



HAL
open science

Rôle des récepteurs P2X4 dans la dégradation d'ApoE : implication dans la maladie d'Alzheimer

Jennifer Hua

► **To cite this version:**

Jennifer Hua. Rôle des récepteurs P2X4 dans la dégradation d'ApoE : implication dans la maladie d'Alzheimer. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTT021 . tel-02464816

HAL Id: tel-02464816

<https://theses.hal.science/tel-02464816>

Submitted on 3 Feb 2020

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

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

THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé spécialité Neurosciences

École doctorale CBS2 (Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé)

Unité de recherche Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF)

Rôle des récepteurs P2X4 dans la dégradation d'ApoE : implication dans la maladie d'Alzheimer

Présentée par Jennifer Hua

Le 6 Novembre 2019

Sous la direction de Lauriane Ulmann

Devant le jury composé de

[Dr. Sonia Garel, Directeur de Recherche, IBENS, Paris]

[Dr. Cecile Delarasse, Chargé de Recherche, Institut de la vision, Paris]

[Dr. Eric Boué-Grabot, Directeur de Recherche, IMN, Bordeaux]

[Dr. Lauriane Ulmann, Maître de Conférence Universitaire, IGF, Montpellier]

[Rapporteur]

[Rapporteur]

[Président du jury]

[Directrice de thèse]



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

A mes frères,

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dr. Sonia Garel, Dr. Cécile Delarasse et Dr. Eric Boué-Grabot d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et pour l'honneur qu'ils m'ont fait en participant à ce jury.

Je remercierai ensuite ma directrice de thèse, Lauriane, pour m'avoir encadré et fait confiance avec ce projet. Merci de m'avoir supporté, moi et mon bras cassé, mes trains retardés et mes avions annulés. Merci à François de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans cette équipe. Merci pour toutes ces discussions scientifiques mais également pour ces batailles de nerf, même si mon œil n'a pas le même point de vue. Merci à tous les autres membres de l'équipe. Merci à Nathalie pour toutes ces cellulesensemencées, pour ce bureau qui m'a permis d'écrire ma thèse chez moi et pour tous ces conseils de travaux pratiques. Merci à Hélène de m'avoir expliqué le FACS et pour tous ces échanges chou contre chocolat, le meilleur deal de la planète. Merci Anne-Laure, parce que tu t'imagines être dans le tube qu'on passe au vortex. Merci à Vincent pour ces synaptosomes et surtout ces lancés d'ampoules. Un jour, la vitre cèdera. Je remercie également tous ceux qui ont été de passage au labo, et particulièrement Eloïse, qui a participé à ce projet.

Je remercierai bien évidemment Matthias, ce thésard et ami bien unique en son genre. Merci de m'avoir diverti tant de fois avec tes histoires de vie, qui mériteraient bien d'être adaptées en sitcom. Je suis sûre que la vie californienne te réserve autant d'aventures. Merci pour toutes ces discussions, rarement scientifiques, ainsi que pour toutes ces soirées, souvent trop arrosées. Merci de m'avoir fait découvrir la vie montpelliéraine. Tu as rendu cette thèse plus qu'amusante. Merci pour bien des choses Matthias, je ne sais pas si tu réalises à quel point tu as impacté ma thèse.

Merci à Tanguy Maurice et Lucie Crouzier, d'avoir réalisé les tests de Hamlet. Merci à tous les services communs de l'IGF ainsi qu'à la plateforme MRI, et surtout à Amélie pour toutes ces heures de FACS. Je maîtriserai bientôt l'alphabet.

Merci à toute la bande de thésards de l'IGF pour toutes ces bières du jeudi et du vendredi, et du mardi et du mercredi... Merci à Antoine pour ces soirées à deux et ces Tohu Bohu. Il me tarde de voir cette appli de musique. Plus particulièrement un grand merci à Laura et Pauline

pour tous ces cafés, ces soirées filles et ces conversations GIF. Merci de m'avoir montré que les « sushis » pouvaient aussi être bons dans ce pays et de m'avoir entraîné dans le bitchage. Je ne saurais imaginer ce qu'aurait été cette dernière année sans vous deux, et je suis heureuse de ne pas avoir eu à la vivre.

Je n'oublie évidemment pas l'Asso CBS2. Alexandra et Laetitia, je ne connais pas de meilleures personnes avec qui diriger le bureau de cette asso. Merci également à Sarah et Charlotte pour toutes ces soirées. C'est toujours un plaisir de voir des gens autant aimer la bière.

Merci aux argonautes, tous autant qu'ils sont, pour toutes ces soirées à chaque fois que je rentrais à Paris. Ces petites pauses dans la thèse ont été essentielles à son bon déroulement. Malgré les différents chemins empruntés par chacun, c'est toujours un plaisir de se retrouver autour d'une bière, d'un repas, d'un week-end en Normandie, ou même des vacances dans les caraïbes. Peu importe où je serais dans les prochaines années, j'espère qu'on pourra toujours se retrouver.

Merci à Alex, qui est bien plus qu'un simple argonaute. Je ne te remercie pas d'avoir choisi une telle date pour ton mariage même si j'ai apprécié ces vacances au Vietnam pendant ma rédaction de thèse. J'ai été ravie de pouvoir participer à ce jour si important pour vous et vous souhaite bien évidemment tout le bonheur du monde.

Je ne saurais évidemment oublier de remercier Matt. Merci d'avoir essayé de comprendre mon sujet tant de fois, pour les messages envoyés à n'importe quelle heure de la journée quand je n'avais pas envie de travailler, pour tous ces week-ends qui m'ont permis de souffler. Merci pour tous ces voyages extraordinaires remplis de bons souvenirs. Merci d'avoir été présent durant cette thèse mais aussi durant ces dix dernières années. De nouvelles aventures nous attendent et même si notre prochaine destination reste indéfinie, je suis sûre qu'on vivra d'extraordinaires moments.

Enfin et surtout, je tiens à remercier ma famille, qui a toujours été plus que présente. Merci à mes parents pour tous ces bons petits plats préparés à chaque fois que je rentrais ; à mes frères pour les 72 messages inutiles chaque jour et pour la relecture de cette thèse. Merci pour votre soutien tout au long de cette thèse mais également pendant les 24 années précédentes. Tout cela n'aurait pas été possible sans vous et il n'y aura jamais assez de mots ou de gestes pour vous montrer ma reconnaissance.

Tables des matières

<i>Liste des abréviations</i>	i
<i>Liste des figures</i>	iii
INTRODUCTION	1
1 La signalisation purinergique	2
1.1 L'ATP : au-delà de la molécule énergétique, un messenger chimique	2
1.1.1 Découverte et structure de l'ATP	2
1.1.2 L'ATP, un messenger chimique	2
1.2 Les récepteurs purinergiques	4
1.2.1 Les récepteurs P1 de l'adénosine	4
a) Structure des récepteurs de l'adénosine	4
b) Localisation et rôles dans le CNS	4
1.2.2 Les récepteurs métabotropiques P2Y	5
a) Structure des récepteurs P2Y	6
b) Rôle dans le SNC	6
1.2.3 Les récepteurs ionotropiques P2X	7
a) Structure des récepteurs P2X	7
b) Adressage à la membrane et recyclage	11
c) Fonctionnalité du récepteur	12
d) Pharmacologie de récepteurs P2X	16
e) Rôle dans le système nerveux central	18
f) Rôles dans les pathologies du système nerveux	22
1.2.4 Focus sur P2X4R : propriétés et spécificités	26
a) Propriétés générales	26
b) Pharmacologie	28

c) Les modèles murins d'étude de P2X4R.....	30
2 Les microglies et les récepteurs purinergiques.....	31
2.1 Les microglies, cellules immuno-compétentes du CNS.....	31
2.1.1 Origine des microglies	31
a) Découverte et première description	31
b) Origine des microglies.....	32
2.1.2 Les microglies à l'état homéostatique.....	32
a) Rôle des microglies dans l'élimination des synapses au cours du développement	33
b) Les microglies dans la plasticité synaptique et l'apprentissage dans le CNS adulte	33
2.1.3 Réactivité microgliale	34
a) Activation des microglies	34
b) Changement de morphologie.....	35
c) Profils d'activation des microglies	36
d) Fonctions de la microglie activée	36
2.1.4 Les marqueurs microgliaux.....	38
2.1.5 Les microglies au cours du vieillissement	39
2.1.6 Les microglies dans les maladies neurodégénératives.....	39
2.2 Les récepteurs purinergiques dans la microglie	40
2.2.1 Les récepteurs P2Y microgliaux.....	41
a) P2Y6R.....	41
b) P2Y12R	41
c) P2Y13R.....	42
2.2.2 Les récepteurs P2X dans la microglie.....	42
a) P2X7R.....	42
b) P2X4R	45

3	La maladie d'Alzheimer	48
3.1	Découverte de la pathologie	48
3.2	Caractéristiques pathologiques de la MA	49
3.2.1	Aspects cliniques	49
3.2.2	Caractéristiques histologiques	50
3.3	Mécanismes pathologiques.....	53
3.3.1	L'hypothèse amyloïde.....	53
3.3.2	L'hypothèse Tau	56
3.4	Formes génétiques et facteurs de risques	57
3.4.1	Formes génétiques de la maladie d'Alzheimer	58
3.4.2	L'Apolipoprotéine E, facteurs de risques de la MA	58
3.5	Modèles murins de la MA	61
3.5.1	Les modèles amyloïdes	61
3.5.2	Les modèles Tau	62
3.5.3	Les triples mutants, arborant pathologie amyloïde et Tau.....	63
3.6	Inflammation et microglie dans la maladie d'Alzheimer	63
3.6.1	Inflammation au cours de la pathologie.....	63
3.6.2	Les microglies dans la pathologie.....	65
	a) Réactivité microgliale	65
	b) Les «Disease-associated microglia »	69
	c) Modulation des microglies dans des modèles murins de la MA	70
3.6.3	Les facteurs de risque microgliaux	71
	a) L'Apolipoprotéine E.....	71
	b) TREM2, Triggering receptor expressed on myeloid cell 2	72
3.7	Les récepteurs purinergiques microgliaux dans la maladie d'Alzheimer.....	74
3.7.1	Les récepteurs P2Y microgliaux dans la maladie d'Alzheimer.....	75

a) P2Y6R microglial dans la maladie d'Alzheimer	75
b) P2Y12R dans la maladie d'Alzheimer	75
3.7.2 Les récepteurs P2XR microgliaux dans la maladie d'Alzheimer	75
a) P2X7R dans la maladie d'Alzheimer.....	75
b) P2X4R dans la maladie d'Alzheimer	76
MATERIELS ET METHODES	77
1 Animaux	78
1.1 Génération des souris P2X4R-KO.....	78
1.2 Les souris APP/PS1 et APP/PS1xP2X4R-KO	78
1.3 Les souris Cathepsine B-KO	79
2 Tissus humain.....	79
3 Expériences comportementales	79
3.1 La piscine de Morris	79
3.2 Le test du Hamlet.....	80
4 Culture cellulaire	81
4.1 Culture et transfection des cellules COS-7.....	81
4.2 Culture de macrophages	81
4.3 Traitement pharmacologique.....	81
5 Biochimie	82
5.1 Préparation des extraits cellulaires de COS-7 et macrophages	82
5.2 Préparation des extraits cellulaires de cortex	82
5.3 Préparation des extraits de synaptosomes	82
5.4 Western Blot.....	83
6 ELISA Aβ.....	84
7 Immunofluorescence	84
7.1 Immunofluorescence sur culture de macrophages.....	84

7.2	Immunofluorescence sur coupe de cerveau.....	84
7.3	Immunofluorescence sur coupe de cortex humain	85
8	Quantification par immunofluorescence	85
8.1	Quantification des plaques amyloïdes	85
8.2	Quantification microgliale.....	86
9	Marquage Golgi.....	86
10	Mesure de l'activité de la cathepsine B <i>in vitro</i>	87
10.1	Mesure en lecture de plaques.....	87
10.2	Mesure en microscopie.....	87
11	Cytométrie et tri cellulaire.....	87
12	Statistiques.....	88
	RESULTATS.....	90
	Contexte de l'étude	91
1	Caractérisation des effets de P2X4 sur ApoE <i>in vitro</i>	94
1.1	Etude de la spécificité de P2X4R	94
1.2	Etude de l'activité de P2X4R	95
1.3	Etude de la dégradation d'ApoE dans les macrophages.....	95
1.3.1	Les protéases à cystéine	97
1.3.2	Etude de la cathepsine B.....	100
	a) Localisation subcellulaire de la cathepsine B	100
	b) Analyse de l'activité enzymatique de la cathepsine B	102
1.3.3	Etude de l'expression d'ApoE dans les cellules Cathepsine B-KO.....	104
2	Caractérisation de la maladie d'Alzheimer dans les souris P2X4R-KO ..	105
2.1	Etude des performances mnésiques	105
2.1.1	La piscine de Morris	105
2.1.2	Le test du Hamlet.....	107

2.1.3	Performances locomotrices	109
2.2	Etude de la charge amyloïde.....	110
2.2.1	Quantification des plaques amyloïdes	110
2.2.2	Quantification du peptide A β soluble	111
2.3	Caractérisation synaptiques	113
2.3.1	Quantification des épines dendritiques par marquage Golgi.....	113
2.3.2	Etudes de marqueurs synaptiques	114
2.4	Etude des microglies.....	115
2.4.1	Localisation de P2X4R dans le cortex	115
2.4.2	Caractérisation des microglies réactives	116
3	Etude de P2X4R et d'ApoE dans la MA.....	118
3.1	Expression d'ApoE dans le cortex de souris APP/PS1	120
3.1.1	Localisation d'ApoE dans le cortex de souris APP/PS1.....	120
3.1.2	Expression d'ApoE dans les souris APP/PS1	121
3.2	Mise en relation avec la pathologie humaine	122
3.2.1	Etude de P2X4R et ApoE dans le cortex de patient.....	122
3.2.2	Etude des différentes isoformes d'ApoE	122
	DISCUSSION	125
1	Rôle de P2X4R dans la dégradation d'ApoE	126
1.1	Spécificité de l'implication de P2X4R dans l'augmentation d'ApoE.....	126
1.2	Implication de la cathepsine B dans la dégradation d'ApoE.....	126
1.2.1	Implication des protéases à cystéine	127
1.2.2	Implication d'autres enzymes ?	128
1.3	Implication de P2X4R dans la dégradation d'ApoE	129
2	Modulation d'ApoE chez les souris APP/PS1	130
2.1	Expression d'ApoE dans les souris APP/PS1xKO.....	131

2.2	Implication de P2X4R dans la maladie d'Alzheimer	132
2.3	Modulation d'ApoE, amélioration du phénotype ?	133
2.3.1	Modulation d'ApoE	133
2.3.2	Modulation de la cathepsine B.....	134
3	Etudes de la maladie d'Alzheimer chez les APP/PS1xKO : limites et considérations	136
3.1	De nouveaux phénotypes chez les souris P2X4R-KO.....	136
3.2	Implication de P2X4R microglial ou neuronal ?	136
3.3	Limites du modèle d'études de la pathologie	137
3.3.1	Les limites du modèles APP/PS1	137
3.3.2	Les limites du test de la piscine de Morris.....	138
3.3.3	Les limites de la caractérisation synaptique.....	138
4	Mise en relation avec la pathologie humaine	139
	Conclusion générale.....	141
	BIBLIOGRAPHIE.....	142

Liste des abréviations

ABCA1	ATP-binding cassette A1
ADP	Adenosine diphosphate
AICD	APP intracellular domain
AMP	Adenosine monophosphate
AMPC	Adenosine monophosphate cyclique
APP	β -amyloid precursor protein
APP	β -amyloid precursor protein
ATP	Adenosine triphosphate
BBG	Brillant blue G
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMDM	Bone marrow-derived macrophage
CatB	Cathepsine B
CFA	Complete Freund's adjuvant
CI-I	Inhibiteur de calpaïne I
CI-II	Inhibiteur de calpaïne II
CI-III	Inhibiteur de calpaïne III
COX	Cyclooxygénase
CSF-1R	Colony-stimulating factor receptor
DAM	Disease-associated microglia
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
EC ₅₀	Half maximal effective concentration
ECE	Endothelin-Converting Enzyme
EPSC	Excitatory post-synaptic current
FGF	Fibroblast growth factor
FRET	Förster resonance energy transfer
GWAS	Genome-wide associated studies
IDE	Insulin-degrading Enzyme
IGF-I	Insulin-like growth factor I
IL-1 β	Interleukin 1 β
IVM	Ivermectine
KO	Knock-out

Liste des abréviations

LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LTP	Long-term potentiation
MA	Maladie d'Alzheimer
MGNd	Microglie de phénotype neurodégénératif
MP	Maladie de Parkinson
NANC	Non adrenergique non cholinergique
NGF	Nerve growth factor
NLRP3	NOD-LRR-and pyrin domain-containing protein 3
NO	Oxyde nitrique
PGE2	Prostaglandine 2
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PNI	Lésion de nerf périphérique
PSEN	Presenilin
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Reactive oxygen species
sAPP α	Soluble APP α
sAPP β	Soluble APP β
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SNC	Système nerveux central
TM	Transmembrane domain
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cell 2
α CTF	α carboxy-terminal fragment
β CTF	β carboxy-terminal fragment

Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'adénosine triphosphate (ATP).....	2
Figure 2 : Les récepteurs purinergiques.....	4
Figure 3 : Structure des récepteurs P2X.....	8
Figure 4 : Changement de conformation des récepteurs P2X suite à la liaison de l'ATP.....	13
Figure 5 : Désensibilisation des P2XR.....	15
Figure 6 : Rôles des P2XR post-synaptiques.....	21
Figure 7 : Mode d'action de P2X4R dans la douleur neuropathique.....	24
Figure 8 : Représentation des gènes <i>p2rx4</i> mutés des modèles knock-out.....	30
Figure 9 : Schéma des différentes morphologies des microglies au cours de leur activation .	36
Figure 10 : Schéma de l'activation de l'inflammasome NLRP3.....	43
Figure 11 : Histopathologie de la maladie d'Alzheimer.....	51
Figure 12 : Clivage de l'APP.....	54
Figure 13 : Agrégation du peptide A β	55
Figure 14 : Les microglies au cours de la maladie d'Alzheimer.....	69
Figure 15 : Génération de la mutation sur le gène <i>p2rx4</i>	78
Figure 16 : Le dispositif du test du Hamlet.....	80
Figure 17 : Tri des microglies par FACS.....	88
Figure 18 : Interaction entre P2X4R et ApoE.....	92
Figure 19 : Augmentation d'ApoE dans des cultures de BMDM et de microglies provenant de souris P2X4R-KO.....	93
Figure 20 : Effet spécifique de P2X4R sur l'augmentation d'ApoE.....	94
Figure 21 : Diminution d'ApoE dans les cellules transfectées avec P2X4R-K69A-HA, un mutant d'activité.....	95
Figure 22 : Augmentation d'ApoE dans les BMDM WT traités avec un inhibiteur de protéases à cystéine.....	96

Liste des figures

Figure 23 : Augmentation d'ApoE dans des BMDM WT traités avec des inhibiteurs de calpaïnes II	98
Figure 24 : Absence d'effet lors de l'inhibition des cathepsines L et S.....	99
Figure 25 : Augmentation d'ApoE dans des BMDM traités avec un inhibiteur de cathepsine B	100
Figure 26 : Expression d'ApoE, de la cathepsine B et de P2X4R dans les lysosomes des BMDM.....	101
Figure 27 : Diminution de l'activité de la cathepsine B dans les BMDM P2X4R-KO.....	103
Figure 28 : Expression identique de la cathepsine B dans les BMDM WT et P2X4R-KO...	103
Figure 29 : Augmentation d'ApoE dans les BMDM Cathepsine B-KO	104
Figure 30 : Amélioration des performances mnésiques chez les souris APP/PS1xKO dans le test de la piscine de Morris	106
Figure 31 : Amélioration des performances mnésiques chez les souris APP/PS1xKO dans le test du Hamlet	108
Figure 32 : Performances locomotrices en champs ouvert	110
Figure 33 : Nombre et taille des plaques amyloïdes identiques entre les APP/PS1 et APP/PS1xKO.....	111
Figure 34 : Diminution du peptide A β soluble chez les APP/PS1xKO.....	112
Figure 35 : Nombre d'épines dendritiques corticales identique entre les APP/PS1 et les APP/PS1xKO.....	113
Figure 36 : Quantification des marqueurs synaptiques NR1A et PSD95	114
Figure 37 : Localisation de P2X4R dans les lysosomes des microglies réactives.....	116
Figure 38 : Aire microgliale autour des plaques amyloïdes identique entre les APP/PS1 et APP/PS1xKO.....	118
Figure 39 : Localisation d'ApoE dans le cortex de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO	119
Figure 40 : Localisation d'ApoE dans les lysosomes des microglies de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO.....	120

Figure 41 : Augmentation d'ApoE dans les microglies corticales de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO	121
Figure 42 : Localisation de P2X4R et d'ApoE dans le cortex de patients atteints de la maladie d'Alzheimer	123
Figure 43 : Diminution d'ApoE dans les cellules COS-7 transfectées avec P2X4R et l'isoforme ApoE- ϵ 3	124
Tableau 1 : Les récepteurs métrabotropiques purinergiques	5
Tableau 2 : Caractéristiques et pharmacologie des P2XR	17
Tableau 3 : Exemples de signaux et de modulateurs de l'activation microgliale.....	35
Tableau 4 : Liste des agents pharmacologiques utilisés en culture cellulaire.....	82
Tableau 5 : Tableau des anticorps utilisés pour les expériences de Western Blot.....	83
Tableau 6 : Tableau des anticorps utilisés en immunofluorescence	86
Tableau 7 : Tableau résumant les Ki des inhibiteurs de calpaine I et II pour différentes protéases.....	97

INTRODUCTION

1 La signalisation purinergique

1.1 L'ATP : au-delà de la molécule énergétique, un messenger chimique

1.1.1 Découverte et structure de l'ATP

L'adénosine triphosphate (ATP) est une molécule énergétique commune à tous les êtres vivants et représente la principale source d'énergie pour la majorité des fonctions cellulaires. Elle a été découverte en 1929 par le biochimiste Karl Lohmann et parallèlement par Cyrus Fiske et Yellapraga Subbarao¹. C'est cependant l'Allemand Fritz Albert Lipmann qui évoque l'ATP comme intermédiaire dans les réactions libérant et consommant de l'énergie².

L'ATP est une molécule composée d'une adénine liée à un ribose, formant ainsi une adénosine, et de trois groupements phosphate (Figure 1). Elle est synthétisée à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi), principalement dans les mitochondries pendant la phosphorylation oxydative mais également dans le cytoplasme au cours de la glycolyse. L'hydrolyse de la liaison phosphoanhydrique reliant le phosphate β et γ est une réaction chimique exergonique, libérant ainsi une grande quantité d'énergie nécessaire aux diverses fonctions cellulaires.

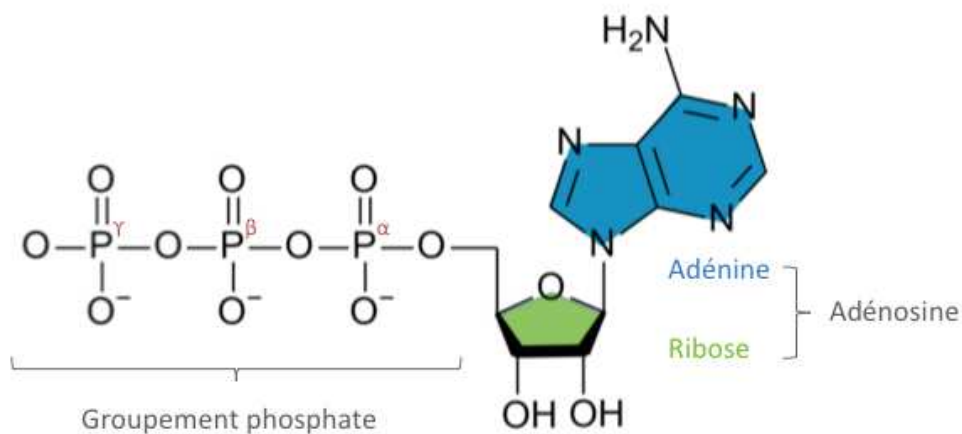


Figure 1 : Structure de l'adénosine triphosphate (ATP)

1.1.2 L'ATP, un messenger chimique

L'hypothèse d'un rôle autre qu'énergétique de l'ATP est apparue tôt, en 1929, lorsque Drury et Szent Gyorgyi montrent la sensibilité des cellules des muscles lisses et cardiaques à des composés purinergiques³. Suite à cette étude, de nombreux travaux montrent l'effet de l'ATP et de l'adénosine sur le système cardiaque^{4,5} et Emmelin et Feldberg montrent, en 1948, que

INTRODUCTION : La signalisation purinergique

l'injection intraveineuse d'ATP entraîne des effets complexes sur les systèmes pulmonaire, cardiaque et musculaire chez le chat⁶. En 1954, Holton et Holton suggèrent que l'ATP est le composé vasodilatateur libéré à la suite d'une stimulation des nerfs sensoriels⁷; ils démontrent en 1959 que la stimulation du nerf de l'oreille chez le lapin entraînant une vasodilatation est effectivement accompagnée d'une libération d'ATP⁸.

Dans les années 1960, le groupe de Burnstock identifie un courant hyperpolarisant chez le cochon d'Inde lors de la stimulation des muscles lisses en présence d'antagonistes cholinergique et adrénérique (l'atropine et le bretylium respectivement), démontrant ainsi l'existence d'un courant non cholinergique non adrénérique (NANC)^{9,10}. Il montre ensuite que ce courant est aboli par la tétrétoxoïne, assimilant ainsi ces hyperpolarisations à des potentiels inhibiteurs en réponse au courant NANC¹⁰. Burnstock émet alors l'hypothèse de « neurotransmission purinergique », selon laquelle l'ATP libérée serait l'élément responsable du courant NANC¹¹. Suite à ces découvertes, une série d'étude a montré les effets excitateur et inhibiteur de l'ATP, laissant émerger le concept des récepteurs purinergiques¹². Cependant, l'idée que l'ATP puisse être un neurotransmetteur reste peu acceptée. En effet, l'ATP ayant un rôle énergétique bien établi, il n'était pas concevable qu'elle puisse également jouer un rôle de messenger extracellulaire et il faudra attendre les années 1980 pour que l'idée soit entendue^{13,14}.

La notion de récepteurs spécifiques de cette transmission purinergique apparaît peu de temps après son identification. Burnstock propose dans un premier temps une classification simple, distinguant les récepteurs P1, sélectifs de l'adénosine et les récepteurs P2, sélectifs de l'ATP et l'ADP. En se basant sur des données pharmacologiques, il établit ensuite deux classes de récepteurs P2 : les récepteurs P2X et les récepteurs P2Y¹⁵. Enfin, dans les années 1990, les premiers récepteurs purinergiques sont clonés¹⁶⁻¹⁸, établissant définitivement l'ATP comme messenger chimique. De nos jours, il existe 4 types de récepteurs P1, 8 types de récepteurs P2Y et 7 récepteurs P2X. Ces récepteurs sont activés par l'ATP extracellulaire et ses différents produits de dégradation. En effet, l'ATP libérée dans l'espace extracellulaire est rapidement dégradée par des ectonucléotidases, telles que la NTPDase et le e5'NT. L'ATP est dans un premier temps dégradée en ADP puis en AMP et enfin en adénosine. Ces composés activent différents récepteurs purinergiques. Parmi les P2, les récepteurs P2X sont activés par l'ATP tandis que les récepteurs P2Y sont activés par l'ATP, l'UTP mais également par leur produit de dégradation, l'ADP et l'UDP. Enfin, les récepteurs P1 sont activés par l'adénosine, produit final de la dégradation complète de l'ATP (Figure 2).

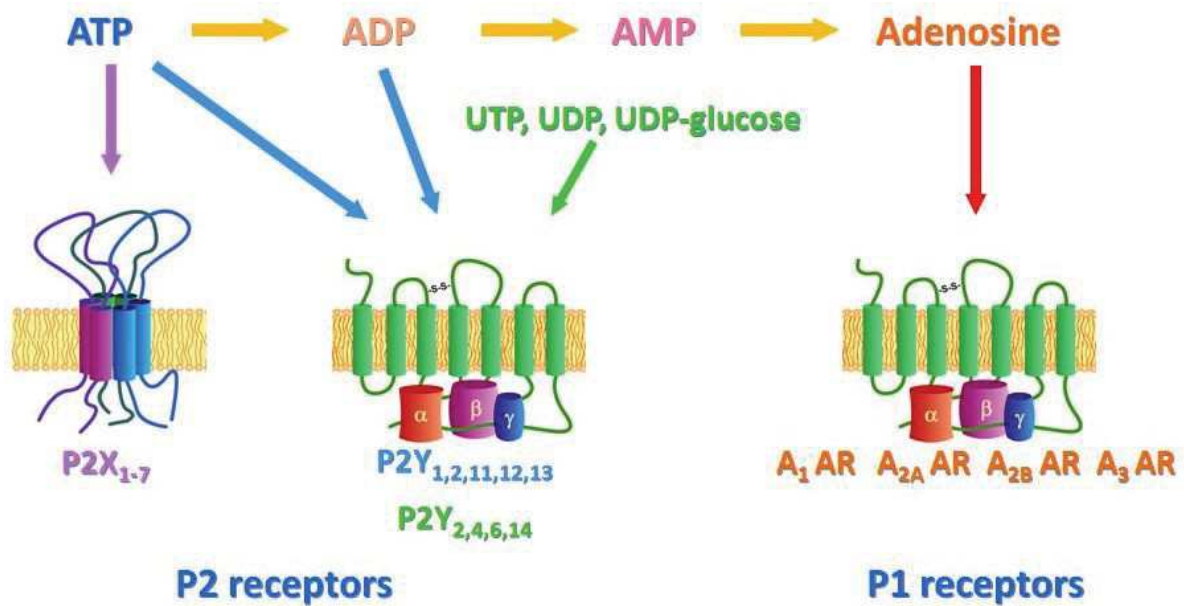


Figure 2 : Les récepteurs purinergiques

1.2 Les récepteurs purinergiques

1.2.1 Les récepteurs P1 de l'adénosine

a) Structure des récepteurs de l'adénosine

Les récepteurs P1, activés par l'adénosine, sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), possédant sept domaines transmembranaires en structure d'hélice α de 20 à 27 acides aminés, une extrémité N-terminale extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire. Quatre sous-types de récepteurs P1 ont été identifiés : A1R, A2AR, A2BR et A3R. Les récepteurs A1 et A3 sont couplés à des protéines $G_{i/o}$ tandis que les récepteurs A2A et A2B sont couplés à des protéines G_s ¹⁹. Les récepteurs A2A et A2B, couplés aux protéines G_s , activent l'adénylate cyclase conduisant ainsi à la production d'AMP cyclique (AMPc). L'AMPc permet l'activation de la protéine kinase A; cette dernière allant phosphoryler divers effecteurs. Au contraire, les récepteurs A1 et A3, couplés aux protéines $G_{i/o}$, inhibent l'adénylate cyclase et par conséquent la production d'AMPc (Tableau 1).

b) Localisation et rôles dans le CNS

Les récepteurs P1 sont exprimés dans les systèmes immunitaire, respiratoire, cardiovasculaire et nerveux. Dans le SNC, l'adénosine intervient notamment dans la libération de neurotransmetteurs, la plasticité synaptique et la production d'espèces réactives oxygénées.

INTRODUCTION : La signalisation purinergique

En effet, les récepteurs P1 sont exprimés dans différentes structures du CNS et dans plusieurs types cellulaires²⁰. Les récepteurs A1 sont exprimés dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet, dans lesquels ils modulent la libération de neurotransmetteurs, l'excitabilité neuronale²⁰, le sommeil²¹ et la douleur²². Les récepteurs A2AR ont une localisation plus restreinte et sont exprimés dans le striatum et les bulbes olfactifs, où ils contrôlent la libération de neurotransmetteurs²⁰. Les récepteurs A3R, quant à eux, sont exprimés dans l'hippocampe, le cortex et l'hypothalamus.

Les récepteurs P1 remplissent diverses fonctions physiologiques et pathologiques. A l'aide d'outils pharmacologiques et de modèles knock-out (KO), il a été montré que l'adénosine, *via* les récepteurs P1, jouait un rôle dans diverses pathologies telles que l'épilepsie²³, la douleur²² ou la maladie de Parkinson²⁴.

	Agoniste	Protéine G	Signalisation en aval		
Récepteur P1					
A1R	Adenosine	Gi/o	↘ Adenylate cyclase	↘ AMPc	↘ PKA
A2AR	Adenosine	Gs	↗ Adenylate cyclase	↗ AMPc	↗ PKA
A2BR	Adenosine	Gs	↗ Adenylate cyclase	↗ AMPc	↗ PKA
A3R	Adenosine	Gi/o	↘ Adenylate cyclase	↘ AMPc	↘ PKA
Récepteur P2YR					
P2Y1	ADP	Gq	phospholipase C/Inositol triphosphate		↗ Ca ²⁺
P2Y2	ATP/UTP	Gq	phospholipase C/Inositol triphosphate		↗ Ca ²⁺
P2Y4	UTP	Gq	phospholipase C/Inositol triphosphate		↗ Ca ²⁺
P2Y6	UTP	Gq	phospholipase C/Inositol triphosphate		↗ Ca ²⁺
P2Y11	ATP	Gq	phospholipase C/Inositol triphosphate		↗ Ca ²⁺
P2Y12	ADP	Gi/o	↘ Adenylate cyclase	↘ AMPc	↘ PKA
P2Y13	ADP	Gi/o	↘ Adenylate cyclase	↘ AMPc	↘ PKA
P2Y14	UDP	Gi/o	↘ Adenylate cyclase	↘ AMPc	↘ PKA

Tableau 1 : Les récepteurs métrabotropiques purinergiques

1.2.2 Les récepteurs métrabotropiques P2Y

Peu de temps après la distinction entre les récepteurs P2X et P2Y, une revue de Abbraccio et Burnstock souligne l'existence de plusieurs sous-types de récepteurs P2X (P2XR) et de

récepteurs P2Y (P2YR); les P2XR étant des canaux ioniques tandis que les P2YR sont couplés à des protéines G²⁵.

a) Structure des récepteurs P2Y

Les P2YR sont des récepteurs couplés aux protéines G ; ils possèdent donc sept domaines transmembranaires (TM), trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Il existe 8 sous-types de P2YR : P2Y1R (activé par l'ADP), P2Y2R (activé par l'UTP et l'ATP), P2Y4R (activé par l'UTP), P2Y6R (activé par l'UDP), P2Y11R (activé par l'ATP), P2Y12R (activé par l'ADP), P2Y13R (activé par l'ADP) et P2Y14R (activé par l'UDP). Ces récepteurs ont tous été clonés^{16,18,26-31} et les structures de P2Y1R et P2Y12R ont récemment été caractérisées^{32,33}. Il a notamment été montré, grâce à l'étude de P2Y1R, que certains résidus des TM 3 et 7 sont cruciaux pour l'activation des récepteurs par les nucléotides³⁴. Les P2YR sont classiquement séparés en deux grandes catégories, différant d'un point de vue phylogénique, par la sélectivité de la protéine G ainsi que par les acides aminés importants pour la liaison du ligand. Le premier sous-groupe contient P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R ainsi que P2Y11R et sont couplés à des protéines G_q, qui activent la voie phospholipase C/Inositol triphosphate. Le second groupe, les P2Y12R-like, englobe les P2Y12R, P2Y13R et P2Y14R. Ces derniers sont couplés à des protéines G_{i/o} et inhibent la voie de l'adénylate cyclase³⁵. Il a également été montré qu'un même récepteur peut être couplé à différentes protéines G (Tableau 1).

b) Rôle dans le SNC

Les P2YR sont exprimés de manière ubiquitaire dans l'organisme et sont par conséquent impliqués dans de nombreux systèmes ; l'exemple le plus remarquable étant l'implication de P2Y1R et P2Y12R dans l'agrégation des plaquettes sanguines³⁶. Dans le SNC, l'expression des P2YR est dépendante des types cellulaires : P2Y1R, P2Y2R sont neuronaux et astrocytaires tandis que P2Y12R, P2Y13R, P2Y14R sont majoritairement gliaux.

Les P2YR sont impliqués dans diverses fonctions telles que la neurotransmission, la neurogénèse et la communication intercellulaire. Dans les neurones, les P2YR modulent l'activité synaptique, en jouant sur la libération de glutamate, de GABA, de noradrénaline, de sérotonine et de dopamine dans différentes structures³⁷. Les P2YR peuvent également interagir fonctionnellement avec des récepteurs ionotropiques et il semblerait que l'activation des P2YR, tels que P2Y1R, inhibe la transmission excitatrice neuronale médiée par les récepteurs NMDA tandis qu'elle stimule la transmission GABAergique³⁸.

INTRODUCTION : La signalisation purinergique

Dans les astrocytes, la signalisation induite par les P2YR entraîne une prolifération cellulaire³⁹ et une amélioration des capacités neuroprotectrices⁴⁰ en condition pathologique, telle que lors de lésions mécaniques ou lors de stress oxydatif. Enfin dans les microglies, différentes fonctions ont été démontrées telles que l'implication de P2Y6R dans la phagocytose ou bien la fonction chemotaxique de P2Y12R. Ces fonctions seront détaillées ultérieurement.

1.2.3 Les récepteurs ionotropiques P2X

Les récepteurs P2X (P2XR) sont des canaux ioniques activés par l'ATP. De nos jours, sept sous-unités ont été identifiées. Ces récepteurs sont des canaux cationiques, principalement caractérisés par leur perméabilité au calcium. Chaque P2XR fonctionnel est composé de trois sous-unités, assemblées en homomère ou en hétéromère et présente des propriétés ioniques et pharmacologiques propres.

a) Structure des récepteurs P2X

Les P2XR sont abondamment exprimés chez les vertébrés et les organismes eucaryotes inférieurs⁴¹. Chez les mammifères, il existe sept sous-unités, de P2X1 à P2X7. Leurs gènes possèdent entre 11 et 13 exons et sont répartis sur cinq chromosomes différents. Les gènes *p2rx1* et *p2rx5* ainsi que *p2rx4* et *p2rx7* sont adjacents, reflétant probablement une duplication évolutive récente. D'un point de vue peptidique, les P2XR ont une homologie de séquence de 30-50%⁴².

Topologie

En 1994, Valera et *al.* clonent le premier P2XR à partir d'ADNc de rat exprimé dans des ovocytes¹⁷. La même année, Brake et *al.* utilisent une approche similaire, à l'aide d'ADNc de cellules PC12, afin de décrire pour la première fois la structure d'un P2X⁴³. Il décrit alors un récepteur possédant deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2), une large boucle extracellulaire et des domaines N- et C-terminaux intracellulaires. La boucle extracellulaire est large et riche en cystéines, formant probablement des ponts disulfures, importants pour la stabilisation du site de liaison du ligand. La partie C-terminale est, quant à elle, riche en prolines et serines et contient des domaines sur lesquels l'activité du canal peut être modifiée par phosphorylation. Ils émettent également l'hypothèse que le TM2 forme, avec un domaine hydrophobe adjacent, le pore du canal.

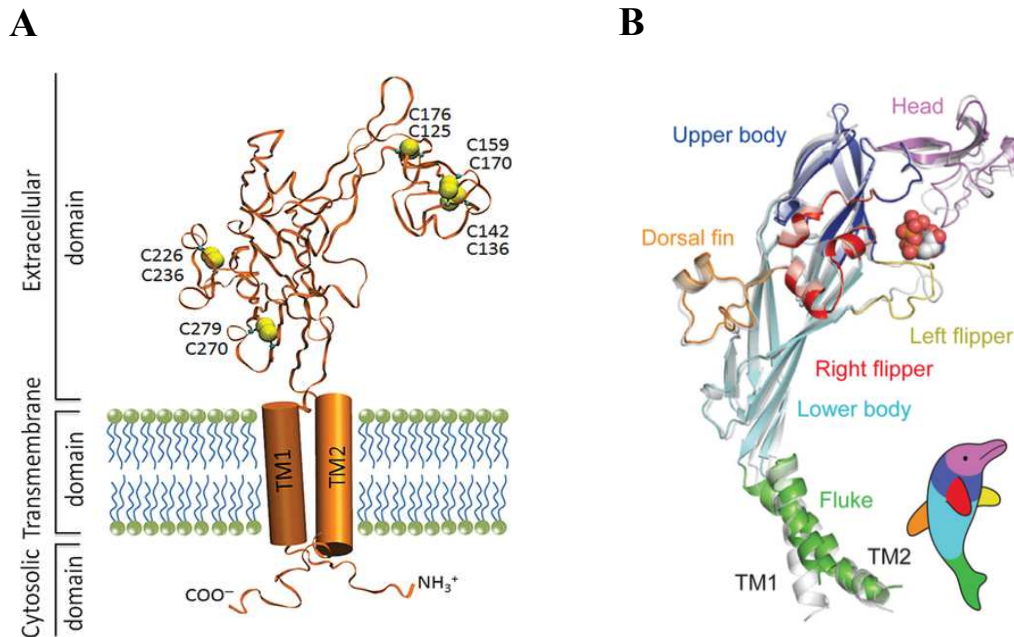


Figure 3 : Structure des récepteurs P2X

(A) Représentation schématique d'une sous-unité P2X composée de deux domaines transmembranaires TM1 et TM2, de domaines N- et C- terminaux intracellulaires et d'une large boucle extracellulaire. Dans la boucle extracellulaire, les 10 résidus cystéiniques formant des ponts disulfures sont représentés. D'après Mittal et *al.* (2016) (B) Structure cristallographique d'une sous-unité P2X4 de poisson-zèbre. Chaque sous-unité s'apparente à un dauphin dont les différentes parties sont représentées par couleur. D'après Hattori et *al.* (2012)

Par la suite, plusieurs études ont montré que les différents sous-types de P2X ont une structure similaire à celle décrite par Brake en 1994⁴². Les P2X sont des protéines de 384 à 595 acides aminés, ayant une partie N-terminale très conservée parmi les différents sous-types de P2XR tandis que la partie C-terminale varie considérablement⁴². En outre, la boucle extracellulaire possède 10 résidus cystéiniques hautement conservés entre les différents P2X, formant 5 ponts disulfures⁴⁴. La cristallisation de P2X4R, en configuration fermée chez le poisson-zèbre en 2009⁴⁵ puis en configuration ouverte en 2012⁴⁶, a permis de confirmer l'architecture générale de ces récepteurs. La structure globale d'une sous-unité reprend la forme d'un dauphin. Les deux domaines transmembranaires forment la queue du dauphin tandis que la large boucle extracellulaire forme le corps et la tête ainsi que les trois nageoires : gauche, droite et dorsale. Le corps du dauphin représente l'architecture centrale de la boucle extracellulaire, composée de feuillets β , tandis que la tête est composée de trois feuillets β et d'une hélice α (Figure 3). Cependant, dans cette étude cristallographique, le récepteur est tronqué de ses parties N- et C-terminales⁴⁵ et ce n'est qu'en 2016, lors de la cristallisation de P2X3R, que les parties intracellulaires sont mises en évidence. Elles sont composées de

INTRODUCTION : La signalisation purinergique

structures en feuillets β formant une « casquette cytoplasmique » et jouent un rôle dans l'ouverture du pore et la désensibilisation du récepteur⁴⁷.

