



HAL
open science

Impact du VEGF sur les altérations synaptiques dans la maladie d'Alzheimer

Laurent Martin

► **To cite this version:**

Laurent Martin. Impact du VEGF sur les altérations synaptiques dans la maladie d'Alzheimer. Neurosciences. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1265 . tel-02127969

HAL Id: tel-02127969

<https://theses.hal.science/tel-02127969>

Submitted on 13 May 2019

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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1265

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 476
Neurosciences et Cognition (NSCo)

Spécialité de doctorat : Neurosciences
Discipline : Neurobiologie cellulaire

Soutenue publiquement le 6 décembre 2018, par :
Laurent MARTIN

Impact du VEGF sur les altérations synaptiques dans la maladie d'Alzheimer

Devant le jury composé de :

Présidente du jury : Pr. Anne Didier.

Pagès, Gilles, DR INSERM Université Nice Sophia Antipolis

Rapporteur

Baranger, Kévin, CR CNRS Université Aix Marseille

Rapporteur

Didier, Anne, PU Université Claude Bernard Lyon 1

Examineur

Buisson, Alain, PU Université Grenoble Joseph Fournier

Examineur

Verret, Laure, MCF Université Paul Sabatier Toulouse III

Examineur

Meissirel, Claire, CR INSERM Université Claude Bernard Lyon 1

Directrice de thèse

*If you can keep your head when all about you
Are losing theirs and blaming it on you,
If you can trust yourself when all men doubt you,
But make allowance for their doubting too;
If you can wait and not be tired by waiting,
Or being lied about, don't deal in lies,
Or being hated, don't give way to hating,
And yet don't look too good, nor talk too wise:*

*If you can dream—and not make dreams your master;
If you can think—and not make thoughts your aim;
If you can meet with Triumph and Disaster
And treat those two impostors just the same;
If you can bear to hear the truth you've spoken
Twisted by knaves to make a trap for fools,
Or watch the things you gave your life to, broken,
And stoop and build 'em up with worn-out tools:*

*If you can make one heap of all your winnings
And risk it on one turn of pitch-and-toss,
And lose, and start again at your beginnings
And never breathe a word about your loss;
If you can force your heart and nerve and sinew
To serve your turn long after they are gone,
And so hold on when there is nothing in you
Except the Will which says to them: 'Hold on!'*

*If you can talk with crowds and keep your virtue,
Or walk with Kings—nor lose the common touch,
If neither foes nor loving friends can hurt you,
If all men count with you, but none too much;
If you can fill the unforgiving minute
With sixty seconds' worth of distance run,
Yours is the Earth and everything that's in it,
And—which is more—you'll be a Man, my son!*

Rudyard Kipling

A vos intuitions vous fier, il faut.

Yoda

Table des matières

Remerciements	8
Abréviations	10
- Résumé -	11
Impact du VEGF sur les altérations synaptiques dans la maladie d'Alzheimer	11
Mots clés	11
- Abstract -	12
VEGF impact on synaptic alterations in Alzheimer's disease	12
Keywords	12
Laboratoire d'encadrement	13
INTRODUCTION	14
I- La famille du VEGF et ses récepteurs	14
a- Généralités, développement angiogénèse et guidage.....	14
b- Les différentes isoformes du VEGF	17
c- Les différents domaines, impacts sur la physiologie	19
1- Séquence signal	20
2- Site de dimérisation	20
3- HBD - Heparin binding domain.....	22
d- Modulation de la production du VEGF.....	24
e- Récepteurs et corécepteurs du VEGF.....	24
1- Généralités sur les récepteurs au VEGF	25
2- Activation des récepteurs	26
3- Régulation de l'activation de VEGFR2	28
4- Effets du blocage des récepteurs au VEGF.....	28
5- Les corécepteurs	29
f- Les voies de signalisation du VEGF.....	30
1- La voie de signalisation PLC γ – ERK1/2	30
2- La voie de signalisation PI3K-Akt.....	31
3- La voie des Src kinases	31
II- Rôle du VEGF dans le système nerveux	33
a- Expression neuronale des différents acteurs de la voie.....	33
b- Développement des systèmes nerveux et vasculaire	34
1- Similitudes anatomiques.....	34
2- Signaux et mécanismes communs de guidage.....	35

c- Effet direct du VEGF sur les neurones	36
1- Rôle dans la survie et la différenciation neuronale.....	36
2- Rôle dans la croissance neuritique, le guidage des neurones et des axones.....	37
3- Rôle dans la néo-neurogenèse	37
d- Rôle de la voie VEGF dans le système nerveux	38
1- Modulation activité canaux.....	39
2- Modulation de la transmission et de la plasticité synaptique	40
3- Impact de l'activité sur la sécrétion du VEGF	41
4- Formation et maintenance / élimination des synapses.....	41
5- Régulation des processus mnésiques par le VEGF	42
6- Le VEGF dans la maladie d'Alzheimer	43
III- La synapse glutamatergique	44
a- Les récepteurs au glutamate et la transmission synaptique.....	44
1- Généralités	44
2- Les récepteurs ionotropiques AMPA, NMDA, Kainate.....	45
3- Les récepteurs métabotropiques	51
b- Les épines dendritiques	52
1- Organisation des épines dendritiques.....	52
2- Formation et développement des épines dendritiques.....	54
3- Morphologie et classification des épines dendritiques	55
4- Intérêts et défauts de classification des épines dendritiques.....	58
IV- Plasticité synaptique, bases cellulaires et moléculaires de la mémoire	60
a- La potentialisation à long terme : LTP	60
1- Généralités	60
2- Mécanismes d'induction	61
3- Expression	62
b- La dépression à long terme : LTD	65
1- Généralités	65
2- Induction	66
3- Expression	66
c- Voies de signalisation mises en jeu	66
1- Principaux acteurs et concepts de bases	66
2- CAMKII.....	68
3- Fyn	71

4- Calcineurine.....	73
5- Caspase 3.....	76
6- Bilan sur les voies	78
d- Dynamique des épines dendritiques et implication dans la plasticité synaptique.....	78
1- Modulation du cytosquelette d'actine.....	78
2- Corrélacion entre la transmission et la morphologie des épines.....	79
V- La maladie d'Alzheimer, concepts de base.....	81
a- Généralités	81
b- Données épidémiologiques.....	82
1- Les formes sporadiques.....	82
2- Les formes familiales	84
c- Les différentes phases de la maladie.....	84
d- Diagnostic de la pathologie.....	86
1- Clinique.....	86
2- Anatomopathologie	88
e- De l'APP aux A β	94
1- Clivages de l'APP : α -, β -, η - et γ -sécrétases.....	94
2- Trafficking de l'APP.....	97
3- Les différents types d'oligomères	98
4- Mutations responsables des formes familiales de la pathologie.....	100
f- Les différentes hypothèses	101
1- Peptides amyloïdes et protéines Tau : l'œuf ou la poule ? Hypothèse de la cascade amyloïde.	101
2- Hypothèse cholinergique	102
3- Pathologie multifactorielle.....	103
h- Thérapeutique.....	104
1- Traitements symptomatiques	104
2- Disease modifiers	105
VI- Altérations induites par les oligomères solubles β -amyloïdes	106
a- Les altérations de la transmission	106
1- Bilan sur les voies, altération de la LTP	106
2- Altération de la transmission basale, effets des A β sur les récepteurs glutamatergiques...	107
b- Les altérations morphologiques.....	110
1- Altérations de la morphologie des épines dendritiques	110

2- Altérations de l'arbre dendritiques	111
c- Processus inflammatoires.....	112
d- Cibles des A β o	113
e- Propagation des oligomères, un processus « prion-like » responsable de l'évolution de la pathologie.....	113
f- Mise en évidence des déficits cognitifs dans les modèles transgéniques de la maladie.....	114
1- Processus hippocampo-dépendants : altération de la mémoire spatiale.....	114
2- Aires supérieures : mémoire associative, fonction exécutives et flexibilité	115
g- Effets sélectifs des oligomères	116
1- Dimères	116
2- Trimères	117
3- A β star	117
VII- Projet de recherche	119
a- Le VEGF dans la pathologie d'Alzheimer	119
1- Un potentiel binding	119
2- Modulation de la transmission synaptique – LTP, récepteurs glutamatergiques.....	120
b- Hypothèses de travail.....	121
c- Objectifs et méthodes	122
RESULTATS.....	124
Introduction.....	125
Materials & methods.....	128
Human brain sample	128
Animals	128
A β preparation and oligomerization	128
ELISA assays.....	129
Peptide arrays.....	129
Electrophysiology	129
Cultures and treatments	130
Postsynaptic density enrichment and immunoblotting.....	130
Immunohistochemistry and hippocampal neuron immunostaining.....	131
Hippocampal neuron transfection	132
Image acquisition and analysis.....	132
Statistical analyses.....	133
Table 1	134

Table 2	135
Results	136
Accumulation of VEGF in amyloid plaques.....	136
A β oligomers directly interact with matrix-binding and diffusible VEGF isoforms.....	136
VEGF counteracts A β o-induced impairment in VEGFR2 activation	137
VEGF rescues the synaptic content in glutamate receptors challenged by A β o.....	138
VEGF effect involves a downregulation of the Caspase-3-calcineurin pathway.....	139
VEGF restores GluA1 phosphorylation and cell surface expression impeded by A β o.....	140
VEGF rescues A β o-induced impairment in LTP	141
VEGF prevents the spine morphology alterations and loss triggered by A β o	141
Discussion.....	143
References.....	147
Legends to the figures.....	153
Figure 1.....	157
Figure 2.....	158
Figure 3.....	159
Figure 4.....	160
Figure 5.....	161
Figure 6.....	162
Figure 7.....	163
Supplemental Figure 1.....	164
RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	165
DISCUSSION	168
Interaction entre l'A β et VEGF	168
Perturbation de la voie du VEGF, altération de l'activation de VEGFR2	171
Impact du VEGF sur les altérations de la plasticité synaptique induites par les A β o	172
Remodelage des épines dendritiques par les A β o et le VEGF.....	175
Conclusion et perspectives.....	177
BIBLIOGRAPHIE.....	181
ANNEXES.....	219

Remerciements

Ce travail est l'aboutissement d'un long périple au cours duquel j'ai bénéficié de l'encadrement, du soutien et des encouragements de nombreuses personnes, à qui je tiens à présenter mes sincères remerciements.

Cinq années se sont écoulées depuis j'ai débuté sur ce projet. Je me souviendrais toujours du jour où Pierre m'a dit « Mais je crois que Claire souhaite se lancer dans des recherches sur la maladie d'Alzheimer ». J'ai alors sauté sur l'occasion et me suis lancé dans cette formidable aventure. Je tiens donc à remercier tout particulièrement Claire Meissirel, pour m'avoir accordé sa confiance et donner l'opportunité de travailler sur un sujet qui me tenait réellement à cœur. Je tiens aussi à la remercier pour son encadrement, que ce soit d'un point de vue professionnel mais aussi humain. J'ai eu cette chance de travailler aux côtés de cette personne qui a su m'insuffler le désir de se dépasser, de toujours aller plus loin, mais aussi la rigueur scientifique nécessaire à l'élaboration d'un projet. Je tiens aussi à remercier le professeur Honnorat, qui m'a accueilli dans son équipe, ainsi que Nelly et Véro qui me l'ont faite découvrir. Naura et Chantal, pour leur soutien indéfectible et leur expertise de la culture cellulaire et des immunomarquages. Je remercie aussi tout le reste de l'équipe, pour leur présence, leur soutien, ou encore leur expertise. Margaux, on y est arrivé ! Une petite mention pour Pauline, qui a maintenant la charge de poursuivre cet ambitieux projet ! Si tu as besoin de quoi que ce soit, les mails circulent outre-Atlantique ! En tout cas, je sais que tu es entre de bonnes mains.

Je remercie aussi chaleureusement l'ensemble de mon jury ; les professeurs Buisson et Didier, les docteurs Baranger, Pages et Verret, pour avoir accepté d'évaluer mon travail réalisé lors de ces 4 années. Merci d'avoir accepté de donner de votre temps pour lire ce travail et l'examiner. Les conseils et critiques de mon comité de suivi de thèse ont été aussi très pertinents et m'ont permis de perfectionner ce projet. Je tiens donc à remercier une seconde fois Anne et Alain de m'avoir suivi et conseillé pendant ces quatre années.

Mais l'aboutissement de ce projet ne saurait se résumer aux simples auteurs mentionnés sur les publications et aux équipes de recherche. Voilà pourquoi je tiens aussi à remercier toutes ces autres personnes. Mes parents, Monique et Gérard. Je pense honnêtement qu'une thèse ne peut être réussie sans être épaulé, et vous avez été là pour ça. Cette thèse, c'est un peu la vôtre. Je tiens donc à vous la dédicacer. Je remercie aussi ma sœur, qui a su accepter mon absence sans jamais m'en tenir rigueur. Et mes neveux et nièce, Adrien, Charlie, Clémence, qui m'ont toujours rappelé l'importance de la famille.

Mais qu'auraient été ces 4 années sans ma famille de cœur ? Anna et Trich, vous avez su être là quand il le fallait, pour m'écouter et partager ces moments qui furent si spéciaux. Toute la bande, Nounours, Gaele, Xav, Mc, Oriane, Rom, Sasha et Djowy. Merci de m'avoir rappelé qu'il faut parfois sortir la tête de la thèse et partir faire de longues virées en Rokugan ou sur un deux roues ! Je chérie les moments passés à vos côtés, et je partirai avec ces souvenirs mémorables. Je vous attends aussi pour une virée sur la 66 ! Une petite mention aussi pour un Tsuruchi californien que j'espère bientôt revoir !

And I also wanted to thank Anna, for supporting me during the end of my thesis. This was a particular moment to go through, and you can't imagine how helpful you were with your words, your tea, and also your chocolate! The little lucky Koala will follow me in Tucson.

Cette thèse a aussi été pour moi l'occasion d'enseigner, et de découvrir cette réelle passion. Je remercie Sylvie, pour m'avoir permis de pleinement m'exprimer dans mes enseignements, mais aussi Véro, qui m'a donné l'énorme opportunité d'enseigner des cours magistraux. Merci à vous de m'avoir donné ce sourire chaque fois que je me trouvais en bas d'un amphi ou sur une estrade. J'espère avoir été à la hauteur des étudiants. Je tiens aussi à les remercier pour leur assiduité et leur intérêt. Nos échanges ont toujours été extrêmement enrichissants.

Je remercie aussi ces étudiants qui n'en sont plus : Kassandre, Alice, Jérôme. Je me souviendrai longtemps des brainstormings en bas de l'escalier B, des soirées pizzas à la Pinte Douce, de nos longues discussions entre deux fondeurs (que je remercie aussi au passage pour tous ces bons moments partagés). Merci à Jérôme pour ses innombrables relectures qui furent essentielles ! Je sais qu'on ne perdra pas contact ! Et c'est pareil pour vous Kassandre et Alice. Vous m'avez soutenu dans les moments de doutes et je ne vous remercierai jamais assez pour cela.

Une ligne pour mon petit monstre qui a toujours été là avec moi jour et nuit. On peut bien entendu questionner son libre-arbitre... Merci Mephouille.

Quelques mots pour Aubin, qui vient étrangement fermer une boucle qu'il avait ouverte ! Tu as développé mon intérêt et ma curiosité scientifique pour la biochimie. Je suis impatient de te trouver et de pouvoir travailler à tes côtés dans un proche futur.

Et je tiens aussi particulièrement à remercier Aude, sans qui soyons honnête, je ne serai pas arrivé là aujourd'hui. Tous ces moments partagés qui nous ont conduits où nous sommes. Et je sais qu'il y en aura pleins d'autres encore. Cette thèse t'est aussi dédiée.

Abréviations

AAV :	<i>Adeno Associated Virus.</i>
A β o :	Oligomères solubles de protéines bêta-amyloïde.
ADAS :	<i>Alzheimer's Disease Assessment Scale.</i>
APP :	<i>Amyloid Precursor Protein.</i>
CaN :	Calcineurine.
CaA :	Calcineurine A.
CaB :	Calcineurine B.
CREB :	<i>cAMP Response Element Binding protein.</i>
DNF :	Dégénérescences neurofibrillaires.
EPSPs :	<i>Excitatory PostSynaptic Potentials.</i>
HBD :	<i>Heparin binding domain.</i>
HDMECs :	<i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cells.</i>
HR :	<i>Hazard Ratio.</i>
HSPGs :	<i>Heparan Sulfate ProteoGlycan.</i>
iPSC :	<i>Induced Pluripotent Stem Cell.</i>
LTP :	<i>Long Term Potentiation</i> , ou potentialisation à long terme.
LCR :	Liquide céphalo-rachidien.
MA :	Maladie d'Alzheimer.
MAGUKs :	<i>Membrane-Associated GUanylate Kinases</i>
MCI :	<i>Mild Cognitive Impairment.</i>
MMSE :	<i>Mini-Mental State Examination.</i>
MoCA :	<i>Montreal Cognitive Assessment.</i>
NFAT :	<i>Nuclear Factor Activated T cells.</i>
NMDA :	N-méthyl-D-Aspartate.
PHF :	<i>Paired Helical Filaments.</i>
PKC :	Protéine Kinase C.
PS1 et PS2 :	Préséniline 1 et 2.
RCAN1 :	<i>Regulator of Calcineurin 1.</i>
RIP :	<i>Regulated Intramembrane Proteolysis.</i>
SP/TP :	Motifs SP ou TP : résidus sérine et thréonine suivis par une proline.
TTX :	Tétradotoxine.
VEGF :	<i>Vascular endothelial growth factor.</i>

- Résumé -

Impact du VEGF sur les altérations synaptiques dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par un déclin progressif des capacités cognitives. Le peptide β -amyloïde ($A\beta$) sous sa forme d'oligomère soluble ($A\beta_o$) perturbe la transmission nerveuse par une altération des récepteurs au glutamate et une perte de synapses.

Nos résultats récents démontrent que le VEGF facilite la plasticité synaptique et la mémoire par son action sur le récepteur VEGFR2 des neurones. Nous avons montré qu'il stimule l'insertion synaptique des récepteurs au glutamate et la formation de synapses. Ces processus étant altérés dans la MA, le VEGF pourrait donc limiter les altérations synaptiques caractéristiques de la pathologie.

Notre objectif est d'étudier le rôle du VEGF et les mécanismes qu'il met en jeu dans des modèles de la MA.

Tout d'abord, nous avons examiné l'état de la voie du VEGF chez des patients et dans un modèle murin de la MA. Nos résultats montrent une colocalisation entre le VEGF et les plaques séniles suggérant une interaction entre $A\beta$ et VEGF. Pour caractériser cette interaction, nous avons analysé la liaison entre les $A\beta_o$ et le VEGF par test ELISA et puces à peptides. Nos résultats révèlent une interaction $A\beta_o$ -VEGF qui induit un blocage de l'activation de VEGFR2. Enfin, nous avons examiné l'effet d'un apport de VEGF sur les altérations synaptiques par des approches électrophysiologiques, biochimiques et immunocytochimiques. Nos résultats démontrent que le VEGF limite la toxicité des $A\beta_o$, qu'il restaure la LTP, l'expression des récepteurs au glutamate, et limite la perte des synapses.

Notre étude a révélé que l'interaction $A\beta$ -VEGF peut altérer la voie du VEGF chez les patients et démontre qu'un apport de VEGF réduit la toxicité des $A\beta_o$ sur les synapses.

Mots clés

Vascular endothelial growth factor (VEGF), maladie d'Alzheimer, oligomères solubles β -amyloïdes, synapse glutamatergique, plasticité synaptique, épines dendritiques.

- Abstract -

VEGF impact on synaptic alterations in Alzheimer's disease

Alzheimer disease (AD) is characterized by a progressive decline in cognitive abilities. Amyloid- β oligomers ($A\beta_o$) trigger synaptic dysfunction through alterations in glutamate receptor function and subsequent dendritic spine loss. These synaptic impairments compromise memory and contribute to cognitive deficits.

Our recent findings revealed that VEGF facilitates synaptic plasticity and memory in mice through its VEGFR2 receptor in neurons. We showed that VEGF promotes glutamate receptor synaptic insertion and stimulates dendritic spine formation. Therefore, VEGF may be a key candidate for alleviating synaptic damage in AD.

Our objective is to study the impact of VEGF on synaptic dysfunction in AD models and unravel the underlying mechanisms.

First, we examined the VEGF expression pattern in postmortem brain tissue from AD patients and APPPS1 model of AD. Our results showed a partial colocalization between VEGF and $A\beta$ plaques, suggesting an interaction between $A\beta$ and VEGF. To further investigate this interaction, we used ELISA assay and peptide arrays and demonstrated that $A\beta_o$ binds several domains of VEGF, impeding VEGFR2 activation. Finally, we examined whether increasing VEGF levels can prevent synaptic damage induced by $A\beta_o$ using electrophysiological, biochemical and 3D modelling approaches. Our results demonstrated that VEGF can restore LTP in $A\beta_o$ -treated hippocampal slices, glutamate receptor content at synapses and increase dendritic spine density.

Altogether, our results indicate that $A\beta$ -VEGF interaction alter VEGF pathway in AD and highlight that VEGF is able to counteract $A\beta_o$ -induced toxicity at synapses.

Keywords

Vascular endothelial growth factor (VEGF), Alzheimer's disease, amyloid- β soluble oligomers, glutamatergic synapse, synaptic plasticity, dendritic spines.

Laboratoire d'encadrement

Thèse réalisée à :

Institut NeuroMyogène, équipe SynatAc

INSERM U1217, CNRS UMR5310

Université Claude-Bernard Lyon 1

Faculté de médecine Rockefeller

8 avenue Rockefeller

69008 Lyon

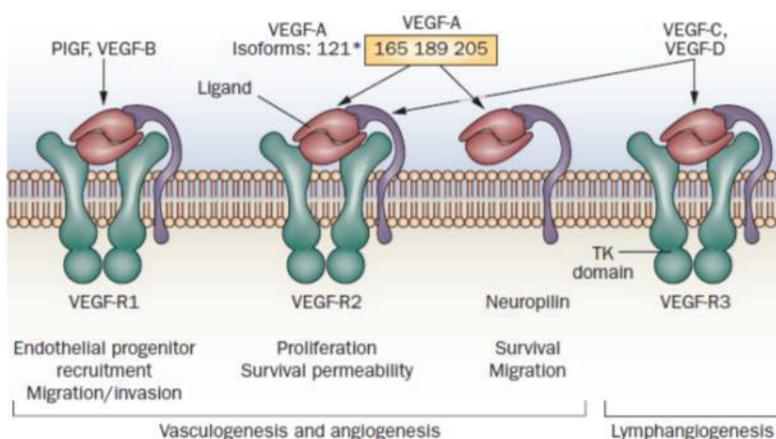
FRANCE

INTRODUCTION

I- La famille du VEGF et ses récepteurs

a- Généralités, développement angiogénèse et guidage

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, ou VEGF, exerce de nombreux rôles dans le système vasculaire. Il est à la fois impliqué dans la vasculogénèse, qui correspond à la formation de novo du réseau vasculaire lors du développement, avec la différenciation et la migration des cellules endothéliales, mais aussi dans l'angiogénèse, qui détermine la formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants. La famille des VEGFs regroupe un ensemble de 7 protéines homologues qui possèdent un motif hautement conservé de 8 résidus cystéines formant un nœud cystéine: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, ainsi que le PlGF1 et 2 (Grothey & Galanis, 2009). Ces facteurs de la famille des VEGFs exercent une fonction précise qui dépend de leurs modifications post-traductionnelles et de leurs interactions avec différents récepteurs (Figure 1). Ils peuvent se lier à trois récepteurs à activité tyrosine kinase, VEGFR1, R2 et R3, et à deux récepteurs de la famille des neuropilines, NRP1 et NRP2. Ainsi, VEGF-A, que je dénommerai dans la suite de cet exposé VEGF, est considéré comme le membre fondateur de cette famille et peut se lier à VEGFR1, VEGFR2, NRP1 et NRP2 (Gluzman-Poltorak et al., 2000). Ces différentes possibilités de liaison aux récepteurs déterminent les effets fonctionnels du VEGF. De plus, l'épissage alternatif de son ARN pré-messager donne lieu à la formation de plusieurs isoformes caractérisées par des propriétés spécifiques et une capacité de liaison propre aux différents récepteurs du VEGF, aux neuropilines et aux



héparanes sulfates (Koch et al., 2011).

Figure 1 : Les récepteurs du VEGF et leurs ligands spécifiques.

D'après Grothey & Galanis, 2009.

Le VEGF module la très grande majorité des fonctions liées à la formation et au développement du réseau vasculaire. Il est requis pour la différenciation des angioblastes, précurseurs des cellules endothéliales qui s'agrègent et forment les premiers vaisseaux au cours de la vasculogénèse. Il intervient ensuite dans le changement de morphologie des cellules endothéliales après leur polarisation apicale-basolatérale, qui détermine l'établissement de la lumière du vaisseau et permet ainsi la circulation du flux sanguin (Bautch, 2012). Ce facteur de croissance induit des effets pléiotropiques sur les cellules endothéliales car il est essentiel à leur prolifération, leur survie et leur migration, et promeut leur assemblage en un réseau vasculaire fonctionnel (Connolly et al., 1989). Chez le rat, il a été montré que l'expression des ARNm du VEGF est corrélée de manière temporelle et spatiale au développement de l'arbre vasculaire embryonnaire (Jakeman et al., 1993).

Afin de mettre en place cet arbre vasculaire, les cellules endothéliales doivent coordonner leur réponse. Lorsqu'elles sont mises en culture, ces cellules prolifèrent et migrent en réponse à une stimulation orientée du VEGF, qui joue alors le rôle d'un facteur de guidage. Lors de la formation d'une nouvelle branche d'un vaisseau, le VEGF est capable de stimuler spécifiquement la prolifération des cellules endothéliales au niveau d'un seul site, sous la forme d'un gradient formé par le VEGF (Figure 2). Chaque branchement est dirigé par une cellule spécialisée, dite « *tip cell* », qui sonde le milieu extracellulaire à l'aide de ses filopodes et permet l'orientation de la nouvelle branche en fonction du gradient de VEGF (Gerhardt, 2008).

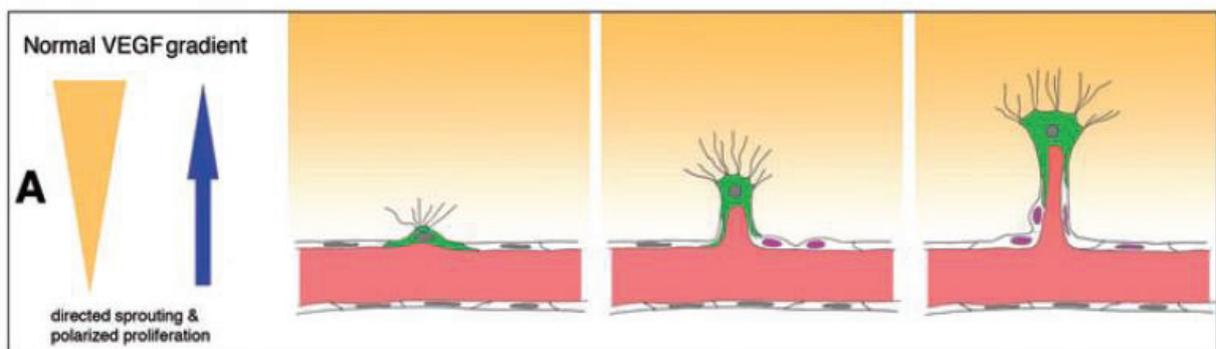


Figure 2 : Illustration du développement d'une nouvelle branche vasculaire, d'après Gerhardt, 2008.

L'implication du VEGF dans la régulation du développement vasculaire est telle que la délétion d'un seul allèle du gène aboutit à la mort de l'embryon au 9^{ème} jour de gestation du fait d'un développement anormal des vaisseaux (Carmeliet et al., 1996 ; Ferrara et al., 1996).

Le VEGF a initialement été identifié comme un facteur de perméabilité vasculaire (VPF) (Senger et al., 1983), avec la capacité de promouvoir la fenestration des vaisseaux (Ferrara et al., 2003). Il possède un effet dose-dépendant sur la perméabilité au dextran d'une monocouche de cellules endothéliales (Lal et al., 2001). L'hyperperméabilité observée lors de certains processus d'inflammation pourrait donc dépendre de la voie VEGF. De plus, le VEGF semble impliqué dans la régulation de l'équilibre entre tolérance immunitaire et processus pro-inflammatoire au moment de l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine (Wheeler et al., 2018). Ainsi, en stimulant une lignée de monocytes humains (THP1) par du milieu conditionné de cellules endométriales enrichi en VEGF, ces auteurs ont observé une augmentation de leur recrutement et un changement de phénotype des macrophages. Le VEGF stimule en effet la transition du phénotype M1 au phénotype M2. Ces dernières observations renforcent l'hypothèse d'un effet du VEGF dans la régulation de la réponse immune inflammatoire.

L'identification du rôle de certains membres de la famille des VEGFs s'est avérée plus complexe. En effet, l'inactivation du gène codant pour le VEGF-B est apparue presque sans effet sur l'angiogenèse développementale, les souris vieillissant sans altération notable (Aase et al., 2001). De plus, sa surexpression dans l'épiderme ou le muscle squelettique de souris n'a pas produit de changement phénotypique majeur (Li et al., 2008). Ces résultats étaient d'autant plus surprenants que les souris déficientes en VEGFR1, dont VEGF-B est le ligand spécifique, meurent au 9^{ème} jour de gestation (Fong et al., 1995). Des études complémentaires ont maintenant démontré que le VEGF-B est spécifiquement requis pour permettre la revascularisation du myocarde ischémié (Li et al., 2008, Li et al., 2009) et exercerait donc une activité angiogénique spécifique de cet organe ou une action indirecte sur la survie des cellules endothéliales et musculaires (Li et al., 2008 ; Lähtenvuo et al., 2009). Une dernière étude attribue un rôle étonnant à ce facteur en démontrant son implication dans la régulation du métabolisme énergétique avec la capture des acides gras par les cellules endothéliales (Hagberg et al., 2010). Enfin, les VEGF-C et D contrôlent principalement la lymphangiogenèse (Jeltsch et al., 1997 ; Stacker et al., 2001).

b- Les différentes isoformes du VEGF

Le VEGF est codé par un ARN pré-messager composé de 8 exons codant pour 232 acides aminés, qui subit un processus d'épissage alternatif et peut être traduit en 4 isoformes principales chez l'homme, variant selon leur nombre d'acides aminés : 121, 165, 189, 206. Ces isoformes sont également présentes chez la souris avec un acide aminé en moins (Holmes et al., 2005). Plus récemment, un nouveau site d'épissage a été découvert au niveau de l'exon 8 de l'ARNm qui produit une autre famille d'isoformes ayant une activité inhibitrice et un rôle anti-angiogénique, comme le VEGF 165b (Bates et al., 2002, Harper & Bates, 2008).

Les isoformes les plus abondantes sont les VEGF 121, 165 et 189 dont la séquence protéique varie dans leur partie C terminale. La portion correspondante de l'ARNm contient les exons 6a , 6b et 7, qui codent pour les domaines de liaison à l'héparine (HBD). L'isoforme la plus courte, VEGF 121, ne possède pas de site HBD, à l'inverse du VEGF 189, l'isoforme la plus longue qui en possède deux. Le VEGF 165, l'isoforme majoritaire, correspond à une forme intermédiaire avec un seul site HBD (Cross et al., 2003). Ces sites HBD ont la capacité de lier non seulement l'héparine mais aussi les héparanes sulfates, qui sont des polysaccharides attachés aux protéines de surface ou de la matrice extracellulaire. La présence ou non d'HBD va donc moduler le caractère diffusible de ces isoformes de telle sorte que les VEGF 121, 165 et 189 ont une capacité de diffusion décroissante et inversement une affinité croissante pour la matrice extracellulaire et les membranes cellulaires (Carmeliet & Tessier-lavigne, 2005).

Le rôle des différentes formes du VEGF a été étudié chez des souris génétiquement modifiées, grâce au système Cre/lox, qui a permis de générer trois types de souris exprimant chacun une seule des isoformes du VEGF (Stalmans et al., 2002). Les souris VEGF 164 se développent normalement avec une vascularisation adéquate de la rétine, alors que les souris VEGF 120 présentent une mortalité importante en raison de problèmes cardio-respiratoires qui provoquent la mort d'environ 50% des embryons *in utero*. On note aussi des troubles sévères de l'arborisation vasculaire rétinienne chez les souris qui survivent avec une diminution drastique du nombre d'artérioles et de veinules dans la rétine et une augmentation du nombre de capillaires. Il s'avère que ce phénotype n'est pas viable car les souris restantes meurent dans les 2 semaines après la naissance à la suite d'insuffisances cardiaques. Quant aux souris VEGF 188, leur développement veineux semble normal, mais on note une altération importante du réseau des artérioles. Ces résultats mettent en évidence le rôle spécifique de chacune des isoformes du VEGF et l'importance des sites HBD pour le

développement vasculaire. Les propriétés de diffusion de ces isoformes et leur affinité différentielle à la matrice va déterminer la formation d'un gradient spatial de VEGF dans le microenvironnement qui permet à la fois l'élongation et le branchement de l'arbre vasculaire (Figure 3 : Carmeliet & Tessier-Lavigne, 2005). Ce gradient associant les isoformes diffusibles et liées à la matrice s'établit entre la cible et les filopodes des « tip cells » pour guider par étape la mise en place du réseau vasculaire. L'absence d'isoforme liée à la matrice ne donne pas suffisamment d'indices directionnels aux cellules endothéliales et conduit à l'élargissement des vaisseaux. Réciproquement, la disparition de l'isoforme diffusible est responsable de la formation de vaisseaux fins et tortueux (Carmeliet, 2003).

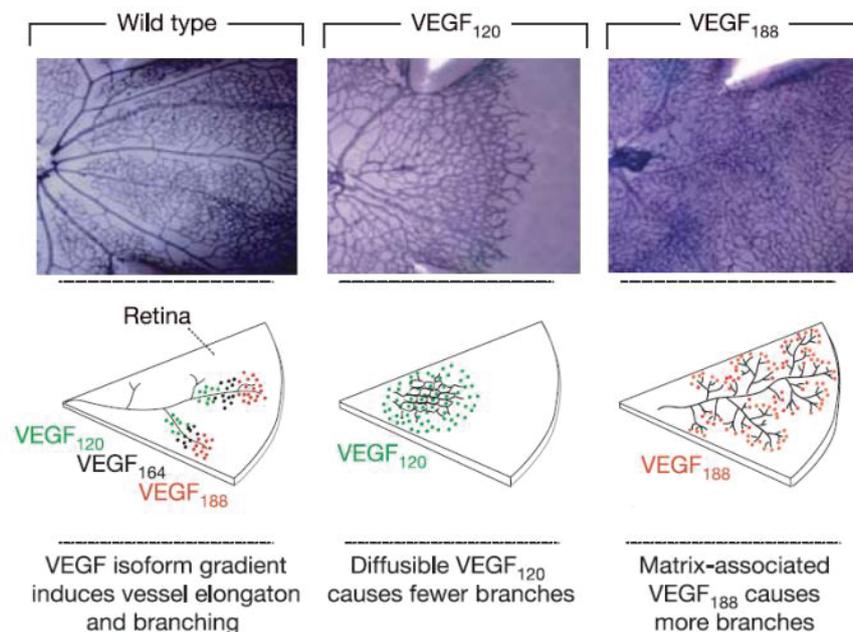


Figure 3 : Le gradient de VEGF est déterminant pour le développement de l'arborisation vasculaire. D'après Carmeliet & Tessier-Lavigne, 2005. Chez les souris sauvages, les plus gros vaisseaux se divisent en branches de plus petit diamètre. Le gradient spatial associant les différentes isoformes du VEGF est nécessaire pour assurer l'élongation et l'arborisation des vaisseaux. Le VEGF 188 se fixe à la matrice et agit sur de courtes distances, alors que le VEGF 120 diffuse sur de longues distances. Le VEGF 164 présente un profil de diffusion spatiale intermédiaire. Chez les souris n'exprimant que le VEGF 120, l'altération du gradient est responsable d'un élargissement des vaisseaux au dépend de leur arborisation. Quant aux souris VEGF 188, la formation d'un gradient abrupt et délimité à de petites zones donne lieu à une arborisation anarchique des vaisseaux avec un branchement plus ramifié.

Parallèlement à ces isoformes pro-angiogéniques, une autre famille d'isoformes anti-angiogéniques nommées VEGF-XXXb, provient de l'épissage alternatif distal de l'ARN pré messager dans l'exon 8, qui donne lieu à l'insertion de 6 acides aminés distincts dans la partie

C terminale de ces protéines (Woolard et al., 2004). Ces isoformes sont dépourvues du domaine de liaison au récepteur NRP1 présent dans les formes angiogéniques, bien qu'elles soient composées du même nombre d'acides-aminés (Cébé Suarez et al., 2006 ; Harper & Bates, 2008). Le VEGF 165b est exprimé de manière physiologique et se lie au récepteur VEGFR2 avec la même affinité que VEGF 165, sans mettre en jeu les même cascades de signalisation en aval du récepteur (Woolard et al., 2004 ; Harper & Bates, 2008). La liaison du VEGF 165b au récepteur VEGFR2 et à son corécepteur NRP1 ne produit pas comme VEGF 165 le changement conformationnel requis pour une autophosphorylation et une activation efficace du récepteur (Harper & Bates, 2008). Il en résulte une activation partielle de VEGFR2 qui en l'absence de liaison à la neuropiline-1 pourrait expliquer l'absence de propriété angiogénique de ces facteurs.

c- Les différents domaines, impacts sur la physiologie

Nous allons maintenant expliciter l'impact fonctionnel des différents domaines présents dans les isoformes du VEGF (Figure 4).



Figure 4 : Principales isoformes du VEGF humain après épissage alternatif. (A) Structure des exons du transcrit primaire (pre-ARNm) et des variants d'épissage (B-D) codant les 3 isoformes principales du VEGF. (B) VEGF 189 contenant les 2 domaines de liaison à l'héparine (HBD) codés par les exons 6a et 7 (C) VEGF 165 avec un seul HBD codé par l'exon 7a. (D) VEGF 121, isoforme diffusible sans HBD.

1- Séquence signal

Le pré-ARNm du VEGF code pour une séquence signale en position N terminale de 26 acides aminés qui permet l'ancrage de la protéine native dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et son adressage à la lumière du RE après clivage (Guzmán-Hernández et al., 2014). La protéine G trimérique Arf1 contrôle le trafic du VEGF du RE à l'appareil de Golgi, où un processus de glycosylation également essentiel à sa sécrétion se met en place (Guzmán-Hernández et al., 2014).

2- Site de dimérisation

L'ensemble de la famille des VEGF regroupe des facteurs qui interagissent avec leurs récepteurs sous forme de dimères (Muller et al., 1997). Les études par cristallographie ont révélé que les monomères de VEGF s'associent de manière antiparallèle via deux ponts disulfures entre les résidus cystéines 51 et 60 codés par l'exon 3 au niveau du site de dimérisation. Chaque monomère forme également un motif de « nœud cystéine » constitué par six résidus cystéine reliés par des ponts disulfures (Muller et al., 2002). (Figure 5).

du VEGF au monomère du récepteur qui permet sa diffusion latérale dans la membrane et sa dimérisation suivi de son autophosphorylation. Cette influence du ligand sur le processus de dimérisation du récepteur VEGFR2 a été examinée par une approche quantitative de FRET *in vitro* (Sarabipour et al., 2016) ou par modélisation computationnelle. *In vitro*, une proportion substantielle de 30 à 60% de récepteurs VEGFR2 exprimés à des concentrations physiologiques est capable de se dimériser en l'absence de VEGF. De plus, ces dimères de récepteurs non couplés au ligand peuvent être phosphorylés mais à un moindre degré que les dimères stimulés par le VEGF (Sarabipour et al., 2016). Le modèle de Mac Gabhann & Popel propose qu'une proportion significative d'hétérodimères, conditionnée par l'abondance de chaque type de récepteur, se forme en l'absence de ligand. Ainsi, si VEGFR1 est présent en plus faible quantité que VEGFR2, cela aboutit à une importante réduction des homodimères VEGFR1 au profit d'hétérodimères VEGFR1/VEGFR2, et inversement. L'expression relative des deux récepteurs variant selon le type cellulaire, la signalisation du VEGF pourrait donc être largement modulée en fonction des différentes proportions de dimères préformés.

3- HBD - Heparin binding domain

Les isoformes du VEGF sont caractérisées par le nombre de leurs domaines HBD, qui va conditionner leur propriété de diffusion. Ces domaines sont responsables d'une modulation du gradient spatial du VEGF, comme nous l'avons vu précédemment. De plus, les différentes isoformes agissent différemment sur le récepteur VEGFR2. Cet effet peut notamment s'expliquer par la présence ou l'absence de l'HBD, mais qui cette fois-ci intervient dans un autre processus que celui de diffusion. En effet, certaines études avancent que la présence de l'HBD est nécessaire aux effets angiogéniques du VEGF (Grünewald et al., 2010 ; Beckouche et al., 2015). La transglutaminase-2 (TG2) se lie aux héparanes sulfates (HSPGs). Chez les souris TG2 KO, on note une augmentation de l'angiogenèse au niveau de la rétine. De plus, en bloquant l'expression de TG2 dans des cellules HUVEC, on note une augmentation de la prolifération et de la migration induites par le VEGF. Il s'avère que l'incubation de TG2 recombinante réduit la fixation du VEGF 165 sur les cellules endothéliales et ses effets angiogéniques par un blocage de l'interaction requérant l'HBD. En se fixant aux HSPGs, la TG2 bloque l'interaction HBD-HSPGs requise pour la transduction du signal. Ces résultats montrent donc l'importance de l'HBD dans la transmission du signal induite par la fixation du VEGF sur son récepteur.

L'HBD est codé par les exons 6 et 7, et leur présence module les propriétés de liaison des différentes isoformes à la matrice, ou encore leur rétention à la surface des cellules et leur affinité pour les corécepteurs (développée dans la partie traitant des corécepteurs) (Álvarez-Aznar et al., 2017). Le VEGF 189 contient les deux exons, et donc deux sites de liaison à l'héparine. Il en résulte que cette isoforme possède la plus forte affinité pour les HSPGs. Elle est considérée comme non diffusible. VEGF 121 quant à lui ne possède aucun des deux exons et son affinité pour la matrice ou les HSPGs est la plus faible parmi les isoformes. Il correspond donc à la forme la plus diffusible du VEGF. Le VEGF 165 contient seulement l'exon 7 et présente des propriétés intermédiaires par rapport à celles du VEGF 121 et 189.

Les processus protéolytiques vont aussi réguler l'activité du VEGF (Álvarez-Aznar et al., 2017). Diverses protéases peuvent cliver les isoformes du VEGF et les libérer de leur ancrage à la matrice extracellulaire, affectant ainsi leur liaison aux récepteurs ou provoquant leur dégradation. La plasmine est notamment responsable d'un clivage du VEGF au niveau de l'HBD et du domaine de liaison à la neuropiline. Roth et collègues ont démontré qu'une inhibition de ce clivage stimule l'activité angiogénique du VEGF lors des processus de cicatrisation en stabilisant les structures vasculaires au niveau de la lésion (Roth et al., 2006). De plus, le VEGF stimule l'activité de *l'urokinase plasminogen activator* (uPA) dans les cellules endothéliales (Mandriota et al., 1995). L'uPA étant impliqué dans l'activation du plasminogène en plasmine, son action pourrait alors former une boucle de rétrocontrôle positif avec le VEGF pouvant alors favoriser le développement des tumeurs.

Il a aussi été observé que la métalloprotéase 9 (MMP9) induit le clivage du domaine HBD du VEGF 165 (Hawinkels et al., 2008). Il existe une corrélation entre le VEGF circulant et l'expression de MMP9 chez les patients atteints de cancer colorectaux. Il s'avère qu'un traitement par la métalloprotéase aboutit à l'augmentation des niveaux de VEGF dans le milieu des cellules tumorales en culture. Les auteurs ont démontré que MMP9 induit la libération de VEGF en clivant les héparanes sulfates. Leur dissociation empêche en effet leur liaison au VEGF, modifiant ainsi la diffusibilité du facteur de croissance (Hawinkels et al., 2008).

d- Modulation de la production du VEGF

La régulation de la production du VEGF chez l'adulte fait appel à plusieurs processus. En réponse à l'hypoglycémie et l'hypoxie, sa sécrétion est augmentée, suggérant ainsi son rôle dans la néovascularisation durant la croissance tumorale (Akiri et al., 1998). Une augmentation des taux de VEGF est en effet observée dans les carcinomes ovariens épithéliaux, les cancers du col de l'utérus, les neuroblastomes, la leucémie lymphoïde chronique mais aussi de nombreux autres cancers (Hartenbach et al., 1997 ; Barreto et al., 2008 ; Choi et al., 2008 ; Weng et al., 2017).

L'hypoxie est un facteur particulièrement important dans la régulation de la sécrétion du VEGF. Les premières études sont issues de l'observation des zones ischémiques et nécrotiques, où le VEGF est particulièrement exprimé (Minchenko et al., 1994). Il est alors supposé que l'hypoxie induit la synthèse de VEGF. Cette hypothèse est aujourd'hui bien vérifiée. En réponse à une diminution de l'apport en oxygène, les cellules vont synthétiser le facteur de transcription HIF-1 qui sera transloqué au niveau nucléaire et stimulera la synthèse de VEGF en s'associant aux séquences HRE (Hypoxia Response Element) (Ramakrishnan et al., 2014).

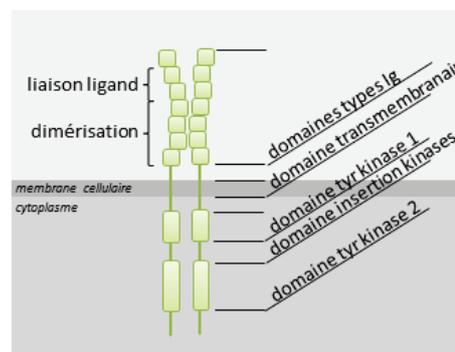
Au niveau neuronal, la libération de VEGF induite par HIF-1 provoque une augmentation de la transmission synaptique dans les neurones hippocampique via le récepteur VEGFR2 (Huang et al., 2010). L'expression de VEGF est également amplifiée dans ces mêmes neurones par l'activation de leurs récepteurs NMDA et l'augmentation du calcium intracellulaire qui en découle (Kim et al., 2008). Les études menées par notre équipe ont aussi démontré que l'expression du VEGF est simulée par l'activité neuronale *in vitro* (De Rossi et al., 2016).

e- Récepteurs et corécepteurs du VEGF

Le VEGF se lie avec une forte affinité à deux types de récepteurs à activité tyrosine kinase : VEGFR1 (Fms-like tyrosine kinase – Flt1) et VEGFR2 (Kinase Domain Receptor - KDR) chez l'homme ou fetal liver kinase (Flk1) chez la souris. Ces deux récepteurs sont impliqués dans l'angiogenèse mais VEGFR2 est considéré comme le principal médiateur de la voie du VEGF dans les cellules endothéliales. Il se lie également à différents corécepteurs comme les neuropilines 1 et 2, les protéoglycans à chaînes héparanes sulfates, ainsi qu'à des récepteurs auxiliaires comme EphB2 et les récepteurs NMDA.

1- Généralités sur les récepteurs au VEGF

VEGFR1 et VEGFR2 sont des récepteurs à activité tyrosine kinase qui présentent 44% d'homologie et partagent une organisation similaire. Ils s'agencent sous la forme de dimères et cette étape est indispensable à leur activation. Leur domaine extracellulaire possède 7 domaines d'homologie aux immunoglobulines (Ig-like). Cette région permet la reconnaissance et la liaison du ligand, qui met en jeu les domaines Ig-like 2 et 3, ainsi que la dimérisation du récepteur au niveau des domaines 4 à 7 (Holmes et al., 2007 ; Koch et al., 2011). Leur région centrale correspond au domaine transmembranaire qui joue un rôle déterminant dans l'orientation des domaines à activité tyrosine kinase intracellulaires et l'activation du récepteur. Les récepteurs peuvent s'associer sous la forme d'homo- ou d'hétérodimères, dont la composition dépend des sous-types cellulaires. Il est important de noter que les complexes issus de l'association entre différents récepteurs et corécepteurs vont moduler leur fonctionnement et les voies de signalisation découlant de leur activation (Simons et al., 2016).



reconnaissance et la liaison du ligand, qui met en jeu les domaines Ig-like 2 et 3, ainsi que la dimérisation du récepteur au niveau des domaines 4 à 7 (Holmes et al., 2007 ; Koch et al., 2011). Leur région centrale correspond au domaine transmembranaire qui joue un rôle déterminant dans l'orientation des domaines à activité tyrosine kinase intracellulaires et l'activation du récepteur. Les récepteurs peuvent s'associer sous la forme d'homo- ou d'hétérodimères, dont la composition dépend des sous-types cellulaires. Il est important de noter que les complexes issus de l'association entre différents récepteurs et corécepteurs vont moduler leur fonctionnement et les voies de signalisation découlant de leur activation (Simons et al., 2016).

Les cellules endothéliales expriment à différents degrés ces deux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 dans l'ensemble du système vasculaire, alors que les macrophages et monocytes expriment principalement VEGFR1 (Cross et al., 2003). VEGFR2 est également exprimé par les cellules endothéliales du système lymphatique, les cellules musculaires lisses et les cellules souches hématopoïétiques. Il est important de noter que VEGFR1 et 2 sont aussi, dans une moindre mesure, exprimés au niveau neuronal (Simons et al., 2016).

Ces récepteurs existent aussi sous une forme soluble, dénommée sVEGFR qui sont produites par épissage alternatif (Hornig & Weich, 1999 ; Shibuya, 2013). Ainsi, sVEGFR1 est composée de la partie extracellulaire de VEGFR1 et de 31 acides aminés supplémentaires dans sa partie C terminale. Il est naturellement produit par les cellules endothéliales et module la disponibilité du VEGF endogène en le piégeant, ce qui provoque une inhibition de l'angiogenèse. *In vitro*, sVEGFR1 réduit la prolifération cellulaire et possède un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses (Miyake et al., 2016). Cette forme soluble du récepteur est impliquée dans certaines pathologies comme la prééclampsie (Shibuya, 2013) et des pathologies rénales chroniques (Marco et al., 2009), où sa surexpression provoque une

carence en VEGF. L'application de sérum de patients avec pathologie rénale chronique sur des membranes vasculaires de poulet est responsable d'une altération de l'arborisation vasculaire. Cet effet est renversé par l'utilisation de bloqueur de sVEGFR1, confirmant ainsi ses effets anti-angiogéniques (Marco et al., 2009).

VEGFR2 existe aussi sous une forme soluble présente dans de nombreux tissus comme la peau, le cœur, la rate, les reins, les ovaires ou encore le plasma. sVEGFR2 est capable de lier préférentiellement le VEGF-C et empêche sa liaison au VEGFR3, inhibant ainsi la lymphangiogenèse (Albuquerque et al., 2009).

2- Activation des récepteurs

La liaison du VEGF aux domaines Ig-like 2 et 3 des récepteurs peut s'effectuer en *cis*, avec la liaison du VEGF diffusible ou lié à un autre récepteur monomérique, comme en *trans*, avec la présentation du VEGF par des corécepteurs présents sur les cellules adjacentes (Koch et al., 2011). L'activation des récepteurs nécessite leur dimérisation, qui est principalement induite par la fixation du VEGF. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, une proportion non négligeable de récepteurs est présente à la membrane sous une forme pré-dimérisée (Sarabipour et al., 2016). Cette étude en FRET a confirmé des travaux en microscopie électronique sur l'implication des domaines extracellulaires Ig-like 4 à 7 dans le processus de stabilisation des récepteurs VEGFR2 et leur dimérisation (Sarabipour et al., 2016 ; Ruch et al., 2007). Une analyse structurale récente a démontré l'importance de ces domaines Ig-like 4 à 7 dans les interactions monomère-monomère pour VEGFR1 (Markovic-Mueller et al., 2017). Les dimères de récepteurs peuvent être associés sous une forme d'homo- ou hétérodimères, et être stabilisés par une association à des corécepteurs ou des Héparanes Sulfates Protéoglycanes (HSPG) (Simons et al., 2016). L'activation des récepteurs par le VEGF provoque des changements conformationnels de leurs domaines transmembranaires qui accompagnent la rotation des dimères et exposent les sites de liaison de l'ATP des domaines à tyrosine kinases intracellulaires (Sarabipour et al., 2016 ; Lemmon & Schlessinger, 2010). Ce degré de rotation des dimères serait proportionnel au niveau d'activation du récepteur (Simons et al., 2016). De plus, il pourrait dépendre de la nature des isoformes du VEGF qui lient le récepteur, car elles conditionnent la composition des dimères (Lemmon & Schlessinger, 2010 ; Simons et al., 2016). Ce processus d'activation permet la fixation de l'ATP et l'auto-/transphosphorylation des monomères du récepteur sur leurs résidus tyrosines. Cette activation entraîne ensuite le recrutement de protéines kinases

spécifiques via leur domaine SH2 et l'activation des voies de signalisation impliquées dans la régulation de processus biologiques tels que la prolifération et la migration cellulaire.

Le récepteur VEGFR2 est reconnu comme le principal médiateur de la réponse des cellules endothéliales au VEGF, et je détaillerai plus particulièrement dans cette partie son activation et la régulation de cette activation.

L'activation du VEGFR2 par le VEGF induit sa phosphorylation sur plusieurs résidus tyrosines (Figure 6). Les principaux sites sont la tyrosine Y951, située dans le domaine faiblement conservé d'insertion des kinases, les tyrosines Y1054 et 1059, dans le domaine catalytique, et les tyrosines Y1175 et Y1214 dans la partie C-terminale (Koch & Claesson-Welsh, 2012). D'autres sites existent mais leur rôle est encore mal connu. La phosphorylation des Y1054 et 1059 est essentielle à l'activité kinase du récepteur (Kendall et al., 1999). Celle du résidu 951 est impliquée dans le recrutement des protéines kinases Src et Akt (Sun et al., 2012 ; Beckouche et al., 2015), alors que la phosphorylation du résidu 1175 recrute et active des molécules de signalisation essentielles telles que la PLC γ , SHB et SCK (Koch & Claesson-Welsh, 2012). De plus, le site 1173, qui correspond au résidu 1175 chez l'humain, est nécessaire au développement des cellules endothéliales et hématopoïétiques chez la souris. Les formes mutées de ce résidu qui empêchent sa phosphorylation aboutissent au décès prématuré des embryons, de manière similaire aux souris VEGFR2 KO (Sakurai et al., 2005). A l'inverse, les formes mutées sur la tyrosine 1212, correspondant au résidu 1214 chez l'humain, n'affectent pas la survie ou la fertilité des souris. Ces résultats mettent en évidence l'importance de la phosphorylation Y1175 dans l'induction des effets biologiques du VEGF.

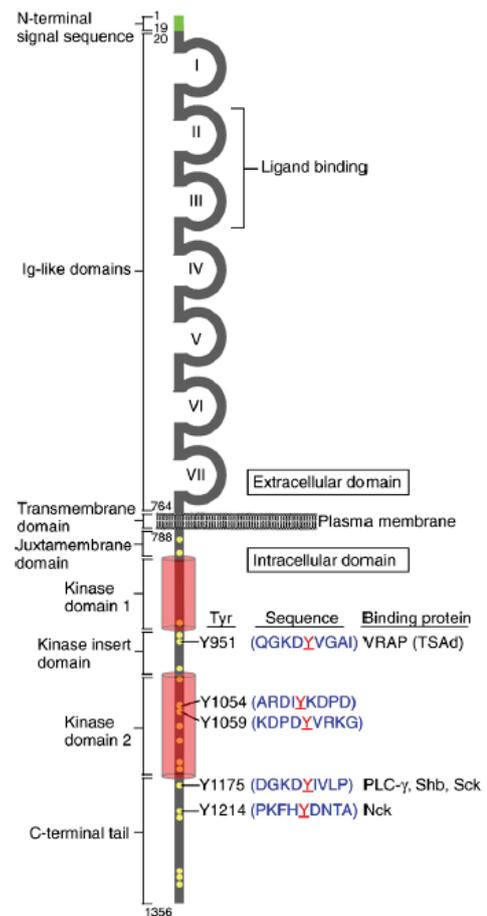


Figure 6 : structure et sites de phosphorylation du récepteur VEGFR2. D'après Holmes et al., 2007.

3- Régulation de l'activation de VEGFR2

L'expression membranaire du VEGFR2 est nécessaire à son activation et dépend du processus de maturation du récepteur. Sous sa forme immature, le précurseur de VEGFR2 (150 kDa) va subir plusieurs glycosylations avant d'adopter sa caractéristique mature (230 kDa) et d'être inséré à la membrane plasmique (Takahashi & Shibuya, 1997). Son affinité de liaison pour le VEGF ($K_D = 75-125$ pM) est environ 10 fois inférieure à celle de VEGFR1 (Shinkai et al., 1998).

L'internalisation du récepteur joue un rôle crucial dans la régulation de son activité car elle prolonge la durée de son activation et est requise pour l'activation de certaines voies de signalisation, comme celle des MAP kinases ERK1/2 (Simons et al., 2016). Ainsi, sa translocation aux endosomes n'interrompt pas pour autant sa signalisation (Labrecque et al., 2003 ; Salikhova et al., 2008). Cette endocytose déclenchée par le VEGF peut aboutir au recyclage ou à la dégradation du récepteur. Elle est conditionnée par les différents complexes que le récepteur forme avec les protéines transmembranaires adjacentes, qu'elles soient situées sur la même cellule ou sur une cellule à proximité (Lampugnani et al., 2006 ; Tae et al., 2017). Parallèlement, l'internalisation de VEGFR2 peut être modulée par les isoformes du VEGF et induire une activation différentielle du récepteur. L'étude menée par Fearnley en 2016 démontre que le VEGF 165 induit plus rapidement l'internalisation du récepteur que le VEGF 121. Cet effet différentiel s'accompagne d'une phosphorylation plus importante du résidu Y1175 induite par le VEGF 165 et d'une activation supérieure de la signalisation en aval (Fearnley et al., 2016). L'internalisation du récepteur est donc une étape cruciale pour sa fonction et son blocage aboutit à une perturbation de la réponse, comme dans le cas de l'extension des « *tip cells* » (Sawamiphak et al., 2010). Il est donc primordial de visualiser l'aspect dynamique de l'activation du récepteur VEGFR2, aspect qui est essentiel à la compréhension de son fonctionnement.

4- Effets du blocage des récepteurs au VEGF

Notre connaissance du rôle physiologique des récepteurs au VEGF a considérablement progressé avec les approches génétiques d'inactivation des gènes codant pour ces récepteurs chez la souris. La perte d'expression de ces récepteurs est létale chez la souris dès le 8^{ème} ou 9^{ème} jour embryonnaire (Shalaby et al., 1995). On constate que le système vasculaire des embryons déficients en VEGFR1 est totalement désorganisé en raison d'une prolifération

excessive des cellules endothéliales. Les vaisseaux sanguins deviennent très larges et sont obstrués par ces cellules endothéliales surnuméraires (Fong et al., 1995 ; Hiratsuka et al., 2005). De plus, l'inactivation de son domaine tyrosine kinase intracellulaire chez la souris ne provoque pas d'altération de l'angiogenèse (Hiratsuka et al. 1998). Ces phénotypes indiquent que le VEGFR1 peut être considéré comme un régulateur négatif, agissant en séquestrant le VEGF ou en formant des hétérodimères non fonctionnels avec VEGFR2 (Kendal et al., 1994). Le contrôle négatif exercé par VEGFR1 est facilité par sa forte affinité pour le VEGF, bien supérieure à celle de VEGFR2, et la faible efficacité de sa transduction (Simons et al., 2016).

L'absence de VEGFR2 se traduit également par une mort prématurée des souris au 8,5^{ème} jour embryonnaire car la différenciation des cellules endothéliales est totalement perturbée et le système vasculaire ne peut donc pas se développer. Ceci conduit à une absence de vasculogenèse et d'angiogenèse (Shalaby et al., 1997). Réciproquement, la surexpression de VEGFR2 conduit à un angiogenèse pathologique qui joue un rôle clé dans le développement de diverses tumeurs malignes (Nasir et al., 2017). Ces phénotypes drastiques confirment le rôle majeur du VEGFR2 dans la transduction du signal VEGF lors de la formation des vaisseaux sanguins.

5- Les corécepteurs

En plus de ses récepteurs classiques, les différentes isoformes du VEGF peuvent se fixer sur des corécepteurs. Ces corécepteurs peuvent alors moduler l'activité des VEGFRs mais aussi induire directement des cascades de signalisations.

Les neuropilines NRP-1 et 2 sont des glycoprotéines transmembranaires. NRP-1 est principalement exprimée au niveau des vaisseaux sanguins alors que NRP-2 sera plus exprimée au niveau des vaisseaux lymphatiques (Yuan et al., 2002 ; Chauvet et al., 2013). Leur partie intracellulaire est dépourvue d'activité enzymatique. Ces récepteurs sont spécifiques des certaines isoformes : NRP-1 lie le VEGF 121, 165, VEGFB et PlGF, alors que NRP-2 s'associe au VEGF 165, VEGFC et PlGF (Wild et al., 2012). NRP-1 favorise la liaison du VEGF 165 sur VEGFR2 et amplifie ainsi l'activation du récepteur (Soker et al., 1998).

Les complexes Ephrine/Eph-récepteur régulent également l'activation des récepteurs du VEGF. Via son domaine PDZ, l'EphrineB2 régule la localisation de VEGFR2 dans les *tip cells* et favorise la migration des cellules (Sawamiphak et al., 2010).

Comme d'autres facteurs de croissance, le VEGF requiert la présence des complexes héparane sulfate-protéoglycanes (HSPG) qui favorise l'association entre le ligand et son récepteur. Un blocage de leur synthèse aboutit à des défauts de l'angiogenèse chez les embryons de souris (Jakobsson et al., 2006). De plus, dans les cultures de cellules endothéliales, une inhibition de l'interaction VEGFR2/HSPG par la gremlin altère l'induction de l'angiogenèse. (Chiodelli et al., 2011).

f- Les voies de signalisation du VEGF

L'activation des récepteurs par le VEGF provoque l'autophosphorylation de résidus tyrosine des domaines intracellulaires et induit le recrutement de protéines kinases spécifiques via leur domaine SH2. Ces étapes initient les cascades de signalisation en aval.

1- La voie de signalisation PLC γ - ERK1/2

La régulation des processus de prolifération, de migration et de spécification des cellules endothéliales dépend de manière critique de la mise en jeu de la voie de signalisation PLC γ -ERK1/2 en aval de VEGFR2. La phosphorylation du résidu tyrosine 1175 dans le domaine C-terminal du VEGFR2 permet de recruter la phospholipase C γ (PLC γ) à la membrane plasmique et d'induire sa phosphorylation et l'augmentation de son activité catalytique. La forme active de la PLC γ hydrolyse alors le phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate (PIP2) en diacyl-glycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3), ce qui entraîne la libération de calcium des citernes du réticulum endoplasmique et l'augmentation de sa concentration dans le cytoplasme. Le DAG couplé à l'augmentation du calcium intracellulaire active alors la protéine kinase C (PKC). Ces deux processus, l'augmentation de calcium intracellulaire et l'activation de la PKC, sont capables d'initier la cascade d'activation des *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular-Signal-Regulated Kinase* (MAPK/ERK1/2). Dans ces deux cas, l'action du VEGF favorise la prolifération des cellules endothéliales, leur différenciation et leur spécification (Xia et al., 1996 ; Takahashi et al., 1999 ; Hong et al., 2006 ; Deng et al., 2013). L'augmentation du calcium intracellulaire est également responsable d'une activation de la calcineurine qui active à son tour le facteur nucléaire NFAT. Or, NFAT réduit l'expression de VEGFR1, ce qui favorise la disponibilité du VEGF et l'augmentation de sa signalisation via VEGFR2 (Jinnin et al., 2008). Cependant, cette

stimulation indirecte de VEGFR2 est étroitement régulée car NFAT exerce un rétrocontrôle négatif sur la calcineurine via RCAN1 (Chang et al., 2004).

L'implication de la voie de la PLC γ dans les processus d'angiogenèse a été démontrée par l'étude de souris déficientes en cette protéine. Les embryons décèdent *in utero* et présentent d'importantes altérations de la vasculogenèse, qui sont comparables au phénotype des souris dont le résidu tyrosine 1175 du VEGFR2 a été substitué par une phénylalanine. Cette altération du développement embryonnaire est aussi semblable à celle des souris VEGFR2 KO (Ji et al., 1997 ; Liao et al., 2002 ; Sakurai et al., 2005 ; Shalaby et al., 1995).

Bien que la signalisation de VEGFR1 ne soit pas entièrement comprise en raison de la faible activité kinase du récepteur, une étude récente suggère que l'activation de la PLC γ sur le résidu tyrosine 1169 serait capable de stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Weddell et al., 2017). Cette étude basée sur une approche computationnelle nécessiterait d'être confirmée par des approches expérimentales réalisées sur tissus.

2- La voie de signalisation PI3K-Akt

D'autres voies de signalisation régulent la survie, la migration et l'apoptose des cellules endothéliales, comme la voie Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase - Sérine-Thréonine Kinase (PI3K-Akt), qui est mise en jeu dans la régulation de ces processus au cours de l'angiogenèse et dans certaines pathologies (Gerber et al., 1998 ; Simons et al., 2016). Cette voie est également impliquée dans la perméabilité et la maturation des vaisseaux (Chen et al., 2005). La PI3K est une kinase qui génère le phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) à partir du PIP2, induisant le recrutement d'Akt à la membrane et son activation. Comme le récepteur VEGFR2 ne possède pas de site de liaison pour la PI3K, son activation en réponse au VEGF est indirecte et implique la kinase Src (Simons et al., 2016). Le développement d'un modèle de souris exprimant une PI3K inactive dans les cellules endothéliales, par mutation de sa sous-unité catalytique, a confirmé l'importance de cette voie de signalisation dans le développement de l'arbre vasculaire et la migration des cellules endothéliales (Graupera et al., 2008). Le VEGF peut enfin stimuler la voie PI3K-AKT indépendamment de son récepteur VEGFR2 et mettre en jeu la neuropiline-1 pour réguler la survie des neurones (Cariboni et al 2011).

3- La voie des Src kinases

La migration des cellules endothéliales dépend de la famille des tyrosine kinases cytoplasmiques de type Src, qui comprend plusieurs membres apparentés tels que Src, Yes, Fyn (Werdich et al., 2005). L'activation et le recrutement de Src sont stimulés par la phosphorylation du résidu tyrosine Y949 (951 chez l'humain) dans le domaine de l'insert cytoplasmique de VEGFR2, qui permet le recrutement de la protéine adaptatrice *T-Cell SH2-containing Adaptor Protein* (TSAAd) (Sun et al., 2012). TSAAd va interagir avec le récepteur VEGFR2 via son domaine SH2 et recruter à son tour Src en liant son domaine SH3. Une fois activée, Src peut réguler la composition du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales et les jonctions intercellulaires, contrôlant à la fois leur motilité, leur adhésion et la perméabilité vasculaire (Kim et al., 2009). Cette régulation des jonctions adhérentes met en jeu la phosphorylation de la protéine d'adhésion cellulaire *vascular endothelial cadherin* (VE-cadherine) en réponse au VEGF qui induit la perte des contact cellule-cellule (Weis et al., 2004). Il est important de mentionner que la VE-cadhérine peut former des complexes avec le récepteur VEGFR2, modulant ainsi son activité et son temps de résidence à la membrane (Lampugnani et al., 2006, Simons et al., 2016).

II- Rôle du VEGF dans le système nerveux

Les systèmes nerveux et vasculaire présentent de nombreuses similitudes. Leurs réseaux ramifiés, parfaitement alignés en périphérie, suggèrent que ces deux systèmes font appel à des principes d'organisation et des mécanismes communs.

a- Expression neuronale des différents acteurs de la voie

L'interaction entre système nerveux et système vasculaire joue un rôle clé et on commence maintenant à mieux comprendre l'influence des facteurs angiogéniques sur la maturation du système nerveux. Parmi l'ensemble des facteurs de la famille des VEGFs, le VEGF est prépondérant dans le système nerveux et ses différents récepteurs jouent un rôle essentiel et complémentaire pour déclencher la transduction de ce signal (Mackenzie & Ruhrberg, 2012). Lors du développement embryonnaire de la souris, au 13^e jour *in utero*, les ARN messagers (ARNm) des récepteurs VEGFR1 et 2 sont retrouvés dans toute la zone ventriculaire des ventricules latéraux. Cette expression spatiale se réduit progressivement pour se limiter à seulement une partie de la zone ventriculaire à J20 (Kim et al., 2007). L'expression de ces récepteurs a aussi été observée dans le cortex cérébral, l'hippocampe et les noyaux thalamiques. Dans le cortex, l'expression de VEGFR1 et 2 est principalement observée dans la plaque corticale à J15, puis se réduit jusqu'à J20 en se limitant alors aux couches profondes du cortex. Cette expression précoce des récepteurs du VEGF dans la zone ventriculaire coïncide avec l'expression du VEGF dans les cellules progénitrices neurales de cette même zone (Breier et al., 1992). Elle favorise la mise en place du premier plexus vasculaire cérébral (Haigh et al., 2003). L'expression du VEGF se réduit ensuite chez l'adulte quand l'arbre vasculaire cérébral est bien établi (Breier et al., 1992).

Chez l'adulte, l'expression complémentaire du VEGF et de ses récepteurs se retrouve en particulier dans le cervelet (Maharaj et al., 2006 ; Ruiz de Almodovar et al., 2010), le cortex (Yang et al., 2003), la région CA1 de l'hippocampe (Yang et al., 2003 ; Cao et al., 2004), les zones de néo-neurogenèse du gyrus denté (Jin et al., 2002 ; Cao et al., 2004), la zone sous-ventriculaire (Jin et al., 2002) et le flux rostral migratoire (Wittko et al., 2009). Il est important de noter que dans ces structures adultes, le VEGF est exprimé non seulement par cellules endothéliales, mais aussi par les neurones et les astrocytes (Ruiz de Almodovar et al., 2010 ; Cao et al., 2004). Cette complémentarité de l'expression ligand/récepteur au cours du développement, comme chez l'adulte, et la nature diverse des cellules qui expriment ces

partenaires soulignent l'ampleur de l'interaction entre les systèmes nerveux et vasculaire. En effet, le VEGF produit initialement par les cellules neurales organise le développement coordonné de ces deux systèmes et cette interaction se poursuit à l'âge adulte. Je développerai dans les parties suivantes les mécanismes communs aux deux systèmes qui sous-tendent ce développement coordonné.

b- Développement des systèmes nerveux et vasculaire

1- Similitudes anatomiques

Les réseaux formés par les vaisseaux sanguins et les fibres nerveuses suivent une organisation précise dans l'ensemble du corps humain, et leur architecture respective partage de nombreuses similitudes. Cependant, ces réseaux vasculaire et neuronal semblent suivre des principes de développement en partie différents ; en effet, les neurones émettent leur axone parfois sur de longues distances afin qu'ils atteignent des cibles spécifiques, alors que les cellules endothéliales font appel à des processus plus locaux (Carmeliet & Tessier-Lavigne, 2005). Lors de la mise en place des vaisseaux, la colonisation des tissus par les cellules endothéliales ne repose pas sur une extension à distance de leurs prolongements, mais dépend en grande partie des processus de prolifération et de migration de ces cellules.

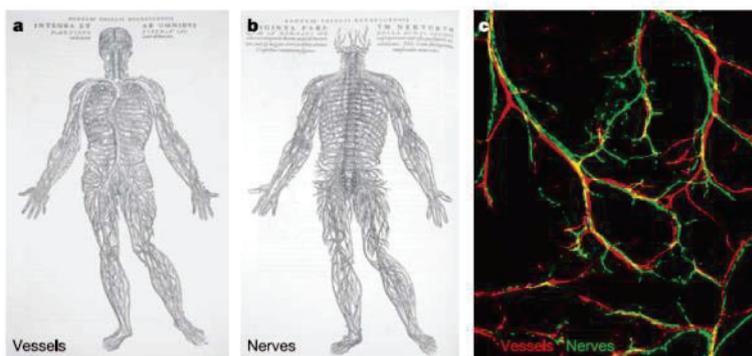


Figure 7 : parallélisme entre les vaisseaux sanguins et les fibres nerveuses. (a) et (b) Dessin d'Andreas Vesale mettant en évidence les similitudes architecturales entre système nerveux et vasculaire. (c) Vaisseaux (rouge) et nerfs (vert). D'après Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2005.

Le parallélisme entre l'architecture des réseaux vasculaire et neuronal peut en revanche s'expliquer par une coopération fine entre ces deux réseaux (figure 7, Carmeliet et Tessier-Lavigne 2005). En effet, les vaisseaux produisent des signaux chimioattractants qui stimulent la pousse et la progression des fibres nerveuses le long des vaisseaux pionniers (Kuruvilla et al., 2004). Réciproquement, les neurones sécrètent aussi des signaux, comme le VEGF, favorisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Mukoyama et

al., 2002). Ces deux systèmes partagent donc des mécanismes communs de guidage permettant ainsi leur développement coordonné.

2- Signaux et mécanismes communs de guidage

Comme nous venons de l'évoquer, neurones et vaisseaux sanguins partagent des signaux de guidage communs au cours du développement, qui appartiennent à la famille des Nétrines, des ligands Slit, des Ephrines et des Sémaphorines. Ces facteurs et les récepteurs qui leurs sont associés contrôlent le guidage des axones vers leurs cibles et contribuent à orienter la migration des cellules endothéliales (Chauvet et al., 2013). Nous allons ici illustrer un exemple de cette interaction croisée en évoquant les expériences qui ont permis de démontrer que les cellules musculaires lisses du système vasculaire sont indispensables à la mise en place d'une innervation sympathique. Ces cellules sont la source de production de la neurotrophine NT-3, un facteur nécessaire à l'extension des axones sympathiques le long des vaisseaux. Chez des souris invalidées pour le gène codant la NT-3, l'équipe de Ginty a révélé par des approches immunohistochimiques, biochimiques et des tests fonctionnels que les axones sympathiques ne poussent plus correctement au contact des vaisseaux, leur cible intermédiaire, et n'innervent plus leur cible terminale (Kuruvilla et al., 2004). Cette interaction entre système vasculaire et système nerveux permet de coordonner les étapes clés de l'innervation des cibles par les axones sympathiques et en particulier la croissance axonale et la mise en place de l'arborisation terminale qui succède. Les travaux de Mukoyama et collègues ont confirmé cette coopération entre vaisseaux et neurones en étudiant l'influence réciproque du système nerveux sur le développement vasculaire. En mutant les facteurs de transcription Neurogénine 1 et 2 qui sont essentiels au développement des nerfs périphériques, ils ont démontré que la mise en place du réseau artériel était défectueuse avec une arborisation vasculaire réduite et un rétrécissement du diamètre des petites artères au niveau de leurs embranchements (Mukoyama et al., 2002).

Le développement de ces deux réseaux fait aussi appel à des mécanismes similaires. Il dépend en effet de structures spécialisées comparables qui vont guider les cellules endothéliales des vaisseaux ou des axones, et leur permettre de répondre aux signaux de guidage du microenvironnement (Carmeliet & Tessier-Lavigne, 2005). Les terminaisons endothéliales et axonales possèdent la même fonction : analyser le milieu environnant afin d'adopter la meilleure trajectoire et permettre le prolongement de la branche ou du vaisseau en développement. Tout comme les cônes de croissance, les « *tip cells* » présentes à

l'extrémité des vaisseaux sanguins émettent des prolongements fins ou filopodes, qui perçoivent les signaux de guidage et orientent la trajectoire des branches vasculaires naissantes (figure 8). Un tissu hypoxique va par exemple synthétiser du VEGF afin de stimuler la prolifération des vaisseaux et répondre à la déficience en oxygène (Carmeliet, 2003). De manière similaire, les cibles sécrètent des facteurs de croissance comme le NGF afin de stimuler leur innervation (Goodman & Shatz, 1993).

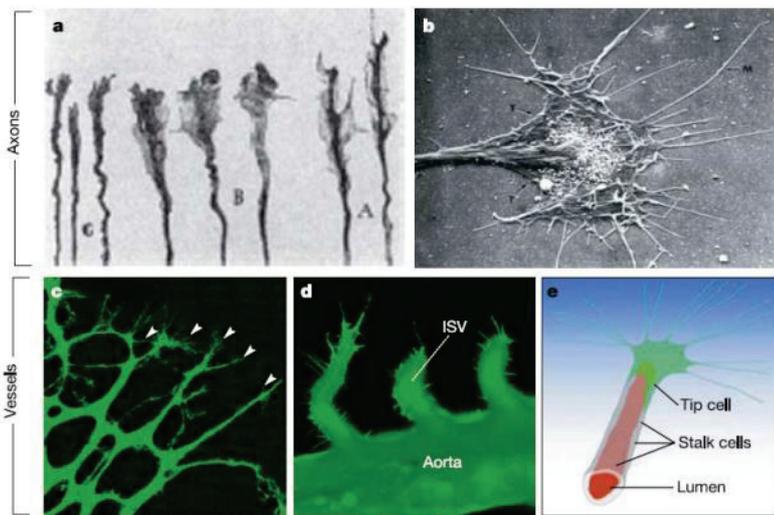


Figure 8 : similitudes entre cône de croissance axonal et « tip cell » endothéliale. (a) et (b) cônes de croissance et leurs extensions (filopodes). (c) et (d) Arborisation vasculaire primitive dans la rétine de souris (c), et l'embryon de zébrafish (d), présentant des cellules endothéliales « tip cells ». (e) représentation schématique d'un prolongement vasculaire naissant avec sa « tip cell » et les « stalk cells » formant la paroi. D'après Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2003

c- Effet direct du VEGF sur les neurones

Cette mise en place coordonnée de l'architecture des systèmes vasculaire et nerveux ne repose pas uniquement sur des influences croisées entre ces deux systèmes. En effet, en dehors de l'effet indirect du VEGF sur les neurones via les vaisseaux, ce facteur peut exercer un impact direct sur plusieurs processus neurobiologiques comme la survie des neurones, la croissance neuritique, le guidage des neurones et des axones, et potentiellement la neurogenèse.

1- Rôle dans la survie et la différenciation neuronale

In vitro, le VEGF favorise la survie de précurseurs nerveux et de neurones différenciés issus de diverses structures du système nerveux central ou périphérique. Cet effet trophique et neuroprotecteur du VEGF s'exerce par exemple sur les neurones du mésencéphale ventral cultivés en explant, dont la différenciation en neurones dopaminergiques et la survie sont

augmentées en présence de VEGF (Silverman et al., 1999). Il permet aussi de contrecarrer les effets délétères de stimuli hypoxiques et excitotoxiques appliqués à des cultures de neurones corticaux ou hippocampiques (Ruiz de Almodovar et al., 2009).

2- Rôle dans la croissance neuritique, le guidage des neurones et des axones

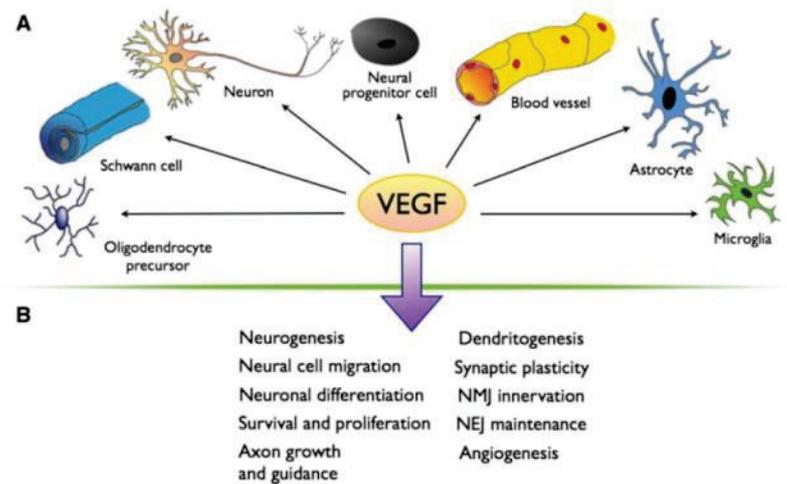
L'action trophique du VEGF stimule également la croissance neuritique de diverses populations neuronales cultivées *in vitro*, comme par exemple les neurones du cortex ou des ganglions spinaux de la racine dorsale. Cet effet est direct, indépendant des vaisseaux, qui requiert le récepteur VEGFR2 des neurones (Sondell et al., 1999 ; Rosenstein et al., 2003 ; Carmeliet & Ruiz de Almodovar, 2013). Parallèlement, le VEGF contrôle le guidage des neurones en migration et le choix de l'orientation des axones commissuraux. Ainsi, la migration des motoneurones du nerf facial, des cellules granulaires du cervelet et la traversée des axones commissuraux dans le chiasma optique et la plaque du plancher dépendent en partie du VEGF (Schwarz et al., 2004 ; Ruiz de Almodovar et al., 2010 ; Erskine et al., 2011 ; Ruiz de Almodovar et al., 2011). Cette orientation de la migration neuronale et de la pousse des axones résulte de la formation d'un gradient spatial du VEGF dans le microenvironnement (Ruiz de Almodovar et al., 2010), qui stimule directement le récepteur VEGFR2 ou le corécepteur neuropiline-1 des neurones.

