsuda, N., and Tohyama, M. (2001). Akt Activation Protects Hippocampal Neurons from Apoptosis by Inhibiting Transcriptional Activity of p53. J. Biol. Chem. *276*, 5256–5264.

Yang, J., Wu, Z., Renier, N., Simon, D.J., Uryu, K., Park, D.S., Greer, P. a, Tournier, C., Davis, R.J., and Tessier-Lavigne, M. (2015). Pathological axonal death through a MAPK cascade that triggers a local energy deficit. Cell *160*, 161–176.

Yang, T., Chan, N.Y.-K., and Sauve, A.A. (2007). Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives: effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mammalian cells. J. Med. Chem. *50*, 6458–6461.

Ying, W. (2007). Intranasal administration with NAD+ profoundly decreases brain injury in a rat model of transient focal ischemia Weihai. Image (Rochester, N.Y.) 2728–2734.

Yoon, M.J., Yoshida, M., Johnson, S., Takikawa, A., Usui, I., Tobe, K., Nakagawa, T., Yoshino, J., and Imai, S. (2015). SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD+ and Function in Mice. Cell Metab. 1–12.

Yoshino, J., Mills, K.F., Yoon, M.J., and Imai, S.I. (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD + intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. Cell Metab. *14*, 528–536.

Young, J.D. (2016). The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: a 30-year

collaborative odyssey. Biochem. Soc. Trans. *44*, 869–876.

Young, J.D., Yao, S.Y.M., Baldwin, J.M., Cass, C.E., and Baldwin, S.A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. Mol. Aspects Med. *34*, 529–547.

Z

Zhai, R.G., Zhang, F., Hiesinger, P.R., Cao, Y., Haueter, C.M., and Bellen, H.J. (2008). NAD synthase NMNAT acts as a chaperone to protect against neurodegeneration. Nature *452*, 887–891.

Zhang, S.J., Steijaert, M.N., Lau, D., Sch??tz, G., Delucinge-Vivier, C., Descombes, P., and Bading, H. (2007). Decoding NMDA Receptor Signaling: Identification of Genomic Programs Specifying Neuronal Survival and Death. Neuron *53*, 549–562.

Zhang, W., Xie, Y., Wang, T., Bi, J., Li, H., Zhang, L.Q., Ye, S.Q., and Ding, S. (2010). Neuronal protective role of PBEF in a mouse model of cerebral ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab. *30*, 1962–1971.

Zhou, B., Yu, P., Lin, M.-Y., Sun, T., Chen, Y., and Sheng, Z.-H. (2016). Facilitation of axon regeneration by enhancing mitochondrial transport and rescuing energy deficits. J. Cell Biol. *214*, jcb.201605101.

Zhu, C., Wang, X., Xu, F., Bahr, B.A., Shibata, M., Uchiyama, Y., Hagberg, H., and Blomgren, K. (2005). The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. Cell Death Differ. *12*, 162–176.

Zhu, Y., Zhang, L., Sasaki, Y., Milbrandt, J., and Gidday, J.M. (2013). Protection of mouse retinal ganglion cell axons and soma from glaucomatous and ischemic injury by cytoplasmic overexpression of Nmnat1. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. *54*, 25–36.

Zimmerman, M.C., Oberley, L.W., and Flanagan, S.W. (2007). Mutant SOD1-induced neuronal toxicity is mediated by increased mitochondrial superoxide levels. J. Neurochem. *102*, 609–618.

Zimmermann, H. (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system.

Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. *362*, 299–309.

Zimmermann, H., Zebisch, M., and Sträter, N. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Purinergic Signal. *8*, 437–502.

Zocchi, E., Usai, C., Guida, L., Franco, L., Bruzzone, S., Passalacqua, M., and De Flora, A. (1999). Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca2+ mobilization: role of NAD+ transport across cell membranes. FASEB J. *13*, 273–283.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. Physiol. Rev. *94*, 909–950.

Zou, Ping Song, M.-H. (2012). Regulation of NAD(P)H oxidases by AMPK in cardiovascular systems.