Modifications post-traductionnelles

Glycosylation

Des études de mutagenèse, puis de cristallographie de P2X4R, ont mis en évidence des sites de N-glycosylation sur la boucle extracellulaire des P2XR. Chaque P2XR possède de trois à six sites de glycosylation, d'une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (dans laquelle X peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline). Des travaux de mutagenèse et l'utilisation de tunicamycine (inhibant l'addition de N-acétylglucosamine) sur P2X1R⁴⁸, P2X2R^{49,50}, P2X3R⁵¹ et P2X7R⁵² montrent le rôle de la glycosylation dans l'adressage des récepteurs à la membrane. En effet, l'expression membranaire des P2XR est diminuée lorsque ces derniers ne possèdent pas au minimum deux N-glycans^{49,50}. En outre, des études sur P2X1R, P2X3R et P2X7R montrent que des mutations spécifiques d'un site unique de glycosylation altèrent l'adressage à la membrane ainsi que les fonctions des récepteurs^{48,51,52}.

Ponts disulfures

La présence de cystéines dans la boucle extracellulaire a été identifiée très tôt⁴³ mais ce n'est qu'avec les études de Ennion *et al.* et de Clyne *et al.* en 2002, que la présence de ponts disulfures a été confirmée^{44,53}. Les ponts disulfures contribuent à la structure tertiaire et quaternaire des récepteurs. Tous les P2XR possèdent, au sein de leur boucle extracellulaire, dix cystéines formant 5 ponts disulfures. Des études de mutagenèse ont mis en évidence leur rôle dans la réponse à l'ATP : des simples mutations sur des cystéines de P2X2R affectent la réponse à l'ATP, modifiant l'EC₅₀⁵³. Il a également été montré que des mutations sur les cystéines C261 et C270 de P2X1R modifient l'adressage du récepteur à la membrane⁴⁴.

Phosphorylation

Parmi les motifs remarquables au sein des P2XR, des sites de phosphorylation peuvent être relevés. En effet, les P2XR possèdent, dans leurs domaines intracellulaires, des sites de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) de séquence Thr-X-Arg/Lys. Ces sites de phosphorylation semblent jouer un rôle primordial dans la désensibilisation des récepteurs puisque des études de mutagenèse sur P2X1R et P2X2R montrent une désensibilisation plus rapide de ces récepteurs^{54,55}. Bien que Boué-Grabot *et al.* identifient la Thr18⁵⁴ comme site de

phosphorylation, Franklin *et al.* ne trouvent pas de preuve de la phosphorylation de P2X2R en immunoblot⁵⁶.

Des sites de phosphorylation dans le domaine C-terminal ont également été identifiés sur P2X4R et P2X7R. Ainsi, P2X7R serait phosphorylé à l'état basal sur la Tyr343 et une déphosphorylation provoquerait son activation⁵⁷. Quant à P2X4R, il voit ses fonctions modulées par une protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMPc, bien qu'une phosphorylation directe soit peu probable⁵⁸.

Des domaines de phosphorylation par la PKC ont également été retrouvés sur l'ecto-domaine de P2X3R et la phosphorylation de ces sites potentialise le courant induit par l'agoniste $\alpha\beta$ -meATP^{59,60}.

Structure quaternaire et interactions

L'idée d'une oligomérisation des récepteurs P2X a été émise très tôt, en 1990, lorsque Bean suggère, grâce à des études électrophysiologiques, la présence de trois sites de liaison à l'ATP⁶¹. Par la suite, des expériences de cross-linking et d'électrophorèse en condition native ont mis en évidence un assemblage en trimère de P2X1R et P2X3R⁶². Cette structure quaternaire a ensuite été confirmée par microscopie à force atomique⁶³, par microscopie électronique⁶⁴, puis par la structure cristallographique de P2X4R⁴⁵.

Afin d'être fonctionnels, les P2X doivent s'assembler en trimère. Tous les P2XR forment des homotrimères fonctionnels, à l'exception de P2X6R⁶⁵, qui, en système hétérologue, se présente sous forme de monomères retenus dans le réticulum endoplasmique (RE)⁶⁶. Lors de la mise en évidence des interfaces de contact par cristallographie, il a été suggéré que l'incapacité de P2X6R à former des homomères serait due à un déficit de 9 résidus dans la nageoire gauche, compromettant ainsi les interactions entre sous-unités⁴⁵.

Les P2XR peuvent également former des hétéromères. Torres *et al.* ont montré que, en système hétérologue, tous les P2X, à l'exception de P2X7, peuvent s'hétéromériser⁶⁵. Cependant, malgré la démonstration de l'existence de ces hétéromères dans des systèmes hétérologues, seuls les hétéromères P2X1/5R⁶⁷, P2X2/5R⁶⁸ et P2X2/3R^{69,70} ont été caractérisés en tissus natifs ; la présence des hétéromères P2X1/2R⁷¹, P2X1/4R⁷², P2X2/6R⁷³ en tissus natifs a seulement été suggérée. Dernièrement, une étude a montré l'existence dans un système hétérologue d'un récepteur composé de trois sous-unités différentes, formant ainsi un trimère P2X3R/P2X4R/P2X6R⁷⁴. Cependant, il n'existe pas d'évidences fonctionnelles d'un tel récepteur ni de son existence dans des systèmes natifs.

INTRODUCTION : La signalisation purinergique

Récemment, et en contradiction avec la première étude de Torres *et al.* sur les hétéromères, l'existence d'une forme hétéromérique P2X4/7R a été observée dans des cellules HEK et dans des macrophages⁷⁵. Dans cette étude, Guo *et al.* montrent que P2X4R et P2X7R co-immunoprécipitent mais également que P2X7R stabilise l'expression de P2X4R à la membrane. Cependant, d'autres études plus poussées d'électrophorèse en condition native et de cross-linking ont par la suite montré que P2X4 et P2X7 ne forment pas d'hétéromères mais interagissent entre eux sous forme d'homomères⁷⁶⁻⁷⁸. Il a en effet été montré que les homotrimères des P2XR pouvaient interagir et former des clusters modulant ainsi leurs propriétés⁷⁹⁻⁸¹. En 2017, une étude de Schneider *et al.* revient sur l'existence d'hétéromères entre ces deux sous-unités et met en évidence une interaction qu'ils déclarent être sous forme d'hétéromère grâce à la technique de FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Cependant, dans leur étude, cette interaction ne provoque pas de nouvelles propriétés électrophysiologiquement discriminables mais résulte simplement en l'addition des propriétés de P2X4R et P2X7R⁸².

b) Adressage à la membrane et recyclage

Les P2XR, une fois glycosylés et assemblés dans le RE, sont amenés vers la membrane par le trans-Golgi. Ils sont ensuite internalisés et sont soit recyclés pour retourner à la membrane, soit dirigés vers les lysosomes et endosomes tardifs. La cinétique de ces procédés d'adressage et d'internalisation détermine la distribution des récepteurs. Comme mentionné plus haut, les modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation ou les ponts disulfures jouent un rôle important dans l'adressage à la membrane^{44,48}. La localisation des P2XR est différente selon leur composition : ils peuvent être localisés à la membrane plasmique, dans le RE, dans les lysosomes ou dans les endosomes tardifs. Il n'y a, à ce jour, pas de rôle connu des P2XR localisés dans les compartiments intracellulaires. Cependant, en conditions pathologiques, les P2XR se trouvant dans des compartiments intracellulaires sont rapidement mobilisés afin d'être adressés à la membrane plasmique^{83,84}.

En 2004, un motif YXXXK commun à tous les P2X a été identifié sur la partie C-terminale des récepteurs⁸⁵. Ce motif, situé 8 résidus en aval du TM2 dans tous les P2X (excepté P2X7 qui contient un domaine de 18 résidus supplémentaires), permet de réguler l'expression des P2XR à la surface. En effet, des mutations introduites dans ce motif réduit la stabilité du récepteur P2X2R à la membrane plasmique et augmente son internalisation⁸⁵.

De manière intéressante, il a été montré que l'internalisation des P2XR est influencée par leur activation ; la présence d'agonistes provoque ainsi une internalisation rapide des récepteurs^{86,87}.

c) Fonctionnalité du récepteur

Site de liaison de l'ATP

Avant la cristallisation du P2X4R de poisson-zèbre, de nombreuses études de mutagenèse ont permis l'identification de résidus essentiels pour la liaison de l'ATP. Des mutations réalisées sur P2X1R et P2X2R ont permis de montrer que les résidus Lys70, Lys72, Arg298 et Lys316 ainsi que Phe188, Phe297, Thr189, Asn296 (numérotation selon P2X2R) sont essentiels pour la liaison de l'ATP⁸⁸⁻⁹¹. Ces acides aminés sont conservés pour tous les P2XR^{92,93}. Des études de co-expression de P2X3R avec des P2X2R mutés ont montré la nécessité d'avoir plusieurs sous-unités pour former le site de liaison à l'ATP⁹⁴, ce site se trouvant à l'interface de deux sous-unités⁹⁵. En 2012, la cristallisation de P2X4R a permis de confirmer l'implication de ces résidus dans le site de liaison de l'ATP⁴⁶. Ces résidus permettent la formation de cavités entre les sous-unités, formant ainsi trois sites de liaison pour chaque P2XR fonctionnel.

Ouverture du pore

La cristallisation du récepteur lié à l'ATP a mis en évidence un pore transmembranaire ininterrompu se situant le long des TM2 : des fenestrations situées au-dessus des TM créent une voie d'accès aux ions assez larges pour le passage des cations⁴⁶.

La liaison de l'ATP sur le récepteur provoque un changement de conformation menant à l'ouverture de ce pore : ceci est le 'gating'. En effet, la superposition des conformations du récepteur inactivé et activé permet de mettre en évidence un changement de conformation⁴⁶ (Figure 4). La liaison de l'ATP entraîne une « fermeture » de la cavité contenant le site de liaison. Ce changement de conformation se répercute tout le long du récepteur et provoque une rotation des hélices des TM, créant ainsi un pore pour les ions (Figure 4). La cristallisation de P2X3R en 2016 a ensuite permis de mettre en avant un rôle des parties N- et C-terminales. Lors de l'ouverture du pore, une « casquette cytoplasmique » se forme au sein de ces domaines, qui ancre la surface cytoplasmique des domaines TM et fournit ainsi une « fenestration cytoplasmique » par laquelle passent les ions⁴⁷.

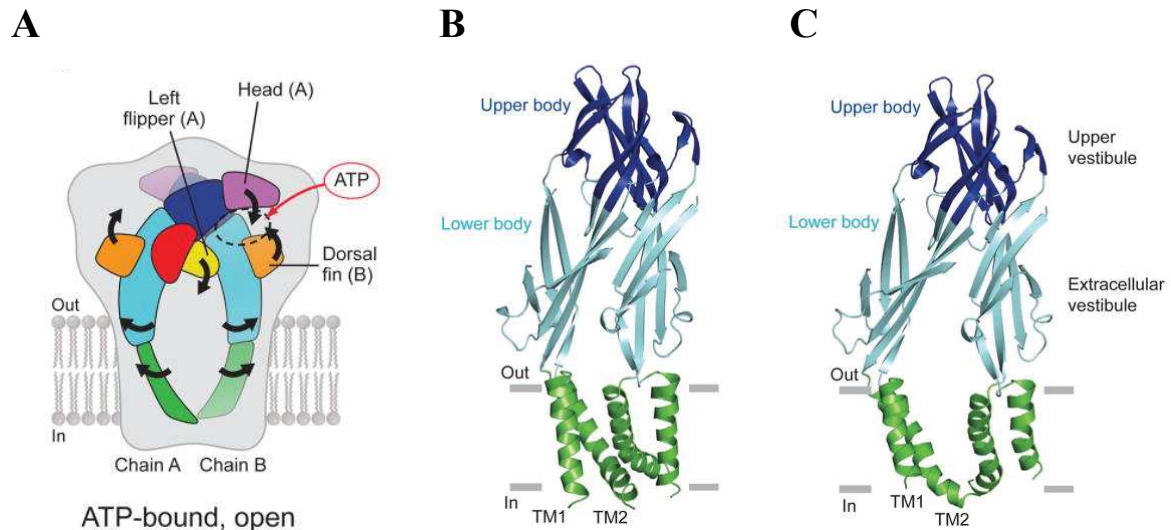


Figure 4 : Changement de conformation des récepteurs P2X suite à la liaison de l'ATP

(A) Schéma de l'activation du récepteur par l'ATP. Les flèches représentent le mouvement de chaque partie afin de passer d'une conformation inactive à active. (B,C) Représentation du corps et de la queue de P2X4 en conformation inactive (B) et active (C). Seules deux sous-unités sont représentées. D'après Hattori et *al.* (2012)

Sélectivité ionique

Les récepteurs P2X sont des canaux perméables aux Na^+ , K^+ et Ca^{2+} . Bien que décrits comme canaux cationiques non sélectifs, il a été montré que P2X5R présente une perméabilité aux ions chlorures⁹⁶. La perméabilité des P2XR aux Na^+ et K^+ est relativement équivalente tandis que leur perméabilité au Ca^{2+} constitue une propriété propre à chaque sous-unité; la perméabilité du récepteur dépend donc de sa composition en sous-unités.

Différentes études ont mis en évidence la perméabilité calcique des différents homomères^{97,98} (Tableau 2). Une étude de perméabilité relative de Migita et *al.* a identifié des résidus (Thr336, Thr339 et Ser340) localisés dans le TM2 responsables de la perméabilité des P2XR aux cations⁹⁹. Par la suite, Samways et Egan, ont identifié des résidus chargés négativement et localisés en extracellulaire près de TM1 et TM2 contribuant à la sélectivité calcique¹⁰⁰. Ces résidus étant présents sur P2X1R et P2X4R, ils leur confèrent leur grande perméabilité au calcium. A l'opposé, ces résidus ne sont pas présents sur P2X2R, le rendant moins perméable à cet ion.

Désensibilisation des récepteurs

Lors d'une exposition longue à l'ATP, les récepteurs P2X se désensibilisent. Basés sur des enregistrements en système hétérologue, les P2XR ont été classés en deux grandes

catégories : les récepteurs à désensibilisation rapide, comprenant P2X1R et P2X3R, et les récepteurs à désensibilisation lente, comprenant P2X2R, P2X4R, P2X5R et P2X7R⁴² (Figure 5). La désensibilisation correspond à la transition d'un état ouvert vers un état fermé en présence de l'agoniste. Elle est suivie d'une phase de récupération qui requiert le détachement de l'agoniste et un changement de conformation vers un état fermé. La désensibilisation constitue une caractéristique importante car elle détermine la cinétique de réponse en présence prolongée de l'agoniste. Dès 1996, des travaux s'attardent sur la désensibilisation et identifient les TM1 et TM2 comme éléments importants dans la désensibilisation¹⁰¹. La structure cristallographique de P2X3R a ensuite permis de comprendre les changements de conformation impliqués. Elle montre que les architectures en conformation ouverte et désensibilisée ne sont pas similaires (Figure 5). Enfin, les auteurs suggèrent que la stabilité de la « casquette cytoplasmique » est responsable des différences de désensibilisation observées entre récepteurs⁴⁷.

Dilatation du pore

Une des propriétés particulières des P2XR est la perméabilité aux larges cations, tels que le NMDG⁺, de certains récepteurs (P2X2R, P2X4R et P2X7R) après une exposition prolongée à l'ATP. Deux hypothèses ont été émises afin d'expliquer cette perméabilité. La première suggère une dilatation du pore de manière intrinsèque. Le pore subit un changement de conformation lent et se dilate. La deuxième hypothèse suggère que la perméabilité aux larges molécules est médiée par une voie qui est structurellement différente et qui est stimulée par l'activation des P2XR¹⁰². Des travaux utilisant des rapporteurs fluorescents ainsi que des expériences mesurant le potentiel de réversion en patch clamp permettent de soutenir les deux hypothèses¹⁰³. Cependant, des travaux récents remettent en cause ce phénomène en montrant que le changement de potentiel de réversion observé est dû à un changement drastique de la concentration intracellulaire en ions plutôt qu'à un changement de perméabilité. En effet l'application prolongée d'ATP mène à une déplétion intracellulaire de Na⁺ et une accumulation de NMDG⁺¹⁰⁴. En outre, des travaux de 2018 montrent que les P2XR sont instantanément perméables aux larges molécules. Ainsi ces récepteurs sont simultanément perméables aux petits et larges ions, remettant en cause une « dilatation » du pore¹⁰³. Le mécanisme permettant la perméabilité de ces récepteurs reste donc à élucider.

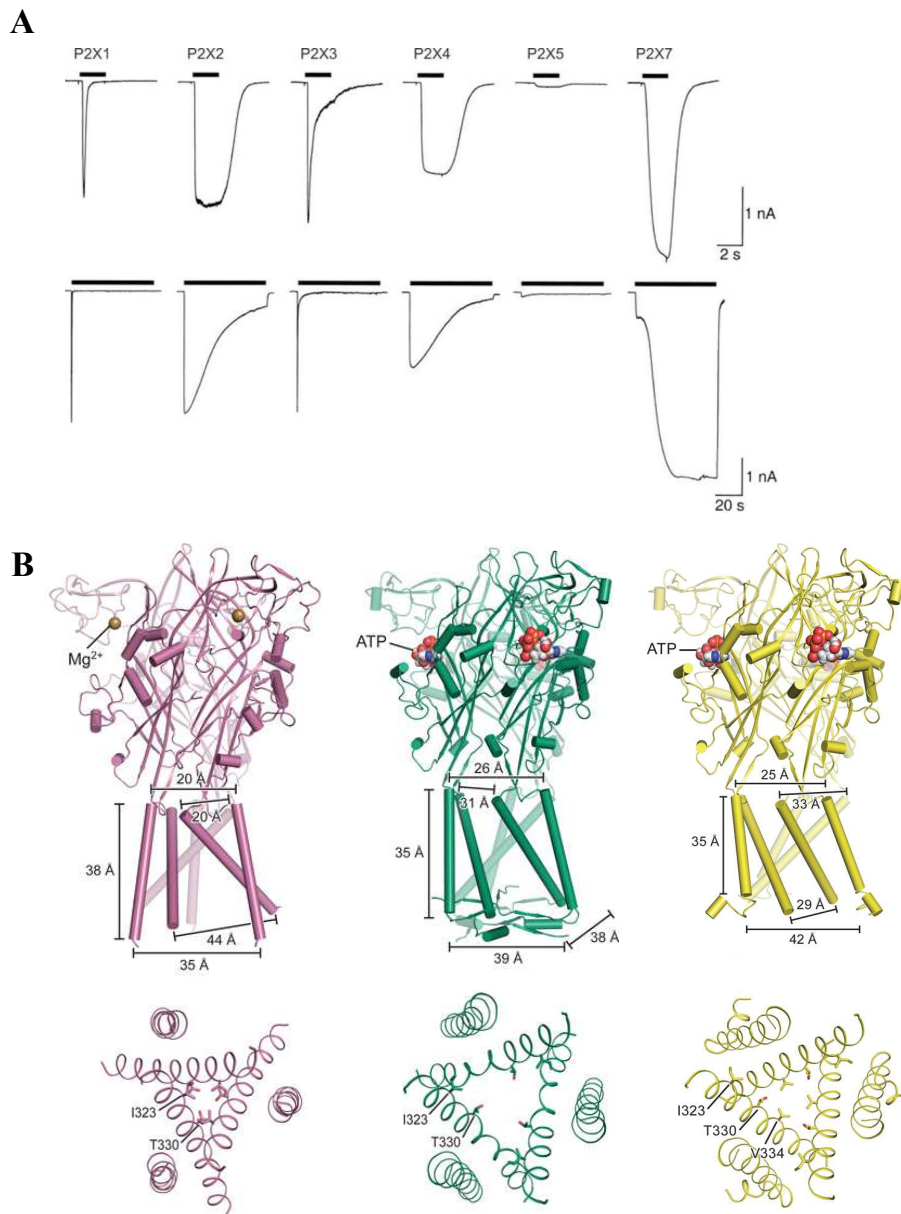


Figure 5 : Désensibilisation des P2XR

(A) Désensibilisation des différents récepteurs P2X homomériques exprimés dans des cellules HEK lors d'une application brève (haut) ou prolongée (bas) d'ATP. Seuls P2X1 et P2X3 désensibilisent lors d'une application brève (2 sec) alors qu'une désensibilisation lente est observée pour P2X2, P2X4 et P2X7 lors d'une application prolongée (60 sec). D'après Khakh et North (2012). (B) Représentation de P2X3 en conformation fermée (gauche), ouverte (milieu) et désensibilisée (droite). Une vue latérale (haut) permet de visualiser les changements de conformation au niveau des TM alors qu'une vue de haut (bas) permet de voir les changements au niveau du pore. D'après Mansoor et *al.* (2016)

Interaction avec les autres protéines

Comme mentionné précédemment, les récepteurs P2X peuvent interagir entre eux et former des clusters modulant ainsi leurs propriétés⁷⁹⁻⁸¹ (cf. §1.2.3a). Outre ces interactions, ces récepteurs peuvent également interagir avec d'autres protéines. De nombreuses études mettent

en évidence des interactions entre les P2XR et les récepteurs appartenant à la super famille des canaux Cys-loop. Ainsi, des interactions fonctionnelles ont été décrites entre les P2XR et des récepteurs GABAergiques^{105,106} et nicotiniques¹⁰⁷. Des interactions avec d'autres canaux ont également été décrites. Par exemple, P2X5R forme un complexe moléculaire avec le canal sodique ASIC3 (acid-sensing ion channel 3) et accroît la sensibilité au pH de ce dernier, formant ainsi un détecteur de coïncidence pour l'ATP et un environnement acide¹⁰⁸. Il a également été suggéré que P2X7R interagit avec l'hemi-canal pannexine-1 et que cette interaction fonctionnelle est impliquée dans la dilatation du pore de P2X7R¹⁰⁹. Outre les récepteurs, les P2XR interagissent également avec d'autres protéines. Ceci a beaucoup été étudié pour P2X2R et P2X7R car ils ont la particularité d'avoir une partie C-terminale longue, permettant ainsi des expériences de « pull-down ». P2X2R interagit avec différentes protéines telles que la β III-tubuline, la protéine heat-shock 90, la tubuline 1 α ou la glutamine synthétase. P2X7R a, quant à lui, au moins 11 partenaires différents parmi lesquels figurent la β -actine, la protéine heat-shock 70 et la protéine heat-shock 90¹¹⁰. Les autres P2XR n'ont été que peu étudiés dans ce contexte ; le manque d'anticorps spécifiques des P2XR reste un obstacle dans l'identification de partenaires protéiques.

d) Pharmacologie de récepteurs P2X

Les agonistes

L'agoniste naturel de tous les P2XR est l'ATP. La sensibilité des P2XR à l'ATP varie considérablement selon les sous-unités ; la concentration efficace médiane (EC_{50}), concentration nécessaire pour atteindre 50% de la réponse maximale, variant entre des concentrations sub-micromolaires, pour P2X1R, P2X3R, P2X5R, à des concentrations de l'ordre de la centaine de micromolaire, pour P2X7R⁹⁸ (Tableau 2). Les P2XR peuvent également être activés par les diadenosines polyphosphates (Asp_nG_s) mais avec une efficacité beaucoup plus faible¹¹¹.

Les agonistes utilisés aujourd'hui sont principalement des composés dérivés de l'ATP. Chacun de ces dérivés présente des affinités différentes pour chaque P2XR (Tableau 2). Parmi les plus couramment utilisés, l'ATP γ S est métaboliquement plus stable que l'ATP mais n'est pas spécifique des P2XR puisqu'il active également les P2YR. De même, le 2-meSATP, bien que fort agoniste, active également les P2YR. Au contraire l' $\alpha\beta$ -meATP, composé relativement stable, n'active pas les P2YR et est donc plutôt spécifique de P2XR. Bien que

INTRODUCTION : La signalisation purinergique

ces composés soient de forts agonistes pour les P2XR, il n'en n'existe pas encore de réellement spécifiques de chaque P2XR⁹⁸.

	P2X1R	P2X2R	P2X3R	P2X4R	P2X5R	P2X6R	P2X7R
Nom du gène	<i>P2RX1</i>	<i>P2RX2</i>	<i>P2RX3</i>	<i>P2RX4</i>	<i>P2RX5</i>	<i>P2RX6</i>	<i>P2RX7</i>
Désensibilisation	Rapide	Lente	Rapide	Lente	Lente	-	Lente
Dilatation du pore	Non	Oui	Non	Oui	-	-	Oui
Permabilité P _{Ca} /P _{Na}	4.8	2.8	1.2	4.2	1.5	-	-
Animaux KO existant	Oui	Oui	Oui	Oui	-	-	Oui
Agoniste EC ₅₀ (μM)							
ATP	0.07	1.2	0.5	10	10	12	100
2MeSATP	0.07	1.2	0.3	10	10	9	100
αβmeATP	0.3	>300	0.8	>300	>300	>100	>300
BzATP	0.003	0.75	0.08	7	>500	-	20
Antagoniste EC ₅₀ (μM)							
Suramine	1	10	3	>500	4	>100	500
PPADS	1	1	1	>500	3	>100	50
TNT-ATP	0.006	1	0.001	15	-	-	>30
NF449	0.7	>100	>100	>100	-	-	>100
Modulateur EC ₅₀ (μM)							
Ivermectine	-	>30	>30	0.25	-	-	>30

Tableau 2 : Caractéristiques et pharmacologie des P2XR

Le tableau récapitule quelques caractéristiques importantes des P2XR ainsi que certains agonistes et antagonistes. Pour la désensibilisation, « rapide » signifie <1 seconde tandis que « lente » signifie >20 secondes. D'après Khakh et North (2012)

Les antagonistes

Les antagonistes utilisés ont longtemps été des antagonistes non spécifiques tels que la suramine, le PPADS ou le Brillant blue. Le TNP-ATP est un fort antagoniste des récepteurs P2X1R et P2X3R avec des IC₅₀ (concentration pour inhiber 50% de la réponse) de l'ordre de la nanomolaire. L'implication des P2XR dans diverses pathologies a conduit au

développement d'antagonistes plus spécifiques. Ainsi, des formes tronquées de la suramine, telles que le NF449, montrent une affinité assez spécifique pour certains récepteurs⁹⁸.

Des études cristallographiques récentes ont permis d'identifier des sites de liaison d'antagonistes allostériques. La cristallisation de P2X7R de panda a permis d'identifier un premier site de liaison allostérique situé près du site de liaison de l'ATP, dans une cavité se situant entre deux sous-unités¹¹². Par la suite, Wang et *al.* identifie un autre site situé à l'interface de deux sous-unités, à l'aide de la forme humaine de P2X3R¹¹³. L'identification des sites de liaison allostérique représente une grande avancée pour le développement d'inhibiteurs spécifiques de chaque P2XR.

Autres modulateurs allostériques

La fonction des P2XR peut être régulée par différents modulateurs allostériques¹¹⁴ tels que les ions divalents Zn^{2+} , Ca^{2+} et Mg^{2+} . Le calcium inhibe ou diminue les courants de P2X2R, P2X3R, P2X5R et P2X7R tandis que le Mg^{2+} bloque les courants P2X2R et P2X7R. Le zinc inhibe P2X1R et P2X7R mais potentialise P2X4R tandis qu'il semble avoir un effet différent sur P2X2R, P2X3R et P2X5R selon la concentration utilisée. Le pH, l'alcool et les lipides peuvent également réguler l'activité des récepteurs.

e) Rôle dans le système nerveux central

Dans le système nerveux, les P2XR sont exprimés dans différentes régions et types cellulaires¹¹⁵. Dans les neurones, l'expression des P2XR est observée au niveau du soma ainsi que des dendrites^{116,117}. P2X4R est exprimé au niveau de l'arborisation terminale¹¹⁶ et Rubio et Soto montrent, par microscopie électronique, que P2X2R et P2X4R sont situés dans le compartiment post-synaptique, plus particulièrement en périphérie, suggérant un rôle modulateur dans la transmission synaptique.

Rôle des récepteurs P2X pré-synaptiques

De manière générale, l'activation des P2XR pré-synaptiques augmente la probabilité de libération des neurotransmetteurs. Khakh et *al.* ont montré que, dans les neurones du noyau mésencéphalique, l'application d'ATP en présence de tétrodotoxine (TTX) augmente la fréquence de libération du glutamate¹¹⁸. Dans l'hippocampe, l'activation des P2XR facilite la libération de glutamate par les interneurones mais pas dans les neurones pyramidaux de CA1¹¹⁹. Cet effet des P2XR a également été observé pour le GABA. Des enregistrements dans des cellules de Purkinje du cervelet montrent que le PPADS et la suramine diminuent

INTRODUCTION : La signalisation purinergique

l'amplitude des courants inhibiteurs des cellules en panier. Dans cette étude, l'activation des P2XR (probablement P2X2R et P2X3R) promeut les courants inhibiteurs GABAergiques¹²⁰.

Les P2XR post-synaptiques

Divers travaux portant sur l'hippocampe et le cortex somatosensoriel ont montré la présence de courants post-synaptiques excitateurs (EPSC) déclenchés par l'activation des P2XR. Au cours d'expériences réalisées en présence d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques, Pankratov et *al.* montrent qu'il existe un courant EPSC résiduel, qui peut être bloqué par le PPDAS, inhibiteur des P2XR¹²¹. Par la suite, Mori et *al.* montrent également son existence et démontrent que l'application d'ATP sur des tranches organotypiques d'hippocampe reproduit ce courant¹²². Ce dernier est également retrouvé dans des tranches de cortex somatosensoriel¹²³, impliquant ainsi les P2XR dans la transmission synaptique dans ces deux structures.

- Les P2XR et les récepteurs AMPA

Dans une étude de 2005, Gordon et *al.* montrent que l'ATP joue un rôle crucial dans la modulation de la transmission synaptique excitatrice des neurones magnocellulaires de l'hypothalamus. Leur étude démontre que la norépinephrine (NA) augmente l'amplitude des EPSC en augmentant le recrutement des récepteurs AMPA à la synapse. Ce processus est dépendant de l'ATP libérée par les cellules gliales qui va activer les P2XR exprimés sur les neurones. Cette activation entraîne l'entrée de calcium, qui à son tour va activer la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et permettre le recrutement des récepteurs AMPA à la membrane post-synaptique. Par ce processus, les P2XR, activés par l'ATP provenant des cellules gliales, contribuent donc à la modulation de la réponse post synaptique glutamatergique¹²⁴.

A l'opposé, une étude récente de Pougnet et *al.* montre que, dans des neurones hippocampiques, l'activation des P2XR par de l'ATP exogène ou de l'ATP libérée par les cellules gliales provoque une diminution de l'amplitude des EPSC. Contrairement à l'étude précédente, ces travaux indiquent que les P2XR provoquent une internalisation des récepteurs AMPA conduisant à la diminution de l'amplitude des EPSC¹²⁵. Une deuxième étude montre que l'inhibition des courants glutamatergiques médiée par les P2XR est dépendante de la composition en sous-unités des récepteurs AMPA. Ainsi, en système hétérologue, P2X2R provoque l'inhibition des courants des récepteurs AMPA contenant les sous-unités GluA1 ou GluA4 mais pas, ou peu, de ceux contenant la sous-unité GluA3¹²⁶.

Ces résultats montrent que les P2XR, activés par l'ATP provenant des cellules gliales, peuvent moduler positivement ou négativement la transmission glutamatergique selon les régions impliquées.

▪ Les P2XR et les récepteurs NMDA

Des études se sont également intéressées au rôle des P2XR dans la transmission médiée par les récepteurs NMDA. Dans les neurones pyramidaux de CA1, l'inhibition des P2XR par le PPADS facilite la potentialisation à long terme (LTP) dépendante des récepteurs NMDA. Les auteurs suggèrent que les P2XR inhibent la LTP en affectant son seuil *via* l'entrée de calcium : en contrôlant la concentration basale de calcium, les P2XR agissent comme filtres afin que les faibles stimuli ne provoquent pas de LTP¹²⁷. De même, une étude de Lalo et *al.* montre que l'ATP libérée par les neurones et par les astrocytes active les récepteurs P2X post-synaptiques, conduisant à la diminution des récepteurs NMDA à la membrane. Ce phénomène est dépendant du calcium ainsi que de la protéine PSD95. Ainsi l'activation des récepteurs P2X régulerait négativement la LTP. En effet, Lalo et *al.* montrent que la LTP est induite plus facilement dans des modèles P2X4R-KO que chez les Wild-type (WT), suggérant que P2X4R module le seuil de LTP¹²⁸. A l'opposé, d'autres études utilisant des souris P2X4R-KO montrent que ces dernières présentent une LTP altérée, ayant des amplitudes d'EPSC plus faibles^{129,130}.

Bien que des conclusions divergentes émergent de l'ensemble de ces travaux, il est indéniable que les P2XR jouent un rôle essentiel dans la modulation de la transmission glutamatergique.

▪ Les P2XR et les récepteurs GABA

Les effets divergents de l'ATP dans ces travaux réalisés en tranche ou culture neuronale pourraient être dus à des effets opposés de l'ATP sur le système glutamatergique et GABAergique. Dans des études de co-expression de P2X2R avec différents récepteurs GABA_A, Boué-Grabot et *al.* montrent un cross-talk entre ces deux récepteurs, s'inhibant mutuellement. Ainsi l'activation simultanée de ces récepteurs entraîne une inhibition de leur réponse¹³¹. De manière intéressante, ils montrent que ce cross-talk est dépendant de la composition en sous-unités des récepteurs GABA_A¹⁰⁵. En outre, la co-expression de ces récepteurs dans des neurones hippocampiques résulte en une relocalisation des récepteurs GABA_A à la membrane plasmique¹³¹. Lalo et *al.* montrent également que, dans le cortex, l'activation des P2XR neuronaux par l'ATP libérée par les astrocytes mène à une diminution de l'amplitude des courants GABA par un processus d'internalisation. Ce processus est inhibé

par le PPADS et est fortement diminué chez les souris P2X4R-KO¹³². Par ailleurs, bloquer l'endocytose des P2X4R dans une population de neurones inhibiteurs de l'hypothalamus réduit l'amplitude des courants post synaptiques inhibiteurs¹⁰⁶. Cette inhibition serait due à une interaction entre les récepteurs GABA et P2X4R à la membrane grâce à un motif essentiel YV¹⁰⁶.

Dans les neurones, les P2XR jouent donc un rôle essentiel en modulant l'activité synaptique, agissant à la fois sur la libération de neurotransmetteurs et sur les récepteurs AMPA, NMDA et GABA (Figure 6).

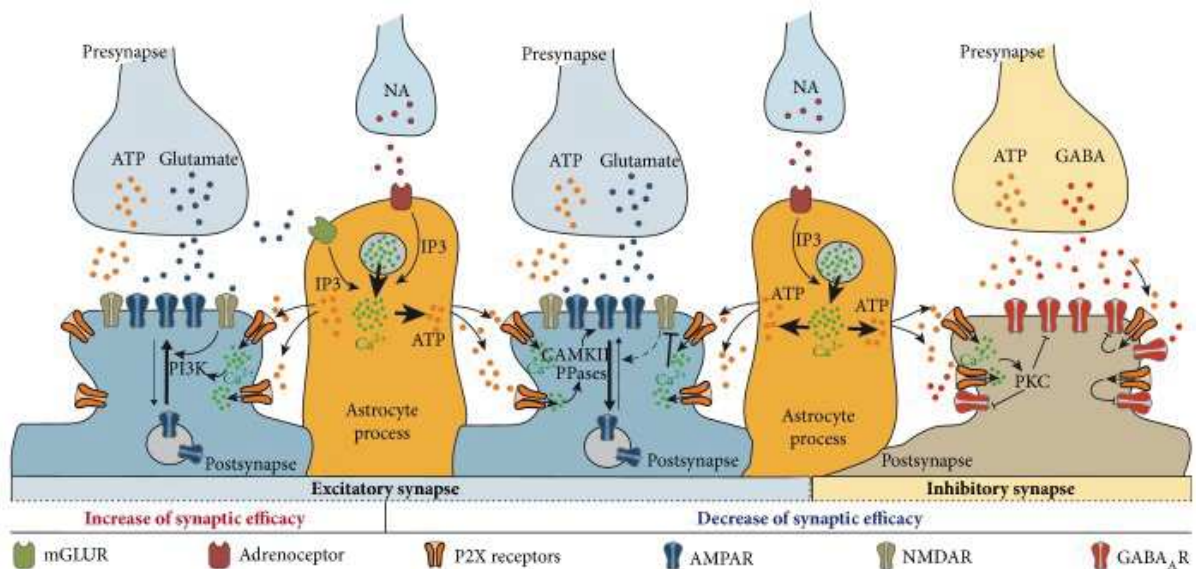


Figure 6 : Rôles des P2XR post-synaptiques

La noradrénaline et le glutamate activent les récepteurs astrocytaires et déclenchent la libération d'ATP. L'activation des P2XR à la synapse glutamatergique (bleu) peut déclencher l'insertion des récepteurs AMPA à la membrane via un processus PI3K dépendant, conduisant ainsi à une potentialisation synaptique (gauche). Cependant, elle peut également déclencher une internalisation des récepteurs AMPA par un processus dépendant de la CAMKII provoquant ainsi une dépression synaptique (milieu). Les P2XR peuvent également moduler les récepteurs NMDA. A la synapse inhibitrice (marron), les P2XR peuvent altérer les courants inhibiteurs en modifiant les récepteurs GABA. D'après Boué-Grabot et al. (2017)

Les P2XR dans les cellules gliales

Récemment, les récepteurs P2X ont été également étudiés dans les cellules gliales. Au niveau transcriptionnel, tous les P2XR sont exprimés dans les astrocytes et l'expression protéique des P2XR a également été démontrée dans diverses régions¹³³. Balleri et al. montrent *in vitro* que les P2X7R astrocytaires répondent à l'ATP et que leur activation conduit à un influx de calcium¹³⁴. Par la suite, l'expression des récepteurs P2X1/5R fonctionnels dans des tranches a été démontrée⁶⁷ et une étude de Palygin et al. suggère que les P2X1/5R des astrocytes

corticaux peuvent être activés par l'ATP libérée par les neurones et ainsi activer une signalisation calcique, contribuant au dialogue neurone-glie¹²³.

Les oligodendrocytes expriment également des P2XR. Les précurseurs de ces cellules en culture expriment P2X1R, P2X2R, P2X3R et P2X7R, et l'expression de récepteurs P2X7 fonctionnels a été montrée dans des oligodendrocytes du nerf optique et de la moelle épinière. Dans des oligodendrocytes du nerf optique en culture, la stimulation excessive de P2X7R entraîne une dégénérescence cellulaire, suggérant son rôle potentiel dans des pathologies impliquant la myélinisation¹³³.

Enfin, les P2XR sont également exprimés par les microglies. P2X4R et P2X7R sont les seuls P2XR ayant été caractérisés¹³⁵ et de nombreux travaux rapportent leur implication dans l'inflammation ainsi que dans des maladies neurodégénératives^{136,137}. La partie 2 de l'introduction étant consacrée aux cellules microgliales, les rôles des P2XR dans ces cellules y seront développés (cf. §2.2.2).

f) Rôles dans les pathologies du système nerveux

De par leur expression ubiquitaire, les P2XR sont impliqués dans nombreux processus physiologiques et pathologiques. Les P2XR étant fortement exprimés dans le SNC, de nombreuses études ont mis en évidence leurs implications dans divers contextes pathologiques. Le paragraphe suivant traitera de quelques pathologies impliquant des P2XR.

Les P2XR dans la douleur

- P2X2/3R

Les P2XR jouent un rôle dans la transmission nociceptive périphérique et centrale. L'application d'ATP sur la peau provoque une sensation de douleur¹³⁸ et la présence de P2X3R dans une sous-population de nocicepteurs, principalement sous forme P2X2/3R, a été démontrée^{139,140}. L'utilisation d'animaux P2X3R-KO a permis de mettre en évidence une diminution des comportements nociceptifs provoqués par l'ATP ou la formaline¹⁴¹. De plus, ces animaux présentent une augmentation de l'hyperalgésie lors d'une inflammation chronique induite par l'injection de CFA (Complete Freund's Adjuvant)¹⁴¹. Au contraire, l'inhibition de l'expression de P2X3R, par des oligonucléotides antisens ou par un antagoniste spécifique, l'A-317491, provoque un effet anti-hyperalgésique lors de douleurs inflammatoires chroniques^{142,143}. Ces résultats sont donc contradictoires, suggérant des changements adaptatifs dans le modèle KO.

INTRODUCTION : La signalisation purinergique

▪ P2X4R

P2X4R joue également un rôle dans les douleurs neuropathiques. En effet, l'inactivation génétique de P2X4R ou son inhibition par des oligonucléotides antisens réduit l'allodynie provoquée par la douleur neuropathique sans affecter les réponses à la douleur aiguë¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Dans ces modèles de lésion de nerf périphérique, l'expression de P2X4R est induite dans les microglies spinales^{145,146}. En outre, l'administration intrathécale de microglies exprimant P2X4R et préalablement stimulées à l'ATP provoque une allodynie chez des animaux naïfs, suggérant que les P2X4 microgliaux activés sont suffisants pour produire une allodynie tactile¹⁴⁵. Dans une étude de 2005, Coull et *al.* montrent que la libération de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) par les microglies est nécessaire à l'induction de l'allodynie tactile¹⁴⁷. Le BDNF, en se fixant sur le récepteur TrkB, entraîne, probablement *via* une régulation négative du transporteur chlorure-potassique KCC2, une diminution de l'inhibition GABAergique, menant à une hyperexcitabilité neuronale¹⁴⁷. Par la suite, Ulmann et *al.* démontrent que l'activation de P2X4R dans les microglies mène à une libération de BDNF¹⁴⁶ (Figure 7).