3- Rôle dans la néo-neurogenèse

A l'âge adulte, le récepteur VEGFR2 est exprimé par les neurones nouvellement formés et marqués à la doublecortine dans les deux zones germinatives du cerveau : la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone sous-granulaire du gyrus denté (Jin et al., 2002). Pour déterminer si le VEGF exerce un impact direct sur la production des nouveaux neurones, Jin et collègues l'ont infusé par voie intracérébrale. L'effet positif du VEGF qu'ils ont mis en évidence à la fois sur la neurogenèse, la prolifération astrocytaire et la croissance vasculaire de ces niches neurogéniques n'a pas permis de trancher cette question. Des expériences parallèles menées *in vitro* ont néanmoins montré que des concentrations croissantes de VEGF peuvent stimuler directement la prolifération de neurones corticaux en culture via leur récepteur VEGFR2 (Jin et al., 2002). Cette étude révèle donc que la voie VEGF/VEGFR2 favorise la néo-neurogenèse et l'angiogenèse dans les niches neurogéniques où les cellules souches neurales et les cellules endothéliales sont voisines (Palmer et al., 2000). L'action

facilitatrice du VEGF sur la néo-neurogenèse a été confirmée dans d'autres études plus récentes où la production neuronale de VEGF est amplifiée par transduction virale ou modification génétique chez la souris (Cao et al., 2004 ; Licht et al., 2011). L'activation du récepteur VEGFR2 des neurones est requise car l'expression de sa forme dominant-négative induite par transduction virale diminue la neurogenèse basale du gyrus denté (Cao et al., 2004). Cet effet du VEGF pourrait s'avérer essentiel dans les pathologies neurodégénératives car l'implantation de cellules productrices de VEGF et encapsulées dans le cortex cérébral de souris modèles de la maladie d'Alzheimer favorise la neurogenèse du gyrus denté (Antequera et al., 2012), et améliore les déficits cognitifs (Spuch et al., 2010).

Figure 9 : rôle du VEGF dans le développement. (a) le VEGF exerce de nombreux effets sur les différentes populations cellulaires du cerveau. (b) Il possède un rôle pléiotropique et module l'ensemble des processus indiqués. D'après Carmeliet et Ruiz de Almodovar, 2013.



d- Rôle de la voie VEGF dans le système nerveux

Les processus développementaux évoqués plus haut permettent l'édification des réseaux de connexions entre neurones et font intervenir une interaction avec le monde extérieur qui joue un rôle majeur. L'expérience va permettre d'organiser un raffinement de ces réseaux qui est indispensable pour assurer un traitement approprié des informations (Katz & Shatz, 1996). Ainsi, les propriétés des réponses des neurones du cortex visuel peuvent être modifiées pendant une période critique du développement par l'expérience (Penn & Shatz, 1999). Cette capacité de modification de la réponse des neurones en fonction des informations entrantes dépend de la plasticité de leurs synapses. Une des formes de plasticité synaptique les plus étudiées dans le cortex visuel mais surtout dans l'hippocampe correspond à la potentialisation à long-terme ou LTP (Katz & Shatz, 1996). Il s'avère que le VEGF est fortement impliqué dans la modulation de ce processus de plasticité et je présenterai ici les

différents effets qu'il exerce tout d'abord sur la transmission nerveuse puis sur la plasticité synaptique.

1- Modulation activité canaux

Au niveau synaptique, la transmission nerveuse est assurée par la libération de neurotransmetteurs de l'élément présynaptique qui seront captés par des récepteurs-canaux induisant une dépolarisation des neurones postsynaptiques. L'intégration par sommation de l'ensemble des réponses postsynaptiques des différentes synapses d'un même neurone sera à l'origine de l'émission d'un potentiel d'action et donc de la transmission du signal nerveux. Le fonctionnement des récepteurs postsynaptiques est modulé par un jeu de phosphorylations affectant leur conductance, leur probabilité d'ouverture, ou encore leur expression à la synapse. Je développerai ces différents points dans la partie traitant de la plasticité synaptique.

Plusieurs travaux se sont intéressés à l'influence du VEGF sur les réponses synaptiques et ont donné lieu à des résultats contrastés. En effet, le VEGF peut réduire l'amplitude des réponses synaptiques évoquées dans l'hippocampe de modèles animaux présentant une épilepsie chronique (McCloskey et al., 2005), ou au contraire augmenter la transmission synaptique excitatrice dans cette structure (Cammalleri et al., 2011). Ces résultats contradictoires soulignent l'importance de réaliser des études complémentaires sur l'impact du VEGF au niveau synaptique. Or, notre équipe a montré que le VEGF a la capacité de réguler l'activité des récepteurs au glutamate de type NMDA avant même la formation des synapses dans le cervelet. Cet effet du VEGF résulte d'une interaction spécifique entre les récepteurs NMDA et VEGFR2 (Meissirel et al., 2011). Depuis, nous avons révélé que le VEGF est un partenaire clé des récepteurs NMDA à des stades plus tardifs car il régule leur distribution dans les compartiments synaptiques et extrasynaptiques, via son action sur VEGFR2. Il favorise en effet le recrutement des récepteurs NMDA exprimant la sous-unité GluN2B au niveau des synapses et la formation de nouvelles synapses (De Rossi et al., 2016). Notre collaboration avec l'équipe de Laurent Groc a permis de mettre en évidence grâce au suivi en temps réel de particule unique que le VEGF stimule la mobilité membranaire des récepteurs NMDA activés. Cet effet conduit à augmenter statistiquement le pool des récepteurs NMDA fonctionnels présents à la synapse à un temps donné. Ces résultats ont été confirmés par des protocoles d'enrichissement en densités postsynaptiques montrant eux-aussi une augmentation de l'expression synaptique des récepteurs NMDA. Enfin, nous avons mis

en évidence avec Paul Salin que le VEGF amplifie la transmission synaptique dépendant des récepteurs NMDA via les récepteurs VEGFR2 des neurones hippocampiques (De Rossi et al., 2016).

2- Modulation de la transmission et de la plasticité synaptique

Les formes de plasticité synaptique les mieux caractérisées dans l'hippocampe impliquent les récepteurs NMDA : il s'agit de la potentialisation à long terme (LTP) et de la dépression à long terme (LTD, Bear & Wickliffe, 1996). La LTP est aujourd'hui considérée comme une base cellulaire de la mémoire et correspond à un changement durable de l'efficacité synaptique. De très nombreuses études ont montré que le blocage de son induction ou de son expression pendant un processus d'apprentissage perturbe la mémorisation de cet apprentissage (Morris et al., 1986). Je présenterai plus en détail les travaux traitant de la plasticité synaptique dans une prochaine partie.

Pour étudier l'implication du VEGF et de son récepteur neuronal VEGFR2 dans ces processus de plasticité synaptique, notre équipe a utilisé un modèle de souris génétiquement modifiées produit par l'équipe d'A. Acker-Palmer à Francfort, qui présentent une invalidation du récepteur VEGFR2 dans les neurones. Nos résultats révèlent que la déficience en VEGFR2 dans les neurones hippocampiques comme l'inhibition pharmacologique du récepteur provoquent une altération majeure de la LTP dans la région CA1 de l'hippocampe (De Rossi et al., 2016). Cette perturbation de la plasticité synaptique en l'absence d'une signalisation VEGF dans les neurones est sélective car la transmission synaptique de base n'est pas affectée ni la plasticité présynaptique à court terme. Nos résultats ont complété des travaux électrophysiologiques plus anciens réalisés sur des tranches d'hippocampe perfusées au VEGF et enregistrées en potentiel de champ (Kim et al., 2008). Ces auteurs ont révélé que l'application de VEGF dans le bain des tranches hippocampique contribuait à augmenter l'efficacité synaptique. Mais ce sont des travaux réalisés *in vivo* sur des souris transgéniques présentant un gain ou une perte de fonction du VEGF qui ont caractérisé pour la première fois l'effet facilitateur du VEGF sur la LTP dans le gyrus denté (Licht et al., 2011). Dans cette étude, l'induction transitoire d'une surexpression de VEGF par les neurones de l'hippocampe a permis de dissocier l'effet du VEGF sur la plasticité synaptique de son effet sur la neurogenèse ou sur l'angiogenèse (Licht et al., 2011). L'ensemble de ces travaux démontre donc l'impact majeur de la voie du VEGF/VEGFR2 sur les processus de plasticité synaptique hippocampique.

3- Impact de l'activité sur la sécrétion du VEGF

Comme nous l'avons évoqué précédemment, il existe un couplage fin entre l'activation des récepteurs NMDA et la voie du VEGF/VEGFR2. Cette interaction contribue en partie à réguler les taux de VEGF libéré par les neurones. En effet, l'étude de Kim et collègues a révélé que l'expression et la production de VEGF sont augmentées dans les neurones hippocampiques après une activation de leurs récepteurs NMDA et l'influx calcique qui en résulte. Réciproquement, une stimulation de ces neurones par le VEGF provoque une augmentation des taux de calcium intracellulaire (Kim et al., 2008). Nos travaux récents ont mis en évidence que cette libération du VEGF dépendant de l'activité neuronale est amplifiée lors d'une stimulation intense des neurones par un protocole de LTP chimique (De Rossi et al., 2016). Il est important de noter que l'invalidation du récepteur VEGFR2 dans ces mêmes neurones n'affecte pas le processus de sécrétion du VEGF, suggérant qu'il est indépendant du récepteur. Ainsi, un niveau critique de VEGF libéré de manière endogène par les neurones de l'hippocampe peut être nécessaire au processus de LTP.

4- Formation et maintenance / élimination des synapses

La plasticité synaptique est caractérisée par un remodelage de la morphologie et de la structure des épines, qui sont des protrusions positionnées le long des dendrites portant les synapses excitatrices. Ces épines dendritiques ont une morphologie bien caractéristique qui est corrélée à l'efficacité de la transmission synaptique (Matsuzaki et al., 2001 ; Kasai et al., 2003 ; Ebrahimi & Okabe, 2014). Elles ont notamment fait l'objet d'une étude particulière lors de ma thèse.

Dans le cerveau adulte, la séquestration du VEGF provoque une réduction de la densité des épines dendritiques des nouveaux neurones ayant incorporé la couche des cellules granulaires du bulbe olfactif (Licht et al., 2010). Cet effet du VEGF ne se limite pas aux neurones nouvellement formés, car nous avons montré par des approches en microscopie électronique et vidéo-microscopie confocale que le VEGF favorise la formation rapide des épines dendritiques des neurones hippocampiques activés par le NMDA (De Rossi et al., 2016). Cette analyse en temps réel nous a permis de déterminer que l'augmentation du nombre de synapses en réponse au VEGF peut s'expliquer en partie par la formation *de novo* d'épines dendritiques. Avec l'activation des récepteurs NMDA des neurones hippocampiques,

le VEGF est capable de changer la morphologie des épines dendritiques et d'augmenter la largeur de leur tête, suggérant un effet positif sur l'efficacité de la transmission synaptique.

L'effet d'autres facteurs neurotrophiques sur les épines dendritiques est maintenant bien connu, comme celui du BDNF. L'appariement d'une dépolarisation postsynaptique et de la libération de glutamate à proximité d'une épine provoque une augmentation immédiate de la taille de cette épine qui dépend de la synthèse de BDNF et de sa libération dendritique (Tanaka et al., 2008). Parallèlement, la surexpression par transfert viral des facteurs de croissance IGF1 et 2 dans les neurones de l'hippocampe est responsable d'une augmentation de la densité en épines (Pascual-Lucas et al., 2014), et réciproquement l'invalidation du FGF2 aboutit à d'importantes altérations de leur morphologie (Zechel et al., 2009). De plus, le gain de fonction d'IGF2 dans l'hippocampe permet de restaurer l'efficacité de la transmission synaptique et les capacités mnésiques de souris modèles de la maladie d'Alzheimer, en lien avec son effet sur la densité des épines et des synapses (Pascual-Lucas et al., 2014).

5- Régulation des processus mnésiques par le VEGF

Comme le VEGF est à l'interface entre le système nerveux et le système vasculaire, il peut améliorer les capacités mnésiques en modulant plusieurs processus. Il peut favoriser l'angiogenèse dans l'hippocampe, stimuler la production de nouveaux neurones (Cao et al., 2004 ; Licht et al., 2011), ou favoriser les processus de plasticité synaptique (Licht et al., 2011 ; De Rossi et al., 2016). La surexpression de VEGF dans l'hippocampe par transfert de gène favorise la consolidation de la mémoire spatiale en lien avec une stimulation de la neurogenèse et de l'angiogenèse (Cao et al., 2004). Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'étude de Licht et collègues a permis de distinguer ces différents effets du VEGF grâce à un modèle de gain de fonction inductible du VEGF. L'amélioration des capacités mnésiques qu'ils ont observée seulement 5 jours après l'induction de VEGF dans l'hippocampe de souris transgéniques signifie que la neurogenèse n'est pas responsable de cet effet bénéfique, car les nouveaux neurones n'ont pas eu le temps de s'intégrer au réseau hippocampique. Cette amélioration rapide des performances mnésiques suggère qu'il existe un effet majeur du VEGF sur la plasticité synaptique hippocampique indépendamment de son action sur les vaisseaux ou sur la neurogenèse (Licht et al., 2011). Le rôle primordial du récepteur VEGFR2 dans les fonctions mnésiques et les processus de plasticité synaptique a été mis en évidence dans notre étude *in vivo* de l'impact d'une invalidation du récepteur. La déficience des neurones hippocampiques en VEGFR2 aboutit à un blocage de la LTP et à une

altération de la consolidation mnésique d'un apprentissage de peur conditionnée (De Rossi et al., 2016). Réciproquement, ces tâches d'apprentissage augmentent les taux d'ARNm du VEGF dans l'hippocampe, et confirment l'implication du VEGF dans les processus mnésiques (Cao et al., 2004).

6- Le VEGF dans la maladie d'Alzheimer

Il semblerait aussi que le VEGF soit impliqué dans la maladie d'Alzheimer. Le taux de VEGF, que ce soit dans le liquide céphalorachidien (LCR) ou le sérum, diffère entre les patients sains et les patients atteints de la pathologie. Ainsi, la présence de taux élevés de VEGF dans le LCR de patients atteints est associée à un volume de l'hippocampe préservé et à de meilleures performances cognitives au cours du temps. Ceci suggère que le VEGF pourrait exercer un rôle protecteur et avoir un effet bénéfique chez les patients atteints de la pathologie (Hohman et al., 2015). De plus, une diminution des taux de VEGF semble impliquée dans les processus de neurodégénérescence (Oosthuyse et al., 2002). Parallèlement, certaines études font état d'une plus faible concentration de VEGF dans le sérum chez les patients Alzheimer (Mateo et al., 2007). Cependant, ces résultats restent discutés (Tarkowski et al., 2002 ; Tang et al., 2013), et aucune différence n'a été mise en évidence en fonction de la sévérité de la maladie (Chakraborty et al., 2018). Le VEGF pourrait être également impliqué dans différents symptômes associés à la maladie. Ainsi, une diminution de son taux est retrouvée chez les patients Alzheimer atteints de dépression comparés aux patients ne présentant pas de troubles dépressifs (Kim & Moon, 2014). De plus, dans des modèles murins de la pathologie, les peptides β -amyloïdes toxiques s'accumulent dans les vaisseaux et provoquent une régression vasculaire, semblable à la situation observée chez l'homme. De manière intéressante, une surexpression neuronale de VEGF permet d'améliorer la vascularisation et les capacités cognitives de ces souris transgéniques (Religa et al., 2013).

Cette revue de la littérature souligne l'implication du VEGF dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, et son rôle important dans un processus qui est à la base de ces fonctions cognitives, la plasticité synaptique. L'impact positif que pourrait avoir le VEGF dans la maladie d'Alzheimer, caractérisée par une dysfonction majeure de la synapse, me conduit naturellement à évoquer dans une prochaine partie la synapse glutamatergique, sa plasticité et les voies qui la régulent.

III- La synapse glutamatergique

a- Les récepteurs au glutamate et la transmission synaptique

1- Généralités

La transmission synaptique entre deux neurones dans le système nerveux central s'effectue principalement par l'intermédiaire de synapses chimiques qui peuvent être excitatrices ou inhibitrices. Ces synapses chimiques sont constituées des éléments pré- et postsynaptiques que sépare la fente synaptique, et représentent l'unité fonctionnelle de la transmission du message nerveux. Dans cette partie, je décrirai le fonctionnement et l'architecture de la synapse excitatrice glutamatergique.

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central (SNC). Les synapses glutamatergiques excitatrices ont été identifiées en microscopie électronique par la présence d'une zone présynaptique, contenant des vésicules contenant le neurotransmetteur ou glutamate, et la présence d'un élément postsynaptique dense aux électrons, connu sous le nom de « *postsynaptic density*, PSD », ou densité postsynaptique. (Harris et al., 1992). Les membranes pré- et postsynaptique sont séparées d'environ 20 nm, espace délimitant la fente synaptique. Cette étroite fente synaptique s'étend sur une large zone, et permet une augmentation rapide de la concentration en glutamate tout en limitant sa diffusion (Isaacson & Nicoll, 1993 ; Savtchenko & Rusakov, 2007). La structure de la synapse est maintenue par des protéines d'adhésion qui relient les éléments pré- et postsynaptiques et organisent les différents composants de la synapse. Cette architecture permet de réduire les phénomènes de neurotoxicité et optimise la transmission des signaux électrochimiques.

L'élément présynaptique contient la machinerie nécessaire à la libération du glutamate en régulant le transport des vésicules synaptiques qui contiennent le glutamate et leur fusion avec la membrane plasmique. La libération des neurotransmetteurs de cet élément présynaptique dépend de l'entrée de calcium par l'activation de canaux voltage-dépendant (Katz & Miledi, 1967, 1969) mais aussi de la libération du calcium intracellulaire contenu dans les réservoirs de l'élément présynaptique (Emptage et al., 2001). Le glutamate libéré dans la fente synaptique agit sur différents types de récepteurs situés au niveau pré- ou postsynaptique. On distingue deux grandes catégories de récepteurs au glutamate, d'une part

les récepteurs ionotropiques couplés à des canaux ioniques qui incluent les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid), les récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) et les récepteurs kaïnates, et d'autre part les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G (mGluR). Les récepteurs ionotropiques jouent un rôle central dans la transmission synaptique rapide par leur capacité à convertir le signal chimique au niveau de la synapse en réponse électrique. Ils sont subdivisés en trois grands groupes en fonction de leurs propriétés pharmacologiques d'activation par des agonistes spécifiques.

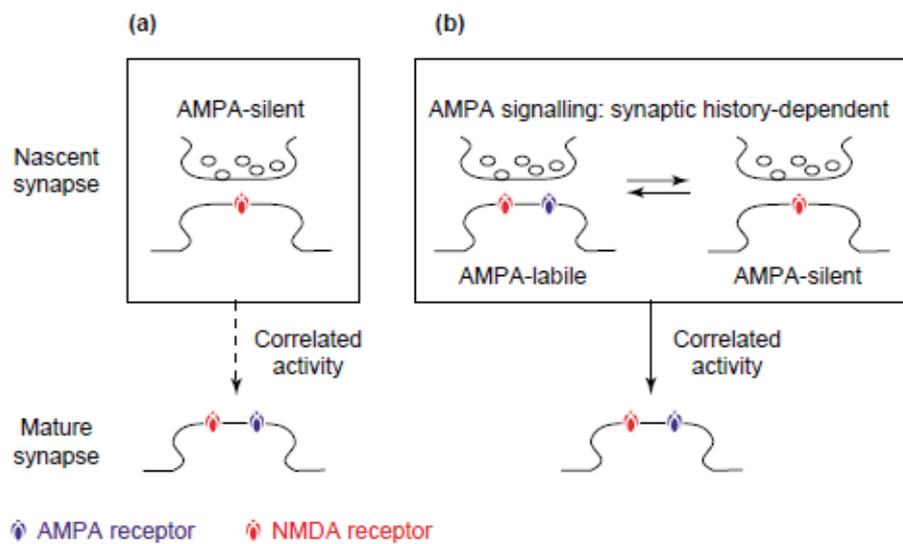
2- Les récepteurs ionotropiques AMPA, NMDA, Kainate

Les récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA sont les principaux récepteurs impliqués dans la transmission synaptique excitatrice rapide avec une cinétique d'activation et d'inactivation inférieure à la milliseconde. Ils sont aussi requis dans les mécanismes de plasticité synaptique (Santos et al., 2009). Ce sont des homo- ou hétérotétramères qui sont composés d'une combinaison de 4 sous-unités différentes liant le glutamate, GluA1 à 4 (Hollmann & Heinemann, 1994 ; Traynelis et al., 2010), mais s'assemblant généralement en tétramères de deux dimères d'une même sous-unité. Ces sous-unités partagent la même structure modulaire avec 4 domaines distincts dont le domaine N-Terminal (NTD), le domaine de liaison au ligand (LBD), le domaine transmembranaire (TMD), qui forme le pore du canal ionique, et enfin le domaine cytoplasmique (CTD). Chaque sous-unité est caractérisée par des propriétés pharmacologiques spécifiques qui vont être modulées par des modifications post-transcriptionnelles de leur TMD. Les récepteurs AMPA ont une affinité relativement faible pour le glutamate et sont principalement perméables aux cations monovalents Na^+ et K^+ . Leur composition en sous-unités va permettre de moduler leur perméabilité au calcium par la présence ou non d'une forme éditée de la sous-unité GluA2, dont un seul acide aminé du TMD est substitué (Hollmann et al., 1991). Cette substitution est présente dans la presque totalité des sous-unités GluA2 chez l'adulte, et l'absence de GluA2 détermine la perméabilité au calcium du récepteur. Ce sont des récepteurs dont la conductance électrique du canal ionique est proportionnelle au nombre de sites liant le glutamate (Rosenmund et al., 1998).

Les premières théories supposaient que lors du développement, les synapses glutamatergiques naissantes étaient équipées seulement en récepteurs au glutamate de type

NMDA. Au moment de la mise en place des réseaux de connexions, les synapses immatures ne contiennent pas de récepteurs AMPA fonctionnels, mais seulement ces récepteurs NMDA qui ne génèrent pas de courant au potentiel membranaire de repos des neurones. Ces synapses sont connues sous le nom de synapses silencieuses et disparaissent progressivement lors de la maturation du réseau synaptique (Kerchner & Nicoll, 2008). Les synapses acquièrent ensuite les récepteurs AMPA au cours de leur maturation. Mais cette théorie a été revue au cours de la dernière décennie. Il semblerait que les récepteurs AMPA soient présents, mais dans un état fortement labile. Les synapses nouvellement créées peuvent facilement changer entre un état silencieux ou non, dépendant de la signalisation découlant des récepteurs NMDA (Groc et al., 2006). Lorsque les récepteurs NMDA sont activés, cela induit une stabilisation des récepteurs AMPA à la synapse et permet la transmission (Fig 10).



TRENDS in Neurosciences

Figure 10. Deux hypothèses quant à la maturation des synapses. (a) Les synapses glutamatergiques naissent sans récepteur AMPA et sont silencieuses. Elles acquièrent les récepteurs plus tardivement, lorsqu'elles sont exposées à une stimulation appropriée. (b) Alternativement, les synapses naissantes contiennent des récepteurs AMPA mais peuvent aisément changer de statut. La présence ou l'absence de signalisation AMPA dépend de l'activité NMDA. D'après Groc et al., 2006.

La stabilisation des récepteurs AMPA dans la synapse mature est donc sous la dépendance de l'activité des récepteurs NMDA (Groc et al., 2006 ; Hall & Ghosh, 2008). En analysant l'exocytose des différentes sous-unités des récepteurs AMPA, Passafaro et collègues ont pu mettre en évidence des différences d'insertion selon le type de sous-unités (Passafaro et al., 2001). Les auteurs ont modifié la partie N-terminale des récepteurs en y

ajoutant un tag HA, permettant ainsi leur suivi lors de l'exocytose. Ils ont ainsi démontré que l'exocytose des sous-unités GluA1 est plus longue que celle des sous-unités GluA2. De plus, GluA1 s'insère préférentiellement au niveau extrasynaptique alors que GluA2 serait directement inséré dans la synapse. La stabilisation et l'insertion des récepteurs est en partie sous dépendance de leur queue C-terminale qui interagit avec différentes protéines d'ancrage. Par exemple, une délétion des 4 derniers résidus de la partie C-terminale de GluA1 bloque sa liaison avec SAP97 et réduit drastiquement son expression de surface (Leonard et al., 1998). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études insérant des mutations dans la partie C-terminale des sous-unités (Passafaro et al., 2001). La partie C-terminale des sous-unités est donc essentielle dans la régulation de l'insertion en surface des récepteurs.

L'ancrage des récepteurs AMPA à la synapse s'effectue par l'intermédiaire de protéines auxiliaires transmembranaires comme les MAGUKs. Les MAGUKs, *membrane-associated guanylate kinases*, sont des protéines d'ancrages fortement exprimées au niveau des synapses. Les plus étudiées sont PSD95, PSD93, SAP102 ou encore SAP97. Les récepteurs AMPA peuvent se lier directement à ces protéines, mais aussi via l'intermédiaire de la stargazine (Petràlia et al., 2005). En analysant l'expression hippocampique des différentes MAGUKs en fonction des stades de développement, l'équipe de Wenthold suppose un changement dans l'architecture de l'ancrage des récepteurs AMPA. Aux stades précoces, l'expression de SAP102 est plus importante, et sera remplacée avec le temps par PSD95 et PSD93 (Petràlia et al., 2005).

L'importance de la transmission dépend de l'expression synaptique des récepteurs AMPA et NMDA, qui à son tour dépend d'un équilibre dynamique avec leur expression extrasynaptique ou intracellulaire. Les récepteurs sont sujets à un important trafic via leur endocytose et exocytose, qui régule leur nombre durant les processus de plasticité synaptique. Mais les récepteurs sont aussi régulés par des processus de diffusion latérale. Au cours du développement *in vitro*, la diffusion des récepteurs AMPA est grandement réduite entre 10 et 15 jours, d'environ 70% (Groc et al., 2004). Ces résultats se rapprochent du comportement fortement labile des récepteurs dans les synapses naissantes, et peuvent notamment s'expliquer par le développement de la matrice extracellulaire autour des synapses. La matrice extracellulaire forme un maillage à la surface des neurones et contribue en effet à réguler la diffusion latérale des récepteurs et leur ancrage à la synapse. Sur culture primaires de neurones de rat, elle forme des compartiments qui agissent tels des barrières à la diffusion latérale des récepteurs. De plus, une digestion enzymatique de la matrice aboutit à une augmentation du coefficient de diffusion des récepteurs (Frischknecht et al., 2009).

L'ancrage des récepteurs est donc modulé par la composition de leur partie C-terminale, leur interaction avec les MAGUKs et la matrice extracellulaire. Mais la régulation de cet ancrage fait aussi appel à d'autres processus. En effet, l'expression synaptique des récepteurs AMPA est régulée par l'activité neuronale et le degré de phosphorylation des récepteurs. L'entrée de calcium dans l'élément postsynaptique aboutit à l'activation de kinases qui vont phosphoryler le récepteur et ainsi modifier sa conductance, sa probabilité d'ouverture, ou encore son insertion à la membrane et son ancrage. Ces processus de régulation seront détaillés dans les parties traitant de la plasticité synaptique et des différentes voies de signalisation.

Les récepteurs NMDA

Les récepteurs au glutamate de type NMDA se distinguent des récepteurs AMPA car ils sont sélectivement activés par le NMDA et leur activation nécessite la fixation simultanée du glutamate (ou du NMDA) et d'un co-agoniste, la glycine ou la D-sérine, sur des sites et des sous-unités distinctes (Mothet et al., 2000). De plus, ce récepteur forme un canal ionique perméable aux Na^+ et K^+ comme aux ions Ca^{2+} , dont le pore est bloqué au potentiel de repos de la membrane par le Mg^{2+} extracellulaire. Ce blocage magnésium qui varie en fonction du potentiel membranaire transforme les récepteurs NMDA en véritable détecteurs de coïncidence entre la dépolarisation du neurone postsynaptique et la libération présynaptique du glutamate (Yuste et al., 1999). L'activation simultanée des éléments pré- et postsynaptiques est donc requise pour activer ces récepteurs, et l'entrée de calcium qui en découle leur permet de jouer un rôle essentiel à l'établissement de certains processus de plasticité synaptique.

Ce sont aussi des hétérotétramères composés de deux sous-unité obligatoire GluN1, associée à différents types de sous-unités GluN2 (A à D), ou GluN3 (A et B). Chacune de ces sous-unités est caractérisée par une organisation modulaire commune avec un domaine extracellulaire N-terminal (NTD), le domaine de liaison à l'agoniste (ABD), le domaine transmembranaire qui contient le pore du canal, et le domaine intracellulaire C-terminal dont la taille varie en fonction de la nature de la sous-unité (Paoletti et al., 2013). L'ABD forme une poche centrale qui lie le co-agoniste (glycine ou D-sérine) pour les sous-unités GluN1 et GluN3, et le glutamate pour les sous-unités GluN2 (A-D) (Paoletti et al., 2013 ; Yao et al.,

2013). Chaque sous-type de récepteur possède des propriétés biophysiques, pharmacologiques et des voies de signalisation spécifiques (Paoletti et al., 2013).

L'expression spatiotemporelle des ARNm des différentes sous-unités varie de manière importante, en particulier pour GluN2, comme le montrent les études d'hybridation *in situ* (Monyer et al. 1994) (Fig 11). Au cours du développement embryonnaire du SNC chez les souris, seuls les récepteurs à sous-unités 2B et 2D sont présents, avec des différences régionales marquées. La sous-unité GluN2B est présente dans l'ensemble des régions cérébrales alors que GluN2D est restreinte au diencephale, au mésencéphale et au tronc cérébral. Les récepteurs à sous-unité 2A commencent à s'exprimer progressivement après la naissance, à l'inverse des récepteurs 2D dont l'expression diminue fortement (Monyer et al., 1994). On observe également une tendance inverse pour GluN2A et GluN2B avec une expression maximale de GluN2B au cours de la 2^{ème} semaine postnatale qui diminue progressivement pour se restreindre aux structures antérieures du cerveau. Parallèlement, l'expression de GluN2A augmente et s'étend progressivement à l'ensemble du cortex, à l'hippocampe ainsi qu'au cervelet. Enfin, les récepteurs 2C apparaissent après la naissance, principalement dans le cervelet et dans une moindre mesure dans le bulbe olfactif. Les modulations d'expression spatiotemporelle des différentes sous-unités pourraient jouer un rôle essentiel en régulant le remodelage des circuits neuronaux et leur adaptation à l'expérience sensorielle afférente (Sanz-Clemente et al., 2013).

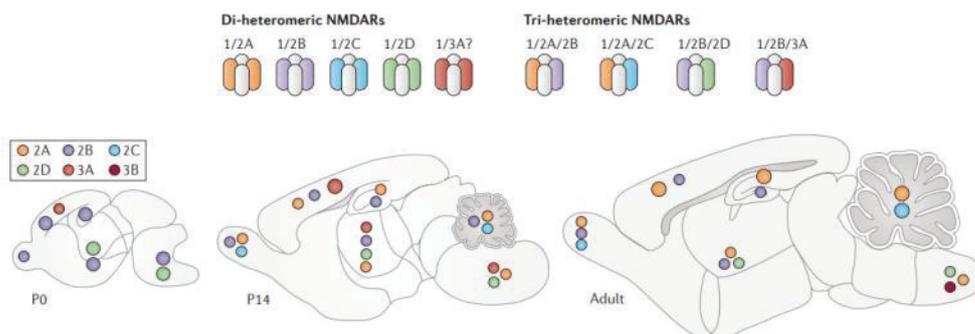


Figure 11 : diversité des récepteurs NMDA, structure et expression. Composition des récepteurs NMDA di-hétérotrimériques et tri-hétérotrimériques. Leur répartition spatiale est représentée en fonction du développement chez la souris. D'après Paoletti et al., 2013.

Ils sont toujours exprimés au niveau de la densité postsynaptique (PSD), que les synapses soient actives ou non (Takumi et al., 1999). Cette densité postsynaptique est un élément essentiel de la transmission synaptique, juste en regard de la fente synaptique. Mais les récepteurs NMDA sont aussi exprimés au niveau extrasynaptique et présynaptique. Les

récepteurs extrasynaptiques sont organisés sous forme de clusters, pouvant être mobilisés au niveau de la synapse par diffusion latérale lors des processus de plasticité synaptique (Groc et al., 2004 ; Papouin & Oliet, 2014 ; De Rossi et al., 2016). Il est souvent considéré que les récepteurs NMDA extrasynaptiques sont majoritairement constitués par des récepteurs à sous-unité 2B. Or, GluN2B interagit préférentiellement avec SAP102 et non PSD95, à l'inverse de GluN2A (Papouin & Oliet, 2014), ce qui augmente sa capacité de diffusion, augmentant ainsi le pool de récepteurs 2B à l'extérieur des synapses. Au niveau présynaptique, les récepteurs NMDA sont retrouvés à la fois dans les synapses excitatrices et inhibitrices (Bouvier et al., 2015). Ces récepteurs vont moduler la libération de neurotransmetteurs, mais aussi être impliqués dans la signalisation présynaptique. Il a notamment été suggéré que les récepteurs présynaptiques pourraient être une source d'influx calcique impliquée dans la synthèse de NO durant la LTD (Bidoret et al., 2009).

Comme les récepteurs AMPA, la composition en différentes sous-unités des récepteurs NMDA va influencer la transmission synaptique en modulant leur mobilité, leur localisation synaptique ou extrasynaptique, ou même leur conductance (Paoletti et al., 2013). Ainsi, l'affinité du récepteur pour le glutamate dépend de la nature des sous-unités présentes, avec les récepteurs les moins affins exprimant GluN2A, aux plus affins avec GluN2D. Les co-agonistes D-sérine et glycine vont en retour moduler de manière spécifique la diffusion latérale dans la membrane postsynaptique des récepteurs à sous-unité 2A ou 2B (Papouin et al., 2012 ; Ferreira et al., 2017). Parallèlement, l'activité synaptique va influencer la composition des différentes sous-unités formant les récepteurs AMPA et NMDA qui sont insérés à la membrane postsynaptiques (Malinow & Malenka, 2002 ; Pérez-Otaño & Ehlers, 2005).

Les récepteurs kaïnates

Les récepteurs kaïnates (KARs) doivent leur nom à leur activation sélective par l'agoniste kaïnate. Ils s'assemblent en homo ou hétérotétramères de 4 sous-unités parmi lesquelles sont retrouvées les sous-unités GluK1 à 5 (Hollmann & Heinemann, 1994). Ces récepteurs sont perméables aux ions Na^+ et K^+ , et leur perméabilité au Ca^{2+} varie selon un épissage alternatif des ARNm des sous-unités GluK5 et 6 qui détermine la substitution d'un acide aminé dans leur domaine transmembranaire (Bernard & Khrestchatisky, 1994). Ils sont exprimés de façon ubiquitaire dans le système nerveux central et peuvent être présents au

niveau de l'élément postsynaptique ou présynaptique des neurones. Ils peuvent être retrouvés aux mêmes synapses que les récepteurs AMPA et NMDA, ou être exprimés à titre exclusif, comme au niveau des synapses entre les cônes et les cellules bipolaires de la rétine (Huettner, 2003).

A la différence des récepteurs AMPA et NMDA, les KARs sont relativement peu impliqués dans la transmission excitatrice glutamatergique rapide, mais jouent néanmoins un rôle important dans la régulation de l'activité et des processus de plasticité des réseaux neuronaux (Contractor et al., 2011 Sihra et al., 2014). Ils peuvent réguler la dépolarisation postsynaptique comme la libération présynaptique des neurotransmetteurs (Huettner, 2003). Ainsi, dans la moelle épinière, le glutamate libéré par les fibres sensibles est responsable d'une inhibition des courants postsynaptiques inhibiteurs via l'activation des KARs. Ce mécanisme s'explique par une activation présynaptique des KARs qui augmentent la libération de GABA et de glycine par les interneurons inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle épinière (Kerchner et al., 2001, Pinheiro & Mulle, 2008). Ces récepteurs interviennent aussi dans la modulation des processus présynaptiques de plasticité dans l'hippocampe puisqu'ils facilitent la potentialisation à long terme (LTP) au niveau des synapses entre les fibres moussues et les neurones de CA3 (Lauri et al., 2001).

3- Les récepteurs métabotropiques

Comme nous l'avons vu, les récepteurs glutamatergiques ionotropiques sont essentiels à la transmission synaptique. Mais il existe aussi des récepteurs glutamatergiques couplés aux protéines G, appelés récepteurs métabotropiques (mGluRs). Ils sont notamment retrouvés au niveau pré- et/ou postsynaptique des synapses de l'hippocampe, du cervelet (Hinoi et al., 2001), mais aussi au niveau des cellules pyramidales du cortex (Chu & Hablitz, 2000).

Ces récepteurs se retrouvent sous la forme d'homo ou hétérodimères, composés par les sous-unités mGluR1 à 8. Leur composition en sous-unités module leur fonction et notamment leur couplage aux différentes protéines G (Moustaine et al., 2012). Ils sont classés en trois groupes distincts selon leur homologie de séquence, leurs propriétés pharmacologiques et leur couplage aux protéines G, avec la mise en jeu de voies de signalisation spécifiques en aval (Nicoletti et al., 2011). Le groupe I inclut les mGluR1 et mGluR5 et active la voie de la phospholipase C alors que les groupes II (mGluR2 et 3) et III (mGluR4 à 8) inhibent l'adénylate-cyclase. Ils ont une cinétique d'activation lente et ne sont donc pas impliqués dans la transmission glutamatergique rapide. En effet, leur activation par le glutamate aboutit non

pas à l'ouverture d'un canal mais à l'activation de cascades de signalisation qui sont impliquées dans une modulation relativement lente de la transmission synaptique (Niswender & Conn, 2010). Ainsi, l'utilisation du trans-ACPD, agoniste des mGluR, aboutit à la suppression des potentiels postsynaptiques évoqués dans le cortex visuel de rat (Sladeczek et al., 1993). L'activation de mGluR1 facilite aussi les courants calciques via l'intervention des protéines $G_{q/11}$ et PKC (Endoh, 2004). Cet effet peut notamment être expliqué par l'augmentation de l'activité des récepteurs NMDA induite par mGluR1, nécessitant l'activation de PKC (Skeberdis et al., 2001). Néanmoins, il est essentiel de noter que l'action des mGluR sur les récepteurs NMDA dépend fortement de leur composition en sous-unités. On note des effets opposés sur les courants calciques NMDA, aboutissant à une amplification ou une réduction des effets excitotoxiques (Ambrosini et al., 1995 ; Bruno et al., 1995 ; Buisson et al., 1996).

b- Les épines dendritiques

1- Organisation des épines dendritiques

Les épines dendritiques mises en évidence par Ramon y Cajal au XIX^e siècle, sont des protrusions présentes sur les dendrites des neurones qui portent l'élément postsynaptique des synapses glutamatergiques excitatrices (Gray, 1959). Leur morphologie est caractérisée par la présence d'une tête et d'un cou généralement plus étroit qui forment des compartiments distincts et permet de contrôler les étapes de la transmission synaptique dans des compartiments différenciés.

Le cytosquelette des épines dendritiques est particulièrement important puisqu'il sera fortement impliqué dans la régulation des processus de plasticité ; son aspect dynamique permet des changements rapides de leur forme et volume en réponse aux stimuli. La largeur de leur tête est positivement corrélée à la taille de la densité postsynaptique (PSD), et la taille de la PSD est elle-même corrélée à la force de la transmission (Arrelano et al., 2007 ; Meyer et al., 2014). La PSD est une structure dense aux électrons en microscopie électronique qui regroupe une forte densité de récepteurs et de protéines régulant la transmission synaptique (Scannevin & Huganir, 2000). Les changements dans la forme des épines affectent donc la transmission synaptique.

Le cytosquelette des épines est principalement composé de filaments d'actine (F-actin), sur lesquels vont s'ancrer les protéines régulant la structure de l'épine et de la PSD.

Ces protéines contiennent des domaines PDZ liant notamment les récepteurs du glutamate. Les MAGUKs vont s'attacher aux récepteurs via leurs domaines PDZ et conditionner leur ancrage à la membrane. Elles servent aussi d'intermédiaires dans la modulation de leur expression et de leur internalisation régulée par de nombreuses voies de signalisation (Figure 12).

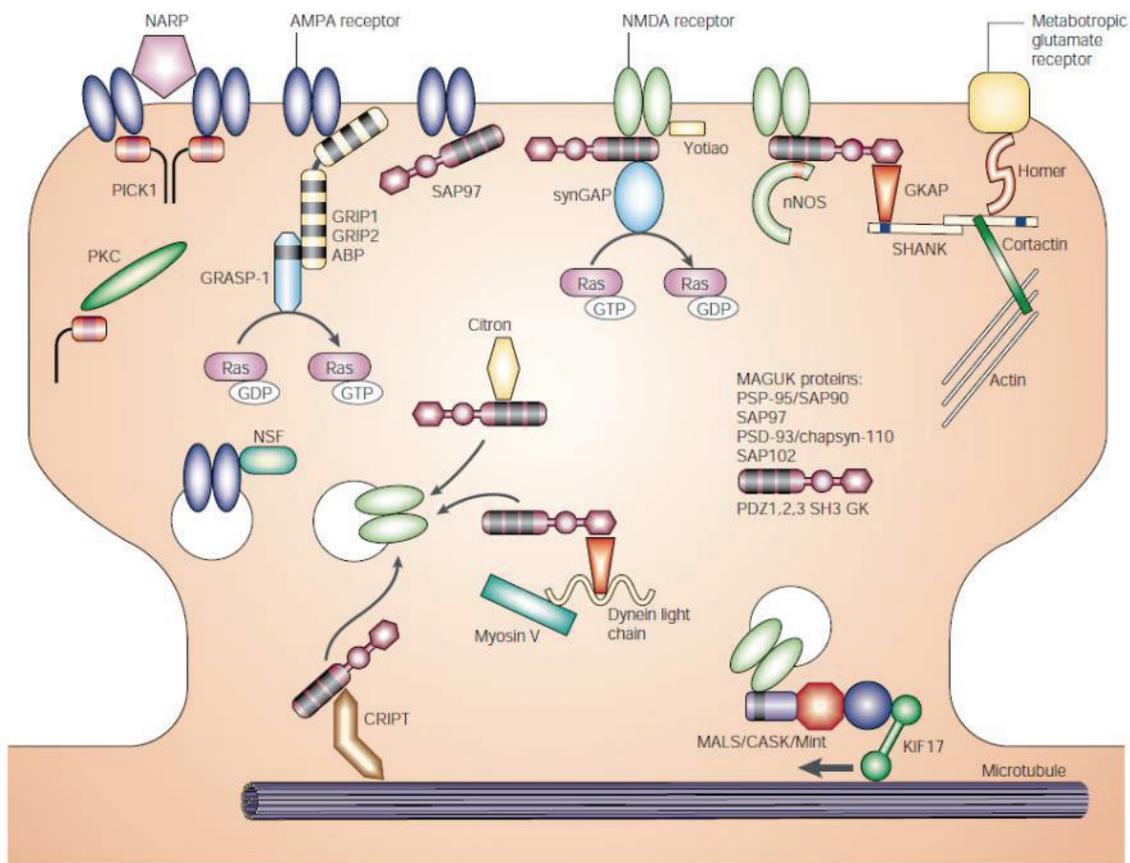


Figure 12. Structure de l'élément postsynaptique. De nombreuses protéines synaptiques impliquées dans le trafic des récepteurs possèdent des domaines PDZ, ici représentés par des rectangles noirs. Ces protéines sont des protéines d'échafaudages qui organisent les complexes de récepteurs et corécepteurs. Les domaines PDZ vont lier les récepteurs entre eux mais aussi aux éléments structuraux de la synapse. Les récepteurs NMDA peuvent être couplés aux récepteurs métabotropiques (mGlu) et au cytosquelette d'actine via PSD95, GKAP ou encore SHANK. Mais les domaines PDZ des MAGUKs interagissent aussi avec synGAP ou nNOS (*neuronal NO synthase*) et vont moduler les voies de signalisations sous-jacentes (**ABP**, *AMPA receptor-binding protein* ; **CASK**, *calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase* ; **CRIPT**, *cysteine-rich interactor of PDZ three* ; **GK**, guanylyl kinase ; **GKAP**, *guanylyl kinase-associated protein* ; **GRASP-1**, *GRIP-associated protein* ; **GRIP1/2**, *glutamate receptor-interacting protein* ; **KIF17**, *kinesin 17* ; **MALS** *mammalian Lin seven* ; **Mint**, *Munc18-interacting protein* ; **NARP**, *neuronal activity-regulated pentraxin* ; **PDZ-1, -2, -3**, (*PSD-95, Dlg, ZO-1*) *domains-1, -2, -3* ; **PICK**, *protein interacting with C kinase* ; **PKC**, *protein kinase C* ; **PSD-93, -95**, *postsynaptic density-93, -95* ; **SAP90, -97, -102**, *synapse-associated proteins 90, -97, -102* ; **SHANK**, *SH3 domain and ankyrinrepeat*

containing protein ; **SH3**, *Src-homology region 3* ; **SynGAP**, *synaptic Ras–GTPase-activating protein*). D'après Scannevin & Huganir, 2000.

2- Formation et développement des épines dendritiques

Ramon y Cajal avait observé que la densité des épines dendritiques était plus importante sur les neurones pyramidaux du cortex cérébral aux stades précoces du développement qu'à l'âge adulte (Ramon y Cajal, 1899). Ces premières observations ont été confirmées par de multiples études combinant la méthode d'imprégnation argentique de Golgi et la microscopie électronique. Elles ont révélé la formation de ces épines et l'accroissement de leur nombre, suivie d'une sélection d'une partie des synapses portées par les épines, phénomène connu sous le nom de « *synaptic pruning* ». Ce processus est nécessaire au raffinement des connections (Miller & Peters, 1981 ; Rakic et al., 1986). Chez certaines espèces comme le cochon d'Inde, les épines dendritiques peuvent se développer avec une faible influence de l'environnement durant la gestation (Yuste & Bonhoeffer, 2004). Des processus similaires sont retrouvés au niveau du cervelet, où les épines des cellules de Purkinje semblent se développer indépendamment des axones (Sotelo, 1978). Chez les modèles murins, caractérisés par un cerveau relativement immature à la naissance, le développement des épines au niveau du prosencéphale semble faire appel à des processus plus complexes impliquant des facteurs propres aux cellules ou extérieurs (Miller & Peters, 1981 ; Katz & Shatz, 1996).

Les filopodes, présents en nombre important lors du développement, sont parfois considérés comme des épines naissantes, essentielles à l'établissement de la synapse dans les neurones pyramidaux de CA1 (Ziv & Smith, 1996 ; Fiala et al., 1998). Néanmoins, d'autres modèles mettent en avant une synaptogenèse à partir des épines de type stubby ou des dendritic shafts (Miller & Peters, 1981 ; Pokorny & Yamamoto, 1981). Aujourd'hui, on distingue principalement trois modèles de synaptogenèse (Figure 13). D'une part, les épines pourraient émerger indépendamment des terminaisons axonales. Mais des terminaisons pourraient aussi connecter la dendrite et induire une restructuration du cytosquelette menant à la formation d'une épine. Enfin, l'arbre dendritique peut émettre des prolongements qui vont alors connecter les axones pour former une épine. Ces trois hypothèses sont présentées dans la figure 13 (Yuste & Bonhoeffer, 2004).

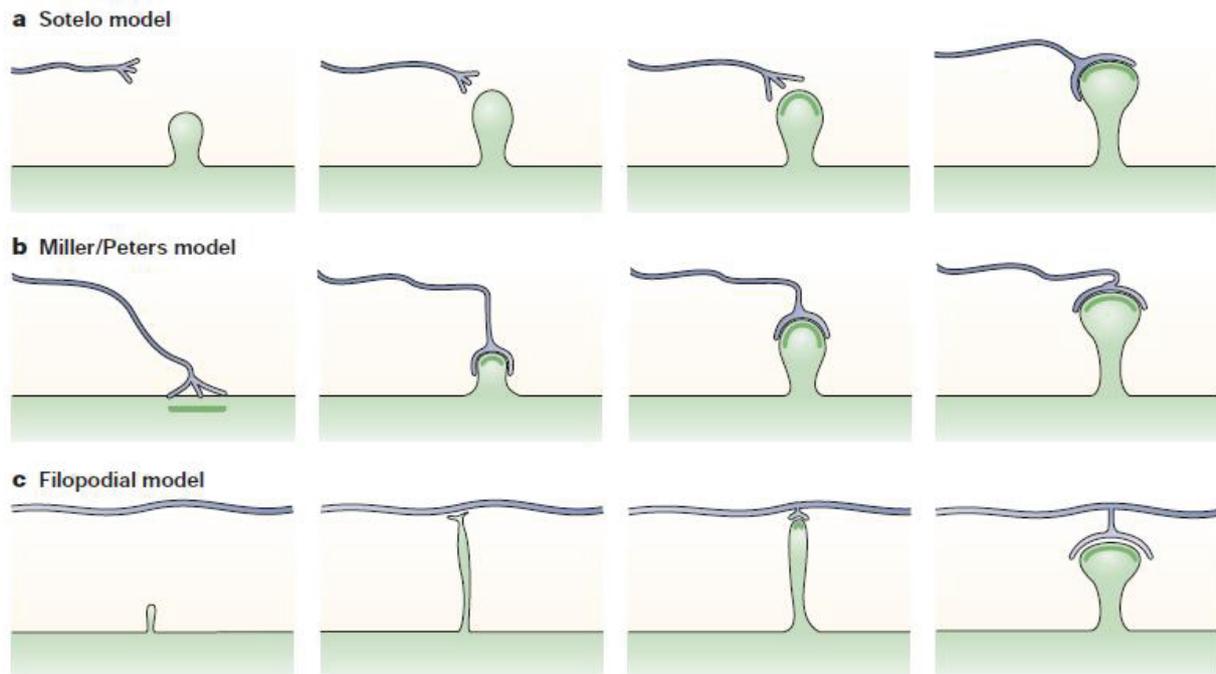


Figure 13. Les différents modèles de synaptogenèse. (a) Modèle de Sotelo, 1990. Sotelo propose que le développement des épines des cellules de Purkinje est indépendant des fibres axonales. (b) Modèle de Miller & Peters, 1981. Les auteurs proposent un modèle dans lequel l'axone stimule la formation des épines. (c) Modèle du filopode, Vaughn, 1989. Dans ce modèle, Vaughn propose une hypothèse « synaptotrope » dans laquelle les filopodes s'associent aux axones et peuvent aussi former des dendrites naissantes. D'après Yuste & Bonhoeffer, 2004.

3- Morphologie et classification des épines dendritiques

Dans l'hippocampe, les épines sont des protrusions dont la longueur est généralement inférieure à 2 μm et la largeur inférieure à 1 μm , qui recouvrent la surface des dendrites des neurones pyramidaux. Leur morphologie et leur densité varient grandement avec l'âge, leur localisation dendritique ou encore l'activité et les apprentissages (Horner & Arbuthnott, 1991 ; Nwabuisi-Heath et al., 2012 ; Benavides-Piccione et al., 2013 ; Mahmoud et al., 2015). Les premières études d'ultrastructure en microscopie électronique ont confirmé la diversité morphologique des épines dendritiques sur les neurones pyramidaux du néocortex en caractérisant des paramètres essentiels tels que leur longueur, la largeur de leur tête ou encore la taille de leur cou (Jones & Powel, 1969). Ces caractéristiques ont permis leur classification en différents sous-types, qui représentent le corrélat anatomique d'une modulation de la transmission synaptique (Harris et al., 1992).

La classification la plus courante divise ces épines en 3 sous-types morphologiques. Les épines *stubby* ne possèdent pas de constriction au niveau du cou et leur longueur est

équivalente à leur diamètre. Les épines *thin* sont caractérisées par un cou long et fin surmonté d'une petite tête, avec une longueur nettement supérieure au diamètre de leur cou. Les épines *mushroom* possèdent la forme d'un champignon avec un petit cou et une large tête (Harris et al., 1992). Enfin, certaines études distinguent aussi les filopodes, prolongements longs et fins qui ne portent pas de synapse et ne sont pas nécessairement reliés à un bouton présynaptique.

La densité relative de ces différents sous-types varie en fonction de l'âge avec une prépondérance d'épines « thin » dans la région CA1 de l'hippocampe chez le rat adulte alors que les épines « stubby » sont bien représentées 15 jours après la naissance (Harris et al. 1992). Les épines « stubby » sont donc majoritaires aux stades précoces ce qui constitue un argument en faveur de leur implication dans la formation de la synapse (De Simoni et al, 2003). Cependant, on note un doublement de la densité totale des épines dendritiques entre le 15^{ème} jour et l'âge adulte avec une majorité d'épines présentant une constriction du cou chez l'adulte. Cette prépondérance des épines « thin » et « mushroom » avec la présence d'un cou marqué pourrait réduire les phénomènes de diffusion de calcium à distance des épines et augmenter la spécificité et la stabilité des processus de plasticité synaptique (Harris et al., 1992).

Il existe plusieurs classifications basées sur l'analyse de la morphologie des épines dendritiques, avec comme point commun la classification en 3 sous types principaux regroupant les épines « mushroom », « stubby » et « thin ». Ces classifications reposent sur l'utilisation d'algorithmes qui classent les épines selon leur longueur, la largeur de leur tête ou encore la finesse de leur cou. Le tableau 1 regroupe de manière non-exhaustive les algorithmes utilisés par quelques études caractéristiques de la littérature.

Auteurs	Mushroom	Thin	Stubby
Harris et al., 1992	$DC \lll DT$	$DC \lll L$ $DC \leq DT$	$DC \sim L$
De Simoni et al., 2003	$\frac{DT}{DC} > 2$	Tête observable $L > DC$	$DC \sim L$
De Simoni & Edwards, 2006	$LC < DC$ $DT > DC$	$LC > DC$ $DT < LC$	$DC \sim L$ Absence de tête
Oray et al., 2006	$\frac{L}{DC} > 2$ $\frac{DT}{DC} > 1,3$	$\frac{L}{DC} > 2$ $\frac{DT}{DC} < 1,3$	$\frac{L}{DC} < 2$
Matsuo et al., 2008	Tête large avec un cou	Long cou et petite tête	Tête large sans cou
Rodriguez et al., 2008	Cou défini, large tête	Si cou non défini, longue Si cou défini, pas de large tête	Cou non défini, courte
McNair et al., 2010	$\frac{DT}{DC} > 1,4$	$\frac{L}{LC} < 1,4$	$\frac{DT}{DC} < 1$ $\frac{L}{DC} < 1$
Risher et al., 2014	Largeur $> 0,6 \mu\text{m}$	Longueur $< 1 \mu\text{m}$	$\frac{L}{\text{largeur de l'épine}} < 1$

Tableau 1 : exemple des différents algorithmes utilisés afin de classer les épines dendritique. DT : diamètre de la tête. L : longueur de l'épine. DC : diamètre du cou. LC : longueur du cou.

Certaines études choisissent des algorithmes dont les paramètres ne se superposent pas (Oray et al., 2006), alors que d'autres préfèrent utiliser des algorithmes moins contraignants en éliminant de leur analyse un certain nombre d'épines à la morphologie ambiguë (Matsuo et al., 2008).

D'autres classifications distinguent les épines thin en « *long thin* » et « *thin* », et ajoutent la classe des épines dite « *branched* » qui correspond aux épines possédant un cou et deux têtes (Fig 14, Risher et al., 2014). Ces différents sous-types sont notamment décrits pour analyser la maturation des épines dans le cortex visuel postnatal.

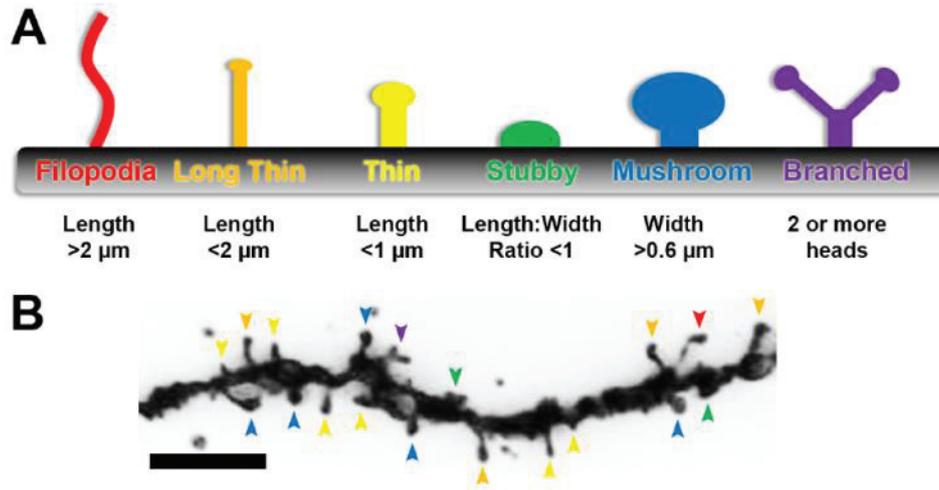


Figure 14 : caractéristiques géométriques des épines dendritiques. (A) Les différents types d'épines retrouvées au niveau cortex cérébral, positionnées selon leur degré de maturité de droite à gauche. (B) Marquage de Golgi-cox d'un fragment de dendrite secondaire de neurone pyramidal du cortex visuel de souris. Les flèches de couleur représentent les différents types d'épines. D'après Risher et al., 2014.

Enfin, certaines études mettent en avant le continuum qui caractérise les variations de la morphologie des épines dendritiques. Certaines catégories d'épines comme les « mushrooms » montrent en effet une variabilité importante de leurs dimensions au cours du développement, comme à un âge donné, suggérant qu'elles forment plus un continuum qu'une catégorie distincte de synapses (Harris et al. 1992 ; Arellano et al., 2007). Néanmoins, il est admis que le volume de la tête des épines est fortement corrélé à la taille de leur densité postsynaptique et à leur contenu en récepteurs postsynaptiques, qui déterminent l'efficacité de la transmission synaptique.

4- Intérêts et défauts de classification des épines dendritiques

Il est important de noter que l'ensemble des études analysant la morphologie des synapses en différentes sous-classes repose sur l'utilisation d'algorithmes permettant leur différenciation. L'ensemble de ces algorithmes diffèrent selon les études, et aucun consensus n'est établi afin de définir quels paramètres caractérisent une épines d'un type spécifique. Il en résulte une importante variabilité dans l'analyse des différentes sous classes, dont la pertinence peut être discutée du fait de l'importante quantité d'épines écartées à cause d'algorithmes dont la précision ne permet pas leur reconnaissance. Ces épines, considérées à la morphologie ambiguë, ne rentrent en effet pas en compte dans l'analyse de la densité ou

encore de la proportion. Leur pourcentage pouvant être important, parfois jusqu'à 30% (Harris et al., 1992), la question de la représentativité des résultats peut être posée. Afin de palier à cela, d'autres auteurs ont choisi des critères de sélection exclusifs (Oray et al., 2006), processus qui peut néanmoins donner lieu à une mauvaise classification de certaines épines à la morphologie ambiguë.

Aujourd'hui, le classement des épines en différents sous-types fait encore l'objet de débats. Il n'est pas encore établi si les épines sont représentées par différentes classes spécifiques de leur fonction, ou si leur morphologie suit un continuum, s'ajustant en fonction de la plasticité. Mais la multitude d'études validant un lien entre la morphologie de l'élément postsynaptique et la transmission démontre l'intérêt d'une analyse fine de cette morphologie afin d'en déduire sa corrélation avec la transmission.

IV- Plasticité synaptique, bases cellulaires et moléculaires de la mémoire

La plasticité synaptique correspond aux mécanismes qui régulent les modifications morphologiques, structurales et moléculaires des connexions entre neurones et permettent la réorganisation des réseaux neuronaux. Ces processus dynamiques vont contrôler l'efficacité de la transmission du message nerveux en modifiant l'architecture des synapses mais aussi l'expression des différents récepteurs et des protéines d'échafaudage. Bien que les neurones se renouvellent peu dans la majeure partie des structures du cerveau, les connexions nerveuses font face à de nombreux changements, qu'ils soient fugaces ou perdurent dans le temps.

Plusieurs processus de plasticité synaptique existent, visant à potentialiser la transmission synaptique ou inversement à la diminuer. Ils sont présents dans l'ensemble du SNC, mais font appel à des mécanismes différents selon les structures impliquées. Je me concentrerai ici sur la plasticité synaptique des synapses glutamatergiques de l'hippocampe dépendant de l'activité des récepteurs NMDA. Cette plasticité est très fortement étudiée du fait de l'implication de l'hippocampe dans la mémoire. Cette forme de plasticité synaptique fait principalement référence à deux processus, appelés LTP (*long term potentiation*) et LTD (*long term depression*). Ces mécanismes visent respectivement à amplifier ou diminuer l'efficacité de la transmission au niveau des synapses. Le fait que chaque synapse puisse subir ces deux types de plasticité de manière dynamique est essentiel pour la raison suivante : si une synapse ne peut être que potentialisée alors la force de sa transmission ne peut qu'augmenter et arrivera donc à un point de saturation. La synapse perdra alors sa capacité à être plastique. Ainsi, la plasticité bidirectionnelle permet aux réseaux neuronaux de conserver leur plasticité et d'augmenter leur capacité de traitement de l'information (Malenka & Bear, 2004).

a- La potentialisation à long terme : LTP

1- Généralités

Découverte en 1973 par Bliss & Lømo, la potentialisation à long terme (LTP) est le sujet de nombreuses études du fait de son implication dans les processus de mémorisation. La LTP est en effet le corrélat cellulaire de la mémoire. Ce mécanisme de plasticité correspond à une augmentation durable de l'efficacité de la transmission synaptique en réponse à une forte stimulation (Volianskis et al., 2013). Elle repose notamment sur une modification du

fonctionnement et de l'expression des récepteurs NMDA et AMPA postsynaptiques, qui se traduit par une augmentation de l'amplitude de la réponse postsynaptique ou potentiel postsynaptique excitateur (EPSP) (figure 15).

Deux types de LTP existent au niveau des synapses des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe. La STP, *short-term potentiation* ou *transient LTP* (t-LTP), est une forme de LTP précoce qui se distingue de la *late LTP* (l-LTP) par ces caractéristiques temporelles et les mécanismes mis en jeu (Bliss & Collingridge, 1993 ; Volianskis et al., 2013). La STP est caractérisée par une réorganisation des récepteurs au niveau de la synapse, mais ne fait pas appel à la synthèse de nouveaux récepteurs à l'inverse de la l-LTP (Malenka & Bear, 2004). Cette STP correspond à une phase instable d'augmentation de la transmission qui perdure environ 30 minutes et conduit à une potentialisation persistante représentée par la l-LTP (figure 15).

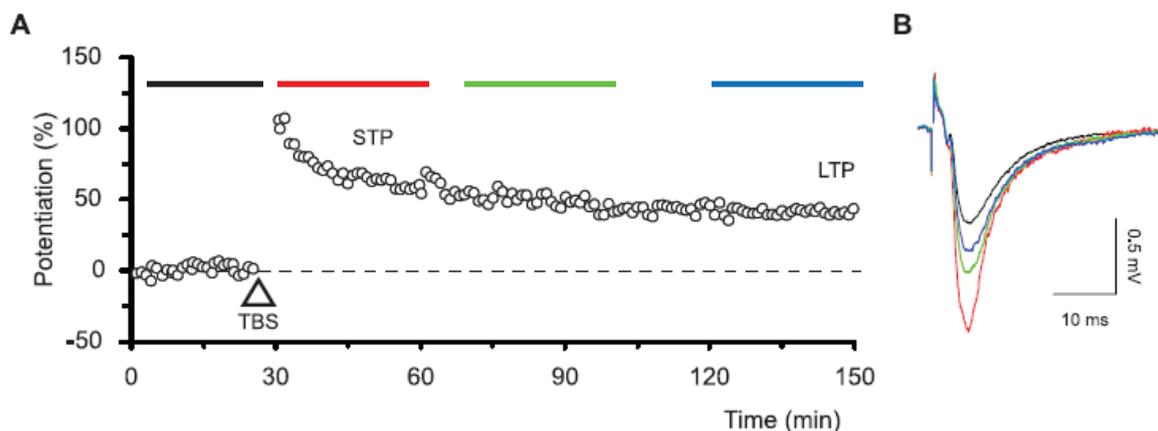


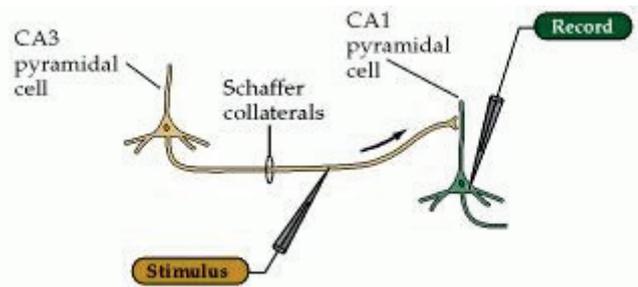
Figure 15 : Réponses postsynaptiques (EPSP) suite à l'induction d'une LTP. Les différents graphes représentent la réponse de l'élément postsynaptique suite à une stimulation présynaptique identique entre chaque point, avant ou après induction de la LTP. (A) L'augmentation du signal suite à induction de la LTP (TBS) consiste en une phase décroissante (STP) et une phase continue (l-LTP). (B) Potentiels postsynaptiques excitateurs illustrant la transmission du signal avant et après potentialisation. Les couleurs illustrent les différentes phases représentées en A. D'après Volianskis et al., 2013.

2- Mécanismes d'induction

Dans l'hippocampe, l'induction de la LTP nécessite l'activation simultanée des éléments pré- et postsynaptiques. Elle est déclenchée par l'activation des récepteurs NMDA, dont le canal est bloqué par un ion magnésium au potentiel de repos. Ces récepteurs NMDA sont essentiels à l'induction de la LTP, et leur blocage par l'utilisation d'antagonistes comme l'APV aboutit à l'inhibition de la potentialisation (Cummings et al., 1996 ; Kleschevnikov et

al., 2001). Leur activation requiert la liaison du glutamate mais aussi l'élimination de cet ion magnésium du canal, qui est induite par la dépolarisation de la membrane postsynaptique par les récepteurs AMPA (Lüscher & Malenka, 2012). Du fait de cette caractéristique, les récepteurs NMDA sont considérés comme des détecteurs de coïncidence de l'activation des éléments pré- et postsynaptiques. La LTP nécessite donc une stimulation à forte fréquence pour activer ces deux éléments de manière concomitante.

Dans les tranches aigues d'hippocampe, la LTP est souvent induite par une stimulation téτανique des collatérales de Schaeffer. Les enregistrements sont alors réalisés au niveau de CA1 (figure 16). Les stimulations à hautes fréquences



correspondent généralement à un ou plusieurs trains de stimulations comprises entre 50 et 100 Hz pendant 1 seconde (Lüscher & Malenka, 2012 ; Volianskis et al., 2013) et permettent une sommation temporelle des potentiels postsynaptiques excitateurs. La dépolarisation postsynaptique importante qui résulte de cette activation permet la libération de l'ion magnésium du canal NMDA et un influx calcique dans l'élément postsynaptique. Ainsi, par des approches reposant sur l'imagerie calcique, il a été démontré qu'une stimulation à haute fréquence provoque une augmentation transitoire et locale du calcium intracellulaire dans les dendrites et les synapses, et que cette augmentation peut être bloquée par l'APV, un bloqueur compétitif des récepteurs NMDA (Regehr & Tank, 1990). De plus, l'injection intracellulaire d'un chélateur du calcium, l'EGTA, dans le neurone postsynaptique bloque l'induction de la LTP (Lynch et al., 1983). L'influx calcique dans l'élément postsynaptique est donc nécessaire à l'induction de la LTP.

3- Expression

Au niveau des synapses glutamatergiques de l'hippocampe, l'expression de la LTP dépend en premier lieu de l'activation des récepteurs NMDA, mais aussi des récepteurs métabotropiques du glutamate (Bortolotto et al., 1994 ; Malenka & Bear, 2004). Lors de la LTP dépendant des récepteurs NMDA, l'activation de ces récepteurs aboutit à un influx calcique dans l'élément postsynaptique qui déclenche l'activation d'effecteurs moléculaires à l'origine d'une cascade de signalisation. Il en résulte une augmentation du nombre de

récepteurs AMPA qui vont s'insérer à la synapse et moduler de façon persistante la force de la transmission synaptique.

L'équipe de Malinow a ainsi démontré que l'activation des récepteurs NMDA entraîne une augmentation du nombre des récepteurs AMPA au niveau de la synapse. En utilisant une forme modifiée de la sous-unité GluA1 exprimant la protéine fluorescente GFP, l'équipe a mis en évidence que la majorité des récepteurs AMPA ne sont pas exprimés au niveau de la membrane synaptique des neurones de CA1 mais qu'ils sont retrouvés au niveau intracellulaire. Cependant, la réalisation d'une stimulation tétanique provoque la relocalisation de ces récepteurs au niveau de la synapse. Il s'avère que cette relocalisation dépend de l'activation des récepteurs NMDA puisqu'elle est inhibée par l'application d'APV, bloqueur des récepteurs NMDA. Cette étude démontre donc que suite à une activation des récepteurs NMDA lors de l'induction de la LTP, les récepteurs AMPA sont relocalisés au niveau de la membrane synaptique (Shi et al., 1999).

Cette réorganisation des récepteurs AMPA met en jeu différentes kinases qui sont impliquées dans la phosphorylation des différentes sous-unités de ce récepteur. En particulier, la phosphorylation spécifique de résidus sérines dans la partie C-terminale de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA module leur expression, leur localisation, mais aussi leur activité par une modification de leur probabilité d'ouverture ou encore de leur conductance.

La phosphorylation des sérines 831 et 845, respectivement S831 et S845, est responsable de l'augmentation des courants issus des récepteurs AMPA (Roche et al., 1996 ; Snyder et al., 2003) et est induite lors de la LTP (Lee et al., 2010). Initialement phosphorylée par PKA, le résidu S845 est impliqué dans la régulation de la probabilité d'ouverture et l'expression de surface des récepteurs AMPA (Lee et al., 2003). La génération d'une forme mutée de GluA1 par remplacement sélectif des résidus S831 et S845 a permis de bloquer ces processus de phosphorylation. Les souris transgéniques exprimant ces récepteurs mutés sont caractérisées par une réduction importante de leur LTP hippocampique, mais aussi de leurs capacités de mémorisation lors d'un apprentissage spatial analysées en piscine de Morris (Lee et al., 2003). D'autres études analysant la phosphorylation de ces résidus de manière séparée ont mis en évidence que seul le blocage de la phosphorylation en 845 aboutit à une inhibition partielle de la LTP (Lee et al., 2010, Song et al., 2017). Il est important de noter que suite à leur activation, les récepteurs AMPA subissent une rapide déphosphorylation du résidu S845. Cette déphosphorylation est bloquée par l'application de MK801 et de CNQX, antagonistes respectifs des récepteurs NMDA et AMPA (Snyder et al., 2003). Ainsi, l'activation des

récepteurs AMPA et NMDA postsynaptiques exerce un rétrocontrôle négatif sur l'expression synaptique des récepteurs AMPA.

L'expression de surface des récepteurs AMPA est elle aussi régulée par la phosphorylation de GluA1. Ainsi, l'induction d'un processus de plasticité homéostatique a permis d'étudier la contribution de la phosphorylation de GluA1 en fonction de l'activité neuronale globale. L'homéostasie synaptique est un mécanisme qui permet de compenser la suractivité ou l'inhibition de la transmission neuronale ; les neurones régulent leur seuil de déclenchement de potentiels d'actions en fonction d'une hyper- ou hypoactivité du réseau. Durant l'adaptation homéostatique, l'expression synaptique des récepteurs AMPA est augmentée ou diminuée en réponse à une diminution ou une augmentation de l'activité, respectivement par une stimulation de leur insertion ou de leur internalisation (Figure 17, Wang et al., 2012).

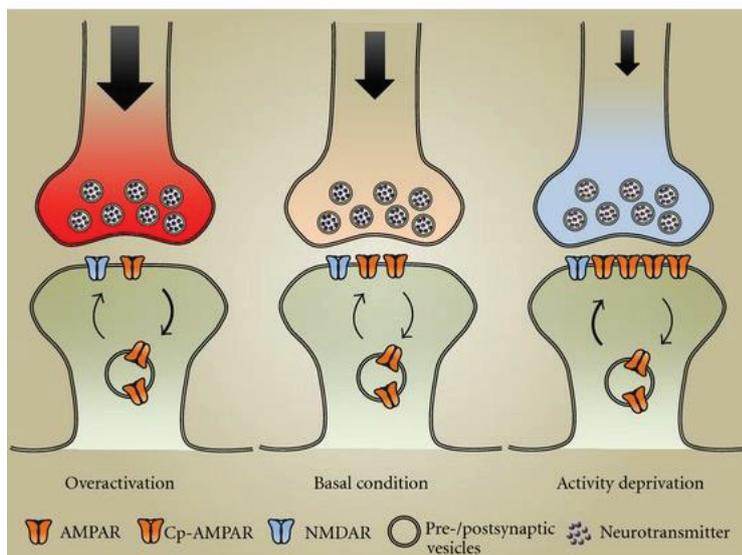


Figure 17 : Adaptation homéostatique dépendant de l'activité neuronale, d'après Wang et al., 2012. Une importante activité peut être détectée par les neurones, conduisant à une augmentation de l'internalisation des récepteurs AMPA. Inversement, quand les neurones sont sous-stimulés, on note une augmentation de leur insertion au niveau post-synaptique. Par contre, aucun changement n'est noté au niveau des récepteurs NMDA.

L'application de TTX sur tranches d'hippocampe permet de bloquer l'activité neuronale et de déclencher des processus d'homéostasie synaptique qui se traduisent par une augmentation de l'expression de surface des récepteurs AMPA. En utilisant ce protocole, Diering et collègues ont montré que l'augmentation de l'expression des récepteurs AMPA postsynaptiques requiert la phosphorylation du résidu S845 sans mettre en jeu la phosphorylation du résidu S831 (Diering et al., 2014). Ces résultats soulignent donc l'importance de la phosphorylation de la sérine 845 de la sous-unité GluA1 dans l'expression de surface du récepteur, en lien avec l'activité neuronale.

L'expression de la LTP fait donc appel à des processus modulant l'expression des récepteurs glutamatergiques, mais aussi leur activité. Suite à l'activation des récepteurs NMDA, cette expression de la LTP se traduit d'abord par une augmentation de l'activité des récepteurs AMPA, régulée par leur degré de phosphorylation, puis par un adressage de nouveaux récepteurs AMPA à la synapse. A plus long terme, on observe une synthèse de nouveaux récepteurs venant stabiliser l'augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique (Malenka & Bear, 2004).

b- La dépression à long terme : LTD

1- Généralités

Au même titre que la LTP, la LTD est un processus de plasticité synaptique. Elle s'oppose à la LTP du fait qu'elle induit non pas une potentialisation mais une dépression de la transmission synaptique. Ce mécanisme de plasticité est lui aussi impliqué dans l'apprentissage, en particulier dans les processus de flexibilité cognitive. Une étude menée par l'équipe de Kandel a montré l'implication de la LTD dans ces fonctions cognitives, à l'aide de souris transgéniques dont l'activité de la protéine kinase A, nécessaire à l'expression de la LTP dite tardive, est bloquée dans deux régions de l'hippocampe, le gyrus denté et la région CA1. Leurs capacités cognitives ont été analysées en piscine de Morris, et bien qu'elles soient caractérisées par des déficits de consolidation, les souris mutantes présentent une amélioration de leur performance en mémoire de travail. Ces souris présentent donc un déficit mnésique lié à une altération de la LTP, mais aussi une flexibilité cognitive avec l'amélioration de leur mémoire de travail qui résulte d'une facilitation de la LTD. Cette étude confirme donc l'implication de la LTP dans la mémoire à long terme, et révèle que la LTD est requise pour permettre l'acquisition de nouvelles informations et limiter le stockage des informations précédentes (Malleret et al., 2010). Elle confirme des travaux précédents qui ont mis en évidence une altération de la flexibilité cognitive chez des souris transgéniques présentant des altérations de la LTD (Nicholls et al., 2008). En d'autres termes, l'oubli serait nécessaire à l'acquisition de nouvelles informations.

2- Induction

La LTD est induite par une activation répétée de l'élément présynaptique à basse fréquence, qui correspond généralement des stimulations de 1 à 3 Hz pendant 5 à 15 minutes (Lüscher & Malenka, 2012). Comme le blocage du canal NMDA par l'ion magnésium n'est jamais complet, même au potentiel de repos (Jahr & Stevens, 1993), une faible quantité de calcium afflue donc au niveau de l'élément postsynaptique lors des stimulations à basse fréquence (Bloodgood et al., 2009). La LTD et la LTP sont donc caractérisées par un influx calcique d'ampleur différente, qui va déterminer si la transmission synaptique est potentialisée ou diminuée. Il est admis aujourd'hui qu'un faible influx calcique induit une LTD alors qu'un influx massif provoque l'induction d'une LTP (Malenka, 1994).

3- Expression

Comme la LTP, l'induction de la LTD requiert donc un influx calcique au travers du récepteur-canal NMDA. Néanmoins, cet influx calcique entraîne l'activation de phosphatases, sans mettre en jeu les kinases. L'activation de ces phosphatases provoque une déphosphorylation des récepteurs AMPA au niveau du résidu S845 qui contribue à diminuer leur activité et leur expression synaptique (Lee et al., 1998 ; Lee et al., 2000, Diering et al., 2014). De plus, la déphosphorylation sélective du résidu S845 dans un modèle de souris transgénique prévient l'induction de la LTD (Lee et al. 2010). La LTD se traduit donc par une diminution de l'activité et du nombre des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques (Malenka and Bear 2004).

c- Voies de signalisation mises en jeu

1- Principaux acteurs et concepts de bases

L'activation des récepteurs NMDA provoque un influx calcique, et selon l'intensité de cet influx l'insertion ou le retrait des récepteurs AMPA à la membrane, avec l'induction respective d'une LTP ou d'une LTD (Lüscher & Malenka, 2012). Comme je l'ai mentionné précédemment, ces processus font appel à un jeu de phosphorylation qui est modulé par l'activation de kinases et de phosphatases. Ces protéines vont directement modifier l'activité des récepteurs glutamatergiques, mais aussi déclencher des voies de signalisation et la

synthèse de nouvelles protéines nécessaires au maintien de la plasticité et au remodelage de l'architecture synaptique.

Pour la LTP, le fort influx calcique induit l'activation de la protéine kinase CaMKII, qui va à son tour phosphoryler les récepteurs AMPA sur leur résidu S831 et augmenter leur activité (Coultrap et al., 2014). Cette kinase faisant l'objet de notre étude, je développerai plus précisément son implication dans la régulation des processus de plasticité dans une prochaine partie qui lui est dédiée. Les kinases PKA et PKC sont elles aussi impliquées dans la modulation de la plasticité. Comme CaMKII, PKC phosphoryle la sous-unité GluA1 sur la sérine 831, et PKA est responsable de la phosphorylation de la sérine 845 (Roche et al. 1996, Lee et al., 2000). La PKC est impliquée dans le maintien de la LTP puisque son blocage par la polymyxine B perturbe la LTP tardive et non les phases initiales de la potentialisation (Colley et al., 1990). Mais les récepteurs AMPA ne sont pas les seuls récepteurs à être modifiés par l'activité des kinases. La famille des Src kinase module en effet l'activité des récepteurs NMDA en formant un complexe protéique aux densités postsynaptiques avec la partie C-terminale de ces récepteurs et la protéine d'échafaudage PSD95 (Ali & Salter, 2001). L'équipe de Mike Salter a révélé qu'un blocage de l'activité de la protéine Src par infusion intracellulaire d'un peptide inhibiteur prévient l'induction de la LTP dans la région CA1 de l'hippocampe de rat. Réciproquement, l'induction d'une LTP augmente l'activité de cette tyrosine kinase dans le neurone postsynaptique (Lu et al., 1998). Une récente étude menée sur des neurones humains développés à partir d'iPSC (*induced pluripotent stem cell*) a montré que l'activité de la tyrosine kinase Fyn est requise pour permettre l'activation des récepteurs NMDA exprimant la sous-unité GluN2B. En effet, l'utilisation de genistein, un inhibiteur général des tyrosines kinases, et celle d'un peptide bloquant ciblant Fyn, provoque une très forte diminution des courants NMDA de ces neurones humains (Zhang et al., 2016).

La LTD repose quant à elle sur l'activité de phosphatases stimulée par un faible influx calcique dans l'élément postsynaptique. Le modèle développé par Lisman en 1989 propose que la LTD dépendant des récepteurs NMDA implique les phosphatases PP1 et PP2B (calcineurine). Ce modèle est séduisant car la calcineurine possède une affinité forte pour le complexe calcium/calmoduline qui active à la fois la CaMKII et calcineurine. Ainsi, à faible concentration calcique, la calcineurine serait préférentiellement activée, bloquant la LTP par une déphosphorylation de la CaMKII, et permettrait l'induction de la LTD en réduisant la phosphorylation et l'activation des récepteurs AMPA. Inversement, la CaMKII serait sélectivement mise en jeu à des concentrations de calcium plus élevées, favorisant la LTP (Lisman, 1989). Cette hypothèse est aujourd'hui confirmée car une inhibition de ces

phosphatases bloque spécifiquement la LTD (Mulkey et al., 1994 ; Carroll et al., 2001). Mais la LTD implique aussi d'autres protéines comme la protéase caspase-3, connue pour son rôle clé comme protéine effectrice de la voie induisant l'apoptose. En effet, Li et collègues en 2010 ont démontré son rôle critique dans la LTD (Li et al., 2010). Calcineurine et caspase 3 étant au centre de notre étude, les mécanismes d'action de ces deux protéines seront développés dans des parties qui leur sont dédiées.