P2X4R a également été impliqué dans la douleur inflammatoire. En effet, les souris n'exprimant pas P2X4R ne développent pas d'hypersensibilité suite à l'injection en périphérie de divers composés inflammatoires. Suite à ces injections, l'activation des P2X4R dans les macrophages conduit à l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) et de la cyclooxygénase (COX) et par conséquent à la synthèse de prostaglandine E2 (PGE2)¹⁴⁸. Plus récemment, il a été montré que les P2X4R neuronaux étaient également impliqués dans la douleur inflammatoire. Suite à une inflammation chronique, P2X4R est surexprimé dans des neurones de ganglion rachidien et déclenche la libération autocrine de BDNF causant ainsi une hyperexcitabilité neuronale spinale¹⁴⁹.

Dans ces études, l'utilisation de souris P2X4R-KO ne permet pas de discriminer les effets des P2X4R neuronaux de ceux exprimés par les microglies et macrophages. Des modèles d'inactivation spécifique de chaque type cellulaire sont donc nécessaires afin de mieux définir l'implication de P2X4R dans la douleur.

▪ P2X7R

P2X7R est également impliqué dans les douleurs inflammatoires et neuropathiques. En effet, après lésions neuropathiques, P2X7R est surexprimé dans la moelle épinière¹⁵⁰⁻¹⁵² et les animaux P2X7R-KO ne développent pas d'hypersensibilité. De même, après une injection de

CFA, les souris P2X7R-KO montrent une hypersensibilité réduite¹⁵⁰. L'implication de P2X7R a été confirmée par l'utilisation d'antagonistes de P2X7R, qui supprime le développement de l'hypersensibilité mécanique^{151,152}. En outre, l'étude de Chessel et *al.* révèle une augmentation de l'Interleukine-1 β (Il-1 β) après inflammation, qui est réduite chez les animaux P2X7R-KO¹⁵⁰. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que des animaux KO pour l'Il-1 β présentent une diminution de l'hyperalgésie thermique et mécanique suite à l'injection de CFA ainsi qu'une allodynie réduite dans des modèles de douleurs neuropathiques¹⁵³. Ainsi ces études montrent que la douleur inflammatoire ou neuropathique implique l'activation des récepteurs P2X7R par l'ATP et la libération de l'Il-1 β .

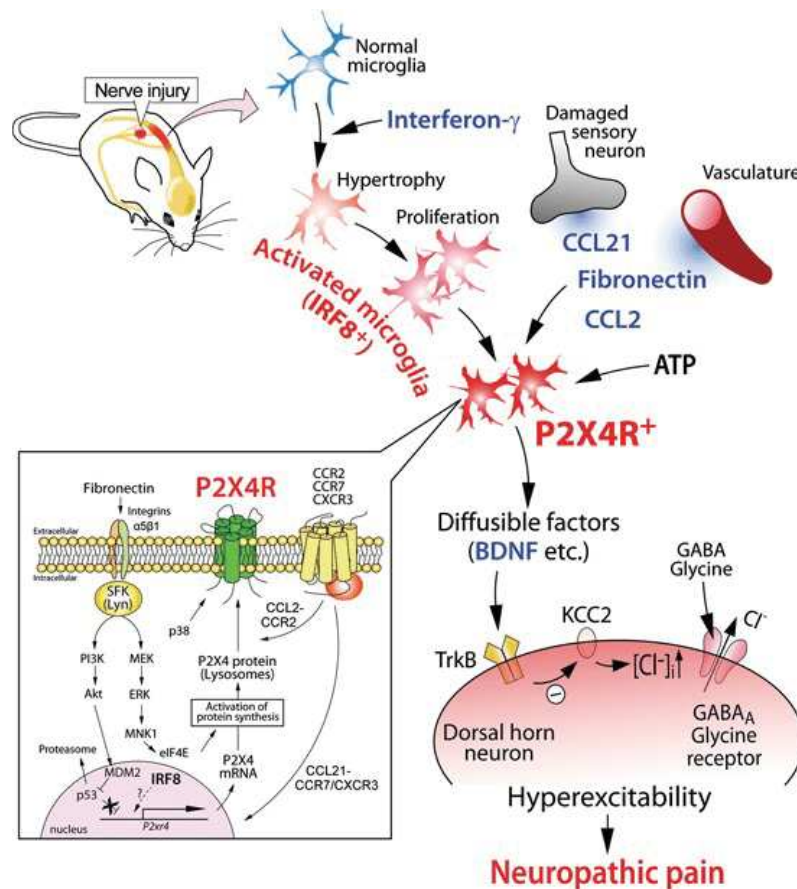


Figure 7 : Mode d'action de P2X4R dans la douleur neuropathique

La lésion nerveuse périphérique active les microglies de la corne dorsale de la moelle épinière. P2X4R, induit dans ces microglies, est activé par l'ATP et provoque la libération autocrine de BDNF. Dans les neurones de la corne dorsale, le BDNF régule négativement l'expression du transporteur KCC2 à la membrane, par l'intermédiaire de TrkB. Cette diminution de KCC2 entraîne une augmentation de la concentration de chlore intracellulaire, ce qui altère le potentiel ionique de la membrane. Les neurones inhibiteurs GABAergiques, normalement hyperpolarisants, deviennent dépolarisants et leur activation résulte en une hyperexcitabilité des neurones. D'après Tsuda et *al.* (2013)

Les P2XR dans l'épilepsie

Très tôt, des études ont montré l'implication de l'ATP dans l'épilepsie. En effet, l'application d'ATP exogène entraîne une hypersensibilité neuronale et déclenche des crises épileptiques. De plus, l'altération de la libération vésiculaire d'ATP diminue la fréquence des crises et les dommages neuronaux¹⁵⁴. L'expression de P2X7R est augmentée chez les patients épileptiques¹⁵⁴ ainsi que dans les neurones et les microglies de l'hippocampe¹⁵⁵ et du neocortex¹⁵⁶ chez les souris après un *Status Epilepticus*. Dans un modèle d'injection de kaïnate dans l'amygdale, Engel et *al.* montrent que l'activation de P2X7R augmente la durée des crises tandis que l'utilisation d'antagonistes de P2X7R les diminue. Ils remarquent également une diminution de l'amplitude des crises chez les souris P2X7R-KO¹⁵⁵. Des résultats similaires ont été retrouvés lors de l'injection de kaïnate dans les ventricules¹⁵⁶, suggérant un rôle délétère de P2X7R dans l'épilepsie. Suite à une crise d'épilepsie, la libération de molécules inflammatoires va participer aux dommages neuronaux¹⁵⁷. Au vu de l'implication de P2X7R dans l'inflammation, il est intéressant de noter qu'une diminution d'Il-1 β mature ainsi que de la réactivité microgliale sont observées chez les animaux épileptiques traités avec des antagonistes de P2X7R.

Au contraire, plusieurs études de Kim et *al.* suggèrent que P2X7R aurait un rôle bénéfique. En effet, dans un modèle d'injection de pilocarpine (un agoniste des récepteurs cholinergiques), les animaux P2X7R-KO montrent une plus grande susceptibilité aux crises épileptiques¹⁵⁸. De même, des animaux WT traités avec des antagonistes de P2X7R montrent une plus grande susceptibilité et une augmentation de la mort neuronale^{158,159}. Ainsi, l'implication, bénéfique ou délétère, de P2X7R reste encore à éclaircir.

Il a également été montré que P2X4R est impliqué dans l'épilepsie. Cependant, des conclusions divergentes sont observées concernant l'expression de P2X4R après induction du *Status Epilepticus*. Engel et *al.* n'observent pas de changement dans l'expression de P2X4R après induction de *Status Epilepticus* dans un modèle d'injection de kaïnate dans l'amygdale¹⁵⁵ tandis que Dona et *al.* mettent en avant une diminution de P2X4R dans l'hippocampe dans un modèle d'injection de pilocarpine¹⁶⁰. Au contraire, dans un modèle d'injection de kaïnate intrapéritonéale, une augmentation de l'expression de P2X4R dans l'hippocampe est observée^{161,162}; P2X4R est induit dans les microglies 48h après le *Status Epilepticus*¹⁶². En outre, l'utilisation de souris P2X4R-KO permet de mettre en évidence une diminution de la réactivité microgliale accompagnée d'un changement de propriétés de ces cellules. Une diminution de l'expression de gènes pro-inflammatoires ainsi qu'une diminution

de la mort neuronale sont également observées chez ces animaux¹⁶¹. L'absence de P2X4R semble donc avoir un effet bénéfique dans ce contexte. Cependant, P2X4R étant également exprimé par les neurones, des modèles de délétion conditionnelle du gène sont nécessaires afin d'étudier plus précisément le rôle de P2X4R dans l'épilepsie.

Dans l'ensemble, les études portées sur les P2XR montrent leurs implications dans des processus physiologiques et pathologiques. Exprimés par les neurones et les cellules gliales, ils jouent un rôle essentiel dans la transmission nerveuse mais sont également importants dans diverses pathologies.

1.2.4 Focus sur P2X4R : propriétés et spécificités

P2X4R présente les caractéristiques typiques des P2XR décrites ci-dessus. P2X4R a une perméabilité calcique élevée⁹⁸, est largement exprimé dans les neurones et microglies et est impliqué dans diverses pathologies¹⁴⁶. P2X4R étant le récepteur au centre des travaux de cette thèse, la partie suivante s'attardera à détailler ses propriétés.

a) Propriétés générales

P2X4R est l'un des P2XR les mieux conservés parmi les vertébrés. A ce jour, les ADNc de P2X4R de rat, de souris, d'embryon de poulet, de *Xenopus* et d'humain ont été clonés⁴². Le gène *p2xr4* contient 12 exons et la protéine est constituée de 384 acides aminés. Chez l'humain, le gène *p2rx4* est situé sur le chromosome 12⁴². Le P2X4R de poisson-zèbre est le premier P2XR dont la structure a été cristallisée (cf. §1.2.3a). La structure du P2X4R de rat a été partiellement cristallisée et est similaire à celle du poisson-zèbre¹⁶³.

Fonctionnalité du récepteur

Les récepteurs P2X4 sont activés par des concentrations micromolaires d'ATP (cf. Tableau 2) et désensibilisent lentement⁹⁸ (cf. Figure 5). Ils présentent l'une des perméabilités calciques les plus élevées parmi les P2XR, avec une perméabilité proche de $P_{Ca}/P_{Na} \approx 4.2$ ⁹⁸. P2X4R présente également des propriétés de dilatation du pore. En effet, lors de l'application prolongée d'ATP, P2X4R devient perméable aux larges cations tels que le NMDG^{+164,165}. Cet effet semble être dépendant de la concentration en calcium¹⁶⁵ et implique des changements structuraux¹⁶⁶.

INTRODUCTION : La signalisation purinergique

Adressage à la membrane et internalisation

P2X4R a beaucoup été étudié pour ses propriétés particulières d'internalisation. Dans les neurones, microglies et macrophages péritonéaux, P2X4R est principalement localisé au sein des endosomes précoces et des lysosomes^{167,168}. En effet, P2X4R est rapidement internalisé de manière constitutive mais également suite à son activation¹⁶⁷. Cette internalisation semble être dépendante de la dynamine et de la clathrine^{167,169}. Comme tous les P2XR, P2X4R possèdent un motif d'internalisation YXXXXK en C-terminal (cf. §1.2.3b). Cependant, ils possèdent, en aval de ce dernier, un motif distinct YXXGL, qui est responsable de son internalisation rapide¹⁶⁹. L'internalisation *via* ce motif est dépendante de la clathrine et ce motif interagit avec la sous-unité $\mu 2$ de la protéine adaptatrice AP2¹⁶⁹. Qureshi et *al.* ont également identifié un motif dileucine responsable de l'internalisation, localisé dans la partie N-terminale de la protéine. En outre, ils montrent que des mutations simultanées sur ce motif dileucine et sur le motif YXXGL amplifient cette diminution, suggérant que ces deux motifs contribuent indépendamment à l'endocytose de P2X4R¹⁶⁸. Enfin, cette étude montre que les P2X4R lysosomaux résistent à la dégradation lysosomale grâce aux N-glycanes qu'ils possèdent.

Récemment, Fois et *al.* ont montré que l'internalisation des P2X4R dans des compartiments acides est essentielle pour la resensibilisation du récepteur car il facilite la protonation et déprotonation de résidus histidine¹⁷⁰. Suite à une stimulation de l'exocytose des lysosomes par la ionomycine, l'expression et la réponse de P2X4R à la membrane sont accrues, suggérant que les P2X4R lysosomaux peuvent être mobilisés afin d'augmenter la réponse à l'ATP.¹⁶⁸

La localisation lysosomale de P2X4R a entraîné un intérêt particulier pour son rôle intracellulaire. En effet, la concentration d'ATP étant élevée dans les lysosomes¹⁷¹, la présence de P2X4R et de son agoniste naturel dans ces vésicules laisse supposer que P2X4R pourrait être activé. Huang et *al.* ne trouvent que peu de courant dans ces vésicules à un pH de 4,6, tandis qu'un pH de 7,4 induit l'apparition de courant P2X4R¹⁷¹. Cette sensibilité au pH est également connue pour les P2X4R situés à la membrane et le résidu His286 du P2X4R humain a été identifié comme responsable de cette sensibilité⁵³. Par la suite, Cao et *al.* montrent que l'activation de P2X4R suite à une alcalinisation des lysosomes promeut la fusion des lysosomes et des endosomes. Plus précisément, l'activation de P2X4R conduit à une augmentation de calcium, activant la calmoduline. Cette dernière va interagir avec P2X4R afin de promouvoir la fusion des vésicules¹⁷². L'activation de P2X4R dans les lysosomes est donc dépendante du pH et semble déclencher une fusion vésiculaire. Dans des

conditions physiologiques, bien que l'ATP et P2X4R soient abondants dans les lysosomes, les P2X4R restent inactifs dû au pH acide.

Récepteur hétéromère de P2X4R

Similairement à la majorité des P2XR, P2X4R forme des hétéromères avec des sous-unités différentes. Torres et *al.* montrent que P2X4R s'associe avec P2X5R et P2X6R dans un système hétérologue⁶⁵. Dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, P2X4R est capable de former des hétéromères avec P2X1R. Ces hétéromères montrent des propriétés cinétiques similaires à P2X4R mais une pharmacologie semblable à celle de P2X1R¹⁷³.

Egalement dans des ovocytes des *Xenopus laevis*, il a été montré que P2X4R et P2X6R forment des hétéromères fonctionnels présentant des profils électrophysiologiques et pharmacologiques distincts des homomères P2X4R¹⁷⁴. Ces hétéromères sont également exprimés en système recombinant dans des cellules HEK et présentent une localisation similaire à celle de P2X4R¹⁶⁷. La localisation de ces deux récepteurs au sein de même cellule^{117,175} a mené à spéculer sur leur hétéromérisation. En effet, P2X4R et P2X6R sont exprimés dans les neurones de l'hippocampe et dans les cellules de Purkinje du cervelet, cependant aucune étude n'a, à ce jour, démontré l'existence fonctionnelle de ces hétéromères dans ces structures.

Enfin, comme discuté précédemment, des études se sont attardées sur l'interaction entre P2X4R et P2X7R. Les études, controversées, semblent plutôt montrer que ces récepteurs ne forment pas d'hétéromères mais se comportent comme deux homotrimères qui interagissent entre eux (cf. §1.2.3a).

b) Pharmacologie

Les agonistes

L'ATP active les récepteurs P2X4 avec des EC₅₀ estimées entre 3 µM et 10 µM. P2X4R est également activé par différents agonistes tels que l'ATPγS, le 2-meSATP et le BzATP¹¹¹ (cf. Tableau 2). Par ailleurs, le potentiel agoniste de l'αβmeATP est dépendant de l'espèce considérée. Ainsi, longtemps considéré comme inactif sur les P2X4R de rat, l'αβmeATP agit comme un agoniste sur les P2X4R de souris et d'humain¹⁷⁶. P2X4R est également activé par les diadenosines polyphosphates ; AP4 ayant un fort potentiel (EC₅₀ entre 2 µM et 10 µM)^{111,177}. Du côté des modulateurs allostériques, P2X4R est potentialisé par le bleu de

INTRODUCTION : La signalisation purinergique

cibracon¹⁷⁸ et le reactive blue¹⁷⁴. Cependant l'agoniste allostérique de P2X4R le plus remarquable est l'ivermectine.

Le cas de l'ivermectine

L'ivermectine (IVM) est un modulateur allostérique positif de P2X4R. Ne potentialisant pas les courants des autres P2XR, l'IVM paraît spécifique de P2X4R¹⁷⁹ ; il semble cependant pouvoir moduler P2X7R humain¹⁸⁰. Bien qu'il ait été proposé que l'IVM agisse en augmentant le nombre de récepteurs à la membrane⁸⁴, de nombreuses études montrent que l'IVM agit de manière allostérique¹⁸¹⁻¹⁸³. L'IVM potentialise les courants P2X4R en augmentant leur amplitude, le temps de désactivation de P2X4R ainsi que son affinité pour l'ATP¹⁷⁹. Ces phénomènes sont déclenchés par des mécanismes différents et Priel et *al.* montrent l'existence de deux sites d'affinité différents pour l'IVM. Un premier site, de haute affinité, module l'amplitude du courant sans changer le temps de désactivation tandis qu'un deuxième site, de plus basse affinité, prolonge la cinétique de désactivation¹⁸⁴. Des études utilisant des chimères de récepteurs P2X2R et P2X4R ont mis en évidence l'importance des domaines transmembranaires dans les effets produits par l'IVM^{181,182}. En effet, les chimères P2X2R contenant les domaines transmembranaires de P2X4R sont sensibles à l'IVM¹⁸². Plus précisément, la séquence V49-V61 de P2X4R est importante pour l'effet de l'IVM sur la désactivation du récepteur¹⁸¹. De nombreuses études se sont ensuite attardées à identifier les résidus impliqués dans la potentialisation par l'IVM. A l'aide de mutagénèses dirigées, de multiples sites d'interaction ont été identifiés, permettant de supposer que l'IVM agit en s'insérant entre deux hélices transmembranaires adjacentes¹⁸³.

Les antagonistes

Contrairement aux autres sous-unités, P2X4R est relativement insensible à la suramine. P2X4R de rat est également insensible au PPADS tandis que ce dernier agit comme antagoniste sur les orthologues souris et humain¹⁷⁶. Le Brilliant Blue G (BBG) est un faible antagoniste tandis que le TNP-ATP inhibe les courants P2X4R avec une IC₅₀ de 15 µM¹¹¹ (cf. Tableau 2). Plus récemment, le 5-(3-Bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-one (5-BDBD) a été caractérisé comme fort antagoniste de P2X4R¹⁸⁵. Le 5-BDBD inhibe les courants P2X4R avec une IC₅₀ de 0,75 µM et semble spécifique de ce récepteur. En effet, le 5-BDBD utilisé à 10 µM inhibe fortement les courants P2X4R mais n'a pas d'effets sur P2X2R et P2X7R. A cette concentration, il semble cependant inhiber les courants P2X1R et P2X3R, de 13% et 35% respectivement. En comparaison, dans les mêmes conditions, le

courant P2X4R est inhibé à 83%¹⁸⁶. Le 5-BDBD peut donc être considéré comme un fort antagoniste montrant une préférence pour P2X4R plutôt que pour les autres sous-unités, bien que son action sur P2X1R et P2X3R ne soit pas totalement négligeable.

c) Les modèles murins d'étude de P2X4R

Afin d'étudier les rôles de P2X4R dans des contextes physiologiques et pathologiques, des modèles de knock-out pour P2X4R ont été générés. Trois modèles de KO sont référencés (Figure 8). Dans la première souris générée, une cassette neomycine a été utilisée afin de supprimer les exons 3, 4 et 5 de *p2xr4*. Dans ce KO, la cassette neomycine est encadrée par deux sites loxP et remplace les exons 3, 4 et 5. Cette dernière est ensuite éliminée avec une CRE recombinase¹⁸⁷. Dans le second modèle, une cassette LacZ/Neomycine a été utilisée afin de remplacer une région comprenant le premier exon ainsi qu'une partie du premier intro¹²⁹ (Figure 15). Enfin, dans la dernière souris P2X4R-KO, un court fragment de l'exon 2 est remplacé par une cassette IRES-lacX/Neomycine¹⁸⁸.

P2X4R étant exprimé de façon ubiquitaire dans divers organes et dans différents types cellulaires, l'utilisation de modèles KO spécifiques serait plus pertinent afin d'étudier précisément son rôle dans diverses fonctions. Récemment, divers modèles utilisant un système CRE/lox ont été générés. Des souris, contenant un gène *p2xr4* dans lequel deux sites loxP ont été insérés, sont croisées avec des souris exprimant spécifiquement la CRE recombinase dans les cellules d'intérêt. Les souris issues de ces croisements sont alors privées d'un gène *p2xr4* fonctionnel exclusivement dans les cellules exprimant la CRE recombinase. Ainsi, des modèles de délétion de P2X4R spécifiquement dans des cellules myéloïdes¹⁸⁹ ou dans des cellules endothéliales vasculaires¹⁹⁰ ont pu être générés.



Figure 8 : Représentation des gènes *p2xr4* mutés des modèles knock-out

Représentation du locus de *p2xr4* wild-type (haut) ainsi que des différents KO. De haut en bas: Wild-type, mutant généré par Yamamoto et *al.* (2006), mutant généré par Sim et *al.* (2006), mutant généré par Brone et *al.* (2007). D'après Kaczmarek-Hájek (2012)

2 Les microglies et les récepteurs purinergiques

2.1 Les microglies, cellules immuno-compétentes du CNS

Initialement décrites il y a plus de 100 ans, les microglies sont les macrophages résidents du SNC. Présentées comme pouvant adopter deux états différents, « quiescent » et « réactif », les microglies sont capables de s'adapter rapidement à leur environnement. En condition physiologique, les microglies sont dans un état homéostatique dans lequel elles adoptent une morphologie ramifiée et surveillent constamment leur environnement. Lors d'une perturbation, les microglies deviennent réactives, adoptent une forme amiboïde, et acquièrent des fonctions spécifiques leur permettant de répondre à cette perturbation. Longtemps décrites comme adoptant seulement ces deux états, « quiescent » et « réactifs », passant progressivement d'un état ramifié à amiboïde, cette conception des microglies a évolué au cours des dernières années avec de nombreux travaux montrant que l'« activation » des microglies ne se limite pas un système « on/off » dichotomique, mais qu'il existe un large éventail de profil d'activation et de phénotypes microgliaux.

2.1.1 Origine des microglies

a) Découverte et première description

Les microglies ont été décrites pour la première fois en 1919 par Pío del Río-Hortega¹⁹¹. Dans une série de papiers publiés successivement, il décrit la morphologie et la distribution des microglies dans des cerveaux sains et pathologiques. Il commence par la découverte des cellules microgliales, les distinguant des cellules neuronales, vasculaires et astrogliales. Ces cellules ont un petit soma et de longs et fins prolongements, partant du soma et formant des protrusions complexes. Il mentionne leur présence dans tout le cerveau, à des densités plus ou moins grandes. Il montre ensuite que ces cellules, décrites dans des cerveaux sains, se transforment en conditions pathologiques et correspondent à des cellules qui ont été auparavant observées dans diverses pathologies mais dont l'origine était inconnue. Del Río-Hortega montre que ces cellules, décrites par Nissl et Alzheimer comme des « cellules en batonnet » et des cellules « granuloadiposes », sont d'origine microgliale. Enfin, il suggère que ces cellules prennent leur origine dans le mésoderme et met en avant certaines de leurs caractéristiques fonctionnelles telles que leur capacité migratoire ou phagocytaire¹⁹¹.

b) Origine des microglies

Bien qu'il ait été suggéré que les microglies dérivent des monocytes périphériques infiltrant le cerveau¹⁹², il est maintenant bien établi que les microglies forment une population cellulaire unique, distincte des macrophages. Les microglies dérivent des progéniteurs du mésoderme, ayant leur origine dans le sac vitellin^{193,194}. Elles dérivent de progéniteurs myéloïdes quittant le sac vitellin au 8^e-9^e jour du développement embryonnaire (E8-E9) afin de coloniser le tube neural avant la formation de la barrière hémato-encéphalique¹⁹⁴. Suite à leur entrée dans le cerveau, les microglies se développent en proliférant activement durant la gestation ainsi que pendant les deux semaines suivant la naissance¹⁹³.

Les gènes impliqués dans la différenciation de ces progéniteurs en microglies matures ne sont que partiellement connus. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme nécessaires au développement des microglies. Parmi eux, le récepteur CSF-1R (colony-stimulating factor receptor), l'interleukin-34 (IL-34), le facteur de transcription PU.1 et l'IRF-8 (interferon regulatory factor 8) ont été décrits comme nécessaires¹⁹⁵. Ces cellules subsistent tout au long de la vie et se maintiennent grâce à leur auto-renouvellement, indépendamment des macrophages périphériques^{196,197}.

2.1.2 Les microglies à l'état homéostatique

Les microglies à l'état homéostatique présentent un petit soma et de nombreux longs prolongements s'étendant dans toutes les directions. Longtemps considérées comme « quiescentes », il est maintenant établi que les microglies jouent un rôle de surveillance dans le parenchyme, étant à l'affût de perturbations et de signaux de danger grâce à leurs prolongements hautement motiles¹⁹⁸. Il a aussi été mis en évidence que les microglies participent à certaines fonctions du SNC en conditions physiologiques, notamment durant le développement^{199,200}. Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à cet état homéostatique et différents acteurs nécessaires pour son maintien ont été identifiés. Par exemple, le canal potassique THIK1 promeut la ramification des microglies ainsi que la surveillance du parenchyme²⁰¹ tandis que Mef2C (Myocyte-specific enhancer factor 2C) agit en restreignant la réponse inflammatoire²⁰². Enfin le facteur de transcription Sall1, dont l'expression est restreinte aux microglies dans le SNC, inhibe la réactivité microgliale et promeut le phénotype de surveillance. En effet, l'inactivation de Sall1 mène à une morphologie altérée des microglies (adoptant un soma plus large et des prolongements courts et épais) ainsi qu'à une augmentation des gènes codant pour des protéines inflammatoires,

INTRODUCTION : Les microglies et les récepteurs purinergiques

suggérant que l'inactivation de *Sall1* résulte en la conversion des microglies d'un état homéostatique à un état inflammatoire²⁰³.

Il a également été montré que les microglies participent aux fonctions du SNC sain²⁰⁴. En effet, les microglies, *via* leur prolongements, contactent directement les terminaisons pré-synaptiques et les épines dendritiques²⁰⁵ et jouent un rôle important dans la formation des synapses durant le développement²⁰⁶.

a) Rôle des microglies dans l'élimination des synapses au cours du développement

Durant le développement du SNC, les connexions synaptiques sont formées en excès et doivent être remodelées afin de former des circuits neuronaux matures. A ces fins, certaines synapses sont éliminées tandis que celles qui subsistent seront renforcées²⁰⁷. Les microglies jouent un rôle essentiel dans l'élimination des synapses en phagocytant les synapses en excès. En effet, dans le cortex visuel, les microglies sont en contact avec de petites épines dendritiques et leur suivi en microscopie au cours du temps montre que ces dernières tendent à disparaître, suggérant ainsi que les microglies sont impliquées dans leur élimination²⁰⁵. Ce rôle des microglies a également été démontré dans l'hippocampe au cours du développement. Dans cette structure, les prolongements microgliaux co-localisent avec SNAP25 et PSD95, suggérant que les microglies agissent tant sur les compartiments pré-synaptiques que post-synaptiques¹⁹⁹. Plus récemment, l'implication du récepteur du complément CR3, exprimé dans les microglies, dans l'élimination des synapses a été démontrée. En effet, la phagocytose des synapses est diminuée dans les souris CR3-KO, qui présentent une altération du remodelage des circuits neuronaux²⁰⁰.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montre que, au cours du développement, les microglies jouent un rôle majeur dans le modelage des circuits neuronaux en éliminant les synapses excédentaires.

b) Les microglies dans la plasticité synaptique et l'apprentissage dans le CNS adulte

Des études récentes se sont également intéressées aux rôles des microglies dans le SNC sain adulte. Ainsi, une étude de 2011 montre l'implication des microglies dans la plasticité à long terme et dans l'apprentissage. En effet, Rogers et *al.* montrent que la délétion du récepteur de la fractalkine *Cx3cr1*, exclusivement exprimé par les microglies dans le SNC, mène à des défauts de rétention mnésique ainsi qu'à un défaut d'apprentissage moteur. De plus, la LTP est altérée, étant presque totalement absente dans l'hippocampe de souris *Cx3cr1-KO*²⁰⁸. Cependant, *Cx3Cr1* est également exprimé dans les macrophages périphériques et la délétion

du gène dans une souris KO affecte aussi bien les microglies que les macrophages. Parkhurst *et al.* génèrent alors une stratégie permettant d'éliminer exclusivement les microglies²⁰⁹. Dans ce modèle, la suppression des microglies conduit à une altération de l'apprentissage moteur, accompagnée d'une réduction de la formation de synapses dépendante de cet apprentissage. De manière intéressante, la délétion du BDNF spécifiquement dans les microglies entraîne des déficits cognitifs et une altération synaptique similaire à ceux des souris privées de microglies. Cette étude suggère que le BDNF agit par l'intermédiaire de TrkB afin de réguler l'expression des récepteurs synaptiques NMDA²⁰⁹.

Il semblerait donc que, dans le SNC adulte, les microglies modulent la formation de synapses, la LTP et par conséquent les processus d'apprentissage.

2.1.3 Réactivité microgliale

Les microglies surveillent constamment le parenchyme et sont capables de détecter rapidement des perturbations de l'état homéostatique. Le cas échéant, les microglies acquièrent une morphologie et des fonctions adaptées et deviennent « réactives ».

a) Activation des microglies

De nombreuses conditions, telles que les infections, les traumatismes ou une altération de l'activité neuronale peuvent induire l'activation des microglies. Les microglies sont capables de reconnaître et de réagir à de nombreux signaux présents dans l'environnement (Tableau 3). Ces derniers ont en commun de refléter une menace pour l'intégrité fonctionnelle et structurelle du SNC.

Deux principaux types de signalisation déclenchent une réponse microgliale. La première est un signal « actif » avec l'apparition d'un signal anormal. Ceci peut être un élément qui n'est pas usuellement présent (e.g. lors d'une infection), un élément présent à une concentration anormale (e.g libération de composés intracellulaires) ou un élément ayant une conformation inhabituelle (e.g agrégation de protéines)²¹⁰. Ces signaux sont des témoins de l'agression du SNC et vont déclencher une réaction microgliale. Le deuxième type de signalisation s'apparente à une perte de signal homéostatique. Certains récepteurs ou voies de signalisation, tels que la voie Cx3CL1-Cx3cr1, sont nécessaires au maintien de l'état homéostatique et leur perturbation entraîne une alerte et une activation²¹¹.

Class of compound	Examples
Surface structures and DNA/RNA of viral, bacterial or fungal origin	Agonists of members of the pattern recognition receptor families, notably TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR6/2 and TLR9, such as bacterial LPS or cell wall proteoglycans and lipoteichoic acid (LTA), gp41, gp120 (the TLR4-agonistic LPS serving as a common model agent)
Abnormal endogenous proteins	β -amyloid (aggregates), A β 25-35, A β 40-42, prion protein (PrP)
Complement	Complement factors C1q, C5a
Antibodies	Immunoglobulin of various classes and isotopes (IgA, IgG, IgM), presented in immune complexes
Chemokines	Ligands for chemokine receptors : CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR, CXCR4, CX3CR1, IL-8R
Neurotrophic factors	Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF), neurotrophic 3 (NT-3), NT-4
Plasma components	Albumin, fibronectin, fibrinogen, thrombin
Other proteins and peptides	Apolipoprotein E (ApoE), heat shock proteins hsp60 and hsp70, CD40L, melanocyte-stimulating hormone (MSH), endothelium, S100 proteins, vasoactive intestinal peptide (VIP)
Neurotransmission-related compounds	ATP (and related purines), β -adrenergic agonists, glutamate, kainite, NMDA
Ions	K^+ , MN^{2+}
Other compounds	Cannabinoids, ceramide, gangliosides, lysophosphatidic acid (LPA), melatonin, opioids (endomorphines), platelet-activating factor (PAF), prostaglandin E_2 (PGE_2), steroid hormones, vitamin D_3

Tableau 3 : Exemples de signaux et de modulateurs de l'activation microgliale

D'après Hanisch et Kettenmann (2007)

b) Changement de morphologie

Suite à la détection de signaux de dangers, les microglies subissent un changement morphologique, passant d'un état ramifié à un état amiboïde. Au cours de leur activation, les microglies adoptent un soma plus gros et des prolongements plus courts, plus épais, moins nombreux et moins complexes. Les microglies existent sous plusieurs morphologies différentes selon leur degré de ramification et d'activation²¹² (Figure 9).

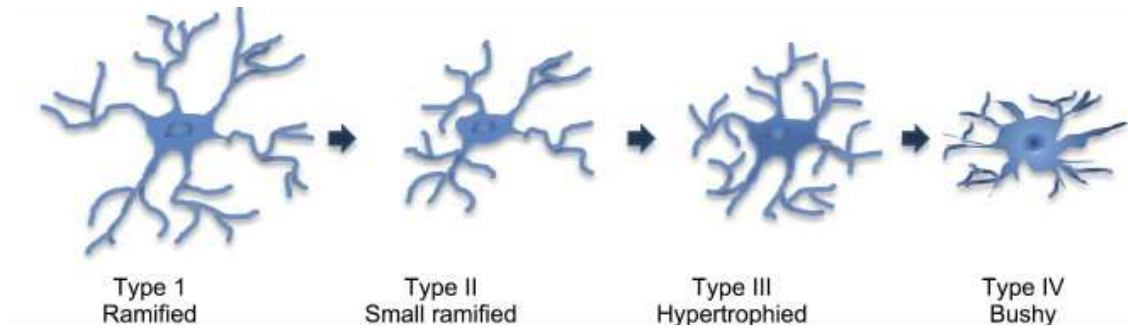


Figure 9 : Schéma des différentes morphologies des microglies au cours de leur activation

Les microglies peuvent adopter plusieurs morphologies selon leur degré de ramification. D'après Walker et *al.* (2014)

c) Profils d'activation des microglies

Au cours de leur activation, les microglies acquièrent des fonctions spécifiques telles que des capacités phagocytaires, de libération de cytokines et de facteurs trophiques. Le phénotype des microglies réactives a longtemps été classifié en deux états différents et opposés, M1 et M2, par analogie aux macrophages. Le phénotype M1, classique, représente un état pro-inflammatoire, libérant des molécules telles que des ROS et des cytokines pro-inflammatoires. Le phénotype M2, quant à lui, représente un état anti-inflammatoire, dans lequel les cellules produisent des facteurs trophiques et des cytokines anti-inflammatoires²¹³. Cependant, cette classification ne reflète pas la variété des phénotypes microgliaux observée dans le SNC et il est maintenant admis que cette classification, trop simple, ne peut servir à caractériser l'ensemble des différents états microgliaux. En effet, diverses études récentes montrent une grande hétérogénéité microgliale dépendante de la région du cerveau, de l'âge mais également du contexte pathologique²¹⁴⁻²¹⁶.

d) Fonctions de la microglie activée

Chimiotaxie

Suite à leur activation, les microglies sont recrutées au niveau du site de lésion, guidées par divers signaux tels que l'ATP et des chimiokines²¹⁷. Après leur détection, les microglies réorientent leurs prolongements vers le site d'altération et subissent un processus de déramification partielle ou totale afin de développer des structures semblables à des filopodes, qui leur permettent de devenir totalement mobiles²¹². La motilité des cellules est régulée par des voies de signalisation intracellulaire diverses. Bien que ces voies ne soient pas encore

INTRODUCTION : Les microglies et les récepteurs purinergiques

bien comprises, des études ont montré l'implication de différents acteurs tels que la PI3K, PLA2, les P2YR et la PKA²¹⁸.

Phagocytose

Quelque soit leur état d'activation, les microglies sont capables de phagocytose. La phagocytose est un processus complexe permettant d'ingérer et d'éliminer les agents pathogènes, débris cellulaires et tout autre agent perturbant l'homéostasie. Dans le CNS, la phagocytose est un processus essentiel pour le développement des circuits neuronaux et le maintien de l'homéostasie. En effet, ce processus permet l'élimination de cellules apoptotiques, de débris cellulaires mais permet aussi le développement correct du SNC en éliminant les synapses²¹⁹. La phagocytose joue également un rôle dans des contextes pathologiques, éliminant des agents « anormaux ». Ainsi, dans la maladie d'Alzheimer, la phagocytose par les microglies est impliquée dans le processus d'élimination du peptide A β . Dans la sclérose en plaque, les débris de myéline sont phagocytés par les microglies et dans la maladie de Parkinson, l' α -synucleine promeut la phagocytose²²⁰. La phagocytose est donc un processus essentiel et majoritairement bénéfique. Cependant, des études ont montré que les microglies sont capables de phagocyter des cellules altérées mais viables. Ce phénomène de « phagoptose » pourrait aggraver la mort neuronale dans certaines maladies neurodégénératives²²¹.

Libération de divers facteurs au cours de l'inflammation

- Le versant pro-inflammatoire

L'inflammation est un processus fondamental de réponse contre les organismes exogènes ou endogènes représentant un danger. Elle est médiée par la production de cytokines, chimiokines, de ROS et de messagers secondaires, pouvant être produits par différents types de cellules tels que les microglies, les astrocytes et les cellules endothéliales. Le degré de l'inflammation est dépendant de sa durée, du contexte et de la lésion. Dans le SNC, les microglies sont les acteurs au centre de l'inflammation de par leurs fonctions.

Comme décrit précédemment, lors de leur activation, les microglies adoptent des profils particuliers et peuvent libérer un certain nombre de molécules. Une fois recrutées sur le site de lésions, les microglies vont sécréter des molécules pro-inflammatoires. Elles adoptent donc un profil analogue à l'état M1 des macrophages et produisent des cytokines telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β ainsi que des chimiokines telles que CCL2 et CCL5. Les microglies expriment également la NADPH oxydase et peuvent libérer des ROS²²². Dans cet état, les

microglies tendent à transitoirement amplifier la réponse inflammatoire²²³. Cependant, une activation chronique est parfois observée. Celle-ci est délétère et mène à une neurotoxicité²²⁴, comme il a pu être observé dans des maladies neurodégénératives²²⁵.

- Le versant anti-inflammatoire

Les microglies peuvent également adopter un phénotype anti-inflammatoire et « réparateur », se rapprochant ainsi d'un état M2. Dans cet état, les microglies libèrent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β . Elles sont également capables de libérer des facteurs de croissance tels que l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor I), le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le CSF-1 ainsi que des facteurs neurotrophiques tels que le NGF (Nerve Growth Factor) ou le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor)²²².

Ainsi les microglies acquièrent des fonctions diverses, leur conférant une double qualité, à la fois pro-inflammatoire et anti-inflammatoire, leur permettant de répondre efficacement aux perturbations du SNC.

2.1.4 Les marqueurs microgliaux

Les microglies expriment de multiples marqueurs de macrophages. Ainsi, elles expriment le récepteur CSF-1R, l'intégrine Cd11b, la phosphatase Cd45, la glycoprotéine de surface F4/80, le récepteur CD200R, le récepteur de la fractalkine Cx3cr1 ainsi que la protéine Iba-1¹⁹⁵. Ces protéines étant exprimées par les macrophages et les microglies, il est difficile de les utiliser afin de différencier ces deux types cellulaires. Cependant, le niveau d'expression de certaines protéines diffère entre les microglies et les macrophages, pouvant ainsi servir de marqueurs pour les différencier. A titre d'exemple, les microglies expriment plus faiblement la protéine Cd45 comparativement aux macrophages. Cependant, utiliser les différences de niveau d'expression afin de distinguer ces deux types cellulaires ne peut être réalisé qu'en utilisant certaines techniques spécifiques telles que la cytométrie en flux. De plus, l'expression de Cd45 peut être augmentée dans des microglies activées, comme il a été montré pour les microglies associées aux plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer.

Récemment, des études ont mis en avant une signature transcriptomique microgliale, identifiant des gènes spécifiquement exprimés dans les microglies et absents des cellules myéloïdes périphériques. Ainsi, les gènes *p2ry12*, *Tmem119*, *Gpr34*, *Socs3*, *Hexb* ont été identifiés dans les microglies quiescentes²²⁶⁻²²⁸, et peuvent servir à les différencier des macrophages et monocytes circulants. Cependant, il semblerait que l'expression de certains de ces gènes tels que *Tmem119* et *P2ry12* soit diminuée en cas d'activation^{216,229,230}.

2.1.5 Les microglies au cours du vieillissement

Au cours du vieillissement, une augmentation de l'inflammation est observée. En effet, dans le cerveau humain âgé, les microglies présentent une morphologie dystrophique, caractérisée par une dé-ramification et de courts prolongements²³¹. Dans le SNC de rongeurs âgés, une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires^{232,233} et une réduction de cytokines anti-inflammatoires^{234,235} sont observées. Les microglies exhibent un phénotype pro-inflammatoire hypersensible, appelé « primed », présentant un profil inflammatoire altéré et une dérégulation des gènes impliqués dans les réponses immunes, phagosomales et lysosomales²³⁶. De plus, ces cellules présentent une diminution de l'expression des gènes homéostatiques²³⁶ ainsi qu'une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires²³². En conséquence, la réponse à des stimuli résulte en une exagération de l'inflammation, causant une augmentation de la libération de cytokines pro-inflammatoires mais également une activation microgliale de plus longue durée²³⁷.

Il semblerait donc que les cellules microgliales présentent une altération morphologique et fonctionnelle au cours du vieillissement, les éloignant d'un profil homéostatique.

2.1.6 Les microglies dans les maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par une perte chronique et progressive des neurones du SNC. Dans la maladie d'Alzheimer, une perte neuronale est provoquée par les plaques A β et les dégénérescences neurofibrillaires. Dans la maladie de Parkinson, une perte de neurones dopaminergiques dans la *substantia nigra* est observée tandis que la sclérose latérale amyotrophique est caractérisée par une perte de neurones moteurs²²⁵. Toutes ces pathologies sont caractérisées par une inflammation chronique et des microglies réactives ont été observées chez les patients et dans les modèles animaux^{225,238,239}. A titre d'exemple, dans la sclérose latérale amyotrophique, l'activation microgliale est corrélée à la progression de la maladie²⁴⁰ et module la mort des neurones moteurs²⁴¹. Dans ces pathologies neurodégénératives, l'activation microgliale conduit à la production de facteurs délétères pour les neurones tels que les cytokines pro-inflammatoires et l'oxyde nitrique²⁴²⁻²⁴⁴. Réciproquement, l'inhibition de l'activation microgliale ou de la libération de facteurs pro-inflammatoire conduit à une réduction de la mort neuronale²⁴⁵⁻²⁴⁷.

Longtemps considérées comme une conséquence des altérations pathologiques, de nombreuses études récentes suggèrent que les microglies participent activement à la pathogénèse et la progression des maladies neurodégénératives.

MGnD, les microglies de phénotype neurodégénératif

L'étude des microglies au cours du vieillissement et de pathologies neurodégénératives montre donc l'importance de leur activation. Récemment, Krasemann et *al.* ont étudié les transcriptomes microgliaux d'animaux modèles pour différentes pathologies (maladie d'Alzheimer, sclérose latérale amyotrophique et sclérose en plaque) afin d'identifier un motif de changement transcriptionnel commun²²⁹. Ils ont ainsi identifié un phénotype microglial commun à ces trois pathologies, qu'il nomme « microglie de phénotype neurodégénératif » (MGnD), par opposition aux microglies homéostatiques. Ces MGnD présentent une diminution de l'expression de certains gènes homéostatiques tels que *p2ry12*, *Tmem119*, *csflr* et *Cx3cr1*, et de facteurs de transcription, tels que *Mef2a* et *Sall1*. Simultanément, elles présentent également une augmentation de l'expression de certains gènes inflammatoires tels que *Clec7a* et *ApoE*. Leur étude montre que la dérégulation de certains gènes des MGnD est corrélée avec la progression des pathologies. Plus important, les auteurs montrent que le phénotype MGnD est différent du phénotype inflammatoire classique « M1 » des microglies. De plus, ils identifient des protéines, ApoE et Trem2, nécessaires à la reprogrammation des microglies en MGnD²²⁹.

L'ensemble de ces études montre donc que les microglies homéostatiques et réactives ont des rôles physiopathologiques essentiels. Les microglies réactives, *via* leurs nombreuses fonctions, sont bénéfiques lorsqu'elles répondent à des perturbations spontanées. Cependant, leur activation chronique dans des contextes pathologiques peut être délétère et participer à l'établissement et à la progression de maladies neurodégénératives.

2.2 Les récepteurs purinergiques dans la microglie

Lors d'une lésion, l'ATP est rapidement libérée par les cellules altérées et est détectée par les microglies, qui s'activent²⁴⁸. Cette réponse est possible grâce à l'expression de récepteurs purinergiques P2 membranaires. Parmi eux, seuls les récepteurs ionotropiques P2X4R et P2X7R ainsi que les récepteurs métabotropiques P2Y6R, P2Y12R et P2Y13R ont été caractérisés dans ces cellules¹³⁵.

2.2.1 Les récepteurs P2Y microgliaux

a) P2Y6R

L'expression de P2Y6R dans les microglies a été montrée *in vitro* dans des cultures cellulaires ainsi qu'*in vivo*, dans l'hippocampe de rat^{249,250}. L'expression de P2Y6R est augmentée lors de l'activation microgliale suite à une lésion et plusieurs études ont montré l'implication de P2Y6R microglial dans la phagocytose²⁴⁹⁻²⁵¹. En effet, l'application d'UDP, agoniste de P2Y6R, déclenche le processus de phagocytose²⁴⁹⁻²⁵¹ et l'inhibition pharmacologique de P2Y6R empêche cette dernière. P2Y6R est également responsable de la phagoptose induite par l'application de LPS. Ainsi, dans ce modèle, l'activation de P2Y6R dans les microglies conduit à la phagocytose de neurones qui sont stressés mais qui restent cependant viables, et l'inhibition spécifique de P2Y6R conduit à une diminution de la mort neuronale²⁴⁹. De manière intéressante, Wendt et *al.* montrent que l'altération de la phagocytose dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer est due à un dysfonctionnement de P2Y6R dans les microglies²⁵². L'ensemble de ces études montre donc que P2Y6R est essentiel pour le processus de phagocytose.

Plus récemment, l'implication de P2Y6R dans la libération de chimiokines a également été suggérée. En effet, Kim et *al.* montrent que l'activation de P2Y6R par l'UDP conduit à la production de CCL2 et CCL3 dans des microglies en culture²⁵³. Dans des cultures de microglies spinaux de rats, l'activation de P2Y6R induit la production de CCL2, par le biais de la phosphorylation de ERK ou p38 par la PLC²⁵⁴.

b) P2Y12R

N'étant exprimé ni dans les astrocytes, oligodendrocytes et neurones ni dans les cellules immunes périphériques, le gène *P2ry12* a été identifié comme un gène unique de la microglie²²⁶. Il est l'un des gènes les plus fortement exprimés dans les microglies homéostatiques et son expression est diminuée dans les microglies réactives²³⁰. Par conséquent, *p2ry12* fait partie des gènes servant de marqueurs des microglies homéostatiques²²⁶. P2Y12R est impliqué dans la chimiotaxie en réponse à l'ATP²⁵⁵ et les souris invalidées pour ce récepteur présentent une altération de la polarisation et de la migration microgliales²³⁰. Son activation par l'ATP est suffisante pour induire une chimiotaxie²⁵⁶. Les voies de signalisation intracellulaires activées par P2Y12R ne sont pas bien comprises mais différents acteurs tels que PI3K, Akt et Erk ont été identifiés²¹⁸.

Contrairement à de nombreuses études montrant une diminution de l'expression de *p2ry12* dans les microglies activées^{216,229,230}, il a été montré que l'expression de P2Y12R dans les microglies spinales est augmentée dans des modèles de douleurs neuropathiques et contribue à la régulation de l'hyperalgésie et de l'allodynie^{257,258}. De plus, l'activation de P2Y12R dans des cultures de microglies spinales induit une libération de cytokines inflammatoires²⁵⁹. Les raisons de cette divergence dans l'expression de *p2ry12* restent à élucider. Il est possible qu'elle soit due aux différentes régions étudiées ainsi qu'aux différents contextes pathologiques.

c) P2Y13R

Dans le CNS, l'expression de *P2ry13* est observée dans les microglies du cortex, du cervelet, de l'hippocampe²⁶⁰ ainsi que dans la moelle épinière²⁶¹. Cependant, ses fonctions n'ont pas fait l'objet de beaucoup d'études et restent donc peu caractérisées. L'utilisation de souris P2Y13R-KO montre que les microglies ont une morphologie altérée, présentant des prolongements plus courts et moins nombreux²⁶⁰. Dans l'hippocampe, P2Y13R est uniquement exprimé dans les microglies et semble impliqué dans la neurogénèse hippocampique²⁶⁰. De même que P2Y12R, P2Y13R est impliqué dans la libération de cytokines inflammatoires telles que l'Il-1 β , l'Il-6 et le TNF α dans des cultures de microglies spinales²⁵⁹. De plus, dans un modèle de douleurs neuropathiques, l'expression de P2Y13R est augmentée dans les microglies de la moelle épinière et P2Y13R est impliqué dans l'allodynie mécanique²⁶¹. Enfin, une étude récente de Quintas et *al.* montre l'implication des récepteurs P2Y13 microgliaux dans la prolifération astrocytaire *in vitro*²⁶².

L'étude des P2YR dans les microglies a permis de mettre en évidence l'expression de P2Y6R, P2Y12R et P2Y13R. Ces récepteurs sont essentiels au bon fonctionnement microglial dans des conditions physiologiques et pathologiques. Outre ces récepteurs, les récepteurs ionotropiques P2X4R et P2X7R ont également été caractérisés dans les microglies.

2.2.2 Les récepteurs P2X dans la microglie

a) P2X7R

Le récepteur P2X7 est exprimé dans les microglies dans toutes les structures du cerveau²⁶³. P2X7R est sensible à des concentrations élevées d'ATP et est donc théoriquement inactif en condition physiologique. Lors de lésions, la concentration extracellulaire d'ATP augmente à

des concentrations micromolaires, permettant ainsi d'activer P2X7R. De manière intéressante, son activation promeut davantage la libération d'ATP, amplifiant ainsi le signal de danger²⁶⁴.

P2X7R représente le récepteur purinergique le plus étudié dans les pathologies du SNC et son expression au sein des microglies est augmentée dans diverses pathologies telles que la maladie d'Alzheimer¹³⁶, la douleur neuropathique¹³⁷ et l'épilepsie¹⁵⁶. *In vivo*, l'injection de LPS dans le striatum de rat induit une augmentation de l'expression de P2X7R ainsi qu'une augmentation de médiateurs inflammatoires tels que les ROS et le NO. L'expression de ces derniers est dépendante de P2X7R puisqu'elle est atténuée lorsque P2X7R est inhibé²⁶⁵. *In vitro*, l'application de LPS sur des cultures de microglies mène à une augmentation des facteurs inflammatoires tels que COX2, Il-1 β , Il-6, Il-12 et TNF α , dépendante de P2X7R²⁶⁵. Dans des conditions pathologiques, l'expression de P2X7R est donc augmentée et est impliquée dans la libération de facteurs pro-inflammatoires.

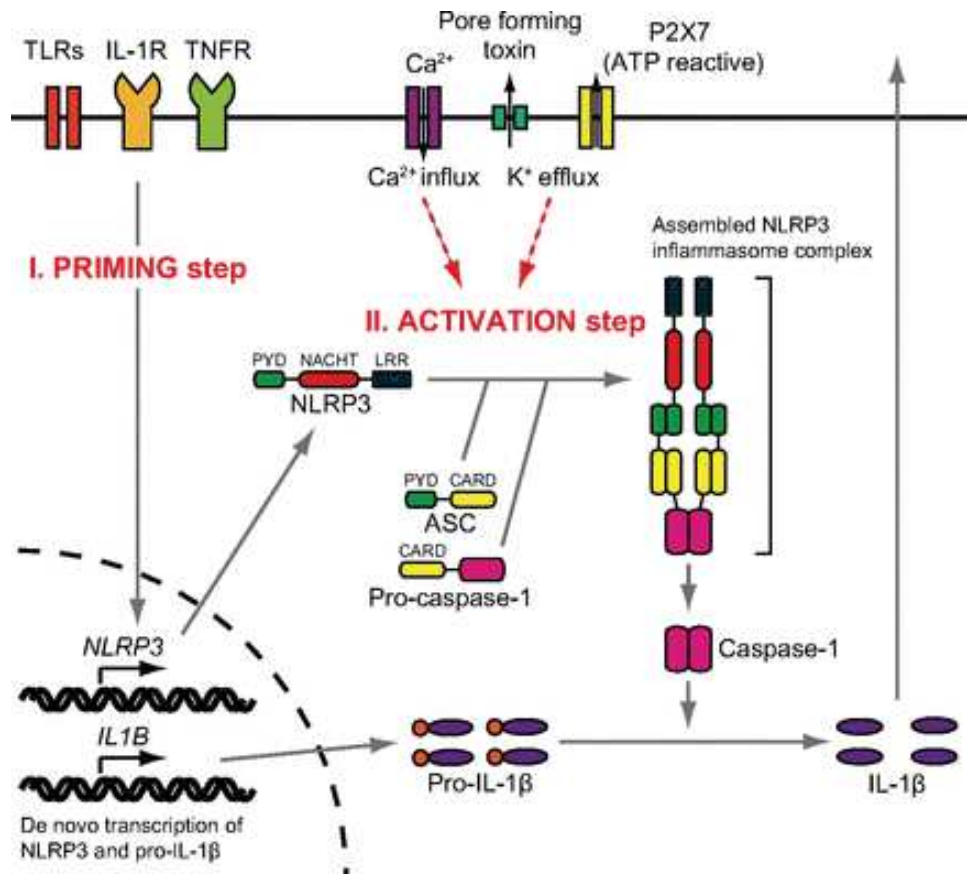


Figure 10 : Schéma de l'activation de l'inflammasome NLRP3

L'activation de l'inflammasome NLRP3 requiert deux étapes. Dans un premier temps (I. Priming step), l'activation de TLRs, de IL-1R ou de TNFR conduit à l'augmentation de l'expression de NLRP3 et d'Il-1 β . Dans un second temps (II. Activation step), l'efflux de potassium provoqué par l'entrée de calcium ou par l'activation de P2X7R mène à l'activation du complexe NLRP3. Ce dernier clive la pro-caspase-1 en caspase-1 mature, qui à son tour va cliver la pro-Il-1 β en Il-1 β mature. L'Il-1 β sera ensuite libérée dans le milieu extracellulaire. D'après Nakanishi et *al.* (2017)

P2X7R et libération d'Il-1 β par l'inflammasome

P2X7R a fortement été étudié pour son implication dans la libération de la cytokine pro-inflammatoire Il-1 β suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3.

L'inflammasome est un complexe multiprotéique cytosolique qui active la caspase-1, menant ainsi à la maturation et à la sécrétion d'Il-1 β . Il existe plusieurs types d'inflammasomes mais le plus étudié reste le complexe NLRP3 (NOD-LRR-and pyrin domain-containing protein 3). Afin de remplir ses fonctions, NLRP3 agit en deux temps. Dans un premier temps, le « priming », déclenché par un premier signal de danger, conduit à l'augmentation de l'expression des protéines composant NLRP3, de la caspase-1 ainsi que de la pro-Il-1 β , forme immature de l'Il-1 β . Dans un second temps, un deuxième signal d'activation induit l'oligomérisation et l'activation de NLRP3, qui permet l'activation de la caspase-1. La caspase-1 va, à son tour, cliver la pro-Il-1 β en Il-1 β mature, qui sera ensuite libérée dans le milieu extracellulaire²⁶⁶ (Figure 10)

Des études réalisées sur des macrophages et des monocytes montrent que P2X7R participe à la deuxième étape d'activation de NLRP3. Piccini et *al.* montrent que des monocytes humains traités avec différents composés pathogènes libèrent de l'Il-1 β de manière dépendante de P2X7R. En effet, lorsque P2X7R est inhibé, aucune libération d'Il-1 β n'est observée²⁶⁷. De même, la libération d'Il-1 β mature est observée dans des macrophages lors d'une application de LPS suivie d'une stimulation à l'ATP, mais est absente dans des macrophages P2X7R-KO²⁶⁸. De manière intéressante, dans ces deux études, l'absence ou l'inhibition de P2X7R n'empêche pas la libération d'Il-1 β quand les cellules sont traitées avec de la nigéricine, un fort ionophore potassique^{267,268}, suggérant que P2X7R agirait sur l'activation de l'inflammasome *via* un efflux de potassium.

Dans des cultures de microglies, une libération d'Il-1 β dépendante de P2X7R est observée suite à un priming au LPS suivi d'une stimulation au Bz-ATP²⁶⁹. Des travaux sur tranches organotypiques d'hippocampe montrent que l'activation de P2X7R après une exposition au LPS mène à une libération massive d'Il-1 β ; cette dernière étant inhibée par des antagonistes de P2X7R²⁷⁰. Enfin, une étude de Bianco et *al.* montre que l'activation des P2X7R microgliaux par de l'ATP astrocytaire conduit à une libération d'Il-1 β ²⁷¹.

L'ensemble de ces études montre donc que P2X7R est exprimé dans les microglies, dans lesquelles il contribue à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Son activation conduit à un

efflux de potassium, provoquant l'assemblage de NLRP3, l'activation de la caspase-1 et par conséquent la maturation et la libération d'Il-1 β (Figure 10).

b) P2X4R

En condition pathologique, l'expression de P2X4R dans les microglies du SNC est augmentée^{83,145,146,161,162,272} et résulte d'une augmentation de son expression génique²⁷². L'expression de P2X4R à la membrane est également amplifiée grâce à une hausse de son adressage à la membrane plasmique⁸³. Comme vu précédemment, les récepteurs P2X4 microgliaux et neuronaux sont impliqués dans la douleur et dans l'épilepsie (cf. §1.2.3f)). La partie suivante s'attardera sur quelques implications de P2X4R dans les microglies au sein du SNC.

P2X4R et la consommation d'alcool

p2rx4 est exprimé dans des régions impliquées dans l'initiation et le maintien des comportements de récompense²⁷³ et plusieurs études montrent l'implication de P2X4R dans la consommation d'alcool²⁷⁴. En effet, l'expression de *p2rx4* est réduite chez les rats présentant une préférence pour l'alcool^{273,275}, suggérant une corrélation entre l'expression du gène et la consommation d'alcool. En accord avec cela, lorsque les animaux ont de l'alcool à disposition, les souris P2X4R-KO en consomment plus que les souris WT²⁷⁴.

In vitro, P2X4R est inhibé par des faibles concentrations d'alcool et Ostrovskaya et *al.* ont identifié les résidus D331 et M336 comme essentiels dans ce processus²⁷⁶. L'ivermectine, un fort potentialisateur de P2X4R, inhibe les effets de l'alcool en interférant avec la liaison de l'éthanol sur le récepteur²⁷⁷. En conséquence, l'ivermectine réduit la consommation d'alcool dans des modèles murins d'auto-administration²⁷⁸.

Paradoxalement, des études *in vitro* récentes montrent que des cellules microgliales traitées avec de l'éthanol présentent une augmentation de l'expression de P2X4R. Dans ces cellules, l'éthanol induit une altération de certaines fonctions microgliales comme la phagocytose et la migration. Ces altérations sont dépendantes de P2X4R²⁷⁹, qui module les cascades de signalisation ERK et Akt²⁸⁰.

L'ensemble de ces résultats montre que l'effet de l'alcool sur P2X4R est complexe. L'alcool induit l'expression de P2X4R mais inhibe ses fonctions une fois qu'il est exprimé. L'implication de P2X4R dans les comportements d'addiction à l'alcool est indéniable, cependant les mécanismes sous-tendant restent à élucider.

P2X4R et BDNF microglial

Comme mentionné en paragraphe 1.2.3f), P2X4R est impliqué dans la douleur neuropathique. Des expériences d'injection de microglies exprimant des récepteurs P2X4 stimulés ont permis d'établir le rôle des P2X4R microgliaux dans l'allodynie tactile. Dans les microglies, son action est médiée par le BDNF : l'expression de P2X4R est induite dans ces cellules et l'activation de ce récepteur mène à la libération de BDNF, qui va agir sur les neurones de la corne dorsale, et qui va, à terme, provoquer une hyperexcitabilité neuronale (Figure 7). Chez les souris P2X4R-KO, après lésion du nerf sciatique, le BDNF s'accumule dans les microglies de la corne dorsale démontrant le rôle essentiel de P2X4R dans la libération du BDNF microglial¹⁴⁶. *In vitro*, l'activation de P2X4R conduit à la libération de BDNF pré-existant ainsi qu'à l'augmentation de l'expression du BDNF. En effet, l'activation de P2X4R déclenche un influx de calcium menant à l'activation de p38-MAPK, entraînant une libération de BDNF dépendante de SNARE²⁸¹. Dans un modèle d'allodynie trigeminale, Liu et *al.* montrent que la surexpression de P2X4R microglial promeut l'activation de p38-MAPK et la libération de BDNF. Le BDNF, agissant sur son récepteur TrkB, favorise la surexpression du transporteur glutamatergique EAAT3, contribuant à l'allodynie²⁸². Dans des modèles de douleurs, P2X4R est donc impliqué dans la libération de BDNF, contribuant à l'allodynie.

L'implication de P2X4R dans la libération de BDNF lors de processus d'apprentissage et de remodelage synaptique a également été suggérée. Parkhurst et *al.* montrent que le BDNF microglial contribue à l'apprentissage moteur et à la restructuration synaptique dépendante de l'apprentissage. De manière intéressante, ils montrent que le BDNF agit en phosphorylant TrkB, et des expériences *in vitro* montrent que le milieu de culture provenant de culture de microglies exprimant P2X4R provoque la phosphorylation de TrkB dans des synaptosomes, suggérant ainsi un potentiel rôle de P2X4R dans la libération de BDNF²⁰⁹.

L'ensemble de ces études montre donc que les P2X4R microgliaux sont impliqués la libération de BDNF, contribuant ainsi aux phénotypes de douleurs et potentiellement aux processus d'apprentissage.

P2X4R dans les pathologies inflammatoires

Bien que P2X7R soit le récepteur purinergique le plus étudié dans l'inflammation, différents travaux soulignent l'implication de P2X4R dans ce processus. L'augmentation de l'expression de P2X4R est observée dans diverses pathologies caractérisées par une inflammation. Comme décrit en paragraphe 1.2.3f), le niveau de P2X4R est augmenté dans

INTRODUCTION : Les microglies et les récepteurs purinergiques

les microglies réactives et est impliqué dans l'épilepsie ainsi que dans les douleurs inflammatoires et chroniques. L'augmentation de P2X4R est également observée dans des microglies spinales de modèles d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) ainsi que dans le nerf optique de patients atteints de sclérose en plaques²⁸³. De même, lors d'une inflammation provoquée par une ischémie, l'expression de P2X4R est augmentée²⁸⁴.

En 2014, Vazquez-Villoldo et *al.* montrent que P2X4R est impliqué dans l'activation et la mort microgliale. *In vitro*, le traitement des microglies primaires avec du LPS provoque une activation microgliale, une mort cellulaire et une libération de TNF α ; ces effets sont réduits lors de l'inhibition de P2X4R par du TNP-ATP et du 5-BDBD. *In vivo*, l'injection de LPS déclenche également une activation ainsi qu'une mort microgliale. Cette perte cellulaire est réduite lors de l'inhibition de P2X4R par le TNP-ATP et est facilitée lors de la potentialisation de P2X4R par l'ivermectine²⁸³, suggérant une implication de P2X4R dans ce processus.

Enfin, une série de travaux conduite par Shuji Kojima montre également l'implication de P2X4R dans les processus inflammatoires. En effet, l'inhibition de P2X4R par des shRNA dans la lignée cellulaire de macrophages RAW264.7 et dans des cellules dendritiques mène à une diminution de la libération d'Il-1 β et d'Il-18 ainsi qu'à une diminution de la mort cellulaire^{285,286}. Ces études suggèrent donc une implication de P2X4R dans la libération de cytokines et dans la mort cellulaire.

De manière intéressante, de Rivero Vaccari et *al.* ont montré que les souris P2X4R-KO présentent une libération de caspase-1 et d'Il-1 β moins élevée que les souris WT²⁸⁷. Cependant, dans des cultures de microglies traitées au LPS, l'inhibition de P2X4R n'entraîne pas de diminution de leur libération²⁸³, suggérant que ceci n'est pas dû aux P2X4R microgliaux. En accord avec ces résultats, l'étude de Rivero Vaccari et *al.* suggère que l'expression de P2X4R est augmentée dans les neurones de la moelle épinière après lésion, proposant ainsi une implication de P2X4R neuronal plutôt que microglial dans la libération de caspase-1 et d'Il-1 β ²⁸⁷.

P2X4R est donc impliqué dans divers processus inflammatoires. Son expression est augmentée dans des pathologies ayant une composante inflammatoire et P2X4R est impliqué dans la libération de facteurs inflammatoires ainsi que dans la mort cellulaire. Cependant, il semble que les P2X4R microgliaux et neuronaux peuvent être impliqués dans ces processus.

Dans le SNC, les microglies jouent donc des rôles essentiels en conditions physiologiques et pathologiques. Grâce à leurs nombreuses fonctions, elles sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie et dans la réponse inflammatoire. Diverses fonctions microgliales sont dépendantes des récepteurs purinergiques, reflétant ainsi leur importance dans ces cellules. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont montré l'importance des microglies dans des maladies neurodégénératives notamment dans la maladie d'Alzheimer.

3 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est l'une des maladies neurodégénératives les plus communes, affectant environ 24 millions de personnes dans le monde. L'organisation mondiale de la santé estime que, si la tendance reste la même, ce chiffre atteindra les 48 millions en 2050. La MA est une démence caractérisée par une perte progressive de la mémoire, de l'orientation et de la capacité d'apprentissage. D'un point de vue pathologique, elle est caractérisée par le dépôt de plaques amyloïdes, des dégénérescences neurofibrillaires, d'une perte neuronale et d'une inflammation cérébrale. Les facteurs de développement de la pathologie sont multiples et sont aussi bien génétiques qu'environnementaux. Depuis sa découverte par Alois Alzheimer, la MA a fait l'objet d'une multitude d'études visant à déterminer ses causes ainsi qu'à développer des traitements.

3.1 Découverte de la pathologie

La maladie d'Alzheimer a été décrite pour la première fois en 1907 par Alois Alzheimer²⁸⁸. Dans son rapport, Alois Alzheimer fait état du cas d'une femme de 51 ans développant progressivement des troubles psychiatriques, une perte de mémoire ainsi qu'une désorientation spatiale et temporelle. L'analyse post-mortem du cerveau de la patiente, décédée à l'âge de 55 ans, met en évidence une atrophie cérébrale ainsi que la présence de dégénérescences neurofibrillaires et de plaques neuritiques. Enfin, il mentionne également une altération de la glie²⁸⁸. Depuis cette première description, de nombreuses études cliniques et précliniques se sont attardées à décrire et à comprendre cette pathologie.

3.2 Caractéristiques pathologiques de la MA

3.2.1 Aspects cliniques

La MA est une maladie neurodégénérative irréversible et incurable. Elle est caractérisée par le développement progressif de déficits cognitifs et fonctionnels ainsi que par des changements comportementaux et une perte d'autonomie.

Les patients atteints de la MA présentent typiquement une perte antérograde de la mémoire épisodique ainsi que des déficits additionnels tels que des troubles du langage, de la mémoire sémantique, des fonctions exécutives et des capacités visuo-spatiales. En 2011, la NIA-AA (National Institute of Aging – Alzheimer's association) définit les critères définissant la maladie d'Alzheimer. Les patients doivent présenter (1) un déclin progressif et graduel de la cognition, (2) une altération cognitive et comportementale évidente dans, au minimum, deux de ces domaines : mémoire épisodique, fonctions exécutives, capacités visuo-spatiales et fonction du langage, (3) des difficultés à effectuer des tâches de la vie quotidienne et enfin (4) ces symptômes ne doivent pas être attribués à une autre pathologie mentale, démentielle ou neurologique^{289,290}.

Stades de la maladie

Cliniquement, trois stades de la MA sont identifiables, caractérisés par le déclin cognitif : léger, modéré et sévère. Une perte de la mémoire à long terme est généralement le premier symptôme de la MA. Durant la progression de la maladie, plusieurs changements apparaissent tels que le changement de personnalité et de comportement, une détérioration de la communication verbale, une altération des tâches visuo-spatiales et une dysfonction motrice²⁹⁰.

Dans le premier stade, léger, les patients vivent de manière autonome et sont actifs dans la société. Ils montrent cependant des troubles progressifs de l'élocution et de la mémoire ainsi que des troubles de l'organisation et de la planification.

La phase modérée est usuellement la plus longue. Les patients ont des difficultés à se rappeler des souvenirs épisodiques récents tandis que les souvenirs anciens ne sont pas affectés. Ils présentent des difficultés à se souvenir des informations de la vie quotidienne mais se souviennent des détails essentiels de leur vie. Ils présentent maintenant des troubles du langage ainsi qu'une désorientation spatio-temporelle. Tous les aspects des fonctions cognitives sont affectés et mènent progressivement à une incapacité à effectuer des tâches

quotidiennes. Des symptômes neuropsychiatriques tels que l'apathie, l'anxiété et l'irritabilité sont également présents.

Enfin, dans la phase sévère, les patients ont besoin d'une aide intensive dans la vie quotidienne. Toutes les fonctions précédemment affectées se dégradent. Les patients perdent leur habilité à gérer leur environnement et leurs mouvements, incluant la capacité à marcher et s'asseoir. Ils deviennent incontinents et grabataires. Des complications multiples telles que l'immobilité, la malnutrition, des thromboses et des risques d'infection apparaissent, causant le décès du patient²⁹⁰.

Diagnostic clinique

Le diagnostic de la MA est pluridisciplinaire et se base sur des examens physiques et neurologiques, une évaluation neuropsychologique, des imageries cérébrales ainsi que des tests biologiques. Les tests d'évaluations cognitives communément utilisés tels que le *Mini Mental Status Examination* ne sont généralement pas suffisants pour diagnostiquer la MA dans les stades précoces. Depuis 2007, l'imagerie fonctionnelle, combinant le PET scan à une IRM volumétrique, ainsi qu'une analyse des protéines du liquide céphalo-rachidien (LCR) représentent des méthodes fiables pour le diagnostic de la MA. Cependant, le diagnostic définitif ne peut être établi que de manière post-mortem, par l'analyse histologique du cerveau du patient.

3.2.2 Caractéristiques histologiques

L'étiologie de la MA n'est, à ce jour, toujours pas claire. En 1907, Alois Alzheimer décrivait une atrophie cérébrale accompagnée de dégénérescences neurofibrillaires et de plaques neuritiques²⁸⁸. Depuis, de nombreuses études histologiques confirment ces observations. De plus, des dégénérescences neuritiques, une activation microgliale, une astroglie ainsi qu'une angiopathie amyloïde cérébrale sont également fréquemment observés (Figure 11). Ces processus pathologiques entraînent une dégénérescence et une perte neuronale menant à une atrophie cérébrale²⁹¹.

Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes, ou plaques séniles, sont des agrégats extracellulaires de peptides amyloïdes A β . Les peptides, se trouvant sous deux formes principales, A β_{40} et A β_{42} , s'agrègent afin de former des plaques (Figure 11). Ces dernières peuvent être « diffuses » ou « denses ». Les plaques denses sont composées de dépôts fibrillaires d'A β structurés en

INTRODUCTION : La maladie d'Alzheimer

feuillets β . Elles présentent un centre dense pouvant être marqué par la Thioflavine ou le Congo Red, des marqueurs de feuillets β . Les plaques denses sont associées à des neurites dystrophiques et des astrocytes et microglies réactives ainsi qu'à une perte synaptique. Les plaques diffuses sont quant à elles composées de dépôts amyloïdes amorphes, qui ne sont pas marqués par la Thioflavine ou le Congo Red. Contrairement aux plaques denses, celles-ci ne sont pas associées à une réactivité des cellules gliales ni à une perte synaptique^{291,292}.

Les plaques amyloïdes sont principalement observées dans le cortex entorhinal et l'hippocampe, et leur dépôt commence plusieurs années avant l'apparition des symptômes cliniques.

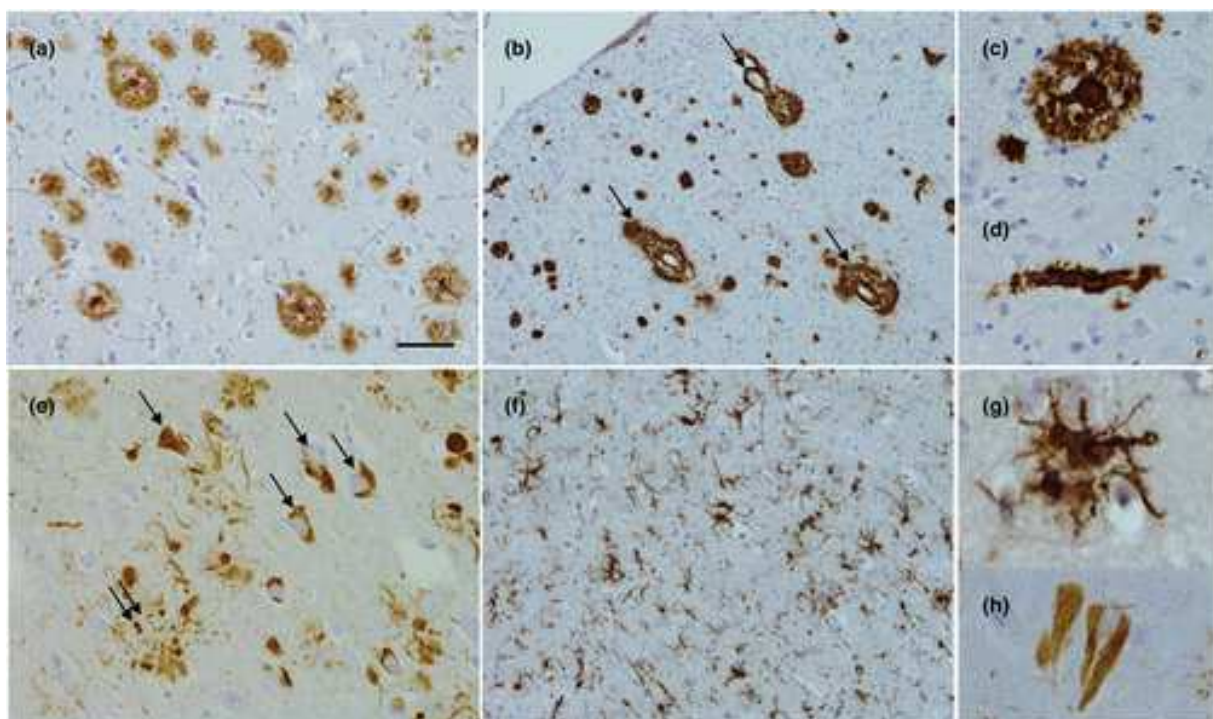


Figure 11 : Histopathologie de la maladie d'Alzheimer

(a) Immunohistochimie d'A β montrant des plaques amyloïdes dans le cortex frontal et (b) une angiopathie amyloïde cérébrale dans laquelle A β s'accumule dans les vaisseaux sanguins. Les images (c) et (d) montrent un grossissement d'une plaque amyloïde (c) et d'un vaisseau accumulant de l'A β (d). L'immunohistochimie de Tau démontre des dégénérescences neurofibrillaires (e) et des plaques neuritiques (e). L'image (h) représente un grossissement d'une dégénérescence neurofibrillaire. Dans le cerveau de patient, une inflammation est également présente et caractérisée par des microglies réactives (f) (grossissement en (g)). La bar d'échelle représente 50 μ m pour les images a et f; 100 μ m pour b; 25 μ m pour c et e; 15 μ m pour d, g et h. D'après Lane et *al.* (2017)

Dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) sont des agrégats intracellulaires de protéines Tau hyperphosphorylées (Figure 11), entraînant une mort neuronale. Les DNF présentent trois

stades morphologiques différents et graduels. Dans un premier temps, les DNF sont diffuses et ponctuées dans le cytoplasme de neurones. Elles forment ensuite des DNF matures. Dans cet état, les DNF représentent des agrégats filamenteux. Enfin, les DNF deviennent extracellulaires et « fantômes ». Ces derniers résultent de la mort du neurone portant les DNF. L'apparition de ces dégénérescences est stéréotypée et commence dans le cortex entorhinal et atteint l'hippocampe avant de se propager vers les différentes régions du cortex associatif²⁹². La progression des DNF corrèle fortement avec la progression de la maladie^{293,294}.

Atrophie cérébrale

L'analyse post-mortem des cerveaux de patients montre une atrophie cérébrale affectant principalement les lobes medio-temporaux. Elle est considérée comme la cause sous-jacente de la démence des patients. En conséquence de cette atrophie, les ventricules sont dilatés, ce qui peut être observé en imagerie cérébrale et servir au diagnostic de la maladie.

Perte neuronale et synaptique

La maladie d'Alzheimer est également caractérisée par une forte perte neuronale et synaptique, cause sous-jacente de l'atrophie cérébrale^{295,296}. La perte neuronale corrèle avec la présence de DNF mais corrèle également, et de manière plus importante, avec la progression de la maladie^{294,295}. La progression spatio-temporelle de la perte synaptique correspond à celle de la perte neuronale et représente la caractéristique qui corrèle le mieux aux déficits cognitifs²⁹³. Dans la MA, les causes de la perte neuronale et synaptique ne sont pas claires mais semblent avoir plusieurs origines. Il a été montré qu'elle est partiellement causée par les DNF²⁹⁷. Les DNF s'accumulent dans les neurones et provoquent leur mort. De la mort neuronale, il en résulte des DNF « fantômes » extracellulaires. La perte neuronale est également provoquée par le peptide amyloïde, qui est toxique pour ces cellules et provoque leur apoptose^{298,299}. Enfin, la libération de facteurs inflammatoires, qui devient toxique pour les neurones lorsqu'elle est chronique, déclenche également une mort neuronale^{300,301}.

La MA est donc une maladie neurodégénérative complexe, caractérisée par des symptômes sévères. Histologiquement, elle est caractérisée par de multiples altérations dont les deux principales restent le dépôt de plaques amyloïdes et l'apparition de dégénérescences neurofibrillaires.

3.3 Mécanismes pathologiques

Si l'étiologie de la pathologie n'est pas connue, différentes hypothèses concernant la pathogénèse de la MA ont émergé. Dans ce contexte, deux principales écoles s'affrontent, l'une mettant en avant l'importance du peptide A β , l'autre prônant l'implication des dégénérescences neurofibrillaires.

3.3.1 L'hypothèse amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde est la théorie prévalente afin d'expliquer la pathogénèse de la MA. Cette hypothèse suggère que l'accumulation dans le cerveau des formes pathologiques du peptide A β est le premier mécanisme pathologique de la MA. Les autres altérations observées telles que les DNF, la perte neuronale et synaptique et l'inflammation apparaissent en aval du processus amyloïde. L'hypothèse de la cascade amyloïde est soutenue par les cas génétiques de la MA. En effet, dans ceux-ci, la MA est due à la présence de mutations sur les gènes APP, PSEN1 et PSEN2, impliqués dans la production du peptide A β ²⁹⁰.

Le peptide A β est le produit de clivage de la protéine APP (β -amyloid precursor protein). L'accumulation de peptides amyloïdes dans le cerveau résulte d'un déséquilibre entre sa production et son élimination. Les peptides vont ensuite s'agréger afin de former les plaques amyloïdes.

Clivage d'APP et production de peptides A β

APP est une protéine transmembranaire pouvant être clivée selon deux voies différentes. Une première est « amyloïdogénique » et mène à la production de A β tandis que la deuxième, dite « non-amyloïdogénique », conduit à la production d'une protéine sAPP α , protéine non pathogène (Figure 12)³⁰².

- La voie amyloïdogénique

La première étape de la génération du peptide A β est le clivage d'APP par la protéase β -sécrétase. Plusieurs β -sécrétases, telles que BACE1 et BACE2 ont été identifiées. Le clivage d'APP par la β -sécrétase résulte en deux produits : la protéine soluble APP β (sAPP β) ainsi que le fragment carboxy-terminal (β CTF) transmembranaire. Ce dernier est clivé par la γ -sécrétase afin de générer le peptide A β ainsi que le domaine intracellulaire d'APP (AICD). Ce clivage s'effectue dans le domaine transmembranaire de la protéine et conduit à la production

de deux formes de peptide $A\beta$: l' $A\beta_{40}$ et l' $A\beta_{42}$, composés respectivement de 40 et 42 acides aminés³⁰² (Figure 12).

- La voie non-amyloïdogénique

Alternativement, l'APP peut être clivée selon une voie non-amyloïdogénique, par l' α -sécrétase, afin de produire une protéine soluble APP α (sAPP α) et un fragment carboxy-terminale (α CTF) transmembranaire. Comme β CTF, l' α CTF sera ensuite pris en charge par la γ -sécrétase afin de produire une protéine P83 et une protéine AICD³⁰² (Figure 12).

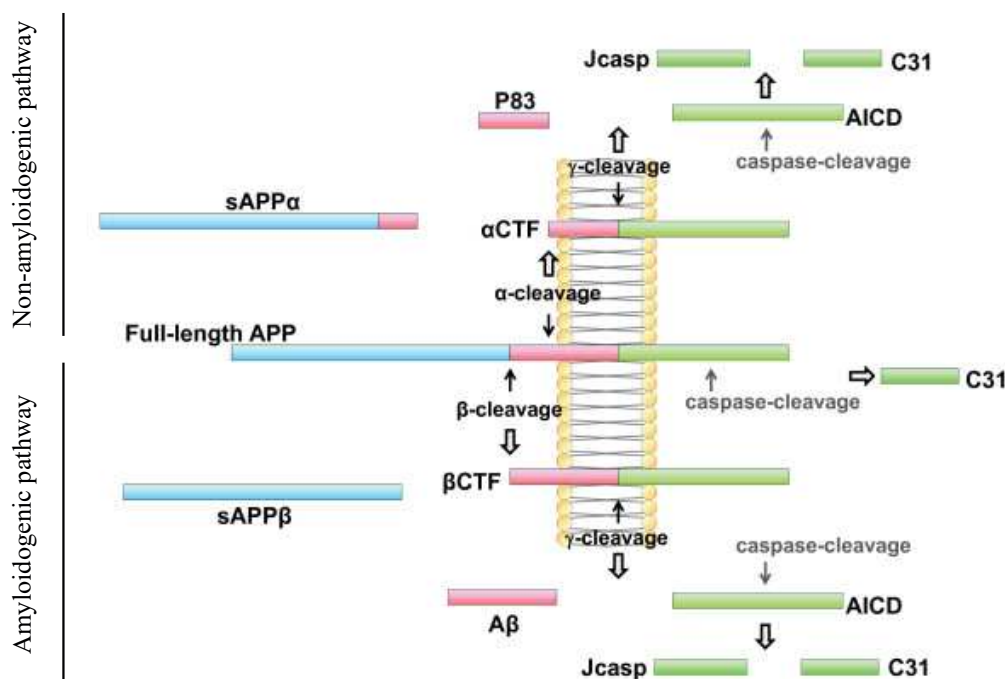


Figure 12 : Clivage de l'APP

Schéma représentant la voie non-amyloïdogénique (haut) et la voie amyloïdogénique (bas) du clivage de l'APP. D'après Zhang et *al.* (2011)

Agrégation du peptide $A\beta$

L'agrégation des protéines se produit lorsqu'une concentration critique de protéines est dépassée. Les peptides $A\beta$ vont progressivement s'agréger pour former des plaques amyloïdes. L'agrégation se faisant en plusieurs étapes, il existe plusieurs formes d' $A\beta$ ³⁰³ (Figure 13). Les monomères $A\beta$ sont des peptides amphipathiques de 40 et 42 acides aminés, s'agrégeant d'abord en petits oligomères globulaires. Ces oligomères sont formés de 3 à 50 monomères d' $A\beta$ et sont d'une grande toxicité^{299,304}. Des oligomères plus larges, de 17 à 42 kDa, sont ensuite formés. Ces oligomères sont très toxiques et leur concentration est corrélée

aux déficits cognitifs des patients³⁰⁵. Se forment ensuite les protofibrilles, qui sont assemblées en feuillets β et sont les précurseurs solubles des fibrilles. Les fibrilles sont quant à elles des structures thermodynamiquement stables, structurellement organisées, très insolubles et composées de répétitions de feuillets β . Les fibrilles sont composées de multiples protofibrilles assemblées. Enfin, les plaques amyloïdes sont la conformation finale de l'agrégation d'A β et sont composées de fibrilles A β insolubles³⁰³ (Figure 13).