2- CAMKII

Généralités, fonctionnement et activation

La *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II*, ou CaMKII, est une sérine/thréonine kinase dont l'activité est régulée par le complexe calcium/calmoduline (CaM). Elle est impliquée dans de très nombreuses cascades de signalisation et est un médiateur essentiel des processus de plasticité synaptique, d'apprentissage et de mémorisation.

Toutes les isoformes de la CaMKII possèdent un domaine catalytique, un domaine auto-inhibiteur et un domaine d'association (Hudmon & Schulman, 2002). On distingue 4 isoformes, α β γ et δ , les formes α et β étant spécifiques et très fortement exprimées dans l'encéphale (Tobimatsu & Fujisawa, 1989). Du fait de sa très forte expression au niveau des synapses, CaMKII est le principal senseur de l'entrée de calcium, et son activation est nécessaire à la LTP (Giese et al., 1998).

Au niveau basal, CaMKII est inactive du fait de la présence de son domaine auto-inhibiteur. Ce domaine correspond à une séquence « pseudosubstrat » s'associant au domaine catalytique et bloquant la liaison des autres substrats. Le complexe Ca^{2+} /Calmoduline active la kinase suite à l'entrée de calcium dans la cellule. Ce processus passe par la dissociation du pseudosubstrat du domaine catalytique, permettant ainsi la liaison de la CaMKII à différentes protéines et la libération du domaine de liaison à l'ATP. Suite à son activation, la kinase subit un processus d'autophosphorylation sur son résidu thréonine 286 (Hudmon & Schulman, 2002). Cette autophosphorylation bloque la liaison du pseudosubstrat permettant ainsi à l'activité de la CaMKII de ne plus être influencée par sa liaison au complexe CaM. Cela permet à l'enzyme d'être active de manière autonome et indépendante de la concentration en calcium intracellulaire dont l'augmentation est très limitée dans le temps.

Une mutation de la thréonine 286 remplacée par l'asparagine permet de bloquer l'autophosphorylation de la CaMKII, sans pour autant inhiber son activité dépendant de la CaM (Giese et al., 1998). Il est important de noter que comme la phosphorylation de ce résidu 286 expose un site de liaison à la partie C-terminale des récepteurs NMDA, son blocage provoque une altération importante de la plasticité synaptique de type LTP (Giese et al., 1998).

Action sur les récepteurs glutamatergiques

La CaMKII est donc fortement impliquée dans les processus de plasticité synaptique. Elle possède un site de liaison aux sous-unités GluN2B des récepteurs NMDA, et cette interaction favorise sa stabilisation dans une conformation active (Bayer et al., 2001). Dans cette étude, l'équipe de Schulman a démontré que cette association bloque la CaMKII dans une conformation autonome par la suppression de son auto-inhibition. De plus, ils supposent que cette interaction favorise l'ancrage des récepteurs à la synapse par un phénomène d'agrégation due à la présence des domaines d'associations de la CaMKII.

La CaMKII agit aussi sur les récepteurs AMPA en stimulant leur conductance et leur insertion au niveau des synapses. En surexprimant les protéines GluA1 et CaMKII couplées à la GFP dans les neurones, Hayashi et collègues ont révélé qu'une stimulation de l'activité de CaMKII par un protocole de LTP entraîne une insertion des récepteurs AMPA au niveau des synapses (Hayashi et al., 2000). La conductance des récepteurs AMPA est également augmentée par l'activation de la CaMKII. Une approche similaire réalisée dans des cellules HEK a mis en évidence que cette augmentation de la conductance et de la réponse des récepteurs AMPA dépend de la phosphorylation des récepteurs sur leur résidu 831 par la CaMKII (Barria et al., 1997, Derkach et al., 1999).

L'implication de la CaMKII dans l'induction et l'expression de la LTP est aujourd'hui bien documentée. Le premier modèle développé a notamment permis de mettre en évidence qu'un blocage de l'autophosphorylation de la kinase inhibe la LTP dépendant des récepteurs NMDA au niveau de CA1. L'altération de cette LTP est accompagnée d'un déficit mnésique important chez des souris transgéniques dont les capacités sont évaluées en piscine de Morris (Giese et al., 1998). Inversement, l'injection de formes constitutivement actives de la CaMKII dans les neurones postsynaptiques induit une potentialisation des synapses, démontrant ainsi que cette kinase est à la fois nécessaire et suffisante pour induire et maintenir la LTP (Lisman et al., 2002). En résumé, l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA lors d'une LTP permet

d'activer la CaMKII et favorise son adressage aux synapses. Les complexes CaMKII-NMDAR-GluN2B ainsi formés vont prolonger l'activation de la kinase et permettre la phosphorylation des récepteurs AMPA et le recrutement de nouveaux récepteurs à la synapse.

Parallèlement, une étude récente a mis en évidence l'implication de cette kinase dans les processus de LTD. Sur tranches d'hippocampe, un blocage de l'activité de la CaMKII par l'inhibiteur tatCN21 provoque à une inhibition de la LTD. Son activité est donc également nécessaire à l'induction de la LTD. En effet, la LTD est inhibée chez des souris mutantes où l'activation autonome de la CaMKII est empêchée par le remplacement de la thréonine 286 par une asparagine. Enfin, la LTD provoque une phosphorylation des sous-unités GluA1 sur leur résidu sérine 567 qui dépend de l'activité de la CaMKII. Cette étude menée par l'équipe de Bayer a donc mis en évidence la dualité de la CaMKII, impliquée à la fois dans l'induction de la LTP et de la LTD, via différentes phosphorylations des récepteurs AMPA (Coultrap et al., 2014).

Réorganisation de l'architecture synaptique

A son état basal, la CaMKII est notamment associée aux filaments d'actines. Suite à l'entrée de calcium, son activation provoque son détachement et sa translocation au niveau de la densité postsynaptique ou PSD (Zhang et al., 2008). Une fois libérée, CaMKII active la kalirine 7, qui active à son tour la petite GTPase Rac 1 (Xie et al., 2007). Or, l'activation de Rac 1 induit l'inhibition de la cofiline, qui dépolymérise les filaments d'actine (Tashiro et al., 2000), pouvant ainsi favoriser leur polymérisation et donc l'élargissement des synapses. Cependant, l'inhibition de la CaMKII bloque le maintien, mais non l'initiation de l'élargissement des synapses observée après induction de la LTP (Matsuzaki et al., 2004). Ces observations ont été confirmées par une étude plus récente menée par les équipes de De Koninck et Lisman. En cultivant des neurones exprimant une forme mutée constitutivement active de la CaMKII, les auteurs ont démontré que cette mutation donne lieu à l'augmentation de la densité des synapses, mais aussi à un accroissement du volume des épines dendritiques (Pi et al., 2010). L'ensemble de ces études indiquent donc que la CaMKII est impliquée dans la réorganisation et la stabilisation de l'architecture des épines induite par les processus de plasticité. Ce rôle central de la CaMKII permet de coordonner la dynamique du cytosquelette des épines en lien avec l'activité synaptique, et de favoriser l'insertion des récepteurs et l'ancrage des différentes protéines d'échafaudage contenues dans la PSD.

3- Fyn

Généralités, fonctionnement et activation

La protéine kinase Fyn fait partie de la famille des Src kinases, et est composée de 4 domaines SH (*Src Homology*). Le domaine SH4 est impliqué dans l'ancrage de la protéine à la membrane cytoplasmique, et les domaines SH2 sont des domaines de liaison aux résidus tyrosines phosphorylés des autres protéines (Pawson et al., 2001). L'interaction de Fyn avec ses protéines partenaires dépend de son domaine SH3. Son domaine SH1 est quant à lui impliqué dans son activité kinase (Krämer-Albers & White, 2011).

L'activation de Fyn à la synapse dépend d'un équilibre fin entre les processus de phosphorylation et de déphosphorylation de certains de ses résidus, qui sont induits respectivement par des kinases et phosphatases. Sous sa forme inactive, la protéine est phosphorylée sur le résidu tyrosine 531 qui forme un pont avec son domaine SH2. De plus, le domaine SH3 forme également un pont avec une région proche du domaine SH2. Les deux sites de liaison aux partenaires sont alors masqués. Son activité est donc régulée négativement par la phosphorylation de ce résidu, notamment induite par la kinase Csk (Nada et al., 1993 ; Krämer-Albers & White, 2011). La phosphatase STEP est quant à elle impliquée dans la déphosphorylation de Fyn. Suite à cette déphosphorylation, la liaison au domaine SH2 est interrompue et libère ainsi la protéine dans une conformation active où les domaines SH2 et SH3 sont accessibles. Ce changement de conformation permet aussi l'autophosphorylation de la tyrosine 420 qui stabilise la kinase sous sa forme active (Figure 18, Nada et al., 1993).

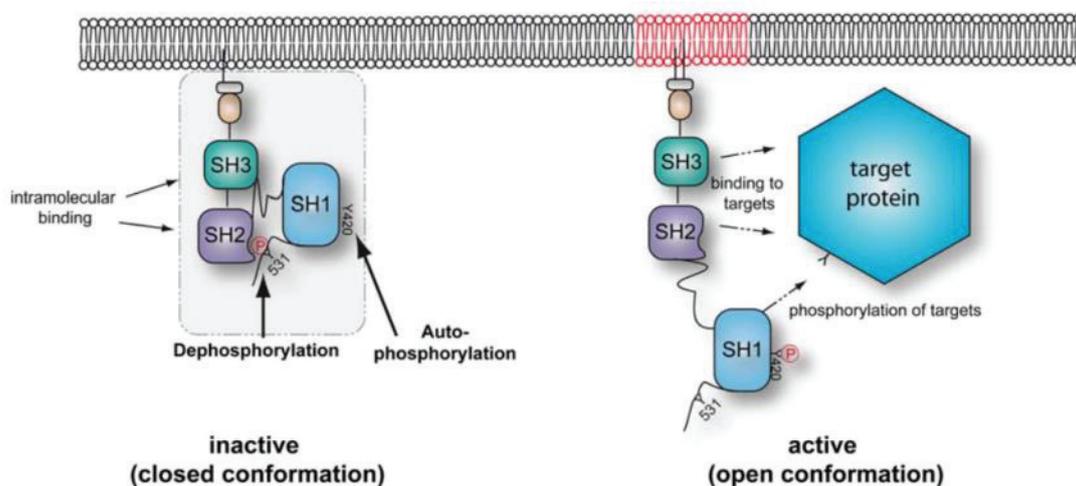


Figure 18 : changements de conformation impliqués dans l'activation de la protéine Fyn. D'après Krämer-Albers & White, 2011.

Le rôle de Fyn est bien documenté dans le système immunitaire, notamment au niveau des lymphocytes T. Mais cette kinase joue aussi un rôle clé dans le système nerveux central, en particulier dans la régulation de la plasticité synaptique, via son interaction avec les récepteurs glutamatergiques.

Action sur les récepteurs glutamatergiques

Comme nous l'avons vu précédemment, la fonction des récepteurs glutamatergiques est en partie régulée par leur phosphorylation. Lors de l'induction de la LTP dans l'hippocampe, l'activité des kinases de la famille des Src est augmentée et contribue à amplifier la réponse des récepteurs NMDA en stimulant leur phosphorylation. Réciproquement, leur blocage inhibe l'induction de cette forme de plasticité synaptique (Lu et al., 1998). En particulier, la kinase Fyn est impliquée dans la phosphorylation des sous-unités GluN2A et GluN2B de ces récepteurs. Ces récepteurs possèdent en effet plusieurs sites de phosphorylation, dont un site majeur est la tyrosine 1472 sur la sous-unité GluN2B. La phosphorylation de ce résidu est mise en jeu spécifiquement au cours d'une LTP hippocampique, et contribue à stabiliser les récepteurs à la membrane en limitant leur internalisation (Chen & Roche, 2007 ; Bhattacharyya et al., 2014 ; Luissier et al., 2015). L'équipe de Tadashi Yamamoto a analysé précisément l'implication de Fyn dans cette phosphorylation, en produisant une forme mutée de cette kinase qui maintient la protéine dans un état constitutivement actif. La mutation du résidu tyrosine 531 par la phénylalanine bloque sa phosphorylation et stabilise Fyn en forme active ouverte. En sur-exprimant la sous-unité GluN2B dans des cellules HEK avec ou sans cette forme mutée, les auteurs ont observé que le résidu 1472 de GluN2B est phosphorylé uniquement en présence de la forme active de la kinase (Nakazawa et al., 2001). Cette étude confirme des travaux plus anciens montrant que Fyn stimule la phosphorylation des sous-unités GluN2A et GluN2B des récepteurs NMDA synaptiques (Suzuki & Okumura-Noji, 1995), et que la LTP et les processus de consolidation mnésiques sont altérés chez des souris invalidées pour cette kinase (Grant et al., 1992). Cette déficience en Fyn provoque également une altération de la morphologie des épines dendritiques et un déficit du nombre de synapses chez les souris invalidées (Babus et al., 2011). En quelques mots, la kinase Fyn contrôle des aspects clés de la plasticité synaptique car son activation stimule la transmission et la plasticité synaptique alors que son inactivation bloque ces processus.

4- Calcineurine

Généralités, fonctionnement et activation

La calcineurine (CaN) est une sérine/thréonine phosphatase, également connue sous le nom de PP2B, formant un hétérodimère composé des deux sous-unités suivantes : la calcineurine A, sous-unité catalytique de 61 kDa, associée à une sous-unité régulatrice de 19 kDa, la calcineurine B (CalB). La Calcineurine A (CalA) lie la calmoduline et CalB correspond à la sous-unité se complexant au calcium (Rumi-Masante et al., 2012). Son activation dépend donc du complexe Ca^{2+} /calmoduline.

Lors de l'activation de la calcineurine, la calmoduline provoque son changement de conformation en se liant à sa sous unité régulatrice, libérant ainsi le site actif du domaine auto-inhibiteur (Rumi-Masante et al., 2012). L'activation de cette phosphatase provoque ensuite la translocation du facteur de transcription NFAT au niveau nucléaire.

L'activation de la calcineurine dépend de protéases telles que la calpaïne et les caspases. Lors de processus excitotoxiques ou ischémiques, la calcineurine A est directement clivée par la calpaïne (Wu et al., 2004 ; Shioda et al., 2006), mais ce clivage dépend de la présence de la calmoduline. Ce clivage produit un fragment de 48 kDa en présence de calmoduline et un fragment de 45 kDa, sans calmoduline. Cette dernière forme de 45 kDa ne comporte aucun domaine de liaison à la calmoduline, ni de domaine auto-inhibiteur. L'analyse de l'activité de ces différentes formes, par surexpression en cellules HEK, indique qu'elles correspondent à des formes constitutivement actives, fonctionnelles à des concentrations physiologiques en Ca^{2+} (Wu et al., 2004). La calpaïne convertit donc la calcineurine A en formes actives de 45 et 48 kDa par un clivage du domaine auto-inhibiteur. Paradoxalement, l'étude de Shioda suppose que cette activation de la calcineurine A retarde la mort neuronale lors d'événements ischémiques, alors que l'équipe de Wu suggère que ces formes clivées augmentent l'activité de la caspase-3 et la mort neuronale.

Il s'avère que les études portant sur l'interaction entre la calcineurine et la caspase-3 donnent lieu à des résultats contradictoires. Ainsi, la transduction par vecteur viral d'une forme constitutivement active de la calcineurine dans des neurones corticaux de rats augmente l'activité de la caspase-3 et l'apoptose, confirmant les résultats de l'équipe de Wu (Asai et al., 1999). Cependant, l'inhibition de la calcineurine peut produire des effets similaires. En effet, la cyclosporine A et le FK506, inhibiteurs couramment utilisés, provoquent l'activation de la caspase-3 et induisent la mort des neurones corticaux de rat (Takadera & Ohyashiki, 2007). De même, la surexpression de RCAN1, une protéine régulatrice connue pour son action

inhibitrice de la calcineurine, augmente l'activité des caspase-3 et -9 et provoque l'apoptose (Sun et al., 2011). Le lien entre la calcineurine et la caspase-3 est donc complexe à établir et l'existence d'une interaction directe reste à déterminer. Cependant, on peut noter que l'incubation *in vitro* de la caspase-3 avec la calcineurine entraîne un clivage de cette dernière et la formation de son fragment constitutivement actif de 45 kDa, suggérant que la caspase-3 active directement la calcineurine (Mukerjee et al., 2001).

L'activation de la calcineurine fait donc appel à de multiples processus impliquant le complexe Ca^{2+} /calmoduline, la calpaïne, mais aussi la caspase-3. Des facteurs de croissance comme le VEGF modulent aussi l'activité de cette phosphatase par une voie indirecte (Fig 19). Ainsi, dans les cellules endothéliales, le VEGF stimule l'expression de RCAN1 (Iizuka et al., 2004), par un processus dépendant de PKC (Yao & Duh, 2004). Une étude menée par Holmes et collègues a confirmé ces résultats par l'utilisation de siRNA dirigés contre la PKC dans des cellules endothéliales HDMECs. Par l'application d'inhibiteur de VEGFR2 (ZM323881), ils démontrent que la stimulation de l'expression de RCAN1 par le VEGF requiert l'activation de son récepteur (Holmes et al., 2010).

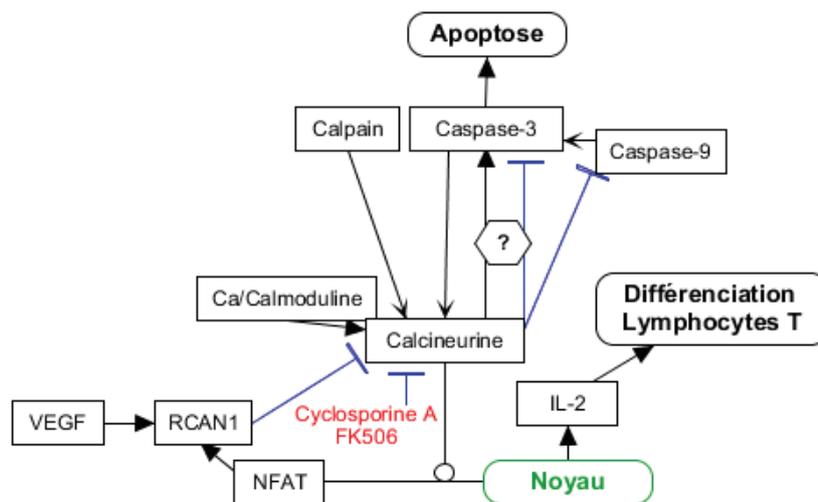


Figure 19 : Modulation de l'activité de la phosphatase calcineurine. Flèches : activation par clivage ; flèches pleines : stimulation ; tête plate : inhibition ; ligne : translocation.

Action sur les récepteurs glutamatergiques

La voie de signalisation CaN/NFAT est impliquée dans la régulation de plusieurs processus neuronaux car la calcineurine entraîne la déphosphorylation d'une grande variété de substrats dans différents compartiments cellulaires. Elle régule en particulier des sites de

phosphorylation clés sur les récepteurs AMPA qui contrôlent l'expression, l'ancrage, ou encore l'ouverture de ces canaux.

La calcineurine va en effet induire la déphosphorylation du résidu sérine 845 de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA et provoquer leur internalisation. Cette déphosphorylation intervient notamment après l'activation des récepteurs, et l'action de la calcineurine pourrait donc correspondre à un rétrocontrôle négatif de leur activité.

Ainsi, la calcineurine est impliquée dans la régulation de la plasticité synaptique homéostatique et contribue à compenser l'hyperactivité du réseau (Kim & Ziff, 2014). Comme nous l'avons évoqué précédemment (au paragraphe IV-a-3 page 64), l'application de tétradotoxine (TTX) bloque les canaux sodiques et donc les potentiels d'action, et déclenche un processus d'homéostasie synaptique. Cette diminution de la transmission synaptique aboutit alors à une augmentation de l'expression des récepteurs AMPA à la synapse. Une application de TTX sur des neurones corticaux de souris provoque la diminution de l'expression de la calcineurine et stabilise la phosphorylation du site S845 des récepteurs AMPA (Kim & Ziff, 2014). Ces résultats montrent donc que la calcineurine joue un rôle clé dans la régulation de la plasticité synaptique homéostatique, par son action de déphosphorylation des récepteurs AMPA.

Mais la calcineurine (CaN) n'agit pas uniquement sur les récepteurs AMPA, elle module aussi le fonctionnement des récepteurs NMDA en jouant sur leur désensibilisation. Ainsi, après une stimulation des récepteurs NMDA synaptiques, on observe une désensibilisation de ces récepteurs qui conduit à une diminution de l'influx calcique (Tong et al., 1995). Les auteurs n'ont pas mis en évidence d'interaction directe entre la CaN et les récepteurs NMDA. Néanmoins, par l'utilisation d'inhibiteur de la CaN, ils ont révélé que le processus de désensibilisation requiert l'action de la phosphatase. Il semble donc que la calcineurine soit impliquée dans la diminution de l'activité des récepteurs NMDA et exerce un rétrocontrôle négatif semblable à celui observé pour les récepteurs AMPA. Ces effets régulateurs de la CaN sont confirmés dans l'étude de Lieberman et Mody réalisée sur des cellules granulaires du gyrus denté (Lieberman & Mody, 1994). Par l'utilisation d'inhibiteurs de la CaN directement infusés dans la cellule en patch clamp sur cellule attachée (*cell attached recordings*), les auteurs ont montré que la calcineurine diminue le temps d'ouverture des canaux NMDA en contrôlant la phosphorylation de ces récepteurs. Cependant, les résultats concernant cette action de la calcineurine sur les récepteurs NMDA sont débattus. Ainsi, une étude électrophysiologique sur tranches d'hippocampe de rat a révélé qu'une inhibition de l'activité de la calcineurine peut diminuer les courants NMDA et être

responsable d'un blocage de l'induction de la LTP (Lu et al., 1996). Encore plus étonnant, ces auteurs n'observent aucun effet d'une inhibition de la CaN sur l'induction de la LTD.

Il faudra attendre les travaux de Rycroft et Gibb pour avoir une hypothèse quant aux effets paradoxaux de la CaN sur les récepteurs NMDA. En appliquant de la CaN ou de la calmoduline isolées à partir de cerveau de bœuf sur des tranches d'hippocampe de rat, les auteurs ont montré que la calmoduline et la CaN combinées réduisent le temps d'ouverture des canaux NMDA, mais l'effet observé est plus important lorsque seule la calmoduline est présente (réduction de 51% par rapport à une réduction de 21%) (Rycroft & Gibb, 2004). Ces deux protéines pourraient donc entrer en compétition et leur effet inhibiteur sur l'activité des récepteurs NMDA se réduire ou s'annuler potentiellement. L'ensemble de ces travaux conforte donc bien l'effet inhibiteur de la calcineurine sur la transmission synaptique impliquant les récepteurs NMDA. Plus récemment, la liaison de la calcineurine à la protéine d'échafaudage AKAP en complexe s'est révélée nécessaire à l'induction de la LTD dépendant des récepteurs NMDA (Jurado et al., 2010). De très nombreuses publications montrent donc que la calcineurine diminue l'activité des récepteurs AMPA et NMDA, impactant la LTP et stimulant la LTD (Lieberman & Mody, 1994 ; Tong et al., 1995 ; Lee et al., 2000 ; Krupp et al., 2002 ; Lee et al., 2003 ; Snyder et al., 2003 ; Jurado et al., 2010 ; Kim & Ziff, 2014). Il s'agit d'un partenaire clé de ces récepteurs à la synapse, impliquée dans la régulation homéostatique de leur activité et l'induction des différentes formes de plasticité.

5- Caspase 3

Généralités, fonctionnement et activation

La Caspase-3 est une protéase à cystéine très étudiée pour son rôle dans l'apoptose. Leurs précurseurs protéiques, les pro-caspases, sont inactives jusqu'à ce qu'elles subissent un processus protéolytique libérant deux sous-unités qui vont alors se dimériser pour former la protéine active. Ces caspases sont regroupées en trois groupes fonctionnels: les caspases inflammatoires, les caspases initiatrices représentées par les caspases 8, 9 et 10 impliquées dans le clivage et l'activation de la caspase-3, et les caspases effectrices, comprenant notamment caspase-3 (Lavrik et al., 2005).

Sous sa forme inactive, la pro-caspase 3 est une protéine de 32 kDa, qui lors de son activation protéolytique sera clivée en deux fragments de 17 et 12 kDa. Ces deux fragments vont alors s'associer par des liaisons hydrophobes et former des hétérodimères présentant des

feuilletés β . Ces dimères vont ensuite s'agréger via leurs feuilletés β pour former un hétérotétramère représentant la forme active de la protéine (Lavrik et al., 2005).

Au cours du processus apoptotique, la caspase-3 est activée selon deux voies de signalisation caractéristiques: les voies extrinsèque et intrinsèque (Salvesen, 2002 ; Lavrik et al., 2005). La voie extrinsèque repose sur l'induction de l'apoptose via des ligands extracellulaires tels que Fas ligand ou encore TNF α et leurs récepteurs de mort respectifs, alors que la voie intrinsèque dépend elle des mitochondries. Cette dernière voie peut être induite par les rayonnements UV, γ , ou encore par la perturbation de l'expression de certains facteurs de croissance. Son activation provoque la libération de cytochrome C de la mitochondrie qui stimule la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-3 via la caspase 9 (Jiang & Wang, 2000). Une fois activée, la caspase-3 induit le clivage de nombreux substrats au niveau de leurs résidus asparagine, comme certaines protéines du cytosquelette, altérant ainsi la structure même de la cellule et menant à sa mort programmée.

Fonctions neuronales de caspase 3

Au-delà de son implication dans l'apoptose, la protéase caspase-3 joue un rôle central dans le système nerveux. Elle intervient dans le développement du SNC et son activation est observée dès la formation du tube neural. Son action perdure jusqu'à l'âge adulte où elle est impliquée dans la plasticité synaptique (D'Amelio et al., 2012).

Lors du développement, la caspase-3 participe au remodelage du réseau neuronal. Chez les souris transgéniques déficientes en caspase-3, le phénotype est létal en raison du développement excessif de l'encéphale, pouvant aller jusqu'à la déformation de la boîte crânienne (Madden & Cotter, 2008). Ce développement anormal hypertrophique est attribué à l'altération des processus apoptotiques nécessaires au bon développement du cerveau. Néanmoins, les altérations observées chez les souris transgéniques invalidées varient selon le fond génétique de la souche de souris utilisée. Ainsi, l'invalidation de la protéase produit des effets d'une ampleur très différente chez les souris C56Bl6J et 129X1/Sv. Les souris 129X1/Sv meurt *in utero* avec une hypertrophie importante du cerveau, alors que les C56Bl6J atteignent l'âge adulte et sont fertiles (Leonard et al., 2002).

La caspase 3 est également impliquée dans la régulation de processus non-apoptotiques. Elle exerce en particulier un rôle clé dans certaines formes de plasticité synaptique. Comme nous l'avons vu précédemment, la LTD requiert une activation modérée des récepteurs NMDA, liée à une internalisation des récepteurs AMPA. Si la transmission

glutamatergique basale et la LTP, analysées sur tranches aiguës d'hippocampe, ne sont pas affectées par l'absence de la protéase, ce n'est pas le cas de la LTD. En effet, l'induction de la LTD est bloquée chez les souris déficientes en caspase-3 (Li et al., 2010). Des expériences complémentaires ont permis de mettre à jour les mécanismes qui sous-tendent cet effet de la caspase-3. Ainsi, l'analyse immunocytochimique sur cultures de neurones a révélé que les inhibiteurs de la caspase-3 bloquent l'internalisation des sous-unités GluA1 et GluA2 des récepteurs AMPA induite par une stimulation des récepteurs NMDA (Li et al., 2010). De plus, lors d'une induction de LTD, on observe une augmentation de l'activité de la protéase au niveau dendritique, indépendamment de toute mort neuronale (D'Amelio et al., 2012). La caspase-3 est donc requise dans les processus d'internalisation des récepteurs au glutamate nécessaires à l'établissement de la LTD.

6- Bilan sur les voies

La plasticité synaptique est un mécanisme essentiel aux processus d'apprentissage et de mémorisation, et nous venons de voir que sa régulation implique de nombreuses voies de signalisation aujourd'hui bien caractérisées. Ces voies visent à moduler la force de la transmission synaptique en régulant la conductance et l'insertion ou l'internalisation des récepteurs au glutamate à la synapse. Ces mécanismes de plasticité font aussi appel à des processus qui régulent la mobilité et la diffusion des récepteurs membranaires au sein des différentes régions composant l'élément postsynaptique (Dupuis et al., 2014). On observe enfin une réorganisation importante de l'architecture des épines dendritiques impliquant notamment le remodelage du cytosquelette.

d- Dynamique des épines dendritiques et implication dans la plasticité synaptique

1- Modulation du cytosquelette d'actine

Comme je l'ai décrit précédemment, les épines sont des entités motiles qui évoluent constamment au cours du développement et à l'âge adulte. Ce dynamisme est régulé par l'activité du réseau neuronal et permet l'adaptation du contenu en récepteurs des synapses en lien avec le changement de morphologie des épines et la modification de leur cytosquelette.

Les filaments d'actine sont l'un des principaux constituants du cytosquelette des épines dendritiques et sont retrouvés principalement au niveau de leur tête, juste sous la densité postsynaptique ou PSD (Landis & Reese, 1983). L'actine joue un rôle fondamental dans la stabilisation des protéines nécessaires à la transmission synaptique (Renner et al., 2009). De nombreux travaux ont en effet montré que la transmission médiée par les récepteurs au glutamate pouvait modifier la morphologie des épines dendritiques via une modulation de leur cytosquelette d'actine (Fischer et al., 2000; Okamoto et al., 2004). Suite à l'induction de la LTP, les filaments d'actine se réorganisent pour favoriser l'élargissement de la tête des épines dendritiques (Honkura et al., 2008). L'élargissement de l'épine est maintenu seulement si l'actine est isolée du reste de la dendrite par la présence d'un cou (Honkura et al., 2008), ce qui souligne l'importance de la morphologie de ces épines dans les processus de plasticité synaptique .

2- Corrélation entre la transmission et la morphologie des épines

La première observation de la formation d'une épine suite à une induction locale de la LTP a été réalisée par Engert & Bonhoeffer. En stimulant simultanément les réseaux pré- et postsynaptiques, ces auteurs ont mis en évidence l'apparition et les modifications de la morphologie des synapses présentes au niveau de la zone de stimulation (Engert & Bonhoeffer, 1999). Les études suivantes ont confirmé cette corrélation étroite entre la transmission synaptique et les variations de la taille des épines (Zhou et al., 2004 ; Kopec et al., 2006).

La taille de la tête des épines est en effet corrélée à la force de la transmission synaptique. Des analyses précises réalisées par microscopie électronique montrent la relation étroite qui existe entre la taille de la PSD (Harris et al., 1992), la taille de la tête et le nombre des récepteurs AMPA à la synapse (Baude et al., 1995). L'expression de la protéine d'échafaudage PSD-95, composant clé de la densité postsynaptique, est en effet essentielle à l'expression synaptique des récepteurs au glutamate (Hata, 1998 ; Chen et al., 2015). De plus, la stabilisation d'une synapse sous sa forme potentialisée requiert un élargissement de sa PSD (Meyer et al., 2014). La relation entre la largeur de la tête des épines et la force de leur réponse synaptique a aussi été mise en évidence par des techniques d'imagerie biphotonique couplées à la libération très locale de glutamate (*glutamate uncaging*). Ces derniers travaux révèlent que les épines les plus larges présentent des réponses synaptiques plus importantes que les épines plus fines (Matsuzaki et al., 2001 ; Kasai et al., 2003).

De nombreux travaux ont donc démontré que l'activité des synapses modifie leur structure et la morphologie des épines qui les portent (Maravall et al., 2004 ; Matsuzaki et al., 2004 ; Okamoto et al., 2004 ; Zhou et al., 2004), et réciproquement, leur morphologie peut déterminer et modifier leur fonction. Cette interdépendance entre structure et fonction des synapses permet d'expliquer pourquoi la population des épines fines est considérée comme la population la plus plastique. Ces épines sont en effet sujettes aux modifications morpho-fonctionnelles les plus importantes avec une forte propension à la potentialisation, c'est à dire à la transformation en épines larges et stables de type « mushroom ». Inversement, la déstabilisation des épines et leur perte induite par le peptide toxique β -amyloïde est un des facteurs majeurs contribuant aux premiers déficits fonctionnels des synapses à l'origine des symptômes mnésiques observés dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer.

V- La maladie d'Alzheimer, concepts de base

a- Généralités

La maladie d'Alzheimer (MA), découverte par Aloïs Alzheimer en 1906, est la forme de démence la plus courante chez les personnes âgées. Les patients atteints font face à une perte progressive de leurs capacités cognitives, et leur mémoire est affectée dès les stades les plus précoces de la maladie. Cette maladie neurodégénérative liée à l'âge est caractérisée initialement par une perte de synapses, puis par une mort neuronale menant à une importante atrophie cérébrale (Serrano-Pozo et al., 2011).

Elle se distingue par la présence de deux types de lésions neuropathologiques qui sont nécessaires au diagnostic : la présence de dépôts extracellulaires de peptides amyloïdes ou A β , qui s'agrègent progressivement dans le parenchyme en plaques insolubles, et l'accumulation de filaments insolubles de protéines Tau hyperphosphorylée dans les neurones. Ces lésions sont à l'origine des deux marqueurs histologiques de la maladie, respectivement les plaques séniles, ou plaques amyloïdes, et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF).

Seule la topographie des DNF est corrélée aux signes cliniques (Braak and Braak, 1991). En effet, à ce jour, aucune relation convaincante n'a été mise en évidence entre la progression des plaques amyloïdes et l'évolution des symptômes de la maladie. Cependant, les études menées cette dernière décennie montrent une importante toxicité des oligomères solubles d'A β (A β _o) (Cleary et al., 2005 ; Shankar et al., 2007). Les causes de la maladie d'Alzheimer ne sont néanmoins pas encore identifiées, bien que les cascades biologiques conduisant à la dégénérescence neuronale soient de mieux en mieux connues.

Certaines mutations autosomiques dominantes sont responsables du développement de la pathologie. On parle alors de « formes familiales » de la maladie d'Alzheimer (FAD), s'opposant aux « formes sporadiques ». Ces FAD ne représentent qu'un très faible pourcentage des patients atteints de la pathologie (de 1 à 2%), et sont caractérisées par un développement précoce de la maladie intervenant dans la grande majorité des cas avant 65 ans. Ces formes de la pathologie font donc partie des EOAD, *early-onset Alzheimer's disease*, et sont parfois dénommées eFAD. La grande majorité des cas de la MA appartient donc à la forme sporadique qui est une pathologie multifactorielle pour laquelle l'effet de l'âge, la prédisposition génétique et les facteurs environnementaux contribuent au développement de la

maladie. Des études d'association pan-génomiques (GWAS) ont en effet identifié des facteurs de risque génétiques de développement de cette forme sporadique qui correspondent à des variations génétiques sur plus de 20 gènes. Comme l'âge est le facteur de risque le plus important, les patients atteints sont classés en deux grands groupes selon l'âge d'apparition des symptômes cliniques. On distingue les EOAD qui apparaissent avant 65 ans des formes plus tardives « *late onset Alzheimer's disease* ou LOAD » (Cacace et al., 2016). Les cas d'EOAD représentent environ 10% des cas de MA (Cacace et al., 2016), avec 200 000 patients atteints aux USA. Néanmoins, cette distinction est relativement arbitraire car la maladie correspond plus à un continuum, c'est à dire à une gradation entre ces deux sous-classes.

b- Données épidémiologiques

1- Les formes sporadiques

Le risque de développer la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer augmente avec l'âge. En 2016, le nombre total de cas de démences à travers le monde est estimé à plus de 47 millions (World Alzheimer Report, 2016). Si l'on observe les précédentes études, ce nombre à presque doublé en moins de 10 ans ; 25 millions de personnes étaient atteintes de démences en 2009 (Qiu et al., 2009). D'après les différentes projections, ce nombre pourrait augmenter de manière exponentielle, doublant presque tous les 20 ans (World Alzheimer Report, 2015 et 2016). D'ici à 2050, ce seront plus de 130 millions de cas qui sont attendus avec une prévalence variant en fonction des pays. Cette forte augmentation de la prévalence de la MA témoigne de l'importance sociétale de cette maladie.

Environ 60% à 80% de ces démences sont attribuées à des cas de MA. Cependant, il n'existe pas d'estimation précise de la prévalence de la maladie car les critères de sélection et d'analyse utilisés, comme les marqueurs diagnostiques de la maladie, varient selon des études. Dans les pays développés, on estime que la prévalence de la maladie approche des 5% à 10% après 65 ans (Rizzi et al., 2014 ; Alzheimer's Association Report, 2018), avec d'importantes variations selon les populations. Cette prévalence croît rapidement avec l'âge pour atteindre plus de 30% après 85 ans. La prévalence de la maladie étant corrélée positivement avec le vieillissement de la population, une augmentation importante de cette prévalence est attendue dans les régions où une transition démographique est en cours, tels que la Chine, l'Inde ou l'Amérique Latine.

Une étude récente reposant sur une méta-analyse estime que la prévalence de la maladie en Europe est en moyenne d'environ 5% de la population âgée de plus de 65 ans, les femmes étant plus touchées que les hommes, avec respectivement 7,13% et 3,31% (Niu et al., 2017). Cette différence a fait l'objet de nombreux débats et plusieurs hypothèses ont été avancées, comme l'espérance de vie plus longue chez les femmes avec leur représentation plus élevée dans les groupes d'âge avancé, la différence de niveau d'éducation entre hommes et femmes chez la population âgée, ou encore la mort prématurée des hommes présentant le risque le plus élevé de développer la maladie en raison de maladies cardiovasculaires (Chêne et al., 2015). De nouvelles hypothèses ont émergé basées sur des interactions génétiques potentielles entre sexe et facteurs de risque, comme la présence de l'allèle APOE4. Ainsi, l'étude de Michael D. Greicius à Stanford, suggère que l'allèle APOE4 confère un risque plus élevé de conversion des stades de troubles cognitifs légers (MCI) à la maladie d'Alzheimer, chez les femmes que chez les hommes (Altmann et al., 2014, figure 20). Ceci pourrait suggérer que des mécanismes biologiques distincts, dus en partie à des interactions génétiques liées au sexe, augmenteraient le risque de développer la maladie chez les femmes. Cependant, l'influence du sexe sur l'évolution de la maladie pourrait être indirecte car les hommes et les femmes atteints présentent des tableaux cliniques différents ; les hommes sont plus sujets aux comportements agressifs, avec une comorbidité plus importante, alors que les femmes tendent à présenter plus de troubles affectifs (Mazure & Swendsen, 2016).

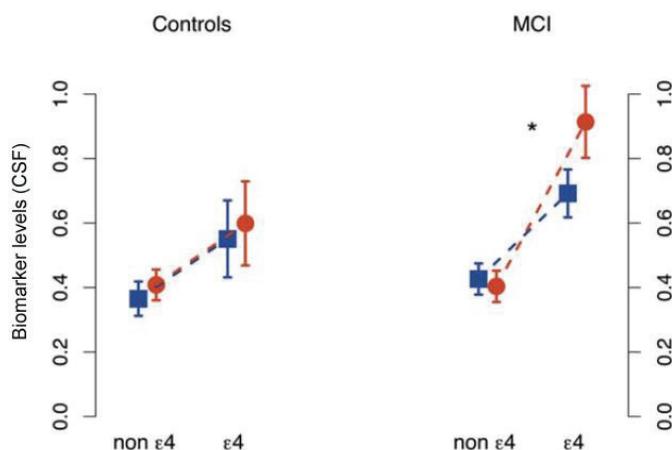


Figure 20 : le sexe influence l'effet de l'allèle APOE4 sur le niveau des biomarqueurs dans le LCR. L'allèle APOE4 est associé à une augmentation significative du niveau des biomarqueurs de la MA dans le LCR chez les patients MCI. Cet effet est particulièrement présent chez les femmes (d'après Altmann et al., 2014).

2- Les formes familiales

Les FAD sont une forme héréditaire de la maladie marquées par des symptômes qui apparaissent à un âge exceptionnellement jeune, pouvant débiter dès 30 ans. A ce jour, les mutations responsables des FAD concernent trois protéines impliquées dans la production de A β : l'APP, *amyloid precursor protein* ou protéine précurseur amyloïde, et les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2) (Piaceri et al., 2013). Les mutations de la PS1 et l'APP sont responsables de la majorité des FAD, alors que les mutations de PS2 sont plus rarement impliquées (Cacace et al., 2016 ; Bekris et al., 2010). Selon les études, la prévalence des FAD parmi les cas de MA serait comprise entre des valeurs < à 1% et 3% (Campion et al., 1999 ; Harvey et al., 2003 ; Bird, 2008 ; Bekris et al., 2010 ; Piaceri et al., 2013).

c- Les différentes phases de la maladie

Le diagnostic de la maladie s'axe principalement sur l'analyse des capacités cognitives des patients, mais aussi les rapports d'imagerie IRM. Les dosages de biomarqueurs dans le liquide céphalo-rachidien tendent à se développer. Le profil général de l'évolution de la maladie permet de distinguer quatre stades:

- Une phase préclinique (ou phase asymptomatique) au cours de laquelle les lésions cérébrales caractéristiques de la maladie progressent de manière silencieuse sans symptôme apparent. Cette phase peut durer plus d'une dizaine d'années, lors desquelles les biomarqueurs s'accumulent sans pour autant que les lésions soient observées (Jack et al., 2010, figure 21).
- Une phase pré-démentielle qui correspond au début de la phase symptomatique, pouvant durer de 2 à 4 ans. Les manifestations cliniques correspondent principalement à des troubles de la mémoire à court terme et de la mémoire épisodique.
- Une phase de démence modérée, où l'autonomie du patient est significativement altérée dans sa vie quotidienne. Les pertes de mémoire décrites précédemment s'aggravent et la mémoire des faits anciens commence à s'altérer. Une désorientation spatio-temporelle apparaît et des troubles aphaso-apraxo-agnosiques commencent à se développer. Ils sont caractérisés par des troubles du langage, des difficultés de coordination motrice et spatiale combinés à des déficits d'identification de personnes et d'objets. Il se produit également une atteinte des fonctions exécutives.

L'aggravation des troubles est le reflet de l'extension des lésions aux régions corticales associatives.

- Une phase de démence sévère, où l'institutionnalisation du patient est nécessaire du fait de sa perte d'autonomie complète. Cette phase est caractérisée par l'apparition de nouveaux troubles tels que l'apathie, une importante agitation ou encore des hallucinations. Apparaissent aussi d'autres signes neurologiques tels que des troubles de la marche, des myoclonies ou encore des crises d'épilepsie.

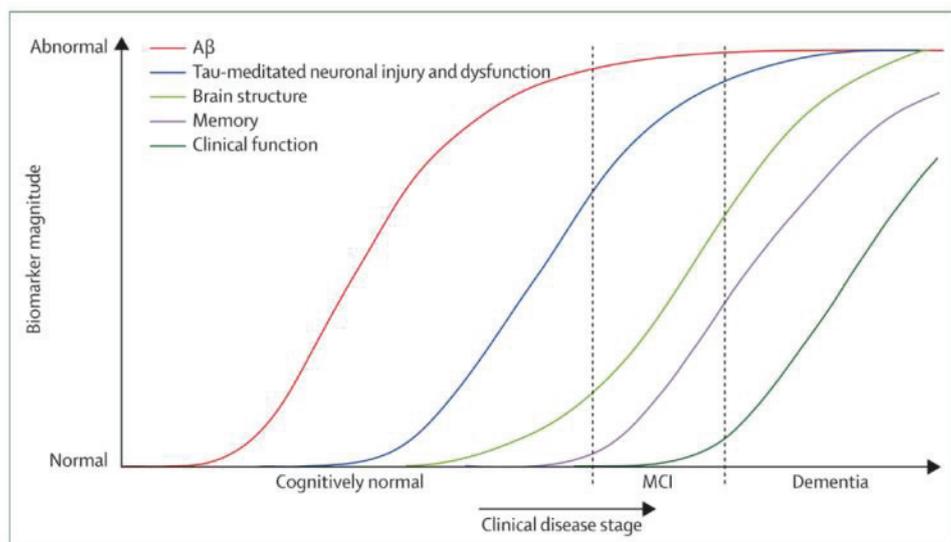


Figure 21 : dynamique de l'évolution des biomarqueurs et troubles cognitifs dans la maladie d'Alzheimer. La MA est caractérisée par une apparition d'altérations physiologiques très en amont de l'apparition des symptômes cognitifs. D'après Jack et al., 2010.

La phase pré-clinique est la période cruciale de développement du processus physiopathologique qui conduit à la généralisation des lésions cérébrales et à un dysfonctionnement semblant irréversible au moment de l'apparition des symptômes cliniques. Pour cette raison, de nombreuses études s'attachent actuellement à caractériser au mieux cette phase afin de pouvoir développer et adapter des traitements efficaces. Néanmoins, ces études se heurtent aux difficultés éthiques posées par un diagnostic pré-symptomatique car les traitements destinés à enrayer le développement de la MA ne sont pas disponibles.

d-Diagnostic de la pathologie

1- Clinique

En France, l'examen clinique de la pathologie repose principalement sur trois critères : les examens neuropsychologiques, l'imagerie et l'analyse de biomarqueurs. A l'heure actuelle ce sont principalement les deux premiers points qui sont utilisés pour le diagnostic, mais le dosage des biomarqueurs tend de plus en plus à se développer. A ce jour, il ne s'agit plus d'un diagnostic d'exclusion, mais d'un diagnostic de probabilité qui dépend de la mise en relation des éléments en faveur du diagnostic et de ceux en sa défaveur. La concordance des arguments est alors corrélée à la probabilité du diagnostic. Le diagnostic de certitude repose quant à lui sur un examen anatomopathologique post-mortem.

Il existe de nombreux examens neuropsychologiques visant à étudier les troubles cognitifs des patients. La spécificité des examens nécessaires au diagnostic diffèrent selon les pays. En France, d'après le Collège des Enseignants de Neurologie, la plainte mnésique est le premier symptôme conduisant à évoquer un trouble amnésique hippocampique caractéristique de maladie d'Alzheimer.

Il existe différents types de mémoires en relation avec des structures cérébrales spécifiques. De ce fait, l'altération d'une aire cérébrale aura des conséquences sur un type de mémoire spécifique. Par exemple, les démences fronto-temporales sont caractérisées par une désinhibition du patient, mettant en évidence des altérations des structures cérébrales frontales, notamment impliquées dans l'élaboration et la mémorisation des interdits sociétaux. Une lésion bilatérale des structures hippocampiques temporales chez le patient HM a quant à elle permis de mettre en évidence l'implication de l'hippocampe dans l'établissement de la mémoire à court terme. Le patient n'était en effet plus capable de créer le moindre souvenir mais se souvenait de sa vie passée. Au-delà de ces concepts de mémoire à court et long terme, on distingue aussi la mémoire épisodique, rassemblant les événements personnels vécus dans un contexte temporel et spatial, et la mémoire sémantique, qui stocke les mots, concepts et connaissances du monde. L'atteinte de cette dernière est en faveur d'une maladie dégénérative. Enfin, la mémoire de travail permet de stocker et de manipuler de petites quantités d'informations pendant un bref laps de temps. Elle est perturbée très tôt dans la MA.

Le test des cinq mots est un test de mémoire verbale sérielle consistant à restituer 5 mots après un délai de quelques minutes. Il permet d'évaluer la qualité de la restitution de l'information (ou du rappel) en présence ou non d'indices sémantiques. Ce test permet d'évaluer rapidement un trouble de la consolidation de la mémoire épisodique verbale. Les troubles mémoriels sont confirmés par un test de mémoire, type RI/RL 16, pouvant démontrer un effondrement des capacités de rappel. De nombreux autres tests sont aussi couramment utilisés pour caractériser au mieux les troubles cognitifs des patients et établir un diagnostic. Il s'agit par exemple du *Mini-Mental State Examination* (MMSE), testant la mémoire de travail, l'attention, la mémoire sémantique et la praxie (Folstein et al., 1975). Tout comme le MMSE, le *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA) analyse la mémoire de travail, l'attention, la mémoire sémantique, mais aussi la mémoire épisodique et visuospatiale (Nasreddine et al., 2005). Enfin, l'ADAS, *Alzheimer's Disease Assessment Scale* (Rosen et al., 1984), est couramment utilisé dans les études américaines comme celle réalisée sur le Solanezumab, un traitement infructueux de la maladie d'Alzheimer basé sur l'utilisation d'anticorps ciblant le peptide bêta amyloïde (Doody et al., 2014).

Mais le diagnostic de MA ne repose pas uniquement sur les tests neuropsychologiques. En France, la pratique d'une imagerie cérébrale par résonance magnétique (IRM) permet d'évaluer la présence d'une atrophie hippocampique et d'un amincissement des régions corticales considérées comme vulnérables dans la maladie. Il s'agit d'une véritable signature des changements structurels du cerveau au cours de la maladie. D'autres techniques d'imagerie sont également utilisées, telle que la tomographie par émission de positons (TEP) permettant de mettre en évidence un hypométabolisme cérébral de la consommation du glucose. Ces dernières années, le développement des traceurs radioactifs type Pittsburg Compound B, ciblant spécifiquement les lésions amyloïdes, permet de mieux analyser la charge amyloïde, c'est à dire l'accumulation du peptide bêta-amyloïde (A β) en dépôts amyloïdes. En pratique clinique, lorsque le patient émet une plainte mnésique, les éléments essentiels au diagnostic requièrent une évaluation neuropsychologique, une IRM cérébrale, l'examen du métabolisme et de la charge amyloïde cérébrale par TEP et TEP amyloïde, mais aussi un bilan biologique plasmatique. Le bilan plasmatique permet de déterminer la présence de biomarqueurs de la MA dans le liquide céphalorachidien (LCR). Ces dosages de protéines clés dans le LCR sont des examens délicats réservés aux diagnostics difficiles à établir. La littérature s'accorde à considérer qu'une diminution des protéines β -amyloïdes (A β ₁₋₄₂) couplée à l'augmentation de la protéine Tau hyperphosphorylées (pTau)

correspond à un diagnostic de MA de forte probabilité (Motter et al., 1995 ; Formichi et al., 2006 ; Anoop et al., 2010). Plus rarement utilisés dans le cadre de diagnostic, ces dosages sont réalisés couramment lors des essais cliniques.

2- Anatomopathologie

La MA est caractérisée par la présence de deux lésions anatomopathologiques : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Le diagnostic de certitude, effectué post-mortem, repose sur la présence de ces deux types de lésions. Les plaques séniles sont composées principalement d'agrégats insolubles de peptides β -amyloïdes, et les DNF correspondent à une agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée dans les neurones.

Les plaques séniles

Les plaques séniles correspondent à des dépôts extracellulaires de peptides β -amyloïdes ($A\beta$) au niveau de la matière grise du cerveau. En condition physiologique le métabolisme de l' $A\beta$ ne provoque pas d'accumulation de peptide, mais au cours du vieillissement, on note une apparition de dépôts d' $A\beta$ dans le parenchyme cérébral et les vaisseaux (Hardy & Allsop, 1991 ; Funato et al., 1998 ; Vehmas et al., 2003). L' $A\beta$ est issu du clivage enzymatique d'une glycoprotéine transmembranaire, la protéine précurseur amyloïde « *Amyloid precursor protein* ou APP », qui implique successivement la β sécrétase et le complexe de la γ -sécrétase. Les étapes et les acteurs de ce clivage amyloïdogénique seront détaillés ultérieurement dans le paragraphe. On considère classiquement que les monomères d' $A\beta$ issus de ce clivage s'assemblent en oligomères, qui formeront à leur tour des protofibrilles. Ces protofibrilles insolubles s'agencent alors en fibrilles, principal constituant des plaques séniles. L'abondance de feuillet β dans ces plaques permet leur identification à l'aide de marquages type Congo red ou Thioflavine S. Néanmoins, il existe des plaques dites « diffuses », qui ne sont pas mises en évidence par les marqueurs précédents (Hardy & Allsop, 1991). On distingue en effet deux sous-types de plaques séniles appelés « *dense-core plaques* », ou plaques à cœur dense, et les plaques diffuses.

Les plaques à cœur dense correspondent à des dépôts amyloïdes fibrillaires compacts et sphériques, et sont typiquement entourées par des microglies activées et des neurites dystrophiques (Fig 22, Vehmas et al., 2003 ; Serrano-Pozzo et al., 2011).

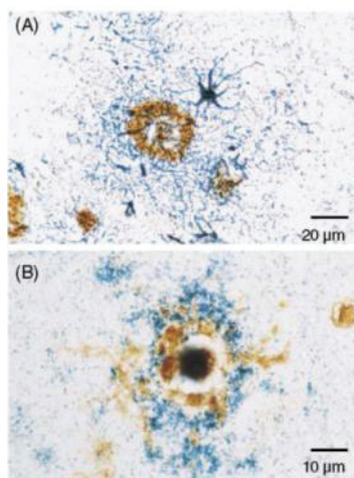


Fig 22 : réaction gliale au niveau des plaques séniles.

(A) Plaque sénile à cœur dense (brun), entourée par un astrocyte réactif (bleu). (B) Microglies activées (brun) présentes au centre d'une plaque à cœur dense (bleue). D'après Vehmas et al., 2003

Les neurites dystrophiques sont des processus neuronaux anormaux caractérisés par une expansion dystrophique et une accumulation d'organelles et de protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette. Ces neurites contiennent notamment des PHFs, « *paired helical filaments* », composant principal des dégénérescences neurofibrillaires. Elles sont aussi caractérisées par une accumulation de β -secrétase, pouvant potentiellement augmenter la production de peptides $A\beta$ (Sadleir et al., 2016). Les plaques à cœur dense sont associées à une perte importante de synapses et à une dégénérescence neuronale (Masliah et al., 1990 ; Urbanc et al., 2002).

Les plaques diffuses correspondent aussi à des dépôts amyloïdes mais ne sont pas marquées au Congo red ou à la Thioflavine S (Fig 23). Elles ne sont généralement pas associées aux neurites dystrophiques et à la réponse microgliale (Serrano-Pozzo et al., 2011). Ces plaques ne sont pas nécessairement prises en compte lors du diagnostic puisqu'elles sont aussi retrouvées chez les sujets âgés ne présentant pas la maladie.

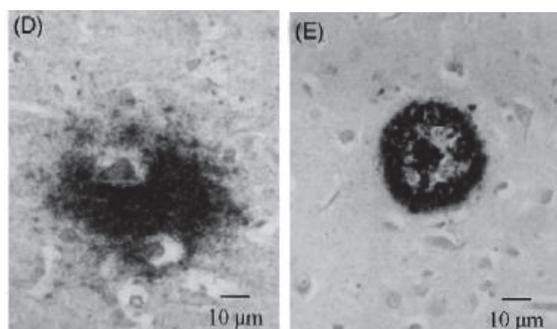


Figure 23 : marquage $A\beta$ au niveau du néocortex humain.

(D) Plaque diffuse présente chez un sujet âgé non dément. (E) Plaque à cœur dense présente chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. D'après Vehmas et al., 2003.

Les plaques séniles s'accumulent principalement dans le néocortex mais leur progression spatiale ne suit pas l'évolution des symptômes de la maladie. Cette absence de corrélation a suggéré que ces dépôts insolubles ne constituent pas les espèces les plus toxiques d' $A\beta$ (Sengupta et al., 2016). Thal et al. ont proposé une progression de ces lésions amyloïdes

en 5 stades. Le premier stade est caractérisé par une atteinte du néocortex. Lors du second stade, les plaques commencent à apparaître au niveau du cortex entorhinal, de l'hippocampe, ou encore de l'amygdale. Le stade 3 correspond à l'atteinte des noyaux sous-corticaux et de la matière blanche. Le quatrième stade implique les structures du tronc cérébral, avec notamment une atteinte de la substantia nigra, du colliculus supérieur et du noyau rouge. Le dernier stade correspond aux atteintes du pont, des noyaux du raphé, de la formation réticulaire et du locus coeruleus, ainsi que de la couche moléculaire du cervelet (Figure 24, Thal et al., 2002).

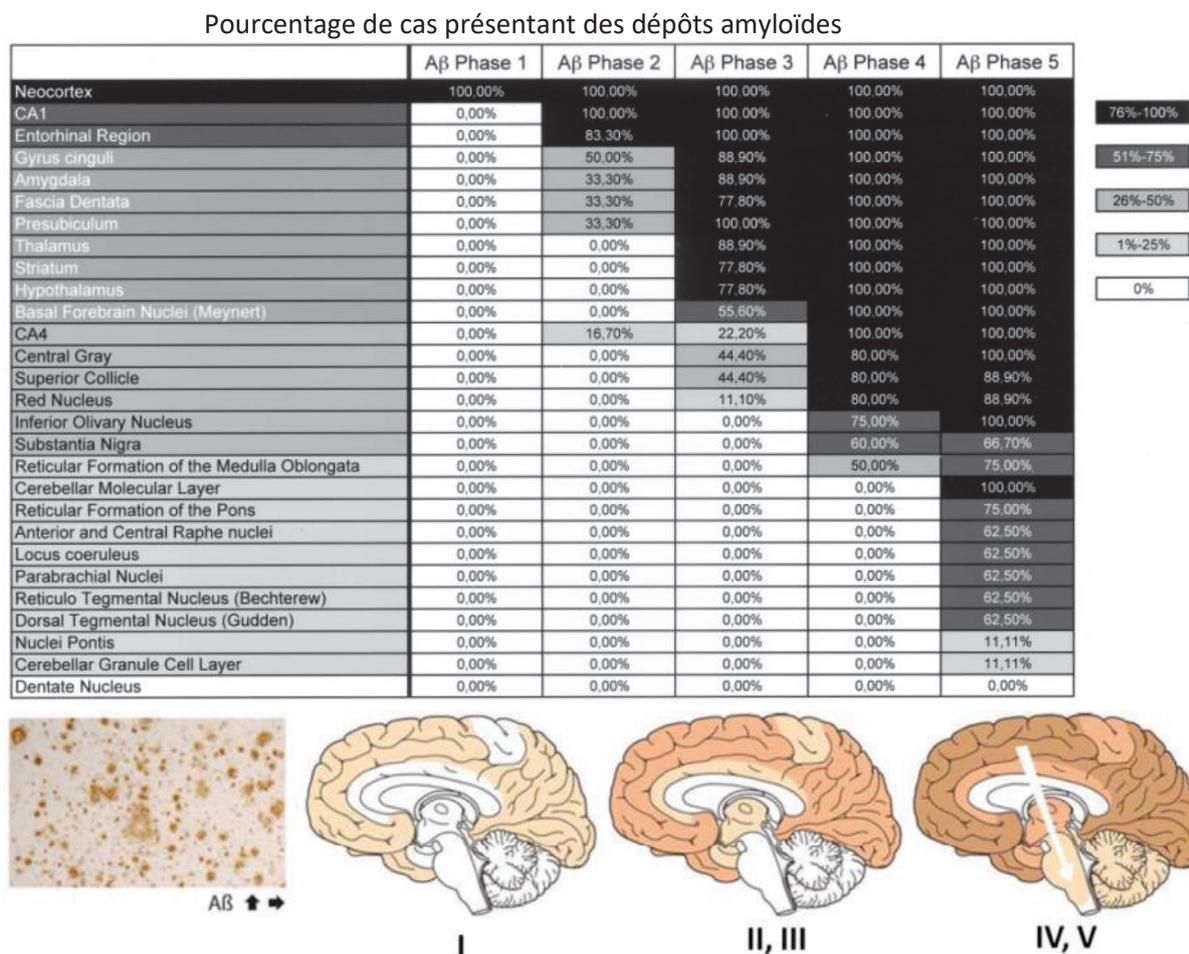


Figure 24 : évolution des lésions amyloïdes en fonction des structures cérébrales et des stades de la MA. D'après Thal et al., 2002 et Jouanne et al., 2017.

Bien que les plaques séniles soient bien décrites dans la pathologie, il est important de rappeler que les dépôts amyloïdes ne corrèlent pas avec la sévérité ou la durée de la démence. En revanche, la perte synaptique, l'évolution des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) ou encore la gliose réactionnelle sont des paramètres qui suivent la progression et l'aggravation des symptômes (Giannakopoulos et al., 2003 ; Ingelsson et al., 2004).

Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires, ou « DNF », sont des agrégats de protéines Tau hyperphosphorylées dans les neurones. Lors du diagnostic, elles sont reconnues comme l'un des premiers marqueurs de la pathologie.

La protéine Tau est une protéine MAP, pour *microtubule-associated protein*, régulatrice de la polymérisation des microtubules. L'activité de la protéine est régulée par de nombreux sites de phosphorylation qui modulent son affinité et son interaction avec les microtubules. Une hyperphosphorylation de Tau aboutit à un détachement des microtubules et à son agrégation en structures fibrillaires appelées PHFs, *paired helical filaments*. Ces PHFs sont le principal constituant des DNF et on distingue trois stades évolutifs selon leur densité, estimée par un immunomarquage anti-Tau, et la dégénérescence associée (Fig 25, Bancher et al., 1989).

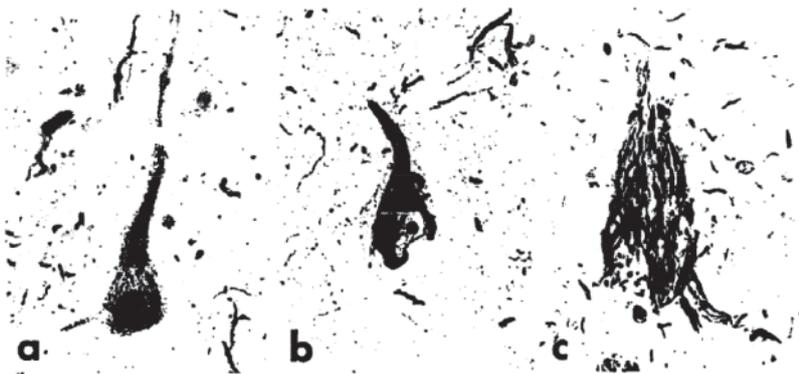


Fig 25 : dégénérescences neurofibrillaires à différents stades de maturation. (a) Stade 1, on note la présence de quelques rares inclusions allongées. (b) Stade 2, représentant classiquement la dégénérescence neurofibrillaire observée dans la

pathologie d'Alzheimer. Les PHFs sont agrégées de manière compacte dans l'entière du cytoplasme. (c) Stade 3, DNF dite « fantôme », le neurone a dégénéré et les filaments se retrouvent dans le neuropile. D'après Bancher et al., 1989.

Les DNFs présentent une distribution spatiale caractéristique qui évolue en fonction de la progression de la maladie et permet de distinguer 6 stades différents (Braak & Braak, 1991). L'ensemble des régions cérébrales altérées à chaque stade est représenté dans le tableau 2.

Location	Stage: I	II	III	IV	V	VI
Cortical areas:						
Fascia dentata	0	0	0	0	0-i	+--+
CA4: Non-pyramidal cells	0	0	0	i+	+--+	+++g
CA4/CA3: Pyramidal cells	0	0	0	0	i+	+--+
CA1: Pyramidal cells	0	i+	+--+	++	+++	+++g
Subiculum	0	0	0	i	+	+--+
Presubiculum	0	0	0	0	0-i	+
Para-/Transsubiculum	0	0	0	0-i	+	++
Entorhinal-Pre- α	0-i	+	++	+++	+++g	+++g
Entorhinal-Pri- α	0	i	+	+--+	++	+++g
Entorhinal-Pre- β	0	0	i	+	+--+	++
Transentorhinal Pre- α	i+	+--+	++	+++g	+++g	+++g
Isocortex:						
Association areas	0	0	i	+	+++	+++
Parastriate area	0	0	0-i	i+	+	++
Striate area	0	0	0	0-i	i+	+
Subcortical nuclei:						
Striatum	0	0	i	i+	+	++
Basal magnocellular complex	0	i	+	+--+	++	+++g
Amygdala	0	i	+	++	+++	+++g
Clastrum	0	0	0	i	+	++
Thalamus:						
Antero-dorsal nucleus	i	i+	+--+	++	+++g	+++g
Reuniens nucleus	0	0	i	+	++	+++
Reticular nucleus	0	0	0	i	+	++
Hypothalamus:						
Tuberomamillary nucleus	0	0	i	+	++	+++
Lateral tuberal nucleus	0	0	0	0	i	+
Pars compacta of substantia nigra	0	0	0	0	i	+--+

Tableau 2 : stades caractéristiques de l'accumulation des dégénérescences neurofibrillaires. 0 : pas de DNF. (i) : quelques DNF isolées. (+), (++) , (+++) : faible, moyenne ou importante quantité de DNFs. (g) : DNFs fantômes. D'après Braak et Braak, 1991.

Ces dernières années, le développement de traceurs spécifiques a permis d'analyser plus finement l'évolution des DNFs par TEP, chez des patients atteints de la pathologie, et de comparer leur progression à celle des lésions amyloïdes. Ces études démontrent clairement que les DNFs peuvent être utilisées comme biomarqueur et qu'elles prédisent le déclin cognitif à venir contrairement aux plaques séniles (Johnson et al., 2016; Ossenkoppele et al., 2016). Cependant, même si l'organisation spatiale des DNFs est positivement corrélée à la sévérité de la maladie, il s'avère que ces lésions ne semblent pas directement responsables de la dégénérescence neuronale. En effet, l'équipe d'Halliday a démontré en quantifiant le nombre de neurones en fonction du nombre des DNFs, que ces altérations permettent seulement d'expliquer une faible proportion de la perte neuronale dans la région CA1 de l'hippocampe (Kril et al., 2002).

Les plaques séniles, propice au développement des DNF ?

Les plaques séniles et les agrégats de protéines Tau composant les DNF apparaissent à différents temps, dans différentes régions. L'interaction entre ces deux types de lésions est restée longtemps hypothétique, mais une étude récente menée par l'équipe de Virginia Lee suppose que les plaques séniles pourraient déclencher la formation d'agrégats Tau spécifiques. Chez les souris transgéniques présentant des mutations de l'APP humaine sans surexpression associée, la présence de dépôts amyloïdes accélère la formation et la propagation des lésions Tau associées aux plaques après injection intracérébrale de protéine Tau dérivée de patients Alzheimer (He et al., 2018). Plus étonnant, les souris triples transgéniques mutées sur les formes humaines de l'APP, la PS1 et Tau présentent une augmentation des agrégats de Tau très précoce, avant même l'apparition des plaques, par rapport aux souris mutées seulement sur Tau (Bennett et al., 2017). Cette dernière étude confirme l'existence d'un lien de causalité entre ces deux types de lésions (Pooler et al., 2015), et renforce l'hypothèse d'une implication des oligomères solubles d'A β (A β o) à l'origine des altérations de Tau. Si la toxicité des A β o solubles est aujourd'hui clairement admise dans la communauté scientifique, la toxicité directe des formes insolubles que sont les plaques séniles fait toujours l'objet de débats.

Toxicité des plaques ?

La toxicité des plaques est remise en question, au regard du nombre croissant d'études mettant en évidence la toxicité des oligomères solubles (Cheng et al., 2007). L'étude récente menée par l'équipe de Sylvain Lesné sur des modèles transgéniques de la maladie (APP), avec surexpression associée de l' α -synucléine humaine (α Syn), révèle que les troubles cognitifs des souris augmentent alors que le nombre de leurs plaques diminue. Inversement lorsque le gène codant pour l' α -synucléine est invalidé chez ces souris transgéniques, les troubles cognitifs diminuent mais le nombre de plaques augmente (Khan et al., 2018). L' α -synucléine, abondante au niveau des synapses, est une protéine pouvant former des fibrilles insolubles retrouvées dans certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la démence à corps de Lewy. Il s'avère que les agrégats de cette protéine sont aussi retrouvés dans la maladie d'Alzheimer et sont négativement corrélés aux déficits cognitifs (Larson et al., 2017). Il est important de noter que la surexpression de l' α Synucléine (α Syn) chez les souris APP induit une augmentation des A β o solubles (Khan et al., 2018).

clivage libère un fragment peptide N-terminal α soluble, sAPP α , au niveau extracellulaire. Le fragment transmembranaire restant, nommé CTF α , est alors clivé par le complexe de la γ -sécrétase, libérant ainsi les peptides p3 et AICD (Haass et al., 2012). Le fragment sAPP α possède des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices, et stimule notamment la croissance axonale (Chasseigneaux & Allinquant, 2012). Le peptide p3 peut quant à lui s'agréger sous forme fibrillaire car ses propriétés hydrophobes l'empêchent de conserver une forme oligomérique. Cette incapacité à conserver une forme oligomérique soluble pourrait expliquer l'absence d'impact du peptide p3 sur la fonction synaptique (Dulin et al., 2008). Enfin, le peptide AICD est libéré dans le cytosol et semble être impliqué dans la régulation de la transcription en formant un complexe nucléaire avec la protéine Fe65 et l'histone acétyltransférase Tip60 (Cao & Sudhof 2001; von Rotz et al., 2004, Konietzko, 2012).

Voie amyloïdogénique

Les monomères d'A β sont eux générés par la voie amyloïdogénique. Ils résultent du clivage séquentiel par la β - et γ -sécrétase. L'activité de la β -sécrétase produit un fragment N-terminal β soluble (sAPP β), qui est libéré dans le milieu extracellulaire, et un fragment C-terminal membranaire (β CTF ou C99). Ce clivage « β » se produit dans les endosomes où le pH est plus acide. Le fragment β CTF est ensuite clivé par la γ -sécrétase, dans l'environnement hydrophobe du compartiment membranaire de l'endosome. On parle alors de clivage « RIP » ou « *Regulated Intramembrane Proteolysis* » (Haass et al., 2012). Suite à ce clivage, l'A β est libéré et retrouvé dans les fluides extracellulaires tels que le plasma ou le LCR (Seubert et al., 1992). Le fragment AICD est lui aussi issu de ce clivage, et est donc synthétisé à la fois par la voie amyloïdogénique et la voie non amyloïdogénique.

Le clivage par la γ -sécrétase peut être imprécis ; il en résulte une hétérogénéité des sites de clivages C-terminaux qui aboutit à la génération d'un grand nombre de peptides A β différents. Les A β ₄₀, clivés au niveau de la position 40, sont les formes les plus abondantes (80 à 90%). Les clivages au niveau de l'acide aminé 42 génèrent l'A β ₄₂ (5-10%), seconde forme la plus abondante (Murphy & LeVine, 2010). L'A β ₄₂ est la forme la plus hydrophobe et fibrillogène qui conduit à la formation des agrégats insolubles, principal composant des dépôts intracérébraux (Selkoe et al., 2001). De très nombreuses études ont mis en évidence la toxicité supérieure du peptide A β ₄₂ par rapport à l'A β ₄₀ (Podlisny et al., 1992 ; Younkin, 1995 ; Dahlgren et al., 2002). La toxicité des fragments issus du clivage β - de l'APP varie donc selon les peptides, et l'A β ₄₂ est aujourd'hui reconnu comme le principal peptide toxique

dans la maladie. Mais ces peptides sont à l'origine de très nombreuses études, qui mettent en évidence chaque année l'existence de nouveaux fragments issus de l'APP.

Récemment, l'effort de recherche pour la compréhension des différents mécanismes de clivages a aussi permis de mettre en évidence l'implication d'autres protéines impliquées dans le clivage et la génération d'A β . Les travaux de K. Baranger ont notamment démontré qu'un blocage de la métalloprotéase MT5-MMP réduisait fortement les niveaux de peptides A β (Baranger et al., 2016). En croisant des souris 5xFAD avec des souris MT5-MMP^{-/-}, les auteurs ont observés une diminution des niveaux d'A β et de C99 dès 4 mois. Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'étude de la synthèse des peptides A β afin de permettre la mise au point de thérapies modulant leur production et toxicité.

L'η-sécrétase

A ce jour, la compréhension de la voie amyloïdogénique a stimulé la genèse de nombreux travaux et l'étude des A β a notamment dominé la recherche sur la maladie d'Alzheimer. Mais de nombreuses études s'intéressent également au rôle d'autres fragments dérivés de l'APP. En particulier, les études menées par Christian Haass détaillent une nouvelle voie métabolique de l'APP générant un nouveau fragment à la toxicité importante. Ce nouveau clivage, appelé clivage « eta » (η), coupe l'APP dans sa partie N-terminale, à distance du site de clivage de la β -sécrétase. Il produit des fragments d'environ 92 à 108 acides-aminés qui se terminent respectivement aux sites de la β - ou de l' α -sécrétase (figure 27, Willem et al., 2015).

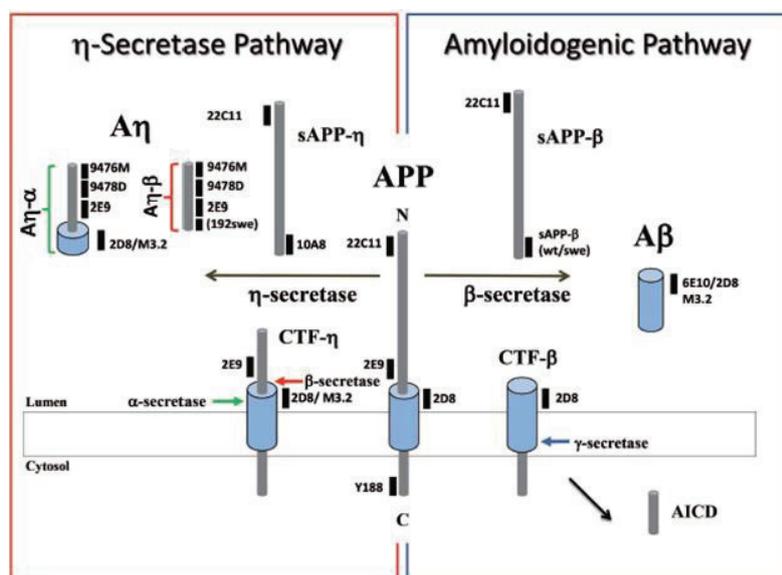


Figure 27 : fragments de l'APP générés par l' α -, la β - et l' η -sécrétase. D'après Willem et al., 2015.

L'A η - α , qui est le fragment le plus long produit par le clivage « η », possède une toxicité synaptique importante. Appliqué sur tranches *ex vivo*, ce peptide altère fortement la LTP hippocampique. Par une approche bi-photonique sur souris anesthésiées, l'équipe a mis aussi en évidence une réduction des courants calciques au niveau de la région CA1 de l'hippocampe reflétant la perturbation de l'activité neuronale. De manière intéressante, ce peptide A η - α semble s'accumuler au niveau des neurites dystrophiques alors qu'il n'est pas retrouvé au niveau des plaques séniles. Enfin, une inhibition de la β -sécrétase *in vitro* aboutit à l'augmentation des taux de ce peptide. Ce dernier point pourrait s'avérer problématique pour les traitements potentiels faisant appel à des inhibiteurs de la β -sécrétase (Willem et al., 2015).

2- Trafficking de l'APP

L'APP connaît un important trafic entre les différents compartiments cellulaires. Seulement une faible partie des protéines synthétisées atteint la membrane (environ 10% dans les cultures sur-exprimant la protéine), la majorité restant au niveau de l'appareil de Golgi. Une fois exprimée à la surface, la protéine est rapidement internalisée puis transportée au niveau des endosomes, où elle pourra être clivée selon la voie amyloïdogénique (LaFerla et al., 2007 ; Haass et al., 2012). La séquence d'acides aminés YENPTY semble particulièrement importante pour l'internalisation de l'APP. En mutant spécifiquement les résidus tyrosines de ce motif YENPTY de l'APP dans des cellules CHO, l'équipe d'Edward Koo a mis en évidence que cette mutation aboutissait à une diminution importante de l'internalisation de l'APP et de la production d'A β (Perez et al., 1999).

Par des approches immunohistochimiques, Grundke-Iqbal et collègues ont été les premiers à démontrer l'accumulation d'A β au niveau intracellulaire chez l'Homme (Grundke-Iqbal et al., 1989). Il est important de noter que cette forme d'A β est fréquemment retrouvée au niveau des DNF. Certains chercheurs émettent aujourd'hui l'hypothèse que cet A β intracellulaire pourrait correspondre à l'initiation de la formation des plaques puisque son expression diminue à mesure que les plaques se forment chez les souris triples transgéniques, 3xTg (Oddo et al., 2006). La toxicité de ces formes d'A β intracellulaire a aussi été démontrée. En effet, l'oxydation de la méthionine en position 35 empêche l'A β de traverser la membrane cellulaire, et lorsque ces variants sont appliqués via des pipettes de patch dans les neurones de la région CA1 de l'hippocampe, la LTP et la transmission basale sont sévèrement altérées (Ripoli et al., 2014).

3- Les différents types d'oligomères

De nombreuses questions persistent quant aux sites de formation et d'accumulation des oligomères A β , mais aussi au sujet de la cinétique de leur génération. Les agrégats de protéines Tau et A β ont longtemps été considérés comme les phénomènes initiateurs de la maladie, mais ces vingt dernières années ont permis de démontrer la toxicité importante des A β , formes oligomériques non-fibrillaires de la protéine β -amyloïde. Les différentes espèces d'A β telles que les dimères, trimères et tétramères sont parfois dénommées LMW (*low molecular weight*), à la différence des complexes oligomériques de haut poids moléculaire dénommées HMW (*high molecular weight*). Ces différents types d'oligomères présentent une différence de taille évidente qui peut être utilisée comme critère de classification. Cependant, cette classification par taille ne renseigne aucunement sur la variabilité structurale des différentes espèces. C'est pour cela que d'autres approches ont été développées afin de caractériser les oligomères, sur la base d'une reconnaissance par des anticorps spécifiques. Il existe aujourd'hui des anticorps qui distinguent les formes fibrillaires des oligomères, obtenus par l'immunisation de lapins à l'aide de fibrilles d'A β ₄₂ (Kayed et al., 2007). Cette nouvelle caractérisation, qui prend en compte la conformation des différents types d'oligomères, a mis en évidence des oligomères de faible poids moléculaire reconnus par des anticorps ciblant les formes fibrillaires (Glabe, 2008). Bien qu'ils ne correspondent pas aux fibrilles, ces oligomères présentent des épitopes communs avec celles-ci, et sont donc dénommés oligomères « pré-fibrillaires ». Par une approche similaire, l'équipe de Charles Glabe a également produit des anticorps spécifiques des formes non-fibrillaires (Kayed et al., 2003).

De nouvelles hypothèses ont émergé sur les processus d'oligomérisation et d'agrégation des peptides en fibrilles. En effet, les formes dimériques sont supposées être la première étape du processus menant à la formation de fibrilles, alors que les formes trimériques seraient responsables de la génération des oligomères solubles de forme non-fibrillaire (Figure 28, Lesné, 2014)

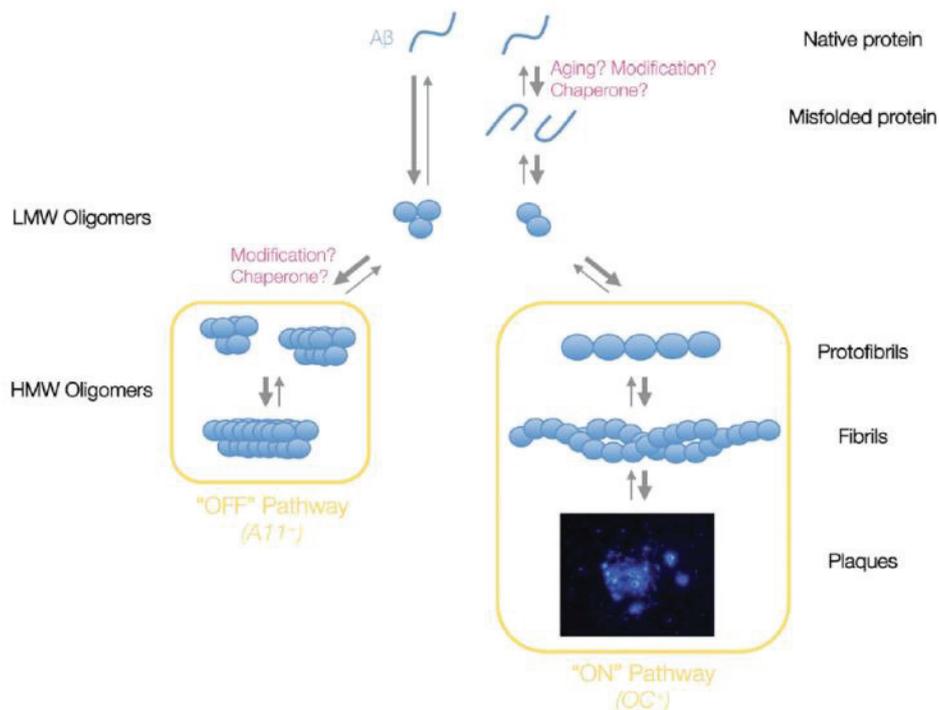


Figure 28 : modèle proposé de l'agrégation des peptides Aβ. Dans ce modèle, les monomères forment préférentiellement des trimères en conditions physiologiques, alors que les dimères sont issus d'un repliement incorrect des monomères. La voie « OFF » n'induit pas de formation de fibrilles insolubles et est reconnue par l'anticorps A11, et la voie « on » est responsable de la formation des formes fibrillaires d'Aβ qui sont reconnues par l'anticorps OC. Aucun transfert horizontal n'existe entre les voies ; les peptides nécessitent un retour aux formes monomériques pour changer de voie. D'après Lesné, 2014.