Bien que les plaques amyloïdes aient longtemps été considérées comme la cause du déclin cognitif chez les patients, plusieurs études montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les déficits cognitifs et les plaques amyloïdes^{306,307}. Au contraire, de nombreuses études montrent que les oligomères A β sont responsables de l'altération synaptique et des déficits cognitifs^{299,304,308,309}.

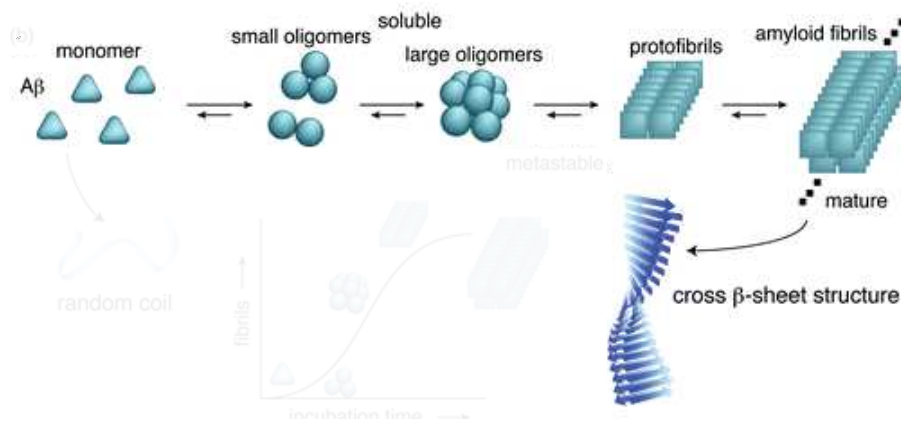


Figure 13 : Agrégation du peptide A β

Représentation schématique de l'agrégation du peptide A β en plaque amyloïde, par l'intermédiaire de divers oligomères stables. D'après Takahashi et al. (2008)

Élimination du peptide A β

L'accumulation de peptide A β résulte d'un déséquilibre entre la production et l'élimination du peptide. L'élimination de ce dernier est donc essentielle et une insuffisance de ce processus pourrait être impliquée dans la pathogénèse de la MA. En effet, puisque l'agrégation du peptide ne se produit qu'au-delà d'une certaine concentration, son élimination est essentielle pour prévenir ce processus³¹⁰. L'élimination du peptide est effectuée par protéolyse dans les cellules gliales, dans les neurones ou dans l'espace extracellulaire. Plusieurs voies de dégradation ont été identifiées. Les deux voies intracellulaires majeures impliquent le lysosome et le protéasome, mais une dégradation cytoplasmique est également observée³¹¹. Les principales enzymes impliquées dans la dégradation sont l'Endothelin-

Converting Enzyme (ECE), l'Insulin-degrading Enzyme (IDE), la Neprilysine, la cathepsine B et les Matrix metalloproteinases. ECE et la Neprilysine sont des protéases membranaires tandis que la cathepsine B est une protéase endosomale et lysosomale. Quant à IDE, c'est une protéine cytosolique qui peut être sécrétée afin de dégrader l'A β extracellulaire. Bien que plusieurs études montrent l'implication de ces enzymes dans la dégradation du peptide A β , leurs mécanismes d'action restent très peu compris. Comprendre les voies de dégradation d'A β représenterait une avancée majeure afin de déterminer comment ces mécanismes contribuent au développement de la MA³¹¹.

L'hypothèse de la cascade amyloïde a été introduite pour la première fois par Hardy et Higgins en 1992³¹². Plusieurs observations soutiennent cette hypothèse. Particulièrement, les formes familiales de MA sont causées par des mutations dans des gènes impliqués dans le clivage d'APP²⁹⁰ et les modèles animaux générés se basant sur des mutations de l'APP miment les principales caractéristiques anatomopathologiques et comportementales de la MA (cf. §3.5.1). De plus, certaines études montrent une corrélation entre la concentration d'A β soluble et la perte synaptique ainsi que le déclin cognitif²⁹³. Cependant, plusieurs observations s'opposent à cette hypothèse. Premièrement, la majorité des cas de la MA sont sporadiques et aucune n'étude ne montre que les cas familiaux et sporadiques partagent les mêmes mécanismes de pathogénèse. Ensuite, les études de corrélation entre la concentration d'A β soluble et le déclin cognitif sont à prendre avec précaution. En effet, les processus d'extraction différenciant les oligomères des fibrilles sont délicats et peuvent ne pas complètement refléter les conditions *in vivo*. En outre, bien que le peptide soluble provoque une mort neuronale *in vitro*, les modèles animaux de la MA ne présentent que peu de mort cellulaire³¹³. Enfin, ces modèles ne présentent pas de DNF, autre caractéristique essentielle de la MA. Il est indéniable que le peptide A β et la cascade amyloïde ont une place essentielle dans la pathogénèse de la MA. Cependant, il n'est que peu probable qu'il soit le premier et seul mécanisme impliqué. Par conséquent, des études se sont attardées sur le rôle essentiel de la protéine Tau dans la pathogénèse la maladie.

3.3.2 L'hypothèse Tau

L'hypothèse Tau suggère que la pathogénèse de la MA est due à l'accumulation et à l'agrégation de protéines Tau hyperphosphorylées, toxiques pour les cellules³¹⁴. Tau est une protéine associée aux microtubules, qui promeut et stabilise ces dernières. Dans le cerveau humain adulte, il existe six isoformes de Tau, pouvant s'assembler et former des protéines à 3

INTRODUCTION : La maladie d'Alzheimer

(3R) ou 4 (4R) répétitions³¹⁵. Chez les patients atteints de la MA, les protéines Tau 3R et 4R sont hyperphosphorylées et forment des agrégats résultant en dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Ces DNF s'accumulent dans le soma et les prolongements des neurones et altèrent leur cytosquelette³¹⁶.

Dans les cerveaux de patients atteints de la MA, la pathologie Tau se propage selon un modèle très stéréotypé. En effet, la propagation spatiotemporelle des DNF suit les différents stades de la maladie initialement décrits par Braak & Braak³¹⁷. Les premiers DNF apparaissent d'abord dans le cortex entorhinal (stade I) puis dans l'hippocampe (stade II). Elles se développent ensuite dans les structures limbiques (stade III) puis dans l'amygdale et le thalamus (stade IV). Enfin, elles se propagent dans les aires néocorticales associatives (stade V) avant d'atteindre les aires motrices, sensorielles et visuelles (stade VI). La distribution topographique des DNF au cours de la maladie reflète le profil neuropsychologique typique des patients atteints de la MA^{292,318}. En effet, contrairement aux plaques amyloïdes, la progression de la pathologie Tau corrèle fortement avec le déclin cognitif^{319,320}. De plus, des études montrent que la pathologie Tau apparaît plus tôt que les plaques séniles, correspondant mieux à la progression de la MA³²¹.

Les mécanismes de pathogénèse de la MA restent à ce jour méconnus. Les deux caractéristiques majeures qui permettent de définir la MA sont les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires. De ces dernières découlent deux hypothèses visant à expliquer la pathogénèse de la MA. Bien que l'hypothèse amyloïde ait longtemps été prévalente, elle ne semble pas suffisante pour expliquer la pathogénèse de la MA. Si les dépôts amyloïdes sont nécessaires au diagnostic de la MA, ils ne sont pourtant pas suffisants pour caractériser cette démence. À l'opposé, bien que les DNF ne soient pas spécifiques de la MA, elles sont nécessaires à son diagnostic et semblent corrélées aux déclinés cognitifs observés chez les patients. Plutôt que deux mécanismes distincts et indépendants, il semblerait que l'A β et les DNF contribuent tous deux à la pathogénèse de la MA.

3.4 Formes génétiques et facteurs de risques

Dans la plupart des cas, la MA est une pathologie sporadique, ne présentant pas d'étiologie ou de causes identifiées. En effet, seuls 1 à 5% des cas sont d'origine génétique, dans lesquels une transmission de la maladie à travers plusieurs générations a été détectée.

3.4.1 Formes génétiques de la maladie d'Alzheimer

A ce jour, seuls trois gènes ont été identifiés comme responsables des cas familiaux de la MA : l'APP, la préséniline 1 (PSEN1) et la préséniline 2 (PSEN2). Ces gènes sont impliqués dans la production du peptide A β qui s'accumule dans les plaques amyloïdes. Dans les cas familiaux, la maladie se développe à un âge précoce (entre 50 et 60 ans) et progresse plus rapidement que chez les patients atteints d'une MA sporadique²⁹⁰.

Les mutations sur le gène APP comptent pour environ 15% des cas génétiques de la MA. La majorité de ces mutations est située sur le site de clivage de la β -sécrétase, dans le domaine transmembranaire de l'APP. A titre d'exemples, les mutations Swedish (APPSW, APPK670N et M671L) et London (APPLON et APPV717I), identifiées sur le gène APP, causent une augmentation de la production d'A β et le développement de la pathologie. Ces gènes ont notamment été utilisés pour générer des animaux modèles de la MA.

La PSEN1 est une protéine de la famille des présénilines et forme un composant majeur du complexe γ -sécrétase, impliqué dans le clivage de l'APP. Les mutations sur *PSEN1* sont les plus courantes. En effet, plus de 200 mutations différentes ont été identifiées. Les mutations sur *PSEN1* augmentent le ratio de peptide A β ₄₂ par rapport à A β ₄₀ et sont responsables des formes les plus sévères de la maladie.

Enfin, les mutations du gène *PSEN2* sont plus rares et seulement 14 mutations ont été identifiées. Comme PSEN1, PSEN2 est impliqué dans le complexe γ -sécrétase. Cependant, la maladie semble moins sévère et débute plus tardivement que chez les patients portant des mutations de *PSEN1*³²².

Les formes génétiques de la maladie d'Alzheimer sont cependant rares et les cas de la MA sont pour la plupart sporadiques. Ainsi, nombreuses études ont cherché à identifier différents facteurs, génétiques et environnementaux, pouvant influencer le développement de la maladie. Dans ce contexte, plusieurs facteurs de risque ont été mis en avant tels que l'âge ou différents gènes tels que celui de l'*Apolipoprotéine E* (ApoE).

3.4.2 L'Apolipoprotéine E, facteurs de risques de la MA

Les cas sporadiques sont les formes les plus communes de la MA. Dans ces cas, la maladie se développe tardivement, fréquemment après 65 ans. Les causes de la pathologie ne sont pas connues mais plusieurs facteurs de risques génétiques ont été identifiés. Notamment, des études de GWAS (Genome-Wide Associated Studies) ont identifié plus de 30 loci

INTRODUCTION : La maladie d'Alzheimer

représentant des risques pour la MA³²³. Parmi eux, l'isoforme $\epsilon 4$ de l'Apolipoprotéine E représente un facteur de risque majeur.

Fonction physiologique d'ApoE

ApoE est exprimée dans de nombreux organes, son expression étant élevée dans le foie et le cerveau. Dans le cerveau, ApoE est synthétisée *de novo* et il y a très peu d'échanges d'ApoE entre le cerveau et la périphérie. ApoE est majoritairement produite par les cellules gliales, principalement par les astrocytes mais également par les microglies. Cependant, dans certaines conditions, les neurones peuvent également produire de l'ApoE³²⁴.

ApoE est impliquée dans le transport de lipides et du cholestérol. Dans les cellules gliales, ApoE se lie à des lipides en interagissant avec le transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette A1), qui conduit à la lipidation d'ApoE. ApoE, chargée en lipides, est alors sécrétée par les cellules gliales et se lie à des récepteurs de lipoprotéines de basse densité situés sur les neurones³²⁵. Par ce procédé, ApoE conduit le transport des lipides et du cholestérol entre les cellules gliales et les neurones, où ils sont nécessaires au maintien de la plasticité synaptique³²⁶.

Isoformes d'ApoE

Chez l'humain, ApoE existe sous trois isoformes ApoE- $\epsilon 2$, ApoE- $\epsilon 3$ et ApoE- $\epsilon 4$ ³²⁷. Ces isoformes sont respectivement présentes à $\approx 7\%$, 79% et 14% dans la population³²⁸. Ils diffèrent sur les résidus en position 112 et 158. ApoE- $\epsilon 2$ présente une cystéine en position 112 et 158, ApoE- $\epsilon 3$ possède une cystéine en position 112 et une arginine en position 158 tandis que ApoE- $\epsilon 4$ possède une arginine aux deux positions³²⁹. La présence de l'isoforme $\epsilon 4$ représente le plus grand facteur de risque pour la MA : les individus portant une - ou deux - copie d'ApoE- $\epsilon 4$ ont trois - ou neuf - fois plus de risque de développer la forme tardive de la maladie d'Alzheimer³³⁰. A l'opposé, ApoE- $\epsilon 2$ est considérée comme protectrice tandis que ApoE- $\epsilon 3$ est neutre³³¹. De manière intéressante, la présence de l'isoforme $\epsilon 4$ conditionne également l'âge auquel la pathologie se manifeste. L'âge moyen de survenue de la MA des individus portant deux copies est de 68 ans, ceux des individus ayant une copie est de 75 ans tandis que celui des individus ne portant pas de copie $\epsilon 4$ est de 85 ans³³⁰.

Implication dans la maladie d'Alzheimer

Basés sur les études montrant qu'ApoE interagissait avec le peptide $A\beta^{332,333}$, de nombreux travaux ont étudié la relation entre ApoE et les plaques amyloïdes. Les patients porteurs de

l'isoforme $\epsilon 4$ ont un niveau plus élevé d'oligomères $A\beta$ ^{334,335} et de plaques neurites³³⁶ comparativement aux patient porteurs d'ApoE- $\epsilon 3$. En outre, les souris exprimant les isoformes humaines d'ApoE montrent également des niveaux de dépôts amyloïdes différents selon l'isoforme qu'elles portent³³⁷⁻³³⁹. Il semblerait donc qu'ApoE soit impliquée dans le dépôt des plaques amyloïdes. Chez des souris exprimant les isoformes humains, l'expression d'ApoE- $\epsilon 4$, mais pas d'ApoE- $\epsilon 3$, induit une augmentation de la concentration $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ ³⁴⁰. De même, l'expression d'ApoE- $\epsilon 4$ induit une augmentation des oligomères $A\beta$ ainsi que des plaques amyloïdes, tandis que l'expression d'ApoE- $\epsilon 2$ tend à les diminuer³³⁹.

ApoE semble également influencer l'oligomérisation du peptide $A\beta$. En effet, l'inactivation génétique d'*ApoE* dans des souris modèles de la MA résulte en une augmentation de dépôts diffus et une diminution de plaques amyloïdes denses³⁴¹, suggérant une implication d'ApoE dans la morphologie des plaques. De plus, Hashimoto et *al.* montrent que la concentration d'oligomères $A\beta$ est 2,7 fois plus élevée chez les patients ApoE- $\epsilon 4/\epsilon 4$, suggérant qu'ApoE- $\epsilon 4$ module l'oligomérisation du peptide. *In vitro*, ils montrent qu'ApoE- $\epsilon 4$ induit une plus forte oligomérisation qu' $\epsilon 3$, qui, lui-même, promeut une oligomérisation plus élevée qu' $\epsilon 2$ ³³⁵. Enfin, des études *in vitro*, montrent qu'ApoE se lie au peptide $A\beta$ et ralentit son agrégation ainsi que la formation de fibrilles³⁴².

Enfin, ApoE module également la dégradation du peptide $A\beta$. En effet, Castellano et *al.* montrent que la dégradation du peptide est plus lente chez des souris porteuses de l'isoforme $\epsilon 4$ comparativement à $\epsilon 3$, ces dernières dégradant le peptide plus lentement que les porteuses d' $\epsilon 2$ ³⁴³. De plus, Jiang et *al.* montrent qu'ApoE est essentielle pour la dégradation intracellulaire de $A\beta$ et que les cellules exprimant l'isoforme $\epsilon 2$ dégradent plus efficacement le peptide tandis que celles exprimant $\epsilon 4$ le dégradent faiblement³⁴⁴. Ils montrent également qu'ApoE influence la dégradation extracellulaire du peptide, conduite par IDE³⁴⁴. De manière intéressante, les patients porteurs de l'isoforme $\epsilon 4$ montrent une réduction de 50% de l'expression de l'enzyme IDE³⁴⁵.

Ces dernières années, de nombreuses études de GWAS ont cherché à identifier des gènes prédominants chez les patients, afin d'identifier différents facteurs de risque. Parmi eux, des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, dans l'endocytose ainsi que dans la réponse immunitaire ont été mis en avant³²³. Outre les facteurs génétiques, d'autres éléments tels que l'âge ont également été identifiés²⁸⁹.

3.5 Modèles murins de la MA

Basés sur les différentes caractéristiques neuropathologiques, différents modèles murins de la maladie d'Alzheimer ont été développés afin de pouvoir étudier les mécanismes sous-tendant la pathologie. Les souris développées se basent principalement sur la formation de dépôts amyloïdes ainsi que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau.

3.5.1 Les modèles amyloïdes

Les modèles amyloïdes sont caractérisés par l'apparition de plaques amyloïdes. Ils se basent sur les formes familiales de la maladie d'Alzheimer et consistent en l'introduction et la surexpression des gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* mutés. Différentes mutations sur ces gènes ont été développées, chacune entraînant des perturbations différentes. Par exemple, les mutations sur la partie N-terminale d'APP augmentent la production d'A β en modulant l'activité de la β -sécrétase tandis que les mutations sur la partie C-terminale ainsi que sur PSEN1 et PSEN2 provoquent un shift dans le clivage par la γ -sécrétase, favorisant la production de A β ₁₋₄₂³⁴⁶.

Différents modèles se basant sur ces mutations sont aujourd'hui disponibles. Tous ces modèles développent des plaques amyloïdes de manière dépendante de l'âge ainsi que des déficits cognitifs. Selon l'expression des transgènes, d'autres caractéristiques sont également présentes telles que les neurites dystrophiques, les astrocytes et microglies réactives et parfois la perte neuronale³⁴⁷. A titre d'exemple pour les modèles APP, on peut citer le premier modèle, portant la mutation V717F (Indiana), ainsi que la souris portant la mutation APP Swedish (APP^{swe}) portant les mutations K670N et M671L³⁴⁷.

D'autres modèles amyloïdes se sont ensuite développés, introduisant simultanément des gènes APP et PSEN1 mutés. Par exemple, la souris APP^{swe}/PS1^{dE9} (simplement APP/PS1) porte la mutation Swedish sur le gène *APP* ainsi qu'un gène *PSEN1* muté, privé de son exon 9. La souris 5xFAD, fréquemment utilisée, combine les mutations APP^{swe} avec des mutations Florida (I716V) et London (V717I) du gène *APP* ainsi que les mutations M146L et L286L du gène *PSEN1*, faisant de ce modèle l'un des plus agressifs³⁴⁷. L'un des modèles les plus communément utilisés, la souris Tg2576, porte une mutation Swedish sous le contrôle du promoteur prion de Hamster et développe des plaques amyloïdes à 10-12 mois. Elle développe également des oligomères A β solubles mais ne présente pas de pertes neuronales. Cependant, elle présente des déficits synaptiques à 15 mois.

Le modèle APP/PS1

Les souris APP/PS1 combinent la mutation Swedish sur le gène *APP* (*APP^{swe}*) avec un mutant de la *PSENI* privé de son exon 9 (*PS1^{dE9}*), menant ainsi au développement d'un niveau élevé de peptides $A\beta_{42}$. Ce modèle présente des changements pathologiques, tels que le dépôt de plaques amyloïdes et les déficits cognitifs, qui sont dépendants de l'âge des souris. Les plaques amyloïdes sont détectables à 4 mois et leur nombre augmente continuellement jusqu'à 12 mois³⁴⁸. Entre 4 et 12 mois d'âge, la localisation des plaques est restreinte au cortex et à l'hippocampe. Une augmentation graduelle de l' $A\beta$ insoluble est observée au cours du vieillissement et des concentrations d' $A\beta_{40}$ soluble sont détectées dès 4 mois tandis que l' $A\beta_{42}$ soluble n'est présent qu'à partir de 8 mois d'âge³⁴⁸.

Les souris APP/PS1 développent des déficits de rétention de mémoire spatiale dès 3 mois tandis que des déficits dans l'apprentissage et la rétention de mémoire sont observés à 9 mois. Ces déficits sont accentués à 14 mois³⁴⁹. Ces souris présentent également une altération de la mémoire contextuelle à 12 mois et Zhang et *al.* montrent une corrélation négative entre les performances cognitives et la concentration de peptide $A\beta$ cortical et hippocampique³⁵⁰.

Similairement aux humains, chez qui la pathologie est prévalente chez les femmes, les souris APP/PS1 femelles développent des plaques amyloïdes plus tôt comparativement aux mâles³⁵¹. A un âge tardif, les souris développent une dystrophie synaptique. Elles ne développent cependant pas de perte neuronale, bien que certaines populations neuronales semblent altérées³⁵².

Dans l'ensemble, les modèles amyloïdes récapitulent la progression des dépôts amyloïdes, de manière plus ou moins agressive selon les modèles. Cependant, ces souris ne développent pas de dégénérescences neurofibrillaires, autres caractéristiques essentielles de la maladie d'Alzheimer. Des modèles Tau se sont donc développés.

3.5.2 Les modèles Tau

La pathologie Tau n'est pas unique à la maladie d'Alzheimer et il existe de nombreuses Tauopathies, causées par des mutations sur le gène *MAPT*, encodant Tau. Cependant, il n'existe pas de mutation de *MAPT* au sein de la MA, rendant la génération de modèles Tau difficile. Deux modèles principaux ont été développés, basés sur la mutation *FTDP-17* de Tau. Le premier modèle, JNPL3, arbore une mutation P301L de Tau sous le contrôle du promoteur prion de souris et développe une pathologie Tau semblable à la MA, avec

INTRODUCTION : La maladie d'Alzheimer

l'apparition de DNF de manière dépendante de l'âge. Le deuxième présente la même mutation, P301L, sous un promoteur Thy1.2 et développe des DNF dans les neurones à 8 mois. Ces deux modèles développent des déficits cognitifs et une perte synaptique au cours du vieillissement³⁴⁶.

3.5.3 Les triples mutants, arborant pathologie amyloïde et Tau

Des modèles combinant les pathologies amyloïdes et Tau ont également été développés afin d'être plus représentatifs de la MA. Le modèle le plus agressif est le triple mutant 3xTg. La souris 3xTg combine l'expression d'APP^{swe}, la mutation M146V du gène *PSEN1* ainsi que la mutation P301L de Tau, permettant ainsi le développement des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires. Ces souris montrent une accumulation d'A β intracellulaire à 6 mois et des plaques amyloïdes à 9-12 mois. Les DNF ne se développent que plus tardivement. Elles présentent un déclin cognitif dépendant de l'âge et de la progression de la pathologie. D'autres caractéristiques, telles que l'altération synaptique et la neurodégénération sont également présentes³⁴⁶.

Ces modèles murins représentent des outils indispensables et inestimables pour comprendre la MA. Cependant, ces modèles présentent plusieurs limitations qui ne sont pas à négliger. En effet, les pathologies se développent différemment selon les mutations introduites et les dépôts amyloïdes peuvent être différents de ceux observés chez l'humain. Ensuite, ces modèles sont basés sur la surexpression de gènes et la production de peptide A β nécessite une forte surexpression d'APP, ce qui n'est pas très représentatif de la pathologie humaine et qui peut engendrer plusieurs produits secondaires indésirables. De plus, les modèles amyloïdes se basent sur les formes familiales de la MA. Les cas de la MA étant majoritairement sporadiques, rien n'indique que les mécanismes de pathogénèse soient les mêmes. Enfin, ces outils restent des modèles et ne peuvent récapituler toutes les caractéristiques de la MA.

3.6 Inflammation et microglie dans la maladie d'Alzheimer

3.6.1 Inflammation au cours de la pathologie

Ces dernières années, de nombreuses études ont révélé un rôle fondamental de l'inflammation dans la progression de la pathologie³⁵³. De multiples travaux d'analyses post-mortem montrent une réponse inflammatoire dans le cerveau des patients atteints de la MA^{354,355}. En effet, les patients présentent un phénotype inflammatoire marqué par la présence de cytokines

pro-inflammatoires^{356,357}. Chez les patients atteints de la MA et dans des modèles murins, des astrocytes et microglies réactives sont observés autour des plaques amyloïdes^{358,359}. De plus, la plupart des facteurs de risque mis en évidence par les études de GWAS sont des gènes impliqués dans la réponse immunitaire^{323,360}, suggérant une forte implication de l'inflammation dans la pathologie.

In vitro, l'incubation des microglies avec le peptide A β déclenche une activation de l'inflammasome NLRP3, une activation de la caspase-1 et une libération d'Il-1 β ³⁶¹. En outre, les patients atteints de MA présentent une concentration élevée de caspase-1 et le déficit ou l'inhibition de NLRP3 et de la caspase-1 entraîne une amélioration de la pathologie. En effet, les souris déficientes pour NLRP3 ou caspase-1 montrent de meilleures capacités mnésiques, une diminution des pertes synaptiques, une amélioration de la phagocytose ainsi qu'une réduction des plaques amyloïdes et de la concentration de A β soluble³⁶². D'autre part, l'inhibition de NLRP3 et de caspase-1 mène également à une réduction de l'accumulation du peptide A β et à une amélioration des déficits cognitifs^{363,364}. Ces études suggèrent donc que NLRP3 contribue négativement à la pathologie.

De manière intéressante, Halle et *al.* démontrent que l'activation de NLRP3 est dépendante de la phagocytose du peptide A β et de la libération de la protéase cathepsine B par les lysosomes³⁶¹. En effet, la phagocytose du peptide induit un dysfonctionnement des lysosomes et l'altération de leur intégrité. Ces lysosomes altérés libèrent la cathepsine B dans le cytoplasme. L'inhibition de cette dernière prévient la libération d'Il-1 β , suggérant que la cathepsine B est essentielle à la libération d'Il-1 β dans ce contexte³⁶¹. En outre, il a été montré que la cathepsine B activait l'inflammasome NLRP3³⁶⁵, suggérant que la libération d'Il-1 β dans les microglies traitées avec du peptide A β est dépendante de l'activation de l'inflammasome par la cathepsine B³⁶¹. L'implication de la cathepsine B dans la MA a également été démontrée par diverses études. Les patients atteints de la MA montrent une augmentation de cathepsine B dans le plasma³⁶⁵. Une accumulation de la cathepsine B dans les microglies autour des plaques séniles dans des modèles murins a été observée³⁶⁶ et son inhibition diminue la charge amyloïde et améliore les déficits cognitifs³⁶⁷.

Pendant longtemps, la présence d'une inflammation chronique dans le cerveau des patients était considérée comme un effet secondaire de la mort neuronale. Cependant, plusieurs études montrent aujourd'hui que cette inflammation contribue à la progression de la maladie et peut faciliter et exacerber les dépôts amyloïdes ainsi que les DNF³⁶⁸.

3.6.2 Les microglies dans la pathologie

a) Réactivité microgliale

La présence de cellules réactives au sein des plaques neuritiques a été observée par Alois Alzheimer lorsqu'il a décrit le premier cas de la MA²⁸⁸. Depuis, de nombreuses études montrent la présence de microglies réactives autour des plaques amyloïdes dans le cerveau de patients et d'animaux modèles^{358,359}. *In vitro*, A β entraîne une activation des microglies³⁶⁹, qui expriment abondamment des cytokines inflammatoires^{370,371}. Suite au dépôt d'A β , les microglies deviennent neurotoxiques³⁷² et expriment différents facteurs inflammatoires tels que l'Il-1 β et le TNF α ³⁷³. De par leurs différentes fonctions, les microglies sont impliquées dans de multiples processus dans la MA tels que la phagocytose du peptide A β et la libération de cytokines inflammatoires.

Libération de cytokines

L'inflammation est caractérisée par la libération de cytokines et les principales cellules sécrétant ces facteurs sont les microglies. Les patients et les modèles murins de la MA présentent une élévation de la concentration de cytokines inflammatoires³⁷⁴⁻³⁷⁶. Des études *in vitro* montrent que le peptide A β induit une activation des microglies, qui sécrètent des cytokines et chimiokines inflammatoires telles que TNF α , Il-1 β , MIP-1 β , MCP-1 et Il-8^{370,377}. L'activation chronique des microglies ainsi que la libération de cytokines contribuent aux dysfonctionnements et à la perte neuronale observés au cours de la pathologie³⁰⁰.

▪ Il-1 β

La cytokine Il-1 β est considérée comme un régulateur de l'inflammation dans le SNC de par son rôle dans la régulation de l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires et le fait que sa perturbation retarde la survenue de la neuroinflammation et de la neurodégénération³⁰¹. *In vivo*, l'injection intracérébrale d'Il-1 provoque une activation des astrocytes³⁷⁸ et la surexpression d'Il-1 β chez les souris APP/PS1 conduit à une augmentation de l'activation microgliale³⁷⁹. L'Il-1 β régule la production de nombreux facteurs inflammatoires et peut produire des médiateurs toxiques, menant à une dégénération neuronale³⁰¹. Dans le contexte de la MA, une production soutenue d'Il-1 β aurait un effet délétère et provoquerait la mort des neurones. De plus, de nombreuses études montrent qu'Il-1 β participe à la progression de la MA³⁸⁰.

Les patients atteints de la MA présentent une augmentation de la concentration d'Il-1 β ³⁷⁵ et certains polymorphismes spécifiques d'Il-1 β sont associés à la MA³⁸¹. *In vitro*, le traitement des cellules gliales avec du peptide A β provoque une libération d'Il-1 β ^{382,383}. En outre, l'injection intracérébrale d'Il-1 provoque une augmentation de l'expression de l'APP³⁷⁸ et des études *in vitro* montrent que Il-1 β stimule l'activation de la γ -sécrétase menant à la production d'A β ^{384,385}. Il semble donc qu'Il-1 β et A β interagissent et forment un cercle vicieux, dans lequel A β provoque une libération d'Il-1 β tandis que ce dernier promeut le clivage de l'APP et donc la production d'A β .

Dans la MA, Il-1 β semble donc avoir des effets délétères, d'une part en maintenant la réponse inflammatoire, et d'autre part, en induisant la production de peptide A β . Cependant, une étude de Shaftel et *al.* montre que l'activation d'Il-1 β mène à une diminution des plaques amyloïdes³⁷⁹, suggérant un effet bénéfique d'Il-1 β . Ghosh et *al.* nuancent cette idée en montrant que l'activation d'Il-1 β entraîne une diminution des plaques mais conduit également à une augmentation de la phosphorylation de Tau³⁸⁶. *In vitro*, l'Il-1 β entraîne une phosphorylation de Tau dans les neurones en culture³⁸⁷ et l'inhibition *in vivo* d'Il-1 β atténue la pathologie Tau et améliore les déficits cognitifs³⁸⁸.

Il-1 β est une cytokine grandement présente dans la MA et semble majoritairement délétère. Ses effets ne sont, à ce jour, toujours pas bien compris. Il semblerait cependant qu'elle contribue à une inflammation chronique, probablement impliquée dans la mort neuronale, à la production d'A β ainsi qu'à la phosphorylation de Tau.

- TNF α

La concentration de TNF α est plus élevée chez les patients atteints de la MA³⁷⁴ et la stimulation *in vitro* de microglies avec des fibrilles A β induit une augmentation de l'expression de cette cytokine^{389,390}, déclenchant une mort neuronale³⁸⁹. De plus, la délétion du récepteur du TNF α dans une souris APP23 conduit à une diminution des microglies réactives ainsi qu'à une amélioration des déficits cognitifs et une diminution des plaques amyloïdes, bien que cette dernière semble être due à une diminution de la production du peptide³⁹¹. Cependant, une étude plus récente montre des résultats contradictoires. La délétion des récepteurs du TNF α , TNFR1 et TNFR2, entraîne une augmentation des dépôts amyloïdes et une progression de la pathologie Tau³⁹².

- Il-10

L'interleukine 10 (Il-10) est une cytokine anti-inflammatoire qui est surexprimée chez les patients atteints de la MA³⁷⁶. La concentration d'Il-10 dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients corrèle avec la progression de la maladie, suggérant que l'IL-10 puisse servir de biomarqueur pour la MA³⁷⁶. L'Il-10 agit comme un médiateur anti-inflammatoire et supprime la réponse inflammatoire en inhibant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que l'Il-1 β et le TNF α ³⁹³. Par conséquent, une augmentation d'Il-10 chez les patients atteints de la MA peut être un mécanisme mis en place afin d'atténuer la production excessive de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, dans le contexte de la MA, il semblerait que l'Il-10 ait un effet délétère. La surexpression d'Il-10 mène à une augmentation de la charge amyloïde, une diminution des marqueurs synaptiques et une dégradation des capacités cognitives³⁹⁴. Inversement, des souris APP/PS1 déficientes pour Il-10 présentent une diminution d'A β , une réduction de la perte synaptique et une amélioration des déficits cognitifs³⁹⁵. De plus, les auteurs de ces deux études suggèrent que l'Il-10 inhibe la phagocytose d'A β , et mettent en avant un rôle possible d'ApoE^{394,395}.

Dans l'ensemble les patients atteints de la MA montrent une augmentation de la production de cytokines. Dans ces conditions, la production continue de ces cytokines exacerbe la réponse inflammatoire et contribue à la neurodégénération et aux déficits cognitifs observés dans la MA.

Phagocytose et élimination de A β

L'une des principales grandes fonctions des microglies est la phagocytose. *In vitro*, les microglies sont capables de phagocyter et d'éliminer le peptide A β ³⁹⁶. *In vivo*, les microglies associés aux plaques sont capables d'ingérer le peptide et contribuent à la croissance des plaques^{397,398}. En effet, Bolmont et *al.* montrent que les microglies sont capables d'ingérer le peptide A β et que ce dernier se retrouve dans le compartiment lysosomal, suggérant un rôle dans la dégradation de celui-ci³⁹⁷. De plus, ils montrent que les plaques grandement associées aux microglies ont tendance à diminuer de taille au cours du temps tandis que les plaques associées à peu de microglies ont plutôt tendance à se développer, suggérant un rôle des microglies dans le maintien des plaques³⁹⁷. A l'opposé, Baik et *al.* montrent que, bien que les microglies phagocytent le peptide, elles ne sont pas capables de le dégrader. Au contraire, les peptides provoquent la mort des microglies et ces dernières les libèrent dans le milieu extracellulaire, contribuant ainsi à la croissance des plaques³⁹⁸. Les microglies sont donc

capables de phagocyter le peptide A β , néanmoins la contribution de ce processus à la croissance des plaques nécessite de plus amples études.

De manière intéressante, plusieurs études ont montré que la phagocytose d'A β par les microglies est dépendante des facteurs inflammatoires. Ainsi, l'Il-6 induit une forte activation microgliale qui mène à une phagocytose et à une diminution des dépôts A β ³⁹⁹. De même, une surexpression d'Il-1 β induit une diminution des plaques amyloïdes ainsi que des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂³⁷⁹. Heneka et *al.* montrent que des souris déficientes pour NLRP3 ou pour la caspase-1 ont une meilleure capacité à phagocyter le peptide et une augmentation de l'expression des enzymes de dégradation IDE et NEP, suggérant que l'inflammasome affecte négativement la dégradation du peptide A β ³⁶².

Les microglies sont donc capables d'éliminer le peptide A β par phagocytose. Cependant, au cours de la progression de la maladie, les microglies deviennent peu à peu incapables de phagocyter le peptide. En effet, Hickman et *al.* montrent que les microglies provenant de souris modèles âgées expriment moins de protéines Neprilysine et MMP9, capables de dégrader le peptide A β ³⁹⁹. Ils montrent, dans un modèle *in vitro*, que l'incubation des cellules avec du TNF α ou de l'Il-1 β induit une diminution de l'élimination du peptide, suggérant ainsi que cette altération est due à la réponse inflammatoire³⁹⁹. De manière intéressante, l'altération des fonctions microgliales dans la pathologie corrèle avec la densité des dépôts amyloïdes⁴⁰⁰. Babcock et *al.* montrent que la capacité phagocytaire des microglies dépend de leur profil inflammatoire. Les microglies exprimant le TNF α et l'Il-1 β présentent une capacité phagocytaire inférieure à celles qui ne les expriment pas. En revanche, les microglies exprimant Il-1 α ont une capacité phagocytaire plus élevée comparativement à celles qui ne les expriment pas⁴⁰¹.

Il semblerait donc que les microglies, au début de la pathologie, soient capables d'éliminer le peptide A β efficacement. Cependant, l'activation prolongée des microglies et la libération chronique de cytokines provoquent une altération de la phagocytose, rendant les microglies incapables d'assurer cette fonction.

La MA est caractérisée par une inflammation soutenue, observée par la production continue de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Ces cytokines participent à la neurodégénération mais également à la dégradation du peptide A β ainsi qu'à la phosphorylation de la protéine Tau. Les mécanismes d'action de ces cytokines restent à éclaircir. En effet, si inhiber l'inflammation semble parfois bénéfique, promouvoir un phénotype anti-inflammatoire reste

peu concluant⁴⁰². Il semblerait qu'en début de pathologie les microglies soient capables de phagocyter et d'éliminer A β . Au cours de la pathologie une activation chronique s'installe, caractérisée par une libération soutenue de cytokines. Cette activation chronique compromet les capacités phagocytaires des microglies qui deviennent incapables d'éliminer le peptide (Figure 14). Plutôt qu'une activation microgliale soutenue, il semblerait donc qu'une altération des microglies se développe au cours de la pathologie.

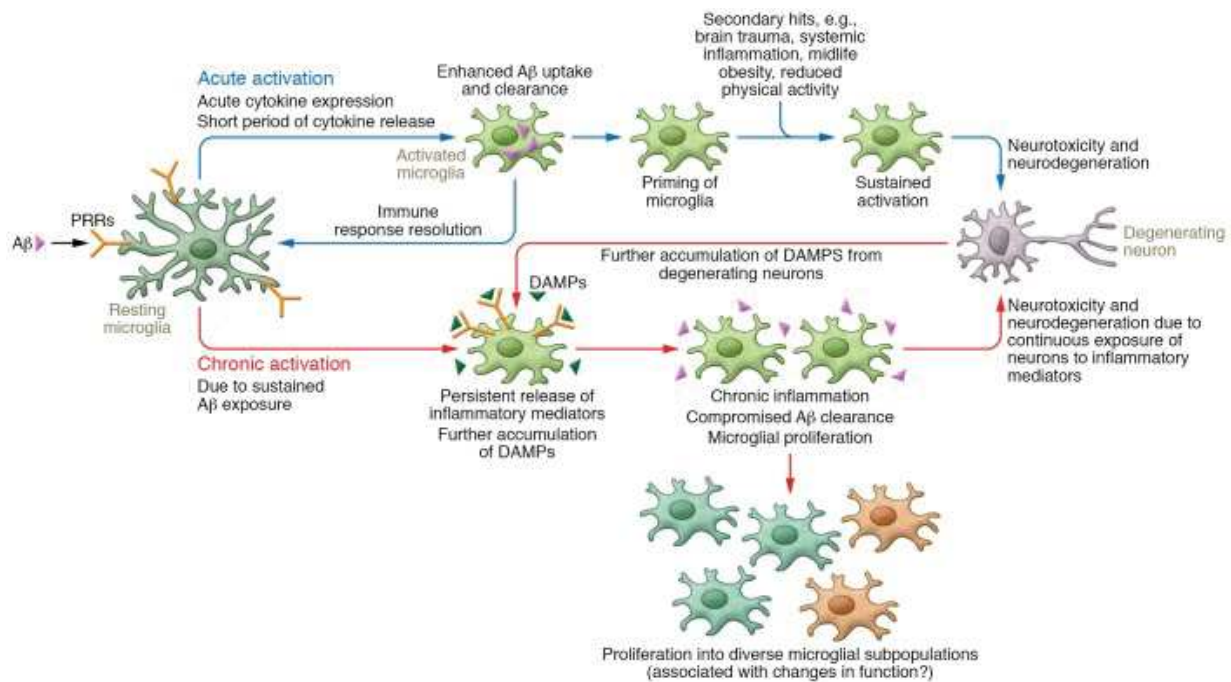


Figure 14 : Les microglies au cours de la maladie d'Alzheimer

Schéma de l'activation des microglies dans la maladie d'Alzheimer induite par A β . A β se lie à des récepteurs et déclenche l'activation des microglies. L'activation aiguë des microglies mène à la libération de cytokines et à la phagocytose du peptide. Lors d'une activation chronique, la libération soutenue de médiateurs inflammatoires altère et les fonctions microgliales et conduit à l'incapacité à éliminer le peptide. D'après Sarlus et Heneka (2017)

b) Les «Disease-associated microglia »

Plusieurs études se sont attardées sur le remodelage transcriptomique des microglies au cours de la pathologie, identifiant ainsi plusieurs gènes dérégulés⁴⁰³. Particulièrement, l'étude remarquable de Keren-Shaul et *al.* met en avant un nouveau type de microglie appelé « Disease-associated microglia » (DAM)²¹⁶. Ces microglies ont un profil particulier et présentent une diminution des marqueurs homéostatiques ainsi qu'une surexpression de certains gènes tels que *ApoE*, *Clec7a*, *Trem2* et *Cst7*. De manière intéressante, ces DAM sont abondantes dans les régions présentant des plaques amyloïdes tandis qu'elles ne sont que peu observées dans les régions ne présentant pas de plaques. L'activation des DAM se fait en

deux temps : l'étape initiale est associée à la dérégulation et la diminution des marqueurs homéostatiques tels que *P2ry12* et *Cx3Cr1* tandis que la deuxième étape est dépendante de *TREM2* et est caractérisée par une surexpression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et dans la phagocytose. Les auteurs suggèrent que les DAM sont bénéfiques et que leur fonction phagocytaire contribue à atténuer la pathologie. Cependant, les DAM ne sont présentes qu'en phase tardive de la maladie. En outre, les DAM ont pu être identifiées chez des patients atteints de la MA²¹⁶.

c) Modulation des microglies dans des modèles murins de la MA

Au vu des fonctions des microglies dans la MA, des études de déplétion microgliale ont été conduites afin d'essayer de comprendre leur implication. Grathwohl et *al.* montrent que la déplétion des microglies dans des souris APP/PS1 et des souris APP23 n'induit pas de changement dans le nombre de plaques amyloïdes ni dans leur morphologie⁴⁰⁴. De même, Spangenberg et *al.* n'observent pas de changement dans la charge amyloïde lorsque les microglies sont éliminées dans les souris 5xFAD. De plus, la déplétion des microglies améliore la mémoire contextuelle et atténue la perte neuronale et synaptique⁴⁰⁵. Dans leur étude, Olmos-Alonso et *al.* choisissent d'inhiber la prolifération des microglies plutôt que de les éliminer. Cette inhibition résulte en une perte de leur activation, une amélioration des capacités cognitives et une diminution de la dégénération synaptique. De plus, l'inhibition de la prolifération microgliale n'altère pas la concentration d'amyloïde β . Ces études montrent donc que l'élimination des microglies ou de leur activation a un effet bénéfique sur les déficits cognitifs et synaptiques. De plus, les microglies ne semblent pas impliquées dans la formation, le maintien ou l'élimination des plaques amyloïdes.