Les études menées par l'équipe de Sylvain Lesné s'attachent à comprendre le rôle spécifique et la formation des oligomères d'Aβ. Par un protocole d'extraction des différentes espèces d'oligomères à partir de cerveaux humains, l'équipe a pu mettre en évidence des propriétés spécifiques à chaque type d'oligomère en lien avec la charge amyloïde ou avec la progression des symptômes de la maladie. Il s'avère que la quantité de dimères d'Aβ est corrélée à la densité en plaques séniles, à l'inverse des trimères (Lesné et al., 2013). Chez les souris transgéniques Tg2576, modèle de la pathologie d'Alzheimer, les trimères correspondent à la forme la plus abondante d'Aβo (Lesné et al, 2006). Leur présence est révélée bien avant l'apparition des dépôts amyloïdes, chez la souris comme chez l'homme (Lesné, 2014). Cette dissociation temporelle entre la détection des trimères et l'apparition des plaques met en avant l'hypothèse que ces trimères correspondent au processus initial de formation des formes non fibrillaires d'Aβo. Bien que plusieurs arguments soient en faveur de

d'un processus d'oligomérisation des peptides selon deux voies distinctes, cette hypothèse devra être confirmée par de futures études.

4- Mutations responsables des formes familiales de la pathologie

Les causes de la pathologie sont encore mal connues et c'est une combinaison de facteurs de risques multiples qui reste l'hypothèse la plus probable pour expliquer la grande majorité des cas de patients atteints par la forme sporadique de la maladie. Néanmoins, les mutations impliquées dans les formes familiales sont aujourd'hui bien caractérisées. Ces mutations, portées par l'APP, la PS1 ou encore la PS2, sont responsables d'un développement généralement précoce de la maladie.

Il existe de nombreuses mutations touchant l'APP. Par exemple, le remplacement des acides aminés KM en position 670 et 671 par les acides aminés NL aboutit à l'augmentation de la synthèse d'A β ₄₀ et A β ₄₂ (Citron et al., 1992). Cette mutation, dite « Swedish », est la seule présente au niveau du site de clivage de la β -sécrétase. Elle est aujourd'hui l'une des plus utilisées afin de générer des modèles transgéniques murins de la pathologie, tel que le modèle Tg2576. Un nombre important de mutations est aussi présent au niveau du site de clivage de la γ -sécrétase, sur les acides aminés 715 à 717. Certaines de ces mutations, dénommées Austrian, Iranian, French, German, Florida, Indiana ou encore London, sont responsables d'une augmentation du ratio entre les formes A β ₄₂ et A β ₄₀ (Suzuki et al., 1994). L'A β ₄₂ s'agrège plus rapidement et possède une toxicité plus importante que la forme A β ₄₀ plus courte. Cette propriété est due à une rigidité plus importante de la queue C-terminale de l'A β ₄₂, favorisant la formation de feuillet β (Yan & Wang, 2006). Il existe aussi des mutations sur l'acide aminé 693 de l'APP, comme les mutations Arctic ou Dutch (Timmers et al., 1990 ; Nilsberth et al., 2001). La mutation Dutch est associée à des dépôts amyloïdes importants au niveau vasculaire et à une accumulation de l'A β insoluble en plaques diffuses dans le parenchyme cérébral (Levy et al., 1990 ; Timmers et al., 1990). Les patients décèdent principalement d'infarctus et d'hémorragies intracérébrales découlant de la pathologie amyloïde vasculaire.

Les mutations sur l'APP ne sont pas les seules responsables de la pathologie. Les mutations de la PS1 sont les formes autosomiques dominantes les plus fréquentes, alors que les mutations de PS2 sont plus rares (Van Cauwenberghe et al., 2016). Ces deux protéines sont des composants essentiels de la sous-unité catalytique du complexe γ -sécrétase. Ces mutations sont responsables d'une modification du clivage γ aboutissant à une augmentation

du ratio $A\beta_{42/40}$, par augmentation de la production d' $A\beta_{42}$ ou diminution de la production d' $A\beta_{40}$ (Cruts & Van Broeckhoven, 1998). Les mutations de la PS1 correspondent aux formes les plus sévères de la maladie qui peuvent débiter à l'âge de 25 ans. La substitution d'une leucine par une proline sur l'acide aminé 166 de la PS1 correspond à la mutation la plus agressive. Identifiée chez une seule famille, les patients présentent des troubles cognitifs dès 24 ans et des troubles moteurs autour de 27 ans. Le stade de démence modérée commence à 28 ans et évolue jusqu'à la mort du patient, à environ 35 ans (Moehlmann et al., 2002). Des dosages ELISA réalisés chez des modèles animaux présentant cette mutation ont révélé une diminution de la sécrétion d' $A\beta_{40}$, augmentant ainsi le ratio $A\beta_{42/40}$ (Li et al., 2016). Cette mutation, couplée à la mutation Swedish, est utilisée pour établir le modèle murin APP/PS1-21, que nous avons utilisé dans notre étude (Radde et al. 2006). Mais il existe aussi d'autres mutations de la PS1, comme la mutation M146V. Dans cette forme familiale de la maladie, l'âge moyen où les patients sont diagnostiqués est compris entre 36 et 40 ans (Clark et al., 1995). Lorsque cette PS1 mutée est exprimée dans des cellules HEK, elle est responsable d'une augmentation de la sécrétion d' $A\beta_{42}$ (Li et al., 2016). Ce type de mutation de la PS1 est utilisé pour développer le modèle transgénique 3xTg, qui présente également la mutation Swedish de l'APP et une mutation du gène MAPT codant pour Tau.

f- Les différentes hypothèses

1- Peptides amyloïdes et protéines Tau : l'œuf ou la poule ? Hypothèse de la cascade amyloïde.

L'initiation du processus pathologique fait encore débat : la maladie est-elle initiée par l'accumulation de la protéine Tau hyperphosphorylée dans les DNF ou par des oligomères solubles du peptide β -amyloïde ?

Comme l'ont décrit Braak et Braak, (1991) la progression des DNF est corrélée à l'évolution de la maladie, à l'inverse de la progression des plaques séniles. Cet argument a longtemps servi à mettre en avant ce type de lésions comme initiatrices de la pathologie. Mais les formes familiales de la pathologie sont uniquement provoquées par des mutations impliquées dans le clivage de l'APP, car aucune mutation génétique de Tau ne peut reproduire les symptômes de la maladie. De plus, ces 20 dernières années, un nombre exponentiel d'études a mis en évidence la toxicité des oligomères d' $A\beta$ sous leur forme soluble ($A\beta_o$) (Mucke & Selkoe, 2012). Il s'avère que ces oligomères reproduisent une très grande majorité

des altérations observées dans la pathologie, que ce soit au niveau de la transmission, de la plasticité, ou encore des déficits cognitifs. Ainsi, la toxicité des oligomères d'A β engendre une défaillance du fonctionnement des synapses qui est illustrée notamment par le blocage d'une forme de plasticité synaptique considérée comme une base cellulaire de la mémoire, la LTP. Cette perturbation de la LTP correspond à une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique impliquant les récepteurs au glutamate de type NMDA ou AMPA (Walsh et al., 2002, Shankar et al., 2008, Mucke & Selkoe, 2012). De plus, les A β o altèrent la morphologie et la densité des épines dendritiques qui sont le substrat anatomique des synapses excitatrices (Dorostkar et al., 2015). Ils sont enfin responsables de l'apparition de déficits cognitifs dans des modèles animaux ; il existe également une corrélation positive entre l'augmentation du pool d'A β soluble et l'ampleur des altérations observées chez l'homme (Mucke & Selkoe, 2012). Cette importante toxicité des oligomères en fait donc un élément clé de la maladie. On peut même supposer que les plaques d'agrégats insolubles auraient un effet protecteur en limitant la propagation de ces oligomères toxiques et leurs effets délétères.

S'il est difficile de déterminer quelle lésion initie la pathologie, l'ensemble des arguments évoqués précédemment a contribué à considérer les A β o comme le principal déclencheur de la cascade pathologique. Il s'agit de l'hypothèse de la cascade amyloïde (Musiek & Holzman, 2015). Ces dernières années des travaux ont renforcé cette hypothèse en révélant que des oligomères solubles d'A β ₄₂ sont responsables d'une augmentation du calcium intracellulaire à l'origine de l'activation des protéines kinases Fyn et CaMKII dans les neurones. Ces kinases activées de manière anormale provoqueraient l'hyperphosphorylation de Tau aboutissant ainsi aux dégénérescences neurofibrillaires (Huang & Jiang, 2009 ; Wray & Noble, 2009 ; Amar et al., 2017). Néanmoins, à ce jour aucun modèle transgénique de la pathologie ne forme des DNF, à l'exception des modèles associant également une forme mutée de la protéine Tau humaine.

2- Hypothèse cholinergique

J'ai à maintes reprises décrit les altérations du système glutamatergique. Or, les patients sont aujourd'hui traités par des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. L'utilisation de ce traitement s'explique par la perturbation précoce du système cholinergique qui est aussi une caractéristique de la maladie d'Alzheimer.

L'hypothèse cholinergique a été proposée dans les années 1980 par Raymond Bartus et a donné à ce jour l'un des deux seuls types de médicaments utilisés pour traiter la maladie.

L'acétylcholine est impliquée dans les processus d'apprentissage et les patients atteints font face à une diminution de l'activité de la choline acétyltransférase, enzyme essentielle à la synthèse de l'acétylcholine (Potter et al., 2011). En mesurant son activité dans des échantillons postmortem de lobes frontaux et temporaux chez l'homme, les auteurs ont mis en évidence que ce déficit est positivement corrélé aux altérations cognitives évaluées par le test de mémoire MMSE. Enfin, l'injection par voie intrapéritonéale d'un antagoniste des récepteurs muscarinique M1 dans le modèle 3xTg de la maladie détériore leurs performances de mémoire spatiale évaluées en piscine de Morris et exacerbe les altérations A β et Tau. Inversement, l'injection d'un agoniste muscarinique améliore les capacités mémorielles des souris 3xTg (Caccamo et al., 2006).

3- Pathologie multifactorielle

Aujourd'hui, l'implication des lésions amyloïdes et tau, ainsi que l'atteinte du système cholinergique, sont bien caractérisées dans la pathologie. Mais de nombreux autres facteurs interviennent comme les processus inflammatoires, les gènes de prédisposition ou encore les facteurs environnementaux.

Des études menées notamment par l'équipe de Michael Heneka ont révélé l'implication des processus inflammatoires dans la pathologie. Les découvertes effectuées ces 10 dernières années démontrent que les oligomères solubles se lient aux microglies et aux astrocytes et provoquent leur activation (Heneka et al., 2015). Cette activation pathologique des cellules gliales est prédominante à proximité des plaques séniles et aboutit notamment à une stimulation de l'activité de phagocytose des microglies qui s'attaquent alors aux synapses et aux neurones (Hong et al., 2016).

L'apolipoprotéine E (ApoE), qui régule le transport du cholestérol et des acides gras, est elle aussi impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Le gène de l'ApoE est un gène polymorphe présentant 3 allèles différents, et l'allèle E4 est le principal facteur de risque génétique de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer (Kim et al., 2009). Incubée en présence de thioflavine T et d'A β ₄₀, l'ApoE4 accélère la formation de fibrilles par rapport aux autres formes d'ApoE ou à l'A β seul (Wisniewski et al., 1994). De plus, une invalidation du gène codant pour l'ApoE chez des souris transgéniques modèle de la pathologie réduit drastiquement le nombre des dépôts amyloïdes (Bales et al., 1997). Dans les faits, les causes potentielles qui concourent au développement de la maladie sont extrêmement nombreuses

(figure 29, Anand et al., 2014), expliquant le nombre important de thérapies en cours de développement qui ciblent les différents acteurs de la pathologie.

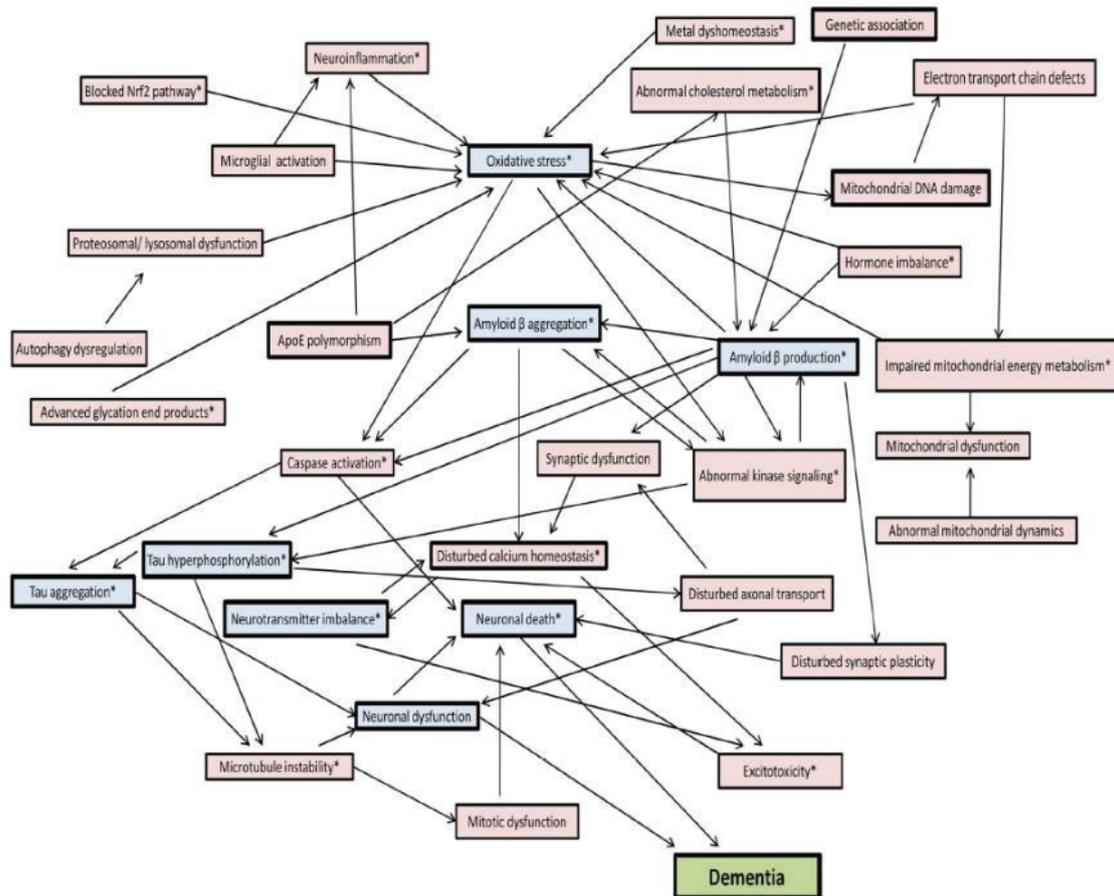


Figure 29 : les différents processus impliqués dans la genèse de la pathologie. Les principaux mécanismes sont représentés en bleu, et les * indiquent certaines cibles des essais thérapeutiques. D’après Anand et al., 2014.

h- Thérapeutique

1- Traitements symptomatiques

Actuellement, les traitements de la maladie d’Alzheimer sont purement symptomatiques. En France, il existe quatre molécules possédant l’autorisation de mise sur le marché. Trois d’entre elles sont des inhibiteurs de l’acétylcholinestérase qui sont responsables d’une augmentation de la biodisponibilité de l’acétylcholine, limitant ainsi les effets de son déficit. Le quatrième est la mémantine, antagoniste des récepteurs NMDA. L’indication de ces traitements se limite aux phases démentielles de la maladie. Leur efficacité est considérée comme modeste et ils présentent un vaste panel d’effets secondaires comme des troubles

digestifs, musculaires ou encore des troubles cardiaques (Vidal 2018, ed. VIDAL France). Du fait de l'absence de traitements efficaces visant à modifier la progression de la maladie, un très grand nombre d'essais cliniques sont actuellement menés. Une recherche par mot clé « Alzheimer » sur le site clinicaltrials.gov du NIH aboutit à plus de 1900 réponses. Ces essais cliniques visent à mettre au point des traitements de type « *disease modifiers* », permettant d'enrayer le décours naturel de la maladie et de soigner les patients.

2- Disease modifiers

Les essais cliniques se concentrent aujourd'hui sur l'élimination des A β , que ce soit en modulant l'activité des sécrétases, en limitant l'agrégation de l'A β , son élimination, ou encore en bloquant ses effets par immunothérapie. Hélas, malgré le grand nombre d'essais tentés à ce jour, aucun n'a encore abouti à un résultat probant. En particulier, des études portant sur un anticorps monoclonal ciblant l'A β , le Solanezumab, présentaient de très bons résultats dans les deux premières phases cliniques de l'essai et nourrissaient beaucoup d'espoir. Seulement, elles se sont révélées sans effet en phase 3, comparées au placebo (Doody et al., 2014). De la même manière, Vellas et collègues ont mené une étude sur l'impact potentiel d'extraits de Ginkgo Biloba, mais le traitement s'est révélé lui aussi inefficace en phase 3 (Vellas et al., 2012).

VI- Altérations induites par les oligomères solubles β -amyloïdes

Les études menées sur les effets des oligomères utilisent principalement trois sources d'oligomères : des oligomères synthétiques (Chromy et al., 2003 ; Li et al., 2009 ; Cissé et al., 2011 ; Talantova et al., 2013), des oligomères d'origine naturelle issus de cellules vecteurs type CHO surexprimant les formes mutées de l'APP (Cleary et al., 2005 ; Shankar et al., 2007 ; Cissé et al., 2011 ; Li et al., 2011), ou encore des oligomères isolés à partir de cerveaux murins ou humains (Lesné et al., 2006 ; Shankar et al., 2008 ; Larson et al., 2012 ; Amar et al., 2017). Dans cette partie, je vais développer les différentes altérations dont ils sont responsables.

a- Les altérations de la transmission

1- Bilan sur les voies, altération de la LTP

La LTP est régulée par un grand nombre de voies qui contrôlent notamment l'équilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation des récepteurs au glutamate, comme je l'ai décrit précédemment. Or, il s'avère que les $A\beta$ perturbent l'activité des kinases et des phosphatases impliquées dans cette régulation. Ainsi, sur des tranches aiguës d'hippocampe, les $A\beta$ altèrent l'activation de la CaMKII qui est indispensable à la LTP, sans pour autant modifier son activité basale (Zheng et al., 2010). Cette diminution de l'activité de la kinase se traduit par une réduction importante de la LTP. De plus, des expériences de fractionnement cellulaire ont révélé qu'un traitement chronique des neurones aux $A\beta$, de 1 à 7 jours, provoque une redistribution de la CaMKII qui disparaît alors des synapses (Gu et al., 2009). L'analyse de l'activation de la CaMKII dans des neurones de souris transgéniques Tg2576 confirme cette réorganisation spatiale de la forme activée (Gu et al., 2009). Parallèlement, les travaux de l'équipe de Strittmater ont démontré que l'activation de la kinase Fyn est également perturbée par les $A\beta$ isolés à partir de cerveaux de patients Alzheimer. *In vitro*, ces $A\beta$ entraînent une augmentation de son activité lors de traitements en concentration croissante. Cette activation devient maximale après 15 minutes et revient à son niveau basal au bout d'une heure (Um et al., 2012). L'utilisation de neurones de souris transgéniques invalidées pour le gène de Fyn et traités aux $A\beta$ a permis de confirmer que la perte de synapses dépend de cette activation anormale de Fyn (Um et al., 2012).

Mais les altérations produites par les A β ne se limitent pas aux kinases car ils perturbent également le fonctionnement des phosphatases et des protéases, comme la calcineurine et la caspase 3. L'utilisation d'un inhibiteur de calcineurine A (CaIA), le FK506, permet en effet de rétablir la LTP en réduisant l'activité de CaIA induite par les A β (Chen et al., 2002). Nous avons aussi vu précédemment que l'activation protéolytique de la caspase 3 est augmentée dans les modèles de la pathologie, effet reproduit par les oligomères d'A β (D'Amelio et al., 2012). De plus, cette activation de la caspase 3 induite par les A β provoque le clivage de la kinase Akt et le blocage de la LTP (Jo et al., 2011). Cette dernière étude met aussi en avant l'importance de caspase 3 dans les processus de toxicité liés aux A β puisque l'inactivation de caspase 3 chez la souris bloque les effets des A β sur la LTP.

Ces dernières études ont été menées à partir d'oligomères synthétiques ou issus de cellules CHO, mais d'autres études ont confirmé que ces altérations de la LTP sont reproduites par des A β naturels isolés à partir de cerveau humain (Li et al., 2009 et 2011). L'isolement de ces oligomères repose sur des protocoles complexes mettant en jeu des immunoprécipitations couplées à des chromatographies d'exclusion selon la taille des protéines. A l'aide de ces protocoles, Shankar et collègues confirment qu'une application de 20 minutes de formes spécifiques d'A β naturels, sur tranches d'hippocampe, aboutit à une inhibition de la LTP, particulièrement marquée dans les phases tardives, mais aussi à une stimulation de la LTD (Shankar et al., 2007 et 2008).

Les oligomères solubles d'A β sont donc responsables d'une altération majeure des voies de signalisation régulant la LTP. Ces altérations se traduisent dans la plupart des cas par une inhibition quasi totale de cette forme de plasticité. Néanmoins, les effets des A β suivent une cinétique très dynamique, phénomène qui est mis en évidence par l'analyse de l'impact des A β sur les récepteurs glutamatergiques, que je vais maintenant développer.

2- Altération de la transmission basale, effets des A β sur les récepteurs glutamatergiques.

Dans leur revue de 2012, Mucke et Selkoe présentent les A β comme des régulateurs négatifs de l'activité postsynaptique. Cependant, ils sont aussi présentés comme des régulateurs de la transmission présynaptique (figure 30).

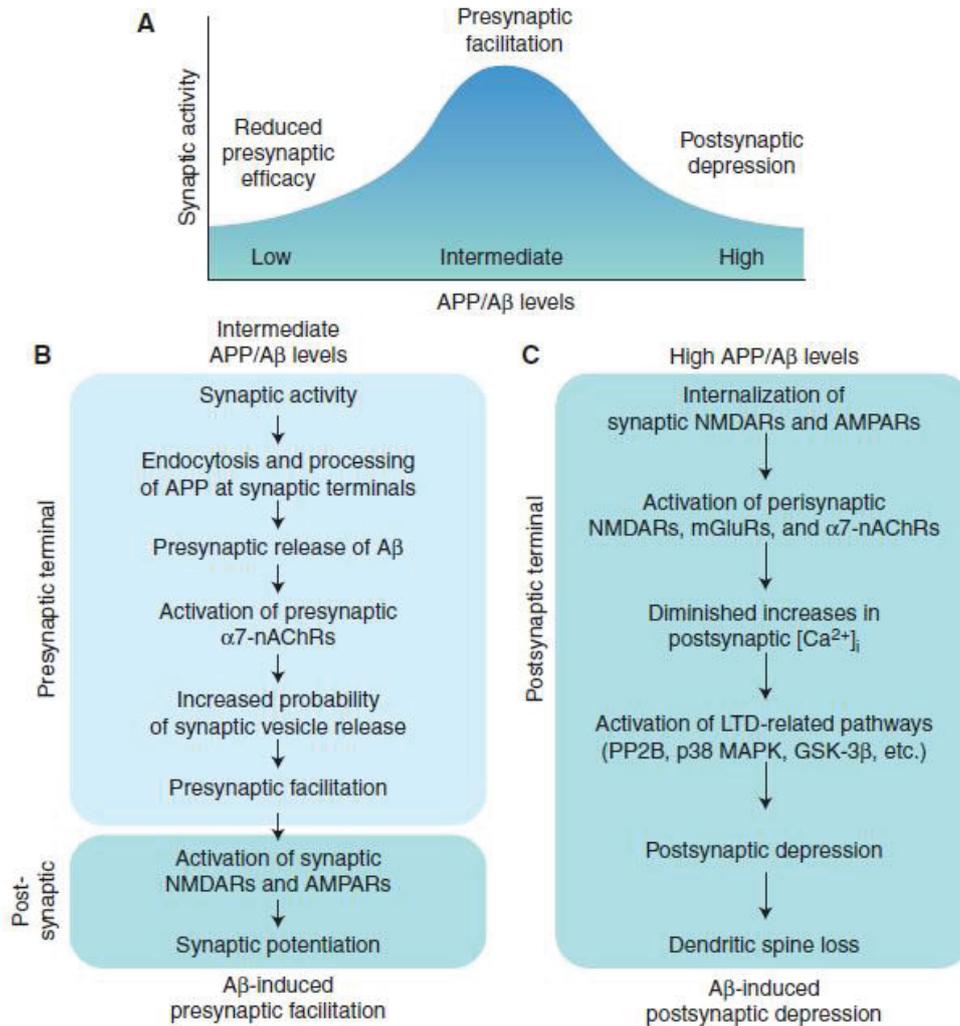


Figure 30 : régulation pré- et postsynaptique de la transmission par les Aβ. (A) Relation hypothétique entre les concentrations d'Aβ et l'activité synaptique. A concentration intermédiaire, l'Aβ stimulerait l'activité synaptique par une augmentation de la libération de neurotransmetteurs. Aux faibles et fortes concentrations, l'Aβ aurait un effet inverse en diminuant l'activité présynaptique ou en induisant une dépression postsynaptique. (B) En concentration physiologique, une faible augmentation des taux d'Aβ facilite les fonctions présynaptiques. (C) A des concentrations élevées pathologiques, l'Aβ stimule des processus LTD-like provoquant une dépression postsynaptique. D'après Mucke et Selkoe, 2012.

Ces effets opposés sont principalement dus à la stimulation de différents récepteurs, situés sur l'élément pré- ou postsynaptique, en fonction des concentrations d'Aβ. Dans cette partie, je vais pour ma part me concentrer sur l'impact des Aβ sur les récepteurs glutamatergiques postsynaptiques. Ces effets peuvent à priori paraître complexes car de nombreuses études avancent une diminution de l'expression synaptique de ces récepteurs quand d'autres évoquent une augmentation. Mais, en se concentrant sur la dynamique des

altérations induites, on se rend compte que cette contradiction résulte de la différence des durées de traitements appliqués. En réponse à un traitement aux A β , les récepteurs glutamatergiques vont suivre une cinétique complexe reflétée par leur changement d'expression aux synapses et leur mobilité entre les compartiments synaptiques et extrasynaptiques.

Ainsi, les A β vont induire *in vitro* une augmentation transitoire de l'expression de surface des récepteurs NMDA (NMDAR) qui s'accompagne d'une phosphorylation accrue de la sous-unité GluN2B des NMDAR (Um et al., 2012). Mais sur des temps de traitement plus longs, de 60 minutes à 4 heures, la phosphorylation de GluN2B comme l'expression en surface des NMDAR diminuent significativement (Um et al., 2012). Ces données confirment les résultats d'une étude plus ancienne où la diminution de l'expression de ces récepteurs, observée à la fois en immunocytochimie et en biochimie par immunoblot, intervient au bout d'une heure (Snyder et al., 2005). Cette diminution s'accompagne d'une réduction des courants régulés par les NMDAR (Snyder et al., 2005). Les études menées par Laurent Groc ont montré que les récepteurs à sous-unités 2B étaient plus enclin à diffuser au niveau extra-synaptique du fait d'une mobilité accrue par rapport aux NMDAR à sous unités 2A (Groc et al., 2006). De plus, ces récepteurs sont impliqués dans l'induction de la LTD (Liu et al., 2004). Or, il s'avère qu'en isolant les courants NMDA extra-synaptiques, Talantova et collègues ont démontré que les A β augmentaient les courants NMDA extra-synaptiques, mais diminuaient les courants synaptiques (Talentova et al., 2013). L'équipe de Li a obtenu des résultats similaires et confirme que les A β induisent une activation des courants extra-synaptiques de type NMDAR, responsables de l'altération de la LTP (Li et al., 2011). Ces résultats sont en accord avec la modulation du degré de phosphorylation des NMDAR à sous unités GluN2B observée par Um et collègues. L'ensemble de ces travaux démontrent donc que les A β sont responsables d'une activation des NMDAR à sous unité 2B, activation qui promeut des processus de dépression synaptique, de type LTD. Au-delà des courants médiés par les NMDAR, de nombreux travaux, dont ceux de l'équipe de Shankar, ont révélé que les A β naturels provoquent une diminution globale de l'efficacité de la transmission synaptique au niveau des synapses excitatrices de l'hippocampe, qui repose en grande partie sur l'insertion de récepteurs AMPA aux synapses (Shankar et al., 2008).

Les oligomères d'A β perturbent à la fois l'expression et la fonction des récepteurs AMPA (AMPA). Par un protocole de fractionnement cellulaire visant à isoler les densités postsynaptiques, l'équipe d'Alain Buisson a démontré que les A β induisent une augmentation rapide de l'expression synaptique de la sous-unité GluA1 des AMPAR, après

trente minutes de traitement (Frاندemiche et al., 2014). Cette augmentation d'expression est seulement transitoire puisqu'une application d'A β pendant 1 à 3 jours provoque une diminution de l'expression de surface des récepteurs AMPA (Gu et al., 2009), Cette perte d'expression synaptique des récepteurs AMPA a également été observée dans des neurones dérivés de modèles transgéniques de la maladie (Almeida et al., 2005 ; Hsieh et al., 2006). L'hypothèse privilégiée à l'heure actuelle suggère que A β sont responsables d'une activation des récepteurs NMDA extra-synaptiques, qui déclenche les voies de signalisation impliquées dans la LTD, favorisant l'internalisation des récepteurs au glutamate et la dépression de la transmission synaptique.

Ces altérations fonctionnelles s'accompagnent d'une perturbation de l'expression et de l'organisation spatiale des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette (Frاندemiche et al., 2014), et provoque des altérations structurelles des éléments postsynaptiques portés par les épines dendritiques.

b- Les altérations morphologiques

1- Altérations de la morphologie des épines dendritiques

En plus d'altérer la transmission synaptique, les A β changent de manière drastique la densité et la morphologie des épines dendritiques, support physique des synapses (Dorostkar et al., 2015). Cet effet est attendu puisque la morphologie des épines est un reflet de l'efficacité de transmission synaptique comme nous l'avons vu précédemment. De très nombreuses études ont établi un lien de causalité entre les altérations fonctionnelles induites par les A β sur les récepteurs et la transmission synaptique, et les altérations morphologiques des épines qui en résultent (Shankar et al., 2007 ; Um et al., 2012 ; Talantova et al., 2013 ; Frاندemiche et al., 2014 ; Miller et al., 2014).

La protéine Tau, qui joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la stabilité des microtubules, est essentiellement présente dans les axones et plus rarement dans les dendrites, où elle interagit avec la kinase Fyn et régule la fonction des NMDAR postsynaptiques (Ittner et al., 2010). Les A β provoquent sa phosphorylation et sa translocation rapide au niveau des épines dendritiques des neurones, comme celle induite par une activation synaptique par la bic4AP (Frاندemiche et al., 2014). Cependant, des expériences complémentaires d'interaction protéique entre Tau et l'actine suggère que cette translocation de Tau induite par les A β est instable car son interaction avec l'actine dans les épines serait plus labile que celle

établi en réponse à une stimulation synaptique (Frandemiche et al., 2014). De plus, cette relocalisation spatiale de Tau est caractérisée par un motif de phosphorylation différent de la protéine en réponse à une activation synaptique ou à une stimulation des neurones par les A β . En effet, l'activation synaptique provoque une phosphorylation du résidu tyrosine 205 alors qu'en présence d'A β cette phosphorylation est réduite et le résidu sérine 404 est phosphorylé (Frandemiche et al., 2014). Miller et collègues ont confirmé sur des neurones dérivés de souris transgéniques exprimant la mutation Swedish que le processus de translocation de Tau dans les épines dépend de la phosphorylation de la protéine (Miller et al., 2014). Ainsi, ces oligomères sont donc responsables d'une altération fonctionnelle de Tau qui modifie son interaction avec le cytosquelette d'actine et donc l'architecture des épines dendritiques.

Les épines dendritiques sont le support physique de l'élément postsynaptique des synapses glutamatergiques, et les oligomères sont responsables de leur altération morphologique et structurelle (Lacor et al., 2007). En culture, ils provoquent une diminution de la densité des épines des neurones pyramidaux hippocampiques (Hsieh et al., 2016). Cette perte d'épines dépend en partie de l'activité des NMDAR extrasynaptiques puisque l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de ces récepteurs, la nitromémantine, bloque l'effet délétère des A β (Talantova et al., 2013). La cinétique de cet effet toxique des A β est relativement rapide, car les épines disparaissent dès les premières heures de traitements (Um et al., 2012). Il est important de noter que ces épines suivent une dynamique très rapide, car nous avons observé la formation d'épines fonctionnelles de type mushroom, en 20 minutes environ, lors de notre précédente étude réalisée en time-lapse (De Rossi et al., 2016). Renforçant les résultats impliquant les récepteurs NMDA dans cette perte synaptique, Um et collègues ont révélé qu'une invalidation de Fyn, modulant l'activité de ces récepteurs, bloque la perte synaptique induite par les A β . D'autres molécules de signalisation sont également impliquées dans l'effet délétère des A β , car le blocage de l'activité de la calcineurine A par le FK506 prévient cette perte d'épines (Cavallucci et al., 2013).

2- Altérations de l'arbre dendritiques

Bien que les études se concentrent pour la plupart sur les épines dendritiques, ces épines ne sont pas les seuls éléments neuronaux dont l'architecture est altérée dans la pathologie. Les A β vont aussi altérer l'arborisation des dendrites. Chez les modèles APP/PS1 de la maladie, on note une réduction de la longueur des dendrites de CA1,

accompagnée d'une diminution de leur surface et du nombre d'embranchements (Šišková et al., 2014). Ces altérations morphologiques sont observées dans d'autres modèles, comme les souris Tg2576, où l'arborisation dendritique des neurones en culture montre une simplification avec environ 60% de réduction du nombre d'embranchements (Wu et al., 2010). Ces altérations seraient imputées aux oligomères solubles puisque ces auteurs ont reproduit les résultats en appliquant des milieux conditionnés de cultures Tg2576 sur des neurones wild-type. De plus, cette étude a confirmé l'implication de la calcineurine dans l'altération de la morphologie neuronale liée à l'A β , car l'inhibition de son activité par l'AKAP79 reproduit le même phénotype (Wu et al., 2010).

c- Processus inflammatoires

Les processus inflammatoires font partie intégrante de la maladie d'Alzheimer et les A β o sont responsables d'une initiation de l'inflammation (Minter et al., 2016). Les oligomères induisent l'inflammation via l'activation de différents récepteurs tels que les récepteurs RAGE, Toll-like, ou encore nod-like (He et al., 2012 ; Minter et al., 2016). L'inflammation apparaît de manière précoce, bien avant l'apparition des plaques. Une fois les plaques formées, les microglies et les astrocytes activés sont recrutés et particulièrement abondants au niveau des plaques (Heneka et al., 2015).

En réponse à la fixation de l'A β sur les microglies, ces cellules phagocytent les agrégats amyloïdes. Parallèlement, l'inflammation chronique induite par les A β o pourrait être à l'origine d'une activation anormale des microglies qui agiraient alors de manière pathologique en phagocytant les synapses et en induisant la neurodégénérescence (Heneka et al., 2015). Une récente étude menée par l'équipe de Stevens a confirmé cette hypothèse en démontrant *in vitro* que les oligomères solubles induisent une augmentation de la phagocytose des épines dendritiques par les microglies (Hong et al., 2016). Les auteurs mettent en évidence une augmentation de l'expression synaptique de C1q, la protéine initiatrice de la cascade du complément. Cette augmentation de l'expression apparaît avant même la formation des plaques séniles chez les souris J20. Or, un blocage de C1q aboutit à une diminution des processus de phagocytose et de la perte synaptique associée, et permet de restaurer la LTP (Hong et al., 2016). Ces études mettent en exergue le rôle primordial que jouent les processus inflammatoires dans la pathologie, avec leur implication dans l'altération de la transmission synaptique et la neurodégénérescence.

d- Cibles des A β

A ce jour, il est extrêmement difficile de faire une liste précise de l'ensemble des cibles des A β . Leur nombre est important et croit de manière exponentielle au fil des études. Ces oligomères se fixent sur des récepteurs neuronaux, mais aussi au niveau des récepteurs des différents types de cellules gliales. Ils vont notamment interagir avec les récepteurs $\alpha 7$ nicotiques, les récepteurs glutamatergiques, les récepteurs de l'insuline, RAGE, les récepteurs du NGF, la protéine du prion, ou encore les récepteurs EphB2 (Yan et al., 1999 ; Lacor et al., 2004 ; Verdier et al., 2004 ; Lacor et al., 2007 ; Simakova & Arispe 2007 ; Koffie et al., 2009 ; Lauren et al., 2009 ; Gimbel et al., 2010 ; Sakono & Zako, 2010 ; Cisse et al., 2011 ; Um et al., 2012). Certains de ces récepteurs vont médier les effets délétères des A β sur la transmission synaptique et la neurodégénérescence alors que d'autres récepteurs comme les récepteurs LRP1 vont promouvoir leur élimination du cerveau (Jarosz-Griffiths et al., 2016).

La multitude des cibles des A β explique la complexité des effets observés d'autant plus qu'ils ne se lient pas seulement aux récepteurs. En effet, ils peuvent se lier également à des protéines de la matrice extracellulaire, comme les complexes formés par l'héparane sulfate et les protéoglycanes (Shimizu et al., 2009). Cette observation est cruciale dans notre étude puisque le VEGF possède un domaine de liaison à l'héparine, qui est très proche de la structure des héparanes sulfates (Muñoz & Linhardt, 2004).

e- Propagation des oligomères, un processus « prion-like » responsable de l'évolution de la pathologie

Depuis plusieurs années, des études montrent que l'A β pourrait propager les altérations caractéristiques de la maladie d'Alzheimer à l'ensemble du cerveau, selon un mécanisme « prion-like », qui induirait une réaction en chaîne et transférerait le processus d'agrégation toxique à des protéines naïves (Kabir & Safar, 2014, Jucker & Walker, 2013). Les oligomères se comporteraient alors comme un agent infectieux, adoptant une conformation incorrecte et induisant une mauvaise conformation des protéines nouvellement synthétisées. En effet, l'injection d'extraits dilués de cerveaux de patients atteints de la pathologie provoque une accélération de la formation des plaques chez les souris Tg2576, modèle de la maladie (Kane et al., 2000). Une étude plus récente menée par l'équipe de Stanley Prusiner à San Francisco a confirmé les résultats obtenus par Kane et collègues à

l'aide de deux modèles transgéniques de la maladie. En utilisant deux lignées de souris qui développent les altérations de la pathologie à des âges différents et expriment la luciférase fluorescente sous le contrôle du promoteur de la GFAP, les auteurs ont pu suivre la déposition de l'A β en plaques par un examen de la bioluminescence. Ils ont révélé que l'injection d'extraits de cerveaux de la lignée développant les dépôts précocement accélérât et aggravait la charge en A β de la lignée de souris receveuse. Ces résultats ont été confirmés par l'injection de préparations fibrillaires obtenues à partir de peptides synthétiques A β ₄₀ ou A β ₄₂ chez les souris modèles de la pathologie exprimant la luciférase (Stohr et al., 2014). Ces fibrilles sont responsables d'une accélération de la formation des plaques qui adoptent une conformation dépendant de la nature du peptide injecté au départ, selon un mécanisme de propagation prion-like (Stohr et al., 2014).

f- Mise en évidence des déficits cognitifs dans les modèles transgéniques de la maladie

1- Processus hippocampo-dépendants : altération de la mémoire spatiale

Les souris transgéniques mutées sur l'APP ou la préséniline 1 présentent des altérations majeures de leurs capacités mémorielles. Ainsi, le modèle APP/PS1-21 développé par Radde et collègues en 2006 présente des déficits d'acquisition de la mémoire spatiale évaluée en labyrinthe à 4 branches (Radde et al., 2006). Quant au modèle Tg2576, développé par Hsiao en 1996, les altérations mnésiques sont reflétées par une augmentation des temps de latence lors d'une restitution de l'apprentissage testée en piscine de Morris (Hsiao et al., 1996). Ces modèles sont donc caractérisés par des déficits d'acquisition de la mémoire spatiale mettant en jeu l'hippocampe, une structure clé dans les processus de mémorisation qui est touchée dès les premiers stades de la maladie chez l'homme. Mais il est essentiel de noter que l'altération des processus hippocampo-dépendants ne se limitent pas à ses deux modèles. En effet, plus d'une centaine de modèles existent et la majorité présente des déficits de la mémoire spatiale.

Les modèles murins de la pathologie présentent d'importantes variations dans la cinétique et l'expression des déficits cognitifs, mais aussi dans l'expression des différents marqueurs de la pathologie. Les souris J20 et Tg2576, mutées seulement sur l'APP, présentent une évolution lente des dépôts amyloïdes, qui sont seulement observés après 5 et

11 mois, alors que les souris APPPS1 présentent des plaques dès 6 semaines (Lesné et al., 2013, figure 31).

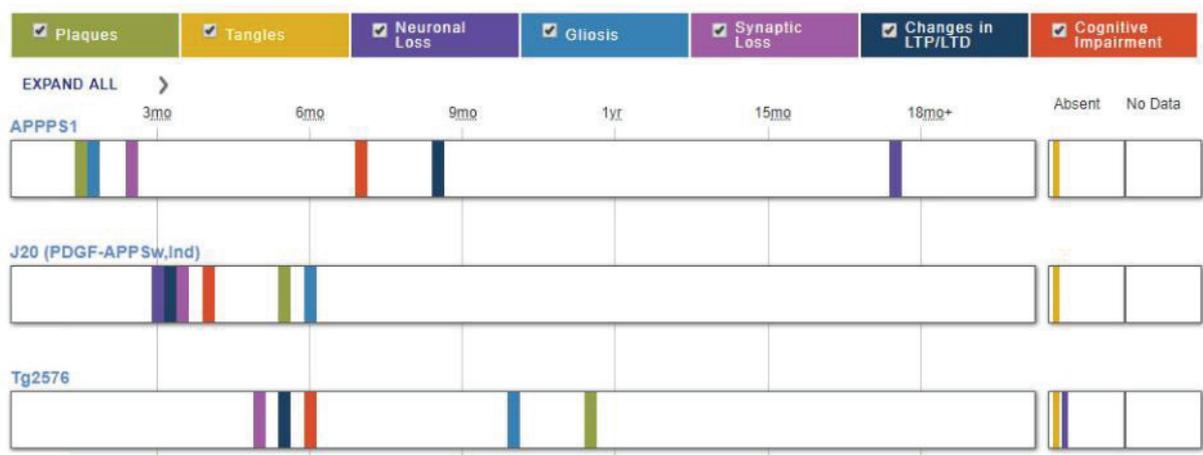


Figure 31 : comparaison de l'évolution des différentes altérations entre 3 modèles de la pathologie. D'après Alzforum.org, page visitée le 8 octobre 2018.

Il a été démontré que les oligomères solubles sont impliqués dans l'altération de la mémoire spatiale. En effet, l'injection dans les ventricules cérébraux d'A β synthétiques altère les capacités cognitives des souris. Ils induisent une forte augmentation du temps de latence pour rejoindre la plateforme immergée en piscine de Morris lors de la restitution de l'apprentissage spatial (Zhang et al., 2015). Ces résultats sont confirmés par une récente étude évaluant les capacités des souris en labyrinthe Y. Lorsque les capacités des souris sont testées 10 minutes après injections d'A β , les souris ne présentent pas de défaut d'apprentissage. Par contre, l'altération de la mémoire spatiale s'amplifie d'heures en heures après injection (Nicole et al., 2016). Les auteurs démontrent donc que les oligomères altèrent les apprentissages spatiaux et que cet effet s'amplifie avec le temps.

2- Aires supérieures : mémoire associative, fonction exécutives et flexibilité

L'effet des A β sur les autres types de mémoire est beaucoup moins étudié. Néanmoins, plusieurs modèles de la pathologie présentent des déficits autres qu'hippocampo-dépendants, touchant notamment les fonctions exécutives. Les fonctions exécutives font référence à un ensemble de processus cognitifs supérieurs tels que le raisonnement, la planification, la mémoire associative ou encore la flexibilité.

Les protocoles de *fear conditioning* permettent notamment d'évaluer la mémoire associative. Ce test comportemental implique particulièrement l'amygdale, mais aussi la mémoire associative hippocampo-dépendante lors du rappel du contexte. Il s'avère que

l'injection intraventriculaire d'A β ne semble pas provoquer d'altération de la mémoire associative amygdalo-dépendante. On note seulement une augmentation du *freezing* des souris lors du rappel contextuel (Dineley et al., 2010 ; Kittelberger et al., 2012).

Hors injection, les modèles murins présentent une évolution des altérations cognitives. Elles sont d'abord caractérisées par des altérations de la mémoire spatiale, analysée en piscine de Morris, puis des altérations de la mémoire associative, testée en *fear conditioning*. Les altérations de la mémoire de reconnaissance, analysée notamment en *novel object recognition test*, sont observées généralement plus tardivement (Webster et al., 2014, figure 32). Mais ce pattern évolutif dépend grandement des modèles. Du fait de leur multitude, nous pouvons noter une divergence dans l'évolution des symptômes.

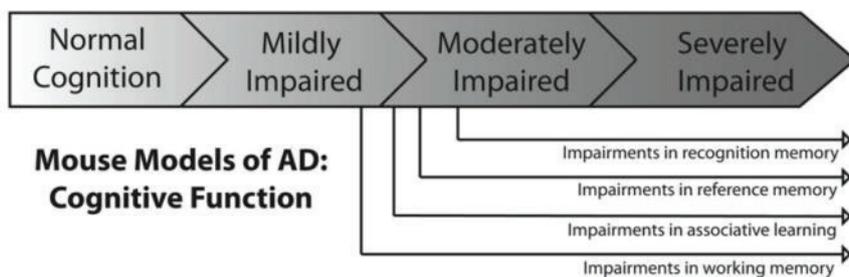


Figure 32 : progression des déficits cognitifs chez les souris modèles de la pathologie d'Alzheimer. D'après Webster et al., 2014.

g- Effets sélectifs des oligomères

Les oligomères d'A β représentent plusieurs sous-ensembles, allant des dimères aux multimères. Face à cette grande variabilité, on peut se demander s'ils n'ont pas des effets différentiels selon l'agencement de leur structure quaternaire multimérique. Plusieurs études ont été menées afin d'analyser ces effets différentiels. Elles reposent sur l'isolement spécifique d'oligomères de masses moléculaires différentes par des chromatographies d'exclusion de taille. Bien qu'un nombre croissant d'études analysent ces effets spécifiques, les connaissances méritent d'être encore développées, et seul l'effet de quelques types d'oligomères commence à être bien caractérisé.

1- Dimères

L'abondance des dimères augmente avec l'âge et la charge amyloïde chez les souris transgéniques et chez les patients (Lesné, 2014). Isolés à partir de cerveaux de patients, ils altèrent la LTP, stimulent la LTD et induisent des déficits cognitifs (Shankar et al., 2008). Ils sont surtout détectés chez les patients présentant un grand nombre de plaques. Chez les souris

Tg2576 et J20, caractérisées par un faible développement des plaques, les dimères sont détectés seulement à partir de 10 à 14 mois. En revanche, chez les souris APP/PS1 présentant un développement précoce et important des plaques séniles, ces oligomères sont retrouvés dès 7 à 8 mois (Lesné et al., 2014). Ces observations conduisent donc à l'hypothèse que l'oligomérisation de l'A β sous forme de dimères correspondrait à l'étape initiale de la formation des fibrilles.

Ces dimères sont aussi impliqués dans la phosphorylation de Tau. Les dimères isolés à partir de patients sont en effet responsables d'une activation de la kinase Fyn et provoquent une augmentation de la phosphorylation de Tau (Larson et al., 2012).

2- Trimères

Les trimères sont détectés très tôt chez les souris Tg2576, dès 14 jours de gestation, et leur abondance augmente progressivement mais de manière stable avec l'âge (Lesné et al., 2006). Leur présence est détectée plusieurs mois avant l'apparition des plaques dans les modèles murins, et des dizaines d'années plus tôt chez l'homme (Larson & Lesné, 2012). Il est important de noter que leur abondance n'est pas corrélée au développement des plaques amyloïdes chez l'homme (Lesné et al., 2013). Cette dissociation entre l'apparition des plaques et l'abondance des trimères suggère que ces oligomères sont impliqués dans la formation de l'A β non fibrillaire.

Lorsqu'ils sont isolés à partir de lignée cellulaire CHO 7PA2, ces trimères inhibent la LTP hippocampique (Townsend et al., 2006). Enfin, sur culture primaire de neurones, les trimères isolés à partir de cerveau de patient induisent un mauvais repliement de la protéine Tau, caractéristique de la pathologie d'Alzheimer (Sherman et al., 2016). Chez les patients MCI, leur abondance est corrélée à ce mauvais repliement de Tau. En revanche cet effet de repliement n'est pas induit par les monomères et les dimères, suggérant que les trimères seraient particulièrement impliqués dans les altérations fonctionnelles de la protéine Tau (Sherman et al., 2016).

3- A β star

L'A β * (A β *56) fait référence aux dodecamères de 56 kDa. Ils sont retrouvés avant l'apparition des plaques chez les souris Tg2576, au même titre que les trimères, hexamères et nonamères (Kayed et al., 2003 ; Larson & Lesné, 2012). Ils sont reconnus par les anticorps

6E10 et A11, caractéristique des formes non fibrillaires, mais pas par l'anticorps OC, reconnaissant les formes pré-fibrillaires (Lesné et al., 2014). Cette immunoréactivité spécifique permet de les classer en tant qu'oligomères non fibrillaires. Chez l'humain, leur apparition commence à un âge médian et augmente avec le vieillissement (Lesné et al., 2013).

Des expériences de co-immunoprécipitations chez les souris Tg2576 ont démontré que l'A β * interagit avec les sous-unités GluN1 des récepteurs NMDA (Amar et al., 2017). Ils sont responsables d'une augmentation des flux calciques dans les cultures de neurones corticaux et altèrent fortement la LTP (Lesné et al., 2006 ; Amar et al., 2017). Cet influx calcique est responsable d'une activation de la CaMKII α et provoque une phosphorylation anormale de la protéine Tau sur son résidu sérine 416. Ces derniers résultats mettent en relation les altérations induites par les A β avec phosphorylation anormale de Tau, suggérant que ces A β * jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la maladie. Au plan cognitif, l'injection ICV de l'A β * induit des déficits cognitifs chez les rats, qui ne sont pas observés lors de l'injection de trimères (Reed et al., 2011). Dans cette dernière étude, des rats Sprague-Dawley doivent apprendre une séquence spécifique d'activation de leviers afin de recevoir une récompense sous la forme de nourriture. Cet apprentissage complexe est seulement altéré lors de l'injection d'A β * et non de trimères, mettant en évidence l'importante toxicité de ces oligomères par rapport aux autres formes.

VII- Projet de recherche

A l'heure actuelle, certains traitements thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer ciblent les récepteurs NMDA, comme la Mémantine, mais le bénéfice de ces traitements pour les patients reste modeste, car ils ne modifient pas le décours de la maladie. Il est donc nécessaire de bien caractériser les altérations précoces qui ciblent les synapses afin d'ouvrir d'autres pistes qui atténuent les effets synaptotoxiques et améliorent les capacités cognitives des patients.

a- Le VEGF dans la pathologie d'Alzheimer

1- Un potentiel binding

L'expression du VEGF dans la pathologie est très complexe à analyser. En effet, du fait du caractère diffusible ou non de ses différentes formes, l'estimation du taux de VEGF par dosage dépendra des protocoles d'extractions utilisés. Au niveau de l'hippocampe, une analyse en immunoblot a révélé une élévation des taux des isoformes de VEGF liées à la matrice dans les formes légères de la pathologie (MCI), qui s'atténue avec le degré de sévérité (Tang et al., 2013). Ces observations sont en accord avec le fait que le VEGF se retrouve préférentiellement associé avec les plaques amyloïdes insolubles dans le cerveau des patients Alzheimer (Thomas et al., 2015). On note aussi après dosage du VEGF dans le plasma que les patients MCI présentent des taux plus élevés que les patients contrôles et les patients atteints de démence, suggérant une augmentation du VEGF dans les phases précoces de la maladie (Cho et al., 2017, Chiappelli et al., 2006). Mais d'autres études présentent des résultats opposés avec une diminution des taux de VEGF dans le sérum, qui corrèle avec les formes les plus avancées de la maladie (Mateo et al., 2007). Ces données contradictoires pourraient être le résultat d'une variation des taux de VEGF qui se produit en périphérie au cours de la maladie, et non pas dans le système nerveux central. Pour pallier à cet inconvénient, une étude récente a comparé les taux de VEGF dans le LCR de patients sains et malades sans détecter de variation en lien avec la pathologie (Chakraborty et al., 2018). Cependant, il serait important d'étudier plus systématiquement l'évolution des taux de VEGF en fonction du décours de la maladie. Certaines études longitudinales font état d'une évolution des taux de ce facteur qui reflèterait l'état cognitif des patients. En effet, les dosages du LCR ont révélé que les patients présentant des taux élevés de biomarqueurs de la maladie avec un taux important de VEGF

présentent de meilleures performances cognitives au cours du temps (Hohman et al., 2015). Ces derniers travaux suggèrent que le VEGF pourrait exercer un rôle protecteur et avoir un effet bénéfique chez les patients atteints de la pathologie.

Les plaques amyloïdes semblent donc perturber la voie du VEGF en agrégeant préférentiellement ce facteur (Yang et al., 2004 ; Ryu et al., 2009 ; Thomas et al., 2015). Ces plaques séniles sont composées en majorité de peptides β -amyloïdes insolubles, mais aussi d'une grande variété de protéines, incluant notamment des protéoglycanes associés à l'héparane sulfate (Atwood et al., 2002). Or le VEGF possède deux sites de liaison à l'héparine (HBD) et pourrait se retrouver piégé dans les plaques via ses domaines HBD (Yang et al., 2004). De plus, les plaques amyloïdes sont le foyer initiateur d'importantes zones d'inflammation et sont responsables du recrutement de cellules gliales (Heneka et al., 2015). Ces cellules, sécrétrices de VEGF, pourraient ainsi induire une mauvaise répartition du facteur neuroprotecteur pour les cellules environnantes du fait de leur recrutement au voisinage des plaques.

Quelques études ont mis en évidence une liaison entre l'A β et le VEGF par l'HBD, ainsi qu'entre les A β et le VEGFR2 (Yang et al., 2004 ; Patel et al., 2010). Le VEGF pourrait ainsi être piégé dans les plaques séniles en se liant à l'A β sous sa forme fibrillaire, réduisant sa disponibilité pour les neurones environnants. Cette liaison pourrait donc empêcher la fixation du VEGF à son récepteur, altérer les voies de signalisation en aval, et perturber ainsi la fonction du VEGF et son action sur les synapses. Il est important de signaler qu'aucune de ces études n'a analysé la liaison entre le VEGF et l'A β sous sa forme oligomérique (A β _o), qui correspond à la forme d'A β la plus toxique pour les synapses.

2- Modulation de la transmission synaptique – LTP, récepteurs glutamatergiques

A court terme, les A β _o provoquent une inhibition de la LTP dans l'hippocampe (Shankar et al., 2008) et favorisent l'induction de processus similaires à la LTD (Talantova et al., 2013) avec l'internalisation des récepteurs au glutamate (Snyder et al., 2005 ; Mucke & Selkoe, 2012). Ces altérations synaptiques se traduisent par une augmentation de la concentration en calcium dans les épines dendritiques et l'activation anormale de certaines kinases et phosphatases (Spires-Jones & Hyman, 2014). En particulier, l'activation anormale de la phosphatase calcineurine conduit à une internalisation des récepteurs AMPA ainsi qu'à

l'activation en cascade de la kinase GSK3 β (Kim et al., 2009) impliquée dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau.

A plus long terme, les A β sont responsables d'une altération morphologique des épines dendritiques, provoquant un rétrécissement de leur tête corrélé à une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique, c'est à dire à une dépression synaptique. Cette altération aboutit à terme à une disparition massive des épines dendritiques (Shankar et al., 2007). L'ensemble de ces processus conduit alors à des déficits cognitifs (Shankar et al., 2008).

Or, il s'avère qu'en condition physiologique, les effets du VEGF s'opposent à ces altérations. Notre précédente étude (en annexe), à laquelle j'ai participé comme co-auteur, a démontré que le VEGF a la capacité d'amplifier la transmission synaptique dépendant des récepteurs NMDA, de favoriser la formation des synapses, et d'être requis pour l'induction de la LTP via son récepteur VEGFR2 (De Rossi et al., 2016). De plus, la greffe de cellules encapsulées sécrétant du VEGF dans des souris transgéniques, modèle de la maladie, entraîne une diminution de la taille des plaques séniles, une réduction de la mort neuronale et une amélioration des capacités cognitives des souris (Spuch et al., 2010). Le VEGF permet enfin de favoriser l'insertion membranaire des récepteurs AMPA, essentiels à la transmission synaptique. (De Rossi et al., 2016). Cet effet du VEGF cible en particulier les récepteurs AMPA exprimant la sous-unité GluA1 qui sont insérés aux synapses lors des processus de LTP. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le VEGF pourrait avoir un effet neuroprotecteur dans la maladie d'Alzheimer en contrecarrant l'impact délétère des A β sur les synapses.

b- Hypothèses de travail

Ainsi, les effets du VEGF, tant au niveau synaptique que mnésique s'opposent à certaines altérations observées dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Et l'ensemble des études présentées précédemment laissent supposer que la voie du VEGF pourrait être altérée dans cette pathologie.

Notre hypothèse propose que le VEGF se lie préférentiellement aux plaques séniles, ce qui réduirait sa disponibilité pour les neurones environnants. Cette accumulation de VEGF dans les plaques suggère qu'il se lie à l'A β , et nous avons envisagé la possibilité qu'il se lie directement aux oligomères solubles. En se liant aux oligomères, les effets du VEGF sur les synapses pourraient être bloqués, limitant ainsi son implication dans les processus de

plasticité synaptique. Notre étude s'est donc attachée tout d'abord à analyser l'état de la voie du VEGF dans le cerveau postmortem de patients Alzheimer et de souris transgéniques, modèle de la maladie. De plus, nous avons caractérisé la liaison entre le VEGF et les A β en identifiant les différents sites de liaison. Enfin, nous avons supposé qu'un gain de fonction de la voie du VEGF pourrait rétablir certaines des altérations synaptiques observées dans la pathologie.

c- Objectifs et méthodes

Notre projet de recherche analyse l'effet du VEGF sur les altérations synaptiques induites par les A β dans les neurones hippocampiques par des approches complémentaires. Tout d'abord, nous avons étudié l'expression spatiale du VEGF en lien avec les plaques amyloïdes par immunohistochimie, mettant en évidence une altération de sa répartition dans les cerveaux de patients atteints de la pathologie. La perturbation de cette voie pouvant aussi provenir d'une association entre les A β et le VEGF, nous nous sommes attachés à caractériser la liaison entre les oligomères et ce facteur de croissance par des approches biochimiques d'interaction protéique.

Nous avons ensuite analysé plus précisément la voie du VEGF, en évaluant par Western Blot l'état de phosphorylation de son principal récepteur en présence d'oligomères, à partir de modèles simplifiés de cellules hétérologues et de cultures primaires de neurones hippocampiques. Une perturbation de l'activation de son récepteur pourrait en effet expliquer une diminution de ses effets bénéfiques.

Après avoir étudié les altérations de la voie du VEGF, nous nous sommes penchés sur l'effet potentiel d'un gain de fonction de cette voie sur les altérations synaptiques induites par les oligomères solubles. Pour cela, nous avons examiné l'impact d'un apport de VEGF combiné aux A β sur l'efficacité de la transmission synaptique par électrophysiologie sur tranches d'hippocampe. L'expression et la phosphorylation des récepteurs au glutamate ont été caractérisées au niveau des synapses par fractionnement cellulaire et Western Blot. Nous avons ensuite analysé les mécanismes moléculaires mis en jeu par le VEGF pour réguler l'expression et la fonction de ces récepteurs synaptiques, en caractérisant les voies de signalisation impliquées.

Enfin, nous avons voulu explorer l'effet du VEGF sur les altérations induites par les A β à plus long terme, par une analyse en imagerie cellulaire à haute résolution. Nous avons donc utilisé des neurones hippocampiques génétiquement modifiés, qui expriment une

protéine fluorescente soluble, afin de modéliser en 3 dimensions la morphologie des épines dendritiques et analyser leurs altérations. L'ensemble de nos résultats a donné lieu à un article que j'intègre dans le manuscrit de la thèse.

RESULTATS

VEGF counteracts amyloid- β -induced synaptic dysfunction

Martin L^{1,2}., Bouvet P^{1,2}., Chounlamountri N^{1,2}., Watrin C^{1,2}., Besançon R^{1,2}., Meyronet D^{2,3,4}., Honnorat J^{1,2}., Buisson⁵, A., Salin PA^{2,6}., Meissirel C^{1,2}.

1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 1217, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5310, Institut Neuromyogène, Synaptopathies and Autoantibodies, Neuromyogène Institut, F-69000 Lyon, France; 2) Université Claude Bernard Lyon 1, F-69000 Lyon, France ; 3) INSERM U1052, CNRS UMR5286, Cancer Cell Plasticity, Cancer Research Centre of Lyon, F-69000 Lyon, France ; 4) Centre de Pathologie et de Neuropathologie Est, Hospices Civils de Lyon F-69000 Lyon, France; 5) GIN, Inserm U1216, Université Grenoble Alpes, 38000, Grenoble, France. 6) INSERM Unité 1028, CNRS UMR 5292, Forgetting processes and cortical dynamics, Lyon Neuroscience Research Center, F-69000 Lyon, France.

Introduction

Alzheimer disease (AD) is the most common form of dementia among elderly people and its prevalence increases dramatically with age (Winblad et al. 2016). AD causes a progressive decline in cognitive functions, and memory is one of the earliest functions to be affected (Dubois et al 2014). The pathological hallmarks of the disease are extracellular insoluble deposits of amyloid-beta ($A\beta$), which form senile plaques, together with intracellular neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein in neurons (Braak and Braak 1991, Serrano-Pozo et al. 2011). At early stages of AD, the best neural correlate of cognitive impairments is the hyperactivation and shrinkage of the hippocampal region, associated with the thinning of posterior cortical regions (Nestor et al. 2004, Putcha et al. 2011). Importantly, brain level of soluble $A\beta$ forms was shown to correlate much better than insoluble plaques with the severity of cognitive symptoms in AD, in link with synapse loss (Lue et al., 1999, McLean et al., 1999). Along these lines, compelling evidence has demonstrated that soluble oligomers of $A\beta$ ($A\beta_o$) derived from AD patients, mouse or cellular models of the disease, as well as synthetic preparations, have greater toxicity on neurons and synapses than insoluble $A\beta$ forms (Lambert et al. 1998, Walsh et al. 2002, Lesné et al. 2006). $A\beta_o$ are now considered to be the main trigger of the disease (Haass and Selkoe 2007, Viola and Klein 2015).

Mounting evidence has demonstrated that $A\beta_o$ bind to a subset of neurons and, more specifically, target excitatory synapses on dendritic spines (Lacor et al. 2004, 2007). Furthermore, the tracking of membrane-bound $A\beta_o$ in living neurons has revealed their ability to diffuse laterally, that results in their concentration in immobile clusters prominently at synapses (Renner et al. 2010). Recently, using a combination of high-resolution 3D imaging and biochemical fractionation approaches, the accumulation of $A\beta_o$ at postsynaptic sites has also been established in postmortem human AD brains (Koffie et al. 2012). This selective synaptic targeting of $A\beta_o$ has generated a growing interest in identifying cell surface proteins, as candidate $A\beta_o$ receptors, that can mediate their toxic effect on synapses (Smith and Strittmater 2017, Jarosz-Griffiths et al. 2016). The synaptic impact of $A\beta_o$ has been extensively studied in the hippocampus, *in vivo* and *in vitro*, using synthetic preparations or oligomeric preparations derived from human $A\beta$ overexpressing cells or from postmortem human AD brains. It consistently causes an impairment in glutamatergic transmission with a robust inhibition of a form of synaptic plasticity, the long-term potentiation or LTP (Lambert et al 1998, Walsh et al. 2002, Shankar et al. 2008). Synaptic strength during LTP largely depends on AMPA receptor (AMPA-R) trafficking and their recruitment to synaptic sites (Ehlers 2000, Esteban et al. 2003). Importantly, high brain level of $A\beta$ in transgenic models of the disease was shown to trigger the internalization and synaptic removal of AMPA-R, leading to synaptic depression (Almeida et al., 2005, Hsieh et al., 2006

Alfonso et al., 2014). Underlying mechanisms have been investigated and involve the A β -dependent upregulation of AMPAR ubiquitination and their dephosphorylation at serine 845 residue on the carboxy terminal of GluA1 subunit (Hsieh et al., 2006, Rodrigues et al., 2016). GluA1 phosphorylation state involving S845 residue was shown to be important for LTP maintenance and critical for long-term depression (LTD) (Lee et al. 2003). Thus, A β -induced changes in these molecular processes are thought to result in synaptic plasticity impairments and in cognition deficits associated with AD.

The canonical angiogenic factor VEGF was shown to regulate several neurobiological processes in the adult brain, with a key role in promoting hippocampal synaptic plasticity and memory consolidation in mice (Cao et al. 2004, Kim et al. 2008, Licht et al. 2011, De Rossi et al. 2016). VEGF overexpression obtained by intracerebral administration, gene transfer or in conditional transgenic mice improves associative memory performances (Cao et al. 2004, Licht et al. 2011), and short exposition to overexpressed VEGF is sufficient to impact on cognitive function independently of its effect on neurogenesis and angiogenesis (Licht et al. 2011). Our recent work with genetically engineered mice models further demonstrated that the VEGF receptor VEGFR2 expressed in neurons is required for the hippocampal-dependent forms of long-term synaptic plasticity and consolidation of memory (De Rossi et al. 2016). In addition, we reported that sustained activity in the hippocampus is able to trigger a rapid increase in endogenous VEGF release, which strongly suggests that activity-dependent secretion of VEGF is involved in synaptic plasticity (De Rossi et al. 2016). Thus, the VEGF-VEGFR2 pathway, aside from its well-known effect on brain blood vessels, has a powerful and direct impact on synapse structure and function.

Importantly, higher levels of VEGF in cerebrospinal fluid (CSF) have been associated during human aging with increased hippocampal volume and improved cognitive performances over time (Hohman et al. 2015). Furthermore, in presence of enhanced AD biomarkers in CSF, elevated VEGF levels are associated with less cognitive decline (Hohman et al. 2015), highlighting a potential neuroprotective role of VEGF in AD. Indeed, in transgenic mice models of the disease, VEGF triggers functional rescue in hippocampus-dependent learning and memory through a decrease in A β -mediated endothelial cell alterations and changes in brain vascularization (Garcia et al 2014, Religa et al. 2013, Herran et al. 2013). However, it remains to be demonstrated whether VEGF can exert a direct protective action on synapses challenged by A β through its receptors expressed on neurons.

Based on the current knowledge of VEGF involvement in synapse strengthening and memory consolidation, we proposed that VEGF is ideally poised to rescue synaptic alterations and related

cognitive deficits initiated by toxic A β . We hypothesized that increasing VEGF levels in the hippocampus may attenuate synaptic dysfunction triggered by A β through a direct action of VEGF on synapses. We therefore analyzed VEGF expression patterns in postmortem human AD brains and transgenic animal model of the disease, to determine to what extent VEGF pathway is affected in the disease. In addition, we developed a mechanistic approach by combining electrophysiological, 3D cell imaging, subcellular fractionation and protein-protein interaction techniques to investigate the impact of VEGF on the synaptic signature of A β -mediated toxicity in AD. Our findings demonstrated that VEGF is able to prevent LTP blockade as well as morphological alterations and loss of dendritic spines induced by A β . Moreover, we showed that VEGF downregulates the caspase 3-calcineurin pathway responsible for the dephosphorylation and internalization of AMPA-R, in response to A β . This VEGF action results in the stabilization of AMPA-R content at synaptic sites. Finally, we confirmed that VEGF accumulates in A β plaques in AD brains and uncovered the specific domains implicated in the A β -VEGF binding. Next, we revealed that this binding jeopardizes the activation of the VEGFR2 receptor by its ligand. Taken together, these results indicate a deficiency of available VEGF in AD and further show in *in vitro* models of the disease that an increase in VEGF level can rescue synaptic dysfunction due to toxic A β .

Materials & methods

Human brain sample

Postmortem tissue samples were obtained from the F2 region of the premotor cortex of 1 clinically and pathologically diagnosed Alzheimer's disease case and 1 control specimen. After pathological review each postmortem specimen was assigned a Braak score based on neuronal neurofibrillary tangle pathology (Braak & Braak, 1991) and a Thal score based on amyloid deposits (Thal et al., 2002). Cases with post-mortem intervals >24 h were excluded due to potential protein degradation with increasing post-mortem intervals. Frozen brain tissues were acquired from Hospices Civils de Lyon, Centre de Pathologie et Neuropathologie Est, Cardiobiotec and Neurobiotec bank (Lyon, France) in compliance with French ethical rules.

Animals

Embryonic day 17-18 (E17-18) C57Bl6J wild-type mice were used for primary hippocampal cell cultures, biochemical purification experiments and immunostainings. In addition, brain section immunostainings were performed on 4 months old wild type and transgenic heterozygous APP/PS1-21 male mice generated on a C57Bl6 background and expressing a transgene combining human APP with the Swedish mutation ($APP^{KM670/671NL}$) and mutated L166P human presenilin 1 (PS1) under the Thy1 promoter (Radde et al, 2006). Genotyping was performed to reveal the presence or absence of APP and PS1 transgenes. For electrophysiological field potential recordings C57Bl6J wild type (P40-P50) mice were also used. All animals were treated according to the guidelines approved by the French Ethical Committee (agreement number 87-848).

A β preparation and oligomerization

Synthetic A β_{1-42} , A β_{1-40} , their biotinylated forms and scrambled peptides were obtained as lyophilized samples from Bachem (A β_{1-42} H1368, b-A β_{1-40} H5914, b-A β_{1-42} H5642, scrambled A β_{1-42} H7406). Briefly, peptides were solubilized in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol to prevent oligomerization, then evaporated overnight under a chemical fume hood, and stored as a dried peptide film at -80°C until use, as previously described (Stine et al. 2003). A β oligomers were prepared extemporaneously by first dissolving the peptide film in 2 mM dimethyl sulfoxide with an additional dilution step to 100 μ M in ice-cold medium depending on experiments (Neurobasal, PBS or ACSF). Diluted peptides were subsequently incubated 24h at 4°C to form oligomers (A β_o), whereas monomers (A β_m) were directly used after the dilution step. For treatments, solutions of 100 μ M A β_o , A β_m or scrambled peptides were diluted in fresh appropriate medium to a final concentration of 500 nM for electrophysiological and morphological experiments or to 1 μ M for biochemical and immunohistochemical experiments. A β_o concentrations are corresponding to monomer equivalent concentrations, as previously reported (Lauren et al. 2009).

ELISA assays

Human VEGF DuoSet ELISA assays were purchased from R&D Systems (DY293B) to analyze binding between recombinant human VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ and synthetic biotinylated A β ₁₋₄₂ oligomers or A β ₁₋₄₀ monomers. Binding was determined using an indirect ELISA in which VEGF was used as the capture antigen and biotinylated A β for the detection. Briefly, 96 well plates were coated with 500 ng.mL⁻¹ of human VEGF₁₆₅ (R&D Systems, 293-VE) or VEGF₁₂₁ (R&D Systems, 4644-VS) in PBS overnight at RT. After a washing step in PBS 0.05% Tween 20, plates were blocked with 3% BSA in PBS for 1 h at RT. A β samples were added in triplicate from 0.1 μ g.mL⁻¹ to 50 μ g.mL⁻¹ (21 nM to 10.5 μ M for A β ₁₋₄₂, 22 nM to 11 μ M for A β ₁₋₄₀) and incubated for 2h at RT, washed with PBS 0.05% Tween 20 and subsequently incubated with HRP-conjugated streptavidin (1/40, R&D Systems, DY998) for 20 min at RT. After washing, substrate solution containing 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) and H₂O₂ was added to the wells and reaction was stopped by H₂SO₄. Absorbance was successively measured at 450 and 540 nm with a TECAN microplate reader and optical density values at 540 nm were subtracted from the ones at 450 nm to correct for optical imperfections of the plate. Unspecific A β binding was determined using non-coated wells.

Peptide arrays

Cellulose-bound peptide arrays encompassing the whole human (UniProtKB #P15692) and mouse (UniProtKB #Q00731) VEGF sequences, minus signal sequences, were synthesized by INTAVIS Bioanalytical Instruments. Overlapping 15-mer peptides were shifted by 6 aa for both human and murine sequences and two copies of the same array were spotted on the slide for quality control. Arrays were blocked for 2 h in Tris buffered saline, 1% Tween 20, 5% BSA to prevent unspecific binding, and subsequently probed for 15 h at 4°C with biotinylated A β ₁₋₄₂ oligomers (10 μ g.mL⁻¹ – 2.11 μ M), biotinylated A β ₁₋₄₀ monomers (10 μ g.mL⁻¹ – 2.19 μ M), or vehicle used as a control. Synthetic A β ₁₋₄₀ monomers were used as controls instead of A β ₁₋₄₂ due to aggregation properties of A β ₁₋₄₂ over time. After washing in TBS 1% Tween 20, arrays were incubated with HRP-conjugated Streptavidin (1/10000, Sigma Aldrich #S5512) for 2h at RT. Peptide interaction was detected using SuperSigna West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Non-specific A β binding was determined using control peptides. Spots were quantified using Image J software (National Institutes of Health) and OD values measured with control incubation assigned as background. For each experiment, OD values reflecting binding to the duplicated spots were used to calculate the mean value for each spot.

Electrophysiology

Field potential recordings were performed on acute coronal hippocampal slices from wild type C57Bl6J female mice (P40-50) to measure synaptic response and LTP. Acute coronal hippocampal slices (400 μ m thick) were cut using a vibratome (Leica VT1000S) and incubated at room temperature in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 124 NaCl, 10 glucose, 1.25 NaH₂PO₄, 2.5

KCl, 26 NaHCO₃, 1.3 MgCl₂, and 2.5 CaCl₂, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4) for 1 h prior to recording. Field extracellular excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded in stratum radiatum of CA1 region in presence of gamma-aminobutyric acid (GABA)-A receptor antagonist picrotoxin (100 μM, Sigma). Electrical stimulation was realized with a bipolar tungsten electrode and fEPSPs were measured using borosilicate glass microelectrodes (~1-3 MΩ) filled with NaCl (1 M), or ACSF, and were collected at 0.2 Hz. We used fEPSPs initial slope to quantify synaptic responses. After baseline recordings of synaptic activity evoked at 0.1 Hz for 10 minutes, slices were treated with Aβ₀ (500 nM) or vehicle for 40 min before LTP induction. Local VEGF applications (500 ng.mL⁻¹, R&D system) were subsequently performed using a Picospritzer II (Pulse 0.1 Hz; 50ms duration) and a glass pipette (10-20 μm aperture) located in the vicinity of the recording electrode, 15-20 min before LTP induction. Input/output (I/O) curves were assessed by progressively raising the stimulation intensity from 20 to 200 μA. Long term potentiation (LTP) was induced by a theta burst stimulation (TBS), which consisted of 10 trains separated by 30 s, each train composed of 6 bursts at 5 Hz and each burst providing 4 pulses at 100Hz. After LTP induction, fEPSPs were recorded for at least 60 min, amplified and low-pass filtered at 3 kHz using a differential amplifier (DAM80 WPI). LFP recording were sampled at 10 kHz. Data acquisition and analyses were carried out using a National Instrument interface coupled with Elphy software (G. Sadoc, UNIC-CNRS, Gif-sur-Yvette, France).

Cultures and treatments

Primary hippocampal cell cultures were prepared from E17-18 C57Bl6 mice. Briefly, hippocampi were removed, cut into pieces, digested in trypsin (0.5% w/v) and DNase (0.01% w/v) and triturated in Neurobasal medium supplemented with L-glutamine (2 mM), 2% B27 (Gibco 17504001), 1% penicillin-streptomycin (10000 U/mL) and D-Glucose, 0.65 mg/mL. Hippocampal cells were then plated onto poly-L-lysine coated coverslips or dishes at either low (1.9 x 10⁴ cells/cm²) or high density (5 x 10⁴ cells/cm²), depending on experiments (Supplementary table 1). Cells were subsequently cultured in supplemented Neurobasal medium at 37°C under 5% CO₂, one-half of the media changed twice a week. For biochemical assessment of receptor activation, post-synaptic enrichments and immunocytochemistry, cell cultures were used after 14-15 days *in vitro* (DIV) and treated for 1h with 1 μM synthetic Aβ₁₋₄₂ oligomers (Aβ₀) or their control peptides, with or without 50 ng/mL of recombinant human VEGF₁₆₅ (R&D systems). In experiments designed to study Aβ synaptic targeting by immunocytochemistry, cultures were treated for 30 minutes with 0.5 μM synthetic Aβ₁₋₄₂ oligomers or monomers, supplemented or not with 50 ng/mL of recombinant human VEGF₁₆₅. For morphological analysis, cultures were treated at 17-18 DIV with 500 nM Aβ₀ or their control peptides, with or without 50 ng/mL VEGF₁₆₅, for 24 h.

Postsynaptic density enrichment and immunoblotting

PSD enrichment: Postsynaptic density (PSD) fractions were prepared from control and treated 14-15 DIV hippocampal cell cultures. 1 hour after treatments, hippocampal neurons were rinsed twice with

cold D-PBS (Gibco), harvested in cold buffer containing 0.32 M sucrose and 10 mM HEPES and cOmplete protease inhibitor cocktail (Roche, 04693159001) at pH 7.4 and centrifuged twice at 800 g for 10 min to remove nuclei and large debris. A supernatant fraction of 10 μ l per sample was collected for total lysate immunoblotting. Crude membrane fractions were obtained after a 12,000 g centrifugation step for 20 min, resulting pellets were resuspended in EDTA buffer to chelate calcium (4 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4) and subsequently centrifuged twice at 12,000 g for 20 min to pellet synaptosomal fraction. Pellets were then incubated in a low-triton buffer for 1 hour (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.5% triton X, pH 7.2) and centrifuged at 12,000 g. The supernatants contained the non-postsynaptic density fraction (non-PSD). The resulting pellets were further extracted with a high-detergent buffer during 1 hour (20 mM HEPES, 0.15 mM NaCl, 1% triton X100, 1% deoxycholic acid, 1% SDS, pH 7.5) and centrifuged 15 minutes at 10,000 g to obtain the postsynaptic density fraction (PSD) in the supernatants. Total lysate samples were lysed in 50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, pH 7.5 and all samples were kept at -20°C until use.

Immunoblotting: PSD and non-PSD fractions (5-10 μ g of proteins) were subjected to immunoblotting analysis using 3-8% or 4-12% gradient SDS-PAGE gels (Criterion XT, Biorad) for glutamate receptor or signaling protein analysis, respectively. Total lysates (7.5-10 μ g of proteins) were also separated on 4-12% SDS-PAGE gels. Gels were transferred on nitrocellulose membranes and immunoblotted with dedicated antibodies (supplemental table 2) after a 45 minutes blocking step in Tris-buffered saline, 0.1% Tween, 5% milk or BSA, pH 7.6. Membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies diluted in Tris-buffered saline, 0.1% Tween, pH 7.6, with 2% milk or 2% BSA for total or phosphorylated protein detection, respectively. Appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were applied for 2h at room temperature (Goat anti-rabbit HRP or goat anti mouse HRP, 1/10,000 or 1/20,000 respectively, Jackson Immunoresearch). Proteins were visualized with an ECL detection system (ThermoFisher Scientific) and band intensities quantified densitometrically with Image J software (National Institutes of Health).