En 2015, des travaux de Hellwig et *al.* cherchent à clarifier le rôle des microglies dans la formation des plaques amyloïdes en utilisant des tranches organotypiques d'hippocampe. La déplétion des microglies dans des tranches WT traitées avec du peptide A β mène à la formation de plaques amyloïdes. La réintroduction de microglies WT dans ces tranches prévient la formation des plaques, supposant un rôle des microglies dans leur apparition. Cependant, la réintroduction de microglies provenant de souris âgées 5xFAD n'empêche pas la formation des plaques. De manière intéressante, la réintroduction de microglies provenant de souris 5xFAD jeunes, n'ayant pas encore développé de plaques amyloïdes, inhibe leur formation, suggérant ainsi que les microglies provenant de souris 5xFAD âgées, ayant été dans un contexte pathologique, présentent une incapacité à moduler les plaques amyloïdes. De manière semblable, Daria et *al.* montrent que les microglies provenant de souris jeunes sont

suffisantes pour induire l'élimination du peptide A β par des microglies de souris âgées APPS1. Ils observent que les microglies jeunes sécrètent des facteurs permettant de stimuler la phagocytose par les microglies âgées⁴⁰⁶.

Ces études suggèrent que les souris âgées des modèles de la MA présentent des microglies altérées, incapables de moduler l'élimination du peptide. La déplétion ou l'inhibition de la prolifération des microglies entraîne une amélioration cognitive et une diminution de la perte synaptique, suggérant un rôle négatif des microglies sur la dégénérescence synaptique et par conséquent sur les capacités mnésiques.

3.6.3 Les facteurs de risque microgliaux

Au cours des dernières années, des études de GWAS ont identifié plus de 25 loci génétiques associés au développement de la pathologie. La plupart de ces loci est impliquée dans la neuroinflammation et est préférentiellement ou exclusivement exprimée dans les microglies^{323,360}. Parmi eux, le variant commun *ApoE* et le variant génétique rare *TREM2* sont les deux facteurs de risque les plus étudiés.

a) L'Apolipoprotéine E

L'isoforme $\epsilon 4$ d'ApoE représente le plus commun variant génétique et le plus grand facteur de risque associé à la MA. Comme décrit précédemment (cf. §3.4.2), ApoE est exprimée dans les astrocytes et les microglies dans lesquelles elle joue un rôle dans l'agrégation et l'élimination du peptide A β . Peu d'études se sont cependant attardées sur le rôle d'ApoE dans les microglies. Des analyses post-mortem de patients atteints de la MA montrent que les patients porteurs de l'isoforme $\epsilon 4$ présentent une augmentation des microglies réactives dans le cortex temporal et frontal⁴⁰⁷. De manière similaire, les modèles murins exprimant ApoE- $\epsilon 4$ montrent une augmentation de la réactivité microgliale comparés à des animaux porteurs de ApoE- $\epsilon 3$ ^{408,409}. Ces observations suggèrent donc un lien entre les isoformes d'ApoE et les microglies réactives.

ApoE semble impliquée dans le processus inflammatoire. En effet, ApoE est surexprimée dans les MGnD et module le programme transcriptionnel de gènes homéostatiques et de facteurs inflammatoires²²⁹. *In vitro*, les cultures mixtes de cellules gliales déficientes en ApoE présentent une augmentation de la production de cytokines telles que TNF α , Il-1 β et Il-6⁴¹⁰. Inversement, l'application exogène d'ApoE sur des cultures traitées avec du peptide A β inhibe la production de facteurs inflammatoires⁴¹¹, suggérant qu'ApoE atténue la réponse pro-

inflammatoire. En outre, ApoE modifie la réponse inflammatoire différemment selon ses isoformes. Les animaux porteurs d'ApoE-ε4 libèrent plus de cytokines pro-inflammatoires que ceux exprimant ApoE-ε3 ou ApoE-ε2⁴¹². *In vitro*, les microglies de souris ApoE-ε4 présentent une augmentation de la libération des cytokines TNFα, Il-1β et Il-6 mais également une diminution d'Il-4. Par conséquent, les cellules exprimant ApoE-ε4 présentent à la fois une augmentation du profil pro-inflammatoire et une diminution du profil anti-inflammatoire⁴¹³. Il est intéressant de noter que dans les astrocytes, les différents isoformes d'ApoE ont un effet inverse. Contrairement aux microglies, les astrocytes exprimant ApoE-ε2 sécrètent plus d'Il-6 et de TNFα que ceux exprimant ApoE-ε4⁴¹⁴.

Il semble donc qu'ApoE soit impliquée dans le processus inflammatoire. ApoE atténue la réponse inflammatoire et promeut un état anti-inflammatoire. ApoE-ε4 est moins efficace à produire cet état anti-inflammatoire comparativement à ApoE-ε3. De manière intéressante, l'expression protéique d'ApoE dans les cellules ApoE-ε4 est moins élevée que celle des cellules ApoE-ε3⁴¹³, suggérant que la réponse inflammatoire accrue des cellules ApoE-ε4 peut être en partie due à une diminution de l'expression protéique d'ApoE.

b) TREM2, Triggering receptor expressed on myeloid cell 2

Le deuxième facteur de risque le plus étudié dans le cadre de la MA est le gène *TREM2* (Triggering receptor expressed on myeloid cell 2). En effet, les études de séquençage ont identifié plusieurs variant génétiques associés à la pathologie^{415,416} et le variant rs75932628 est grandement associé à la MA^{415,417}.

TREM2 est un récepteur exprimé sur les cellules myéloïdes^{418,419}, dont les cellules dendritiques, les macrophages⁴²⁰ et les microglies⁴¹⁸. TREM2 se lie à des molécules polyanioniques⁴²¹ telles que le LPS et à des lipides^{422,423} et agit *via* DAP12 afin de recruter la tyrosine kinase SYK. Cette dernière phosphoryle ensuite des effecteurs en aval tels que la PLCγ ou la PI3K^{420,424}. Par ces mécanismes, TREM2 module l'inflammation⁴²⁵, la phagocytose⁴²⁶ et la sécrétion de chimiokines⁴²⁷.

Les mécanismes par lesquels TREM2 influence la MA ne sont pas bien connus mais le variant rs75932628 cause une mutation R47H perte de fonction, suggérant un rôle protecteur de la protéine^{415,417}. TREM2 est surexprimée dans l'hippocampe et le cortex de souris APP/PS1⁴²⁸ et son expression est observée dans les microglies autour des plaques dans les modèles TgCRND8 et APP23, suggérant ainsi son implication dans la pathologie⁴¹⁵. Plus récemment, des études montrent qu'élever ou supprimer l'expression de TREM2 induit une

reprogrammation microgliale^{229,429} et l'étude de Keren-Shaul et *al.* suggèrent que TREM2 est nécessaire à l'activation des DAM²¹⁶. Lee et *al.* montrent que la surexpression de TREM2 entraîne la surexpression de certains gènes associés aux DAM afin de promouvoir certaines fonctions microgliales telles que la phagocytose et la suppression de la « sur-activation » des microglies⁴²⁹. De plus, plusieurs études montrent que les oligomères A β peuvent interagir avec TREM2 et que cette interaction module des fonctions microgliales comme leur prolifération, la dégradation d'A β et la réponse inflammatoire.

Des études se sont intéressées au rôle de TREM2 dans la réponse inflammatoire, bien que celles-ci révèlent des résultats contradictoires. Jay et *al.* observent que les souris APP/PS1 déficientes pour TREM2 présentent une diminution des transcrits Il-1 β et Il-6, suggérant que TREM2 promeut la réponse inflammatoire⁴³⁰. De même, Zhao et *al.* montrent que les microglies n'exprimant pas TREM2 ne produisent pas de cytokines inflammatoires lorsqu'elles sont stimulées avec du peptide A β ⁴³¹. Au contraire, Jiang et *al.* suggèrent que la surexpression *in vitro* de TREM2 dans les microglies incubées avec du peptide A β mène à une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires⁴²⁸. Ces études montrant des effets contradictoires, de plus amples études sont nécessaires afin de comprendre les effets de TREM2 sur la libération de cytokines.

De nombreuses études se sont également attardées sur l'implication de TREM2 dans le maintien des plaques amyloïdes. Ulrich et *al.* n'observent pas de différence de plaques amyloïdes entre les souris APP-21 hétérozygotes et homozygotes pour TREM2 âgées de 3 mois ou 7 mois⁴³². Cependant Jay et *al.* montrent une réduction des dépôts amyloïdes dans l'hippocampe de souris TREM2-KO âgées de 4 mois⁴³⁰. A l'opposé, Wang et *al.* observent une augmentation de la concentration de A β dans l'hippocampe de souris 5xFAD déficientes pour TREM2 âgées de 8 mois⁴²³. En accord avec cela, la surexpression de TREM2 dans des cultures de microglies induit la phagocytose du peptide A β_{1-42} ^{428,429}. De plus, la surexpression de TREM2 *in vivo*, par stratégie lentivirale, mène à une diminution de la densité des plaques dans le cortex et l'hippocampe ainsi qu'à une diminution des formes solubles et insolubles du peptide⁴²⁸. Ces études montrent donc des résultats contradictoires, pouvant cependant être expliqués par l'âge des souris ou les différents modèles choisis. Dans l'ensemble, il semblerait donc que l'interaction entre TREM2 et les dépôts amyloïdes soit complexe.

Enfin, des études montrent que le déficit en TREM2 mène à une diminution des microglies associées aux plaques amyloïdes^{423,430,432} tandis que la surexpression de TREM2 conduit à

une amélioration des fonctions cognitives dans des tests de mémoires contextuels ainsi que dans le test de la piscine de Morris^{428,429}.

De manière intéressante, TREM2 module l'expression d'ApoE. En effet, TREM2 est nécessaire pour l'activation des DAM et la surexpression d'ApoE est supprimée chez les souris TREM2-KO^{216,229}. Parhizkar et *al.* montrent que les souris TREM2-KO présentent une diminution de l'expression d'ApoE au sein des plaques amyloïdes, suggérant que TREM2 conditionne l'expression d'ApoE⁴³³. En outre, les patients atteints de la MA porteurs de mutations perte de fonction de TREM2 présentent une réduction de la quantité d'ApoE associée aux plaques⁴³³.

Bien que ses mécanismes d'action ne soient pas bien établis, TREM2 semble intervenir dans la pathologie par diverses fonctions : en interagissant avec le peptide A β , modulant ainsi son dépôt et sa phagocytose, en modulant la libération de cytokines mais également en agissant sur l'expression d'ApoE. Bien que le rôle de TREM2 ne soit pas clair, il semble que, de manière générale, TREM2 promeut la localisation des microglies autour des plaques et une amélioration des fonctions cognitives. Nombre d'études surexpriment ou inhibent son expression ; or il serait également pertinent d'étudier les différents variants de TREM2.

ApoE et TREM2 sont les deux facteurs de risque les plus étudiés dans la maladie d'Alzheimer. Tous deux sont exprimés dans les microglies où ils modulent diverses fonctions. Parmi les gènes identifiés par les études de GWAS, beaucoup sont exprimés dans les microglies tels que *CD33* et *CRI*. Ces gènes semblent impliqués dans la MA de par leurs fonctions dans l'activation microgliale⁴³⁴ mais n'ont été que peu étudiés.

Dans l'ensemble, ces données mettent en avant une forte implication des microglies dans la maladie d'Alzheimer. Leur contribution, bénéfique ou délétère, reste à déterminer. Il semblerait cependant que ce ne soit pas aussi binaire et que leur contribution dépende du stade et de la progression de la pathologie.

3.7 Les récepteurs purinergiques microgliaux dans la maladie d'Alzheimer

Comme mentionné précédemment (cf. §2.2), les récepteurs purinergiques sont exprimés au sein des microglies et remplissent diverses fonctions importantes. Ces récepteurs étant impliqués dans l'inflammation, le maintien de l'homéostasie et la phagocytose, il semble pertinent de les étudier dans le contexte de la MA.

3.7.1 Les récepteurs P2Y microgliaux dans la maladie d'Alzheimer

a) P2Y6R microglial dans la maladie d'Alzheimer

Comme décrit précédemment, P2Y6R est impliqué dans la phagocytose²⁴⁹⁻²⁵¹ et pourrait donc être impliqué dans l'élimination du peptide A β dans la MA. En utilisant des tranches aigües de cerveaux, Wendt et *al.* montrent que la phagocytose par des microglies de souris 5xFAD de 9 mois est altérée comparativement à celle des souris WT. Chez les WT, cette phagocytose est dépendante de P2Y6R puisqu'elle est inhibée en présence de MRS2578, un antagoniste de P2Y6R. Cependant, MRS2578 n'affecte pas la phagocytose chez les souris 5xFAD, suggérant une altération de ce récepteur. De manière intéressante, ils montrent que l'altération de la phagocytose affecte aussi bien les zones riches que pauvres en plaques amyloïdes, montrant une indépendance vis à vis de ces dernières. Enfin, ils montrent que cette altération est dépendante de l'âge puisque la phagocytose dépendante de P2Y6R n'est pas altérée chez des 5xFAD de 4 mois. Dans l'ensemble, cette étude montre que P2Y6R est impliqué dans la capacité phagocytaire des microglies dans le cerveau de modèles murins de la MA²⁵².

b) P2Y12R dans la maladie d'Alzheimer

Dans le CNS, P2Y12R est exclusivement exprimé dans les microglies et est un marqueur des microglies homéostatiques^{226,230}. En accord avec cela, les microglies réactives situées autour des plaques amyloïdes n'expriment pas P2Y12R tandis que son expression est observée dans les microglies distantes des plaques^{430,435}. Bien que ces observations soient consistantes avec une diminution des microglies homéostatiques autour des plaques, les conséquences de la diminution de son expression sur les fonctions microgliales ne sont pas connues.

3.7.2 Les récepteurs P2XR microgliaux dans la maladie d'Alzheimer

P2X4R et P2X7R sont les deux seuls P2XR exprimés dans les microglies¹³⁵. Ces deux récepteurs sont impliqués dans l'inflammation présente dans diverses pathologies (cf. §2.2.2) et méritent donc leur attention dans le contexte inflammatoire de la MA.

a) P2X7R dans la maladie d'Alzheimer

Dans le contexte de la MA, P2X7R représente le récepteur purinergique le plus étudié. P2X7R est surexprimé dans le cerveau de patients atteints de la MA^{136,436} et il a été observé que le polymorphisme 489C>T de P2X7R est moins fréquent chez les patients atteints de la MA⁴³⁷. L'exposition de cultures de microglies humaines au peptide A β conduit à une augmentation de l'expression de P2X7R et l'injection de peptide A β dans l'hippocampe de rat

induit une expression de P2X7R dans les microglies¹³⁶. Les souris P2X7R-KO présentent de meilleures capacités cognitives ainsi qu'une diminution des déficits synaptiques⁴³⁶. Les souris déficientes pour P2X7R montrent également une diminution de la charge amyloïde^{436,438} et Ni et *al.* observent *in vitro* une augmentation de la phagocytose d'A β lors de l'inhibition de P2X7R⁴³⁹. En outre, l'absence de P2X7R mène à une augmentation de l'activité de l' α -sécrétase, induisant ainsi une diminution de la production d'A β ⁴³⁸. Il semble donc que l'absence de P2X7R module les dépôts amyloïdes, en promouvant la phagocytose du peptide A β ou en inhibant sa production.

L'implication de P2X7R dans la libération de facteurs inflammatoires a également été étudiée. *In vitro*, l'inhibition de P2X7R, par siRNA ou par l'antagoniste Brilliant Blue G, conduit à une diminution de la libération des cytokines Il-1 β et de TNF α après stimulation par l'A β et l'ATP⁴³⁹. De plus, la stimulation des microglies issues de souris P2X7R-KO ne provoque pas la libération d'Il-1 β , contrairement à ce qui est observé dans les cellules WT⁴⁴⁰. Cependant, Martin et *al.* n'observent pas d'altération dans la libération de ces cytokines dans les cerveaux de souris P2X7R-KO⁴³⁶.

Ces études suggèrent une forte implication de P2X7R dans la pathologie. L'absence ou l'inhibition de P2X7R semble avoir un effet bénéfique sur les capacités cognitives et les dépôts amyloïdes. Cependant, l'implication de P2X7R dans la libération de cytokines pro-inflammatoires dans un contexte de la MA reste à élucider.

b) P2X4R dans la maladie d'Alzheimer

P2X4R est induit dans les microglies réactives et est impliqué dans divers processus inflammatoires⁴⁴¹. Une diminution de l'expression de P2X4R dans le cerveau de patients atteints de la MA a été observée⁴⁴². Bien que P2X4R neuronal ait été impliqué dans la mort des neurones provoquée par le peptide A β ⁴⁴², aucune étude ne montre l'implication des récepteurs microgliaux dans la maladie d'Alzheimer.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent l'implication des récepteurs purinergiques microgliaux dans la maladie d'Alzheimer. Cependant, ces récepteurs étant également exprimés par les neurones, des outils plus spécifiques seraient nécessaires afin d'étudier leur implication dans les fonctions microgliales.

MATERIELS ET METHODES

1 Animaux

Les animaux sont maintenus en cycle 12h jour/nuite dans une animalerie à statut EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes spécifiques) et disposent de nourriture et boisson à volonté. Les souris utilisées pour les travaux *in vivo* sont exclusivement des mâles de 12-13 mois. Les souris utilisées pour les cultures primaires sont des souris mâles âgées de 3 à 5 mois.

1.1 Génération des souris P2X4R-KO

Les souris P2X4R-KO ont été générées comme décrit par Sim *et al.*¹²⁹. Brièvement, une cassette β -galactosidase (LacZ)-neomycine a été insérée à la place du premier exon codant du gène *p2rx4*. Le promoteur de *p2rx4* promeut donc l'expression de la β -galactosidase (Figure 15).

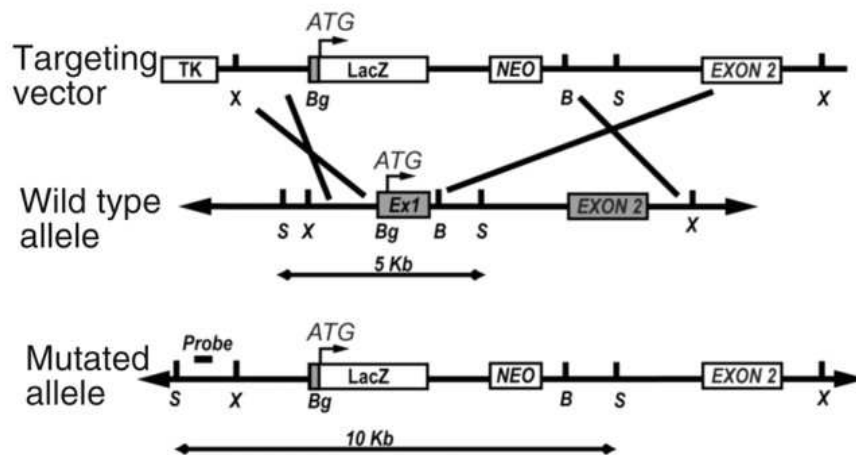


Figure 15 : Génération de la mutation sur le gène *p2rx4*

Carte du gène P2XR4 sauvage (milieu), du vecteur cible (haut) et du gène muté (bas). L'insertion de la cassette LacZ induit une délétion de la région codante de l'exon 1 du gène.

1.2 Les souris APP/PS1 et APP/PS1xP2X4R-KO

Des souris transgéniques APPSwe/PSEN Δ E9 (appelées simplement APP/PS1), exprimant une protéine APP chimérique Homme/Souris ainsi que le gène Preseniline (PSEN1) privé de l'exon 9⁴⁴³, sous le contrôle de la protéine prion de souris et sur un fond C57BL/6J, sont utilisées.

Afin de générer des souris APP/PS1xP2X4R-KO, des souris mâles de la lignée APP/PS1 sont croisées avec des souris femelles P2X4R-KO.

1.3 Les souris Cathepsine B-KO

Les souris Cathepsine B-KO ont été fournies par la Dr. Manoury du centre de recherche de l'Institut Necker enfants malades, et leur génération décrite dans Deussing *et al.*⁴⁴⁴

2 Tissus humain

Les lames de coupes de cerveaux humains ont été obtenues à la banque d'échantillon IHU-A-ICM-Neuro-CEB de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière à Paris. Des échantillons de cortex de patients atteints de la maladie d'Alzheimer au stade VI de Braak, âgés de 56 à 88 ans, ainsi que ceux d'un témoin âgé de 90 ans sont utilisés. Les coupes, de 30 μm d'épaisseur, sont congelées et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3 Expériences comportementales

3.1 La piscine de Morris

Le test de la piscine de Morris a été réalisé dans une cuve circulaire de 140 cm de diamètre et de 45 cm de hauteur. Celle-ci est remplie avec de l'eau à une température de 20°C et contenant du blanc de Meudon afin de la rendre opaque. Des indices visuels fixes sont placés sur les murs autour de la piscine afin d'orienter les souris. Le test consiste en une phase d'apprentissage de six jours, suivie d'un jour de repos puis du test de rétention, au jour 8. Durant la phase d'apprentissage, une plateforme de 10 cm de diamètre est immergée, de manière à être invisible pour les souris, et placée dans un cadran qui restera le même durant toute cette phase. Les souris réalisent trois essais par jour ; chaque essai étant espacé de 15 min. Durant chaque essai, les souris sont placées dans un cadran aléatoire et peuvent nager pendant 90 secondes. Lorsqu'elles atteignent la plateforme, les souris y restent 20 secondes avant d'être replacées dans leur cage. Si les souris n'atteignent pas la plateforme au bout des 90 secondes, elles sont délicatement attrapées et placées sur celle-ci pendant 20 secondes. La médiane des trois essais est calculée pour chaque jour d'apprentissage. Lors du test de rétention, au jour 8, la plateforme est retirée et les souris nagent pendant 60 secondes. Le temps passé dans le cadran cible, c'est-à-dire le cadran contenant la plateforme lors la phase d'apprentissage, est mesuré grâce au logiciel Viewpoint.

3.2 Le test du Hamlet

Le test du Hamlet a été réalisé tel que décrit par Crouzier *et al.*⁴⁴⁵. Le dispositif consiste en un appareil de 1.6 mètre de diamètre, ayant des murs de 30 cm de haut et élevé de 30 cm au-dessus du sol. Il contient une agora en son centre ainsi que cinq couloirs, de 30 cm de long et 8 cm de largeur, s'étendant dans différentes directions et menant vers différents compartiments appelés « maisons ». Chaque maison a une fonctionnalité différente, leur permettant de se nourrir, de boire, de se cacher, de courir ou d'interagir avec une autre souris (Figure 16). Le test se compose d'une phase d'apprentissage de 12 jours suivi d'un test de rétention, réalisé 72 heures après le dernier jour d'apprentissage. Durant la phase d'apprentissage, les souris sont placées dans l'agora par groupe de 6-8 durant 4 heures et sont libres de circuler dans tout le dispositif. 15 heures avant le test de rétention, les biberons d'eau sont retirés des cages d'hébergement des souris afin de les priver d'eau (water-deprived). Lors de la rétention, les souris sont placées individuellement dans l'agora et sont libres de se déplacer pendant 10 min ; leur comportement exploratoire est alors suivi et enregistré. L'analyse via le logiciel Viewpoint permet d'analyser le temps de latence ainsi que le nombre d'entrées dans chaque maison. Après le test de rétention, les souris retournent dans leur cage et ne sont plus privées d'eau. Le jour suivant, les souris sont placées dans le Hamlet d'une manière similaire au jour précédent afin de réaliser le test de rétention en condition non-privée (Non water-deprived).



Figure 16 : Le dispositif du test du Hamlet

L'appareil dispose d'une agora en son centre, où les souris sont placées au début du test. L'agora est reliée à différentes maisons par des couloirs. Chaque maison possède une fonction : boire, manger, se cacher, courir et interagir avec une souris étrangère.

4 Culture cellulaire

4.1 Culture et transfection des cellules COS-7

Les cellules COS-7 sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) + glutamaX (Gibco, 61965), supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal décomplémenté) et 1% de Penicillin-Streptomycin. Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂. Pour leur entretien bihebdomadaire, les cellules sont rincées au PBS (tampon phosphate salin) puis traitées au Versène (Gibco, 15040-033) afin de permettre leur détachement. Les cellules sont ensuite ensemencées dans des plaques de 6 puits à 70% de confluences afin d'être transfectées 24 heures plus tard. Les cellules sont transfectées avec de la Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, 11668019) avec les quantités d'ADN suivantes : 150 µg ApoE, 100µg P2X4, 100 µg P2X4K69A, 100 µg P2X2. Pour les formes humaines, 50 µg d'ApoE-ε2, ApoE-ε3 ou ApoE-ε4 ainsi que 33 µg de P2X4R humain sont transfectés. 48 heures après transfection, les cellules sont rincées et incubées sur la nuit dans du milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) contenant du calcium et du magnésium (Gibco, 14025092). Les surnageants et les extraits cellulaires sont ensuite collectés pour des expériences de Western Blot.

4.2 Culture de macrophages

Les macrophages sont obtenus à partir de moelle osseuse de fémur et de tibia des souris. Les souris WT ou P2XR4-KO sont euthanasiées à l'euthasol Vet (400mg/kg) afin de récupérer les fémurs et tibias. La moelle osseuse est ensuite collectée dans du milieu contenant 30% de milieu de cellules L929 et 70% de milieu DMEM + glutamaX, supplémenté avec 10% de SVF et 1% de Penicillin-Streptomycin. Les cellules sont ensuite mécaniquement dissociées et cultivées dans ce même milieu. Le milieu est changé tous les trois jours. A DIV7, les macrophages sont rincés au PBS et ensemencés en plaque de 12, 24 ou 96 puits selon leur utilisation.

4.3 Traitement pharmacologique

Pour les traitements pharmacologiques, les macrophages sont ensemencés dans des plaques de 12 puits à raison de 10⁶ cellules par puits. 24 heures après ensemencement, les cellules sont incubées dans de l'HBSS contenant les différents agents pharmacologiques indiqués dans le Tableau 4, pendant une nuit, avant d'être collectés pour des expériences de Western Blot.

Drogues	Cibles	Concentration utilisée	Référence produit
E64	Cysteine protease	10 μ M	Tocris, 5208
Calpain inhibitor II	Calpain I et II, cathepsine B, S et L	10 μ M	Bertin Pharma, 15994
Calpain inhibitor III	Calpain I, calpain II	10 μ M	Bertin Pharma, 14283
Cathepsin B inhibitor	Cathepsine B	20 μ M	Santa Cruz, sc3131
Ly3000328	Cathepsine S	10 μ M	MedChem Express, HY-15533
Cathepsin L inhibitor	Cathepsine L	20 μ M	Santa Cruz, sc3132

Tableau 4 : Liste des agents pharmacologiques utilisés en culture cellulaire

5 Biochimie

5.1 Préparation des extraits cellulaires de COS-7 et macrophages

Les surnageants des macrophages et cellules COS-7 sont collectés dans des colonnes Amicon (Millipore, UFC5010BK). Les surnageants sont ensuite centrifugés à 14000 g pendant 20 min à 4°C afin de collecter et concentrer les protéines. Les cellules sont quant à elles homogénéisées dans du tampon de lyse (100 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM EDTA, 1% IGEPAL) contenant des inhibiteurs de protéases et phosphatase (ThermoFisher, A32961), pendant 30 min à 4°C. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 15900 g à 4°C pendant 10 min. Le surnageant, contenant ainsi les protéines solubilisées, est récupéré et la concentration protéique mesurée par la méthode de BCA.

5.2 Préparation des extraits cellulaires de cortex

Les souris sont anesthésiées à l'Euthasol Vet et une perfusion intracardiaque de PBS est réalisée. Le cerveau est disséqué afin de récupérer les cortex. Ceux-ci sont ensuite lysés dans un tampon de lyse (100 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM EDTA, 1% Triton-X100), contenant des inhibiteurs de protéases et phosphatases, avant d'être homogénéisés sur roue pendant une heure à 4°C. L'homogénat est ensuite centrifugé à 15900 g à 4°C pendant 10 min et la concentration protéique mesurée.

5.3 Préparation des extraits de synaptosomes

Les extraits de synaptosomes de cortex sont préparés à l'aide du réactif d'extraction Syn-PERTM (Thermofisher, 87793). Après pesée, les cortex sont homogénéisés mécaniquement dans du réactif Syn-PERTM supplémenté en inhibiteurs de protéases et de phosphatases, à raison de 10 mL par gramme de tissus. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 1200 g

pendant 10 min à 4°C et les surnageants sont récupérés. Après dosage des protéines par méthode de BCA, les échantillons sont centrifugés à 15000 g pendant 20 min à 4°C. Suite à cette étape, les surnageants constituent les fractions cytosoliques de l'échantillon tandis que les culots représentent les synaptosomes. Pour finir, les culots sont resuspendus dans du réactif Syn-PER™ à raison de 1-2 mL par gramme de tissu.

Anticorps	Dilution	Hôte	Référence produit
Anticorps primaires			
ApoE	1:1000	Chèvre	Millipore, AB947
P2X4R	1:1000	Lapin	Sigma, HPA039494
Tubuline	1:2000	Souris	Sigma, T9026
RFP	1:1000	Lapin	MBL, PM005
HA	1:1000	Lapin	Invitrogen, 715500
6E10	1:1000	Lapin	Biologend, SIG-39320-0200
Cathepsin B	1:1000	Chèvre	R&D systems, AF965
Anticorps secondaires			
Souris-HRP	1:5000	Cheval	Cell singling, 7076S
Lapin-HRP	1:5000	Chèvre	Jackson, 111-035-144
Chèvre-HRP	1:5000	Ane	Jackson, 705-035-003

Tableau 5 : Tableau des anticorps utilisés pour les expériences de Western Blot

5.4 Western Blot

Les surnageants et extraits cellulaires sont dilués dans du tampon de charge dénaturant (tampon LDS-Page 4x, Invitrogen), complétés avec 5% de β -mercaptoethanol puis chauffés pendant 5 min à 80°C. Les protéines sont ensuite séparées par migration sur un gel polyacrylamide en gradient 4-12% (ThermoFisher, NW04125BOX), dans du tampon MOPS (ThermoFisher, B0001) et transférées sur membrane de nitrocellulose à l'aide du système iBlot (ThermoFisher, IB21001). Les membranes sont incubées dans un tampon de blocage (PBS + 0,1% de Tween-20 (PBS-T) et 5% de lait), à température ambiante pendant une heure avant d'être incubées avec les anticorps primaires (cf. Tableau 5) dans ce même tampon durant la nuit. Le lendemain, après trois lavages au PBS-T, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à l'enzyme HRP (cf. Tableau 5) pendant 1 heure à

température ambiante. Les protéines sont ensuite révélées par chimioluminescence avec un substrat ECL (Biorad, 170-5061). Les images sont acquises à l'aide d'un Chemidoc Touch (Biorad) et analysées avec le logiciel ImageLab.

6 ELISA A β

Les cortex sont disséqués tels que décrit plus haut. Ils sont ensuite homogénéisés dans du tampon de solubilisation (Tris 1 M pH 7,6 + 2% SDS contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases ainsi que 1 mM d'ABCSEF (Cayman Chemical, 14321)) à l'aide de deux sonications de 5 secondes chacune. Après centrifugation à 16000 g pendant 30 min à 4°C, les surnageants sont récupérés, constituant la phase soluble des extraits. La concentration protéique est ensuite dosée par la méthode de BCA et les échantillons dilués afin de procéder à l'ELISA. L'ELISA a été réalisé selon les recommandations du kit et du fournisseur (ThermoFisher, KHB3441). La concentration d'A β obtenue pour chaque échantillon est ensuite rapportée à la quantité de protéines.

7 Immunofluorescence

7.1 Immunofluorescence sur culture de macrophages

Les macrophages sont ensemencés sur des lamelles contenues dans des plaques de 24 puits, à raison de 10^5 cellules par puits. Après fixation pendant 5 min avec du PFA 1%, les cellules sont incubées pendant 30 min avec une solution de saturation IF : PBS contenant 0,1% de Triton X-100 (Sigma, X-100) et 10% de sérum d'âne (Sigma, D9663). Les cellules sont ensuite incubées dans du PBS-0,1% Triton X-100 contenant les anticorps primaires (cf. Tableau 6) pendant 2 heures, rincées trois fois au PBS, puis incubées avec les anticorps secondaires (cf. Tableau 6) pendant une heure. Un marquage Hoechst est utilisé pour visualiser les noyaux. Le Hoechst (Sigma, B2883) est dilué à 1:5000 dans de l'eau et les cellules sont incubées dans cette solution pendant 5 min avant d'être rincées trois fois au PBS. Les lamelles sont montées sur lames avec du milieu de montage (Dako, S3023).

7.2 Immunofluorescence sur coupe de cerveau

Afin de récupérer le cerveau, les souris sont anesthésiées et perfusées avec du PBS en intracardiaque. Le cerveau est ensuite extrait et un héli-cerveau est fixé par immersion dans du PFA 4% pendant une nuit. Le lendemain, la PFA est remplacée par du PBS contenant

0,1% de sodium azide. Les héli-cerveaux sont coupés au vibratome (Leica, VT1000S) afin d'obtenir des sections de 40 μm d'épaisseur. Pour l'immunohistochimie, les coupes sont incubées dans une solution de saturation IF pendant 2 heures à température ambiante avant d'être incubées avec les anticorps primaires (cf. Tableau 6) pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les coupes sont rincées au PBS et incubées avec les anticorps secondaires (cf. Tableau 6) pendant 2 heures à température ambiante. Avant montage, les coupes sont incubées avec du True Black® (Biotium, 23007) afin de masquer l'autofluorescence des lipofusines. Les coupes sont ensuite montées sur lamelles à l'aide du milieu de montage (Dako, S3023). Lorsque indiqué, les coupes sont traitées avec de l'AmyloGlo® (Biosensis, TR-300-AG) afin de marquer les plaques amyloïdes, selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, en amont du marquage par les anticorps décrit ci-dessus, les coupes sont déshydratées à l'éthanol pendant 5 min, rincées à l'eau distillée pendant 2 min, puis incubées dans une solution saline contenant de l'AmyloGlo®. Des rinçages à la solution saline et à l'eau distillée complètent la procédure. L'AmyloGlo® permet de marquer les plaques amyloïdes, avec des spectres d'excitation et d'émission de 325-375 nm et 400-450 nm respectivement.

7.3 Immunofluorescence sur coupe de cortex humain

Les tissus humains sont fixés avec de la PFA à 4% et incubés avec du tampon de saturation IF. Les lames sont directement incubées avec les anticorps primaires (cf. Tableau 6) dilués dans du PBS-0,1% Triton X-100 pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les lames sont rincées et incubées avec les anticorps secondaires (cf. Tableau 6) et traitées avec du True Black®.

8 Quantification par immunofluorescence

8.1 Quantification des plaques amyloïdes

Afin de réaliser un marquage des plaques amyloïdes, les coupes de cerveaux de souris ont été obtenues comme décrit plus haut. Les coupes sont incubées avec de la Thioflavine T à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma, T3516) pendant 15 min, rincées à l'éthanol 70% pendant 5 min et lavées au PBS trois fois. Les coupes sont ensuite montées sur lames et les acquisitions sont réalisées à l'aide d'un microscope Zeiss AxioImager Z1. Le nombre et la taille des plaques sont quantifiés à l'aide de la méthode de seuillage avec le logiciel ImageJ.

8.2 Quantification microgliale

Les coupes de cerveaux sont marquées avec de l'AmyloGlo® et l'anticorps Iba1, en utilisant le protocole décrit en paragraphe 7.2, afin de marquer les plaques amyloïdes et les microglies respectivement. Pour la quantification microgliale, des champs contenant des plaques amyloïdes sont choisis de façon aléatoire ; six champs par coupe, à raison de 5 coupes par animal, sont acquis à l'aide d'un microscope Zeiss AxioImager Z1. Pour chaque plaque amyloïde, la zone d'intérêt est définie par un périmètre variant selon la taille de la plaque ; le périmètre est calculé avec un rayon correspondant à quatre fois celui de la plaque amyloïde. L'aire du marquage Iba1 est quantifiée dans cette zone d'intérêt grâce au logiciel ImageJ, sur la base d'un seuillage automatique.

Anticorps	Dilution	Hôte	Référence produit
Anticorps primaires			
ApoE	1:500	Chèvre	Millipore, AB947
Iba1	1:2000	Lapin	Wako, MNK4428
Iba1	1:1000	Chèvre	Abcam, ab5076
Cathepsin B	1:200	Chèvre	R&D systems, AF947
Cathepsin B	1:200	Lapin	Cell signaling, 31718
P2X4R	1:200	Rat	Don du Dr. Nolte
P2X4R	1:200	Lapin	Sigma, HPA039494
Cd68 (couplé Alexa-488)	1:300	Ane	Biorad, MCA1957A488T
Anticorps secondaires			
Rat-A594	1:500	Ane	Jackson, 712-586-150
Chèvre-A488	1:500	Ane	Molecular probes, A11034
Lapin-A557	1:500	Ane	R&D system, NL004
Lapin-A488	1:1000	Chevre	Molecular probes, A11034

Tableau 6 : Tableau des anticorps utilisés en immunofluorescence

9 Marquage Golgi

Les cerveaux sont récupérés comme décrit en section 7.2. Des coupes de 150 µm d'épaisseur sont obtenues au vibratome. Le marquage Golgi est réalisé à l'aide du kit « Slice Golgi Kit » (BioemmoTech, 003760), en suivant les recommandations du fournisseur. Les images sont

obtenues au microscope Zeiss AxioImager Z1. Seuls des dendrites du second ordre des neurones du cortex sont analysées. L'analyse des épines dendritiques est réalisée avec le logiciel Imaris, en utilisant la fonction « filaments ». Le nombre d'épines est rapporté à la longueur de la dendrite analysée.

10 Mesure de l'activité de la cathepsine B *in vitro*

10.1 Mesure en lecture de plaques

Afin de réaliser les mesures d'activité, les macrophages sont ensemencés en plaque de 96 puits à raison de 10^5 cellules par puits. 12 heures après, les cellules sont incubées avec de l'HBSS contenant le substrat de la cathepsine B, le Z-RR-AMC (Enzo, BNL-P137), à 100 μ M pendant 1 heure à 37°C. La fluorescence est lue à 440 nm, après une excitation à 365 nm, grâce à un lecteur de plaques (Molecular Devices, Flexstation 3). La fluorescence est ensuite normalisée à la quantité de protéines et rapportée à la fluorescence des cellules WT.

10.2 Mesure en microscopie

Pour l'étude de l'activité de la cathepsine B en microscopie, les macrophages sont ensemencés sur des lamelles contenues dans des plaques de 24 puits, à raison de 10^5 cellules par puits. Ils sont ensuite incubés avec un substrat cathepsine B-Magic Red (BioRad, ICT938) pendant 2 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis fixées à la PFA 1%. Les images sont acquises à l'aide d'un microscope Zeiss AxioImager Z1 et l'intensité moyenne de fluorescence est analysée avec le logiciel ImageJ.

11 Cytométrie et tri cellulaire

Les cortex de souris sont prélevés tels que décrit en section 5.2 et dissociés à l'aide du kit de dissociation *Neural Tissue Dissociation Kit P* (Miltenyi, 130-092-628) et du dissociateur *gentleMACS Octo Dissociator with heaters* selon le protocole préprogrammé *ABDK_01*. Après dissociation, la myéline est séparée à l'aide de la solution *Debris Removal Solution* (Miltenyi, 130-109-398). Les cellules sont incubées avec du Fc Bloc (1/100, BD Pharmingen, 553142) pendant 10 min sur glace puis marquées avec un anticorps Cd11-PE (BD Pharmingen, 557397) pendant 30 min sur glace afin de marquer les microglies. Les cellules sont ensuite analysées et triées à l'aide du trieur BD FACS Melody. Les cellules sont en premier lieu séparées selon leur taille (FSC) et leur granulosité (SSC). Les doublets sont

ensuite discriminés. Enfin, les cellules marquées positivement avec du Cd11b-PE sont analysées et triées (Figure 17). Les microglies ainsi récupérées sont ensuite homogénéisées dans le tampon de lyse mentionné en section 5.2. Après une centrifugation à 15900 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est collecté et utilisé pour des expériences de Western Blot.

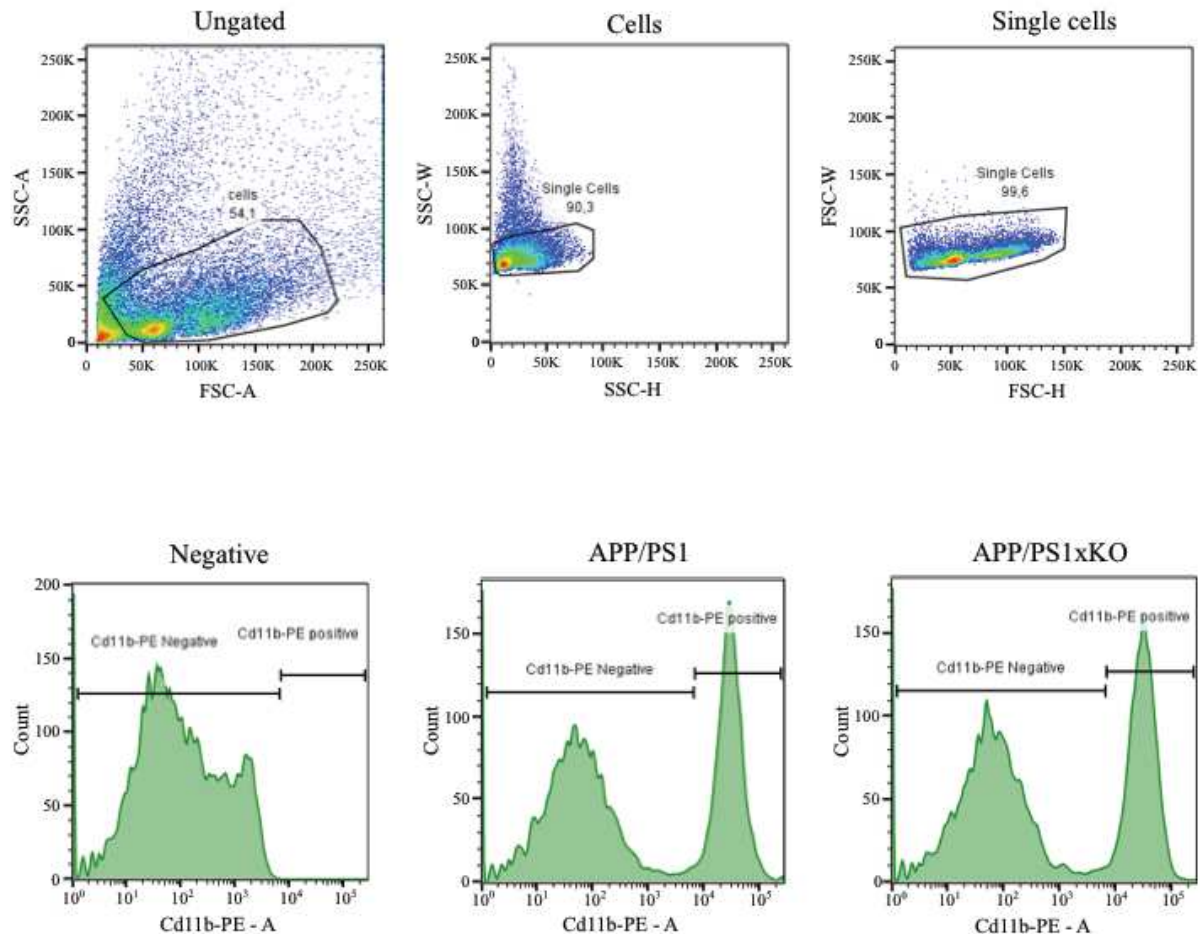


Figure 17 : Tri des microglies par FACS

Les cellules sont sélectionnées selon leur granulosité et leur taille (SSC-A/FSC-A) : sélection de la population “cells”. Les doublets sont ensuite éliminés selon leur granulosité (SSC-W/SSC-H) et leur taille (FSC-W/FSC-W) : sélection de la population “single cell”, avant d’être triée selon leur marquage Cd11b-PE. Les histogrammes (*bas*) représente le marquage cd11b-PE pour un contrôle négatif, un cortex provenant de souris APP/PS1 et un cortex provenant de souris APP/PS1xKO

12 Statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés à l’aide du logiciel Graph Prism. Les résultats sont analysés à l’aide de tests de Student ou d’ANOVA, après vérification des conditions d’application : la normalité est vérifiée à l’aide du test de Shapiro-Wilk et l’égalité des variances à l’aide du test de Fisher. Afin de comparer l’effet des traitements sur les

MATERIELS ET METHODES : Statistiques

macrophages en cultures, des tests de Student appariés sont réalisés. Lorsque les conditions d'application ne sont pas respectées, les données sont analysées avec des tests non paramétriques : le test de Wilcoxon-Mann-Whitney pour la comparaison de deux échantillons ainsi que le test de Kruskal-Wallis pour des comparaisons de multiples échantillons. Sur chaque graphique, les valeurs indiquées représentent les moyennes \pm SEM. Pour chacun des tests, la notation est telle que * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$.

RESULTATS

Contexte de l'étude

Les récepteurs P2X sont exprimés par toutes les cellules du SNC. Ils sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques tels que l'inflammation chronique. En particulier, P2X4R est exprimé par les neurones et les microglies et est impliqué dans diverses pathologies telles que l'épilepsie et les douleurs inflammatoires et neuropathiques. Dans ce contexte, des études précédemment menées au sein du laboratoire ont cherché à mettre en évidence les partenaires protéiques de P2X4R. Ainsi, des expériences de co-immunoprécipitation ont permis d'identifier une interaction entre P2X4R et ApoE dans des macrophages dérivés de moelle osseuse (BMDM) (Figure 18A). Ces résultats ont été confirmés par marquages immunocytochimiques, montrant une co-localisation des deux protéines (Figure 18B). Une telle interaction a également été observée en système recombinant dans des cellules COS-7 transfectées avec ApoE et P2X4R-HA (Figure 18C et D), faisant de ces cellules un bon modèle pour l'étude de cette interaction. Par la suite, les conséquences fonctionnelles de cette interaction ont été étudiées et des quantifications par Western Blot (WB) ont révélé un niveau protéique d'ApoE plus élevé dans des BMDM provenant de souris P2X4R-KO (simplement appelé KO) comparativement à des BMDM de souris WT (Figure 19A et B). La quantification d'ApoE dans des cultures primaires de microglies conduit à des résultats similaires, le niveau d'ApoE étant plus élevé dans le surnageant et le lysat cellulaire des microglies provenant de souris P2X4R-KO comparativement à celui de souris WT (Figure 19C et D).

Ainsi, il apparaît que P2X4R et ApoE interagissent et que l'absence de P2X4R dans les cellules myéloïdes en culture entraîne une augmentation d'ApoE extra- et intracellulaire. Au vu de ces résultats, il semblait donc intéressant de rechercher les mécanismes par lesquels P2X4R intervient dans l'augmentation d'ApoE.

La protéine ApoE représente un facteur de risque majeur pour le développement de la maladie d'Alzheimer, modulant la dégradation et l'agrégation du peptide A β . P2X4R étant impliqué dans divers processus pathologiques, en particulier dans l'inflammation, il était également intéressant de déterminer si P2X4R, par l'intermédiaire d'ApoE, est impliqué dans cette pathologie.

Les travaux de cette thèse visent (1) à étudier le mécanisme conduisant à l'augmentation d'ApoE dans les cellules P2X4R-KO, (2) à établir si P2X4R est impliqué dans la

RESULTATS : Contexte de l'étude

pathogénicité de la MA et (3) à mettre en relation l'augmentation d'ApoE et l'implication de P2X4R dans la MA, afin de savoir si l'augmentation d'ApoE pourrait être le mécanisme par lequel P2X4R module certaines caractéristiques de la MA.

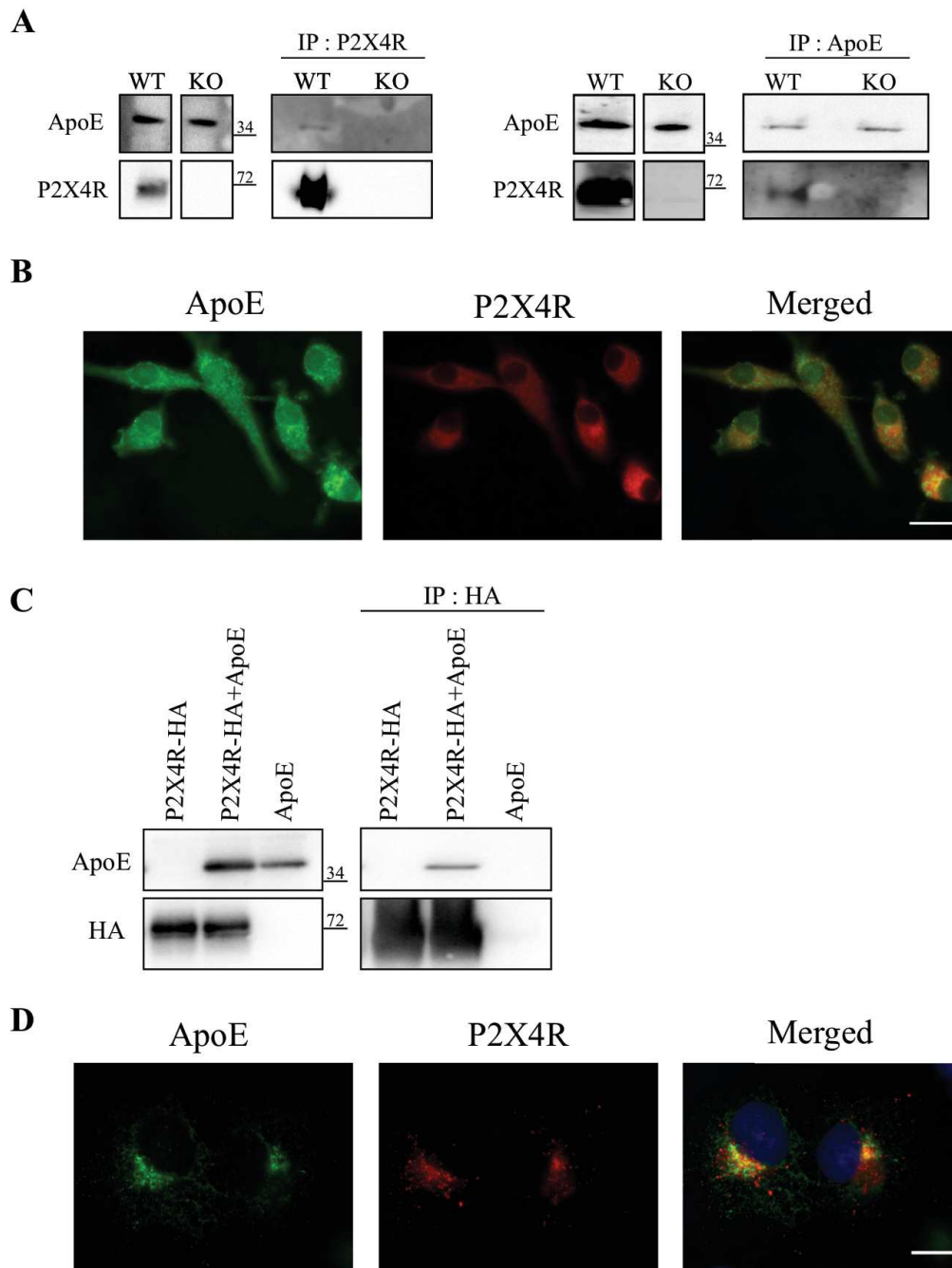


Figure 18 : Interaction entre P2X4R et ApoE

(A) WB d'ApoE et de P2X4R après immunoprécipitation de P2X4R (*gauche*) ou d'ApoE (*droite*) de BMDM en culture. (B) Immunomarquage d'ApoE (*vert*) et de P2X4R (*rouge*) dans des BMDM en cultures (barre d'échelle : 10 µm). (C) WB d'ApoE et de P2X4R-HA après immunoprécipitation de P2X4R-HA exprimés dans des cellules COS-7 transfectées avec P2X4R, ApoE ou P2X4R+ApoE. (D) Immunomarquage de P2X4R (*rouge*) et ApoE (*vert*) dans des cellules COS-7 transfectées avec ApoE et P2X4R (barre d'échelle : 5 µm).

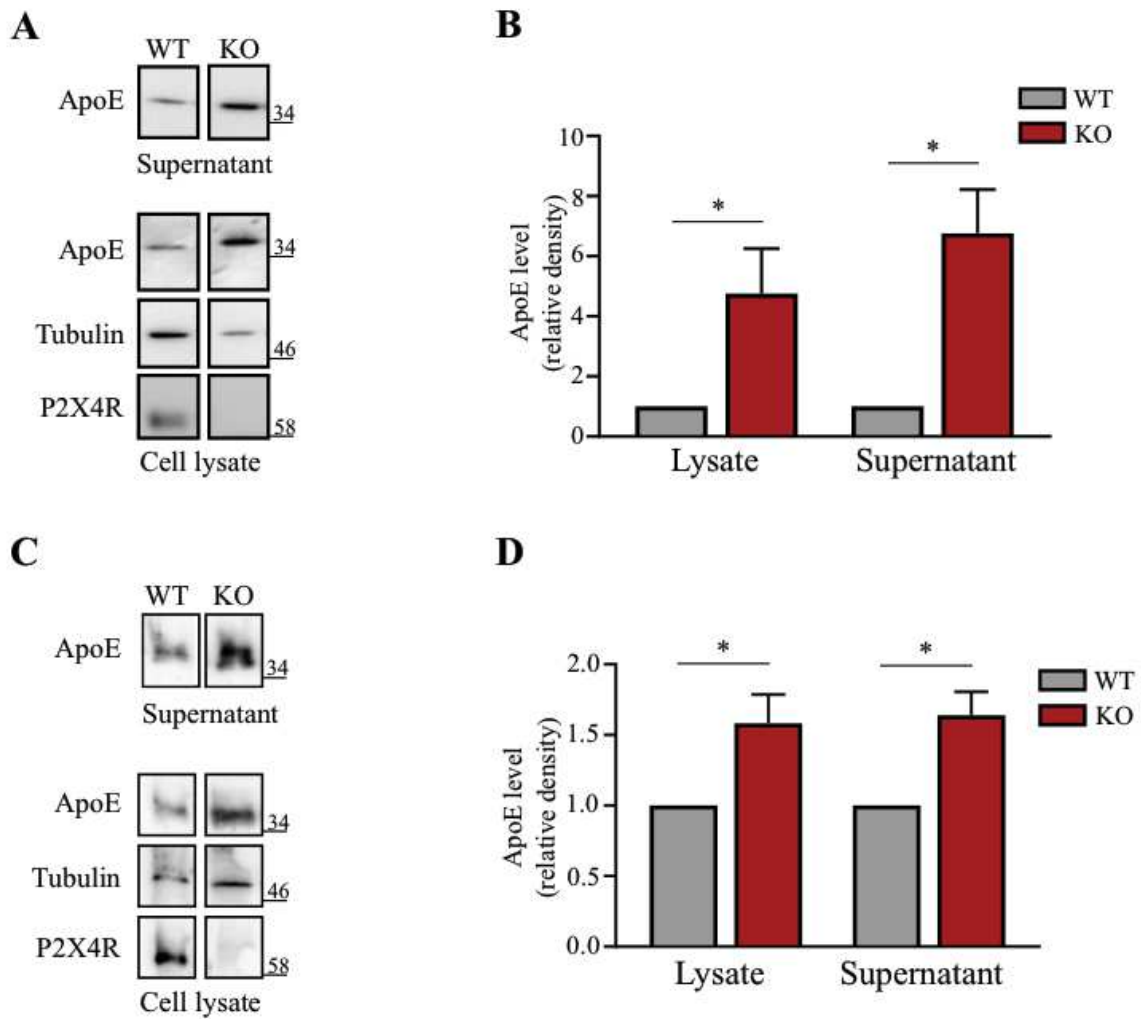


Figure 19 : Augmentation d'ApoE dans des cultures de BMDM et de microglies provenant de souris P2X4R-KO

(A) WB représentatif d'ApoE dans le surnageant et dans le lysat cellulaire de BMDM de souris WT et P2X4R-KO (KO). (B) Quantification du signal d'ApoE observé en WB dans les macrophages WT et P2X4R-KO (n=3 cultures indépendantes, moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$, one-sample t-test comparé à une valeur théorique de 1). (C) WB représentatif d'ApoE dans le surnageant et dans le lysat cellulaire de microglies en culture primaire. (D) Quantification d'ApoE observée en WB dans les microglies en culture primaire (n=3 cultures indépendantes, moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$, one sample t-test comparé à une valeur théorique de 1)

1 Caractérisation des effets de P2X4 sur ApoE in vitro

1.1 Etude de la spécificité de P2X4R

Les expériences précédemment menées au sein du laboratoire montrent une augmentation de l'expression d'ApoE dans des BMDM et des microglies en culture n'exprimant pas P2X4R. Avant d'étudier les mécanismes sous-jacents, des expériences ont été réalisées afin de vérifier que cet effet est spécifique de P2X4R. A ces fins, des cellules COS-7 ont été transfectées avec des plasmides codant pour ApoE en l'absence ou en présence de P2X4R ou de P2X2R. Après 48h, les surnageants sont prélevés et l'expression protéique d'ApoE est quantifiée par WB. Les cellules exprimant ApoE et P2X4R montrent une diminution significative de l'expression d'ApoE comparativement aux cellules exprimant seulement ApoE (ApoE + P2X4R : $0,95 \pm 0,3$ vs ApoE : $1,35 \pm 0,3$) (Figure 20), indiquant que les cellules COS-7 représentent un bon modèle pour cette étude puisque représentatif de l'effet endogène observé dans les cultures primaires. Les cellules exprimant ApoE et P2X2R montrent un niveau d'expression d'ApoE similaire aux cellules exprimant seulement ApoE (ApoE + P2X4R : $1,18 \pm 0,2$ vs ApoE + P2X2R : $1,35 \pm 0,3$) (Figure 20), ne mimant pas le phénotype observé avec P2X4R. Ainsi, l'effet de P2X4R sur ApoE est spécifique de cette sous-unité.

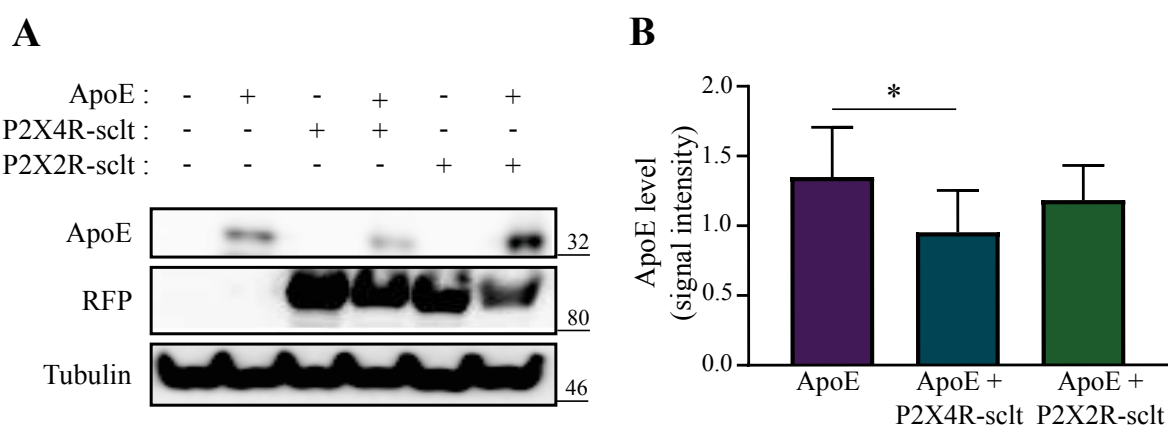


Figure 20 : Effet spécifique de P2X4R sur l'augmentation d'ApoE

(A) WB représentatif d'ApoE dans des cellules COS-7 transfectées avec ApoE seule ou avec P2X4R-Scarlet (P2X4R-sclt) ou P2X2R-Scarlet (P2X2R-sclt). (B) Quantification du signal d'ApoE observé en WB (n=6 cultures indépendantes, moyenne \pm SEM, * p<0,05, RM one-way Anova)

1.2 Etude de l'activité de P2X4R

Dans un deuxième temps, des expériences ont été conduites afin de déterminer si l'effet de P2X4R sur ApoE est dépendant de l'activité de P2X4R. En effet, certains récepteurs peuvent avoir des effets indépendants de leur activation par un ligand⁴⁴⁶. Afin d'étudier cela, un mutant d'activité de P2X4R, P2X4R-K69A, a été utilisé. La lysine en position 69 étant essentielle pour la liaison de l'ATP, ce récepteur muté est inactif. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec ApoE, ApoE et P2X4R ou ApoE et P2X4R-K69A. L'expression d'ApoE dans le surnageant est ensuite observée et quantifiée en WB. Comme observé précédemment, les cellules transfectées simultanément avec ApoE et P2X4R présentent un niveau d'expression plus faible que les cellules exprimant seulement ApoE (ApoE + P2X4R-HA : $0,44 \pm 0,1$ vs ApoE : $0,93 \pm 0,2$). Les cellules transfectées avec ApoE et P2X4R-K69A présentent une diminution significative de l'expression d'ApoE (ApoE + P2X4R-K69A-HA : $0,41 \pm 0,1$ vs ApoE : $0,93 \pm 0,2$), similairement aux cultures exprimant P2X4R et ApoE (Figure 21). Ces résultats suggèrent que l'effet de P2X4R sur ApoE est indépendant de son activité.

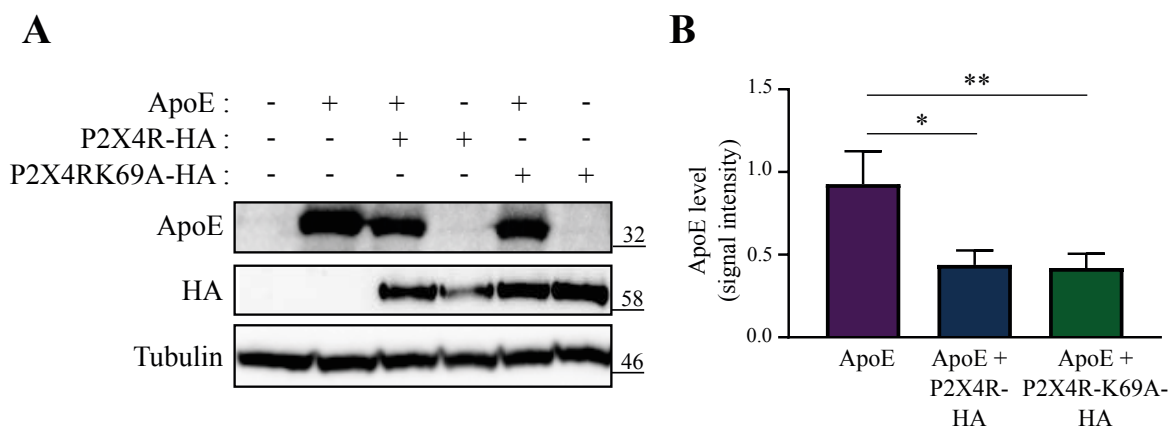


Figure 21 : Diminution d'ApoE dans les cellules transfectées avec P2X4R-K69A-HA, un mutant d'activité

(A) WB représentatif d'ApoE dans des cellules COS-7 transfectées avec ApoE, P2X4R-HA et le mutant d'activité P2X4R-K69A-HA. (B) Quantification du signal d'ApoE observé en WB (n=8 cultures indépendantes, moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Friedman test: ApoE+P2X4R vs ApoE, ApoE+P2X4RK69A vs ApoE)

1.3 Etude de la dégradation d'ApoE dans les macrophages

Les résultats précédents montrent que l'absence de P2X4R conduit à une augmentation d'ApoE dans les macrophages et les cellules COS-7. Après avoir été synthétisé, ApoE subit des modifications post-traductionnelles dans le Golgi afin d'être incorporée dans des

vésicules et d'être rapidement sécrétée⁴⁴⁷. Lorsqu'elle n'est pas sécrétée, ApoE est rapidement dégradée. Différentes voies de dégradation d'ApoE ont été identifiées et ApoE peut être dégradée par des protéases à cystéine ainsi que par des aspartic et chymotrypsin-like serine protease⁴⁴⁸. Dans les macrophages, ApoE peut être dégradée dans le lysosome et l'utilisation d'inhibiteur de lysosomes diminue la dégradation d'ApoE d'environ 60%⁴⁴⁹. Dans ce contexte, il a été intéressant de se demander si l'augmentation d'ApoE dans les BMDM P2X4R-KO était due à une altération de sa dégradation. Des BMDM WT et P2X4R-KO ont donc été incubés avec un inhibiteur de protéases à cystéine lysosomales, l'E64 (10 μ M) pendant une nuit. L'expression d'ApoE dans le surnageant de ces cellules a été quantifiée. Les cellules WT traitées à l'E64 montrent une augmentation de l'expression d'ApoE (contrôle : $0,44 \pm 0,1$ vs E64 : $0,23 \pm 0,1$) (Figure 22). Ce résultat était attendu puisque l'E64 inhibe les protéases à cystéine, impliquées dans la dégradation d'ApoE. Au contraire, le traitement par l'E64 n'induit pas d'augmentation de l'expression d'ApoE dans les cellules P2X4R-KO (contrôle : $0,81 \pm 0,3$ vs E64 : $0,92 \pm 0,4$) (Figure 22). Ces données suggèrent une altération de la dégradation d'ApoE, médiée par les protéases à cystéine, en l'absence du récepteur.

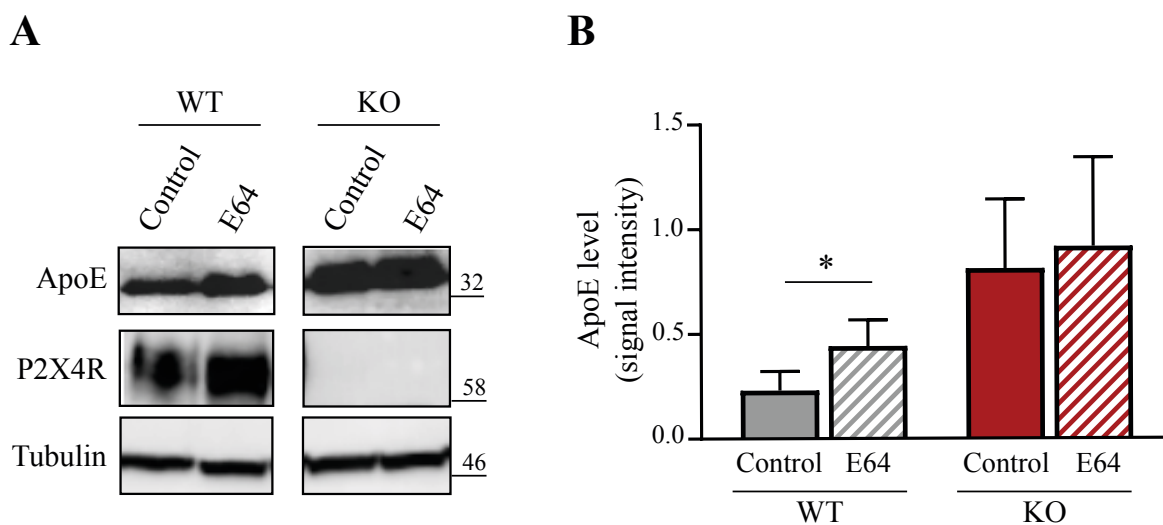


Figure 22 : Augmentation d'ApoE dans les BMDM WT traités avec un inhibiteur de protéases à cystéine

(A) WB représentatif d'ApoE dans le surnageant de BMDM WT et P2X4R-KO après traitement à l'E64 (10 μ M), un inhibiteur du protéasome. (B) Quantification du signal d'ApoE observé en WB dans des macrophages traités à l'E64. (n=5 cultures indépendantes, moyenne \pm SEM, * p<0,05 paired t-test : WT-control vs WT-E64 et KO-control vs KO-E64)

1.3.1 Les protéases à cystéine

Afin d'étudier plus en détail les enzymes impliquées dans la dégradation d'ApoE, des inhibiteurs plus spécifiques ont été utilisés. Les cellules ont été traitées avec les inhibiteurs de calpaïnes I et II. Ces drogues inhibent les calpaïnes I et II, des protéases à cystéines non lysosomale, ainsi que le cathepsine L et la cathepsine B, des protéases à cystéine lysosomales. Le traitement par l'inhibiteur de calpaïnes I (CI-I) n'induit pas de changement dans l'expression d'ApoE (contrôle : $0,37 \pm 0,1$ vs CI-I : $0,40 \pm 0,1$) tandis que le traitement par l'inhibiteur de calpaïnes II (CI-II) induit une augmentation significative (contrôle : $0,37 \pm 0,1$ vs CI-II : $0,59 \pm 0,2$) (Figure 23A et B). Bien qu'ayant des affinités proches pour les différents composés qu'elles inhibent, l'inhibiteur de calpaïnes II présente un K_i plus faible pour la calpaïne I et la cathepsine B comparativement à l'inhibiteur de calpaïnes I (cf. Tableau 7). Ces différences d'affinité pourraient expliquer les différents effets des traitements, supposant ainsi qu'ils soient dus à l'inhibition de la calpaïne I et/ou de la cathepsine B.

Inhibiteurs	Ki Calpain I	Ki Calpain II	Ki Cathepsine L	Ki Cathepsine B
Calpain inhibitor I	190nM	220nM	0.5nM	150nM
Calpain inhibitor II	120nM	230nM	0.6nM	100nM

Tableau 7 : Tableau résumant les K_i des inhibiteurs de calpaïne I et II pour différentes protéases

Bien que le traitement par CI-II induise une augmentation d'ApoE dans les BMDM WT, il n'a pas d'effet significatif dans les BMDM P2X4R-KO (contrôle : $0,76 \pm 0,2$ vs CI-II : $1,05 \pm 0,4$) (Figure 23B). La dégradation d'ApoE n'est donc pas inhibée par CI-II dans les cellules P2X4R-KO, suggérant une altération de la dégradation conduite par la calpaïne I et/ou la cathepsine B dans ces cellules.

Afin d'identifier plus précisément les protéases à cystéines impliquées, les cellules ont été traitées avec l'inhibiteur de calpaïne III (CI-III), inhibant spécifiquement les calpaïnes I et II. L'utilisation de ce dernier n'induit aucun changement dans l'expression protéique d'ApoE dans les BMDM WT (contrôle : $0,42 \pm 0,2$ vs CI-III : $0,43 \pm 0,2$) et P2X4R-KO (contrôle : $1,1 \pm 0,5$ vs CI-III : $1,57 \pm 0,7$) (Figure 23C et D), suggérant que les calpaïnes I et II ne sont pas impliquées dans la dégradation d'ApoE.

L'utilisation de CI-III permet donc d'écartier les calpaïnes I et II de notre étude et suggère l'implication des cathepsines dans l'altération de la dégradation d'ApoE.

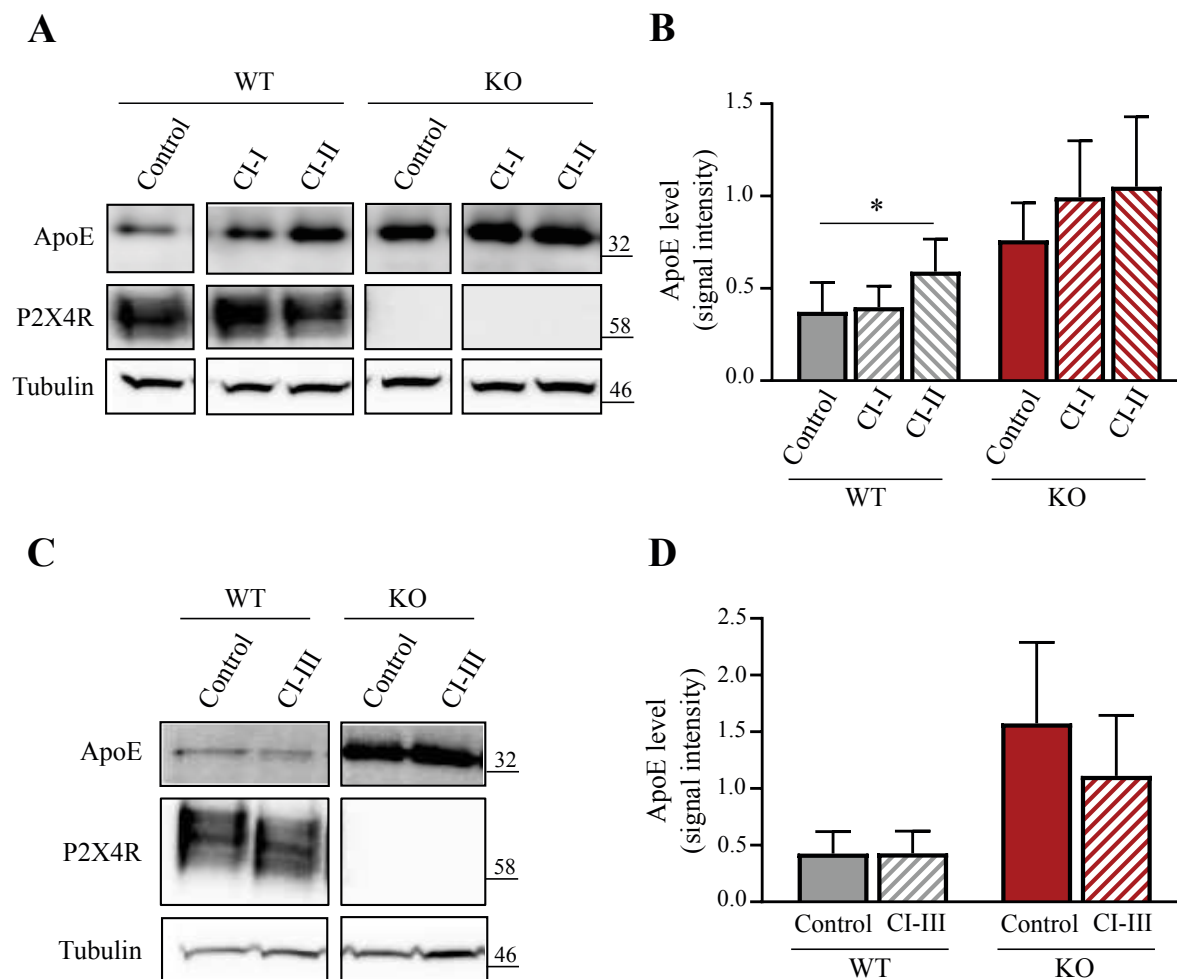


Figure 23 : Augmentation d'ApoE dans des BMDM WT traités avec des inhibiteurs de calpaïnes II

(A) WB représentatif d'ApoE dans le surnageant de BMDM WT et P2X4R-KO après traitement avec des inhibiteurs de calpaïnes I et II (10 µM). (B) Quantification du signal d'ApoE observé en WB après traitements mentionnés en A (n=5 cultures indépendantes, moyenne ± SEM, * p<0,05 paired Wilcoxon test: WT-control vs WT-CI-I, KO-control vs KO-CI-I, WT-control vs WT-CI-II, KO-control vs KO-CI-II). (C) WB représentatif d'ApoE dans le surnageant de BMDM WT et P2X4R-KO après traitement avec l'inhibiteur de calpaïnes III (CI-III) (10 µM). (D) Quantification du signal d'ApoE observé en WB après traitement avec CI-III (n=3 cultures indépendantes, moyenne ± SEM, paired Wilcoxon test : WT-control vs WT-CI-III, KO-control vs KO-CI-III)

Afin d'identifier les cathepsines impliquées dans la dégradation d'ApoE, des inhibiteurs spécifiques des cathepsines B, L et S, exprimées dans les cellules myéloïdes, ont été utilisés. La Figure 24 montre que l'incubation des BMDM avec des inhibiteurs des cathepsines L et S ne provoque pas de changement significatif dans l'expression d'ApoE chez les WT et les

RESULTATS : Caractérisation des effets de P2X4 sur ApoE in vitro

P2X4R-KO (contrôle : $0,24 \pm 0,1$; inhibiteur de cathepsine L à $10 \mu\text{M}$: $0,37 \pm 0,1$; inhibiteur de cathepsine L à $50 \mu\text{M}$: $0,33 \pm 0,15$; inhibiteur de cathepsine S à $50 \mu\text{M}$: $0,33 \pm 0,1$), suggérant que ces deux protéases ne sont pas impliquées dans la dégradation d'ApoE (Figure 24). Au contraire, le traitement des cellules WT par un inhibiteur de la cathepsine B ($20 \mu\text{M}$) induit une augmentation d'ApoE (contrôle : $0,15 \pm 0,1$ vs inhibiteur de cathepsine B : $0,40 \pm 0,2$), suggérant l'implication de la cathepsine B dans la dégradation de cette dernière (Figure 25). De manière intéressante, le traitement par l'inhibiteur de la cathepsine B n'a pas d'effet sur les BMDM P2X4R-KO (contrôle : $0,44 \pm 0,2$ vs inhibiteur de cathepsine B : $0,46 \pm 0,1$) (Figure 25), suggérant ainsi une altération de cette protéase dans les cellules P2X4R-KO.

L'ensemble de ces résultats montre que l'augmentation d'ApoE dans les BMDM P2X4R-KO est, en partie, due à une altération de sa dégradation par la cathepsine B.

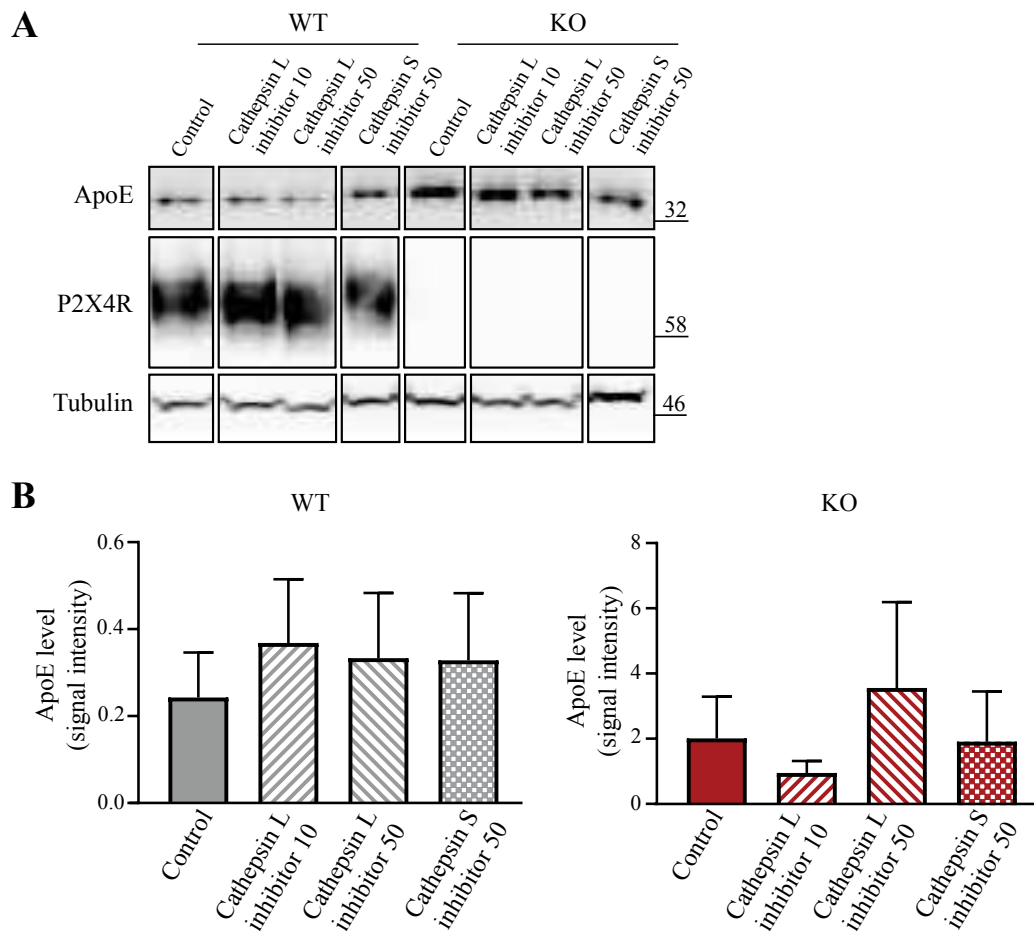


Figure 24 : Absence d'effet lors de l'inhibition des cathepsines L et S

(A) WB représentatif d'ApoE dans des BMDM WT et P2X4R-KO après traitement par un inhibiteur de cathepsine L ($10 \mu\text{M}$ ou $50 \mu\text{M}$) ou un inhibiteur de cathepsine S ($50 \mu\text{M}$). (B) Quantification du signal d'ApoE observé en WB après traitements mentionnés en A ($n=4$ cultures indépendantes, moyenne \pm SEM, paired Wilcoxon test: WT-control vs WT-Cathepsine L, WT-control vs WT-Cathepsine S, KO-control vs KO-Cathepsin L, KO-control vs KO-Cathepsin S)

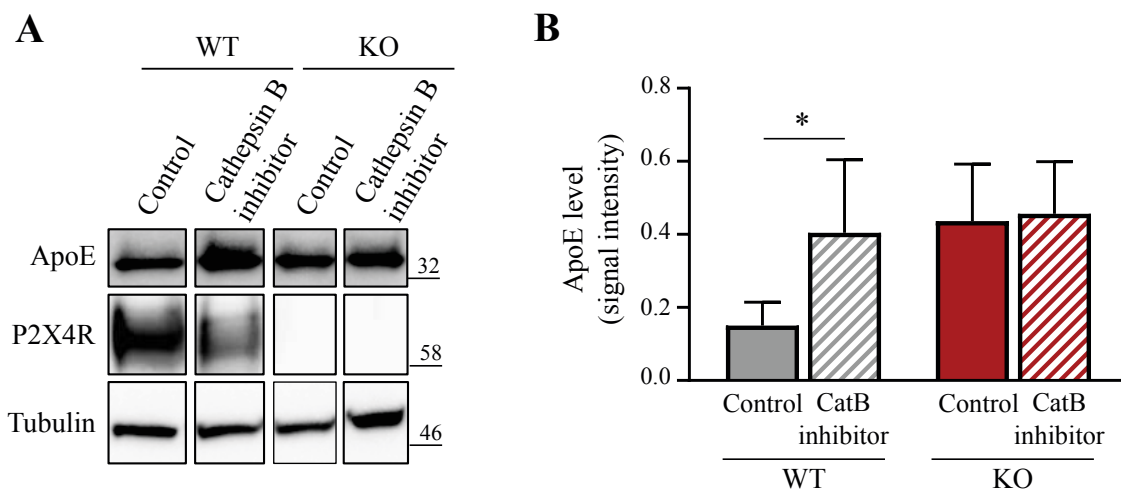


Figure 25 : Augmentation d'ApoE dans des BMDM traités avec un inhibiteur de cathepsine B

(A) WB représentatif d'ApoE dans le surnageant de BMDM WT et P2X4R-KO après traitement par un inhibiteur de la cathepsine B (catB inhibitor). (B) Quantification du signal d'ApoE par WB (n=6 cultures indépendantes, moyenne \pm SEM, * P<0,05, paired Wilcoxon test: WT-control vs WT-Cathepsine B, KO-control vs KO-Cathepsine B)

1.3.2 Etude de la cathepsine B

a) Localisation subcellulaire de la cathepsine B

Les résultats précédents identifient la cathepsine B comme responsable de la dégradation d'ApoE dans les BMDM WT. De ce fait, des marquages immunocytochimiques ont été effectués afin de confirmer sa localisation lysosomale. La Figure 26 montre la co-localisation de la cathepsine B avec CD68, un marqueur spécifique des lysosomes (Figure 26A). La cathepsine B co-localise également avec P2X4R et ApoE (Figure 26B), et plus particulièrement la cathepsine B co-localise avec ApoE dans les lysosomes (Figure 26C). Ainsi, ces observations sont cohérentes avec une implication de la cathepsine B et de P2X4 dans la dégradation lysosomale d'ApoE.