Immunohistochemistry and hippocampal neuron immunostaining

Immunohistochemistry: Heterozygous APP/PS1-21 and wild type male mice were killed by decapitation after deep isoflurane gas anesthesia and brains were rapidly dissected and fresh frozen at -50°C. Postmortem human brain samples through F2 prefrontal cortex were obtained from histologically confirmed AD cases and age-matched controls. Frozen serial sections were cut with a Cryostat at 10 and 7 μ m thick for mouse and human brains respectively, and were further processed for immunostaining. Briefly, sections were fixed in 4% PFA with 4% sucrose for 10 minutes and rinsed twice in PBS. In addition, three in 50th serial mouse brain sections were stained with 0.05% Thioflavin-S (Sigma T1892) in 50% ethanol for 8 min to label dense-core plaques, washed twice in 80% ethanol for 5 min, and rinsed 3 times in PBS. Subsequently, sections were permeabilized in 0.3%

Triton-X-100 in PBS with 1% BSA and stained overnight at 4°C with antibodies directed against VEGF and β -amyloid (supplementary table 2). Next, they were incubated for 2 hours at room temperature with appropriate fluorescently conjugated secondary antibodies: Alexa Fluor 488 for A β and Alexa Fluor 555 for VEGF detection. Before DAPI counterstaining, human sections were processed for an additional autofluorescence quenching step in 0.1% Sudan Black B (Merck) in 70% ethanol for 10 minutes to decrease lipofuscin fluorescence. Finally, sections were counterstained with DAPI (Roche, 10236276001) prior to mounting them with FluorSave reagent (Calbiochem).

Hippocampal neuron immunostaining: Hippocampal neuron cultures were grown on poly-L-lysine-coated glass coverslips for 14-15 DIV to analyze surface receptor expression, or 18-19 DIV for morphological analysis. Culture were fixed with 4% paraformaldehyde, 4% sucrose in 0.1 M phosphate buffer at RT prior to immunostaining under non-permeabilizing (cell surface GluA1 immunostaining) or permeabilizing (GFP immunostaining) conditions. After a blocking step in non-permeabilizing (PBS, 1% BSA) or permeabilizing (PBS, 0.3% Triton-X-100, 1% BSA) buffer, antibodies recognizing the extracellular domain of GluA1 or GFP (supplementary table 2) were used overnight at 4°C in appropriate blocking solution. After rinses, cells were incubated with appropriate Alexa conjugated secondary antibody combined or not with alexa fluor 546 phalloïdin for 2 hours at RT. Cultures were subsequently counterstained with DAPI (10 ng/mL) and mounted in FluorSave reagent (Calbiochem).

Hippocampal neuron transfection

11 DIV hippocampal neurons were transfected with a pEGFP-C1 plasmid coding for enhanced green fluorescent protein (eGFP) under a CMV promoter (GenBank Accession #: U55763), using Lipofectamine LTX (Invitrogen). Briefly, cells were treated with a mix including LTX, DNA and Plus reagent in OptiMEM (Gibco, 31985-070). Transfection medium was removed after 5h and replaced with fresh Neurobasal medium supplemented with L-glutamine (2 mM), 2% B27, without antibiotics, for 24h. Next, half of the medium was changed for fresh supplemented Neurobasal medium with antibiotics. Hippocampal neurons were treated at 6 days post-transfection for 24h with A β or control peptide, supplemented or not with VEGF.

Image acquisition and analysis

Images were obtained using a Zeiss Imager Z1 equipped with Apotome technology for human brain section and hippocampal cell surface immunostainings, and with a slide scanner Axio Scan.Z1 for immunostaining of transgenic mice brain sections. For each image acquisition system identical acquisition parameters were used between treated conditions, and images were further analyzed with image J software (MFB Image J, McMaster Biophotonics Facility). Data were expressed as density of Thioflavin-S positive plaques, with or without VEGF expression, or density of GluA1 positive clusters per surface area. For morphological analysis of dendritic spines, hippocampal pyramidal cells

expressing eGFP were selected based on their morphology and imaged using a confocal Leica TCS-SP5 X microscope equipped with a white light laser, a 63x objective and an additional zoom factor (3x). 3D confocal z-stack images were analyzed using Imaris Software (Bitplane). Image acquisition and subsequent analyses were performed by an investigator blind to cell culture treatments.

3D dendritic spine modeling: Z-stack images were subsequently deconvolved using Huygens software (Scientific Volume Imaging), and spine density and morphology were analyzed with Imaris software. Briefly, fragments of secondary and tertiary dendrites were selected and modelled with filament tracer with a total of 198 dendritic fragments measuring 27 μm in average that have been analyzed for 66 hippocampal pyramidal cells. After automatic image thresholding, quantification and classification of spines were performed with Spine Classification MATLAB plugin. Five algorithms were used to classify spines according to Imaris measured parameters: Stubby spines: $\text{length}(\text{spine}) < 0.7$ and $2 * \text{min_width}(\text{spine}) > \text{max_width}(\text{head})$; Mushroom spines: $\text{max_width}(\text{head}) > \text{min_width}(\text{spine}) * 2$ and $\text{length}(\text{neck}) < \text{max_width}(\text{head}) * 2$; Thin spines: $\text{max_width}(\text{head}) > \text{min_width}(\text{spine}) * 1.5$ and $\text{length}(\text{neck}) > \text{max_width}(\text{head}) * 2$; Filopodia: $1.3 * \text{mean_width}(\text{neck}) > \text{mean_width}(\text{head})$ and $\text{length}(\text{spine}) > 2$; Others: true. All spines which remained unclassified (around 10%), due to their ambiguous shape, were classified as “Others” and integrated to the total spine density analysis.

For analysis of A β synaptic targeting, images were obtained using a TCS-SP5X confocal microscope equipped with a 63x objective and an additional zoom factor (3x) under identical acquisition parameters. Images were subsequently deconvolved using Huygens Professional software and analyzed with Icy software. Image thresholding was applied for each channel to remove noise and Spot Detector plugin was used to detect significant signal. Detected spots or clusters were defined as region of interest (ROI) and subsequently launched with Colocalization studio plugin to assess the percentage of colocalized clusters. Data were expressed as density of PSD95, Bassoon or A β positive clusters per 100 μm^2 surface area and by percentage of colocalized clusters.

Statistical analyses

All data were expressed as mean \pm SEM, unless stated otherwise. Distributions were tested for normality with variance equality assessed between groups. Sample size was determined based on previous studies from the literature and pilot experiments. For protein activation, PSD, cluster density and dendritic spine analyses, protein expression level as well as cluster and spine density were compared for statistical significance between groups using a Kruskal Wallis with a Dunn's *post-hoc* test (Prism, GraphPad). For ELISA assay, significant differences between curves were assessed comparing fits of nonlinear models (Prism). For electrophysiological recordings, statistical analysis of slope variations in fEPSPs between treatments was performed using a Kruskal Wallis followed by an unpaired two-tailed t-test.

Table 1

Immunostainings	Figure panels	1: A	1: C	5: D, E	7: B, D	7: C	S1: B	
	Independent experiments	1	2	2	3	3	2	
	Human brain sample per condition	1						
	Mouse brain sample per group		3					
	Cell culture seeding density			18,750 cells/cm ²	50,000 cells/cm ²	50,000 cells/cm ²	18,750 cells/cm ²	
	Wells per condition				Ctrl: 9 A β : 9 Ctrl + V: 7 A β + V: 7		A β m: 6 A β : 6 A β m + V: 5 A β + V: 4	
	Cells per condition			Ctrl: 7 A β : 9 Ctrl + V: 8 A β + V: 10	Ctrl: 16 A β : 19 Ctrl + V: 11 A β + V: 10			
Analysed clusters or spines per condition			Ctrl: 712 A β : 818 Ctrl + V: 476 A β + V: 1117		Ctrl: 1094 A β : 1992 Ctrl + V: 878 A β + V: 865			
Biochemistry	Figure panels	2: A	2: D	3: B	3: D	4: B	4: D	5: B
	Independent experiments	3	4	7	7	GluA1: 10 GluN1: 9	CamKII: 5 Fyn: 8 Cal A: 7 Casp 3: 7	s845: 10 s831: 9
	Cell culture seeding density			50,000 cells/cm ²	70,000 cells/cm ²	70,000 cells/cm ²	70,000 cells/cm ²	70,000 cells/cm ²
	Slides per condition		4					
Wells/Dishes per condition	9		7	14	GluA1: 20 GluN1: 18	CamKII: 10 Fyn: 16 Cal A: 14 Casp 3: 14	s845: 20 s831: 18	
Electrophysiology	Figures panels		6: A, B			6: C		
	Independent experiments		Ctl: 8 VEGF: 5 A β : 11 A β + V: 9			Ctl: 5 VEGF: 4 A β : 4 A β + V: 4		
	Mice per experiment		Ctl: 8 VEGF: 5 A β : 11 A β + V: 9			Ctl: 5 VEGF: 4 A β : 4 A β + V: 4		
Slices per condition		Ctl: 8 VEGF: 6 A β : 12 A β + V: 9			Ctl: 9 VEGF: 7 A β : 8 A β + V: 6			

Table 2

	Antibody against	Dilution	Manufacturer	Ref	Host
Immunoblotting	GluA1	1/500	Millipore	04855	Rabbit
	pGluA1 (S845)	1/500	Millipore	Ab5849	Rabbit
	pGluA1 (S831)	1/500	Millipore	04823	Rabbit
	GluN1	1/500	Millipore	04532	Mouse
	CamKII	1/10,000	Abcam	Ab22609	Mouse
	pCamKII (T286)	1/500	Abcam	Ab5683	Rabbit
	Fyn	1/1000	Cell Sign Tech	4023	Rabbit
	pSFK (T416)	1/1000	Cell Sign Tech	2101	Rabbit
	Calcineurine A	1/1000	Abcam	Ab3673	Rabbit
	Pro-Caspase 3	1/1000	Cell Sign Tech	9662	Rabbit
	Cleaved-Caspase 3	1/500	Cell Sign Tech	9661	Rabbit
	PSD 95	1/1000	Cell Sign Tech	3450	Rabbit
	Synaptophysin (SYP)	1/10,000	Millipore	MAB368	Mouse
	B-actin	1/40,000	Sigma Aldrich	A1978	Mouse
	VEGF-R2	1/1000	Cell Sign Tech	2479	Rabbit
	pVEGF-R2 (Y1175)	1/250	Cell Sign Tech	2478	Rabbit
	<i>Rabbit HRP</i>	<i>1/10,000</i>	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	<i>111036003</i>	<i>Goat</i>
	<i>Mouse HRP</i>	<i>1/10,000-20,000</i>	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	<i>115036003</i>	<i>Goat</i>
Immunocytochemistry	Antibody against	Dilution	Manufacturer	Ref	Host
	GluA1	1/60	Millipore	PC246	Rabbit
	EGFP	1/1000	Millipore	Ab3080	Rabbit
	<i>Rabbit (Alexa fluor 488)</i>	<i>1/1000</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>A11034</i>	<i>Goat</i>
	Dye	Dilution	Manufacturer	Ref	Host
	Phalloïdine (alexa fluor 546)	1/40	Invitrogen	A22283	nc
DAPI	10 ng/mL	Roche	10236276001	nc	
Immunohistochemistry	Antibody against	Dilution	Manufacturer	Ref	Host
	β-Amyloid 17-24	1/500	Biologend	800710	Mouse
	VEGF	1/200	Santa Cruz	SC152	Rabbit
	<i>Mouse (Alexa fluor 488)</i>	<i>1/1000</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>A11029</i>	<i>Goat</i>
	<i>Rabbit (Alexa fluor 555)</i>	<i>1/1000</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>A21429</i>	<i>Goat</i>
	Dye	Dilution	Manufacturer	Ref	Host
	Thioflavine S	0.05%	Sigma	T1892	nc
DAPI	10 ng/mL	Roche	10236276001	nc	

Results

Accumulation of VEGF in amyloid plaques

Abnormal level of VEGF has been associated with A β deposition in Alzheimer's disease (Thomas et al. 2015) and our goal was to decipher the spatial relationship between endogenous VEGF and insoluble A β plaques in severe AD cases and age-matched controls in post-mortem frontal cortex. As expected, amyloid plaques containing insoluble A β_{1-42} were identified only in the cortex of AD patients but not in age-matched controls (Fig 1A). Double-labeled immunolabeling shows that VEGF and A β were expressed in partially overlapping patterns centered on insoluble A β -positive amyloid plaques. Notably, a gradient of VEGF expression was seen with higher VEGF levels in the core of A β plaques to lower levels in their periphery. In addition, high VEGF immunoreactivity was detected in blood vessels and ramified cells located in close proximity to plaques (Fig 1A). We further assessed whether co-localization of VEGF and A β can be replicated in the APP/PS1-21 mouse model of AD, at early stages of A β deposition. Plaque load was characterized by thioflavin S staining of amyloid fibrils in brain sections from 4 months old APP/PS1 mice. Assessment of amyloid burden confirmed previous findings (Radde et al. 2006, Fig 1B), with 0.53 ± 0.28 % (N=3, \pm SEM) of the neocortical area occupied by fibrillar A β plaques (Ulrich et al. 2014). Furthermore, analysis of VEGF immunostaining revealed that 20.79 ± 5.28 % of these amyloid plaques were positive for VEGF (N=3, \pm SEM, Fig 1C). These results suggest that A β -VEGF interaction is present in insoluble A β deposits in brain parenchyma from the early stages of A β deposition.

A β oligomers directly interact with matrix-binding and diffusible VEGF isoforms

To further determine to what extent VEGF also associates with the soluble pool of A β , we prepared synthetic A β_{1-42} monomers and oligomers (A β_o) and investigated their binding abilities to soluble or matrix-binding VEGF isoforms, VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅, respectively. A β monomers (A β_m) failed to bind to either immobilized VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅. In contrast, saturation curves showed that A β_o bound to both VEGF isoforms, demonstrating direct interactions between A β_o and VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ (Fig 2A). However, we observed that the binding was significantly reduced between A β_o and VEGF₁₂₁ (Fig 2A), indicating that VEGF₁₆₅ has additional binding sites for A β_o compared to VEGF₁₂₁.

To further characterize which domains of the VEGF isoforms mediated the binding to A β_o , we designed peptide arrays with overlapping 15-mer peptides that encompass the entire length of human and murine VEGF protein sequence (with a 6aa shift). Linear protein sequences include, from the N to the C terminal parts, two binding sites to VEGFR1 and VEGFR2, two heparin binding domains (HBD 1 and HBD 2) and a neuropilin binding site (Fig 2B). Notably, matrix-binding or diffusible VEGF isoforms, generated through alternative splicing of the pre-messenger RNA, differ by the presence or

absence of HBD 1 and HBD 2 (Ferrara et al. 2003). Peptide arrays were incubated with biotinylated A β m, A β o or vehicle and positive binding sites were visualized as dark labelled spots. Reproducibility of the positively labelled pattern has been verified on duplicated peptide arrays present on the same slide. In addition, control experiments were performed by incubating peptide arrays with the detection agent alone, where only the biotin positive control was labelled. Our data showed that A β o incubation induced a strong labelling of some spots distributed over the human and murine protein sequences, with one spot surrounded by several weaker neighboring spots in the C terminal region (Fig 2C). In contrast, almost no labeling was obtained after A β m incubation, except for one weak spot. A heat map illustrating the semi-quantitative analysis of 4 independent experiments revealed that 3 main sites of human and murine VEGFs bound A β o, namely the N terminal part (for the human protein the 3rd spot), the VEGFR2 binding site (13th spot) and HBD 1 with a slight involvement of HBD 2 (from 17th to 24th and 27th spot; Fig 2D). These data are consistent with our previous findings showing that VEGF₁₆₅ expressing HBD 2 has additional binding sites for A β o compare to VEGF₁₂₁ lacking both HBD 1 and HBD 2.

VEGF counteracts A β o-induced impairment in VEGFR2 activation

To investigate whether A β o impede VEGFR2 signaling mediated by VEGF, we examined receptor activation in HEK cells engineered to overexpress VEGFR2, and acutely treated with A β m or A β o vehicle, supplemented or not with VEGF. Western blotting analyses showed that basal VEGFR2 activation was not affected by treatments. In addition, VEGF induced VEGFR2 activation in all conditions, as revealed by the increased phosphorylation of VEGFR2-P₁₁₇₅ (100 ± 20.62 % in A β m versus 275.9 ± 22.8 % with A β m+VEGF, N=7-7, $p < 0.01$, and 80.13 ± 9.08 % in A β o versus 161.7 ± 11.77 % with A β o+VEGF, N=7-7, $p < 0.05$, Fig 3A,B). However, A β o significantly reduced the increase in VEGFR2 phosphorylation triggered by VEGF (Figure 3 A, B). Thus, acute exposure to A β o was sufficient to trigger a reduction in VEGF-dependent VEGFR2 activation, suggesting that A β o may inhibit the binding of VEGF to its receptor VEGFR2. To assess whether A β o-VEGF interaction also impaired VEGFR2 activation in physiological conditions, we used cultured hippocampal neurons exposed for 1h to A β o or control peptide, with or without VEGF application. ELISA quantification showed that endogenous VEGF is released in the culture medium (638 ± 0.02 pg VEGF per mL, N=6) and can therefore stimulate VEGFR2 receptors expressed on hippocampal neurons (De Rossi et al. 2016). When hippocampal neurons were exposed to A β o, the phosphorylated to total VEGFR2 ratio was significantly reduced compared to control condition, indicating an impairment in VEGFR2 activation mediated by endogenous VEGF (100 ± 6.85 % in control versus 36.99 ± 4.69 % with A β o, N=7-7, $p < 0.05$, Fig 3C, D). To determine if increasing VEGF levels might reverse the deficit in VEGFR2 activation due to A β o, we simulated hippocampal neurons with combined A β o and VEGF treatment. Immunoblotting analyses revealed that combined treatments

normalized VEGFR2 activation to control level and prevented the A β -induced decrease (98.66 ± 6.32 % with combined A β and VEGF treatments versus 36.99 ± 4.69 % with A β alone, N=7-7, $p < 0.05$, Fig 3C, D). Taken together, these data revealed that A β does not impact on VEGFR2 phosphorylation induced in the absence of its ligand. Furthermore, they demonstrated that exogenous application of VEGF is able to counteract A β -induced reduction in ligand-dependent VEGFR2 activation. Thus, these findings suggested that A β -VEGF binding interactions might play an important role in regulating VEGFR2 activation level in pathological context.

Next, we assessed whether increasing VEGF levels mitigates A β -induced defects in neuronal VEGFR2 activation by triggering a decrease in A β synaptic targeting. We thus analyzed A β cell surface staining on hippocampal neurons treated for 30 min with biotinylated A β m or A β o, with or without VEGF. Synapses were identified with the presynaptic marker Bassoon and the postsynaptic density marker PSD95, and biotinylated A β with streptavidin. A β cell surface staining dramatically increased with A β o compared to A β m treatments (Supplemental Fig 1A), confirming that A β o selectively bound to hippocampal neuron surface. Furthermore, quantification of colocalized Bassoon and PSD95 synaptic clusters with A β staining indicated that exogenous VEGF application does not interfere with A β o synaptic targeting (Supplemental Fig 1A, B). Thus, VEGF is able to counteract A β o-dependent inhibition of neuronal VEGFR2 activation without impeding A β o synaptic targeting.

VEGF rescues the synaptic content in glutamate receptors challenged by A β o

VEGFR2 signaling in neurons is directly implicated in glutamate receptor content at synapses by triggering synaptic incorporation of AMPA and NMDA receptors (De Rossi et al. 2016). Moreover, evidence indicates that synaptic glutamate receptors are instead removed from the cell surface and internalized in response to soluble A β o (Hsieh et al. 2006). We thus examined whether A β o-induced loss of glutamate receptors at synapses can be counteracted by VEGFR2 signaling in response to VEGF. Established biochemical fractionation method of PSDs (De Rossi et al. 2016, El Gaamouch et al. 2012) was used to determine glutamate receptor content at synapses in hippocampal cultures treated with a combination of A β o or control peptide, \pm VEGF. We validated the purification protocol with the prominent expression of PSD95 and presynaptic synaptophysin in PSD and non-PSD fractions, respectively (Fig 4A). Immunoblotting showed that the expression level of GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits was similar in all conditions in PSD fractions (Fig 4A, B). In contrast, the content of GluA1 AMPA receptor subunit was significantly reduced after A β o treatment compared to control (100 ± 6.92 % in control versus 55.5 ± 9.17 % with A β o, N=10-10, $p < 0.05$; Fig 4A, B), in agreement with the previously described removal of synaptic GluA1 due to A β accumulation

(Almeida et al. 2005, Hsieh et al. 2006). Importantly, co-administration of A β and VEGF prevented this A β -dependent decrease in postsynaptic AMPA receptors (110 ± 12.6 % with combined A β and VEGF treatment versus 55.5 ± 9.17 % with A β , N=10-10, $p < 0.01$) (Fig 4A-B). Together, these data revealed that VEGF interferes with *A β -dependent* removal of GluA1 from postsynaptic sites, suggesting that VEGF prevents a molecular pathway implicated in GluA1 redistribution and/or internalization.

VEGF effect involves a downregulation of the Caspase-3-calcineurin pathway

To underscore the molecular mechanisms underlying redistribution of the GluA1 pool of receptors that is present at PSDs, we examined the signaling pathways activated by combined A β and VEGF as well as single applications. Transient activation of the caspase-3 protease has been involved in the regulation of GluA1 receptor internalization at synapses, through the selective activation of the calcineurin A phosphatase in dendritic spines (Hsieh et al. 2006). In addition, caspase-3 – calcineurin pathway has been shown to underlie synaptic alteration in a mouse model of AD, with the selective removal of GluA1 from the postsynaptic sites (D'Amelio et al. 2011). Thus, given the key role of this pathway in the regulation of postsynaptic AMPA receptor content in pathological AD context, we analyzed the modulation of its expression and activation in PSDs purified from treated hippocampal cultures. We examined caspase-3 activation by measuring its proteolytic cleavage with the expression level of its inactive pro-form and cleaved active form, using two dedicated antibodies. Similarly, immunoblotting of the full-length catalytic domain of calcineurin A (60 kDa) and its cleaved form lacking the autoinhibitory domain (45 kDa), allowed us to study calcineurin proteolytic activation. Proteolytic activation of these signaling molecules was expressed as the ratio between the cleaved and the full-length or pro-form. A β application resulted in a significant increase in caspase-3 and calcineurin activation in PSDs, compared to control condition (for caspase-3: 100 ± 6.35 % in control versus 205.6 ± 9.66 % with A β , N=7-7, $p < 0.05$; for calcineurin A: 100 ± 9.83 in control versus 191.6 ± 15.28 % with A β , N=7-7, $p < 0.01$; Fig 4C, D), consistent with the reported increase in caspase-3 activity in synaptosome derived from transgenic mouse model of AD (D'Amelio et al. 2011). In contrast, combined A β and VEGF treatment counteracted A β -induced enhancement in proteolytic activation and normalized both caspase-3 and calcineurin A activation ratios (for caspase-3: 76.7 ± 14.38 % with A β and VEGF versus 205.6 ± 9.66 % with A β , N=7-7, $p < 0.001$; for calcineurin A: 112.6 ± 7.71 % with A β and VEGF versus 191.6 ± 15.28 % with A β , N=7-7, $p < 0.05$; Fig 4C, D). In addition, we monitored CaMKII activation that promotes GluA1 receptor anchorage at synapses (Opazo et al. 2010), as well as Src family kinase activity for their major role in NMDA receptor regulation (Salter and Kalia 2004). None of the applied treatments had an effect on Fyn or CaMKII activation compared to control condition (Fig 4C, D). Thus, collectively these findings underscore that

VEGF limits the activation of the caspase-3-calcineurin pathway in postsynaptic sites of neurons challenged by A β .

VEGF restores GluA1 phosphorylation and cell surface expression impeded by A β

Mobilizing new AMPA receptors that can be recruited to synapses in response to synaptic activity critically depends on their phosphorylation status (Lee et al 2000). Moreover, their dephosphorylation triggered by calcineurin results in their removal from postsynaptic sites and internalization (Miñano-Molina et al. 2011). Therefore, we immunoblotted total hippocampal lysates after A β or control treatment combined or not with VEGF, to examine GluA1 phosphorylation state at major sites known to regulate receptor trafficking - S831 and S845 - (Esteban et al., 2003, Roche et al 1996, Malinow 2003). A β treatment caused a significant reduction in the level of phosphorylated S845 residue on GluA1, compared to control condition (100 ± 4.85 % in control versus 65.9 ± 4.56 % with A β , N=10-10, $p < 0.001$; fig 5A, B), as previously reported (Miñano-Molina et al. 2011). However, when VEGF was associated with A β application, it significantly enhanced levels of S845 phosphorylation compared to A β condition alone (98.75 ± 3.74 % with A β and VEGF versus 65.9 ± 4.56 % with A β , N=10-10, $p < 0.001$: Fig 5A, B). Importantly, these effects were specific for S845 phosphorylation, as the different treatments failed to induce a change in S831 phosphorylation level of GluA1 (Fig 5A, B). Furthermore, as S845 phosphorylation directly contributes to GluA1 trafficking to the cell surface (Esteban et al., 2003), we selectively labelled the surface pool of GluA1 with a non-permeabilizing immunostaining in hippocampal cultures exposed to the treatments described above. A representative labeling of GluA1 dendritic surface expression with the F-actin staining of spines is illustrated for each treatment in Fig 5C. Quantitative imaging showed that A β administration reduced the average size of GluA1 clusters without affecting their surface density, compared to control condition (cluster size: 100 ± 3.98 % in control versus 75.99 ± 3.64 % with A β , N=7-9, $p < 0.05$; Fig 5E). In this cell surface expression assay, we recapitulated the loss of surface GluA1 reported by others 1 hour after A β exposure (Zhao et al. 2010). Conversely, we showed that combined A β and VEGF treatment prevented A β -induced reduction in cluster size and restored them to control values (113.1 ± 12.02 % with A β and VEGF versus 75.99 ± 3.64 % with A β alone, N=10-9, $p < 0.05$: Fig 5E). Therefore, addition of VEGF to A β treatment was sufficient to counteract the A β -mediated loss of surface GluA1, in agreement with the maintenance of GluA1 S845 phosphorylation observed in the same condition.

VEGF rescues A β -induced impairment in LTP

GluA1 trafficking and related phosphorylation processes play a critical role in synaptic plasticity (Citri and Malenka 2008). Our current data indicate that these processes are controlled in the opposite way depending on whether A β is associated with VEGF or not. Moreover, there is mounting evidence indicating that invalidation of VEGFR2 in neurons or trapping of endogenously released VEGF is detrimental to LTP in the hippocampus (De Rossi et al. 2016, Licht et al. 2011). Thus, to assess the biological activity of A β and/or VEGF on synaptic function, we used acute hippocampal slices from adult mice to induce LTP by theta burst stimulation (TBS) of Schaeffer collaterals and recorded local field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) in the CA1 region. A β treatment was applied in the bath for 40 minutes before TBS, whereas VEGF was administrated locally in the vicinity of the recording electrode to minimize indirect effects, 15 minutes prior to TBS. Basal synaptic transmission of CA1 pyramidal cells was first assessed by measuring the input-output relationships of evoked fEPSPs. The curves showing fEPSPs slopes as a function of stimulation intensities and fiber volley amplitude showed no significant differences between the treatment groups (Fig 6C). The application of TBS failed to induce a robust LTP in the CA1 region of A β -treated hippocampal slices, in line with previous work (Walsh et al., 2002). In these slices, the LTP amplitude was reduced as soon as 5 minutes after TBS and remained impaired at 1h post-stimulation, compared to control slices (278.46 ± 26.38 % in control slices versus 149.47 ± 22.32 % in A β -treated slices, N=8-12, $**P < 0.005$; Fig 6A-B). Importantly, when VEGF was associated to A β , TBS induced a sustained increase in fEPSP slope, characteristic of LTP, which significantly differed from the responses obtained in A β -treated slices (233.98 ± 47.75 % in A β and VEGF treated slices versus 149.47 ± 22.32 % in A β -treated slices, post-hoc test $*P < 0.03$; N=10-12, Fig 6A, B). LTP measured in slices with combined treatment reached the same level 1h after TBS as in control condition (278.46 ± 26.38 % in *control* slices versus 233.98 ± 47.75 % in A β and VEGF treated slices, post-hoc test NS, N=8-10; Fig 6A, B). Moreover, addition of VEGF alone did not further enhance TBS-induced LTP compared to control condition (278.46 ± 26.38 % in *control* slices versus 236.60 ± 56.12 % in VEGF treated slices, post-hoc test NS; N=8-6, Fig 6A, B). Thus, we reasoned that if VEGF underlies the same potentiation mechanism than the one occurring during LTP, VEGF should have no further potentiating effect than the one obtained in control condition. In contrast, in A β -treated slices, the resulting block of LTP would allow VEGF to strongly potentiate fEPSP responses and therefore to rescue LTP.

VEGF prevents the spine morphology alterations and loss triggered by A β

Increasing evidence has demonstrated that changes in synaptic strength involve activity-dependent structural plasticity including remodeling of dendritic spine morphology as well as formation or removal of spines (Matsuzaki et al. 2004). Notably, synaptic dysfunction and the related alteration in

dendritic spine morphology and number are among the best characterized deleterious actions of $A\beta$ (Sheng et al. 2012, Dorostkar et al. 2015). Thus, given the protective role of VEGF that we observed in $A\beta$ -induced synaptic alterations, we investigated dendritic spine remodeling in response to treatments in a culture model in which hippocampal neurons expressed enhanced green fluorescent protein (eGFP). We carried out a 3D quantitative analysis of dendritic spines by focusing on secondary and tertiary apical dendrites of pyramidal neurons treated for 24 hours with $A\beta$ or control peptide, supplemented or not with VEGF (Fig 7A). Quantitative confocal imaging of eGFP expressing neurons revealed that $A\beta$ treatment triggers a significant loss of dendritic spines compared to control cultures (1.71 ± 0.07 spine per μm in control versus 1.17 ± 0.08 with $A\beta$, $N=16-19$, $p<0.001$; fig 7A, B), confirming previous reports (Shankar et al., 2007). Next, we investigated whether $A\beta$ affected spine classes selectively or alternatively maintained their overall morphological distribution, with normal spine length and head width. We observed a leftward shift in the spine head distribution toward narrower diameters in presence of $A\beta$, whereas spine length was not changed by the treatment (Fig 7C). After classifying dendritic spines, we observed that mushroom as well as thin spines were selectively targeted by the $A\beta$ -induced decrease in density (for mushroom spines, 0.35 ± 0.04 spine per μm in control versus 0.13 ± 0.02 with $A\beta$, $N=16-19$, $p<0.001$; for thin spines, 0.71 ± 0.05 spine per μm in control versus 0.49 ± 0.03 with $A\beta$, $N=16-19$, $p<0.01$; fig 7D). Conversely, the co-application of $A\beta$ and VEGF significantly increased total spine density and reversed spine loss triggered by $A\beta$ treatment alone (1.63 ± 0.09 spine per μm with $A\beta$ and VEGF versus 1.17 ± 0.08 with $A\beta$ alone, $N=10-19$, $p<0.05$: Fig 7A, B). This rescue effect of VEGF resulted in a morphological recovery of the dendritic spine pool, which was reflected by the rightward shift in spine head distribution compared to $A\beta$ condition (Fig 7C). Furthermore, using the four-category classification approach, we have been able to demonstrate that VEGF selectively protected mushroom spines from the deleterious action of $A\beta$, by preventing their decrease in density (for mushroom spines, 0.34 ± 0.03 spine per μm with $A\beta$ and VEGF versus 0.13 ± 0.02 with $A\beta$ alone, $N=10-19$, $p<0.01$; Fig 7D). Collectively, these findings strongly indicated that VEGF impact on neurons prevents $A\beta$ -associated structural defects in dendritic spines.

Discussion

In the present study we demonstrated that VEGF is able to counteract the synaptic failure induced by A β in hippocampal neurons, and deciphered the underlying mechanisms using a combination of biochemical, electrophysiological and cell imaging approaches. First, we showed that brain expression of VEGF and A β deposition are overlapping in AD patients and transgenic model of the disease, consistent with their direct interaction. Second, we identified the interacting domains between VEGF and soluble A β and further revealed that this direct interaction impedes VEGF receptor activation. Consequently, increasing VEGF levels rescued the phosphorylation state and synaptic content of AMPA receptors disrupted by A β and blocked the A β -mediated impairment in synaptic and structural plasticity. Together these data uncovered a crosstalk between A β and VEGF acting directly on synapses, and provided the first evidence for a key role of VEGF in maintaining synaptic structure and function in AD pathology.

During human aging, high levels of VEGF in cerebrospinal fluid (CSF) in presence of enhanced AD biomarkers have been associated with less cognitive decline overtime (Hohman et al. 2015). Moreover, CSF levels of VEGF were reported to mimic the changes in CSF levels of A β during the disease, and significantly decreased with the severity of cognitive impairment assessed by MMSE scores in large AD cohorts (Leung et al. 2015). This link between VEGF and A β hallmarks raises the possibility that VEGF interacts with A β deposits in AD brains, which would lead to a decrease in VEGF availability in the parenchyma surrounding A β plaques. In the present study, immunostainings showed that A β -positive plaques were strongly labeled for VEGF in the frontal cortex of human AD brains, with a gradient from high VEGF levels within plaques to control levels at a distance from plaques. In contrast, VEGF expression was restricted to blood vessels in age-matched controls. This pattern of VEGF accumulation in A β plaques was partly reproduced in young APP/PS1 transgenic mice, although at this early stage of A β deposition, VEGF expression was below detection limit in some thioflavin-positive plaques as well as in plaque vicinity. These findings demonstrate that VEGF is associated with insoluble fibrillary forms of A β peptides in both human and transgenic brain deposits, supporting previous evidence (Yang et al. 2004, Ryu et al. 2009, Thomas et al. 2015). It is tempting to speculate that the VEGF immunoreactivity we observed in the vicinity of human A β deposits is linked to the reported halo of A β oligomers surrounding plaques (Koffie et al 2009). Heparan sulfate proteoglycans known to interact with both insoluble and soluble A β (Verbeek et al. 1999, Liu et al. 2016), and with heparin-binding VEGF isoforms (Houck et al. 1992), could provide a molecular anchor trapping these proteins in the extracellular matrix.

Alternatively, previous work has demonstrated that immobilized A β is able to physically interact through direct binding with the heparin-binding VEGF₁₆₅ isoform, leaving the diffusible VEGF₁₂₁ unbound (Yang et al. 2004, Yang et al. 2005). These VEGF isoforms, produced by alternative splicing, differ in their binding affinity for heparan sulfate proteoglycan (HSPG) in the extracellular matrix, which affects their diffusion properties (Ferrara et al. 2003). It has not been documented yet whether these VEGF isoforms preferentially interact with soluble A β oligomeric aggregates (A β o), known to be the main A β pathogenic species (Serrano-Pozo et al. 2011), or with A β monomers (A β m). Our biochemical analyses provided strong evidence for a selective binding of A β o to VEGF₁₆₅ and to a lesser extent to VEGF₁₂₁, in contrast to A β m. In addition, three major binding domains have been identified between A β o and VEGF using a peptide array-based strategy, among which the VEGFR2 binding site in the amino-terminal receptor-binding region, common to all VEGF isoforms, and the amino-terminal part of the heparin binding domain. Notably, these two domains are critically required for VEGF signaling. Indeed, VEGFR2 has long been considered as the principal VEGF signaling receptor (Ferrara et al. 2003), and the interaction between HSPG and heparin-binding VEGF isoforms on the one hand, and VEGFR2 on the other hand, can promote the formation of an active signaling complex (Selleck 2006). Moreover, a blocking peptide targeting the amino-terminal part of the VEGF heparin binding domain has previously been reported to prevent VEGF₁₆₅ from binding the cell surface and its receptors, leading to an inhibition of its function (Lee et al., 2010, Jia et al. 2001). Thus, the direct A β o-VEGF interaction shown in the present study further suggests a strong inhibition of VEGF - VEGFR2 signaling due to A β o. In line with these data, we documented in VEGFR2 expressing HEK cells and hippocampal neurons that A β o block VEGFR2 activation in a VEGF-dependent manner. Hence, exogenous VEGF applications are able to rescue impaired VEGFR2 activation induced by A β o, likely due to competitive interactions between A β o and VEGF.

We envisioned that this shift from VEGFR2 blockade to VEGFR2 activation by increasing VEGF levels with A β o might have consequences on synaptic receptor content. In a recent study, we revealed that VEGF has the ability to regulate the trafficking of surface glutamate receptors and to promote the formation of new synaptic sites (De Rossi et al. 2016). These two VEGF-dependent processes contribute to increase the pool of synapses expressing functional glutamate receptors, in sharp contrast with the reported impact of A β o on neurons. Indeed, A β o derived from synthetic or natural sources have been shown to trigger removal of surface NMDA and AMPA receptors over time, in link with the loss of synaptic sites (Snyder et al. 2005, Almeida et al. 2005). We hypothesized that these opposite actions of A β o and VEGF might rescue the decrease in synaptic glutamate receptor content induced by A β o. Since A β o have been shown to produce a biphasic effect on NMDA and AMPA receptor content at synapses, with an early transient increase and a later decline (Um et al. 2012,

Snyder et al. 2005, Frandmiche et al. 2014, Almeida et al. 2005), we selected treatment duration exceeding the transient phase. Consistently, we found that increasing VEGF levels markedly reduced the loss of GluA1-expressing AMPA receptors at synapses, induced by A β . Because AMPA receptor (AMPA) internalization depends on caspase-3 and calcineurin activations (Beattie et al. 2000, Li et al. 2010), which are causally linked (Mukerjee et al. 2000) and exacerbated in A β -mediated pathology (D'Amelio et al. 2011), this prompted us to investigate the impact of VEGF on these signaling pathways. Our biochemical findings provided a strong evidence that VEGF has the ability to block the concomitant increase in caspase-3 and calcineurin activations triggered by A β , in link with the maintenance of AMPAR synaptic content. In addition, we demonstrated that VEGF counteracts the A β -induced dephosphorylation of serine 845 (S845) in GluA1, which has been shown to result from calcineurin activation (Minano-Molina et al., 2011). Notably, the reversible phosphorylation occurring at S845 has previously been reported to play a critical role in regulating AMPAR membrane insertion and function at synapses (Ehlers 2000). Consistently, our results revealed that VEGF contributes to maintain cell surface expression of AMPAR expressing GluA1 in hippocampal neurons challenged by A β . Taken together, our findings are consistent with the idea that VEGF utilizes the same molecular signaling hub than A β , which links extracellular signals to the control of AMPAR synaptic expression, but with opposite effects.

Mechanisms underlying LTP have been shown to interact with LTD mechanisms to regulate synaptic function (Bear and Malenka, 1994). Indeed, the balance between phosphorylation and dephosphorylation of postsynaptic AMPA receptors is instrumental in the control of these two forms of synaptic plasticity (Lee et al 2000, Lee et al 2003). In particular, phosphorylation of S845 has been shown to be sufficient to support LTP, but is required for LTD (Lee et al., 2010), with its dephosphorylation state being linked to a decrease in synaptic efficacy (Lee et al., 1998). Along this line, our results in hippocampal cultures showing that A β stimulate calcineurin and trigger S845 dephosphorylation, suggest that A β alone can prime naïve synapses for a decrease in synaptic efficacy. We further showed that A β application adversely affects LTP induction and expression in the CA1 region of the hippocampus, preventing the theta burst-induced increase in synaptic efficacy. This result is consistent with the well-established findings that soluble A β trigger a robust inhibition of LTP (Lambert et al 1998, Walsh et al. 2002, Shankar et al. 2008). In addition, we demonstrated for the first time that VEGF has the ability to rescue LTP inhibition triggered by A β in CA1. However, because VEGF alone fails to further increase the magnitude of LTP, we propose that its impact depends on the prior state of synapses. Therefore, in agreement with a previous study (Lee et al., 2000), we hypothesized that the phosphorylation of S845 promoted by VEGF allows the potentiation of synapses that have been previously primed for depression by A β . Taken together, our findings

suggest that VEGF has the ability to promote the potentiation of recently depressed synapses in the adult brain in A β -mediated pathology.

Long-term changes in synaptic plasticity are supported by morphological and structural remodeling of dendritic spines (Matsuzaki et al., 2004, Tada and Sheng 2006). In transgenic models of AD, structural alterations and loss of dendritic spines have been shown to mimic the situation observed in brain sections from AD patients (Knafo et al., 2009, Mi et al 2017), and can be reliably reproduced in hippocampal cultures or slices exposed to A β o (Shankar et al., 2007, Lacor et al., 2007). Previous studies have implicated VEGF in the protection against long-term A β -mediated neurotoxicity in cultured neurons (Heran et al. 2013), but its direct impact on dendritic spine loss has not been documented yet. Here we revealed with a 3D analysis of spine morphology that VEGF partially rescues the changes induced by A β o, sparing the mushroom spines which are considered as stable memory spines with high synaptic efficacy (Bourne and Harris, 2007, Kasai et al., 2010). Notably, this impact of VEGF results in the maintenance of dendritic spine density in hippocampal neurons challenged by A β o. Thus, the fact that VEGF counteracts mushroom spine loss, which might be a cellular marker of memory decline, and further maintains dendritic spine density, highlights its functional relevance in AD pathology.

In conclusion, we demonstrate that VEGF is specifically able to restore the balance in signaling activities that controls the phosphorylation state and synaptic content of AMPAR, a critical hub for mechanisms involved in long-term synaptic plasticity processes. Hence, VEGF can rescue early functional and structural alterations triggered by pathogenic A β o, such as impairment in synaptic plasticity and hippocampal spine density. Our findings suggest a new model whereby VEGF-A β o binding impedes VEGF neuronal functions, whereas a restoration of VEGF availability may preserve synaptic dysfunction caused by A β oligomers.

References

- Alfonso S, Kessels HW, Banos CC, Chan TR, Lin ET, Kumaravel G, Scannevin RH, Rhodes KJ, Haganir R, Guckian KM, Dunah AW, Malinow R (2014) Synapto-depressive effects of amyloid beta require PICK1. *Eur J Neurosci* 39:1225-33.
- Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK (2005) Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis* 20:187-98.
- Bear MF, Malenka RC (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 4:389-99.
- Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, Malenka RC (2000) Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci* 3:1291-300.
- Bourne J, Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17:381-6.
- Braak H, Braak E (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol* 1:213-6.
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, Doring MJ (2004) VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* 36:827-35.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41.
- D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, Diamantini A, De Zio D, Carrara P, Battistini L, Moreno S, Bacci A, Ammassari-Teule M, Marie H, Cecconi F (2011) Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 14:69-76.
- De Rossi P, Harde E, Dupuis JP, Martin L, Chounlamountri N, Bardin M, Watrin C, Benetollo C, Pernet-Gallay K, Luhmann HJ, Honnorat J, Malleret G, Groc L, Acker-Palmer A, Salin PA, Meissirel C. (2016) A critical role for VEGF and VEGFR2 in NMDA receptor synaptic function and fear-related behavior. *Mol Psychiatry* 21:1768-1780.
- Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J (2015) Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathol* 130:1-19.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, DeKosky ST, Gauthier S, Selkoe D, Bateman R, Cappa S, Crutch S, Engelborghs S, Frisoni GB, Fox NC, Galasko D, Habert MO, Jicha GA, Nordberg A, Pasquier F, Rabinovici G, Robert P, Rowe C, Salloway S, Sarazin M, Epelbaum S, de Souza LC, Vellas B, Visser PJ, Schneider L, Stern Y, Scheltens P, Cummings JL (2014) Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* 13: 614-29.
- Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28:511-25.
- El Gaamouch F, Buisson A, Moustié O, Lemieux M, Labrecque S, Bontempi B, De Koninck P, Nicole O (2012) Interaction between α CaMKII and GluN2B controls ERK-dependent plasticity. *J Neurosci* 32:10767-79.

- Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Haganir RL, Malinow R (2003) PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci* 6:136-43.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-76.
- Frandemiche ML, De Seranno S, Rush T, Borel E, Elie A, Arnal I, Lanté F, Buisson A (2014) Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J Neurosci* 34:6084-97.
- Garcia KO, Ornellas FL, Martin PK, Patti CL, Mello LE, Frussa-Filho R, Han SW, Longo BM (2014) Therapeutic effects of the transplantation of VEGF overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells in the hippocampus of murine model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 6:30.
- Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-12.
- Herrán E, Pérez-González R, Igartua M, Pedraz JL, Carro E, Hernández RM (2013) VEGF-releasing biodegradable nanospheres administered by craniotomy: a novel therapeutic approach in the APP/Ps1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Control Release* 170:111-9.
- Hohman TJ, Bell SP, Jefferson AL; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2015) The role of vascular endothelial growth factor in neurodegeneration and cognitive decline: exploring interactions with biomarkers of Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 72:520-9.
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267:26031-7.
- Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R (2006) AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*. 52:831-43.
- Jarosz-Griffiths HH, Noble E, Rushworth JV, Hooper NM (2016) Amyloid- β Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein. *J Biol Chem* 291:3174-83.
- Jia H, Jezequel S, Löhr M, Shaikh S, Davis D, Soker S, Selwood D, Zachary I (2001) Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 283:164-73.
- Kasai H, Hayama T, Ishikawa M, Watanabe S, Yagishita S, Noguchi J (2010) Learning rules and persistence of dendritic spines. *Eur J Neurosci* 32:241-9.
- Kim BW, Choi M, Kim YS, Park H, Lee HR, Yun CO, Kim EJ, Choi JS, Kim S, Rhim H, Kaang BK, Son H (2008) Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin. *Cell Signal* 20:714-25.
- Knafo S, Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Merino-Serrais P, Feraud-Espinosa I, Ferrer I, DeFelipe J (2009) Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 19:586-92.
- Koffie RM, Hashimoto T, Tai HC, Kay KR, Serrano-Pozo A, Joyner D, Hou S, Kopeikina KJ, Frosch MP, Lee VM, Holtzman DM, Hyman BT, Spires-Jones TL (2012) Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid- β . *Brain* 135:2155-68.

- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, Hyman BT, Spires-Jones TL (2009) Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4012-7.
- Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24:10191-200.
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:796-807.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-53.
- Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405:955-9.
- Lee HK, Kameyama K, Huganir RL, Bear MF (1998) NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21:1151-62.
- Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL (2003) Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112:631-43.
- Lee HK, Takamiya K, He K, Song L, Huganir RL (2010) Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus.
- Lee TY, Folkman J, Javaherian K (2010) HSPG-binding peptide corresponding to the exon 6a-encoded domain of VEGF inhibits tumor growth by blocking angiogenesis in murine model. *PLoS One* 5:e9945.
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352-7.
- Leung YY, Toledo JB, Nefedov A, Polikar R, Raghavan N, Xie SX, Farnum M, Schultz T, Baek Y, Deerlin VV, Hu WT, Holtzman DM, Fagan AM, Perrin RJ, Grossman M, Soares HD, Kling MA, Mailman M, Arnold SE, Narayan VA, Lee VM, Shaw LM, Baker D, Wittenberg GM, Trojanowski JQ, Wang LS (2015) Identifying amyloid pathology-related cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease in a multicohort study. *Alzheimers Dement (Amst)* 1:339-348.
- Li Z, Jo J, Jia JM, Lo SC, Whitcomb DJ, Jiao S, Cho K, Sheng M (2010) Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell* 141:859-71.
- Licht T, Goshen I, Avital A, Kreisel T, Zubedat S, Eavri R, Segal M, Yirmiya R, Keshet E (2011) Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:5081-6.

- Liu CC, Zhao N, Yamaguchi Y, Cirrito JR, Kanekiyo T, Holtzman DM, Bu G (2016) Neuronal heparan sulfates promote amyloid pathology by modulating brain amyloid- β clearance and aggregation in Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* 8:332ra44.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-62.
- Malinow R (2003) AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:707-14.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-6.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-6.
- Mi Z, Abrahamson EE, Ryu AY, Fish KN, Sweet RA, Mufson EJ, Ikonomic MD (2017) Loss of precuneus dendritic spines immunopositive for spinophilin is related to cognitive impairment in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 55:159-166.
- Miñano-Molina AJ, España J, Martín E, Barneda-Zahonero B, Fadó R, Solé M, Trullás R, Saura CA, Rodríguez-Alvarez J (2011) Soluble oligomers of amyloid- β peptide disrupt membrane trafficking of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor contributing to early synapse dysfunction. *J Biol Chem* 286:27311-21.
- Mukerjee N, McGinnis KM, Park YH, Gnegy ME, Wang KK (2000) Caspase-mediated proteolytic activation of calcineurin in thapsigargin-mediated apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 379:337-43.
- Nestor PJ, Scheltens P, Hodges JR (2004) Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat Med* 10 Suppl:S34-41.
- Opazo P, Labrecque S, Tigaret CM, Frouin A, Wiseman PW, De Koninck P, Choquet D (2010) CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* 67:239-52.
- Putchá D, Brickhouse M, O'Keefe K, Sullivan C, Rentz D, Marshall G, Dickerson B, Sperling R (2011) Hippocampal hyperactivation associated with cortical thinning in Alzheimer's disease signature regions in non-demented elderly adults. *J Neurosci* 31:17680-8.
- Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jäggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Hölscher C, Mathews PM, Jucker M (2006) Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 7:940-6.
- Religa P, Cao R, Religa D, Xue Y, Bogdanovic N, Westaway D, Marti HH, Winblad B, Cao Y (2013) VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival. *Sci Rep* 3:2053.
- Renner M, Lacor PN, Velasco PT, Xu J, Contractor A, Klein WL, Triller A (2010) Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66:739-54.
- Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Huganir RL (1996) Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16:1179-88.

- Rodrigues EM, Scudder SL, Goo MS, Patrick GN (2016) A β -Induced Synaptic Alterations Require the E3 Ubiquitin Ligase Nedd4-1. *J Neurosci* 36:1590-5.
- Ryu JK, Cho T, Choi HB, Wang YT, McLarnon JG (2009) Microglial VEGF receptor response is an integral chemotactic component in Alzheimer's disease pathology. *J Neurosci* 29:3-13.
- Salter MW, Kalia LV (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 5:317-28.
- Selleck SB (2006) Signaling from across the way: transactivation of VEGF receptors by HSPGs. *Mol Cell*. 22:431-2.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006189.
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27:2866-75.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-42.
- Sheng M, Sabatini BL, Südhof TC (2012) Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 pii: a005777.
- Smith LM, Strittmatter SM (2017) Binding Sites for Amyloid- β Oligomers and Synaptic Toxicity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1;7 pii: a024075.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8:1051-8.
- Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ (2003) In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem*. 2003 278:11612-22.
- Tada T, Sheng M (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:95-101.
- 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* 58:1791-800.
- Thomas T, Miners S, Love S (2015) Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain* 138:1059-69.
- Thomas T, Miners S, Love S (2015) Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain* 138:1059-69.
- Ulrich JD, Finn MB, Wang Y, Shen A, Mahan TE, Jiang H, Stewart FR, Piccio L, Colonna M, Holtzman DM (2014) Altered microglial response to A β plaques in APPS1-21 mice heterozygous for TREM2. *Mol Neurodegener* 9:20.
- Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, Stagi M, Vortmeyer A, Wisniewski T, Gunther EC, Strittmatter SM (2012) Alzheimer amyloid- β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* 15:1227-35.

- Verbeek MM, Otte-Höller I, van den Born J, van den Heuvel LP, David G, Wesseling P, de Waal RM (1999) Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 155:2115-25.
- Viola KL, Klein WL (2015) Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* 129:183-206.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-9.
- Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, Cedazo-Minguez A, Dubois B, Edvardsson D, Feldman H, Fratiglioni L, Frisoni GB, Gauthier S, Georges J, Graff C, Iqbal K, Jessen F, Johansson G, Jönsson L, Kivipelto M, Knapp M, Mangialasche F, Melis R, Nordberg A, Rikkert MO, Qiu C, Sakmar TP, Scheltens P, Schneider LS, Sperling R, Tjernberg LO, Waldemar G, Wimo A, Zetterberg H (2016) Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol* 5:455-532.
- Yang SP, Bae DG, Kang HJ, Gwag BJ, Gho YS, Chae CB (2004) Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with beta-amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:283-90.
- Yang SP, Kwon BO, Gho YS, Chae CB (2005) Specific interaction of VEGF165 with beta-amyloid, and its protective effect on beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Neurochem* 93:118-27.
- Zhao WQ, Santini F, Breese R, Ross D, Zhang XD, Stone DJ, Ferrer M, Townsend M, Wolfe AL, Seager MA, Kinney GG, Shughrue PJ, Ray WJ (2010) Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *J Biol Chem* 285:7619-32.

Legends to the figures

Figure 1. Association of VEGF expression with β -amyloid plaques. **A)** Immunostainings showing spatial VEGF expression (red) in relation to $A\beta$ deposits (green) in post-mortem brain sections from F2 cortical region in AD patient and age-matched control. A prominent VEGF staining was observed in blood vessels from AD and control brains. Note the moderate intensity of VEGF staining centered on β -amyloid plaques with a downhill gradient at a distance from the plaques. Higher-magnification of individual β -amyloid plaques in the merge revealed VEGF positive cells in their vicinity. **B)** Brain $A\beta$ plaque burden in APP/PS1 transgenic mice. Representative brain section from 4 months old transgenic mice showing thioflavin-S positive extracellular amyloid deposits in the cerebral cortex. **C)** Higher-magnification of individual plaques delineated in white (B) showing a thioflavin-S positive plaque (middle) immunoreactive for VEGF (left) with the colocalization in the merge (right). Scale bar, 50 μ m.

Figure 2. Selective binding of $A\beta$ oligomers to VEGF and identification of the binding sites. ELISA and peptide arrays encompassing VEGF protein sequence were used to analyze $A\beta$ binding to VEGF. **A)** Dose-dependent binding of biotinylated forms of $A\beta_{42}$ oligomers ($A\beta_o$) or $A\beta_{40}$ monomers ($A\beta_m$) to VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ isoforms, respectively, analyzed by ELISA. Binding was assessed through colorimetric detection using HRP-Streptavidin and TMB reaction. Each value represents the mean between 3 independent experiments; ***<0.001. **B)** Human and murine DNA exon sequences coding for full length VEGF, with their respective domains of interest. Sign seq: signal sequence; R1 & R2: VEGFR1 and VEGFR2 binding sites; HBD 1 & 2: Heparin binding domain 1 and 2; NRP: neuropilin binding site. Italic numbers refers to the position of the corresponding peptide spotted on the peptide array slide. **C)** Representative image of CelluSpot peptide arrays showing $A\beta$ interacting sites in the VEGF protein sequence. Overlapping 15-mer peptides with a 6aa shift were spotted on each array for both human and murine VEGF protein sequence and reacted with the biotinylated forms of $A\beta_{42}$ oligomers ($A\beta_o$) or $A\beta_{40}$ monomers ($A\beta_m$) and vehicle (control), respectively. Binding sites were detected with HRP-Streptavidin and chemiluminescent substrate (n = 4 independent experiments per condition). **D)** Heat map illustrating the binding domains between $A\beta_o$ and VEGF. Data from the 4 experiments were normalized to the maximum binding level and illustrated by a color code from the blue-to-red color representing the binding value from low to high level. The 3 binding domains are corresponding to isolated or merged green/yellow lines delineated by asterisks; h refers to human and m to murine with H1 to H4 and M1 to M4 representing the experiment number.

Figure 3. A β oligomers disrupt VEGFR2 activation. Receptor activation was assessed through western blotting and expressed as the ratio between phosphorylated VEGFR2 (Y1175) and total receptor expression. **A)** Representative immunoblotting for pVEGFR2, total VEGFR2 and actin expression in VEGFR2-expressing HEK cells treated with A β ₄₂ monomers (A β m) or A β ₄₂ oligomers (A β o) at 1 μ M for 5 minutes, in presence or absence of 50 ng.mL⁻¹VEGF. **B)** Semi-quantitative analyses of VEGFR2 activation in HEK cells expressed as the ratio between phosphorylated and total VEGFR2 expression. Values were normalized to control and significant differences assessed using a Kruskal-Wallis and Wilcoxon post hoc test (Kruskal-Wallis $p = 0.0001$, $n = 7$ independent experiments). **C)** Representative immunoblotting for pVEGFR2, total VEGFR2 and actin expression in hippocampal neurons treated with control peptide or A β ₄₂ oligomers (A β o) at 1 μ M for 1 hour with or without 50 ng.mL⁻¹ VEGF. **D)** Semi-quantitative analyses of VEGFR2 activation in neurons. Values were normalized to control and significant differences were assessed using a Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test (Kruskal-Wallis $p = 0.0013$, $n = 7$ independent experiments) * < 0.05, **<0.01.

Figure 4. VEGF counteracts AMPA receptor loss and phosphatase/protease activation at synapses. Postsynaptic densities (PSD) isolated from hippocampal neuronal cultures and treated for 1 hour with control peptides (Ctrl) or A β oligomers (A β o) at 1 μ M, with or without 50 ng.mL⁻¹ VEGF, were analyzed for receptor and signaling protein content. **A)** Representative western blot of isolated PSD and non-PSD fractions immunoblotted for PSD95, Synaptophysin (SYP), GluN2A, GluN2B and GluA1 subunits. PSD95 and SYP expression validate PSD enrichment protocol. **B)** Semi quantitative analyses of GluA1 and GluN2A expression levels normalized to control, in PSD and non-PSD fractions. Significant differences were assessed using a Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test (GluA1, Kruskal-Wallis $p = 0.0022$, $n = 9-10$ independent experiments). **C)** Representative immunoblotting for activated and total form of Fyn, CaMKII α , calcineurine A (Cal A) and caspase-3 (Casp-3) in PSD and non-PSD fractions. **D)** Semi-quantitative analyses indicating the activation levels of Fyn, CaMKII α , Cal A and Casp-3 expressed as the ratio between cleaved or phosphorylated forms and total forms. Values were normalized to control and significant differences assessed using a Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test (full length Cal A/cleaved Cal A, Kruskal-Wallis $p = 0.0014$, proCasp-3/cleaved Casp-3 Kruskal-Wallis $p = 0.0008$, $n = 5-8$ independent experiments). * < 0.05, **<0.01, ***<0.001.

Figure 5. VEGF prevents A β o-induced alterations in AMPA receptor phosphorylation and surface expression. **A)** AMPA receptor phosphorylation and total expression were analyzed in extracts from hippocampal neuronal cultures treated with control peptide (Ctrl) or A β ₄₂ oligomers (A β o) at 1 μ M for 1 hour, with or without 50 ng.mL⁻¹ VEGF. Representative immunoblotting for

phosphorylated GluA1 (S845 and S831), total GluA1 and actin. **B)** Semi-quantitative analyses indicating the phosphorylation level of GluA1, normalized to control, and expressed as the ratio between phosphorylated GluA1 at S845 or S831 sites and total GluA1 expression. Significant differences were assessed using a Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test (S845/GluA1 Kruskal-Wallis $p = 0.0002$, total GluA1 Kruskal-Wallis $p = 0.0009$, $n = 9-10$ independent experiments). **C)** Hippocampal neuronal cultures treated with the same conditions as shown above were processed for surface GluA1 and actin immunostainings. Upper panels illustrating representative dendritic immunostainings for GluA1 (green) and actin (red) in all conditions, and binary images indicating GluA1 clusters in white are shown in the lower panels. Scale bar, $2.5 \mu\text{m}$. **D)** Quantitative analysis indicating the mean values \pm SEM of GluA1 cluster density and size. Values were normalized to control and analyzed for statistical significance using a Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test (GluA1 cluster density Kruskal-Wallis $p = 0.7827$, GluA1 cluster size Kruskal-Wallis $p = 0.0035$, $n = 7$ obtained from 2 independent experiments). * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 .

Figure 6. VEGF rescues the A β -induced impairment in CA1 LTP. **A)** Time course of LTP experiments for control (black dots, in presence of DMSO, $n = 8$), VEGF (blue dots, puff of 500 ng.mL^{-1} VEGF in the vicinity of the recording electrode, $n = 6$), A β (red dots, 500 nM A β in ACSF, $n = 12$) and A β + VEGF (green dots, $n = 10$) groups. **B)** Bar graph indicating the mean \pm SEM of LTP amplitude (at 55-60 min) for the 4 treatment groups. Significant differences were obtained for A β -treated slices compared with vehicle treated slices (Kruskal-Wallis $p = 0.008$, post-hoc $p = 0.003$), VEGF treated slices (post-hoc $p = 0.044$) and A β +VEGF treated slices (post-hoc $p = 0.022$). **C)** The input-output curve at Schaffer collateral-CA1 synapse was not significantly modulated by slice treatments. Left: the input-output curves were established by progressively increasing the stimulus strength and measuring the slope of the synaptic response. Right: the input-output curves were computed by the correlation between the fiber volley amplitude of the Shaffer collaterals and the slope of the synaptic response. * < 0.05 , ** < 0.01 .

Figure 7. VEGF prevents A β -induced morphological alterations and loss of dendritic spines. hippocampal neuron cultures were transfected with eGFP on DIV12 and treated with control peptide (Ctrl) or A β ($0.5 \mu\text{M}$), with or without 50 ng.mL^{-1} VEGF for 1 day. Dendritic spine density and morphology were analyzed on apical dendrites of DIV 19 identified pyramidal neurons. **A)** Left panels illustrate representative images of dendritic segments from treated pyramidal neurons. Corresponding 3D modellings are shown in right panels. Scale bar, $2.5 \mu\text{m}$. **B)** Quantitative analysis showing total dendritic spine density in the indicated conditions. Values indicate mean spine number per μm from 3

dendritic segments per neuron (mean±SEM). Data were obtained from 10-19 pyramidal cells per condition and analyzed for statistical significance using a Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test ($p < 0.0001$, from 3 independent experiments). **C**) Spine head width and length distribution per class. **D**) Morphological classification in stubby, mushroom, thin spines and filopodia with values indicating mean spine number per μm (mean±SEM). Data were analyzed for statistical significance using a Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test (stubby Kruskal-Wallis $p = 0.0384$, mushroom Kruskal-Wallis $p < 0.0001$, thin Kruskal-Wallis $p = 0.0050$, filopodia Kruskal-Wallis $p = 0.1671$, from 3 independent experiments). * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 .

Supplemental Figure 1. VEGF does not influence A β o synaptic targeting. **A**) Representative confocal images of immunostainings for PSD95 (green) Bassoon (red) and A β (white or magenta) performed on DIV 12 hippocampal neurons treated with A β m (upper panels) or A β o (lower panels). Co-localization of presynaptic Bassoon and postsynaptic PSD95 clusters delineating full synapses is shown on left, A β cell surface staining in the middle and the merge on right. Note the selective A β o binding to hippocampal neuron cell surface. **B**) Quantitative analysis of synapses containing A β positive clusters in all conditions: A β m (n=6), A β m + VEGF (n=5), A β o (n=6), A β o + VEGF (n=4). Values were expressed as mean \pm SEM and significant differences assessed using Kruskal-Wallis and post hoc Wilcoxon, (Kruskal-Wallis $p = 0,032$, from 2 independent experiments. * < 0.05 , ** < 0.01).

Figure 1

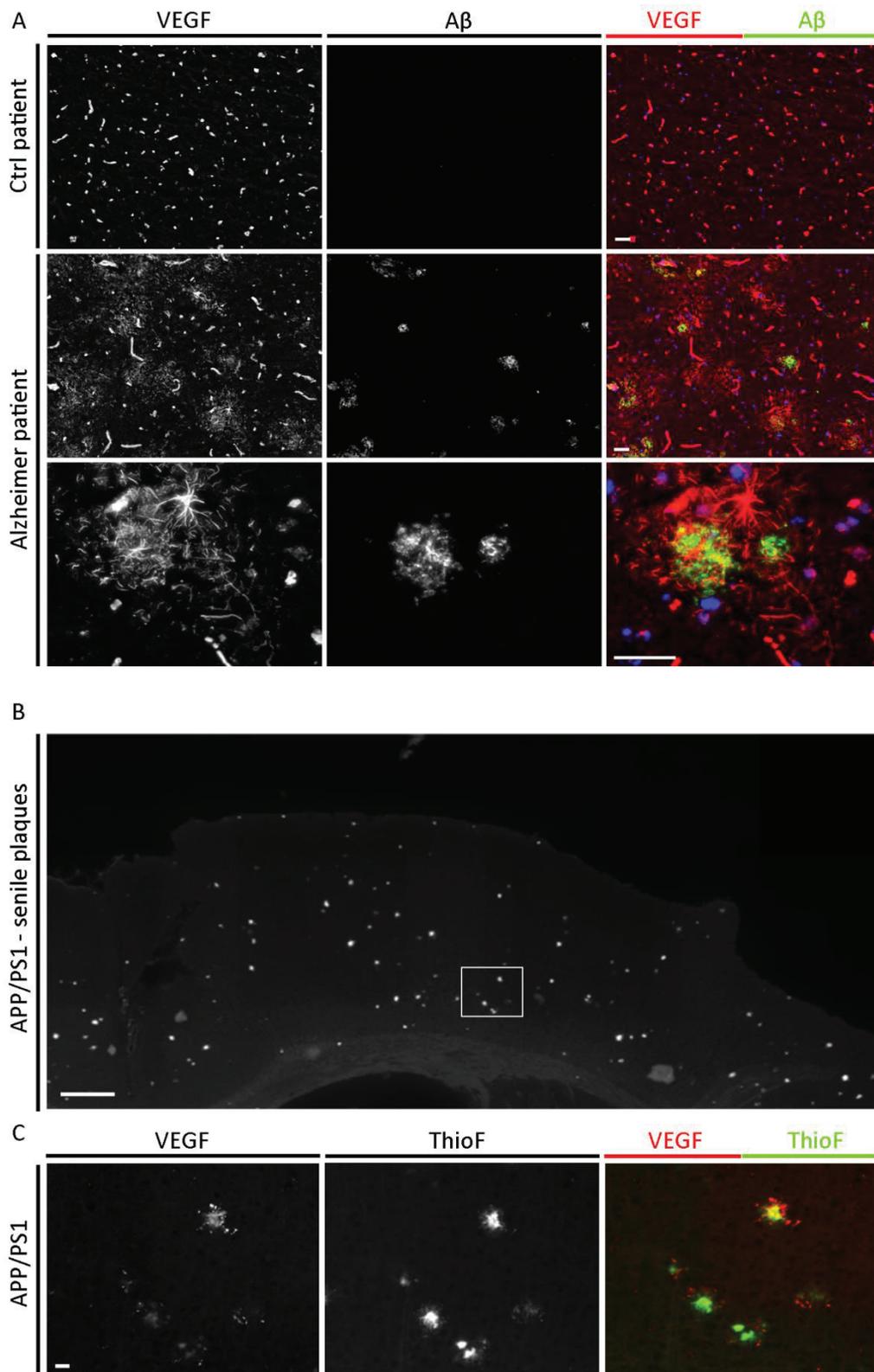


Figure 2

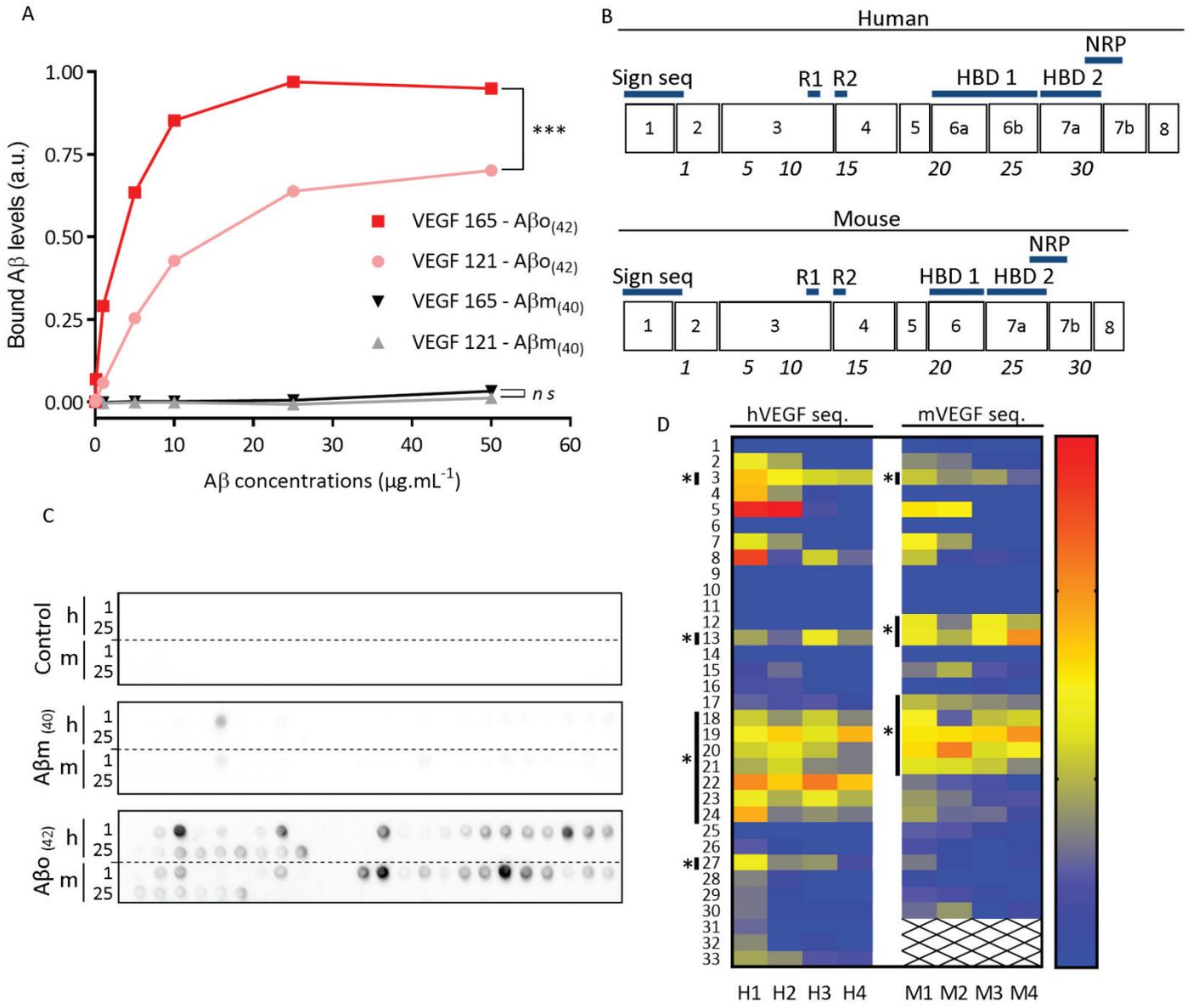


Figure 3

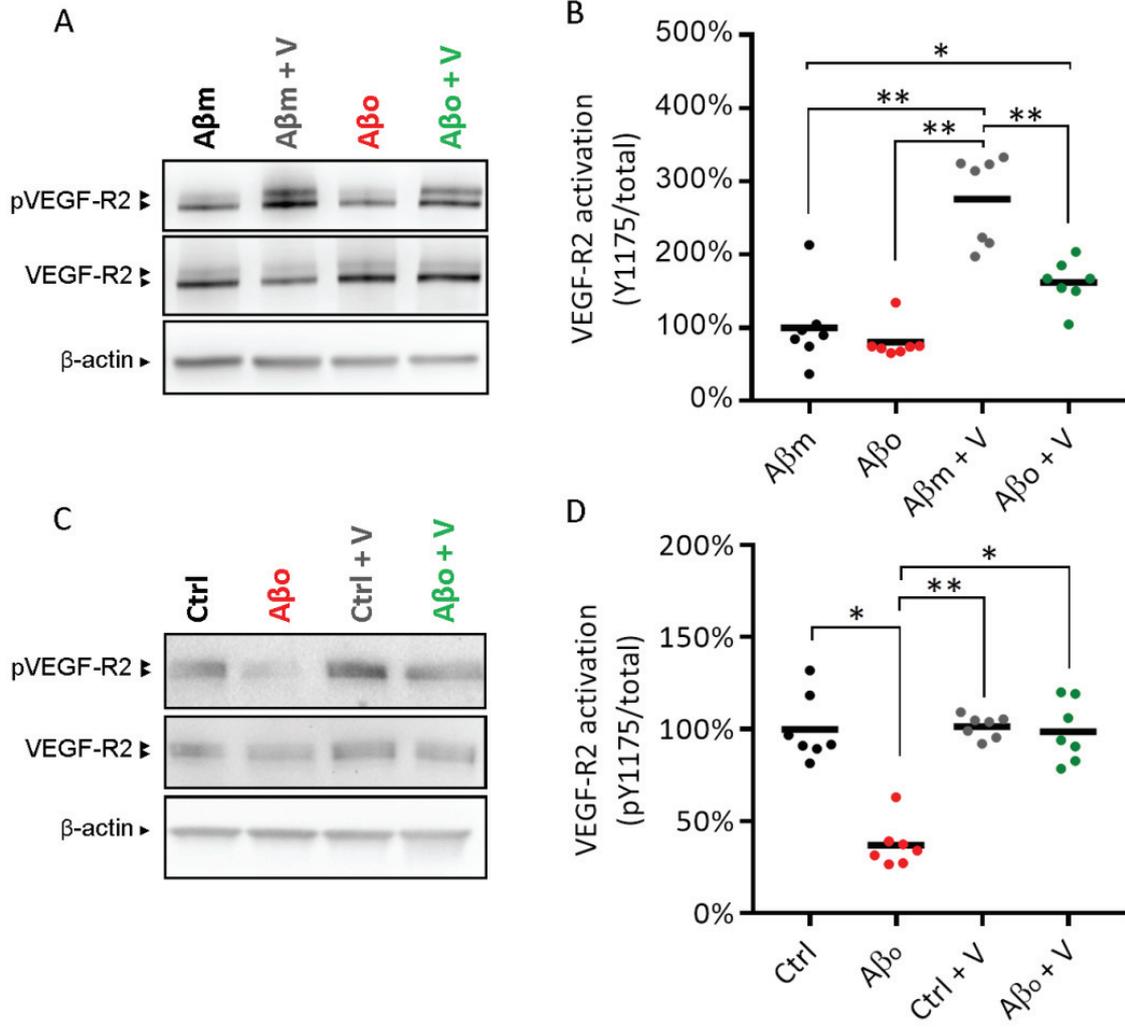


Figure 4

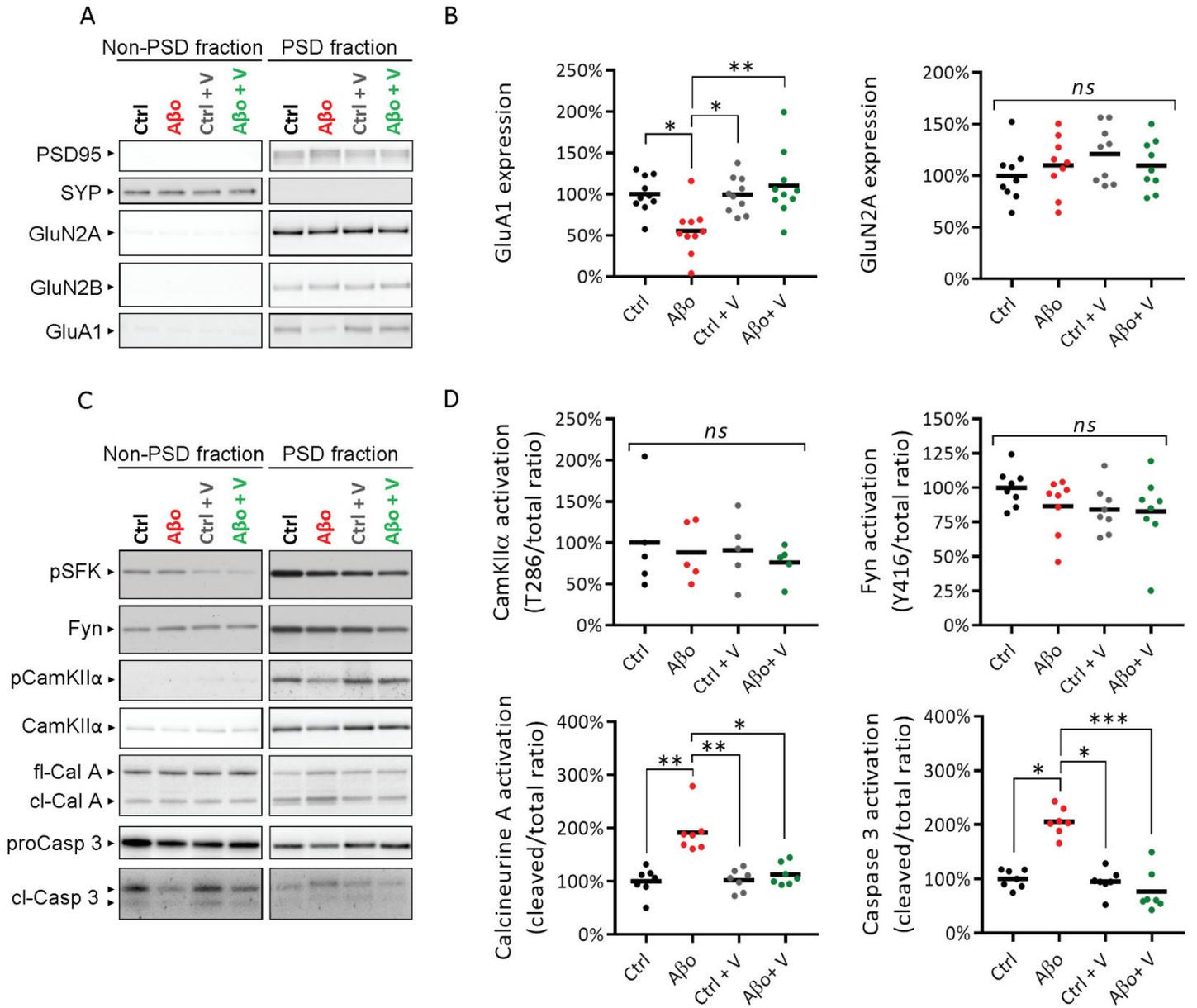


Figure 5

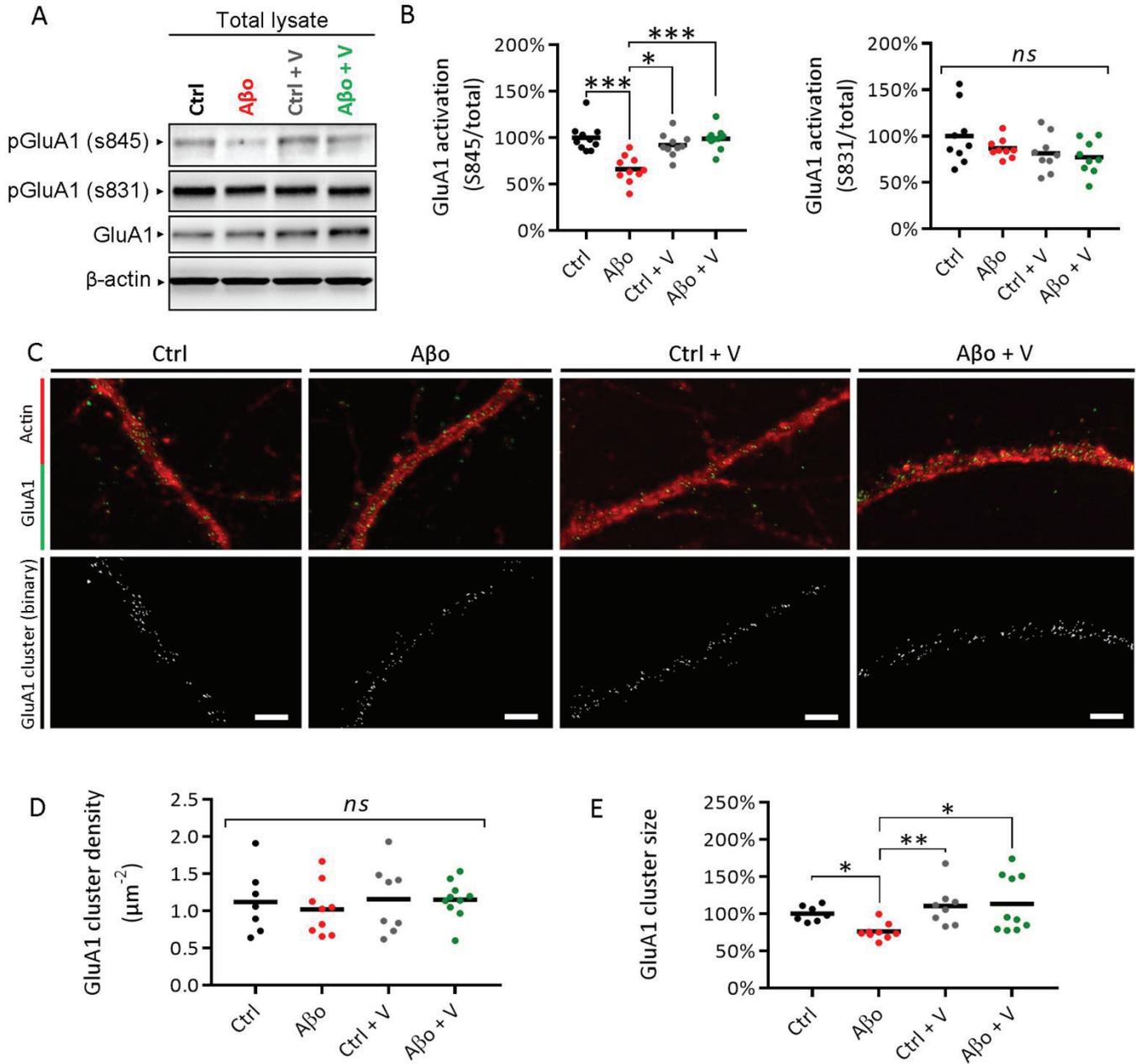


Figure 6

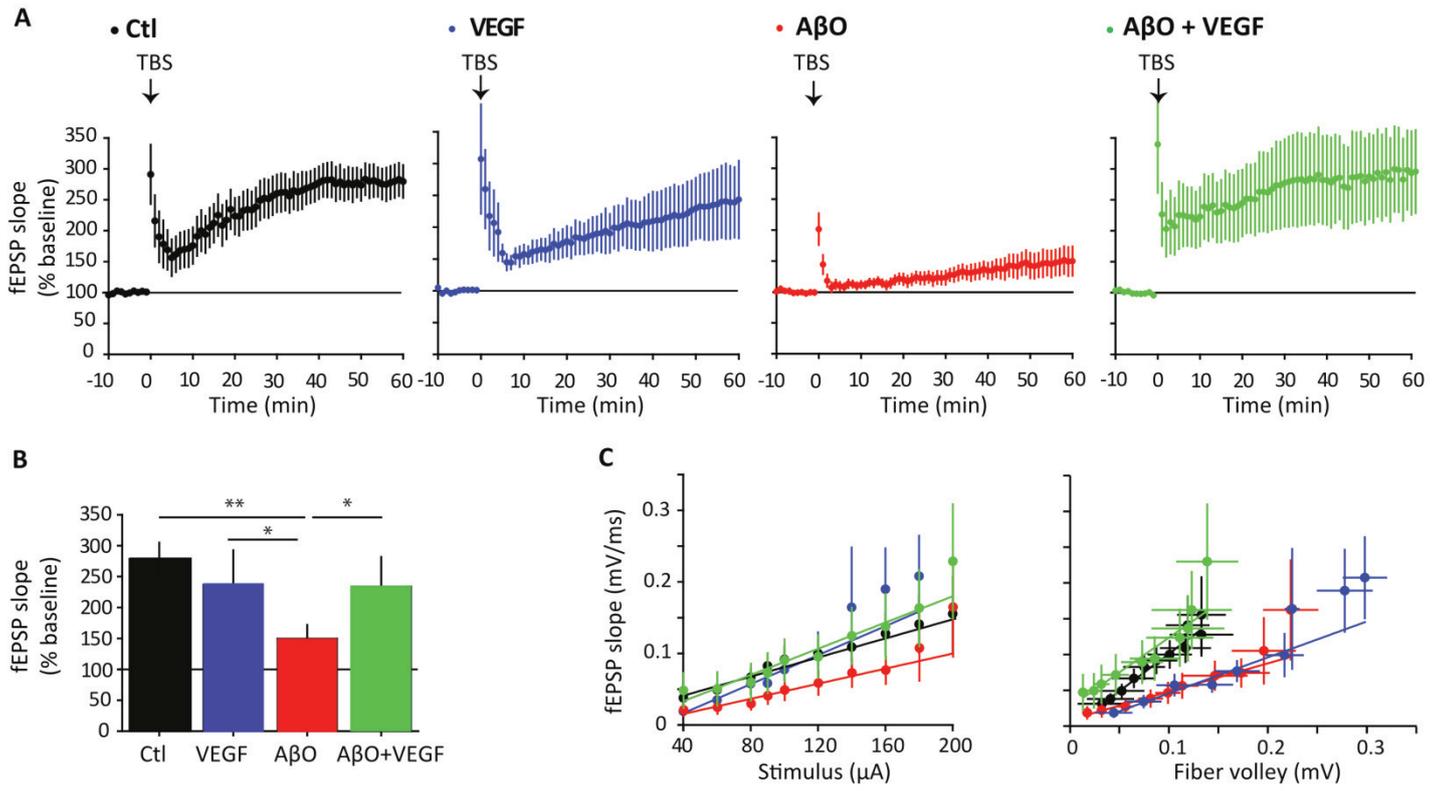
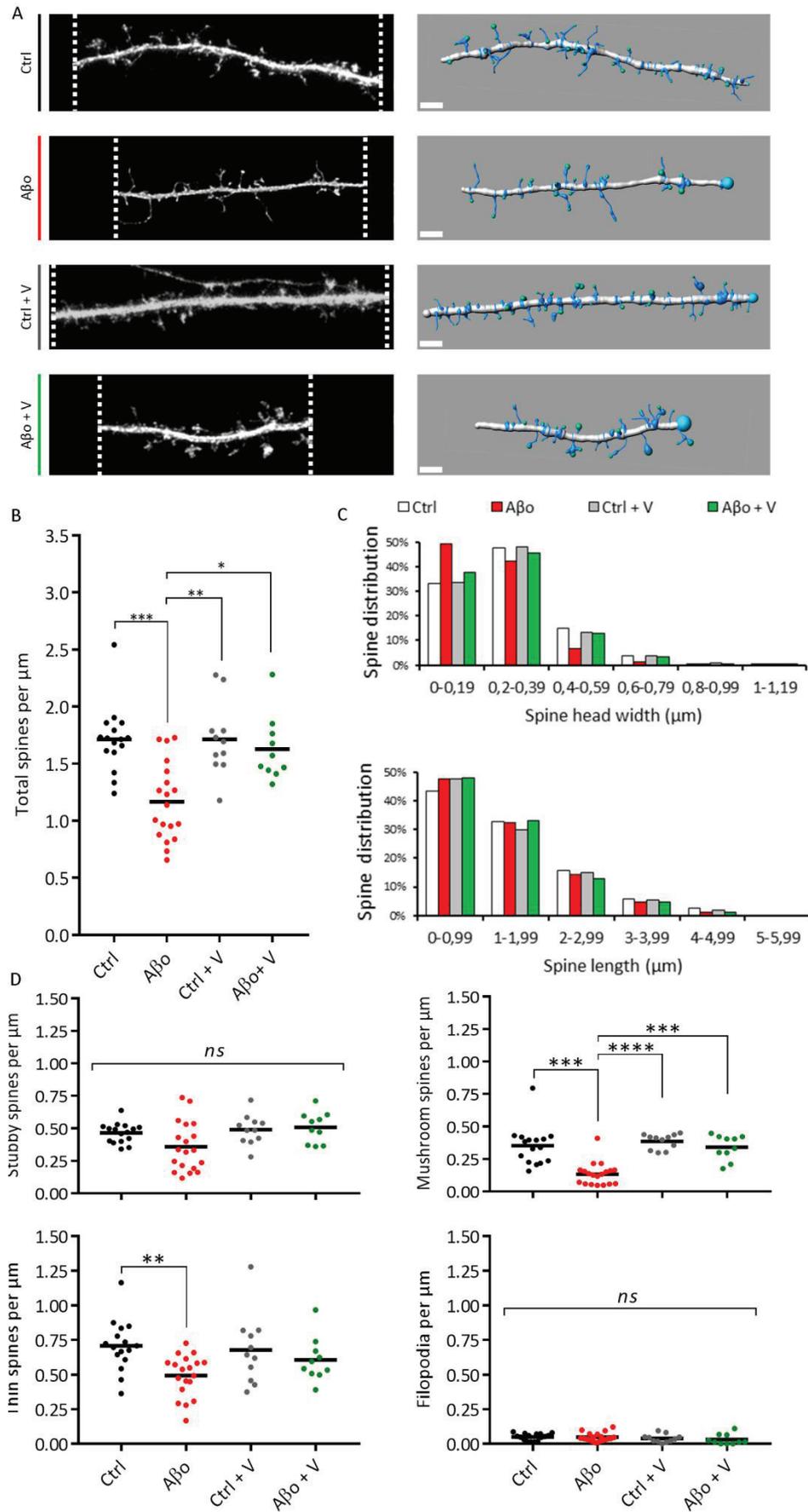
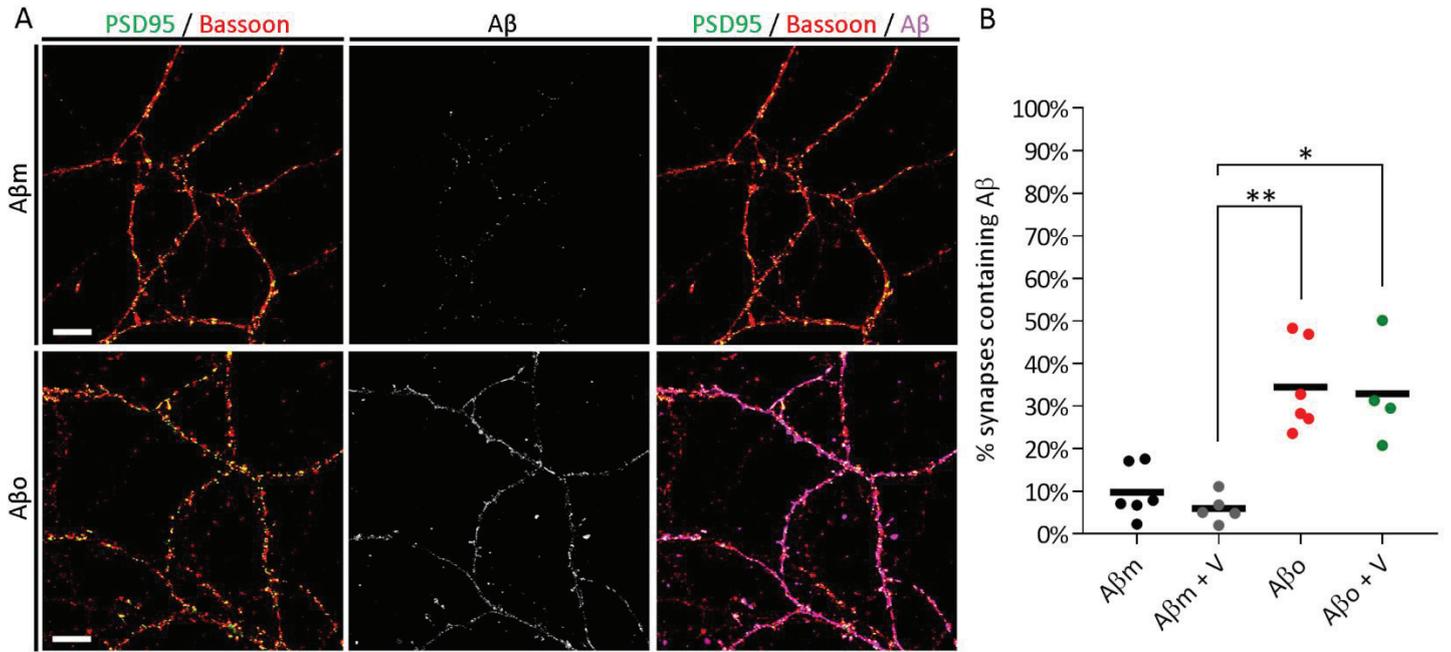


Figure 7



Supplemental Figure 1



RESULTATS COMPLEMENTAIRES

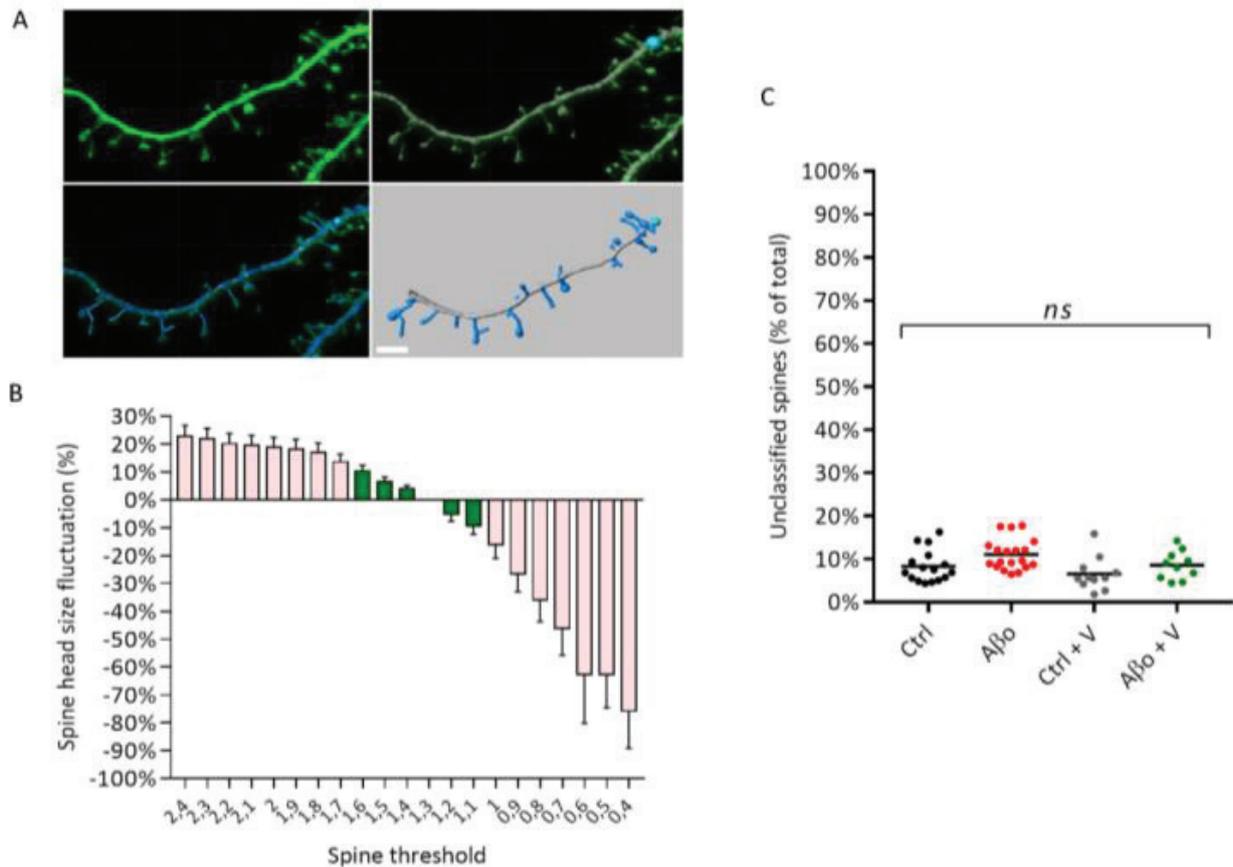


Figure supplémentaire 2. Analyse des différents paramètres de modélisation. (A) Deux seuils successifs sont utilisés afin de pouvoir modéliser d'une part le fragment dendritique et d'autre part les épines. (B) Taille de la tête des épines en fonction de différentes valeurs de seuils. En vert est représenté l'intervalle de valeurs utilisées lors de notre analyse ($n = 58$ épines). (C) Pourcentage d'épines à morphologie ambiguë. Ces épines n'ont pas été prises en compte lors de notre analyse morphologique ($n = 10$ à 19 neurones pyramidaux par conditions, issus de 3 expériences indépendantes).

Notre analyse de la morphologie des épines repose sur une modélisation tridimensionnelle automatisée et l'utilisation d'algorithmes de classification. La modélisation 3D par le logiciel Imaris fait appel à l'utilisation de différents *thresholds*, ou méthodes de seuillage, afin de modéliser d'une part le fragment dendritique, et d'autre part les épines (Figure supp 4, A). Bien que la sélection de ce paramètre soit automatique, nous avons analysé l'influence de sa variation sur la morphologie des épines (Figure supp 4, B). Aux faibles valeurs, le *threshold* influence grandement la taille de la tête des épines. Néanmoins, les valeurs utilisées lors de notre expérience, de 1,12 à 1,55, correspondent à l'intervalle où la variabilité est la plus faible.

Afin de classer nos épines, nous avons utilisé des algorithmes non exclusifs. Il en résulte une proportion d'épines à la forme ambiguë qui ne peuvent être classées. Dans l'ensemble de nos conditions, aucun neurone ne dépasse les 20% d'épines non classables, la valeur moyenne la plus importante étant obtenue pour la condition A β avec 11,07% \pm 0,8243 d'épines à la forme ambiguë. Ces résultats illustrent la précision de nos algorithmes permettant une prise en compte globale de la morphologie des épines présentes sur un neurone pyramidal.

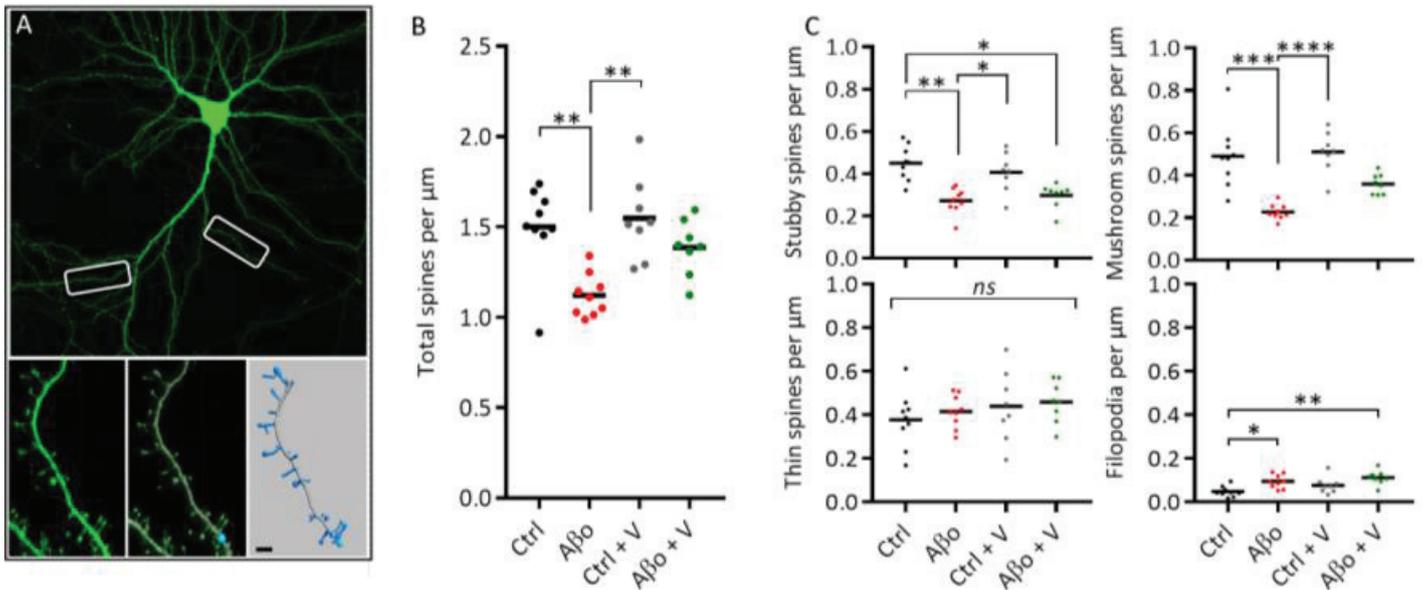


Figure supplémentaire 3. Le VEGF limite les alterations morphologiques et la perte synaptique suite à un traitement de longue durée. Des neurones hippocampiques ont été transfectés avec un plasmide codant pour l'eGFP à DIV12. Ils ont ensuite été traités par des peptides contrôles (Ctrl) ou des A β (0,5 μ M), en présence ou non de 50 ng.mL⁻¹ de VEGF, pendant 7 jours. La densité et la morphologie des épines dendritiques ont été analysées de manière similaire à la figure 7. (A) Les neurones pyramidaux ont été sélectionnés selon leur morphologie, et des fragments de leurs dendrites secondaires et tertiaires (rectangle blanc) ont été modélisés en 3 dimensions (panneau du bas). (B) Analyse quantitative de la densité totale d'épines dendritiques selon les conditions de traitements. Les valeurs indiquent le nombre moyen d'épines par μ m (moyenne \pm SEM). Les résultats ont été obtenus à partir de 8-9 cellules pyramidales par condition, et analysés statistiquement par un test de Kruskal Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn's ($p = 0.0011$). (C) Classement des épines selon leurs différentes morphologies : stubby, mushroom, thin et filopodes. Les valeurs indiquent le nombre moyen d'épines par μ m (moyenne \pm SEM). Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide d'un test de Kruskal Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn's (stubby $p = 0.0003$, mushroom $p < 0.0001$, filopodia $p = 0.0016$). * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 .

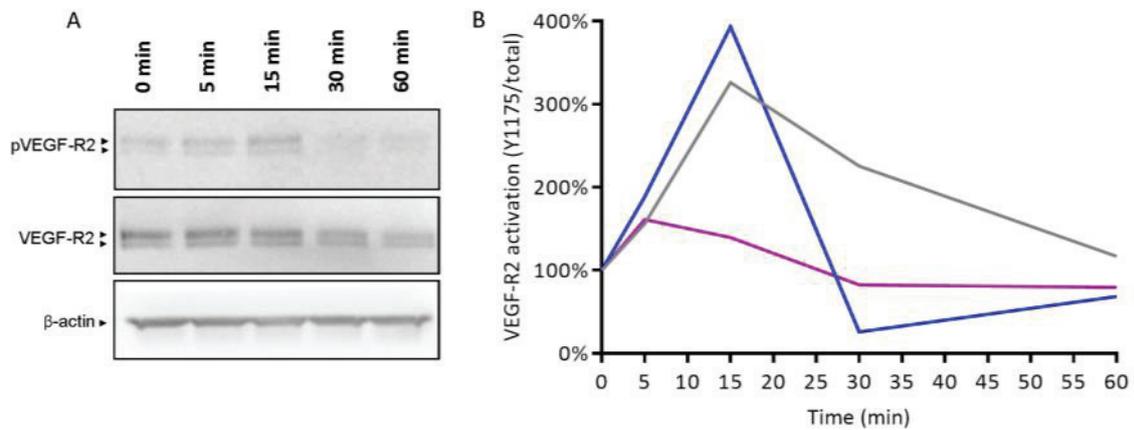


Figure supplémentaire 4. Cinétique d'activation de VEGFR2. L'activation du récepteur VEGFR2 a été analysée par immunoblot et exprimée en tant que ratio entre la forme phosphorylée (Y1175) et totale. Des neurones hippocampiques ont été traités avec 50 ng.mL^{-1} de VEGF et récupérés après 0, 5, 15, 30 et 60 minutes de traitements. (A) Immunoblot représentant l'expression des formes phosphorylées et totales de VEGFR2, ainsi que la protéine β -actine. (B) Cinétique d'activation du récepteurs VEGFR2 observées sur trois expériences indépendantes. Les valeurs représentent le ratio entre les formes phosphorylées et totales du récepteur.

DISCUSSION

L'ensemble de nos résultats suggère que les A β o peuvent se lier au VEGF au niveau de sites spécifiques comme ses domaines de liaison au récepteur VEGFR2 et à l'héparine. De ce fait, les oligomères perturbent la fonction de la voie VEGF/VEGFR2 en diminuant l'activation du récepteur. Cette réduction de l'activité de VEGFR2 pourrait aggraver les altérations morphologiques et fonctionnelles induites par les A β o sur les synapses, et nous montrons que l'addition de VEGF permet de contrecarrer ces altérations.

Interaction entre l'A β et VEGF

Des travaux de la littérature ont mis en évidence une liaison entre l'A β et le VEGF (Yang et al., 2004), et entre l'A β et le récepteur principal du VEGF, VEGFR2 (Patel et al., 2010). Cependant aucune de ces deux études n'a utilisé de préparations d'oligomères adéquates pour étudier ces liaisons, mais seulement de l'A β synthétique soluble à des concentrations variables et pendant de courtes durées. En effet, les protocoles destinés à former des oligomères solubles d'A β à partir de peptides synthétiques sont maintenant bien caractérisés (Stine et al., 2003). Aucune information n'était donc disponible sur une éventuelle liaison entre les oligomères d'A β et le VEGF quand nous avons entrepris cette étude. Or, une interaction fonctionnelle entre le VEGF et les A β o venait d'être révélée dans les cellules endothéliales (Religa et al., 2013). Cette interaction est responsable d'un défaut de fonction de la voie du VEGF et perturbe la formation des nouveaux vaisseaux normalement induite par le VEGF. Cette étude sur les cellules endothéliales représentait la première démonstration que les oligomères peuvent perturber la voie du VEGF. Ce facteur de croissance exerçant un effet important directement sur les neurones et les synapses, nous nous sommes intéressés à l'état de la voie du VEGF chez des patients atteints de la MA.

L'altération de la voie du VEGF en contexte Alzheimer peut intervenir à deux niveaux. Nous avons tout d'abord observé une accumulation importante de VEGF dans les plaques séniles, qui pourrait limiter sa disponibilité dans le parenchyme et entraver son action neuroprotectrice. Les plaques séniles étant riches en glycoprotéines de type héparane sulfate protéoglycane (HSPG) (Atwood et al., 2002), le VEGF pourrait se lier à celles-ci via son domaine de liaison à l'héparine. Le VEGF serait alors associé en complexe multi-protéique avec l'HSPG et l'A β qui conduirait à sa séquestration dans les plaques. Cette séquestration pourrait expliquer en partie la diminution de la concentration en VEGF dans le liquide

céphalo-rachidien (LCR) des patients malades, et la corrélation entre ce taux observé de VEGF et leur déclin cognitif (Leung et al., 2015). De plus, la perturbation de son expression pourrait être amplifiée par le recrutement de cellules gliales activées qui le secrètent, au voisinage des plaques (Ryu et al., 2009). Ce recrutement préférentiel de cellules productrices de VEGF pourrait créer un gradient d'expression du VEGF, avec un taux maximum dans les plaques et un appauvrissement à distance des plaques. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser l'expression des ARNm du VEGF en lien avec un marquage des plaques séniles au rouge Congo, après prélèvement de chaque région en microdissection laser. Cette analyse permettrait de confirmer ou d'infirmer l'existence d'un gradient d'expression du VEGF avec une surexpression locale au niveau des plaques et un déficit à distance.

D'autre part, nous avons observé une liaison directe entre les A β et le VEGF qui met en jeu des sites fonctionnels importants du facteur de croissance. Nous avons identifié trois principaux sites de fixation : au niveau N-terminal, sur le site de liaison au récepteur VEGFR2, et enfin sur le domaine de liaison à l'héparine (HBD). Il est important de noter que les différentes isoformes du VEGF ne possèdent pas toutes l'ensemble de ces domaines. L'HBD est un domaine essentiel à la fonction du VEGF car il est impliqué dans sa fixation aux HSPG de la matrice extracellulaire et des membranes cellulaires (Grünewald et al., 2010 ; Beckouche et al., 2015). La partie de l'HBD mise en jeu dans la liaison aux A β correspond à l'exon 6A du VEGF. Or, il s'avère que les formes 165 (humaine) et 164 (murine) ne possèdent pas cet exon, au même titre que le VEGF 121 (humaine) ou 120 (murine) qui est dépourvu de domaine HBD. Cependant, des études ont montré qu'un peptide bloquant ciblant ce domaine HBD peut perturber la fixation du VEGF 165 aux membranes cellulaires et au récepteur VEGFR2 (Lee et al., 2010 ; Jia et al, 2001). La liaison des A β à ce domaine HBD peut donc perturber la signalisation de la principale forme du VEGF dans le cerveau, le VEGF 165, même si cette forme ne possède pas le domaine en question.

Nous avons également observé une fixation des A β au site de liaison du VEGF à son récepteur VEGFR2. Une compétition pourrait donc intervenir entre la liaison du VEGF au VEGFR2 et sa liaison aux A β . Enfin, nos résultats ne semblent pas confirmer l'existence d'une liaison directe entre les A β et le VEGFR2 évoquée par le groupe de Patel. L'ensemble de ces observations donnent à penser que l'interaction A β -VEGF pourraient réduire la phosphorylation du récepteur VEGFR2 et donc son activité. Les oligomères solubles pourraient donc agir sur la voie du VEGF selon différents mécanismes. D'une part, ils pourraient bloquer l'interaction entre le VEGF et son récepteur, réduisant l'activation de la

voie. Mais ils pourraient aussi réduire l'activation du récepteur VEGFR2 via des effets indirects impliquant des complexes formés par le VEGF, les HSPGs et le récepteur VEGFR2.

Cette inactivation de la voie du VEGF pourrait donc bloquer son action au niveau des synapses. Nos résultats démontrent qu'un apport de VEGF permet de limiter la plupart des altérations synaptiques induites par les A β . Les effets bénéfiques de cet apport reposent sur plusieurs modes d'action possibles. D'une part, l'apport de VEGF pourrait lever le blocage de sa liaison au VEGFR2 par un processus de compétition avec les A β et maintenir une activation du récepteur. Mais ceci implique que les affinités de liaison du VEGF pour les A β d'une part, et pour son récepteur VEGFR2 d'autre part, soient comparables. Il est donc nécessaire de comparer ces affinités de liaison afin de conforter notre hypothèse. Des analyses en résonance plasmonique de surface «*SPR*» nous permettraient de comparer précisément les affinités respectives des A β et du VEGFR2 pour le VEGF. D'autre part, on peut envisager la possibilité que la liaison des A β au VEGF induise une diminution de la fixation des oligomères sur leurs différentes cibles, et limite leurs effets délétères. Nous avons commencé à explorer cette hypothèse en évaluant l'efficacité de la liaison des A β aux synapses, en présence ou en l'absence de VEGF. Nos résultats ne permettent pas de conclure à un effet quelconque du VEGF sur la liaison synaptique des A β . Les effets bénéfiques de l'apport de VEGF seraient donc préférentiellement dus à une stimulation de la voie du VEGF et non à une réduction de la fixation des A β aux synapses.

Enfin, une troisième possibilité est que l'action positive du VEGF sur les altérations synaptiques implique des voies de signalisation communes à celles mises en jeu par les A β et la calcineurine semble être un bon candidat. En effet, plusieurs études menées sur des modèles murins de la pathologie décrivent une augmentation anormale de l'activité de la calcineurine (Reese et al., 2008 ; Wu et al., 2010 ; Sompol et al., 2017). Dans les neurones, cette activation passe notamment par la stimulation des récepteurs NMDA et l'induction de courants calciques modérés dans l'élément postsynaptique. Or, il s'avère que le VEGF a la capacité de stimuler l'activation de RCAN1, une protéine inhibitrice de la calcineurine, via son récepteur VEGFR2 (Iizuka et al., 2004 ; Holmes et al., 2010). La calcineurine pourrait donc être une protéine centrale impliquée dans les effets du VEGF sur les altérations délétères liées aux A β .

La connaissance précise des sites de liaison entre A β et VEGF pourrait offrir de nouvelles perspectives avec l'utilisation de peptides interférents destinés à bloquer cette

liaison. En effet, en bloquant la liaison entre ces deux protéines, nous pourrions rétablir la disponibilité du VEGF et permettre une activation physiologique de la voie, sans apport exogène de VEGF. Nous avons donc réalisé notre étude sur puces à peptides afin d'identifier des sites permettant la production de peptides interférents. Sur les trois principaux sites identifiés, seulement un site est potentiellement intéressant dans la partie N terminale du VEGF. En effet, un blocage de la liaison au niveau de l'HBD perturberait la fonction du VEGF en empêchant notamment sa fixation à la matrice extracellulaire et/ou aux membranes cellulaires. De même, un peptide interférent correspondant au site de liaison du VEGF au VEGFR2 bloquerait la signalisation du VEGF. C'est pour cette raison que nous souhaitons nous pencher plus précisément sur l'utilisation et les propriétés interférentes d'un peptide développé par l'équipe de Gérard Perret (Binétruy-Tournaire et al., 2000). Il s'agit d'un peptide reconnu par un anticorps anti-VEGF qui ne bloque pas l'action angiogénique du VEGF. Or, nos résultats sur puces à peptides nous ont permis d'analyser la liaison de l'A β à ce peptide. Il s'avère que nos premiers résultats, non présentés dans notre article, démontrent une très forte affinité des oligomères pour la séquence de ce peptide, supérieure à l'ensemble des autres liaisons observées sur le VEGF. Ce peptide pourrait donc être un bon candidat pour réaliser un blocage de l'interaction entre A β et VEGF, sans pour autant affecter la liaison du facteur sur son récepteur.

Perturbation de la voie du VEGF, altération de l'activation de VEGFR2

Comme nous l'avons vu précédemment, les oligomères se lient au site de liaison du VEGF à son récepteur et pourraient être responsables d'une perturbation de son activation. Pour cette raison, nous avons étudié leur effet sur l'activation de VEGFR2 dans différents modèles cellulaires. D'après nos résultats, un traitement bref des cellules HEK aux A β réduit la phosphorylation du récepteur et son activation par le VEGF. Cette réduction de l'activation de VEGFR2 n'a pas lieu en l'absence du ligand VEGF. En revanche, nous notons une diminution de l'activation du VEGFR2 par les A β dans les neurones hippocampiques. Ces résultats nous ont paru aux premiers abords contradictoires, puisque les A β perturbaient la phosphorylation basale du récepteur mais seulement dans nos cultures neuronales. Ceci peut s'expliquer par la présence de VEGF ambiant que nous avons mesuré dans les milieux de cultures neuronales, car le VEGF est sécrété par les neurones (Kim et al., 2008, De Rossi et al. 2016). A l'inverse, nos milieux de cultures HEK sont déplétés en sérum et donc dépourvus de VEGF ambiant. L'altération de la phosphorylation/activation des récepteurs

VEGFR2 des neurones par les A β pourrait donc être due à un blocage du VEGF ambiant par les oligomères.

Nos résultats montrent également qu'un apport de VEGF permet de contrecarrer la diminution de l'activation de VEGFR2 dans les neurones. Cependant, nous ne notons aucune augmentation de l'activation du récepteur lorsque nous traitons les neurones hippocampiques au VEGF seul, contrairement aux cellules HEK. Ceci pourrait s'expliquer par des durées de traitement au VEGF différentes dans ces deux expériences. En effet, les cellules HEK sont traitées au VEGF pendant une courte durée – 5 minutes – contrairement aux neurones qui sont traités pendant 1 heure. La phosphorylation étant un processus rapide, il est probable que celle-ci soit nettement réduite au bout d'une heure. Nos résultats sur la cinétique d'activation de VEGFR2 dans les neurones confortent cette hypothèse puisque le récepteur revient à un niveau de phosphorylation basale après une heure de traitement au VEGF. De plus, comme le VEGF peut provoquer une internalisation de ses récepteurs (Dougher & Terman, 1999), un équilibre pourrait s'établir entre les récepteurs présents à la membrane et potentiellement activables, et ceux qui sont internalisés. Les A β perturbent donc la voie du VEGF en diminuant l'activation de son récepteur VEGFR2, et un apport de VEGF permet de compenser ce déficit fonctionnel dans les neurones hippocampiques. Cette voie étant requise pour l'induction de la LTP, la suite de notre étude s'est attachée à analyser l'effet d'une stimulation de cette voie dans les processus de plasticité, dans des modèles *in vitro* de la maladie d'Alzheimer.

Impact du VEGF sur les altérations de la plasticité synaptique induites par les A β

En 2013, l'étude de Religa et collègues a mis en évidence un effet bénéfique de la surexpression neuronale de VEGF sur les altérations mémorielles des souris TgCRND8, modèle transgénique de la maladie (Religa et al., 2013). Il s'agit là de la première étude montrant l'intérêt crucial d'augmenter les taux de VEGF au voisinage des neurones dans un modèle de la maladie. Néanmoins, cette étude s'est intéressée à l'impact du VEGF sur les altérations vasculaires induites par les A β , et n'a pas étudié son effet au niveau neuronal. Pourtant, la maladie d'Alzheimer est caractérisée principalement par un déclin cognitif, reposant notamment sur une altération fonctionnelle des synapses. C'est pourquoi notre équipe s'est attachée à comprendre les effets bénéfiques du VEGF dans la pathologie, mais cette fois-ci sous l'angle neuronal en analysant les mécanismes de plasticité synaptique.

Dans une étude récente, nous avons démontré que la présence du récepteur VEGFR2 dans les neurones est essentielle à l'induction d'une forme de plasticité synaptique dans l'hippocampe, la potentialisation à long terme (LTP) (De Rossi et al., 2016). Or, notre étude actuelle révèle que les A β induisent une perturbation de l'activation de ce récepteur dans les neurones hippocampiques et un blocage de la LTP, qui sont contrecarrés par un apport de VEGF. Cette action positive du VEGF sur la LTP pourrait en partie s'expliquer par un effet de compétition provoquant un déplacement de l'équilibre de la liaison A β -VEGF, le VEGF résiduel pouvant alors stimuler le récepteur VEGFR2 des neurones.

Les mécanismes mis en jeu dans cette altération de la LTP induite par les A β impliquent une diminution de l'expression synaptique des récepteurs AMPA. Or, c'est la phosphorylation de leur sous-unité GluA1 sur le résidu S845 qui régule l'insertion de ces récepteurs AMPA à la membrane et favorise leur recrutement synaptique (Lee et al., 2000). Nous mettons ici en évidence que l'action combinée des A β et du VEGF va stabiliser cette phosphorylation des récepteurs AMPA altérée par les A β . En revanche, nous n'observons aucune variation quant à la phosphorylation du résidu sérine 831 de GluA1. D'un point de vue mécanistique, le VEGF semble s'opposer au processus de déphosphorylation du résidu S845 de GluA1 induit par les A β , plutôt que de stimuler directement le processus de phosphorylation. Cette observation pourrait notamment expliquer pourquoi nous n'observons pas de différence dans l'expression synaptique des récepteurs en condition VEGF seule. Il était intéressant de vérifier cette hypothèse en analysant la contribution des différentes kinases et phosphatases en réponse aux différents traitements. Nous avons confirmé les travaux de la littérature en montrant que les A β augmentent l'activité de la calcineurine A qui provoque la déphosphorylation des récepteurs AMPA sur leur résidu S845 (Snyder et al., 2003). De plus, nous révélons que ces oligomères toxiques stimulent l'activité de la protéase caspase-3, impliquée dans le clivage et l'activation de la calcineurine, en accord avec les résultats d'une étude plus ancienne (D'Amelio et al. 2011). Pour la première fois notre étude met en évidence que le VEGF a la capacité de réduire l'activité de la caspase-3 et de la calcineurine stimulée par les A β , ce qui limite la déphosphorylation des récepteurs AMPA et contrecarre la diminution de leur expression membranaire. Dans les neurones hippocampiques confrontés à la toxicité des A β , l'action du VEGF réduit donc l'activité de la calcineurine et stabilise les récepteurs AMPA à la synapse. En revanche, il n'a pas d'effet sur l'activation des différentes kinases. Ce facteur s'oppose donc bien au processus de

déphosphorylation des récepteurs AMPA dans les neurones hippocampiques exposés aux A β , sans induire de phosphorylation supplémentaire.

Il est important de noter que la potentialisation et la dépression synaptique jouent sur un équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation de cette sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA. Les processus de LTD sont en effet caractérisés par une déphosphorylation de la S845, alors que les processus de LTP mettent en jeu la phosphorylation des S831 et S845 (Lee et al., 2000). Dans nos cultures hippocampiques, les A β , en stimulant l'activation de la calcineurine, activent une voie impliquée dans la dépression synaptique. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la pré-incubation des tranches d'hippocampe en présence d'A β dans nos expériences de LTP favorise la mise en jeu de ces voies impliquées dans la dépression synaptique. L'action positive du VEGF qui en résulte correspondrait alors à une potentialisation des synapses ayant commencé à amorcer une dépression synaptique. Cette levée de la dépression synaptique par le VEGF permettrait alors une restauration de la LTP. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse et de déterminer si le VEGF rétablit au cours de ce processus l'équilibre entre phosphatases et kinases.

Cet effet « antidépresseur synaptique » du VEGF semble confirmé dans notre étude immunohistochimique sur l'expression de surface des récepteurs AMPA. En effet, nos résultats révèlent que le VEGF limite la perte d'expression de ces récepteurs membranaires induite par les A β dans les neurones hippocampiques ; de plus, cet effet est corrélé au rétablissement de la phosphorylation des récepteurs AMPA. En accord avec cette hypothèse, nous n'observons aucune augmentation de l'expression de surface des récepteurs en condition VEGF seule. Cependant, nos résultats révèlent que cette condition provoque une augmentation de l'expression totale des récepteurs AMPA (résultats non présentés dans l'article). Le VEGF pourrait donc augmenter le pool intracellulaire des récepteurs AMPA sans pour autant induire leur adressage à la membrane. Notre étude ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'une stimulation locale de la synthèse des récepteurs ou d'une limitation de leur dégradation. Les ARNm codant pour les récepteurs peuvent en effet être présents et traduits localement au niveau des épines (Steward & Worley, 2001 ; Ju et al., 2004 ; Hall & Ghosh, 2008). Du fait du décours temporel, une partie de ces nouveaux récepteurs pourrait être impliquée dans des processus d'insertion membranaire et répondre aux modulations de l'activité du réseau neuronal.

Ainsi, en contrôlant l'activité des phosphatases et l'expression synaptique des récepteurs AMPA, le VEGF jouerait un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre entre dépression et potentialisation synaptique. Cet équilibre dérégulé sous l'effet des A β serait donc rétabli en présence de VEGF qui maintiendrait ainsi une fonction adéquate des synapses.

Remodelage des épines dendritiques par les A β et le VEGF

La perte des synapses est l'un des principaux corrélats neurobiologiques des déficits cognitifs chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Terry et al., 1991). Les synapses excitatrices sont portées par des structures spécialisées, les épines dendritiques, qui émergent du tronc dendritique des neurones (Nimchinsky et al., 2002). Ces épines sont des structures dynamiques et leur morphologie évolue en réponse à de nombreux facteurs comme l'activité des réseaux, l'apprentissage ou l'âge, mais aussi en condition pathologique comme dans le cas des maladies neurodégénératives et en particulier dans la maladie d'Alzheimer (Bonhoeffer & Yuste, 2002 ; Shankar et al., 2007). L'analyse de la morphologie de ces épines a fait l'objet de nombreuses études reposant sur des classifications basées sur différents algorithmes. L'absence de consensus et les différentes méthodes d'analyse est la source d'une importante variabilité des résultats. L'utilisation d'algorithmes exclusifs intègre des épines à la forme ambiguë dans les différentes sous-classes, et l'utilisation d'autres algorithmes ne permet pas une prise en compte globale de l'ensemble des épines. Les épines dites ambiguës sont alors exclues de l'analyse et peuvent parfois représenter des proportions relativement importantes, allant jusqu'à 30% (Harris et al., 1992). Il est donc essentiel de développer des algorithmes appropriés réduisant la proportion des épines exclues. Au fil des années, les méthodes de classification se sont améliorées et ont même permis le développement de nouvelles théories et modèles d'épines (Arellano et al., 2007). Aujourd'hui, la variation de la morphologie est considérée comme un continuum évolutif dépendant de la transmission synaptique et de l'activité neuronale (Kasai et al., 2010 ; Attardo et al., 2015 ; Berri & Nedivi, 2017). La classification des épines en catégories distinctes peut donc paraître restrictive, mais elle nous renseigne néanmoins sur la force de la transmission synaptique.

Notre étude révèle qu'un traitement prolongé des neurones hippocampiques aux A β est responsable d'une diminution significative de la densité de leurs épines dendritiques et

confirment les données de la littérature (Hsieh et al., 2006 ; Dorostkar et al., 2015). L'activité synaptique est capable d'influencer la densité comme la forme des épines, or cette activité est perturbée en présence d'A β . Nous avons confirmé que l'exposition brève de tranches d'hippocampe de souris aux A β induit une réduction majeure de la LTP. Elle facilite également la dépression à long terme (LTD) (Shankar et al., 2008). Or la LTD est responsable d'un remodelage des épines pouvant conduire à leur disparition (Nägerl et al., 2004). Nos résultats démontrent que les A β induisent une diminution de la densité en épines de type « mushroom » et « thin » après 24 heures de traitement. Les épines mushroom sont caractéristiques des épines stables et efficaces, alors que les épines « thin » sont plus plastiques et répondent fortement aux modulations de la transmission synaptique (Bourne & Harris, 2007). La disparition d'épines mushroom en présence d'oligomères peut en partie s'expliquer par l'impact délétère des A β sur la LTP qui provoque une réduction de la proportion d'épines destinées à être potentialisées et/ou stabilisées. Néanmoins nous pourrions nous attendre à une augmentation parallèle du nombre de filopodes traduisant une augmentation de la proportion d'épines en voie de disparition. Cette augmentation du nombre de filopodes est observable après 7 jours de traitement, mettant en évidence une perturbation globale du réseau neuronal. Les altérations induites par les oligomères sur la composition en récepteurs des synapses et la force de la transmission se répercutent donc sur la morphologie des épines dès 24h, et au moins jusqu'à 7 jours. Les épines stables comme les épines dynamiques sont rapidement altérées, et la proportion de filopodes augmente avec le temps. L'ensemble de ces résultats confirment les effets majeurs des A β sur l'architecture synaptique.

A l'heure actuelle, l'impact du VEGF sur la morphologie des épines est encore peu connu mais son rôle régulateur sur la plasticité synaptique hippocampique est bien démontré (Kim et al., 2008 ; Licht et al., 2011 ; De Rossi et al., 2016). Seuls quelques travaux ont exploré l'implication du VEGF dans la formation et la maintenance des épines dendritiques. Ainsi, la séquestration du VEGF dans le cerveau de souris adultes donne lieu à une production de nouveaux neurones granulaires dans le bulbe olfactif qui est caractérisée par un déficit en épine dendritique (Licht et al., 2010). Réciproquement, l'élévation des taux de VEGF dans l'hippocampe, suite à un protocole d'environnement enrichi, induit une augmentation du nombre d'épines dendritiques des neurones de la région CA1, qui est reproduite en culture par l'apport de VEGF (Huang et al. 2012). Pour la première fois notre étude met en évidence la capacité du VEGF à restaurer la morphologie et la densité des épines des neurones hippocampiques exposés aux A β . Le VEGF permet ainsi de préserver la plasticité

synaptique, même en présence des A β o, et de limiter la perte des épines, notamment de type mushroom, qui sont considérées comme les plus stables et les plus efficaces. En limitant les effets toxiques des oligomères sur la composition en récepteurs des synapses et leur fonction, le VEGF favorise la transmission et les processus de plasticité synaptique, et permet de stabiliser les synapses.

Conclusion et perspectives

Nos résultats ont confirmé les effets délétères des A β o sur l'organisation synaptique des neurones hippocampiques, et révèlent le mode d'action du VEGF qui conduit à contrecarrer ces effets négatifs (Figure 33). D'une part, le VEGF prévient la disparition des récepteurs AMPA des sites synaptiques, induite par les A β o, et restaure la potentialisation à long terme des synapses. De plus, il contrecarre une partie des effets délétères des oligomères sur les épines dendritiques, et permet de préserver la morphologie et la structure des synapses ou de compenser leur perte par la mise en place de nouvelles synapses. Le VEGF semble donc augmenter la résistance des neurones aux effets synaptotoxiques des A β o. Son accumulation dans les plaques séniles des patients atteints de la MA pourrait expliquer en partie le blocage de son action bénéfique sur les neurones et aggraver les altérations de la transmission synaptique qui sont une caractéristique majeure des phases précoces de la MA.

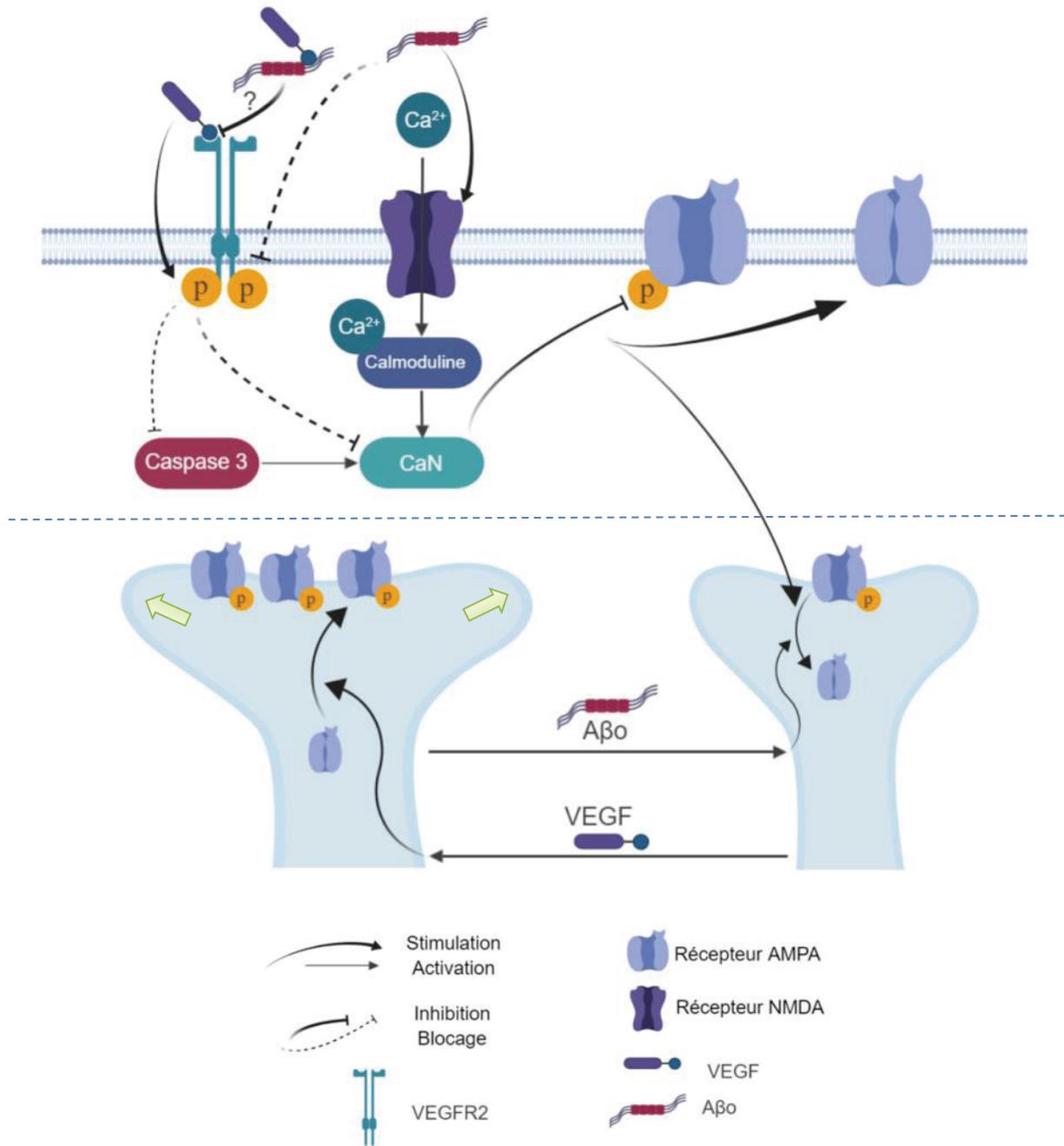


Figure 33. Impact du VEGF sur les altérations synaptiques induites par les oligomères solubles d'Aβ. En se liant au VEGF, les oligomères perturbent la fonction de la voie VEGF/VEGFR2, potentiellement par une inhibition de la liaison du facteur de croissance à son récepteur. Le VEGF réduit l'activation de la voie caspase-3-calcineurine induite par les oligomères et favorise ainsi le maintien et l'activité des récepteurs AMPA à la synapse en stabilisant leur phosphorylation. Cette action du VEGF permet de contrecarrer les altérations des processus de plasticité synaptique et structurale liées aux oligomères et de maintenir une transmission synaptique efficace.

Mais au-delà de ces effets directs sur les neurones, les effets du VEGF peuvent aussi impliquer les cellules gliales. Les astrocytes et les microglies participent à la régulation de la transmission synaptique, et leur fonction est aussi altérée par les A β dans la MA (Hong et al., 2016 ; Spampinato et al., 2017). Ainsi, sur des modèles *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique, les oligomères solubles altèrent la perméabilité des cellules endothéliales, en provoquant une augmentation de l'expression de VEGF et sa libération par les astrocytes. Cette libération de VEGF induit à son tour une production de MMP9 par les cellules endothéliales et l'ouverture de la barrière (Spampinato et al., 2017). De plus, les oligomères solubles activent la microglie et favorise la phagocytose des synapses par la mise en jeu de la voie du complément (Hong et al., 2016). Or, il s'avère que le VEGF est un facteur chimioattractant qui stimule le recrutement des microglies au voisinage des plaques (Ryu et al., 2009) et favorise aussi leur prolifération (Forstreuter et al., 2002). Piégé dans les plaques séniles, le VEGF pourrait alors stimuler leur recrutement et la prolifération des microglies, facilitant ainsi les processus inflammatoires délétères au voisinage des plaques. De plus, l'activation des microglies stimule en retour leur sécrétion de VEGF (Ryu et al., 2009), et cette caractéristique pourrait expliquer un emballement des processus inflammatoires au niveau des plaques séniles favorisant l'apparition des neurites dystrophiques et la dégénérescence neuronale. Le VEGF semble donc un facteur clé impliqué dans la régulation de la fonction des cellules gliales. Il serait intéressant de se pencher plus précisément sur l'implication de la voie du VEGF dans l'inflammation et l'altération des fonctions microgliale et astrocytaire au cours de la MA. En effet, une perturbation de la sécrétion et de la répartition du VEGF pourrait être impliquée dans les processus inflammatoires altérant les fonctions neuronales.

Les études ayant analysé l'expression du VEGF dans le parenchyme cérébral chez l'homme et son taux dans le sérum et le LCR donnent lieu à des résultats contrastés (Tarkowski et al., 2002 ; Mateo et al., 2007 ; Tang et al., 2013 ; Leung et al., 2015 Chakraborty et al., 2018). Ces variations reflètent en partie les différentes approches utilisées pour détecter le VEGF, avec l'évaluation de son expression dans le cerveau, le LCR ou en périphérie dans le sérum. Mais ces résultats apparemment contradictoires pourraient aussi être la conséquence de l'hétérogénéité de structure des plaques observée chez les patients et mise en évidence par le marquage au Pittsburgh compound B (PiB). En effet, dans certains cas aucun signal PIB n'est détecté chez les patients alors que les plaques séniles sont pourtant présentes (Rosen et al., 2010). En analysant les plaques chez 27 patients (21 MA familiale, 6

sporadiques), l'équipe de Mathias Jucker a révélé une importante disparité dans la structure des plaques séniles (Rasmussen et al., 2017). Les auteurs supposent que cette variation importante pourrait être due à l'environnement cérébral affectant la conformation des fibrilles d'A β et leur déposition. Or, nos résultats mettent en évidence des différences d'affinités de liaison du VEGF à l'A β en fonction de sa conformation (A β ₄₀, monomères, oligomères d'A β ₄₂). L'hétérogénéité des plaques séniles pourraient donc être à l'origine d'une variation de l'interaction entre le VEGF et l'A β modulant ainsi sa sécrétion dans le LCR. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression du VEGF en fonction des différents sous-types de plaques afin de déterminer une éventuelle corrélation.

Enfin, nos résultats mettent en exergue des effets bénéfiques du VEGF sur les altérations synaptiques induites *in vitro* par les A β . Il est donc maintenant essentiel d'évaluer la pertinence de ces effets dans des modèles murins de la pathologie. Néanmoins, une surexpression chronique de VEGF *in vivo* est sujette à caution car elle pourrait avoir un impact délétère à long terme sur la perméabilité vasculaire. Comme nos résultats ont révélé que l'altération de la voie du VEGF est en partie la conséquence de sa liaison aux oligomères, une stratégie de blocage de cette liaison par des peptides interférents peut être envisagée. L'infusion prolongée de ces peptides pourrait ainsi réduire la liaison du VEGF aux oligomères et rétablir ainsi le taux endogène de ce facteur et sa fonction neuroprotectrice. Cette approche correspond aux futures directions de notre équipe.

Dans leur ensemble, les résultats de cette thèse ouvrent de nouvelles perspectives sur l'implication du VEGF dans la résistance des neurones à la synaptotoxicité et sur des thérapies capables de retarder le développement de la maladie d'Alzheimer.

BIBLIOGRAPHIE

- Aase, K., Euler, G. von, Li, X., Pontén, A., Thorén, P., Cao, R., Cao, Y., Olofsson, B., Gebre-Medhin, S., Pekny, M., et al. (2001). Vascular Endothelial Growth Factor-B–Deficient Mice Display an Atrial Conduction Defect. *Circulation*, 104, 358–364.
- Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S.-Y., Elroy-Stein, O., Levi, B.-Z. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene*, 17, 227–236.
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M.V., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J.L., Trullas, R., Domercq, M., and Matute, C. (2010). Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*. 47:264–272.
- Albuquerque, R.J.C., Hayashi, T., Cho, W.G., Kleinman, M.E., Dridi, S., Takeda, A., Baffi, J.Z., Yamada, K., Kaneko, H., Green, M.G., Chappell, J., Wilting, J., Weich, H.A., Yamagami, S., Amano, S., Mizuki, N., Alexander, J.S., Peterson, M.L., Brekken, R.A., Hirashima, M., Capoor, S., Usui, T., Ambati, B.K., Ambati, J. (2009). Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat. Med*, 15, 1023–1030.
- Ali, D.W., Salter, M.W. (2001). NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity, 7.
- Almeida, C.G., Tampellini, D., Takahashi, R.H., Greengard, P., Lin, M.T., Snyder, E.M., Gouras, G.K. (2005). Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol. Dis*, 20, 187–198.
- Altmann, A., Tian, L., Henderson, V.W., Greicius, M.D. (2014). Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, 75, 563–573.
- Álvarez-Aznar, A., Muhl, L., Gaengel, K. (2017). VEGF Receptor Tyrosine Kinases: Key Regulators of Vascular Function. *Curr. Top. Dev. Biol.* 123, 433–482.
- Alzheimer’s Association Report (2018). Alzheimer’s disease facts and figures, 2018. *Alzheimer’s & Dementia* 14, 367–429.
- Amada, N., Aihara, K., Ravid, R., Horie, M. (2005). Reduction of NR1 and phosphorylated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II levels in Alzheimer’s disease, *Neuroreport* 16, 1809–1813.
- Amar, F., Sherman, M.A., Rush, T., Larson, M., Boyle, G., Chang, L., Götz, J., Buisson, A., Lesné, S.E. (2017). Amyloid- β oligomer A β *56 induces specific alterations of tau phosphorylation and neuronal signaling. *Sci Signal*, 10.
- Ambrosini, A., Bresciani, L., Fracchia, S., Brunello, N., Racagni, G. (1995). Metabotropic glutamate receptors negatively coupled to adenylate cyclase inhibit N-methyl-D-aspartate receptor activity and prevent neurotoxicity in mesencephalic neurons in vitro. *Mol Pharmacol*, 47, 1057–1064.
- Anand, R., Gill, K.D., Mahdi, A.A. (2014). Therapeutics of Alzheimer’s disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 76, 27–50.
- Anoop, A., Singh, P.K., Jacob, R.S., Maji, S.K. (2010). CSF Biomarkers for Alzheimer’s Disease Diagnosis. *Int J Alzheimers Dis*, 2010.
- Antequera, D., Portero, A., Bolos, M., Orive, G., Hernández, R.M., Pedraz, J.L., Carro, E. (2012). Encapsulated VEGF-Secreting Cells Enhance Proliferation of Neuronal

- Progenitors in the Hippocampus of A β PP/PS1 Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 29, 187–200.
- Arellano, J.I., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., Yuste, R. (2007). Ultrastructure of Dendritic Spines: Correlation Between Synaptic and Spine Morphologies. *Front Neurosci*, 1, 131–143.
- Asai, A., Qiu, J., Narita, Y., Chi, S., Saito, N., Shinoura, N., Hamada, H., Kuchino, Y., and Kirino, T. (1999). High Level Calcineurin Activity Predisposes Neuronal Cells to Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:34450–34458.
- Attardo, A., Fitzgerald, J.E., Schnitzer, M.J. (2015). Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus. *Nature*, 523, 592–596.
- Atwood, C.S., Martins, R.N., Smith, M.A., Perry, G. (2002). Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid- β peptide and associated proteins. *Peptides, Amyloid Peptides*, 23, 1343–1350.
- Avraham-Davidi, I., Ely, Y., Pham, V.N., Castranova, D., Grunspan, M., Malkinson, G., Gibbs-Bar, L., Mayseless, O., Allmog, G., Lo, B., Warren, C.M., Chen, T.T., Ungos, J., Kidd, K., Shaw, K., Rogachev, I., Wan, W., Murphy, P.M., Farber, S.A., Carmel, L., Shelness, G.S., Iruela-Arispe, M.L., Weinstein, B.M., Yaniv, K. (2012). ApoB-containing lipoproteins regulate angiogenesis by modulating expression of VEGF receptor 1. *Nat. Med*, 18, 967–973.
- Babus, L.W., Little, E.M., Keenoy, K.E., Minami, S.S., Chen, E., Song, J.M., Caviness, J., Koo, S.-Y., Pak, D.T.S., Rebeck, G.W., Turner, R.S., Hoe, H.-S. (2011). Decreased dendritic spine density and abnormal spine morphology in Fyn knockout mice. *Brain Res*, 1415, 96–102.
- Bachelder RE, Crago A, Chung J, et al. (2001). Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 61:5736–40.
- Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res*, 62:7203–6.
- Bales, K.R., Verina, T., Dodel, R.C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., Hyslop, P., Johnstone, E.M., Little, S.P., Cummins, D.J., Piccardo, P., Ghetti, B., Paul, S.M. (1997). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nature Genetics*, 17, 263.
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Wisniewski, H.M. (1989). Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 477, 90–99.
- Baranger, K., Marchalant, Y., Bonnet, A.E., Crouzin, N., Carrete, A., Paumier, J.-M., Py, N.A., Bernard, A., Bauer, C., Charrat, E., Moschke, K., Seiki, M., Vignes, M., Lichtenthaler, S.F., Checler, F., Khrestchatisky, M., Rivera, S. (2016). MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73, 217–236.
- Barreto, W.G., Siufi, G.C., Kimura, E.Y., Pessoa, J.G., Pesqueiro, J.B., Vasconcelos, Y., Silva, M.C., Lazar, A.E., Yamamoto, M. (2008). VEGF Expression as Prognostic

- Factor in Early Clinical Stages of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Blood*, 112, 4173–4173.
- Barria, A. (1997). Regulatory Phosphorylation of AMPA-Type Glutamate Receptors by CaMKII During Long-Term Potentiation. *Science*, 276, 2042–2045.
- Barry, A.E., Klyubin, I., Mc Donald, J.M., Mably, A.J., Farrell, M.A., Scott, M., Walsh, D.M., Rowan, M.J. (2011). Alzheimer's Disease Brain-Derived Amyloid- β -Mediated Inhibition of LTP In Vivo Is Prevented by Immunotargeting Cellular Prion Protein. *Journal of Neuroscience*, 31, 7259–7263.
- Basagiannis, D., Zografou, S., Murphy, C., Fotsis, T., Morbidelli, L., Ziche, M., Bleck, C., Mercer, J., and Christoforidis, S. (2016). VEGF induces signalling and angiogenesis by directing VEGFR2 internalisation through macropinocytosis. *Development* 143, e1.1-e1.1.
- Bates, D.O., Cui, T.-G., Doughty, J.M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J.D., Peat, D., Gillatt, D., Harper, S.J. (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 62, 4123–4131.
- Baude, A., Nusser, Z., Molnár, E., McIlhinney, R.A., Somogyi, P. (1995). High-resolution immunogold localization of AMPA type glutamate receptor subunits at synaptic and non-synaptic sites in rat hippocampus. *Neuroscience*, 69, 1031–1055.
- Bautch, V.L. (2012). VEGF-Directed Blood Vessel Patterning: From Cells to Organism. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- Bayer, K.-U., De Koninck, P., Leonard, A.S., Hell, J.W., Schulman, H. (2001). Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature*, 411, 801–805.
- Bear, M.F., Wickliffe, A.C. (1996). Long-Term Depression in Hippocampus. *Annu. Rev. Neurosc*, 19, 437–62.
- Beckouche, N., Bignon, M., Lelarge, V., Mathivet, T., Pichol-Thievend, C., Berndt, S., Hardouin, J., Garand, M., Ardidie-Robouant, C., Barret, A., Melino, G., Lortat-Jacob, H., Muller, L., Monnot, C., Germain, S. (2015). The interaction of heparan sulfate proteoglycans with endothelial transglutaminase-2 limits VEGF165-induced angiogenesis. *Sci Signal*, 8, ra70.
- Bekris, L.M., Yu, C.-E., Bird, T.D., Tsuang, D.W. (2010). Genetics of Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 23, 213–227.
- Benavides-Piccione, R., Fernaud-Espinosa, I., Robles, V., Yuste, R., DeFelipe, J. (2013). Age-Based Comparison of Human Dendritic Spine Structure Using Complete Three-Dimensional Reconstructions. *Cereb Cortex*, 23, 1798–1810.
- Bennett, R.E., DeVos, S.L., Dujardin, S., Corjuc, B., Gor, R., Gonzalez, J., Roe, A.D., Frosch, M.P., Pitstick, R., Carlson, G.A., Hyman, B.T. (2017). Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid β . *Am J Pathol*, 187, 1601–1612.
- Bernard, A., Khrestchatisky, M. (1994). Assessing the Extent of RNA Editing in the TMII Regions of GluR5 and GluR6 Kainate Receptors During Rat Brain Development. *Journal of Neurochemistry*, 62, 2057–2060.
- Berry, K.P., Nedivi, E. (2017). Spine dynamics: Are they all the same? *Neuron*, 96, 43–55.
- Bhaskar, K., Hobbs, G.A., Yen, S.-H., Lee, G. (2010). Tyrosine phosphorylation of tau accompanies disease progression in transgenic mouse models of tauopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*, 36, 462–477.

- Bhattacharyya, M., Nandanor, A., Osman, M., Kasinathan, C., Frederikse, P. (2014). Erratum to: NMDA Glutamate Receptor NR1, NR2A and NR2B Expression and NR2B Tyr-1472 Phosphorylation in the Lens. *Neurochemical Research*, 39, 1833–1833.
- Bidoret, C., Ayon, A., Barbour, B., Casado, M. (2009). Presynaptic NR2A-containing NMDA receptors implement a high-pass filter synaptic plasticity rule. *PNAS*, 106, 14126–14131.
- Billingsley, M.L., Ellis, C., Kincaid, R.L., Martin, J., Schmidt, M.L., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (1994). Calcineurin Immunoreactivity in Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology*. 126:178–184.
- Binétruy-Tournaire, R., Demangel, C., Malavaud, B., Vassy, R., Rouyre, S., Kraemer, M., Plouët, J., Derbin, C., Perret, G., Mazié, J.C. (2000). Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J*, 19, 1525–1533.
- Bird, T.D. (2008). Genetic Aspects of Alzheimer Disease. *Genet Med*, 10, 231–239.
- Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31–39.
- Bloodgood, B.L., Giessel, A.J., Sabatini, B.L. (2009). Biphasic Synaptic Ca Influx Arising from Compartmentalized Electrical Signals in Dendritic Spines. *PLOS Biology*, 7, e1000190.
- Bonhoeffer, T., Yuste, R. (2002). Spine Motility: Phenomenology, Mechanisms, and Function. *Neuron*, 35, 1019–1027.
- Bortolotto, Z.A., Bashir, Z.I., Davies, C.H., Collingridge, G.L. (1994). A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. *Nature*, 368, 740–743.
- Bourne, J., Harris, K.M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol*, 17, 381–386.
- Bouvier, G., Bidoret, C., Casado, M., Paoletti, P. (2015). Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules. *Neuroscience*, 311, 322–340.
- Braak H. & Braak E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4): 239-59.
- Braithwaite, S.P., Stock, J.B., Lombroso, P.J., and Nairn, A.C. (2012). Protein Phosphatases and Alzheimer's Disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 106:343–379.
- Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S., Risau, W. (1992). Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*, 114(2):521-32.
- Bruno, V., Copani, A., Knöpfel, T., Kuhn, R., Casabona, G., Dell'Albani, P., Condorelli, D.F., Nicoletti, F. (1995). Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology*, 34, 1089–1098.
- Buisson, A., Yu, S.P., Choi, D.W. (1996). DCG-IV Selectively Attenuates Rapidly Triggered NMDA-induced Neurotoxicity in Cortical Neurons. *European Journal of Neuroscience*, 8, 138–143.
- Cacace, R., Slegers, K., Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement*, 12, 733–748.

- Caccamo, A., Oddo, S., Billings, L.M., Green, K.N., Martinez-Coria, H., Fisher, A., LaFerla, F.M. (2006). M1 Receptors Play a Central Role in Modulating AD-like Pathology in Transgenic Mice. *Neuron*, 49, 671–682.
- Cammalleri, M., Martini, D., Ristori, C., Timperio, A.M., Bagnoli, P. (2011). Vascular endothelial growth factor up-regulation in the mouse hippocampus and its role in the control of epileptiform activity. *European Journal of Neuroscience*, 33, 482–498.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A., Frebourg, T. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet*, 65, 664–670.
- Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D.S., Liu, Y., Fong, D.M., Young, D., During, M.J. (2004). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nature Genetics*, 36, 827–835.
- Cao, X., Südhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, 293, 115–120.
- Cariboni, A., Davidson, K., Dozio, E., Memi, F., Schwarz, Q., Stossi, F., Parnavelas, J.G., Ruhrberg, C. (2011). VEGF signalling controls GnRH neuron survival via NRP1 independently of KDR and blood vessels. *Development (Cambridge, England)*, 138, 3723.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Med*, 9, 8.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439.
- Carmeliet, P., Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473, 298–307.
- Carmeliet, P., Ruiz de Almodovar, C. (2013). VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 1763–1778.
- Carmeliet, P., Tessier-Lavigne, M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*, 436, 193–200.
- Carroll, R.C., Beattie, E.C., von Zastrow, M., Malenka, R.C. (2001). Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci*, 2, 315–324.
- Carvalho, R.V., da Silva Ferreira, F., Heimfarth, L., Pierozan, P., Fernandes, C., and Pessoa-Pureur, R. (2016). Acute Hyperammonemia Induces NMDA-Mediated Hypophosphorylation of Intermediate Filaments Through PP1 and PP2B in Cerebral Cortex of Young Rats. *Neurotoxicity Research*. 30:138–149.
- Cauwenberghe, C.V., Broeckhoven, C.V., Sleegers, K. (2016). The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine*, 18, 421–430.
- Cavallucci, V., Berretta, N., Nobili, A., Nisticò, R., Mercuri, N.B., D’Amelio, M. (2013). Calcineurin Inhibition Rescues Early Synaptic Plasticity Deficits in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Neuromol Med*, 15, 541–548.

- Cébe Suarez, S., Pieren, M., Cariolato, L., Arn, S., Hoffmann, U., Bogucki, A., Manlius, C., Wood, J., and Ballmer-Hofer, K. (2006). A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, 2067–2077.
- Chakraborty, A., Chatterjee, M., Twaalfhoven, H., Del Campo Milan, M., Teunissen, C.E., Scheltens, P., Fontijn, R.D., van Der Flier, W.M., de Vries, H.E. (2018). Vascular Endothelial Growth Factor remains unchanged in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer’s disease and vascular dementia. *Alzheimer’s Research & Therapy*, 10, 58.
- Chang, C.-P., Neilson, J.R., Bayle, J.H., Gestwicki, J.E., Kuo, A., Stankunas, K., Graef, I.A., Crabtree, G.R. (2004). A Field of Myocardial-Endocardial NFAT Signaling Underlies Heart Valve Morphogenesis. *Cell*, 118, 649–663.
- Chasseigneaux, S., Allinquant, B. (2012). Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J. Neurochem*, 120 Suppl 1, 99–108.
- Chauvet, S., Burk, K., Mann, F. (2013). Navigation rules for vessels and neurons: cooperative signaling between VEGF and neural guidance cues. *Cell. Mol. Life Sci*, 70, 1685–1703.
- Chen, B.-S., Roche, K.W. (2007). Regulation of NMDA Receptors by Phosphorylation. *Neuropharmacology*, 53, 362–368.
- Chen, J., Somanath, P.R., Razorenova, O., Chen, W.S., Hay, N., Bornstein, P., Byzova, T.V. (2005). Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat Med*, 11, 1188–1196.
- Chen, L.-J., Wang, Y.-J., Chen, J.-R., and Tseng, G.-F. (2015). NMDA receptor triggered molecular cascade underlies compression-induced rapid dendritic spine plasticity in cortical neurons. *Exp. Neurol.* 266:86–98.
- Chen, Q.-S., Wei, W.-Z., Shimahara, T., and Xie, C.-W. (2002). Alzheimer Amyloid β -Peptide Inhibits the Late Phase of Long-Term Potentiation through Calcineurin-Dependent Mechanisms in the Hippocampal Dentate Gyrus. *Neurobiology of Learning and Memory*. 77:354–371.
- Chen, X., Levy, J.M., Hou, A., Winters, C., Azzam, R., Sousa, A.A., Leapman, R.D., Nicoll, R.A., Reese, T.S. (2015). PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112, E6983-6992.
- Chêne, G., Beiser, A., Au, R., Preis, S.R., Wolf, P.A., Dufouil, C., Seshadri, S. (2015). Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimer’s & Dementia*, 11, 310–320.
- Cheng, I.H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J.J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., Puoliväli, J., Lesné, S., Ashe, K.H., Muchowski, P.J., Mucke, L. (2007). Accelerating Amyloid- β Fibrillization Reduces Oligomer Levels and Functional Deficits in Alzheimer Disease Mouse Models. *J. Biol. Chem*, 282, 23818–23828.
- Chiappelli, M., Borroni, B., Archetti, S., Calabrese, E., Corsi, M.M., Franceschi, M., Padovani, A., Licastro, F. (2006). VEGF gene and phenotype relation with Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment. *Rejuvenation Res*, 9, 485–493.
- Chiodelli, P., Mitola, S., Ravelli, C., Oreste, P., Rusnati, M., Presta, M. (2011). Heparan sulfate proteoglycans mediate the angiogenic activity of the vascular endothelial

- growth factor receptor-2 agonist gremlin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 31, e116-127.
- Cho, S.-J., Park, M.H., Han, C., Yoon, K., Koh, Y.H. (2017). VEGFR2 alteration in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7, 17713.
- Choi, C.H., Song, S.Y., Choi, J.-J., Ae Park, Y., Kang, H., Kim, T.-J., Lee, J.-W., Kim, B.-G., Lee, J.-H., Bae, D.-S. (2008). Prognostic significance of VEGF expression in patients with bulky cervical carcinoma undergoing neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*, 8, 295.
- Chromy, B.A., Nowak, R.J., Lambert, M.P., Viola, K.L., Chang, L., Velasco, P.T., Jones, B.W., Fernandez, S.J., Lacor, P.N., Horowitz, P., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L. (2003). Self-assembly of A β (1-42) into globular neurotoxins. *Biochemistry*, 42, 12749–12760.
- Chu, Z., Hablitz, J.J., (2000). Quisqualate induces an inward current via mGluR activation in neocortical pyramidal neurons. *Brain Research*, 879 (1–2): 88–92.
- Cissé, M., Halabisky, B., Harris, J., Devidze, N., Dubal, D.B., Sun, B., Orr, A., Lotz, G., Kim, D.H., Hamto, P., Ho, K., Yu, G.-Q., Mucke, L. (2011). Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature*, 469, 47–52.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., Selkoe, D.J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*, 360, 672–674.
- Clark, R.F., Hutton, M., Fuldner, M., Froelich, S., Karran, E., Talbot, C., Crook, R., Lendon, C., Prihar, G., He, C., Korenblat, K., Martinez, A., Wragg, M., Busfield, F., Behrens, M.I., Myers, A., Norton, J., Morris, J., Mehta, N., Pearson, C., Lincoln, S., Baker, M., Duff, K., Zehr, C., Perez-Tur, J., Houlden, H., Ruiz, A., Ossa, J., Lopera, F., Arcos, M., Madrigal, L., Collinge, J., Humphreys, C., Ashworth, A., Sarnier, S., Fox, N., Harvey, R., Kennedy, A., Roques, P., Cline, R.T., Philips, C.A., Venter, J.C., Forsell, L., Axelman, K., Lilius, L., Johnston, J., Cowburn, R., Viitanen, M., Winblad, B., Kosik, K., Haltia, M., Poyhonen, M., Dickson, D., Mann, D., Neary, D., Snowden, J., Lantos, P., Lannfelt, L., Rossor, M., Roberts, G.W., Adams, M.D., Hardy, J., Goate, A. (1995). The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nature Genetics*, 11, 219–222.
- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., Ashe, K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci*, 8, 79–84.
- Clipstone N.A. & Crabtree G.R. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*. 357:695–697.
- Coisne, C., Engelhardt, B.,(2011). Tight junctions in brain barriers during central nervous system inflammation. *Antioxid. Redox Signal*, 15, 1285–1303.
- Colley, P.A., Sheu, F.S., Routtenberg, A. (1990). Inhibition of protein kinase C blocks two components of LTP persistence, leaving initial potentiation intact. *J. Neurosci*, 10, 3353–3360.
- Connolly, D.T., Heuvelman, D.M., Nelson, R., Olander, J.V., Eppley, B.L., Delfino, J.J., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M., and Feder, J. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 84, 1470–1478.

- Contractor, A., Mulle, C., Swanson, G.T. (2011). Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends in Neurosciences*, 34, 154–163.
- Coultrap, S.J., Freund, R.K., O’Leary, H., Sanderson, J.L., Roche, K.W., Dell’Acqua1, M.L., Bayer, K.U. (2014). Autonomous CaMKII mediates both LTP and LTD using a mechanism for differential substrate site selection. *Cell Rep*, 6, 431–437.
- Cross, M.J., Dixelius, J., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 488–494.
- Cruts, M., Van Broeckhoven, C. (1998). Presenilin mutations in Alzheimer’s disease. *Hum. Mutat.* 11, 183–190.
- Cummings, J.A., Mulkey, R.M., Nicoll, R.A., Malenka, R.C. (1996). Ca²⁺ Signaling Requirements for Long-Term Depression in the Hippocampus. *Neuron*, 16, 825–833.
- D’Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Diamantini, A., De Zio, D., Carrara, P., Battistini, L., Moreno, S., Bacci, A., Ammassari-Teule, M., Marie, H., Cecconi, F. (2011). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Nat Neurosci*, 14, 69–76.
- D’Amelio, M., Sheng, M., Cecconi, F. (2012). Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends in Neurosciences*, 35, 700–709.
- Dahlgren, K.N., Manelli, A.M., Stine, W.B., Baker, L.K., Krafft, G.A., LaDu, M.J. (2002). Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- β Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *J. Biol. Chem*, 277, 32046–32053.
- De Rossi, P., Harde, E., Dupuis, J.P., Martin, L., Chounlamountri, N., Bardin, M., Watrin, C., Benetollo, C., Pernet-Gallay, K., Luhmann, H.J., Honnorat, J., Malleret, G., Groc, L., Acker-Palmer, A., Salin, P.A., Meissirel, C. (2016). A critical role for VEGF and VEGFR2 in NMDA receptor synaptic function and fear-related behavior. *Molecular Psychiatry*, 21, 1768–1780.
- De Simoni, A., Griesinger, C.B., Edwards, F.A. (2003). Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J. Physiol. (Lond.)*, 550, 135–147.
- Deng, Y., Atri, D., Eichmann, A., Simons, M. (2013). Endothelial ERK signaling controls lymphatic fate specification. *J Clin Invest*, 123, 1202–1215.
- Deng, Y., Zhang, X., Simons, M. (2015). Molecular controls of lymphatic VEGFR3 signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 35, 421–429.
- Derkach, V., Barria, A., Soderling, T.R. (1999). Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *PNAS*, 96, 3269–3274.
- Diering, G.H., Gustina, A.S., Haganir, R.L. (2014). PKA-GluA1 coupling via AKAP5 controls AMPA receptor phosphorylation and cell-surface targeting during bidirectional homeostatic plasticity. *Neuron*, 84, 790–805.
- Dineley, K.T., Hogan, D., Zhang, W.-R., and Tagliatela, G. (2007). Acute Inhibition Of Calcineurin Restores Associative Learning And Memory In Tg2576 APP Transgenic Mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 88:217–224.
- Dineley, K.T., Kaye, R., Neugebauer, V., Fu, Y., Zhang, W., Reese, L.C., Tagliatela, G. (2010). Amyloid- β oligomers impair fear conditioned memory in a calcineurin-dependent fashion in mice. *Journal of Neuroscience Research*, 88(13) : 2923-2932.
- Ding, X., Gu, R., Zhang, M., Ren, H., Shu, Q., Xu, G., Wu, H. (2018). Microglia enhanced the angiogenesis, migration and proliferation of co-cultured RMECs. *BMC Ophthalmology*, 18.

- DiSalvo, J., Bayne, M.L., Conn, G., Kwok, P.W., Trivedi, P.G., Soderman, D.D., Palisi, T.M., Sullivan, K.A., and Thomas, K.A. (1995). Purification and Characterization of a Naturally Occurring Vascular Endothelial Growth Factor · Placenta Growth Factor Heterodimer. *J. Biol. Chem.* 270, 7717–7723.
- Doody, R.S., Thomas, R.G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, P.S., Siemers, E., Liu-Seifert, H., Mohs, R. (2014). Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer’s Disease. *New England Journal of Medicine*, 370, 311–321.
- Dorostkar, M.M., Zou, C., Blazquez-Llorca, L., Herms, J. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer’s disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathol*, 130, 1–19.
- Dougher, M., Terman, B.I. (1999). Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene*, 18, 1619.
- Drewes G., Mandelkow E.-M., Baumann K., Goris J., Merlevede W., and Mandelkow E. (1994). Dephosphorylation of tau protein and Alzheimer paired helical filaments by calcineurin and phosphatase-2A. *FEBS Letters*. 336:425–432.
- Dulin, F., Léveillé, F., Ortega, J.B., Mornon, J.-P., Buisson, A., Callebaut, I., Colloc’h, N. (2008). p3 peptide, a truncated form of A β devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Letters*, 582, 1865–1870.
- Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M. and Alitalo, K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*, 282, 946–949.
- Dupuis, J.P., Ladépêche, L., Seth, H., Bard, L., Varela, J., Mikasova, L., Bouchet, D., Rogemond, V., Honnorat, J., Hanse, E., Groc, L. (2014). Surface dynamics of GluN2B-NMDA receptors controls plasticity of maturing glutamate synapses. *EMBO J*, 33, 842–861.
- Ebrahimi, S., Okabe, S. (2014). Structural dynamics of dendritic spines: Molecular composition, geometry and functional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1838, 2391–2398.
- Emptage, N.J., Reid, C.A., Fine, A. (2001). Calcium Stores in Hippocampal Synaptic Boutons Mediate Short-Term Plasticity, Store-Operated Ca²⁺ Entry, and Spontaneous Transmitter Release. *Neuron*, 29, 197–208.
- Endoh, T. (2004). Characterization of modulatory effects of postsynaptic metabotropic glutamate receptors on calcium currents in rat nucleus tractus solitarius. *Brain Research*, 1024, 212–224.
- Engert, F., Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, 399, 66–70.
- Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J.M., Alakakone, B., Shewan, D., Ruhrberg, C. (2011). VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. *Neuron*, 70, 951–965.
- Fearnley, G., Smith, G., Harrison, M., Wheatcroft, S., Tomlinson, D., Ponnambalam, S. (2013). Vascular endothelial growth factor-A regulation of blood vessel sprouting in health and disease. *OA Biochemistry*, 1(1):5.

- Fearnley, G.W., Smith, G.A., Abdul-Zani, I., Yuldasheva, N., Mughal, N.A., Homer-Vanniasinkam, S., Kearney, M.T., Zachary, I.C., Tomlinson, D.C., Harrison, M.A., et al. (2016). VEGF-A isoforms program differential VEGFR2 signal transduction, trafficking and proteolysis. *Biol Open*, 5, 571–583.
- Ferrando, I.M., Chaerkady, R., Zhong, J., Molina, H., Jacob, H.K.C., Herbst-Robinson, K., Dancy, B.M., Katju, V., Bose, R., Zhang, J., Pandey, A., Cole, P.A. (2012). Identification of Targets of c-Src Tyrosine Kinase by Chemical Complementation and Phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics*, 11, 355–369.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O’Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439–442.
- Ferreira, J.S., Papouin, T., Ladépêche, L., Yao, A., Langlais, V.C., Bouchet, D., Dulong, J., Mothet, J.-P., Sacchi, S., Pollegioni, L., Paoletti, P., Oliet, S.H.R., Groc, L. (2017). Co-agonists differentially tune GluN2B-NMDA receptor trafficking at hippocampal synapses. *Jun* 9;6. pii: e25492.
- Fiala, J.C., Feinberg, M., Popov, V., Harris, K.M. (1998). Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci*.
- Fischer, M., Kaech, S., Wagner, U., Brinkhaus, H., Matus, A. (2000). Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nature Neuroscience*, 3, 887–894.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHugh, P.R. (1975). “Mini-mental state”: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, 12, 189–198.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. and Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376, 66–70.
- Formichi, P., Battisti, C., Radi, E., Federico, A. (2006). Cerebrospinal fluid tau, A beta, and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer’s disease. *J. Cell. Physiol*, 208, 39–46.
- Forstreuter, F., Lucius, R., Mentlein, R. (2002). Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *Journal of Neuroimmunology*, 132, 93–98.
- Foster, T.C., Sharrow, K.M., Masse, J.R., Norris, C.M., and Kumar, A. (2001). Calcineurin Links Ca²⁺ Dysregulation with Brain Aging. *J Neurosci*. 21:4066–4073.
- Fransmiche, M.L., Seranno, S.D., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lanté, F., Buisson, A. (2014). Activity-Dependent Tau Protein Translocation to Excitatory Synapse Is Disrupted by Exposure to Amyloid-Beta Oligomers. *J. Neurosci*, 34, 6084–6097.
- Freir, D.B., Nicoll, A.J., Klyubin, I., Panico, S., Mc Donald, J.M., Risse, E., Asante, E.A., Farrow, M.A., Sessions, R.B., Saibil, H.R., Clarke, A.R., Rowan, M.J., Walsh, D.M., Collinge, J. (2011). Interaction between prion protein and toxic amyloid β assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nature Communications*, 2:336.
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C.I., Choquet, D., Gundelfinger, E.D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.*, 12, 897–904.
- Funato, H., Yoshimura, M., Kusui, K., Tamaoka, A., Ishikawa, K., Ohkoshi, N., Namekata, K., Okeda, R., Ihara, Y. (1998). Quantitation of amyloid beta-protein (A beta) in the cortex during aging and in Alzheimer’s disease. *Am J Pathol*, 152, 1633–1640.

- Gampel, A., Moss, L., Jones, M.C., Brunton, V., Norman, J.C., Mellor, H. (2006). VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood*, 108, 2624–2631.
- Gerber, H.-P., McMurtry, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., Ferrara, N. (1998). Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway Requirement For Flk-1/Kdr Activation. *J. Biol. Chem*, 273, 30336–30343.
- Gerhardt, H. (2008). VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis* 4, 241–246.
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussi re, T., Bouras, C., K vari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., Hof, P.R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, 60, 1495–1500.
- Giese, K.P., Fedorov, N.B., Filipkowski, R.K., Silva, A.J. (1998). Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science*, 279, 870–873.
- Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Coffey, E.E., Gunther, E.C., Laur n, J., Gimbel, Z.A., Strittmatter, S.M. (2010). Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J. Neurosci*, 30, 6367–6374.
- Glabe, C.G (2008). Structural Classification of Toxic Amyloid Oligomers. *J Biol Chem*, 283, 29639–29643.
- Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y., Neufeld, G. (2000). Neuropilin-2 and Neuropilin-1 Are Receptors for the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and of Placenta Growth Factor-2, but Only Neuropilin-2 Functions as a Receptor for the 145-Amino Acid Form of VEGF. *J. Biol. Chem*, 275, 18040–18045.
- Goodman, C.S., Shatz, C.J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell*, 72, 77–98.
- Grant, S.G., O'Dell, T.J., Karl, K.A., Stein, P.L., Soriano, P., Kandel, E.R. (1992). Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science*, 258, 1903–1910.
- Graupera, M., Guillermet-Guibert, J., Foukas, L.C., Phng, L.-K., Cain, R.J., Salpekar, A., Pearce, W., Meek, S., Millan, J., Cutillas, P.R., Smith, A.J.H., Ridley, A.J., Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Vanhaesebroeck, B. (2008). Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature*, 453, 662–666.
- Gray, E.G. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex. *J Anat*, 93, 420–433.
- Groc, L., Gustafsson, B., Hanse, E. (2006). AMPA signalling in nascent glutamatergic synapses: there and not there! *Trends in Neurosciences*, 29, 132–139.
- Groc, L., Heine, M., Cognet, L., Brickley, K., Stephenson, F.A., Lounis, B., Choquet, D. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nature Neuroscience*, 7, 695–696.
- Groc, L., Heine, M., Cousins, S.L., Stephenson, F.A., Lounis, B., Cognet, L., Choquet, D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *PNAS*, 103, 18769–18774.

- Grothey, A., and Galanis, E. (2009). Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules. *Nature Reviews Clinical Oncology* 6, 507–518.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., George, L., Tung, Y.C., Kim, K.S., Wisniewski, H.M. (1989). Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 2853–2857.
- Grünewald, F.S., Prota, A.E., Giese, A., Ballmer-Hofer, K. (2010). Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1804, 567–580.
- Gu, Z., Liu, W., Yan, Z. (2009). β -Amyloid Impairs AMPA Receptor Trafficking and Function by Reducing Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Synaptic Distribution. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 10639–10649.
- Guzmán-Hernández, M.L., Potter, G., Egervári, K., Kiss, J.Z., and Balla, T. (2014). Secretion of VEGF-165 has unique characteristics, including shedding from the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 25, 1061–1072.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Hagberg, C.E., Falkevall, A., Wang, X., Larsson, E., Huusko, J., Nilsson, I., van Meeteren, L.A., Samén, E., Lu, L., Vanwildemeersch, M., et al. (2010). Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* 464, 917–921.
- Haigh, J.J., Morelli, P.I., Gerhardt, H., Haigh, K., Tsien, J., Damert, A., Miquerol, L., Muhlner, U., Klein, R., Ferrara, N., Wagner, E.F., Betsholtz, C., Nagy, A. (2003). Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Developmental Biology*, 262, 225–241.
- Hall, B.J., Ghosh, A., (2008). Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses. *Trends in Neurosciences* 31, 82–89.
- Harper, S.J., Bates, D.O. (2008). VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature reviews. Cancer*, 8, 880.
- Harris, K.M., Jensen, F.E., Tsao, B, (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci*, 12, 2685–2705.
- Hartenbach, E.M., Olson, T.A., Goswitz, J.J., Mohanraj, D., Twiggs, L.B., Carson, L.F., Ramakrishnan, S. (1997). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and survival in human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Lett*, 121, 169–175.
- Harvey, R.J., Skelton-Robinson, M., Rossor, M.N. (2003). The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74, 1206–1209.
- Hata, Y. (1998). [Molecular mechanism of the assembly of neurotransmitter receptors and cell adhesion molecules at postsynaptic density]. *Seikagaku*, 70, 1414–1418.
- Hawinkels, L.J.A.C., Zuidwijk, K., Verspaget, H.W., de Jonge-Muller, E.S.M., van Duijn, W., Ferreira, V., Fontijn, R.D., David, G., Hommes, D.W., Lamers, C.B.H.W., Sier, C.F.M., (2008). VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis. *Eur. J. Cancer*, 44, 1904–1913.
- Hayashi, Y., Shi, S.-H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.-C., Malinow, R. (2000). Driving AMPA Receptors into Synapses by LTP and CaMKII: Requirement for GluR1 and PDZ Domain Interaction. *Science*, 287, 2262–2267.
- He, Y., Zheng, M.-M., Ma, Y., Han, X.-J., Ma, X.-Q., Qu, C.-Q., Du, Y.-F. (2012). Soluble oligomers and fibrillar species of amyloid β -peptide differentially affect cognitive

- functions and hippocampal inflammatory response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 429, 125–130.
- He, Z., Guo, J.L., McBride, J.D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., Zhang, B., Gathagan, R.J., Yue, C., Dengler, C., Stieber, A., Nitla, M., Coulter, D.A., Abel, T., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y. (2018). Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat. Med*, 24, 29–38.
- Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J.E., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., Kummer, M.P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14, 388–405.
- Hinoi, E., Ogita, K., Takeuchi, Y., Ohashi, H., Maruyama, T., Yoneda, Y. (2001). Characterization with [3 H]quisqualate of group I metabotropic glutamate receptor subtype in rat central and peripheral excitable tissues. *Neurochemistry International*, 38 (3): 277–85.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *PNAS*, 95, 9349.
- Hiratsuka, S., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Maru, Y. and Shibuya, M. (2005) Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Mol. Cell. Biol*, 25, 346–354.
- Hohman, T.J., Bell, S.P., Jefferson, A.L. (2015). The role of vascular endothelial growth factor in neurodegeneration and cognitive decline: exploring interactions with biomarkers of Alzheimer disease. *JAMA Neurol*, 72, 520–529.
- Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S. (1991). Ca $^{2+}$ permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, 252, 851–853.
- Hollmann, M., Heinemann, S. (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 31–108.
- Holmes, D.I., and Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol* 6, 209.
- Holmes, K., Chapman, E., See, V., and Cross, M.J. (2010). VEGF Stimulates RCAN1.4 Expression in Endothelial Cells via a Pathway Requiring Ca $^{2+}$ /Calcineurin and Protein Kinase C- δ . *PLoS One*. 5:e11435.
- Holmes, K., Roberts, O.L., Thomas, A.M., Cross, M.J. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling*, 19, 2003–2012.
- Hong, C.C., Peterson, Q.P., Hong, J.-Y., Peterson, R.T. (2006). Artery/Vein Specification Is Governed by Opposing Phosphatidylinositol-3 Kinase and MAP Kinase/ERK Signaling. *Curr Biol*, 16, 1366–1372.
- Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., Cynthia A. Lemere, Selkoe, D.J., Stevens,

- B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, aad8373.
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, 57, 719–729.
- Horner, C.H., Arbuthnott, E. (1991). Methods of estimation of spine density--are spines evenly distributed throughout the dendritic field? *J Anat*, 177, 179–184.
- Hornig, C., Weich, H.A. (1999). Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis*, 3, 33–39.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G. (1996). Correlative Memory Deficits, AP3 Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Science*, 274, 5.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., Malinow, R. (2006). AMPA-R Removal Underlies A β -induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron*, 52, 831–843.
- Huang, H.-C., Jiang, Z.-F. (2009). Accumulated Amyloid- β Peptide and Hyperphosphorylated Tau Protein: Relationship and Links in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 16, 15–27.
- Huang, Y.-F., Yang, C.-H., Huang, C.-C., Tai, M.-H., Hsu, K.-S. (2010). Pharmacological and genetic accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α enhances excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons through the production of vascular endothelial growth factor. *J. Neurosci*, 30, 6080–6093.
- Hudmon, A., Schulman, H. (2002). Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 473–510.
- Huettnner, J.E. (2003). Kainate receptors and synaptic transmission. *Progress in Neurobiology*, 70, 387–407.
- Hyman, B., Vasdev, N., Sperling, R. (2016). Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. *Ann. Neurol*, 79, 110–119.
- Iizuka, M., Abe, M., Shiiba, K., Sasaki, I., and Sato, Y. (2004). Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *J. Vasc. Res.* 41:334–344.
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K.L., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Frosch, M.P., Albert, M.S., Hyman, B.T., Irizarry, M.C. (2004). Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*, 62, 925–931.
- Isaacson, J.S., Nicoll, R.A. (1993). The uptake inhibitor L-trans-PDC enhances responses to glutamate but fails to alter the kinetics of excitatory synaptic currents in the hippocampus. *J. Neurophysiol*, 70, 2187–2191.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., Götz, J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142, 387–397.
- Jack, C.R., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Shaw, L.M., Aisen, P.S., Weiner, M.W., Petersen, R.C., Trojanowski, J.Q. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*, 9, 119.

- Jahr, C.E., Stevens, C.F. (1993). Calcium permeability of the N-methyl-D-aspartate receptor channel in hippocampal neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 11573–11577.
- Jakeman, L.B., Armanini, M., Phillips, H.S., and Ferrara, N. (1993). Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 133, 848–859.
- Jakobsson, L., Kreuger, J., Holmborn, K., Lundin, L., Eriksson, I., Kjellén, L., Claesson-Welsh, L. (2006). Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev. Cell*, 10, 625–634.
- Jarosz-Griffiths, H.H., Noble, E., Rushworth, J.V., Hooper, N.M. (2016). Amyloid- β Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein. *J Biol Chem*, 291, 3174–3183.
- Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R.K., and Alitalo, K. (1997). Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276, 1423–1425.
- Ji, Q.S., Winnier, G.E., Niswender, K.D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M.A., Carpenter, G. (1997). Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 2999–3003.
- Jia, H., Jezequel, S., Löhr, M., Shaikh, S., Davis, D., Soker, S., Selwood, D., Zachary, I. (2001). Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 283, 164–173.
- Jiang, X., Wang, X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem*, 275, 31199–31203.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 11946–11950.
- Jinnin, M., Medici, D., Park, L., Limaye, N., Liu, Y., Boscolo, E., Bischoff, J., Vikkula, M., Boye, E., Olsen, B.R. (2008). Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nat Med*, 14, 1236–1246.
- Jinnin, M., Medici, D., Park, L., Limaye, N., Liu, Y., Boscolo, E., Bischoff, J., Vikkula, M., Boye, E., Olsen, B.R. (2008). Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nat. Med.*, 14, 1236–1246.
- Jo, J., Whitcomb, D.J., Olsen, K.M., Kerrigan, T.L., Lo, S.-C., Bru-Mercier, G., Dickinson, B., Scullion, S., Sheng, M., Collingridge, G., Cho, K. (2011). A β 1–42 inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3 β . *Nature Neuroscience*, 14, 545–547.
- Johnson, K.A., Schultz, A., Betensky, R.A., Becker, J.A., Sepulcre, J., Rentz, D., Mormino, E., Chhatwal, J., Amariglio, R., Papp, K., Marshall, G., Albers, M., Mauro, S., Pepin, L., Alverio, J., Judge, K., Philiossaint, M., Shoup, T., Yokell, D., Dickerson, B., Gomez-Isla, T., Hyman, B., Vasdev, N., Sperling, R. (2016). Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 79, 110–119.
- Jones, E.G., Powell, T.P.S. (1969). Morphological Variations in the Dendritic Spines of the Neocortex. *Journal of Cell Science*, 5, 509–529.
- Jones, T.L., Hyman, B.T. (2015). Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 3:14.

- Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Garner, C.C., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., Malenka, R.C. (2004). Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nature Neuroscience*, 7, 244–253.
- Jucker, M., Walker, L.C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*, 501, 45–51.
- Jurado, S., Biou, V., and Malenka, R.C. (2010). A calcineurin/AKAP complex is required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Nature Neuroscience*. 13:1053–1055.
- Kabir, M.E., Safar, J.G. (2014). Implications of prion adaptation and evolution paradigm for human neurodegenerative diseases. *Prion*, 8, 111–116.
- Kane, M.D., Lipinski, W.J., Callahan, M.J., Bian, F., Durham, R.A., Schwarz, R.D., Roher, A.E., Walker, L.C. (2000). Evidence for Seeding of β -Amyloid by Intracerebral Infusion of Alzheimer Brain Extracts in β -Amyloid Precursor Protein-Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, 20, 3606–3611.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33, 121–129.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 26, 360–368.
- Katz, B., Miledi, R., (1967). A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *The Journal of Physiology* 192, 407.
- Katz, L.C., Shatz, C.J. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*, 274, 1133–1138.
- Kayed, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C.W., Neuclea, M., Margol, L., Wu, J., Breydo, L., Thompson, J.L., Rasool, S., Gurlo, T., Butler, P., Glabe, C.G. (2007). Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol Neurodegener*, 2, 18.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300, 486–489.
- Kendall, R. L., Wang, G., DiSalvo, J. and Thomas, K. A. (1994). Specificity of vascular endothelial cell growth factor receptor ligand binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 201, 326–330.
- Kendall, R.L., Rutledge, R.Z., Mao, X., Tebben, A.J., Hungate, R.W., Thomas, K.A. (1999). Vascular Endothelial Growth Factor Receptor KDR Tyrosine Kinase Activity Is Increased by Autophosphorylation of Two Activation Loop Tyrosine Residues. *J. Biol. Chem*, 274, 6453–6460.
- Kerchner, G.A., Nicoll, R.A. (2008). Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 813–825.
- Kerchner, G.A., Wang, G.-D., Qiu, C.-S., Huettner, J.E., Zhuo, M. (2001). Direct Presynaptic Regulation of GABA/Glycine Release by Kainate Receptors in the Dorsal Horn: An Iontropic Mechanism. *Neuron*, 32, 477–488.
- Khan, S.S., LaCroix, M., Boyle, G., Sherman, M.A., Brown, J.L., Amar, F., Aldaco, J., Lee, M.K., Bloom, G.S., Lesné, S.E. (2018). Bidirectional modulation of Alzheimer phenotype by alpha-synuclein in mice and primary neurons. *Acta Neuropathologica*, 136, 589–605.

- Kim, B.W., Choi, M., Kim, Y.-S., Park, H., Lee, H.-R., Yun, C.-O., Kim, E.J., Choi, J.-S., Kim, S., Rhim, H., Kaang, B.-K., Son, H. (2008). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin. *Cell. Signal*, 20, 714–725.
- Kim, D., Moon, Y.S. (2014). Vascular endothelial growth factor in alzheimer's disease with depressive symptoms. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 10, P670–P671.
- Kim, H.-Y., Choi, J.-S., Cha, J.-H., Choi, J.-Y., Lee, M.-Y. (2007). Expression of vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and Flk-1 in embryonic rat forebrain. *Neuroscience Letters*, 425, 131–135.
- Kim, J., Basak, J.M., Holtzman, D.M. (2009). The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 63, 287–303.
- Kim, L.C., Song, L., Haura, E.B. (2009). Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6, 587.
- Kim, N.H., Oh, J.H., Seo, J.A., Lee, K.W., Kim, S.G., Choi, K.M., Baik, S.H., Choi, D.S., Kang, Y.S., Han, S.Y., Han, K.H., Ji, Y.H., Cha, D.R. (2005). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 67, 167–177.
- Kim, S., and Ziff, E.B. (2014). Calcineurin Mediates Synaptic Scaling Via Synaptic Trafficking of Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors. *PLOS Biology* 12, e1001900.
- Kim, Y., Lee, Y.-I., Seo, M., Kim, S.-Y., Lee, J.-E., Youn, H.-D., Kim, Y.-S., Juhn, Y.-S. (2009). Calcineurin dephosphorylates glycogen synthase kinase-3 beta at serine-9 in neuroblast-derived cells. *J. Neurochem*, 111, 344–354.
- Kittelberger, K.A., Piazza, F., Tesco, G., Reijmers, L.G. (2012). Natural Amyloid-Beta Oligomers Acutely Impair the Formation of a Contextual Fear Memory in Mice. *PLoS ONE*, 7, e29940.
- Klein C, Kramer EM, Cardine AM, Schraven B, Brandt R, Trotter J (February 2002). "Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau". *J. Neurosci.* 22 (3): 698–707. PMID 11826099
- Kleschevnikov, A.M., Routtenberg, A., 2001. PKC activation rescues LTP from NMDA receptor blockade. *Hippocampus* 11, 168–175.
- Koch, S., Claesson-Welsh, L. (2012). Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., and Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochemical Journal* 437, 169–183.
- Koffie, R.M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K.W., Mielke, M.L., Garcia-Alloza, M., Micheva, K.D., Smith, S.J., Kim, M.L., Lee, V.M., Hyman, B.T., Spire-Jones, T.L. (2009). Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *PNAS*, 106, 4012–4017.
- Koltowska, K., Paterson, S., Bower, N.I., Baillie, G.J., Lagendijk, A.K., Astin, J.W., Chen, H., Francois, M., Crosier, P.S., Taft, R.J., Simons, C., Smith, K.A., Hogan, B.M. (2015). *mafba* is a downstream transcriptional effector of *Vegfc* signaling essential for embryonic lymphangiogenesis in zebrafish. *Genes Dev*, 29, 1618–1630.
- Konietzko, U. (2012). AICD Nuclear Signaling and Its Possible Contribution to Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research*, 9, 200–216.

- Kopec, C.D., Li, B., Wei, W., Boehm, J., Malinow, R. (2006). Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J. Neurosci*, 26, 2000–2009.
- Krämer-Albers, E.-M., White, R. (2011). From axon–glial signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 2003–2012.
- Kril, J.J., Patel, S., Harding, A.J., Halliday, G.M. (2002). Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer’s disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol* 103, 370–376.
- Krupp, J.J., Vissel, B., Thomas, C.G., Heinemann, S.F., and Westbrook, G.L. (2002). Calcineurin acts via the C-terminus of NR2A to modulate desensitization of NMDA receptors. *Neuropharmacology*. 42:593–602.
- Kundi, S., Bicknell, R., Ahmed, Z. (2013). The role of angiogenic and wound-healing factors after spinal cord injury in mammals. *Neuroscience Research*, 76, 1–9.
- Kung L., Batiuk T., Palomo-Pinon S., Noujaim J., Helms L.M. & Halloran P.F. (2001). Tissue distribution of calcineurin and its sensitivity to inhibition by cyclosporine. *Am J Transplant*. 1(4):325-333.
- Kuruvilla, R., Zweifel, L.S., Glebova, N.O., Lonze, B.E., Valdez, G., Ye, H., Ginty, D.D. (2004). A Neurotrophin Signaling Cascade Coordinates Sympathetic Neuron Development through Differential Control of TrkA Trafficking and Retrograde Signaling. *Cell*, 118, 243–255.
- Labrecque, L., Royal, I., Surprenant, D.S., Patterson, C., Gingras, D., Béliveau, R. (2003). Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Activity by Caveolin-1 and Plasma Membrane Cholesterol. *Mol Biol Cell*, 14, 334–347.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Chang, L., Fernandez, S.J., Gong, Y., Viola, K.L., Lambert, M.P., Velasco, P.T., Bigio, E.H., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer’s-related amyloid beta oligomers. *J. Neurosci*, 24, 10191–10200.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., Klein, W.L. (2007). A β Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer’s Disease. *J. Neurosci*, 27, 796–807.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., Klein, W.L. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer’s disease. *J. Neurosci*, 27, 796–807.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer’s disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 499–509.
- Lähteenvuo, J.E., Lähteenvuo, M.T., Kivelä, A., Rosenlew, C., Falkevall, A., Klar, J., Heikura, T., Rissanen, T.T., Vähäkangas, E., Korpisalo, P., et al. (2009). Vascular endothelial growth factor-B induces myocardium-specific angiogenesis and arteriogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-1- and neuropilin receptor-1-dependent mechanisms. *Circulation* 119, 845–856.
- Lal, B.K., Varma, S., Pappas, P.J., Hobson, R.W., and Durán, W.N. (2001). VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvasc. Res.* 62, 252–262.

- Lamallice, L., Houle, F., Huot, J. (2006). Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *J. Biol. Chem.*, 281, 34009–34020.
- Lampugnani, M.G., Orsenigo, F., Gagliani, M.C., Tacchetti, C., Dejana, E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol*, 174, 593–604.
- Landis, D.M., Reese, T.S. (1983). Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J. Cell Biol*, 97, 1169–1178.
- Larson, M., Sherman, M.A., Amar, F., Nuvolone, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Aguzzi, A., Lesné, S.E. (2012). The Complex PrPc-Fyn Couples Human Oligomeric A with Pathological Tau Changes in Alzheimer’s Disease. *Journal of Neuroscience*, 32, 16857–16871.
- Larson, M.E., Greimel, S.J., Amar, F., LaCroix, M., Boyle, G., Sherman, M.A., Schley, H., Miel, C., Schneider, J.A., Kaye, R., Benfenati, F., Lee, M.K., Bennett, D.A., Lesné, S.E., (2017). Selective lowering of synapsins induced by oligomeric α -synuclein exacerbates memory deficits. *PNAS*, 114, E4648–E4657.
- Larson, M.E., Lesné, S.E. (2012). Soluble A β oligomer production and toxicity: Soluble oligomeric A β production and toxicity. *Journal of Neurochemistry*, 120, 125–139.
- Laurén, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., Strittmatter, S.M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*, 457, 1128–1132.
- Lauri, S.E., Bortolotto, Z.A., Bleakman, D., Ornstein, P.L., Lodge, D., J.T., Collingridge, G.L. (2001). A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Neuron*, 32, 697–709.
- Lavrik, I.N., Golks, A., Krammer, P.H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*, 115, 2665–2672.
- Lee, H.-K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., and Huganir, R.L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*. 405:955–959.
- Lee, H.-K., Kameyama, K., Huganir, R.L., Bear, M.F. (1998). NMDA Induces Long-Term Synaptic Depression and Dephosphorylation of the GluR1 Subunit of AMPA Receptors in Hippocampus. *Neuron*, 21, 1151–1162.
- Lee, H.-K., Takamiya, K., Han, J.-S., Man, H., Kim, C.-H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., Gallagher, M., Huganir, R.L. (2003). Phosphorylation of the AMPA Receptor GluR1 Subunit Is Required for Synaptic Plasticity and Retention of Spatial Memory, *Cell* 112, 631–643.
- Lee, H.-K., Takamiya, K., He, K., Song, L., Huganir, R.L. (2010). Specific Roles of AMPA Receptor Subunit GluR1 (GluA1) Phosphorylation Sites in Regulating Synaptic Plasticity in the CA1 Region of Hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 103, 479–489.
- Lee, T.-Y., Folkman, J., Javaherian, K. (2010). HSPG-binding peptide corresponding to the exon 6a-encoded domain of VEGF inhibits tumor growth by blocking angiogenesis in murine model. *PLoS ONE*, 5, e9945.
- Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117–1134.

- Leonard, A.S., Davare, M.A., Horne, M.C., Garner, C.C., Hell, J.W. (1998). SAP97 Is Associated with the Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic Acid Receptor GluR1 Subunit, *J. Biol. Chem.*, 273, 31.
- Leonard, J.R., Klocke, B.J., D'Sa, C., Flavell, R.A., Roth, K.A. (2002). Strain-dependent neurodevelopmental abnormalities in caspase-3-deficient mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 61, 673–677.
- Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440, 352–357.
- Lesné, S.E. (2014). Toxic oligomer species of amyloid- β in Alzheimer's disease, a timing issue. *Swiss Med Wkly*, 144, w14021.
- Lesné, S.E., Sherman, M.A., Grant, M., Kuskowski, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Ashe, K.H. (2013). Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain*, 136, 1383–1398.
- Leung, Y.Y., Toledo, J.B., Nefedov, A., Polikar, R., Raghavan, N., Xie, S.X., Farnum, M., Schultz, T., Baek, Y., Deerlin, V.M.V., Hu, W.T., Holtzman, D.M., Fagan, A.M., Perrin, R.J., Grossman, M., Soares, H.D., Kling, M.A., Mailman, M., Arnold, S.E., Narayan, V.A., Lee, V.M.-Y., Shaw, L.M., Baker, D., Wittenberg, G.M., Trojanowski, J.Q., Wang, L.-S. (2015). Identifying amyloid pathology-related cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease in a multicohort study. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 1, 339–348.
- Levy, E., Carman, M.D., Fernandez-Madrid, I.J., Power, M.D., Lieberburg, I., van Duinen, S.G., Bots, G.T., Luyendijk, W., Frangione, B. (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*, 248, 1124–1126.
- Li, N., Liu, K., Qiu, Y., Ren, Z., Dai, R., Deng, Y., Qing, H. (2016). Effect of Presenilin Mutations on APP Cleavage; Insights into the Pathogenesis of FAD. *Front Aging Neurosci*, 8.
- Li, S., Hong, S., Shepardson, N.E., Walsh, D.M., Shankar, G.M., Selkoe, D. (2009). Soluble Oligomers of Amyloid β Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake. *Neuron*, 62, 788–801.
- Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N.E., Shankar, G.M., Selkoe, D.J. (2011). Soluble A β Oligomers Inhibit Long-Term Potentiation through a Mechanism Involving Excessive Activation of Extrasynaptic NR2B-Containing NMDA Receptors. *J. Neurosci*, 31, 6627–6638.
- Li, X., Lee, C., Tang, Z., Zhang, F., Arjunan, P., Li, Y., Hou, X., Kumar, A., and Dong, L. (2009). VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh Migr* 3, 322–327.
- Li, X., Padhan, N., Sjöström, E.O., Roche, F.P., Testini, C., Honkura, N., Sáinz-Jaspeado, M., Gordon, E., Bentley, K., Philippides, A., Tolmachev, V., Dejana, E., Stan, R.V., Vestweber, D., Ballmer-Hofer, K., Betsholtz, C., Pietras, K., Jansson, L., Claesson-Welsh, L. (2016). VEGFR2 pY949 signalling regulates adherens junction integrity and metastatic spread. *Nat Commun*, 7, 11017.
- Li, X., Tjwa, M., Van Hove, I., Enholm, B., Neven, E., Paavonen, K., Jeltsch, M., Juan, T.D., Sievers, R.E., Chorianopoulos, E., et al. (2008). Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1614–1620.

- Li, Z., Jo, J., Jia, J.-M., Lo, S.-C., Whitcomb, D.J., Jiao, S., Cho, K., Sheng, M. (2010). Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell*, 141, 859–871.
- Lian, Q., Ladner, C.J., Magnuson, D., and Lee, J.M. (2001). Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Exp. Neurol.* 167:158–165.
- Liao, H.-J., Kume, T., McKay, C., Xu, M.-J., Ihle, J.N., Carpenter, G. (2002). Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in Plcg1-deficient mice. *J. Biol. Chem*, 277, 9335–9341.
- Licht, T., Eavri, R., Goshen, I., Shlomai, Y., Mizrahi, A., Keshet, E. (2010). VEGF is required for dendritogenesis of newly born olfactory bulb interneurons. *Development*, 137, 261–271.
- Licht, T., Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Zubedat, S., Eavri, R., Segal, M., Yirmiya, R., Keshet, E. (2011). Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *PNAS*, 108, 5081–5086.
- Lieberman, D.N., and Mody, I. (1994). Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca²⁺-dependent phosphatase. *Nature*. 369:235–239.
- Lisman, J. (1989). A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 9574–9578.
- Lisman, J., Schulman, H., Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci*, 3, 175–190.
- Liu, L., Wong, T.P., Pozza, M.F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y.P., Wang, Y.T. (2004). Role of NMDA Receptor Subtypes in Governing the Direction of Hippocampal Synaptic Plasticity. *Science*, 304, 1021–1024.
- Louneva, N., Cohen, J.W., Han, L.-Y., Talbot, K., Wilson, R.S., Bennett, D.A., Trojanowski, J.Q., Arnold, S.E. (2008). Caspase-3 Is Enriched in Postsynaptic Densities and Increased in Alzheimer's Disease. *Am J Pathol*, 173, 1488–1495.
- Lu, Y.-F., Tomizawa, K., Moriwaki, A., Hayashi, Y., Tokuda, M., Itano, T., Hatase, O., and Matsui, H. (1996). Calcineurin inhibitors, FK506 and cyclosporin A, suppress the NMDA receptor-mediated potentials and LTP, but not depotentiation in the rat hippocampus. *Brain Research*. 729:142–146.
- Lu, Y.M., Roder, J.C., Davidow, J., Salter, M.W. (1998). Src Activation in the Induction of Long-Term Potentiation in CA1 Hippocampal Neurons, 5.
- Lüscher, C., Malenka, R.C. (2012). NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4:a005710.
- Lussier, M.P., Sanz-Clemente, A., Roche, K.W. (2015). Dynamic Regulation of N -Methyl-d-aspartate (NMDA) and α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Posttranslational Modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 28596–28603.
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*, 305, 719–721.
- Mac Gabhann, F., and Popel, A.S. (2007). Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: a computational study. *Biophys Chem* 128, 125–139.
- Mackenzie, F., Ruhrberg, C. (2012). Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development*, 139, 1371–1380.

- Madden, S.D., Cotter, T.G. (2008). Cell Death in Brain Development and Degeneration: Control of Caspase Expression May Be Key! *Molecular Neurobiology*, 37, 1–6.
- Maharaj, A.S.R., Saint-Geniez, M., Maldonado, A.E., D'Amore, P.A. (2006). Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult. *The American Journal of Pathology*, 168, 639.
- Mahmoud, R.R., Sase, S., Aher, Y.D., Sase, A., Gröger, M., Mokhtar, M., Höger, H., Lubec, G. (2015). Spatial and Working Memory Is Linked to Spine Density and Mushroom Spines. *PLOS ONE*, 10, e0139739.
- Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell*, 78, 535–538.
- Malenka, R.C., Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: An Embarrassment of Riches. *Neuron*, 44, 5–21.
- Malinow, R., Malenka, R.C. (2002). AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 103–126.
- Malleret, G., Alarcon, J.M., Martel, G., Takizawa, S., Vronskaya, S., Yin, D., Chen, I.Z., Kandel, E.R., Shumyatsky, G.P. (2010). Bidirectional Regulation of Hippocampal Long-Term Synaptic Plasticity and Its Influence on Opposing Forms of Memory. *J. Neurosci*, 30, 3813–3825.
- Mandriota, S.J., Seghezzi, G., Vassalli, J.-D., Ferrara, N., Wasi, S., Mazziere, R., Mignatti, P., Pepper, M.S. (1995). Vascular Endothelial Growth Factor Increases Urokinase Receptor Expression in Vascular Endothelial Cells. *J. Biol. Chem*, 270, 9709–9716.
- Maravall, M., Koh, I.Y.Y., Lindquist, W.B., Svoboda, K. (2004). Experience-dependent changes in basal dendritic branching of layer 2/3 pyramidal neurons during a critical period for developmental plasticity in rat barrel cortex. *Cereb. Cortex*, 14, 655–664.
- Marco, G.S.D., Reuter, S., Hillebrand, U., Amler, S., König, M., Larger, E., Oberleithner, H., Brand, E., Pavenstädt, H., Brand, M. (2009). The Soluble VEGF Receptor sFlt1 Contributes to Endothelial Dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 20, 2235–2245.
- Markovic-Mueller, S., Stutfeld, E., Asthana, M., Weinert, T., Bliven, S., Goldie, K.N., Kisko, K., Capitani, G., Ballmer-Hofer, K. (2017). Structure of the Full-length VEGFR-1 Extracellular Domain in Complex with VEGF-A. *Structure*, 25, 341–352.
- Masliah, E., Terry, R.D., Mallory, M., Alford, M., Hansen, L.A. (1990). Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol*, 137, 1293–1297.
- Mateo, I., Llorca, J., Infante, J., Rodríguez-Rodríguez, E., Fernández-Viadero, C., Peña, N., Berciano, J., Combarros, O. (2007). Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand*, 116, 56–58.
- Matsuo, N., Reijmers, L., Mayford, M. (2008). Spine-Type-Specific Recruitment of Newly Synthesized AMPA Receptors with Learning. *Science*, 319, 1104–1107.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429, 761–766.
- Mazure, C.M., Swendsen, J. (2016). Sex differences in Alzheimer's disease and other dementias. *Lancet Neurol*, 15, 451–452.
- McCloskey, D.P., Croll, S.D., Scharfman, H.E. (2005). Depression of Synaptic Transmission by Vascular Endothelial Growth Factor in Adult Rat Hippocampus and Evidence for Increased Efficacy after Chronic Seizures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25, 8889.
- Mecollari, V., Nieuwenhuis, B., Verhaagen, J. (2014). A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma. *Front. Cell. Neurosci.* 8.

- Meissirel, C., Almodovar, C.R. de, Knevels, E., Coulon, C., Chounlamountri, N., Segura, I., Rossi, P. de, Vinckier, S., Anthonis, K., Deléglise, B., Mol, M. de, Ali, C., Dassonville, K., Loyens, E., Honnorat, J., Michotte, Y., Rogemond, V., Smolders, I., Voets, T., Vivien, D., Berghe, P.V., Bosch, L.V.D., Robberecht, W., Chédotal, A., Oliviero, S., Dewerchin, M., Schmucker, D., Thomasset, N., Salin, P., Carmeliet, P. (2011). VEGF modulates NMDA receptors activity in cerebellar granule cells through Src-family kinases before synapse formation. *PNAS*, 108, 13782–13787.
- Meyer, D., Bonhoeffer, T., Scheuss, V. (2014). Balance and Stability of Synaptic Structures during Synaptic Plasticity. *Neuron*, 82, 430–443.
- Miller, E.C., Teravskis, P.J., Dummer, B.W., Zhao, X., Haganir, R.L., Liao, D. (2014). Tau phosphorylation and tau mislocalization mediate soluble A β oligomer-induced AMPA glutamate receptor signaling deficits. *Eur J Neurosci* 39, 1214–1224.
- Miller, M., Peters, A. (1981). Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol*, 203, 555–573.
- Minchenko, A., Bauer, T., Salceda, S., Caro, J. (1994). Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab. Invest*, 71, 374–379.
- Minter, M.R., Taylor, J.M., Crack, P.J. (2016). The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer’s disease. *Journal of Neurochemistry*, 136, 457–474.
- Miyakawa, T., Leiter, L.M., Gerber, D.J., Gainetdinov, R.R., Sotnikova, T.D., Zeng, H., Caron, M.G., and Tonegawa, S. (2003). Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *PNAS*. 100:8987–8992.
- Miyake, T., Kumasawa, K., Sato, N., Takiuchi, T., Nakamura, H., Kimura, T. (2016). Soluble VEGF receptor 1 (sFLT1) induces non-apoptotic death in ovarian and colorectal cancer cells. *Sci Rep*, 6, 24853.
- Moehlmann, T., Winkler, E., Xia, X., Edbauer, D., Murrell, J., Capell, A., Kaether, C., Zheng, H., Ghetti, B., Haass, C., Steiner, H. (2002). Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on A β 42 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 8025–8030.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12, 529–540.
- Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319, 774.
- Mothet, J.-P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., Snyder, S.H. (2000). d-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-d-aspartate receptor. *PNAS*, 97, 4926–4931.
- Motter, R., Vigo-Pelfrey, C., Kholodenko, D., Barbour, R., Johnson-Wood, K., Galasko, D., Chang, L., Miller, B., Clark, C., Green, R. (1995). Reduction of beta-amyloid peptide₄₂ in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol*, 38, 643–648.
- Moustaine, D.E., Granier, S., Doumazane, E., Scholler, P., Rahmeh, R., Bron, P., Mouillac, B., Banères, J.-L., Rondard, P., Pin, J.-P. (2012). Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *PNAS*, 109, 16342–16347.

- Mucke, L., Selkoe, D.J. (2012). Neurotoxicity of Amyloid β -Protein: Synaptic and Network Dysfunction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a006338–a006338.
- Mukerjee, N., McGinnis, K.M., Gnegy, M.E., and Wang, K.K.W. (2001). Caspase-Mediated Calcineurin Activation Contributes to IL-2 Release during T Cell Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 285:1192–1199.
- Mukouyama, Y., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M., Anderson, D.J. (2002). Sensory Nerves Determine the Pattern of Arterial Differentiation and Blood Vessel Branching in the Skin. *Cell* 109, 693–705.
- Mulkey, R.M., Endo, S., Shenolikar, S., Malenka, R.C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 369, 486–488.
- Muller, Y.A., Christinger, H.W., Keyt, B.A., and de Vos, A.M. (1997). The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure* 5, 1325–1338.
- Muller, Y.A., Heiring, C., Misselwitz, R., Welfle, K., Welfle, H. (2002). The Cystine Knot Promotes Folding and Not Thermodynamic Stability in Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biol. Chem*, 277, 43410–43416.
- Muñoz, E.M., Linhardt, R.J. 2004. Heparin-Binding Domains in Vascular Biology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24, 1549–1557.
- Murphy, M.P., LeVine, H. (2010). Alzheimer’s Disease and the β -Amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis*, 19, 311.
- Musiek, E.S., Holtzman, D.M. (2015). Three Dimensions of the Amyloid Hypothesis: Time, Space, and “Wingmen.” *Nat Neurosci*, 18, 800–806.
- Nada, S., Yagi, T., Takeda, H., Tokunaga, T., Nakagawa, H., Ikawa, Y., Okada, M., Aizawa, S. (1993). Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell*, 73, 1125–1135.
- Nägerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B., Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, 44, 759–767.
- Nakazawa, T., Komai, S., Tezuka, T., Hisatsune, C., Umemori, H., Semba, K., Mishina, M., Manabe, T., Yamamoto, T. (2001). Characterization of Fyn-mediated Tyrosine Phosphorylation Sites on GluR ϵ 2 (NR2B) Subunit of the N-Methyl-D-aspartate Receptor. *J. Biol. Chem*, 276, 693–699.
- Nasir, A., Holzer, T.R., Chen, M., Man, M.Z., Schade, A.E., 2017. Differential expression of VEGFR2 protein in HER2 positive primary human breast cancer: potential relevance to anti-angiogenic therapies. *Cancer Cell Int* 17. <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0427-5>
- Nasreddine, Z.S., Phillips, N.A., Bédirian, V., Charbonneau, S., Whitehead, V., Collin, I., Cummings, J.L., Chertkow, H. (2005). The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc*, 53, 695–699.
- Nicholls, R.E., Alarcon, J.M., Malleret, G., Carroll, R.C., Grody, M., Vronskaya, S., Kandel, E.R. (2008). Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron*, 58, 104–117.
- Nicole, O., Hadzibegovic, S., Gajda, J., Bontempi, B., Bem, T., Meyrand, P. (2016). Soluble amyloid beta oligomers block the learning-induced increase in hippocampal sharp wave-ripple rate and impair spatial memory formation. *Scientific Reports*, 6.
- Nicoletti, F., Bockaert, J., Collingridge, G.L., Conn, P.J., Ferraguti, F., Schoepp, D.D., Wroblewski, J.T., Pin, J.P. (2011). Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*, 60, 1017–1041.

- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C.B., Condrón, M.M., Axelman, K., Forsell, C., Sten, C., Luthman, J., Teplow, D.B., Younkin, S.G., Näslund, J., Lannfelt, L. (2001). The “Arctic” APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat. Neurosci.*, 4, 887–893.
- Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.*, 64, 313–353.
- Niswender, C.M., Conn, P.J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 295–322.
- Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalence and incidence of Alzheimer’s disease in Europe: A meta-analysis. *Neurología, english edition*, 32, 523–532.
- Nwabuisi-Heath, E., LaDu, M.J., Yu, C. (2012). Simultaneous analysis of dendritic spine density, morphology and glutamate receptors during neuron maturation in vitro by quantitative immunocytochemistry. *J Neurosci Methods*, 207, 137–147.
- Oddo, S., Caccamo, A., Smith, I.F., Green, K.N., LaFerla, F.M. (2006). A Dynamic Relationship between Intracellular and Extracellular Pools of Aβ. *Am J Pathol*, 168, 184–194.
- Oka, M., Fujisaki, N., Maruko-Otake, A., Ohtake, Y., Shimizu, S., Saito, T., Hisanaga, S.-I., Iijima, K.M., Ando, K. (2017). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II promotes neurodegeneration caused by tau phosphorylated at Ser262/356 in a transgenic *Drosophila* model of tauopathy. *J. Biochem.* 162, 335–342.
- Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A., Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.* 7, 1104–1112.
- Okazaki, H., Hayashi-Takagi, A., Nagaoka, A., Negishi, M., Ucar, H., Yagishita, S., Ishii, K., Toyozumi, T., Fox, K., and Kasai, H. (2018). Calcineurin knockout mice show a selective loss of small spines. *Neuroscience Letters*. 671:99–102.
- Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Dorpe, J.V., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., Theilmeier, G., Dewerchin, M., Laudénbach, V., Vermeylen, P., Raat, H., Acker, T., Vleminckx, V., Bosch, L.V.D., Cashman, N., Fujisawa, H., Drost, M.R., Sciot, R., Bruyninckx, F., Hicklin, D.J., Ince, C., Gressens, P., Lupu, F., Plate, K.H., Robberecht, W., Herbert, J.-M., Collen, D., Carmeliet, P. (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nature Genetics*, 28, 131.
- Oray, S., Majewska, A., Sur, M. (2006). Effects of synaptic activity on dendritic spine motility of developing cortical layer v pyramidal neurons. *Cereb. Cortex*, 16, 730–741.
- Ossenkoppele, R., Schonhaut, D.R., Schöll, M., Lockhart, S.N., Ayakta, N., Baker, S.L., O’Neil, J.P., Janabi, M., Lazaris, A., Cantwell, A., Vogel, J., Santos, M., Miller, Z.A., Bettcher, B.M., Vessel, K.A., Kramer, J.H., Gorno-Tempini, M.L., Miller, B.L., Jagust, W.J., Rabinovici, G.D. (2016). Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer’s disease. *Brain*, 139, 1551–1567.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R., Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 425, 479–494.

- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14, 383–400.
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.-P., Oliet, S.H.R. (2012). Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell*, 150, 633–646.
- Papouin, T., Oliet, S.H.R. (2014). Organization, control and function of extrasynaptic NMDA receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369.
- Pascual-Lucas, M., Viana da Silva, S., Di Scala, M., Garcia-Barroso, C., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Mulle, C., Alberini, C.M., Cuadrado-Tejedor, M., Garcia-Osta, A. (2014). Insulin-like growth factor 2 reverses memory and synaptic deficits in APP transgenic mice. *EMBO Molecular Medicine*, 6, 1246–1262.
- Passafaro, M., Piëch, V., Sheng, M., 2001. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nature Neuroscience* 4, 917–926.
- Patel, N.S., Mathura, V.S., Bachmeier, C., Beaulieu-Abdelahad, D., Laporte, V., Weeks, O., Mullan, M., Paris, D. (2010). Alzheimer's beta-amyloid peptide blocks vascular endothelial growth factor mediated signaling via direct interaction with VEGFR-2. *J. Neurochem*, 112, 66–76.
- Pawson, T., Gish, G.D., Nash, P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends in Cell Biology*, 11, 504–511.
- Penn, A.A., Shatz, C.J. (1999). Brain Waves and Brain Wiring: The Role of Endogenous and Sensory-Driven Neural Activity in Development. *Pediatric Research*, 45, 447.
- Perez, R.G., Soriano, S., Hayes, J.D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D.J., Chen, X., Stokin, G.B., Koo, E.H. (1999). Mutagenesis Identifies New Signals for β -Amyloid Precursor Protein Endocytosis, Turnover, and the Generation of Secreted Fragments, Including A β 42. *J. Biol. Chem*, 274, 18851–18856.
- Pérez-Otaño, I., Ehlers, M.D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends in Neurosciences*, 28, 229–238.
- Petralia, R.S., Sans, N., Wang, Y.-X., Wenthold, R.J. (2005). Ontogeny of Postsynaptic Density Proteins at Glutamatergic Synapses. *Mol Cell Neurosci*, 29, 436–452.
- Pi, H.J., Otmakhov, N., El Gaamouch, F., Lemelin, D., De Koninck, P., Lisman, J. (2010). CaMKII control of spine size and synaptic strength: Role of phosphorylation states and nonenzymatic action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14437–14442.
- Piaceri, I., Nacmias, B., Sorbi, S. (2013). Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)*, 5, 167–177.
- Pinheiro, P.S. and Mulle, C. (2008). Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9, 423–436
- Pleiss, M.M., Sompol, P., Kraner, S.D., Abdul, H.M., Furman, J.L., Guttman, R.P., Wilcock, D.M., Nelson, P.T., and Norris, C.M. (2016). Calcineurin proteolysis in astrocytes: Implications for impaired synaptic function. *Biochim. Biophys. Acta*. 1862:1521–1532.
- Podlisny, M.B., Stephenson, D.T., Frosch, M.P., Lieberburg, I., Clemens, J.A., Selkoe, D.J. (1992). Synthetic amyloid beta-protein fails to produce specific neurotoxicity in monkey cerebral cortex. *Neurobiol. Aging*, 13, 561–567.
- Poesen, K., Lambrechts, D., Van Damme, P., Dhondt, J., Bender, F., Frank, N., Bogaert, E., Claes, B., Heylen, L., Verheyen, A., et al. (2008). Novel role for vascular endothelial

- growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration. *J. Neurosci.* 28, 10451–10459.
- Pokorný, J., Yamamoto, T. (1981). Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons. *Brain Res. Bull*, 7, 113–120.
- Pooler, A.M., Polydoro, M., Maury, E.A., Nicholls, S.B., Reddy, S.M., Wegmann, S., William, C., Saqran, L., Cagsal-Getkin, O., Pitstick, R., Beier, D.R., Carlson, G.A., Spires-Jones, T.L., Hyman, B.T. (2015). Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol, Commun* 3.
- Popugaeva, E., Pchitskaya, E., and Bezprozvanny, I. (2017). Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer’s disease – a therapeutic opportunity? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483:998–1004.
- Potter, P.E., Rauschkolb, P.K., Pandya, Y., Sue, L.I., Sabbagh, M.N., Walker, D.G., Beach, T.G. (2011). Pre- and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol*, 122, 49–60.
- Puoliväli, J., Wang, J., Heikkinen, T., Heikkilä, M., Tapiola, T., van Groen, T., Tanila, H. (2002). Hippocampal A β 42 Levels Correlate with Spatial Memory Deficit in APP and PS1 Double Transgenic Mice. *Neurobiology of Disease*, 9, 339–347.
- Qiu, C., Kivipelto, M., von Strauss, E. (2009). Epidemiology of Alzheimer’s disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci*, 11, 111–128.
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S.A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M.E., Jäggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Hölscher, C., Mathews, P.M., Jucker, M. (2006). A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO reports*, 7, 940–946.
- Rakic, P., Bourgeois, J.P., Eckenhoff, M.F., Zecevic, N., Goldman-Rakic, P.S. (1986). Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science*, 232, 232–235.
- Ramakrishnan, S., Anand, V., Roy, S. (2014). Vascular Endothelial growth factor signaling in hypoxia and Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol*, 9, 142–160.
- Ramón y Cajal, S. (1889). Dolores del parto considerablemente atenuados por la sugestión hipnótica. *Gac. Méd. Catalana (Barc.)*, 12, 484–486.
- Ramón y Cajal, S. (1899). La textura del sistema nerviosa del hombre y los vertebrados.
- Rasmussen, J., Mahler, J., Beschorner, N., Kaeser, S.A., Häslner, L.M., Baumann, F., Nyström, S., Portelius, E., Blennow, K., Lashley, T., Fox, N.C., Sepulveda-Falla, D., Glatzel, M., Oblak, A.L., Ghetti, B., Nilsson, K.P.R., Hammarström, P., Staufenbiel, M., Walker, L.C., Jucker, M. (2017). Amyloid polymorphisms constitute distinct clouds of conformational variants in different etiological subtypes of Alzheimer’s disease. *PNAS*, 114, 13018–13023.
- Reed, M.N., Hofmeister, J.J., Jungbauer, L., Welzel, A.T., Yu, C., Sherman, M.A., Lesné, S., LaDu, M.J., Walsh, D.M., Ashe, K.H., Cleary, J.P. (2011). Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived A β oligomers. *Neurobiology of Aging*, 32, 1784–1794.

- Reese, L.C., Zhang, W., Dineley, K.T., Kayed, R., and Tagliavola, G. (2008). Selective Induction Of Calcineurin Activity And Signaling By Oligomeric Amyloid Beta. *Aging Cell*, 7:824–835.
- Regehr, W.G., Tank, D.W. (1990). Postsynaptic NMDA receptor-mediated calcium accumulation in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites. *Nature*, 345, 807–810.
- Religa, P., Cao, R., Religa, D., Xue, Y., Bogdanovic, N., Westaway, D., Marti, H.H., Winblad, B., Cao, Y. (2013). VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer’s mice by improvement of vascular survival. *Scientific Reports*, 2 3, 2053.
- Renner, M., Choquet, D., Triller, A. (2009). Control of the postsynaptic membrane viscosity. *J. Neurosci*, 29, 2926–2937.
- Ripoli, C., Cocco, S., Puma, D.D.L., Piacentini, R., Mastrodonato, A., Scala, F., Puzzo, D., D’Ascenzo, M., Grassi, C. (2014). Intracellular Accumulation of Amyloid- β ($A\beta$) Protein Plays a Major Role in $A\beta$ -Induced Alterations of Glutamatergic Synaptic Transmission and Plasticity. *J. Neurosci*, 34, 12893–12903.
- Risher, W.C., Ustunkaya, T., Alvarado, J.S., Eroglu, C. (2014). Rapid Golgi Analysis Method for Efficient and Unbiased Classification of Dendritic Spines. *PLOS ONE*, 9, e107591.
- Rizzi, L., Rosset, I., Roriz-Cruz, M. (2014). Global Epidemiology of Dementia: Alzheimer’s and Vascular Types. *Biomed Res Int*, vol. 2014, Article ID 908915, 8 pages.
- Roche, K.W., O’Brien, R.J., Mammen, A.L., Bernhardt, J., Haganir, R.L. (1996). Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron*, 16, 1179–1188.
- Rosen, R.F., Ciliax, B.J., Wingo, T.S., Gearing, M., Dooyema, J., Lah, J.J., Ghiso, J.A., LeVine, H., III, Walker, L.C. (2010). Deficient High-Affinity Binding of Pittsburgh Compound B in a Case of Alzheimer’s Disease. *Acta neuropathologica*, 119, 221.
- Rosen, W.G., Mohs, R.C., Davis, K.L. (1984). A new rating scale for Alzheimer’s disease. *Am J Psychiatry*, 141, 1356–1364.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., Stevens, C.F. (1998). The Tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel. *Science* 280, 1596–1599.
- Rosenstein, J.M., Krum, J.M., Ruhrberg, C. (2010). VEGF in the nervous system. *Organogenesis*, 6, 107–114.
- Rosenstein, J.M., Mani, N., Khaibullina, A., Krum, J.M. (2003). Neurotrophic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Organotypic Cortical Explants and Primary Cortical Neurons. *J. Neurosci*, 23, 11036–11044.
- Roth, D., Piekarek, M., Paulsson, M., Christ, H., Bloch, W., Krieg, T., Davidson, J.M., Eming, S.A. (2006). Plasmin Modulates Vascular Endothelial Growth Factor-A-Mediated Angiogenesis during Wound Repair. *Am J Pathol*, 168, 670–684.
- Ruch, C., Skiniotis, G., Steinmetz, M.O., Walz, T., Ballmer-Hofer, K. (2007). Structure of a VEGF–VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14, 249.
- Ruiz de Almodovar, C., Coulon, C., Salin, P.A., Knevels, E., Chounlamountri, N., Poesen, K., Hermans, K., Lambrechts, D., Geyte, K.V., Dhondt, J., Dresselaers, T., Renaud, J., Aragonés, J., Zaczigna, S., Geudens, I., Gall, D., Stroobants, S., Mutin, M., Dassonville, K., Storkebaum, E., Jordan, B.F., Eriksson, U., Moons, L., D’Hooze, R., Haigh, J.J., Belin, M.-F., Schiffmann, S., Hecke, P.V., Gallez, B., Vinckier, S., Chédotal, A., Honnorat, J., Thomasset, N., Carmeliet, P., Meissirel, C. (2010). Matrix-

- Binding Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Isoforms Guide Granule Cell Migration in the Cerebellum via VEGF Receptor Flk1. *J. Neurosci*, 30, 15052–15066.
- Ruiz de Almodovar, C., Lambrechts, D., Mazzone, M., Carmeliet, P. (2009). Role and Therapeutic Potential of VEGF in the Nervous System. *Physiological Reviews*, 89, 607–648.
- Rumi-Masante, J., Rusinga, F.I., Lester, T.E., Dunlap, T.B., Williams, T.D., Dunker, A.K., Weis, D.D., and Creamer, T.P. (2012). Structural basis for activation of calcineurin by calmodulin. *J. Mol. Biol.* 415:307–317.
- Rycroft, B.K., and Gibb, A.J. (2004). Inhibitory interactions of calcineurin (phosphatase 2B) and calmodulin on rat hippocampal NMDA receptors. *Neuropharmacology*. 47:505–514.
- Ryu, J.K., Cho, T., Choi, H.B., Wang, Y.T., McLarnon, J.G. (2009). Microglial VEGF receptor response is an integral chemotactic component in Alzheimer’s disease pathology. *J. Neurosci*, 29, 3–13.
- Sadleir, K.R., Kandalepas, P.C., Buggia-Prévoit, V., Nicholson, D.A., Thinakaran, G., Vassar, R. (2016). Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A β generation in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol*, 132, 235–256.
- Sakono, M., Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS Journal*, 277, 1348–1358.
- Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., Shibuya, M. (2005). Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1076–1081.
- Salikhova, A., Wang, L., Lanahan, A.A., Liu, M., Simons, M., Leenders, W.P.J., Mukhopadhyay, D., Horowitz, A. (2008). Vascular Endothelial Growth Factor and Semaphorin Induce Neuropilin-1 Endocytosis via Separate Pathways. *Circ Res*, 103, e71–e79.
- Salvesen, G.S. (2002). Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death and Differentiation*, 9, 3-5.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., Roche, K.W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 19, 62.
- Sarabipour, S., Ballmer-Hofer, K., Hristova, K. (2016). VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *eLife*, 5:e13876.
- Savtchenko, L.P., Rusakov, D.A. (2007). The optimal height of the synaptic cleft. *PNAS*, 104, 1823–1828.
- Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C.L., Wilkinson, G.A., Pitulescu, M.E., Acker, T., Acker-Palmer, A. (2010). Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature*, 465, 487–491.
- Scannevin, R.H., Haganir, R.L. (2000). Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat. Rev. Neurosci*, 1, 133–141.
- Schwarz, Q., Gu, C., Fujisawa, H., Sabelko, K., Gertsenstein, M., Nagy, A., Taniguchi, M., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., Shima, D.T., Ruhrberg, C. (2004). Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes Dev*, 18, 2822–2834.

- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev*, 81, 741–766.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219, 983–985.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, Sep;1(1):a006189.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schioesmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Lieberburg, I., Schenk, D. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature*, 359, 325–327.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W.L., Fischer, K.-D., Schuh, A.C., Schwartz, L., Bernstein, A., Rossant, J. (1997). A Requirement for Flk1 in Primitive and Definitive Hematopoiesis and Vasculogenesis. *Cell*, 89, 981–990.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., Schuh, A.C., 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62–66. <https://doi.org/10.1038/376062a0>
- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Sabatini, B.L. (2007). Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *J. Neurosci*, 27, 2866–2875.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J. (2008). Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 14, 837–842.
- Shi, S.-H., Hayashi, Y., Petralia, R.S., Zaman, S.H., Wenthold, R.J., Svoboda, K., Malinow, R. (1999). Rapid Spine Delivery and Redistribution of AMPA Receptors After Synaptic NMDA Receptor Activation. *Science*, 284, 1811–1816.
- Shibuya, M. (2013). Featured: Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of Biochemistry*, 153, 13.
- Shibuya, M., Claessonwelsh, L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research*, 312, 549–560.
- Shimizu, H., Ghazizadeh, M., Sato, S., Oguro, T., Kawanami, O. (2009). Interaction between β -amyloid protein and heparan sulfate proteoglycans from the cerebral capillary basement membrane in Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16, 277–282.
- Shinkai, A., Ito, M., Anazawa, H., Yamaguchi, S., Shitara, K., Shibuya, M. (1998). Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem*, 273, 31283–31288.
- Shioda, N., Moriguchi, S., Shirasaki, Y., and Fukunaga, K. (2006). Generation of constitutively active calcineurin by calpain contributes to delayed neuronal death following mouse brain ischemia. *Journal of Neurochemistry*. 98:310–320.
- Sihra, T.S., Flores, G., Rodríguez-Moreno, A. (2013). Kainate Receptors: Multiple Roles in Neuronal Plasticity. *The Neuroscientist*.

- Silverman, W.F., Krum, J.M., Mani, N., Rosenstein, J.M. (1999). Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience*, 90, 1529–1541.
- Simakova, O., Arispe, N.J. (2007). The cell-selective neurotoxicity of the Alzheimer's Abeta peptide is determined by surface phosphatidylserine and cytosolic ATP levels. Membrane binding is required for Abeta toxicity. *J. Neurosci*, 27, 13719–13729.
- Simons, M., Gordon, E., Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 611–625.
- Šišková, Z., Justus, D., Kaneko, H., Friedrichs, D., Henneberg, N., Beutel, T., Pitsch, J., Schoch, S., Becker, A., von der Kammer, H., Remy, S. (2014). Dendritic Structural Degeneration Is Functionally Linked to Cellular Hyperexcitability in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron*, 84, 1023–1033.
- Skeberdis, V.A., Lan, J., Opitz, T., Zheng, X., Bennett, M.V.L., Zukin, R.S. (2001). mGluR1-mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C. *Neuropharmacology*, 40, 856–865.
- Sladeczek, F., Momiyama, A., Takahashi, T. (1993). Presynaptic Inhibitory Action of a Metabotropic Glutamate Receptor Agonist on Excitatory Transmission in Visual Cortical Neurons. *Proceedings: Biological Sciences*, 253, 297–303.
- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nat Neurosci*, 8, 1051–1058.
- Snyder, G.L., Galdi, S., Fienberg, A.A., Allen, P., Nairn, A.C., and Greengard, P. (2003). Regulation of AMPA receptor dephosphorylation by glutamate receptor agonists. *Neuropharmacology*. 45:703–713.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92, 735–745.
- Sompol, P., Furman, J.L., Pleiss, M.M., Kraner, S.D., Artiushin, I.A., Batten, S.R., Quintero, J.E., Simmerman, L.A., Beckett, T.L., Lovell, M.A., et al. (2017). Calcineurin/NFAT Signaling in Activated Astrocytes Drives Network Hyperexcitability in A β -Bearing Mice. *J. Neurosci*. 37:6132–6148.
- Sondell, M., Lundborg, G., Kanje, M. (1999). Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *The Journal of neuroscience*, 19, 5731–5740.
- Song, Q., Zheng, H.-W., Li, X.-H., Haganir, R.L., Kuner, T., Zhuo, M., Chen, T. (2017). Selective phosphorylation of AMPA receptor contributes to the network of long-term potentiation in the anterior cingulate cortex. *The Journal of Neuroscience*, 0925–17.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, 72, 767–778.
- Sotelo, C. (1978). Purkinje cell ontogeny: formation and maintenance of spines. *Prog. Brain Res*, 48, 149–170.
- Sotelo, C. (1990). Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J. Exp. Biol*, 153, 225–249.

- Spampinato, S.F., Merlo, S., Sano, Y., Kanda, T., Sortino, M.A. (2017). Astrocytes contribute to A β -induced blood–brain barrier damage through activation of endothelial MMP9. *Journal of Neurochemistry*, 142, 464–477.
- Spires-Jones, T.L., Hyman, B.T. (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer’s disease. *Neuron*, 82, 756–771.
- Spuch, C., Antequera, D., Portero, A., Orive, G., Hernández, R.M., Molina, J.A., Bermejo-Pareja, F., Pedraz, J.L., Carro, E. (2010). The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Biomaterials*, 31, 5608–5618.
- Stacker, S.A., Caesar, C., Baldwin, M.E., Thornton, G.E., Williams, R.A., Prevo, R., Jackson, D.G., Nishikawa, S., Kubo, H., and Achen, M.G. (2001). VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat. Med.* 7, 186–191.
- Stalmans, I., Ng, Y.-S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouché, A., Yüce, A., Fujisawa, H., Hermans, B., Shani, M., Jansen, S., et al. (2002). Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* 109, 327–336.
- Steward, O., Worley, P.F. (2001). A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *PNAS*, 98, 7062–7068.
- Stine, W.B., Dahlgren, K.N., Krafft, G.A., LaDu, M.J. (2003). In Vitro Characterization of Conditions for Amyloid- β Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis. *J. Biol. Chem*, 278, 11612–11622.
- Stöhr, J., Condello, C., Watts, J.C., Bloch, L., Oehler, A., Nick, M., DeArmond, S.J., Giles, K., DeGrado, W.F., Prusiner, S.B. (2014). Distinct synthetic A β prion strains producing different amyloid deposits in bigenic mice. *PNAS*, 111, 10329–10334.
- Stohr, J., Watts, J.C., Mensinger, Z.L., Oehler, A., Grillo, S.K., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Giles, K. (2012). Purified and synthetic Alzheimer’s amyloid beta (A β) prions. *PNAS*, 109, 11025–11030.
- Sun, X., Wu, Y., Chen, B., Zhang, Z., Zhou, W., Tong, Y., Yuan, J., Xia, K., Gronemeyer, H., Flavell, R.A., et al. (2011). Regulator of calcineurin 1 (RCAN1) facilitates neuronal apoptosis through caspase 3 activation. *J. Biol. Chem.* 286:9049-9062.
- Sun, Z., Li, X., Massena, S., Kutschera, S., Padhan, N., Gualandi, L., Sundvold-Gjerstad, V., Gustafsson, K., Choy, W.W., Zang, G., Quach, M., Jansson, L., Phillipson, M., Abid, M.R., Spurkland, A., Claesson-Welsh, L. (2012). VEGFR2 induces c-*Src* signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSA β . *J Exp Med*, 209, 1363–1377.
- Suzuki, N., Cheung, T.T., Cai, X.D., Odaka, A., Otvos, L., Eckman, C., Golde, T.E., Younkin, S.G. (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*, 264, 1336–1340.
- Suzuki, T., Okumura-Noji, K. (1995). NMDA receptor subunits epsilon 1 (NR2A) and epsilon 2 (NR2B) are substrates for Fyn in the postsynaptic density fraction isolated from the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 216, 582–588.
- Tae, N., Lee, S., Kim, O., Park, J., Na, S., Lee, J.-H. (2017). Syntenin promotes VEGF-induced VEGFR2 endocytosis and angiogenesis by increasing ephrin-B2 function in endothelial cells. *Oncotarget*, 8, 38886–38901.

- Tagliabue, G., Hogan, D., Zhang, W.-R., and Dineley, K.T. (2009). Intermediate- and Long-Term Recognition Memory Deficits in Tg2576 Mice Are Reversed with Acute Calcineurin Inhibition. *Behav. Brain Res.* 200:95–99.
- Takadera, T., and Ohnishi, T. (2007). Caspase-dependent apoptosis induced by calcineurin inhibitors was prevented by glycogen synthase kinase-3 inhibitors in cultured rat cortical cells. *Brain Research.* 1133:20–26.
- Takahashi, T., Shibuya, M. (1997). The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*, 14, 2079–2089.
- Takahashi, T., Ueno, H., Shibuya, M. (1999). VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*, 18, 2221–2230.
- Takumi, Y., Ramírez-León, V., Laake, P., Rinvik, E., Ottersen, O.P. (1999). Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nature Neuroscience*, 2, 618.
- Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M.W., Okamoto, S., Dziewczapolski, G., Nakamura, T., Cao, G., Pratt, A.E., Kang, Y.-J., Tu, S., Molokanova, E., McKercher, S.R., Hires, S.A., Sason, H., Stouffer, D.G., Buczynski, M.W., Solomon, J.P., Michael, S., Powers, E.T., Kelly, J.W., Roberts, A., Tong, G., Fang-Newmeyer, T., Parker, J., Holland, E.A., Zhang, D., Nakanishi, N., Chen, H.-S.V., Wolosker, H., Wang, Y., Parsons, L.H., Ambasadhan, R., Masliah, E., Heinemann, S.F., Piña-Crespo, J.C., Lipton, S.A. (2013). A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *PNAS*, 110, E2518-2527.
- Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H. (2008). Protein Synthesis and Neurotrophin-Dependent Structural Plasticity of Single Dendritic Spines. *Science*, 319, 1683–1687.
- Tang, H., Mao, X., Xie, L., Greenberg, D.A., Jin, K. (2013). Expression Level of Vascular Endothelial Growth Factor in Hippocampus is Associated with Cognitive Impairment in Patients with Alzheimer’s Disease. *Neurobiol Aging*, 34, 1412–1415.
- Tannenberg, R.K., Scott, H.L., Tannenberg, A.E.G., Dodd, P.R. (2006). Selective loss of synaptic proteins in Alzheimer’s disease: evidence for an increased severity with APOE ϵ 4. *Neurochem. Int.*, 49, 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.05.004>
- Tarkowski, E., Issa, R., Sjogren, M., Wallin, A., Blennow, K., Tarkowski, A., Kumar, P. (2002). Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β in Alzheimer’s disease and vascular dementia. *Neurobiology of Aging*, 7.
- Tashiro, A., Minden, A., Yuste, R. (2000). Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb. Cortex*, 10, 927–938.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in alzheimer’s disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30, 572–580.
- Tesco, G., Koh, Y.H., Kang, E., Cameron, A., Das, S., Sena-Estevés, M., Hiltunen, M., Yang, S.-H., Zhong, Z., Shen, Y., Simpkins, J., Tanzi, R.E. (2007). Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances β -secretase activity. *Neuron*, 54, 721–737.

- Texidó, L., Martín-Satué, M., Alberdi, E., Solsona, C., and Matute, C. (2011). Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium*, 49:184–190.
- Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., Braak, H. (2002). Phases of Abeta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, Jun 25;58(12):1791–800.
- Thomas, T., Miners, S., Love, S. (2015). Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer’s disease and vascular dementia. *Brain*, 138, 1059–1069.
- Timmers, W.F., Tagliavini, F., Haan, J., Frangione, B. (1990). Parenchymal preamyloid and amyloid deposits in the brains of patients with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis--Dutch type. *Neurosci. Lett.*, 118, 223–226.
- Tobimatsu, T., Fujisawa, H. (1989). Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J. Biol. Chem*, 264, 17907–17912.
- Tom, S.E., Hubbard, R.A., Crane, P.K., Haneuse, S.J., Bowen, J., McCormick, W.C., McCurry, S., Larson, E.B. (2014). Characterization of Dementia and Alzheimer’s Disease in an Older Population: Updated Incidence and Life Expectancy With and Without Dementia. *Am J Public Health*, 105, 408–413.
- Tong, G., Shepherd, D., and Jahr, C. (1995). Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science*. 267:1510–1512.
- Townsend, M., Shankar, G.M., Mehta, T., Walsh, D.M., Selkoe, D.J. (2006). Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers: Amyloid β -protein and hippocampal synaptic plasticity. *The Journal of Physiology* 572, 477–492.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev*, 62, 405–496.
- Um, J.W., Nygaard, H.B., Heiss, J.K., Kostylev, M.A., Stagi, M., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Gunther, E.C., Strittmatter, S.M. (2012). Alzheimer amyloid- β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci*, 15, 1227–1235.
- Urbanc, B., Cruz, L., Le, R., Sanders, J., Ashe, K.H., Duff, K., Stanley, H.E., Irizarry, M.C., Hyman, B.T. (2002). Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer’s disease. *PNAS* 99, 13990–13995.
- Usui, R., Shibuya, M., Ishibashi, S., Maru, Y. (2007). Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 1 by low-density lipoprotein. *EMBO Rep*, 8, 1155–1161.
- Vaughn, J.E. (1989). Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse*, 3, 255–285.
- Vehmas, A.K., Kawas, C.H., Stewart, W.F., Troncoso, J.C. (2003). Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. of Aging*, 24, 321–331.
- Vellas, B., Coley, N., Ousset, P.-J., Berrut, G., Dartigues, J.-F., Dubois, B., Grandjean, H., Pasquier, F., Piette, F., Robert, P., Touchon, J., Garnier, P., Mathieux-Fortunet, H., Andrieu, S., GuidAge Study Group. (2012). Long-term use of standardised Ginkgo biloba extract for the prevention of Alzheimer’s disease (GuidAge): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 11, 851–859.

- Volianskis, A., Collingridge, G.L., Jensen, M.S. (2013). The roles of STP and LTP in synaptic encoding. *Peerj*, 1 : e3.
- Von Rotz, R.C. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *Journal of Cell Science*, 117, 4435–4448.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416, 535–539.
- Wang, G., Gilbert, J., and Man, H.-Y. (2012). AMPA Receptor Trafficking in Homeostatic Synaptic Plasticity: Functional Molecules and Signaling Cascades. *Neural. Plast.* 2012: 825364.
- Wang, Y.-J., Chen, G.-H., Hu, X.-Y., Lu, Y.-P., Zhou, J.-N., Liu, R.-Y. (2005). The expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-alpha in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease and its links with AD-related pathology. *Brain Res*, 1031, 101–108.
- Webster, S.J., Bachstetter, A.D., Nelson, P.T., Schmitt, F.A., Van Eldik, L.J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet*, 5.
- Weddell, J.C., Chen, S., Imoukhuede, P.I. (2017). VEGFR1 promotes cell migration and proliferation through PLC γ and PI3K pathways. *npj Systems Biology and Applications*, 4, 1.
- Weider M., Starost L.J., Groll K., Küspert M., Sock E., Wedel M., Fröb F., Schmitt C., Baroti T., Hartwig A.C., Hillgärtner S., Piefke S., Fadler T., Ehrlich M., Ehlert C., Stehling M., Albrecht S., Jabali A., Schöler H.R., Winkler J., Kuhlmann T. & Wegner M. (2018). Nfat/calceineurin signaling promotes oligodendrocyte differentiation and myelination by transcription factor network tuning. *Nat. Commun.* 9:899.
- Weis, S., Cui, J., Barnes, L., Cheresh, D. (2004). Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol*, 167, 223–229.
- Weng, W.-C., Lin, K.-H., Wu, P.-Y., Ho, Y.-H., Liu, Y.-L., Wang, B.-J., Chen, C.-C., Lin, Y.-C., Liao, Y.-F., Lee, W.-T., Hsu, W.-M., Lee, H. (2017). VEGF expression correlates with neuronal differentiation and predicts a favorable prognosis in patients with neuroblastoma. *Scientific Reports*, 7, 11212.
- Wentink, M.Q., Hackeng, T.M., Tabruyn, S.P., Puijk, W.C., Schwamborn, K., Altschuh, D., Meloen, R.H., Schuurman, T., Griffioen, A.W., Timmerman, P. (2016). Targeted vaccination against the bevacizumab binding site on VEGF using 3D-structured peptides elicits efficient antitumor activity. *PNAS*, 113, 12532–12537.
- Werdich, X.Q., Penn, J.S. (2005). Src, Fyn and Yes play differential roles in VEGF-mediated endothelial cell events. *Angiogenesis*, 8, 315–326.
- Wheeler, K.C., Jena, M.K., Pradhan, B.S., Nayak, N., Das, S., Hsu, C.-D., Wheeler, D.S., Chen, K., and Nayak, N.R. (2018). VEGF may contribute to macrophage recruitment and M2 polarization in the decidua. *PLoS One* 13.
- Wild, J.R.L., Staton, C.A., Chapple, K., Corfe, B.M. (2012). Neuropilins: expression and roles in the epithelium. *Int J Exp Pathol*, 93, 81–103.
- Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M.A., Ovsepian, S.V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L.D.B., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher,

- B., Wenninger-Weinzierl, A., Kremmer, E., Heneka, M.T., Thal, D.R., Giedraitis, V., Lannfelt, L., Müller, U., Livesey, F.J., Meissner, F., Herms, J., Konnerth, A., Marie, H., Haass, C. (2015). η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*, 526, 443–447.
- Wisniewski, T., Golabek, A., Vogel, T., Frangione, B., 1994. Acceleration of Alzheimer's Fibril Formation by Apolipoprotein E In Vitro. *Am J Pathol*, 145, 6.
- Wittko, I.M., Schanzer, A., Kuzmichev, A., Schneider, F.T., Shibuya, M., Raab, S., Plate, K.H. (2009). VEGFR-1 Regulates Adult Olfactory Bulb Neurogenesis and Migration of Neural Progenitors in the Rostral Migratory Stream In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 29, 8704–8714.
- Woolard, J., Wang, W.-Y., Bevan, H.S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R.O., Cui, T.-G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., Foster, R., Digby-Bell, J., Shields, J.D., Whittles, C.E., Mushens, R.E., Gillatt, D.A., Ziche, M., Harper, S.J., Bates, D.O. (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*, 64, 7822–7835.
- Wray, S., Noble, W. (2009). Linking Amyloid and Tau Pathology in Alzheimer's Disease: The Role of Membrane Cholesterol in A β -Mediated Tau Toxicity. *J. Neurosci.*, 29, 9665.
- Wu, H.-Y., Hudry, E., Hashimoto, T., Kuchibhotla, K., Rozkalne, A., Fan, Z., Spires-Jones, T., Xie, H., Arbel-Ornath, M., Grosskreutz, C.L., Bacskai, B.J., Hyman, B.T. (2010). Amyloid Beta (A β) Induces the Morphological Neurodegenerative Triad of Spine Loss, Dendritic Simplification, and Neuritic Dystrophies through Calcineurin (CaN) Activation. *J Neurosci*, 30, 2636–2649.
- Wu, H.-Y., Tomizawa, K., Oda, Y., Wei, F.-Y., Lu, Y.-F., Matsushita, M., Li, S.-T., Moriwaki, A., and Matsui, H. (2004). Critical Role of Calpain-mediated Cleavage of Calcineurin in Excitotoxic Neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 279:4929–4940.
- Xia, P., Aiello, L.P., Ishii, H., Jiang, Z.Y., Park, D.J., Robinson, G.S., Takagi, H., Newsome, W.P., Jirousek, M.R., King, G.L. (1996). Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest*, 98, 2018–2026.
- Xie, Z., Srivastava, D.P., Photowala, H., Kai, L., Cahill, M.E., Woolfrey, K.M., Shum, C.Y., Surmeier, D.J., Penzes, P. (2007). Kalirin-7 Controls Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron*, 56, 640–656.
- Yan, S.D., Roher, A., Schmidt, A.M., Stern, D.M. (1999). Cellular cofactors for amyloid beta-peptide-induced cell stress. Moving from cell culture to in vivo. *Am. J. Pathol*, 155, 1403–1411.
- Yan, Y., Wang, C. (2006). A β 42 is More Rigid than A β 40 at the C Terminus: Implications for A β Aggregation and Toxicity. *Journal of Molecular Biology*, 364, 853–862.
- Yang, S.-P., Bae, D.-G., Kang, H.J., Gwag, B.J., Gho, Y.S., Chae, C.-B. (2004). Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with β -amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 25, 283–290.
- Yang, S.-Z., Zhang, L.-M., Huang, Y.-L., Sun, F.-Y. (2003). Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 274A, 851–856.

- Yao, Y., Belcher, J., Berger, A.J., Mayer, M.L., Lau, A.Y. (2013). Conformational Analysis of NMDA Receptor GluN1, GluN2, and GluN3 Ligand-Binding Domains Reveals Subtype-Specific Characteristics. *Structure*, Oct 8; 21(10).
- Yao, Y.-G., and Duh, E.J. (2004). VEGF selectively induces Down syndrome critical region 1 gene expression in endothelial cells: a mechanism for feedback regulation of angiogenesis? *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 321:648–656.
- Yasumatsu, N., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Noguchi, J., Kasai, H. (2008). Principles of Long-Term Dynamics of Dendritic Spines. *J. Neurosci*, 28, 13592–13608.
- Yin, Y., Gao, D., Wang, Y., Wang, Z.-H., Wang, X., Ye, J., Wu, D., Fang, L., Pi, G., Yang, Y., et al. (2016). Tau accumulation induces synaptic impairment and memory deficit by calcineurin-mediated inactivation of nuclear CaMKIV/CREB signaling. *PNAS*. 113:E3773–E3781.
- Younkin, S.G. (1995). Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol*, 37, 287–288.
- Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., Bréant, C., Karkkainen, M.J., Alitalo, K., Eichmann, A. (2002). Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*, 129, 4797–4806.
- Yuste, R., Bonhoeffer, T. (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 24–34.
- Yuste, R., Majewska, A., Cash, S.S., Denk, W. (1999). Mechanisms of Calcium Influx into Hippocampal Spines: Heterogeneity among Spines, Coincidence Detection by NMDA Receptors, and Optical Quantal Analysis. *J. Neurosci*, 19, 1976–1987.
- Zachary, I., Glikli, G. (2001). Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc. Res*, 49, 568–581.
- Zechel, S., Unsicker, K., von Bohlen und Halbach, O. (2009). Fibroblast growth factor-2 deficiency affects hippocampal spine morphology, but not hippocampal catecholaminergic or cholinergic innervation. *Developmental Dynamics* 238, 343–350.
- Zeng, Y., Zhao, D., Xie, C.-W. (2010). Neurotrophins Enhance CaMKII Activity and Rescue Amyloid- β -Induced Deficits in Hippocampal Synaptic Plasticity. *Journal of Alzheimer's Disease*, 21, 823–831.
- Zhang, L., Fang, Y., Xu, Y., Lian, Y., Xie, N., Wu, T., Zhang, H., Sun, L., Zhang, R., Wang, Z. (2015). Curcumin Improves Amyloid β -Peptide (1-42) Induced Spatial Memory Deficits through BDNF-ERK Signaling Pathway. *PLOS ONE*, 10, e0131525.
- Zhang, L., Zhou, F., Han, W., Shen, B., Luo, J., Shibuya, M. and He, Y. (2010). VEGFR-3 ligand-binding and kinase activity are required for lymphangiogenesis but not for angiogenesis. *Cell Res*, 20, 1319–1331.
- Zhang, W., Hao, J., Liu, R., Zhang, Z., Lei, G., Su, C., Miao, J., Li, Z. (2011). Soluble A β levels correlate with cognitive deficits in the 12-month-old APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res*, 222, 342–350.
- Zhang, W.-B., Ross, P.J., Tu, Y., Wang, Y., Beggs, S., Sengar, A.S., Ellis, J., Salter, M.W. (2016). Fyn Kinase regulates GluN2B subunit-dominant NMDA receptors in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Scientific Reports*, 6, 23837.
- Zhang, X., Song, W. (2013). The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid- β generation. *Alzheimers Res Ther*, 5, 46.

- Zhang, Y.-P., Holbro, N., Oertner, T.G. (2008). Optical induction of plasticity at single synapses reveals input-specific accumulation of α CaMKII. *PNAS*, 105, 12039–12044.
- Zheng, Z., Sabirzhanov, B., Keifer, J. (2010). Oligomeric amyloid- β inhibits the proteolytic conversion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA receptor trafficking, and classical conditioning. *J. Biol. Chem*, 285, 34708–34717.
- Zhou, Q., Homma, K.J., Poo, M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44, 749–757.
- Ziv, N.E., Smith, S.J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, 17, 91–102.

ORIGINAL ARTICLE

A critical role for VEGF and VEGFR2 in NMDA receptor synaptic function and fear-related behavior

P De Rossi^{1,2,3}, E Harde^{4,5,6}, JP Dupuis^{7,8}, L Martin^{1,2,3}, N Chounlamountri^{1,2,3}, M Bardin^{1,2,3}, C Watrin^{1,2,3}, C Benetollo^{1,2,9}, K Pernet-Galley^{10,11}, HJ Luhmann¹², J Honnorat^{1,2,13}, G Malleret^{1,2,14}, L Groc^{7,8}, A Acker-Palmer^{4,5,6}, PA Salin^{1,2,14} and C Meissirel^{1,2,3}

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is known to be required for the action of antidepressant therapies but its impact on brain synaptic function is poorly characterized. Using a combination of electrophysiological, single-molecule imaging and conditional transgenic approaches, we identified the molecular basis of the VEGF effect on synaptic transmission and plasticity. VEGF increases the postsynaptic responses mediated by the *N*-methyl-D-aspartate type of glutamate receptors (GluNRs) in hippocampal neurons. This is concurrent with the formation of new synapses and with the synaptic recruitment of GluNR expressing the GluNR2B subunit (GluNR-2B). VEGF induces a rapid redistribution of GluNR-2B at synaptic sites by increasing the surface dynamics of these receptors within the membrane. Consistently, silencing the expression of the VEGF receptor 2 (VEGFR2) in neural cells impairs hippocampal-dependent synaptic plasticity and consolidation of emotional memory. These findings demonstrated the direct implication of VEGF signaling in neurons via VEGFR2 in proper synaptic function. They highlight the potential of VEGF as a key regulator of GluNR synaptic function and suggest a role for VEGF in new therapeutic approaches targeting GluNR in depression.

Molecular Psychiatry (2016) 21, 1768–1780; doi:10.1038/mp.2015.195; published online 5 January 2016

INTRODUCTION

Increasing evidence indicate that the vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR2 mediate key neurobiological processes involved in antidepressant treatment response.^{1,2} These treatments, from conventional antidepressants to electroconvulsive therapies, trigger a rapid and robust increase in VEGF levels in the hippocampus in animal models.^{3,4} Reciprocally, VEGF overexpression obtained *in vivo* by intracerebral administration, gene transfer or in conditional transgenic animal models, induces a VEGFR2-mediated increase in adult neurogenesis,^{5–7} improves hippocampal-dependent cognition^{8,9} and influences mood-related behavior with clear antidepressant effects.⁹ Moreover, previous evidence documented that VEGFR2 is required for the beneficial impact of antidepressant treatments on anxiety-like behavior and anhedonia.^{3,4} In contrast, endogenous VEGF depletion via small hairpin RNA silencing or inducible expression of a VEGF trap leads to altered hippocampal neurogenesis in response to enriched environment^{4,10} or to selective deficits in memory.⁸ Licht *et al.*⁸ further demonstrated that short induction or blockade of VEGF significantly impacts on associative learning performances prior to the integration of new neurons in the hippocampal network. VEGF is able to induce rapid changes in synaptic plasticity in the dentate gyrus that could account for the gain or deficit in memory performances.⁸ Yet, the underlying mechanisms responsible for the VEGF effect on hippocampal

synaptic plasticity remain to be demonstrated and might shed new light on synaptic alterations linked to depression.

In the hippocampus, the NMDA type of glutamate receptor (GluNR) is a ionotropic receptor permeable for Ca²⁺ that form di and tri-heteromeric assemblies including the obligatory GluNR1 subunit associated to GluNR2A and/or GluNR2B subunits.¹¹ Extensive studies have focused on the contribution of GluNR in synaptic transmission and plasticity with a specific interest for the network between CA3 and CA1 pyramidal cells in the hippocampus.^{12,13} These exquisitely defined synaptic processes raise the possibility to uncover new actors that may have critical roles in regulating the efficacy of glutamatergic synaptic transmission. The regulation of synaptic strength has recently emerged as a key process implicated in the pathophysiology of depression.¹⁴ Hence, the expression of synaptic function-related genes was reduced in prefrontal cortex of major depressive disorders subjects in link with synaptic loss.¹⁵ Furthermore, GluNR-mediated synaptic transmission was decreased in a juvenile rat model of stress-related disorders, in association with prefrontal cortex dysfunction.¹⁶ Thus, given the influence of VEGF on synaptic plasticity and antidepressant response, it is of interest to explore the interaction between VEGF and GluNR-mediated synaptic function. Recently, we documented a new cross-talk between VEGFR2 and GluNR that mediates the guidance of cerebellar granule neurons prior to synapse formation.^{17,18} In these neurons,

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1028, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5290, Lyon, France; ²Claude Bernard University Lyon 1, Lyon, France; ³Neurooncology and Neuroinflammation, Lyon Neuroscience Research Center, Lyon, France; ⁴Institute of Cell Biology and Neuroscience and BMLS, Goethe University Frankfurt, Frankfurt, Germany; ⁵Max Planck Institute for Brain Research, Frankfurt, Germany; ⁶Focus Program Translational Neurosciences, University of Mainz, Mainz, Germany; ⁷Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Unité Mixte de Recherche 5297, Université de Bordeaux, Bordeaux, France; ⁸Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, Centre National de la Recherche Scientifique, Bordeaux, France; ⁹Functional Neurogenetics and Optogenetics, Lyon Neuroscience Research Center, Lyon, France; ¹⁰Grenoble Institute of Neurosciences, Grenoble, France; ¹¹INSERM U836, Microscopy and Electron Microscopy Platform, Grenoble, France; ¹²Institute of Physiology, University Medical Center, University of Mainz, Mainz, Germany; ¹³Neuro-Oncology Department, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique, Lyon, France and ¹⁴Forgetting and Cortical Dynamics, Lyon Neuroscience Research Center, Lyon, France. Correspondence: Dr C Meissirel, Equipe Neurooncologie et Neuroinflammation, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1028, Faculté de Médecine Laennec, Lyon cedex 08, 69372 Lyon, France. E-mail: clairemeissirel@inserm.fr

Received 21 December 2014; revised 7 October 2015; accepted 22 October 2015; published online 5 January 2016

VEGF triggers phosphorylation of GluN2B expressing GluNR (GluNR-2B) via VEGFR2, and amplify their function.¹⁸ However, whether a VEGFR2–GluNR interaction is involved in the VEGF-dependent increase in synaptic transmission and plasticity described in hippocampal neurons, has not been explored so far.¹⁹ Therefore, we hypothesized that VEGF could modulate GluNR-mediated synaptic function and plasticity in hippocampal pyramidal cells through VEGFR2. One intriguing possibility is that such a VEGF/VEGFR2-dependent mechanism might be relevant for understanding the action of new antidepressant therapies modulating GluNR function.²⁰

In the present study, we identified molecular mechanisms implicated in the VEGF effect on hippocampal excitatory synaptic function, plasticity and related emotional learning processes. We first demonstrated that VEGF is able to potentiate GluNR postsynaptic responses in hippocampal pyramidal cells, via the contribution of GluNR-2B and VEGFR2. Furthermore, we showed that co-application of VEGF and NMDA to cultured hippocampal neurons induces a coordinated remodeling of GluNR-2B and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor content at postsynaptic sites together with calcium-calmodulin-activated kinase (CaMKII) and protein kinase C (PKC) activation. Finally, we uncovered that VEGFR2 is required in hippocampal neurons to enable hippocampal long-term potentiation (LTP), a cellular model of memory, and consolidation of contextual fear memory.

MATERIALS AND METHODS

Animals

For experiments, wild-type P14–P15 C57Bl6J mice were used as well as two lines of transgenic mice (at P14–P15 and/or 2 months) including Nestin-cre²¹ VEGFR2 conditional knockout and CaMKII-cre²² VEGFR2 conditional knockout with related heterozygotes and control littermates. All animal experiments were conducted in accordance with the French and German institutional guidelines and ethical committees.

Culture and treatments

Primary hippocampal cell cultures were prepared from embryonic day 17 C57Bl6 mice. Low-density or high-density cultures were used after 15 days *in vitro* and left in supplemented Neurobasal medium or treated with NMDA (50 μ M), VEGF (50 ng ml⁻¹) or NMDA+VEGF for 15 min prior to further processing.

Immunocytochemistry

Surface receptor expression was assayed in 15 days *in vitro* hippocampal cell cultures fixed in non-permeabilizing conditions and immunostained with antibodies recognizing the extracellular domain of corresponding proteins. After a permeabilization step, synapses were immunostained for the presynaptic synaptotagmin-1 and/or the postsynaptic PSD95. Hippocampal pyramidal cells were subsequently imaged with Apotome microscopy (Zeiss, Jena, Germany), regions of interest were centered on apical dendrites and receptor cluster density quantified in collapsed Z-stacks.

Electrophysiology

Whole-cell patch-clamp recordings were performed in voltage-clamp mode on acute coronal hippocampal slices from non-transgenic and transgenic P14–15 pups including VEGFR2 conditional knockout and heterozygotes. Hippocampal cells were recorded in CA1 and CA3 regions and evoked GluNR-mediated responses were isolated using gamma-aminobutyric acid type A receptor antagonist picrotoxin and AMPA/kainate receptor antagonists NBQX or CNQX in the perfusion solution. VEGF was applied locally by pressure (Picospritzer II) close to the apical dendrite of the recorded pyramidal cell (inset Figure 1b). GluNR-mediated responses were blocked using D-2-amino-5-phosphonopentanoate, MK801 and antagonists selective for GluN2B or GluN2A subunits, respectively, ifenprodil or NVP-AAM077.

Fields recordings were performed in P30–50 acute hippocampal slices from two lines of transgenic VEGFR2 conditional mice, heterozygotes and

control littermates to determine synaptic strength (input/output (I/O) curves, paired-pulse facilitation and long-term potentiation (LTP)) at the Schaffer collateral-CA1 synapses.

For VEGFR2 inhibition, hippocampal slices were treated with PTX/87 (PTX), which inhibits specifically the tyrosine kinase activity of the receptor.

Single-molecule dot tracking

Quantum dots 655 coupled to goat anti-rabbit F(ab)₂ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were incubated on hippocampal neurons previously exposed to anti-GluN2B rabbit antibodies. Quantum dots tracking was analyzed with Metamorph software and the instantaneous diffusion coefficient calculated for each trajectory. Synaptic, perisynaptic and extrasynaptic locations for receptor/particle complex were defined with respect to MitoTracker Green labeling.

PSD fraction isolation

Postsynaptic density fractions (PSDs) were prepared as previously described²³ from treated 15 days *in vitro* hippocampal cell cultures. In brief, cells were harvested and processed for successive centrifugation steps in specific cold buffers to separate PSD from the non-PSD. PSD and non-PSD proteins were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels 4–12%, transferred on nitrocellulose membranes and immunoblotted with antibodies recognizing PSD95, synaptophysin, the GluNR subunits GluN2B and GluN2A, VEGFR2 and the GluA1 subunit of AMPA receptors. Immunoblotting of the active and total forms of CaMKII and PKC γ were also performed.

Quantification of VEGF by enzyme-linked immunosorbent assay

LTP was induced chemically (chemLTP) on acute hippocampal coronal slices from adult VEGFR2 conditional knockout and heterozygote mice, by incubating slices in tetraethylammonium chloride-containing artificial cerebrospinal fluid for 10 min. Immediately after LTP induction, VEGF levels were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay and compared with VEGF levels in untreated conditions.

Behavior

For fear-conditioning tasks, 2-month-old male mice including transgenic and control littermates were used. On training day, mice were placed in conditioning chamber for 2 min prior to the tone-electric footshock pairing. After 24 h, mice were tested in the training context and again 1 h later in a new context, following an exposure to the tone.

Statistics

Data are expressed as mean \pm s.e.m. Distributions were tested for normality and variance equality between groups was assessed using the Levene's test. Statistical analysis were performed using as stated paired Student's *t*-tests, unpaired two-tailed *t*-tests as well as one-way analysis of variance or two-way analysis of variance. The non-parametric Kruskal–Wallis with *post hoc* tests was used when data were not normally distributed.

RESULTS

VEGF increases GluNR-mediated synaptic transmission in hippocampal neurons via VEGFR2 and postsynaptic GluNR-2B

Our goal was to determine whether VEGF might regulate glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. We first investigated by immunohistochemistry with validated antibodies^{5,17,18,24} the spatial distribution of VEGF and its receptor VEGFR2 in P15 hippocampi. Both VEGF and VEGFR2 were expressed in the pyramidal cell layer and proximal apical dendrites in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus (Supplementary Figure S1a–e), indicating that hippocampal pyramidal cells have the capacity to respond to endogenous VEGF.

Based on this expression pattern, we decided to study the VEGF effect on GluNR-mediated synaptic transmission in hippocampal slices from P15 animals. GluNR excitatory postsynaptic currents (EPSCs) were recorded in whole-cell patch-clamp configuration in the presence of specific gamma-aminobutyric acid type A and AMPA receptor antagonists, and we compared evoked synaptic

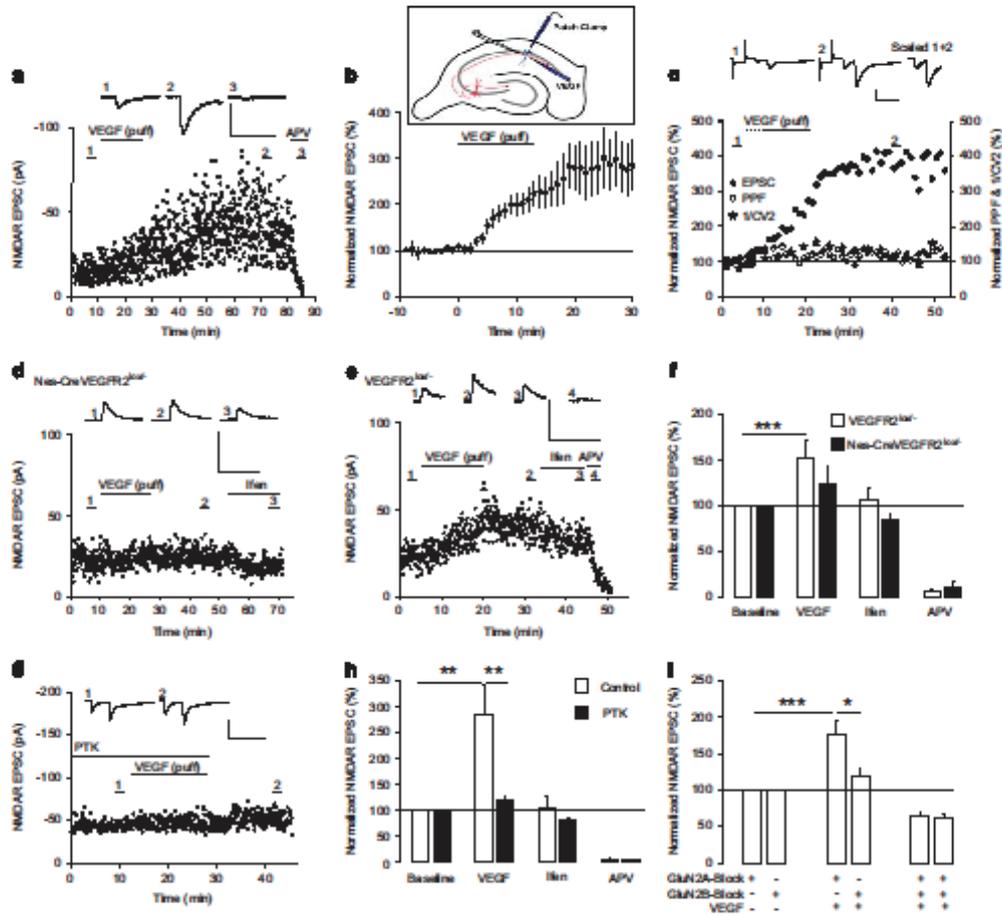


Figure 1. VEGF-dependent increase in GluNR-mediated synaptic transmission requires VEGFR2 and GluNR-2B. (a) Representative whole-cell patch-clamp recording of a CA1 pyramidal cell showing VEGF effect on GluNR-mediated Excitatory Postsynaptic Currents (EPSCs) at Schaffer collateral-CA1 synapses. EPSCs are illustrated in baseline condition in presence of gammaaminobutyric acid type A and AMPA receptor antagonists (1), after VEGF application (2) and APV (50 μ M) (3) treatment. Note their long-term enhancement after VEGF application and their blockade with APV. (b) Local VEGF application showing a threefold increase in GluNR-mediated responses in CA1 ($n=8$). Inset showing VEGF topical application, local electrical stimulation of Schaffer collaterals-CA1 synapses and patch-clamp recording of a CA1 pyramidal cell. (c) Magnitude of PPF is characterized by PPF and inverse of the squared coefficient of variation ratios and did not change after VEGF application at Schaffer collaterals-CA1 synapses. (d and e) Representative whole-cell patch-clamp recordings showing VEGF impact on GluNR-mediated EPSCs in VEGFR2 conditional knockout mice (Nes-Cre VEGFR2^{loxP}) (d) and heterozygotes (VEGFR2^{loxP/+}) (e). *ifen*, (ifenprodyl, 6 μ M) the NMDAR antagonist selective for GluN2B. (f) VEGFR2 silencing in Nes-Cre VEGFR2^{loxP/+} mice prevents the VEGF-dependent increase in GluNR-mediated synaptic transmission (100% of baseline and 123.3 \pm 24% after VEGF, $n=6$, P not significant, paired Student's t -test) that is reported in VEGFR2^{loxP/+} (100% of baseline and 151.6 \pm 19.3% after VEGF, $n=14$, *** P < 0.001, paired Student's t -test). (g) Representative recording of synaptic responses at SC-CA1 synapses using the selective VEGFR2 inhibitor PTK787 (PTK, 30 μ M). (h) PTK inhibited the VEGF induced enhancement of GluNR-mediated synaptic responses (100% of baseline and 118.6 \pm 8.2% after VEGF, $n=6$, P not significant) that is reported in control condition (100% of baseline and 282.7 \pm 55.5% after VEGF, $n=7$; ** P < 0.01, paired Student's t -test PTK versus controls: ** P < 0.01). (i) Contribution of GluN2 subunits to normalized GluNR-mediated EPSCs was characterized with selective GluN2B and GluN2A antagonists (ifenprodyl (6 μ M) and NVP-AAM-077 (50 nM), respectively). GluN2A blockade failed to prevent the VEGF-dependent increase in GluNR-mediated synaptic responses (100% of baseline and 182.1 \pm 17.3% after VEGF, $n=10$, ** P < 0.001, paired Student's t -test) in contrast to GluN2B inhibition (100% baseline and 118.5 \pm 12.1% after VEGF, $n=10$, P not significant, paired Student's t -test). Notably, the difference between the effects of GluN2B and GluN2A antagonists on VEGF-driven increase is significant (* P < 0.05). Scale bars, 50 pA, 200 ms. 1/ CV², inverse of the squared coefficient of variation. APV, D-2-amino-5-phosphonovaleate. * P < 0.05.

responses before and after local VEGF application in CA1 or CA3. VEGF triggered a robust and long-term increase in GluNR EPSC amplitude in pyramidal cells from both CA1 (Figure 1a) and CA3 (results not shown), which was selectively blocked by the GluNR antagonist D-2-amino-5-phosphonovalerate (APV) (Figure 1a). In CA1 pyramidal cells, VEGF increased the GluNR-mediated EPSCs within 5–10 min by almost threefold (Figure 1b). To determine whether this VEGF-dependent increase in GluNR synaptic responses is due to an increase in presynaptic glutamate release

probability or alternatively to a postsynaptic event, we compared the paired-pulse facilitation (PPF) obtained in baseline condition and after VEGF application. Two stimuli were applied at short intervals to induce a presynaptic facilitation of glutamate release and the PPF and the inverse of the squared coefficient of variation ratios were calculated. Changes in both ratios generally reflect an alteration in release probability but VEGF did not trigger any modification (Figure 1c), indicating a postsynaptic involvement of VEGF in the GluNR-mediated synaptic transmission.

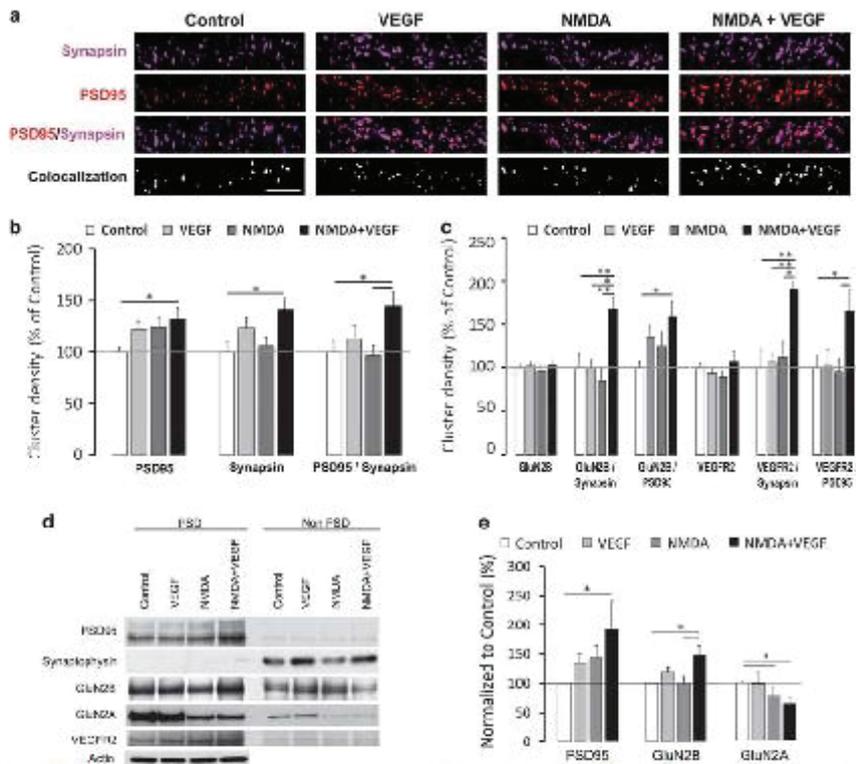


Figure 2. VEGF and NMDA-driven synapse formation and synaptic recruitment of GluNR-2B. (a) Representative dendritic staining in clusters for synapsin (magenta), PSD95 (red) and co-localization (white) in treated hippocampal neurons (scale bar, 5 μ m). (b) Summary graphs showing the cluster density for PSD95, Synapsin and PSD95/Synapsin co-localization in control, VEGF, NMDA and NMDA+VEGF conditions with values normalized to control. Data were analyzed using a one-way ANOVA and when appropriate a Bonferroni *post hoc* test. Combined NMDA and VEGF application causes an increase in PSD95 and Synapsin cluster density compared with control condition (for PSD95 $100 \pm 3.9\%$ in control versus $131.3 \pm 11.3\%$ with NMDA+VEGF, $n = 25-23$, $*P < 0.05$; for synapsin $100 \pm 9\%$ in control versus $141.4 \pm 10.5\%$ with NMDA+VEGF, $n = 27-18$, $*P < 0.05$). Full synapses defined by co-localized PSD95 and Synapsin clusters showed an increase in density with the same treatment ($100 \pm 10.5\%$ in control versus $144.8 \pm 12.9\%$ with NMDA+VEGF, $n = 11-10$, $*P < 0.05$). (c) Graph showing normalized values for GluN2B, VEGFR2 as well as GluN2B/synapsin, GluN2B/PSD95, VEGFR2/synapsin and VEGFR2/PSD95 cluster densities in all conditions. Data were analyzed using a one-way ANOVA and when appropriate, a Bonferroni *post hoc* test. Treatments did not affect the density of surface GluN2B and VEGFR2 clusters but their density increased significantly at synapses following NMDA and VEGF co-application as compared with control condition (for GluN2B/synapsin, with NMDA+VEGF $167.4 \pm 13.3\%$ versus control $100 \pm 16.3\%$, $n = 8-16$, $**P < 0.01$; for GluN2B/PSD95, with NMDA+VEGF $158.2 \pm 17.7\%$ versus control $100 \pm 7.4\%$, $n = 12-15$, $*P < 0.05$; for VEGFR2/synapsin, with NMDA+VEGF $190.9 \pm 8.1\%$ versus control $100 \pm 20\%$, $n = 8-16$, $**P < 0.01$; for VEGFR2/PSD95, with NMDA+VEGF $164.8 \pm 24.7\%$ versus control $100 \pm 13.4\%$, $n = 10-15$, $*P < 0.05$). Data in b and c are derived from three independent experiments. (d) Representative western blot of isolated postsynaptic (PSD) and non-PSD fractions from hippocampal neurons treated with control, VEGF, NMDA or NMDA+VEGF. PSD and non-PSD fractions were immunoblotted for PSD95, synaptophysin, GluN2B, GluN2A and VEGFR2. (e) Semi-quantitative analyses showing an increase in PSD95 and GluN2B content in PSD fractions following NMDA+VEGF treatment. All values were normalized to control. $n = 10$ independent experiments for PSD95, $n = 5$ for GluN2B and $n = 12$ for GluN2A. Data were analyzed using a Kruskal-Wallis and when appropriate a *post hoc* test. Significant differences between conditions are indicated by (*) for $P < 0.05$.

Next, we explored whether VEGFR2 mediates the VEGF-dependent effect on the postsynaptic response of pyramidal cells, using slices from genetically engineered mice. We used conditional mice expressing the Cre recombinase under the nestin promoter²¹ that triggers a selective VEGFR2 deletion in neural cells (Supplementary Figure S1e and g). Whole-cell patch-clamp recordings were performed in CA1 pyramidal cells from VEGFR2 conditional knockout and heterozygote mice. Heterozygote slices display increased GluNR synaptic responses when VEGF was applied (Figure 1e and f), whereas VEGF failed to induce any significant change in GluNR EPSCs in VEGFR2 conditional knockout slices (Figure 1d and f). Thus, complete silencing of VEGFR2 in neural cells blocked the VEGF-dependent amplification of GluNR postsynaptic responses in CA1 pyramidal cells. We further assessed whether pharmacological blockade of VEGFR2 would support our genetic findings. Application of PTK787, a blocker that specifically inhibits the tyrosine kinase activity of VEGFR2, neutralized the amplifying effect of VEGF (Figure 1g and h). Overall, these electrophysiological findings provide strong evidence that VEGF effect on GluNR-mediated synaptic responses acts through VEGFR2.

To gain insight into the GluNR subunit involved in this VEGF induced effect, we examined GluNR postsynaptic responses in hippocampal slices treated with GluN2B or GluN2A selective antagonists (ifenprodyl and NVP-AAM077,²² respectively). With ifenprodyl treatment, VEGF failed to induce a significant increase in GluNR EPSCs, whereas NVP-AAM077 had no significant effect and did not prevent the VEGF-dependent increase in synaptic responses (Figure 1i). Thus, our data indicate that GluN2B expressing GluNR (GluNR-2B) mediate the VEGF-dependent increase in evoked postsynaptic responses in hippocampal neurons.

VEGF and GluNR receptor co-activation promotes synapse formation and accumulation of GluNR-2B at synapses

Postsynaptic mechanisms underlying the VEGF-dependent increase in GluNR synaptic transmission may involve an increase in GluNR-2B synaptic expression and/or a change in receptor function. To test whether VEGF is able to recruit GluNR-2B to synaptic sites, we stimulated the total pool of GluNR and/or VEGFR2 in cultured hippocampal neurons with bath applications of NMDA and/or VEGF.^{1,23} These short treatments did not cause major toxic effects with NMDA and failed to increase cell viability with VEGF, as assessed using Live/dead assay and western blotting (Supplementary Figure S2). Only high doses of NMDA

downregulated activation of the pro-survival extracellular signal-regulated kinase 1/2 and activated the pro-death molecule caspase-3 (Supplementary Figure S2f).

To determine the impact of VEGF on synaptic expression of VEGFR2 and GluNR-2B in hippocampal neurons, we quantified the cluster density of cell surface receptors in apical dendrites of non-permeabilized fixed pyramidal cells. Synaptic sites were identified with the commonly used presynaptic vesicle marker synapsin-1 and/or the postsynaptic density marker PSD95 (Figure 2a). Quantitative analysis of synaptic sites, identified as PSD95 or synapsin-1 clusters, and full synapses (PSD95 and synapsin-1 α -clusters) indicated that their density was only increased with combined NMDA and VEGF treatment compared with control (Figure 2a and b). To investigate whether this increase in synaptic site density was associated with morphological changes of dendritic spines and synapses, we respectively used confocal and electron microscopy on treated hippocampal neurons. The quantitative confocal imaging of enhanced green fluorescent protein-expressing neurons showed that NMDA and VEGF combined stimulation selectively promoted the formation of new dendritic spines (Supplementary Figure S3a–c). This emergence of new dendritic protrusions resulted in part from the appearance of *de novo* spines, as revealed by time-lapse imaging (Supplementary Figure S3d). In addition, dynamic changes in spine morphology were also detected with an increase in spine head size induced by NMDA and VEGF treatment (Supplementary Figure S3d). Electron microscopic analyses further documented a significant increase in PSD length under VEGF and combined NMDA and VEGF treatments, in link with an occurrence of perforated synapses (Supplementary Figure S4a–e). However, only the combined NMDA and VEGF condition triggered a major PSD remodeling with a concurrent enhancement of PSD length and thickness (Supplementary Figure S4e). Thus, our data demonstrated that new synaptic sites are induced after brief NMDA and VEGF exposure through dendritic spine formation and PSD remodeling.

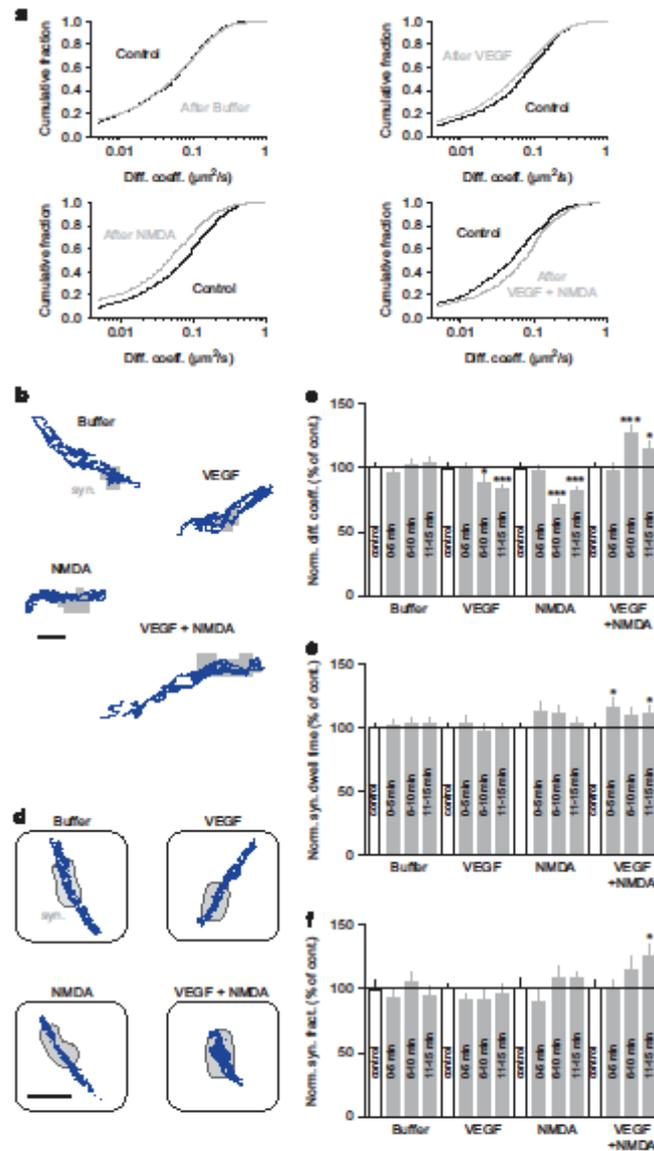
None of the applied treatments did affect the global expression of surface GluNR-2B (identified by immunostaining of their GluN2B subunit) or VEGFR2 in dendrites (Figure 2c and Supplementary Figure S5). In contrast, their synaptic location characterized by the density of GluN2B/synapsin or GluN2B/PSD95 co-clusters and VEGFR2/synapsin or VEGFR2/PSD95 co-clusters was significantly enhanced with NMDA and VEGF co-application compared with control condition (Figure 2c and Supplementary Figure S5). Together, our findings demonstrate that the co-activation of NMDA and VEGF receptors in hippocampal pyramidal neurons

Figure 3. Increase in GluNR-2B surface diffusion and synaptic accumulation induced by VEGF and NMDA. (a) Cumulative distributions of the instantaneous diffusion coefficients of synaptic GluNR-2B before (Control, black) and after buffer, VEGF, NMDA or VEGF+NMDA (gray) administration. The first point of each distribution corresponds to the fraction of immobile receptors (diffusion coefficient < 0.005 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). Kolmogorov-Smirnov test on cumulative distributions: control versus buffer, *P* not significant; control versus VEGF, *P* < 0.0001; control versus NMDA, *P* < 0.0001; control versus VEGF+NMDA, *P* < 0.0001. (b) Representative trajectories (500 frames, 20-Hz acquisition rate) of surface GluNR-2B (scale bar, 1 μm) after Buffer, VEGF, NMDA or VEGF+NMDA administration. Gray, synaptic area (syn.). (c) Normalized instantaneous diffusion coefficients of synaptic GluNR-2B (mean \pm s.e.m.) before (Control, white bars) and after Buffer, VEGF, NMDA or VEGF+NMDA (gray bars) administration (example 6–10 min after treatment: control 100 \pm 3.9%, *n* = 919 trajectories, versus buffer 101.9 \pm 4.7%, *n* = 618, *P* non-significant; control 100 \pm 3.8%, *n* = 742, versus VEGF 89.1 \pm 5.3%, *n* = 355, **P* < 0.05; control 100 \pm 4.5%, *n* = 529, versus NMDA 72.0 \pm 3.8%, *n* = 542, ****P* < 0.0001; control 100 \pm 4.5%, *n* = 712, versus VEGF+NMDA 126.5 \pm 6.3%, *n* = 460, ****P* < 0.0001). (d) Representative surface distributions of single GluNR-2B in the synaptic area (gray, syn.) during a standard acquisition (500 frames, 20-Hz acquisition rate) after Buffer, VEGF, NMDA or VEGF+NMDA administration. Each blue dot represents the detection of a single receptor during a frame (scale bar, 400 nm). (e) Normalized GluNR-2B synaptic dwell time (mean \pm s.e.m.) before (control, white bars) and after Buffer, VEGF, NMDA or VEGF+NMDA (gray bars) administration (example 11–15 min after treatment: control 100 \pm 2.6% versus buffer 103 \pm 5%, *P* non-significant; control 100 \pm 2.6% versus VEGF 98.3 \pm 5.4%, *P* non-significant; control 100 \pm 2.6% versus NMDA 102.9 \pm 5.9%, *P* non-significant; control 100 \pm 2.6% versus VEGF+NMDA 115.1 \pm 7.7%, **P* < 0.05). (f) Normalized synaptic fraction of detected GluNR-2B (mean \pm s.e.m.) before (control, white bars) and after Buffer, VEGF, NMDA or VEGF+NMDA (gray bars) administration. No change in GluNR-2B synaptic content was observed after 11–15 min administration of buffer, VEGF or NMDA alone (control 100 \pm 4.3%, *n* = 10 neuronal fields versus VEGF 96.1 \pm 8.2%, *n* = 8, *P* not significant; control 100 \pm 8%, *n* = 9 versus NMDA 107.8 \pm 5.1%, *n* = 9, *P* not significant). However, GluNR-2B synaptic fraction was increased following 11–15 min of VEGF+NMDA compared with control (control 100 \pm 6.2%, *n* = 9 versus VEGF+NMDA 126.3 \pm 8.2%, *n* = 9, **P* < 0.05). Comparison between groups for instantaneous diffusion coefficients, normalized synaptic dwell time and synaptic fraction were analyzed using a Kruskal-Wallis and post hoc Dunn's test.

triggers synaptogenesis and promotes the synaptic targeting of GluNR-2B and VEGFR2.

To confirm this synaptic targeting process, we isolated the postsynaptic density fractions (PSDs) from treated hippocampal neurons and analyzed the expression of the GluN2 subunits

GluN2B and GluN2A, and of VEGFR2 and PSD95 by immunoblotting. The resulting enrichment of PSD95 in PSDs and of the presynaptic protein synaptophysin in non-PSD fractions validated the purification protocol (Figure 2d). Our biochemical findings revealed that combined NMDA and VEGF treatment is able to



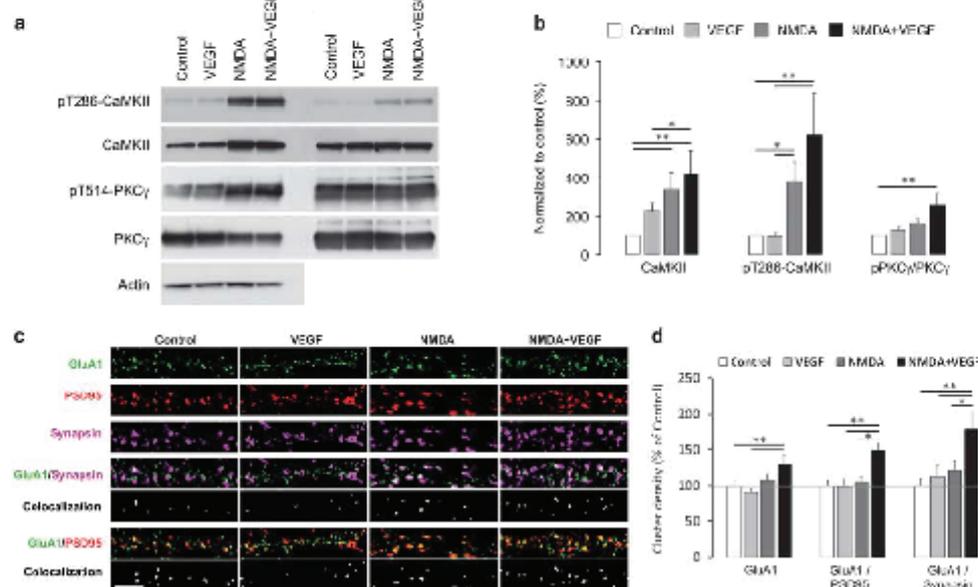


Figure 4. VEGF and NMDA administration induced signaling pathways and AMPAR synaptic delivery in hippocampal neurons. (a) Immunoblots of total and phosphorylated forms of CaMKII and PKC γ in PSDs upon treatments. PSD and non-PSD fractions were purified from hippocampal cultures exposed to control, VEGF, NMDA and NMDA+VEGF. (b) Analysis of protein expression levels normalized to control showing the increase in total and active CaMKII (pT286-CaMKII) induced by NMDA and NMDA+VEGF treatments compared with control, which reflects the translocation of these two forms of CaMKII to PSD. Note that the phosphorylated to total PKC γ ratio was also significantly increased in PSDs upon exposition to NMDA+VEGF compared with control. Respectively $n=9$ independent experiments for CaMKII and $n=7$ for PKC γ ; significant differences between conditions were determined using a Kruskal-Wallis with a post hoc test and are indicated by (*) for $P < 0.05$; (**) for $P < 0.01$. (c) Representative dendritic immunostaining in clusters for GluA1 (green), PSD95 (red) and synapsin (magenta), as well as for GluA1/synapsin and GluA1/PSD95 co-localization (white) (scale bar, 5 μ m). (d) Graphs showing the density of GluA1 clusters, respectively, at the dendritic surface and at synaptic sites defined by PSD95 or synapsin labeling. Values were normalized to control and analyzed using a one-way ANOVA and when appropriate a Bonferroni post hoc test. Following NMDA and VEGF treatment, surface GluA1 clusters increased in density compared with control and VEGF alone (with NMDA+VEGF $130 \pm 13.8\%$ versus control $100 \pm 6.1\%$, $n=10-11$, ** $P < 0.01$; versus VEGF $90.2 \pm 6.2\%$, $n=10-15$, ** $P < 0.01$) and accumulated at synapses compared with the other conditions (for PSD95 labeled synapses: with NMDA+VEGF $148.9 \pm 14.6\%$ versus control $100 \pm 7.4\%$, $n=10-11$, ** $P < 0.01$; versus VEGF $99 \pm 9.7\%$, $n=10-15$, ** $P < 0.01$; versus NMDA $105.5 \pm 7.3\%$, $n=10-15$, * $P < 0.05$). Data shown are derived from three independent experiments.

increase the expression level of PSD95 and GluN2B in PSDs compared with control (Figure 2d and e). In contrast, we observed an opposite trend toward a decrease in the level of GluN2A expressed in PSDs with the same treatment (Figure 2d and e). These data further provide the first evidence that VEGFR2 is located at the PSDs in hippocampal neurons (Figure 2d), and therefore supports the contribution of this vascular receptor in the regulation of synaptic transmission through postsynaptic mechanisms. Thus, we confirmed the postsynaptic enrichment in GluNR-2B when NMDA and VEGF receptors are co-activated, in agreement with the VEGF-dependent increase in evoked postsynaptic responses in hippocampal slices.

Postsynaptic accumulation of GluNR-2B results from an increase in surface diffusion

Growing evidence indicate that the regulation of synaptic content in receptors depends on their surface-trafficking properties.²⁷ Thus, we used the single nanoparticle-tracking approach (quantum dots)²⁸ to further investigate whether application of NMDA, VEGF or NMDA in combination with VEGF impacted the surface diffusion and distribution of GluNR-2B receptors in cultured hippocampal neurons. Buffer additions did not affect

the diffusion of GluNR-2B, whereas exposure to NMDA or VEGF alone slowed down the surface mobility of synaptic receptors (Figure 3a-c). However, none of these treatments affected the synaptic content in GluNR-2B (Figure 3d and f). In contrast, combining NMDA and VEGF induced a significant increase in the diffusion of GluNR-2B (Figure 3a-c). This change likely relied on an upregulation of GluNR-2B diffusion properties rather than on an increase in the fraction of mobile receptors (diffusion coefficient $> 0.005 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$; control, 87.1% of mobile GluNR-2B; VEGF+NMDA, 89.6% of mobile GluNR-2B), as attested by the cumulative distributions of diffusion coefficients (Figure 3a). Moreover, this increased surface diffusion of GluNR-2B, associated with an increase in synaptic dwell time (Figure 3e), resulted in the accumulation of receptors at synapses (Figure 3d and f). Thus, by promoting an increase in surface diffusion of GluNR-2B, the co-activation of NMDA and VEGF receptors triggers GluNR-2B redistribution and accumulation at synapses.

VEGF and NMDA-driven signaling pathways

To characterize the molecular mechanisms underlying the synaptic targeting of GluNR-2B, we investigated downstream signaling pathways activated at the PSD by the co-application of

NMDA and VEGF. Given the key role of CaMKII in the postsynaptic expression and surface dynamics of GluNR-2B,^{29–31} we analyzed the expression and activation of the kinase in PSDs purified from treated hippocampal cultures. Our biochemical data confirmed that GluNR activation is instrumental for the autophosphorylation of CaMKII and its translocation to PSD (Figure 4a and b), as previously shown.³² Combined NMDA and VEGF treatment did not show any further increase in the CaMKII phosphorylation levels and the presence of CaMKII at the PSD (Figure 4a and b).

Protein kinase C (PKC) also has a critical role in the regulation of GluNR trafficking by triggering their rapid insertion into the plasma membrane in hippocampal neurons and *Xenopus* oocytes-expressing recombinant GluNRs.^{33–35} Therefore, we isolated PSD fractions derived from treated hippocampal cultures and immunoblotted them for the total PKC γ levels and its phosphorylated (T514) form, required for PKC γ maturation and rate-limiting for its activation.³⁶ Analysis of the phosphorylated to native PKC γ ratio revealed a significant increase following the combined NMDA and VEGF stimulation compared with control conditions, indicating an accumulation of catalytically competent PKC γ at the PSDs (Figure 4a and b). Thus, the acute co-activation of NMDA and VEGF receptors induces a concomitant increase in autonomously active CaMKII and PKC γ at PSD, which is tightly associated with the enrichment of GluNR-2B at synaptic sites.

Synaptic incorporation of AMPA receptors upon co-activation of VEGF and GluNR receptors

Activation of PKC and CaMKII signaling pathways is known to independently increase recruitment of GluA1-expressing AMPA receptors (GluA1-AMPA) to synapses.^{37–39} Given the activation of CaMKII and PKC upon NMDA and VEGF stimulation, we further explored whether this stimulation protocol was also able to promote an enrichment of AMPA receptors at synaptic sites. Thus, we performed a GluA1 surface immunostaining in combination with a selective labeling of synaptic sites in hippocampal neurons. We showed an increase in density of surface GluA1 clusters following the NMDA and VEGF treatment compared with the control condition and the stimulation with VEGF alone (Figure 4c and d). These data strongly suggest an insertion of new GluA1-AMPA into the plasma membrane and a stabilization of the surface receptors already present. To determine whether this increased pool of surface GluA1-AMPA was targeted to synapses, we quantified the co-localization of PSD95 or synapsin-1 with GluA1 clusters. Our results revealed an increased amount of surface GluA1 at synaptic sites upon co-activation of NMDA and VEGF receptors compared with the other conditions (Figure 4d). Altogether, our findings demonstrate that molecular mechanisms known to be involved in LTP, such as PKC and CaMKII activation and AMPAR synaptic insertion,^{35,40} are triggered by VEGF when GluNR are activated.

VEGFR2 conditional knockout mice show impaired hippocampal LTP and fear memory consolidation

The involvement of VEGF in mechanisms underlying LTP raised the possibility that neuronal VEGFR2 may regulate the magnitude of LTP in the hippocampus. A prerequisite for a modulatory action of VEGFR2 during LTP is the availability of VEGF in the neuronal microenvironment. To evaluate this availability, we analyzed endogenous VEGF secretion in acute hippocampal slices from P30–50 old mice with a conditional deletion of VEGFR2 in neural cells, or heterozygous for the VEGFR2 allele, following chemically induced LTP with tetraethylammonium chloride (chemLTP). Levels of VEGF released in the slice microenvironment, which represent the functional fraction, were compared between untreated and tetraethylammonium chloride-treated slices with enzyme-linked immunosorbent assay measurements. Our findings demonstrate an increase in endogenous VEGF release in response

to chemLTP stimulation in both genotypes (Figure 5a). Thus, critical levels of VEGF might be required in the process of LTP.

Next, to explore the role of VEGFR2, we assessed LTP induced by theta burst stimulation of Schaffer collaterals/commissural afferents in CA1 (SC-CA1 synapses) from knockout, heterozygotes and littermate control hippocampal slices. Although LTP was induced under theta burst stimulation in all groups (Figure 5b), the mean fEPSP slope was significantly reduced as soon as 5 min after theta burst stimulation and remained altered 55–60 min after theta burst stimulation in VEGFR2ko mice compared with heterozygotes and control mice (Figure 5b–d). LTP impairments in knockout mice were not due to an alteration in basal synaptic transmission or presynaptic release probability, as we observed no significant differences among the groups in the input output curve (I/O curve) (Figure 5e) and in measurements of PPF (Figure 5f). Consistent with these findings, similar defective LTP was also observed when the tyrosine kinase activity of VEGFR2 was pharmacologically inhibited using PTK787 in control hippocampal slices (Figure 5g–i).

To further assess the relevance of VEGFR2 in LTP induction, we examined the impact of a VEGFR2 deletion specifically in postmitotic neurons of the forebrain using the α CaMKII-Cre transgene to generate conditional VEGFR2ko mice. We first investigated the VEGFR2 immunolabeling pattern in these CaMKII-Cre-floxed mice and validated the loss of neuronal VEGFR2 in the hippocampus (Supplementary Figure S1f). Next, our electrophysiological data confirmed that deletion of VEGFR2 in hippocampal neurons triggers a deficit in SC-CA1 LTP without affecting basal synaptic transmission (Supplementary Figure S6). Overall, our findings demonstrated a requirement for VEGFR2 expression in hippocampal neurons to induce normal LTP.

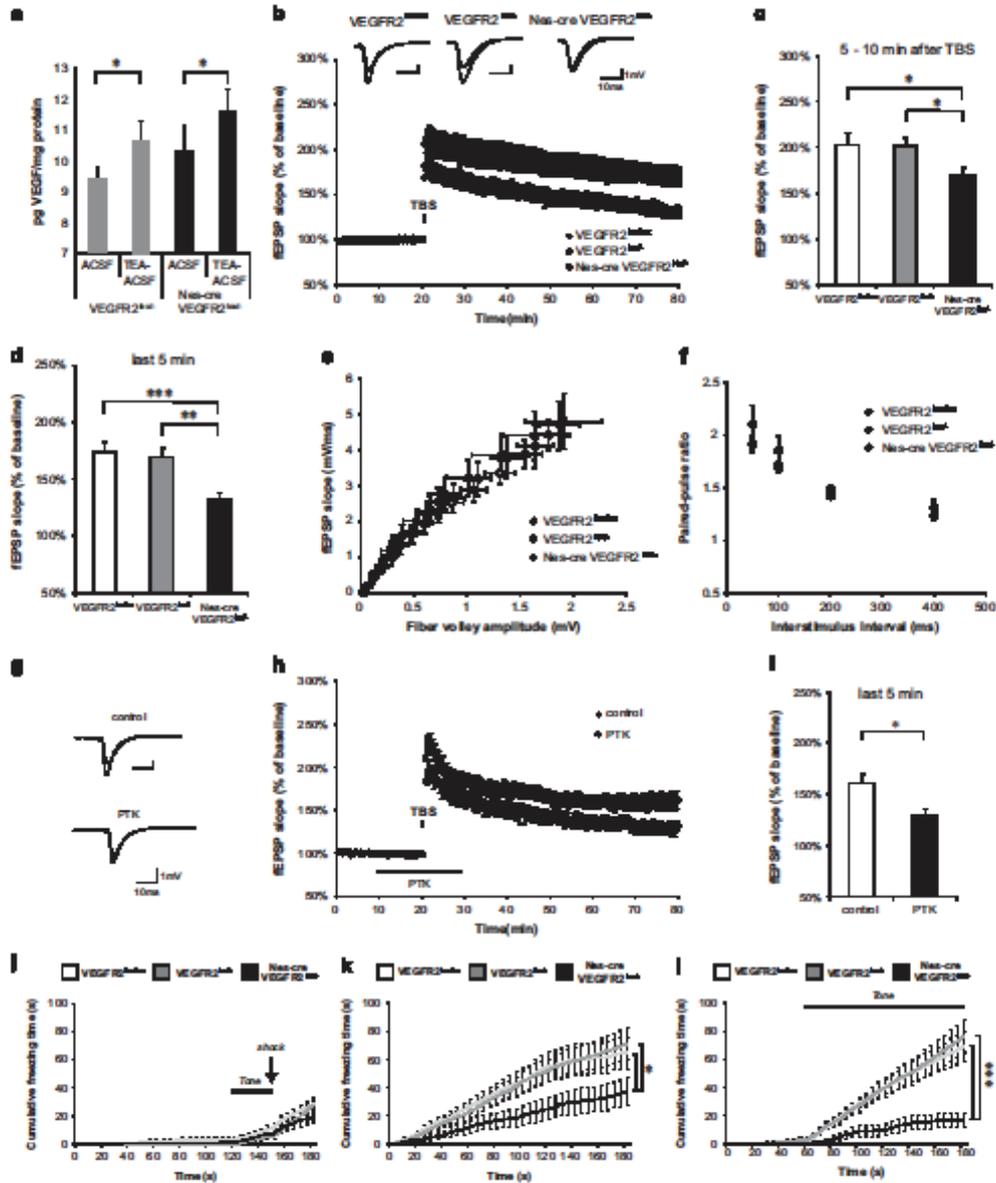
Finally, we examined whether this alteration in hippocampal LTP impacted on hippocampal-dependent emotional memory by studying contextual fear learning. We used a cued fear-conditioning procedure, which allows assessment of both contextual fear learning relying on hippocampus and amygdala functions and cued fear learning, which is only amygdala-dependent. Because amygdala is critically involved in emotion and anxiety in both tests, we first confirmed the neuronal expression of VEGFR2 in this structure in control mice (Supplementary Figure 7a and b). During conditioning, all groups of mice showed a robust increase in freezing time in response to a tone-electrical shock pairing, compared with the period prior to the pairing, and no differences were detected between genotypes (Figure 5j). When tested 24 h later in the same context without tone-electrical shock pairing, VEGFR2ko mice were impaired on this task compared with control and heterozygote mice and spent significantly less time freezing (Figure 5k). In the cued test assessed in a new context with the auditory cue alone, the freezing behavior was increased during the tone for all groups of mice, but VEGFR2ko mice showed again a large reduction in freezing time compared with control and heterozygote mice (Figure 5l). Importantly, the decrease in freezing behavior of VEGFR2ko mice during contextual and cued tests demonstrated that the formation of contextual and cued fear memory is impaired in these mice. Thus, both the amygdala and hippocampal functions might be affected in mice by the loss of VEGFR2 in neural cells.

DISCUSSION

This study demonstrates for the first time that VEGFR2 is required for hippocampal synaptic plasticity and related fear memory and uncovers underlying mechanisms linked to the impact of VEGF on GluNR-mediated synaptic transmission. Based on a combination of single-molecule imaging, biochemical, electrophysiological and behavioral approaches, we have analyzed the synaptic basis of the VEGF action on hippocampal neurons and its contribution to synaptic plasticity and fear memory. Our analysis first shows

that the expression pattern of both VEGF and its receptor VEGFR2 is complementary in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus, consistent with a role for VEGF/VEGFR2 in hippocampal networks. Second, we report a rapid increase in GluNR-mediated currents induced by VEGF in hippocampal neurons that requires the

postsynaptic contribution of GluNR-2B. Further evidence indicates that VEGF triggers the formation of synapses and promotes the surface dynamics and synaptic accumulation of GluNR-2B when NMDA receptors are activated. This enrichment in synaptic GluNR-2B occurs concurrently with an increase in CaMKII and



PKC activation in PSDs. Finally, using conditional inactivation mice models, we have uncovered the requirement for VEGFR2 in hippocampal LTP and consolidation of fear memory.

In a recent study, we documented a VEGF/GluNR link in cerebellar neuronal guidance before synapse formation occurs.¹⁸ The interaction between VEGFR2 and GluNR raised questions about a putative regulatory function that VEGFR2 could have on GluNR dependent neurotransmission. Previous studies have reported that VEGF can regulate the activity of ion channels in endothelial and heterologous cells^{41,42} as well as in hippocampal neurons.^{43,44} VEGF has been shown to either suppress or increase evoked excitatory synaptic transmission in the hippocampus in different contexts.^{19,45,46} Hippocampal synaptic responses to VEGF obtained in adult rodent hippocampal slices differed depending on the concentration and kinetic of the VEGF delivery. Short-term exposure to low doses of VEGF induced a potentiation of synaptic responses,¹⁹ whereas high doses of VEGF applied for a longer period of time resulted in a depression of synaptic transmission.^{45,46} These studies raised intriguing questions about indirect effects of VEGF on neurons involving endothelial or glial cells, which may explain why VEGF can induce opposite changes in synaptic responses. To minimize indirect effects, we investigated the impact of a brief topical application of VEGF on GluNR-mediated synaptic transmission in hippocampal pyramidal cells. VEGF triggered a rapid increase in postsynaptic GluNR currents that requires VEGFR2 expression in hippocampal pyramidal cells, as evidenced by the effect of VEGFR2 pharmacological inhibition and by our results in the neural-specific VEGFR2 conditional knockout. Indirect effects via astrocytes are unlikely because these cells express prominently VEGFR1.⁴⁷ However, we cannot exclude a contribution of the VEGFR2 co-receptors Neuropilin-1 and Neuropilin-2 that have been previously documented to be expressed in hippocampal dendrites and synapses.^{48–50} Consistently, we found that VEGFR2 is localized primarily on the proximal apical dendrite of hippocampal pyramidal cells, at the

postsynaptic densities of excitatory synapses, together with GluNR-2B and the PSD95 scaffolding protein. Notably, the contribution of GluNR-2B to synaptic responses of CA1 pyramidal cells has been shown to be higher for Schaffer collaterals inputs onto proximal dendrites than for the perforant path on distal dendrites.⁵¹

Overall our findings demonstrate that the convergence between VEGF signal and glutamatergic inputs has a key role at hippocampal excitatory synapses in enhancing transmission mediated by GluNR.

The synaptic changes described in this study require a VEGF-dependent increase in targeting of GluNR at synapses. Increasing evidence indicate that synaptic composition of GluNR changes during postnatal development in many brain regions with a progressive decrease in the GluNR2B/GluNR2A subunit ratio.^{11,52,53} In 15 days *in vitro* cultured hippocampal neurons, only 21% of GluNR-2B are located at synapses with a shorter residency time compared with GluNR-2A.⁵² Thus, GluNR-2A could be good candidates for mediating the VEGF-dependent effect on synaptic responses; however, our electrophysiological work demonstrates that in fact GluNR-2B are the major contributor to the postsynaptic effects. We further investigated the underlying mechanism and documented a VEGF and NMDA-driven enrichment in synaptic GluNR-2B and PSD95, combined with the formation of new synaptic sites in hippocampal pyramidal cells.

Our findings are consistent with previous reports suggesting a causal link between synaptic GluNR-2B and synapse formation and plasticity during development.^{54,55} These studies used genetic manipulations designed to overexpress GluNR2A, or replace GluNR2B into GluNR2A, and pointed to the key role of GluNR-2B in hippocampal synaptogenesis and synaptic plasticity, as well as in expression of normal social behavior.^{54–57} This raises the question of how VEGF might trigger such a mobilization of GluNR-2B at synapses. GluNR-2B insertion at synapses is known to be constitutive and independent of glutamatergic synaptic activity,⁵⁸

Figure 5. Hippocampal LTP as well as contextual and cued fear memory are impaired in VEGFR2 conditional knockout mice and upon VEGFR2 inhibition. The three genotypes include control mice or VEGFR2^{lox/lox}, heterozygotes or VEGFR2^{lox/+} and conditional VEGFR2 knockout mice or Nes-cre VEGFR2^{lox/+}. (a) VEGF levels, assessed by Elisa, increased upon chemical LTP induction (tetraethylammonium chloride-artificial cerebrospinal fluid) compared with untreated condition (artificial cerebrospinal fluid) in both heterozygote and knockout adult hippocampal slices (pg VEGF per mg protein from 9.4 ± 0.4 to 10.7 ± 0.7 in VEGFR2^{lox/+} slices, n = 7, paired two-tailed t-test, *P < 0.05; from 10.3 ± 0.8 to 11.7 ± 0.7 in Nes-cre VEGFR2^{lox/+} slices, n = 8, paired two-tailed t-test, *P < 0.05). (b) Representative fEPSP traces showing potentiation for the three indicated genotypes (upper trace: averaged first 5 min of baseline, lower trace: averaged last 5 min, stimulus artifacts were removed). Theta burst stimulation (TBS) of Schaffer collaterals was used to induce LTP and fEPSP responses were recorded in stratum radiatum of CA1 region. (Nes-cre VEGFR2^{lox/+} n = 11 mice (25 slices), VEGFR2^{lox/+} n = 17 mice (36 slices), VEGFR2^{lox/lox} n = 8 mice (15 slices). (c) Shortly (5–10 min) after LTP induction with the TBS protocol the fEPSP was significantly reduced in Nestin-cre VEGFR2^{lox/+} knockout mice compared with heterozygotes and controls (169 ± 9% in Nes-cre VEGFR2^{lox/+} versus 201 ± 10% in VEGFR2^{lox/+} and 203 ± 14% in VEGFR2^{lox/lox}, unpaired two-tailed t-test, *P < 0.05). (d) An even more pronounced reduction in LTP was observed at 55–60 min after TBS (132 ± 6% in Nes-cre VEGFR2^{lox/+} versus 169 ± 8% in VEGFR2^{lox/+} and 174 ± 9% in VEGFR2^{lox/lox}, unpaired two-tailed t-test, **P < 0.01, ***P < 0.001). (e) Input-output curves showing fEPSP slopes at different stimulation intensities (fiber volley amplitude). The three groups of mice showed no significant differences. (f) VEGFR2 knockout slices showed normal paired-pulse facilitation at various interstimulus intervals (50, 100, 200 and 400 ms). No significant differences were obtained among the three genotypes. (g–i) VEGFR2 inhibition in hippocampal LTP. (g) Representative fEPSP traces showing potentiation for wild-type slices untreated and treated with 30 μM PTK787 (upper trace: averaged first 5 min of baseline, lower trace: averaged last 5 min, stimulus artifacts were removed). (h) LTP was induced by TBS stimulation of Schaffer collaterals and fEPSP responses were recorded in stratum radiatum of CA1 region. Hippocampal slices were perfused with 30 μM of the VEGFR2 inhibitor PTK787 (PTK) from 10 min before until 10 min after LTP induction (control n = 7 mice (11 slices), PTK n = 4 mice (7 slices)). (i) LTP magnitude was significantly reduced 55–60 min after TBS in slices treated with PTK (161 ± 10% in control slices vs 130 ± 7% in PTK treated slices, unpaired two-tailed t-test, *P < 0.05). (j–l) Fear-conditioning experiment. Animals were placed in a context and presented with an electrical shock (arrow) paired once with an auditory cue (Tone); data were analyzed using a two-way ANOVA (genotype, time) with n = 12 per genotype. (j) Cumulative freezing time counted during the 3-min conditioning period. There were no significant differences between genotype (F(2,33) = 1.27; P not significant) and all genotypes showed a progressive increase in freezing after the Tone-shock pairing. (k) Cumulative freezing time plotted over time during the 3 min of the context recognition test. There was a significant effect of genotype (F(2,33) = 3.30; *P < 0.05) and Nes-cre VEGFR2^{lox/+} knockout mice showed reduced freezing time compared with heterozygotes and controls (*P < 0.05, Bonferroni post hoc test). (l) Cumulative freezing time during cued testing. There was a significant effect of genotype (F(2,33) = 9.59; **P < 0.001) and only controls and heterozygotes showed a major increase in freezing time during the tone presentation as compared with prior to the tone. Nes-cre VEGFR2^{lox/+} knockout mice exhibited strongly reduced level of freezing compared with heterozygotes and controls (**P < 0.001, Bonferroni post hoc test). ACSF, artificial cerebrospinal fluid; TEA, tetraethylammonium chloride.

but their synaptic trafficking can be promoted through PKC-dependent signaling mechanisms.³⁴ We demonstrated that PKC is involved in the action of VEGF when GluNR are activated, which is consistent with the well-known impact of this kinase on GluNR trafficking and synaptic responses.^{33,34}

The synaptic pool of GluNR is also regulated by the lateral diffusion of these receptors within the membrane between synaptic and extrasynaptic sites.^{52,59} The ability of GluNR to rapidly move between these compartments is linked to their subunit composition, because GluNR2B containing GluNR are the most mobile,⁵² and their lateral diffusion can be increased by synaptic plasticity in young hippocampal neurons.³¹ The activity-driven diffusion of surface GluNR results in an enrichment of GluNR-2A at synapses, whereas GluNR-2B are displaced away from the synapse.^{31,60} Reciprocally, our study demonstrates that VEGF, when combined to NMDA, induces an increase in surface dynamics of GluNR-2B, which leads to their enrichment at synapses. Importantly, this VEGF-dependent mobilization of GluNR-2B at synapses may increase calcium concentration in spines, allowing the modulation of synaptic plasticity.

A major form of synapse strengthening known as LTP critically depends on GluNR-mediated activation in the CA1 region of the hippocampus.^{61,62} LTP triggers a persistent activation of CaMKII via the formation of CaMKII-GluNR2B complexes, which promotes the delivery of new functional GluA1-expressing AMPA receptors to synapses.^{40,54,63–65} Consistently, our data reveal that the increased translocation of active CaMKII to PSD and the post-synaptic enrichment in GluNR-2B upon NMDA and VEGF treatment is associated with membrane insertion and synaptic targeting of GluA1-expressing AMPA receptors. Thus, these results suggest that VEGF signaling might be necessary for LTP in CA1. Although VEGF levels have previously been shown to alter adult hippocampal LTP,^{4,19} direct effect of VEGF via its receptor VEGFR2 expressed in neurons has never been established. The findings reported here demonstrate that genetic ablation of VEGFR2 in neural cells or in neurons, as well as its pharmacological inhibition, impaired adult LTP in CA1 but not basal synaptic transmission or presynaptic short-term plasticity. This impairment in LTP induction could result from the unbalanced subunit composition of GluNR at synapses,^{66–69} with a decreased content in GluNR-2B due to VEGFR2 deficiency. Our findings extended previous work^{4,8} by showing an increase in endogenous VEGF levels upon LTP induction and highlighted the requirement for neuronal VEGFR2 in adult hippocampal LTP, independently of the VEGF impact on neurogenesis and angiogenesis. They further suggest the contribution of VEGFR2 to hippocampal form of learning and memory. Because a causal link between hippocampus-dependent contextual fear memory and a hallmark of LTP has been reported previously,⁷⁰ we used a fear-conditioning paradigm to assess the behavioral relevance of VEGFR2. We now demonstrate that targeted deletion of VEGFR2 compromises the formation of fear memory by combining impairment of hippocampus-dependent contextual fear memory with deficits in amygdala-dependent memory. Contribution of VEGF in emotional memory has previously been documented by showing that upregulated and downregulated VEGF levels in the hippocampus improved and impaired performances, respectively, in the passive avoidance task and in contextual fear memory.⁶⁸ In contrast to our study, these reports used overexpressed soluble VEGFR1⁶⁸ or dominant-negative mutant VEGFR2,⁶ which produce a VEGF trap and does not give a clear insight into the requirement for VEGFR2 in these cognitive processes. Thus, together with these previous reports, our findings strongly indicate that VEGF and VEGFR2, by acting on different limbic networks, have a key role in the regulation of emotional memory.

Increasing evidence indicate that contextual fear learning requires a network interconnecting the hippocampus, the

amygdala and the medial prefrontal cortex,^{71–73} whose dysfunction is linked among other disorders to post-traumatic stress disorder and depression.^{74–76} In these brain areas, increase in LTP has been shown to result from antidepressant treatments and may be instrumental in the antidepressant response.^{77,78} Thus, VEGFR2 dysfunction in these neural networks involved in emotional behavior may attenuate antidepressant response or alternatively promote depression.

In summary, our findings provide new insight into the impact of VEGF on glutamatergic synaptic function and plasticity and further delineate a molecular basis underlying its direct action through VEGFR2 on emotion-related behavior.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Annabelle Bouchardon and Amandine Dusand-Terrason from the Centre Commun de Quantitative (University Lyon 1) and the Microscopy Platform (Grenoble Institut for Neurosciences) for assistance. We are grateful to Carman Ruiz de Almodovar, Fanny Mann, Alain Buisson and Farida B Gaumouch for helpful discussions. This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Lyon Neuroscience Research Center (to CM) and from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (CRC1080 (to AA-P and HU), EXC 115, EXC147 and SFB 834 (to AA-P), Gutenberg Research College (RC) (AA-P); PDR and MB were supported by a doctoral research contract from the French Ministry of Higher Education and Research and LM by a doctoral research contract ADR ARC2 from the "Région Rhône-Alpes".

REFERENCES

- Newton SS, Fournier NM, Duman RS. Vascular growth factors in neuropsychiatry. *Gen Mol Life Sci* 2013; **70**: 1739–1752.
- Clark-Raymond A, Halafis A. VEGF and depression: a comprehensive assessment of clinical data. *J Psychiatr Res* 2013; **47**: 1080–1087.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 4647–4652.
- Greene J, Banasz M, Lee B, Warner-Schmidt J, Duman RS. Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization. *Neuropsychopharmacology* 2009; **34**: 2459–2468.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xia L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 11946–11950.
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D et al. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* 2004; **36**: 827–835.
- Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H et al. Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 2004; **14**: 237–248.
- Li H, Goshen I, Avital A, Krissel T, Zuberik S, Benit R et al. Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 5081–5086.
- Udo H, Yoshida Y, Kino T, Ohnishi K, Mizuno Y, Mukuda T et al. Enhanced adult neurogenesis and angiogenesis and altered affective behaviors in mice overexpressing vascular endothelial growth factor 120. *J Neurosci* 2008; **28**: 14522–14536.
- During MJ, Cao L. VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. *Curr Alzheimer Res* 2006; **3**: 29–33.
- Padrel F, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 2013; **14**: 383–400.
- Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Gold Spring Harb Perspect Biol* 2012; **4**: a005710.
- Bliss TV, Collingridge GL. Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus bridging the divide. *Mol Brain* 2013; **6**: 5.
- Abdallah CG, Saracora G, Duman RS, Krystal JH. Nefopam and rapid-acting antidepressants: a window into a new neurobiology for mood disorder therapeutics. *Annu Rev Med* 2015; **66**: 509–523.

- 15 Kang HJ, Volkert B, Hajszan T, Rajkowska G, Stodmeier CA, Licznieski P et al. Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat Med* 2012; **18**: 1413–1417.
- 16 Yuan EF, Wei J, Liu W, Zhong P, Li X, Yan Z. Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron* 2012; **73**: 962–977.
- 17 Ruiz de Almodovar C, Coulon C, Sain PA, Knowles E, Chouinardmount N, Poesen K et al. Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *J Neurosci* 2010; **30**: 15052–15066.
- 18 Malsinelli C, Ruiz de Almodovar C, Khewek E, Coulon C, Chouinardmount N, Sagara I et al. VEGF modulates NMDA receptors activity in cerebellar granule cells through Src-family kinases before synapse formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 13782–13787.
- 19 Kim BW, Choi M, Kim YS, Park H, Lee HR, Yun CO et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin. *Cell Signal* 2009; **21**: 714–725.
- 20 Duman RS, Aghajanian GK. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* 2012; **338**: 68–72.
- 21 Trencle F, Kellandsonk C, Kretz O, Gas P, Anlag K, Orban PC et al. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 1999; **23**: 90–103.
- 22 Minichiello L, Korem M, Wolfen D, Rahn R, Ursicker K, Costal V et al. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 1999; **24**: 401–414.
- 23 El Gaamouch F, Buisson A, Moustie O, Lamiaux M, Labrecque S, Bontempi B et al. Interaction between alphaCaMKII and GluN2B controls ERK-dependent plasticity. *J Neurosci* 2012; **32**: 10767–10779.
- 24 Lee JS, Jang DJ, Lee N, Ko HG, Kim H, Kim YS et al. Induction of neuronal vascular endothelial growth factor expression by cAMP in the dentate gyrus of the hippocampus is required for antidepressant-like behaviors. *J Neurosci* 2009; **29**: 8493–8505.
- 25 Nayton J, Paolletti P. Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach. *J Neurosci* 2006; **26**: 1331–1333.
- 26 Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, Dumalska J, Salyha Y, Ben-Ari Y et al. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 2006; **572**: 789–798.
- 27 Bard L, Groc L. Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor. *Mol Cell Neurosci* 2011; **48**: 298–307.
- 28 Groc L, Choquet D. Measurement and characteristics of neurotransmitter receptor surface trafficking (Review). *Mol Membr Biol* 2009; **21**: 344–352.
- 29 Coultrap SJ, Bayer KL. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci* 2012; **35**: 607–618.
- 30 Sanz-Clemente A, Gray JA, Ogilvie KA, Nicoll RA, Roche KW. Activated CaMKII couples GluN2B and casein kinase 2 to control synaptic NMDA receptors. *Cell Rep* 2013; **3**: 607–614.
- 31 Dupuis JP, Ladepêche L, Seth H, Bard L, Vanla J, Mikasova L et al. Surface dynamics of GluN2B-NMDA receptors controls plasticity of maturing glutamate synapses. *EMBO J* 2014; **33**: 842–851.
- 32 Stack S, Gilman RJ. Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 1998; **273**: 20689–20692.
- 33 Lan JY, Skabardis VA, Jovic T, Grooms SY, Lin Y, Aroneda RC et al. Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat Neurosci* 2001; **4**: 382–390.
- 34 Lau CG, Takayasu Y, Rodenas-Ruano A, Paternain AV, Lama J, Bennett MV et al. SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. *J Neurosci* 2010; **30**: 242–254.
- 35 Yan JZ, Xu Z, Ren SQ, Hu B, Yao W, Wang SH et al. Protein kinase C promotes N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor trafficking by indirectly triggering calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) autophosphorylation. *J Biol Chem* 2011; **286**: 25187–25200.
- 36 Newton AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 2001; **101**: 2353–2364.
- 37 Zhu JJ, Malinow R. Acute versus chronic NMDA receptor blockade and synaptic AMPA receptor delivery. *Nat Neurosci* 2002; **5**: 513–514.
- 38 Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Estaban J, Huganir RL, Malinow R. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* 2006; **51**: 213–225.
- 39 Opazo P, Labrecque S, Tiganis CM, Frouin A, Wiseman PW, De Koninck P et al. CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* 2010; **67**: 239–252.
- 40 Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2002; **25**: 103–126.
- 41 Fehling M, Koch ED, Rätzl J, Tischer G, Walzenberger J. Vascular endothelial growth factor-A activates Ca2+-activated K+ channels in human endothelial cells in culture. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; **33**: 337–346.
- 42 Chang HW, James AF, Foster RR, Hancock JC, Bates DG. VEGF activates receptor-operated cation channels in human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**: 1768–1776.
- 43 Xu JY, Zhang P, Shan DH, Yang SZ, Zhang LM, Huang YL et al. Vascular endothelial growth factor inhibits outward delayed-rectifier potassium currents in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuroscience* 2009; **118**: 59–67.
- 44 Sun GC, Ma YY. Vascular endothelial growth factor modulates voltage-gated Na(+) channel properties and depresses action potential firing in cultured rat hippocampal neurons. *Biol Pharm Bull* 2013; **36**: 548–555.
- 45 McCloskey DP, Croll SD, Scharfman HE. Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. *J Neurosci* 2005; **25**: 8889–8897.
- 46 Cammalleri M, Martini D, Rizzari C, Timperio AM, Bagnoli P. Vascular endothelial growth factor up-regulation in the mouse hippocampus and its role in the control of epileptiform activity. *Eur J Neurosci* 2011; **33**: 482–498.
- 47 Wittko-Schneider M, Schneider FT, Platz KH. Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2 are two unequal brothers in mind. *Cell Mol Life Sci* 2013; **270**: 1705–1725.
- 48 Sahay A, Kim CH, Septury JP, Cho E, Huganir RL, Grety DD et al. Secreted semaphorins modulate synaptic transmission in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2005; **25**: 3613–3620.
- 49 Bouafouh F, Daoudal G, Falk J, Debame D, Raouf G, Castellani V. Semaphorin-3A regulates synaptic function of differentiated hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 2006; **23**: 2247–2254.
- 50 Tran TS, Rubio ME, Clem RL, Johnson D, Case L, Tessier-Lavigne M et al. Secreted semaphorins control spine distribution and morphology in the postnatal CNS. *Nature* 2009; **462**: 1065–1069.
- 51 Arigoni E, Greene RW, Schaffer collateral and perforant path inputs activate different subtypes of NMDA receptors on the same CA1 pyramidal cell. *Br J Pharmacol* 2004; **142**: 317–322.
- 52 Groc L, Haine M, Coussin S, Stephenson FA, Lounis B, Cognat L et al. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 18769–18774.
- 53 Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; **8**: 413–426.
- 54 Barria A, Malinow R. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 2005; **48**: 289–301.
- 55 Gambill AC, Barria A. NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synaptic stabilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 5855–5860.
- 56 Wang CC, Held RG, Chang SC, Yang L, Dalpino E, Ghosh A et al. A critical role for GluN2B-containing NMDA receptors in cortical development and function. *Neuron* 2011; **72**: 789–805.
- 57 Cui Z, Feng R, Jacobs S, Duan Y, Wang H, Cao X et al. Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Sci Rep* 2013; **3**: 1036.
- 58 Barria A, Malinow R. Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 2002; **35**: 345–353.
- 59 Tovar KR, Westbrook GL. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 2002; **34**: 255–264.
- 60 Bellone C, Nicoll RA. Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron* 2007; **55**: 779–785.
- 61 Choi A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 2008; **33**: 18–41.
- 62 Nicoll RA, Roche KW. Long-term potentiation: peeling the onion. *Neuropharmacology* 2013; **74**: 18–22.
- 63 Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 2012; **13**: 169–182.
- 64 Bredt DS, Nicoll RA. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 2003; **40**: 361–379.
- 65 Lu W, Iwasaki K, Roche KW, Nicoll RA. Synaptic targeting of AMPA receptors is regulated by a CaMKII site in the first intracellular loop of GluA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 22266–22271.
- 66 Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kirschner GA, Zhuo M et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 1999; **401**: 63–69.
- 67 Gardoni F, Maccioni D, Malinow R, Pelli F, Costa C, Tazzi A et al. Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci* 2009; **29**: 669–677.
- 68 Brigen J, Wright T, Talani G, Prasad-Mulcare S, Jinde S, Seabold GK et al. Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J Neurosci* 2010; **30**: 4590–4600.

- 69 Shipton OA, Paulsen O. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *PNAS Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; **369**: 20130163.
- 70 Matsuo N, Rajjems L, Mayford M. Spine-type-specific recruitment of newly synthesized AMPA receptors with learning. *Science* 2008; **319**: 1104–1107.
- 71 Maren S, Phan KL, Liberson I. The consensual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci* 2013; **14**: 417–428.
- 72 Zilfowsky M, Hasman S, Chavira MK, Barnes CA, Fanselow MS. Neuronal ensembles in amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex track differential components of contextual fear. *J Neurosci* 2014; **34**: 8462–8466.
- 73 Gilmartin MR, Bakkersten N., Helmstetter FJ. Prefrontal cortical regulation of fear learning. *Trends Neurosci* 2014; **37**: 455–464.
- 74 Shin LM, Liberson I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* 2010; **35**: 169–191.
- 75 Sotres-Bayon F, Sierra-Mercado D, Pandilla-Dalgado E, Quirk GJ. Gating of fear in prefrontal cortex by hippocampal and amygdala inputs. *Neuron* 2012; **76**: 804–812.
- 76 Raman BK, Rasmussen AM, Koenen KC, Shin LM, Orr SP, Gilbertson MW et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Neurosci* 2012; **13**: 769–787.
- 77 Wang JW, David DJ, Mondtson JE, Battaglia F, Han R. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci* 2008; **28**: 1374–1384.
- 78 Karpova NN, Pickenhagen A, Lindholm J, Tiraboschi E, Kulskaya N, Agustsdottir A et al. Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science* 2011; **334**: 1731–1734.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on the Molecular Psychiatry website (<http://www.nature.com/mp>)