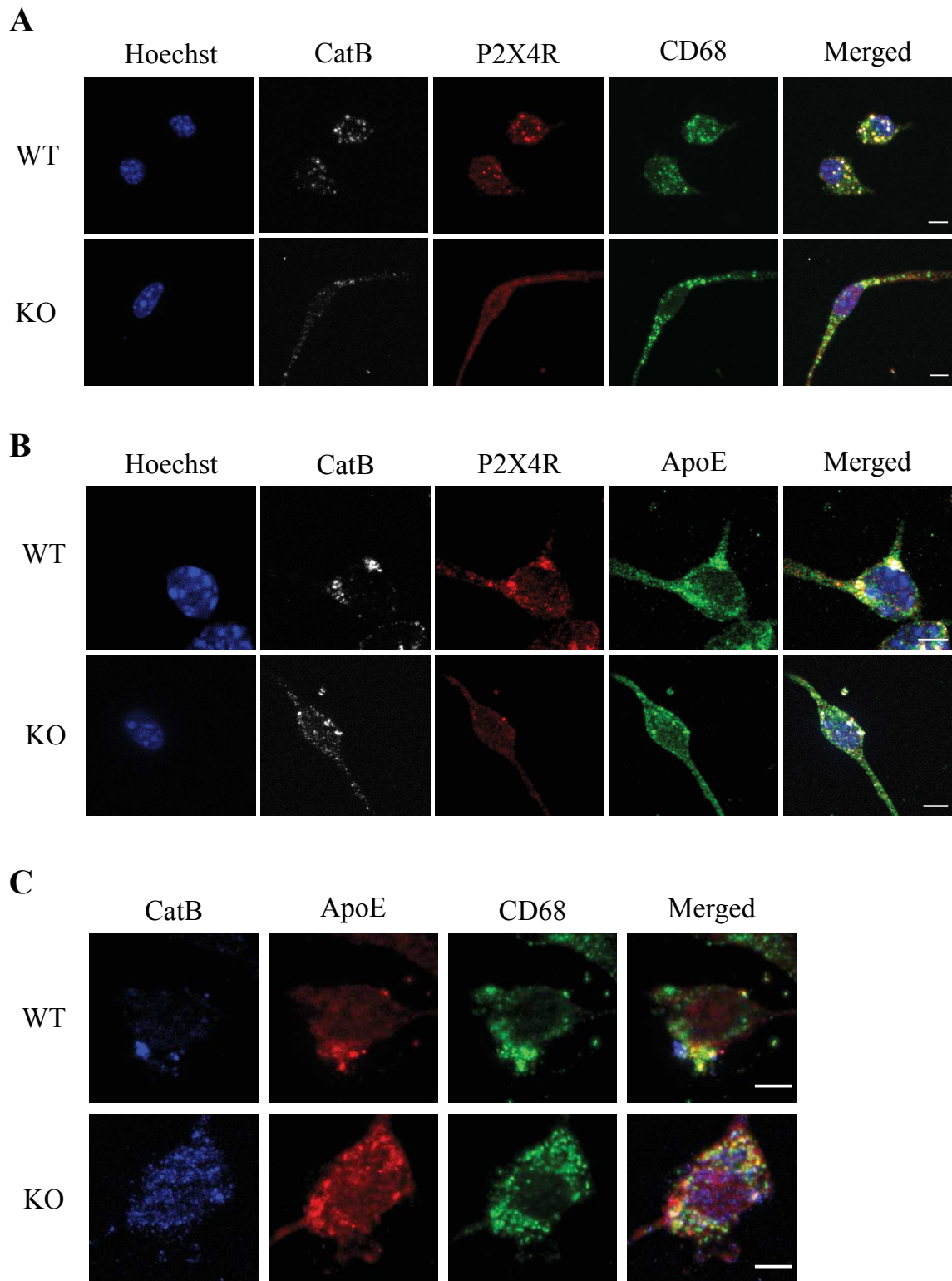


Figure 26 : Expression d'ApoE, de la cathepsine B et de P2X4R dans les lysosomes des BMDM

(A) Immunofluorescence montrant la localisation de la cathepsine B (*gris*) et de P2X4R (*rouge*) dans les lysosomes (CD68, *vert*). (B) Immunofluorescence montrant la co-localisation de la cathepsine B (*gris*), de P2X4R (*rouge*) et d'ApoE (*vert*), dans les BMDM. (C) Immunofluorescence montrant la co-localisation de la cathepsine B (*bleu*), d'ApoE (*rouge*) dans les lysosomes (CD68, *vert*) dans les BMDM WT et P2X4R-KO (barre d'échelle : 5 μ m).

b) Analyse de l'activité enzymatique de la cathepsine B

Les résultats précédents suggèrent une altération de la cathepsine B dans les cellules P2X4R-KO, induisant une diminution de la dégradation d'ApoE et par conséquent une augmentation de sa concentration. Afin de confirmer cette altération, différents substrats fluorescents de la cathepsine B ont été utilisés. Ces substrats deviennent fluorescents suite à leur clivage par la cathepsine B, permettant ainsi de mesurer l'activité de la protéase. Dans une première série d'expériences, les cellules ont été incubées avec le substrat Z-RR-AMC. Après une heure d'incubation, les BMDM P2X4R-KO émettent une fluorescence significativement inférieure aux BMDM WT, indiquant une altération de l'activité de la cathepsine B dans les cellules KO (KO : $0,76 \pm 0,09$ vs WT : 1) (Figure 27A). Cette fluorescence est spécifique de l'activité de la cathepsine B puisque l'application de son inhibiteur entraîne une forte diminution du signal (WT + inhibiteur : $0,47 \pm 0,06$; KO : $0,76 \pm 0,09$; KO + inhibiteur : $0,44 \pm 0,09$ normalisé au WT). Ces résultats ont été confirmés avec un deuxième substrat de la cathepsine B, pouvant être quantifié en microscopie à fluorescence, la cathepsine B-Magic Red. Comme observé dans la Figure 27B, les cellules P2X4R-KO émettent une fluorescence significativement plus faible comparativement aux BMDM WT (WT : 47301 ± 9238 vs KO : 19969 ± 2357).

Ces résultats indiquent donc que l'activité de la cathepsine B est altérée dans les BMDM P2X4R-KO, suggérant ainsi qu'elle est dépendante de P2X4R. De manière intéressante, bien que la fluorescence des cellules P2X4R-KO soit plus faible que celle des WT, elle reste plus élevée que celle des cellules traitées avec l'inhibiteur de cathepsine B (Figure 27A), montrant que la cathepsine B est tout de même active dans ces cellules, bien qu'elle soit altérée.

En parallèle, l'expression protéique de la cathepsine B a été étudiée afin de déterminer si la diminution de l'activité de la cathepsine B dans les BMDM P2X4R-KO pouvait être simplement due à une expression protéique plus faible. L'expression de la protéase, observée en WB dans des lysats cellulaires (Figure 28A) ainsi qu'en immunocytochimie (Figure 28B), est similaire entre les cellules WT et P2X4R-KO. L'expression de la cathepsine B étant similaire entre les WT et les P2X4R-KO, il apparaît donc que l'altération de la cathepsine B ne soit pas due à une diminution de son expression mais qu'elle soit causée par un défaut de son activité.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que P2X4R joue un rôle dans l'activité de la cathepsine B. L'invalidation du récepteur entraîne une diminution de son activité enzymatique et par conséquent, une augmentation d'ApoE.

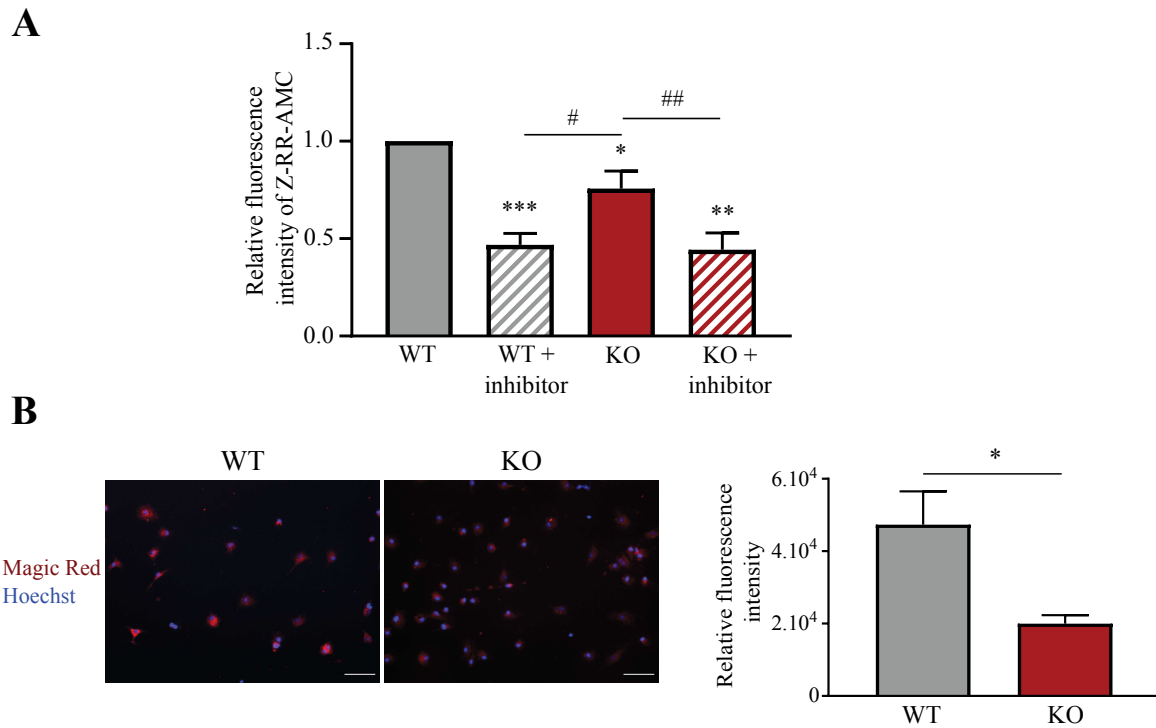


Figure 27 : Diminution de l'activité de la cathepsine B dans les BMDM P2X4R-KO

(A) Mesure de l'activité de cathepsine B dans des BMDM incubés avec un substrat fluorescent Z-RR-AMC (100 μ M) pendant une heure (n=6 cultures indépendantes, moyenne \pm SEM, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, one sample t-test comparé à la valeur théorique de 1, correspondant à une normalisation par rapport au WT; # p<0,05, ## p<0,01, one way ANOVA) (B) *Gauche*, Images représentatives de BMDM en présence de substrat Magic Red (*rouge*) (Barre d'échelle : 50 μ m). *Droite*, Mesure de l'activité de la cathepsine B en microcopie à l'aide du substrat fluorescent cathepsine B Magic Red (n=3 cultures indépendantes, moyenne \pm SEM, * p<0,05, unpaired t-test).

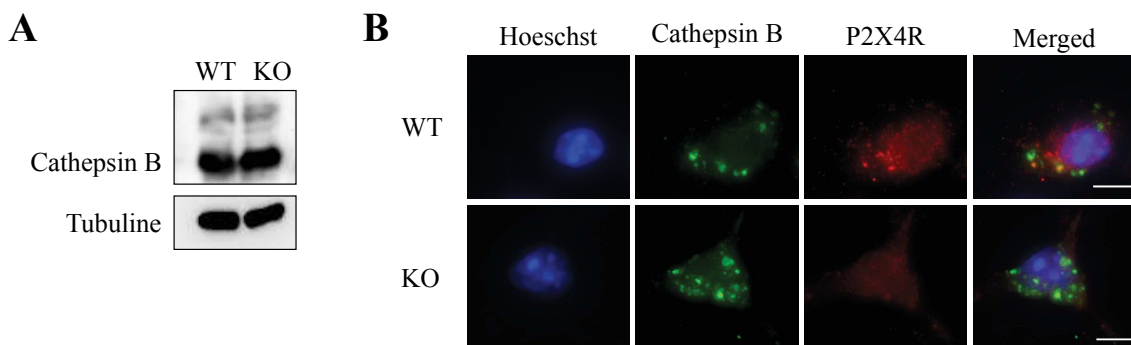


Figure 28 : Expression identique de la cathepsine B dans les BMDM WT et P2X4R-KO

(A) WB représentatif de la cathepsine B dans des lysats de BMDM WT et P2X4R-KO. (B) Immunofluorescence de la cathepsine B (*vert*) et de P2X4R (*rouge*) dans des BMDM WT et P2X4R-KO. (Barre d'échelle : 5 μ m)

1.3.3 Etude de l'expression d'ApoE dans les cellules Cathepsine B-KO

Les résultats précédents identifient donc la cathepsine B comme protéase responsable de la dégradation d'ApoE, modulée par P2X4R. Afin d'appuyer ces résultats, l'expression d'ApoE a été étudiée dans des BMDM provenant de souris Cathepsine B-KO (CatB-KO). Après s'être assurés, par immunocytochimie et par WB, de l'absence de la cathepsine B dans les cellules CatB-KO (Figure 29A et B), la quantification d'ApoE a été effectuée par WB et montre une augmentation de l'expression d'ApoE dans ces cellules. Il est cependant à noter que, par manque de souris disponibles, seules deux expériences ont été effectuées et qu'aucune analyse statistique n'est réalisable (Figure 29C et D).

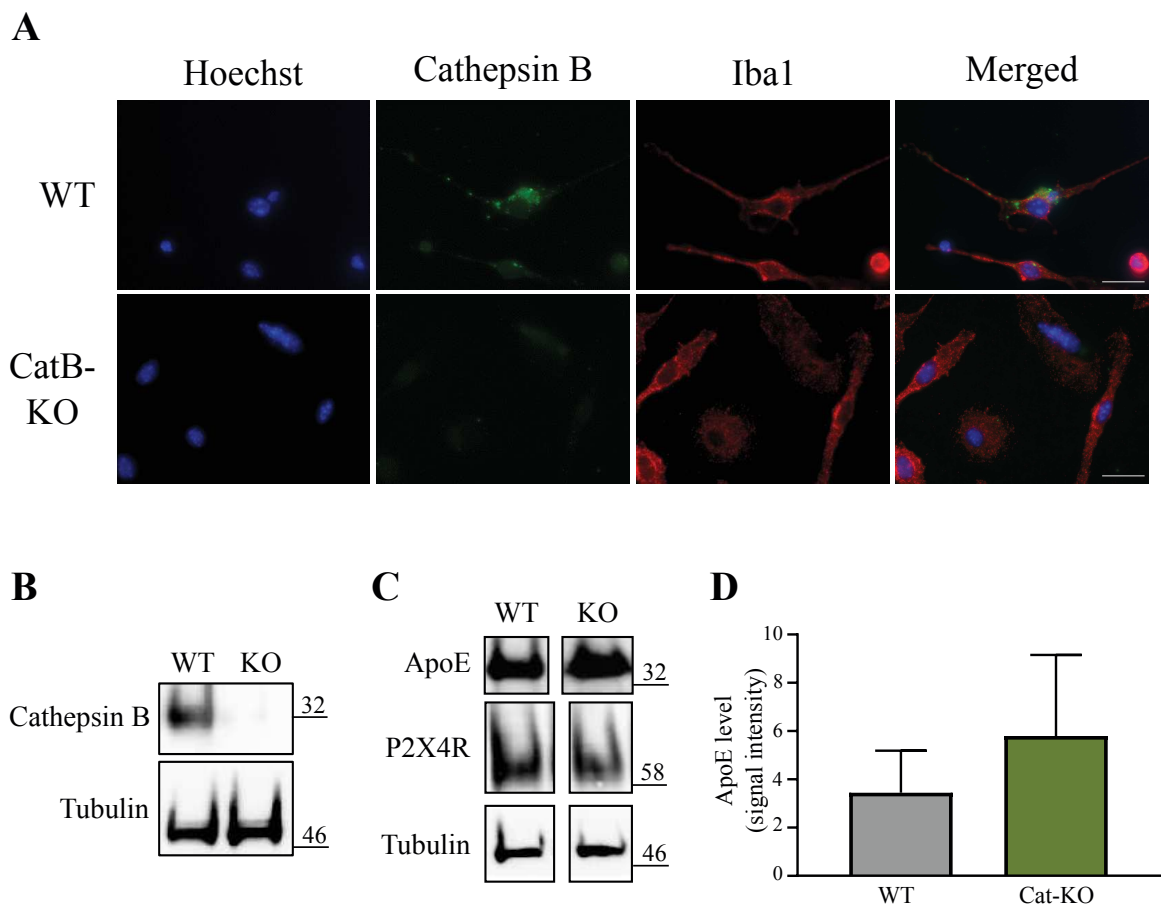


Figure 29 : Augmentation d'ApoE dans les BMDM Cathepsine B-KO

(A) Immunofluorescence de la cathepsine B (*vert*) dans les BMDM WT et CatB-KO, confirmant l'absence de cathepsine B dans les cellules CatB-KO. Barre d'échelle : 15 μ m. (B) WB confirmant l'absence d'expression de cathepsine B dans les cellules CatB-KO. (C) WB représentatif d'ApoE dans les cellules WT et CatB-KO. (D) Quantification du signal ApoE observé WB dans des cellules WTY et CatB-KO (n=2 cultures indépendantes, moyenne \pm SEM).

Dans l'ensemble, cette première partie a permis de mettre en évidence le rôle spécifique de P2X4R dans l'activation de la cathepsine B. Dans les cellules P2X4R-KO, l'activité de la cathepsine B est altérée et provoque un défaut de la dégradation d'ApoE, conduisant à l'augmentation de l'expression d'ApoE.

2 Caractérisation de la maladie d'Alzheimer dans les souris P2X4R-KO

Comme décrit précédemment, P2X4R est impliqué dans divers processus physiopathologiques. En particulier, il est impliqué dans des processus inflammatoires au cours desquels il est exprimé *de novo* dans les microglies réactives. Dans ce contexte, il était intéressant de déterminer si P2X4R pouvait être impliqué dans les procédés inflammatoires présents dans les maladies neurodégénératives. ApoE étant impliquée dans la maladie d'Alzheimer et les résultats précédents montrant une implication de P2X4R dans la dégradation d'ApoE, déterminer si P2X4R est impliqué dans la MA a été l'objet d'étude de la seconde partie de cette thèse. Des souris APP/PS1, modèle murin de la pathologie, invalidées (APP/PS1xKO) ou non (APP/PS1) pour P2X4R, ont été utilisées afin d'étudier le rôle de ce récepteur dans la pathologie.

2.1 Etude des performances mnésiques

Afin de déterminer si P2X4R joue un rôle dans la MA, les performances mnésiques des souris APP/PS1 et APP/PS1xKO ont été évaluées grâce à deux tests comportementaux, la piscine de Morris et le test du Hamlet.

2.1.1 La piscine de Morris

La piscine de Morris est un test de performance mnésique, couramment utilisé pour étudier les souris modèles de la MA. Cette expérience est composée d'une période d'apprentissage et d'un test de rétention. La période d'apprentissage, de 6 jours, permet aux souris d'apprendre la localisation d'une plateforme immergée, placée à un endroit fixe dans la piscine. L'eau étant aversive pour les souris, celles-ci chercheront à rejoindre rapidement la plateforme. Le temps nécessaire pour atteindre cette dernière diminue au cours des jours d'apprentissage et les souris mettent significativement moins de temps au sixième jour comparativement au premier jour (Figure 30A), montrant ainsi que toutes les souris ont appris à localiser la plateforme au cours de la période d'apprentissage.

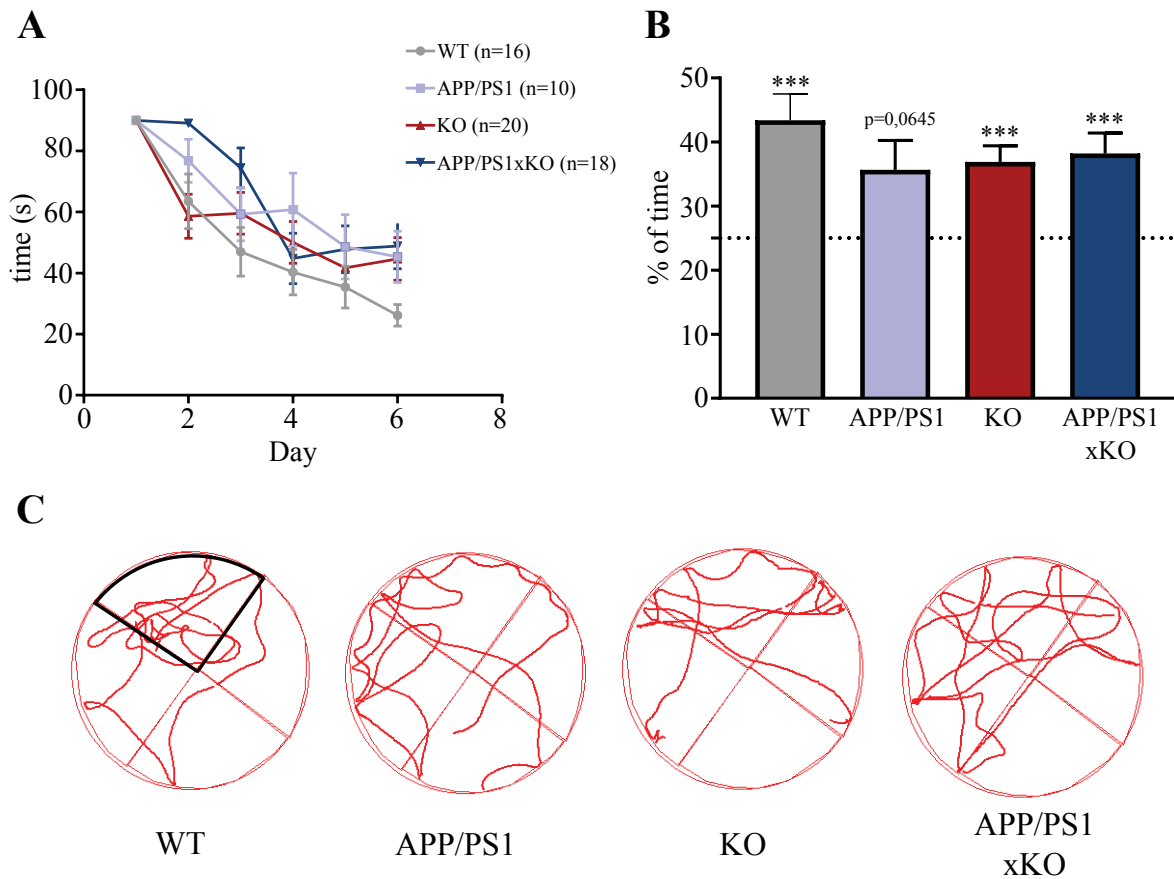


Figure 30 : Amélioration des performances mnésiques chez les souris APP/PS1xKO dans le test de la piscine de Morris

(A) Courbes représentant le temps mis par les souris pour atteindre la plateforme au fil des jours (Moyenne \pm SEM, Two-way ANOVA). (B) Pourcentage de temps passé dans le cadran cible durant le test de rétention comparativement à la valeur théorique de 25% (moyenne \pm SEM, *** $p < 0.001$, one sample Wilcoxon test). (C) Tracés représentatifs du parcours d'une souris de chaque génotype lors du test de rétention. Le quadrant cible est entouré en noir et reste à la même position lors de toutes les expériences.

Le temps nécessaire au sixième jour est plus faible chez les WT que chez les KO, APP/PS1 et APP/PS1xKO (WT : $26 \pm 3,5$ secondes vs KO : $44,6 \pm 7$ secondes ; APP/PS1 : $44,3 \pm 8,4$ secondes ; APP/PS1xKO : $48,1 \pm 7,4$ secondes) bien qu'il ne soit pas statistiquement significatif. 48 heures après le dernier jour d'apprentissage, les souris sont à nouveau placées dans la piscine dans laquelle la plateforme a été retirée. Le temps passé dans le cadran cible, dans lequel était précédemment placée la plateforme, est mesuré. Le temps passé dans ce cadran est exprimé en % par rapport au temps total du test (60 secondes) et comparé à 25%, valeur théorique représentant le temps qu'une souris aurait passé dans le cadran si elle se déplaçait aléatoirement, sans connaissance de la localisation de la plateforme. Les souris WT et KO passent plus de 25% du temps dans le cadran cible (WT : $43,4 \pm 4,1\%$ et KO : $36,9 \pm 2,5\%$), elles ont donc mémorisé la localisation de la plateforme. Les souris APP/PS1 passent

35,7 ± 4,6% de leur temps dans ce cadran cible ; cette valeur n'est cependant pas significativement différente de la valeur théorique, dû à une grande variabilité des performances au sein de ce groupe. Enfin, les souris APP/PS1xKO passent significativement plus de temps dans le cadran cible (38,2% ± 3,2). Il semble donc qu'elles aient retenu la localisation de la plateforme et par conséquent présentent de meilleures performances mnésiques comparativement aux souris APP/PS1 (Figure 30). Cependant, l'hétérogénéité des performances étant élevée et le nombre d'animaux dans le groupe des APP/PS1 étant plus faible que dans les autres groupes, ces résultats sont à interpréter avec précaution.

2.1.2 Le test du Hamlet

Afin de vérifier les résultats obtenus dans le test de la piscine de Morris, un second test, le test du Hamlet, a été effectué. Celui-ci est plus complexe, mêlant capacités cognitives et interactions sociales⁴⁴⁵. Il se compose d'une phase d'habituation suivie d'un test de rétention et se déroule dans un dispositif composé d'une arène et de cinq compartiments, chacun ayant un intérêt différent : boire, manger, se cacher, courir ou interagir avec une autre souris (Figure 16). Durant la phase d'habituation, plusieurs souris sont placées simultanément dans l'arène et sont libres de se déplacer pendant 4 heures. Cette phase, durant 12 jours, leur permet de s'habituer au dispositif et d'apprendre la localisation de chaque compartiment. 15 heures avant le test de rétention, les souris sont privées d'eau (water-deprived). Le temps mis pour atteindre le compartiment contenant l'eau (drink house) est quantifié. Les souris étant été privées d'eau, elles chercheront à aller rapidement au compartiment « boire ». Si elles sont capables de se souvenir de la localisation de celle-ci, le temps de latence pour y accéder sera faible. Au contraire, si elles ne se souviennent pas de sa localisation, le temps pour l'atteindre sera élevé. A la fin du test, les souris sont replacées dans leur cage et l'eau leur est restituée. 24 heures après, les souris sont replacées dans le dispositif afin de passer une seconde fois le test de rétention dans des conditions non assoiffées (non water-deprived). Dans ces conditions, les souris n'ont pas de préférences à aller rapidement au compartiment contenant de l'eau. Le temps mis pour atteindre le compartiment « boire » entre les conditions « assoiffée » et « non assoiffée » est alors comparé pour chaque génotype.

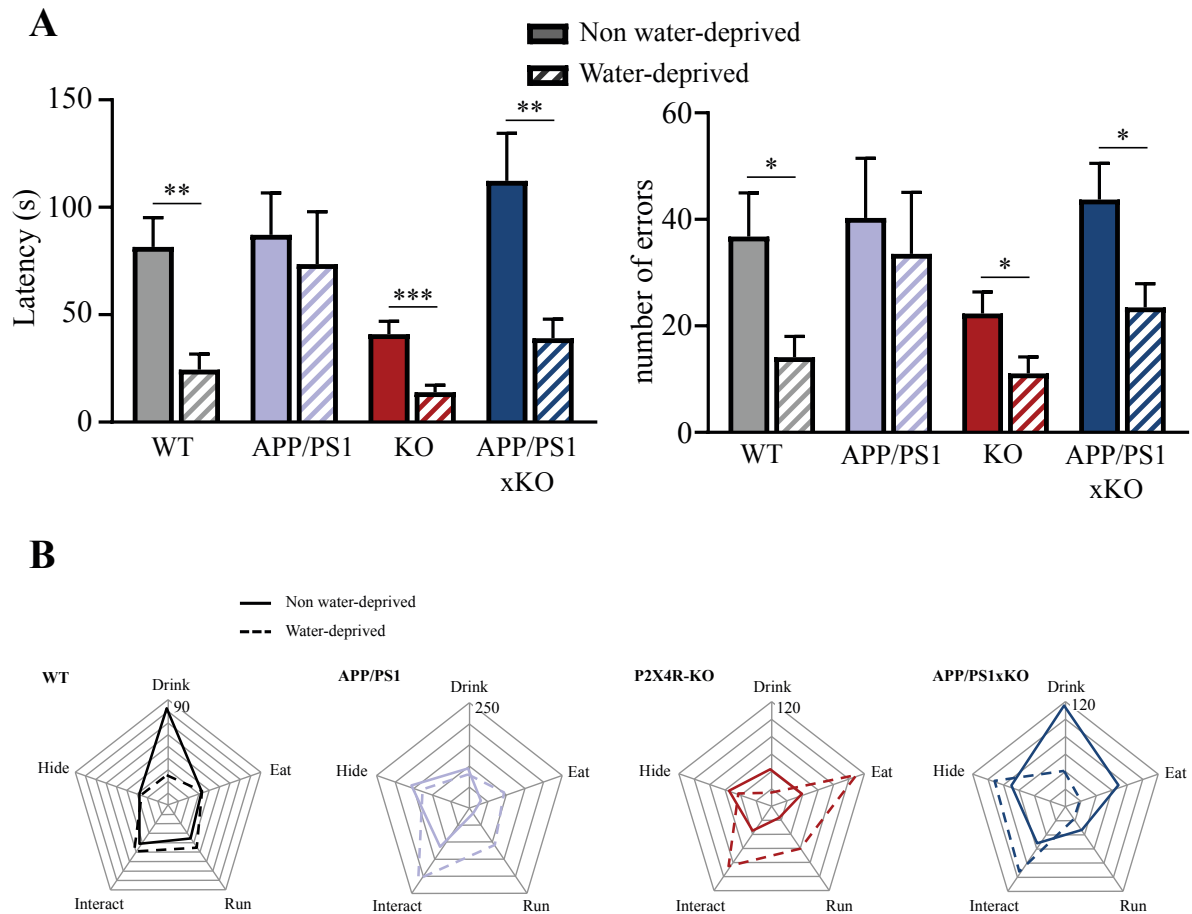


Figure 31 : Amélioration des performances mnésiques chez les souris APP/PS1xKO dans le test du Hamlet

(A) *Gauche*, graphique représentant le temps de latence pour atteindre le compartiment « boire » dans des conditions assoiffée (water-deprived) et non assoiffée (non water-deprived) (n= 8, 8, 10 et 11 souris pour WT, APP/PS1, KO et APP/PS1xKO respectivement. Moyenne \pm SEM, ** p<0,01; *** p<0,001, t-test Water-deprived vs non water-deprived pour chaque génotype). *Droite*, Nombre d'erreurs avant d'entrer dans le compartiment « boire » dans des conditions assoiffée et non assoiffée (Moyenne \pm SEM, * p<0.05, t-test Water-deprived vs non water-deprived pour chaque génotype). (B) Diagramme représentatif du temps de latence pour atteindre chaque compartiment.

Les souris WT et KO présentent un temps de latence significativement plus faible en condition assoiffée comparativement à la condition non assoiffée (WT water-deprived : $24,4 \pm 7,3$ secondes vs WT non water-deprived : $81,5 \pm 13,7$ secondes et KO water-deprived : $13,9 \pm 3,2$ secondes vs KO non water-deprived : $40,9 \pm 6,0$ secondes), montrant ainsi qu'elles ont été capables de mémoriser la localisation du compartiment d'intérêt (Figure 31A). En revanche, les souris APP/PS1 présentent un temps de latence similaire dans les deux conditions (APP/PS1 water-deprived : $73,5 \pm 24,5$ secondes vs APP/PS1 non water-deprived : $87,1 \pm 19,5$ secondes), indiquant qu'elles ne sont pas capables de se souvenir de la

localisation du compartiment. De manière intéressante, les souris APP/PS1xKO présentent une réduction significative du temps de latence en condition assoiffée (APP/PS1xKO water-deprived : $39,0 \pm 9,0$ secondes vs APP/PS1xKO non water-deprived : $112,4 \pm 22,1$ secondes), suggérant que ces souris se souviennent de la localisation du compartiment (Figure 31A). Le nombre d'erreurs avant d'atteindre le compartiment a également été mesuré. Les souris WT et KO présentent un nombre d'erreurs plus faible en condition « assoiffée » (WT water-deprived : $14,1 \pm 3,9$ vs WT non water-deprived : $36,8 \pm 8,2$ et KO water-deprived : $11,1 \pm 3,1$ vs KO non water-deprived : $22,3 \pm 4,1$), contrairement aux souris APP/PS1 (APP/PS1 water-deprived : $33,5 \pm 11,6$ vs APP/PS1 non water-deprived : $40,3 \pm 11,2$). Le nombre d'erreurs est plus faible chez les souris APP/PS1xKO assoiffées comparativement aux souris non assoiffées (KO water-deprived : $23, \pm 4,5$ vs KO non water-deprived : $43,7 \pm 6,8$) (Figure 31A), soulignant ainsi leur capacité à se souvenir de la localisation du compartiment d'intérêt. La Figure 31B permet de visualiser les temps de latence pour atteindre chaque compartiment. Les souris WT, KO et APP/PS1xKO présentent un temps de latence plus faible pour le compartiment « boire » dans la condition assoiffée (Figure 31B). Ces résultats indiquent que les souris APP/PS1xKO présentent de meilleures performances mnésiques comparativement aux souris APP/PS1 dans le test du Hamlet.

2.1.3 Performances locomotrices

Afin de s'assurer que la diminution des temps de latence ne soit pas due à une activité locomotrice plus élevée chez les souris APP/PS1xKO, un test de locomotion en champ ouvert a été réalisé et la distance parcourue pendant 10 minutes a été mesurée. Les souris APP/PS1 et APP/PS1xKO parcourent une plus grande distance comparativement aux souris WT et KO (APP/PS1 : $49,24 \pm 15,74$ mètres ; APP/PS1xKO : $49,18 \pm 11,74$ mètres ; WT : $41,26 \pm 11,07$ mètres et KO : $36,91 \pm 9,20$ mètres) (Figure 32). Par ailleurs, aucune différence n'est observée dans l'activité locomotrice des souris APP/PS1 et APP/PS1xKO (Figure 32).

Dans l'ensemble, ces tests comportementaux mettent en avant de meilleures performances mnésiques chez les souris APP/PS1xKO comparativement aux souris APP/PS1.

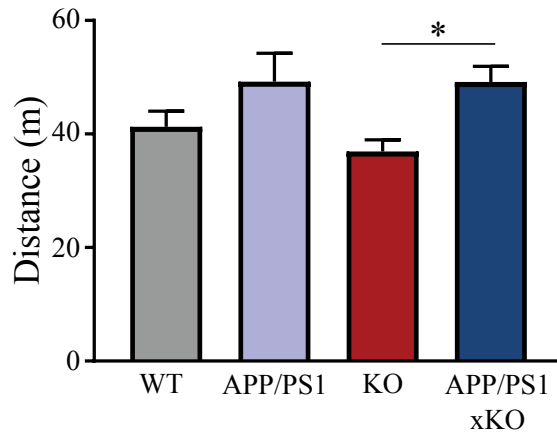


Figure 32 : Performances locomotrices en champs ouvert

Distance parcourue durant 10 min en champ ouvert (n=16, 10, 20 et 18 souris pour WT, APP/PS1, KO et APP/PS1xKO respectivement. Moyenne \pm SEM, one-way ANOVA)

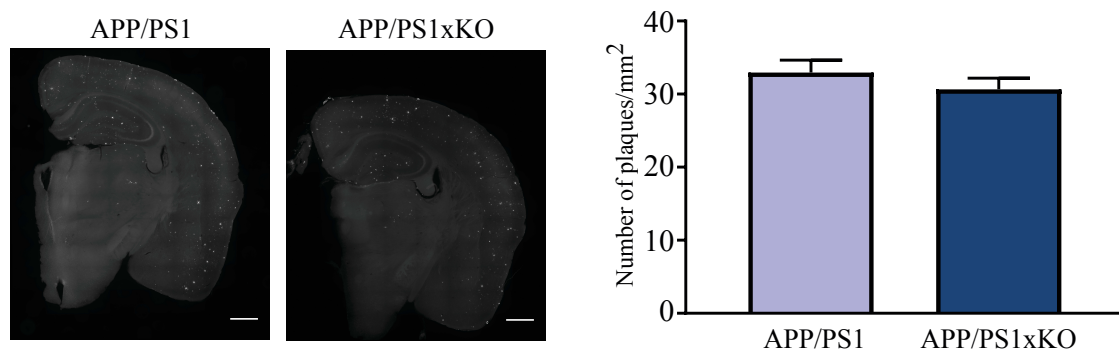
2.2 Etude de la charge amyloïde

Les souris APP/PS1xKO présentant de meilleures performances cognitives, les dépôts amyloïdes, une caractéristique majeure de la MA, ont été étudiés afin de déterminer si ces souris présentaient également une diminution des altérations histologiques.

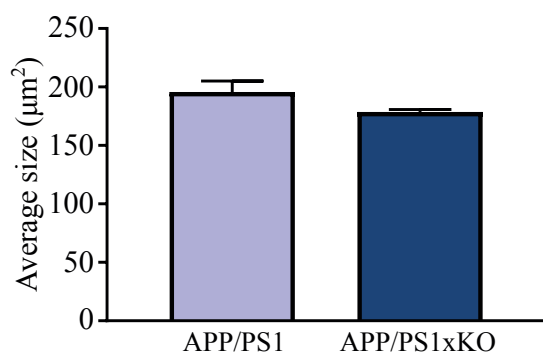
2.2.1 Quantification des plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes, agrégats de peptides A β s'accumulant dans le cerveau de patients atteints de la MA, peuvent être observées à l'aide d'un marquage Thioflavine T, marquant les structures en feuillets β . A l'aide de ce marquage, les plaques du cortex sont quantifiées et leur nombre est rapporté à la taille de cette structure. La quantification des plaques ne montre pas de différence dans le nombre de plaques amyloïdes observées entre les deux génotypes (APP/PS1 : $32,9 \pm 5,6$ vs APP/PS1xKO : $30,6 \pm 5,1$) (Figure 33A). De même, l'analyse de la taille moyenne des plaques ne révèle aucune différence (APP/PS1 : $195,7 \pm 31,1$ mm² vs APP/PS1xKO : $178,7 \pm 6,7$ mm²) (Figure 33B). Enfin, les plaques ont été catégorisées selon leur taille et leur nombre pour chaque catégorie a été quantifié. La fréquence cumulée des plaques en fonction de leur taille est représentée en Figure 33 et aucune différence n'est observée entre les deux génotypes (Figure 33C). De ces analyses, il ne ressort aucune différence dans le nombre et la taille des plaques amyloïdes entre les APP/PS1 et les APP/PS1xKO. De plus, l'analyse du nombre en fonction de la taille des plaques ne relève aucune différence montrant ainsi que les plaques amyloïdes ont le même profil dans ces deux génotypes.

A



B



C

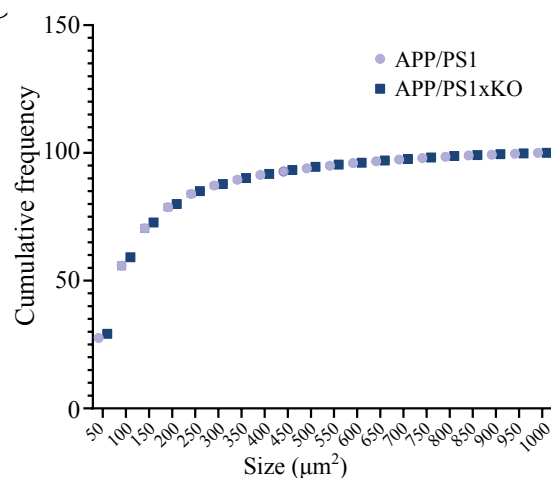


Figure 33 : Nombre et taille des plaques amyloïdes identiques entre les APP/PS1 et APP/PS1xKO

(A) *Gauche*, Images représentatives de coupes de cerveaux marquées à la Thioflavine T (barre d'échelle : 700μm). *Droite*, Quantification du nombre de plaques amyloïdes dans le cortex de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO (n=11, 5 coupes par animal, moyenne ± SEM, unpaired t-test). (B) Quantification de la taille des plaques (n=11, 5 coupes par animal, moyenne ± SEM, unpaired t-test). (C) Distribution de la taille des plaques.

2.2.2 Quantification du peptide Aβ soluble

L'analyse de plaques amyloïdes ne montrent pas de différence entre les APP/PS1 et APP/PS1xKO. Cependant, bien que les plaques soient une caractéristique majeure de la pathologie, aucune corrélation entre les plaques amyloïdes et la progression de la maladie n'a été montrée. Au contraire, des études récentes soulignent la toxicité des oligomères solubles du peptide Aβ et suggèrent que ces derniers, plutôt que les plaques, causent la mort neuronale observée dans la MA^{299,308,309}. Pour ces raisons, la quantité de peptides Aβ solubles a été mesurée dans le cortex des souris APP/PS1 et APP/PS1xKO. Des expériences de WB

montrent que les souris APP/PS1xKO présentent moins d'A β soluble comparativement aux souris APP/PS1 (APP/PS1 : $1,00 \pm 0,1$ vs APP/PS1xKO : $0,52 \pm 0,1$) (Figure 34A). De même, une analyse par ELISA montre une diminution du peptide A β soluble dans le cortex de souris APP/PS1xKO comparativement aux souris APP/PS1 (APP/PS1 : $1216 \pm 66,5$ pg/mg de protéine vs APP/PS1xKO : $937,2 \pm 83,6$ pg/mg de protéine) (Figure 34B).

Ainsi, bien qu'il n'y ait pas de différence dans le nombre de plaques amyloïdes, les souris APP/PS1xKO présentent une concentration plus faible de peptides A β solubles corticaux comparativement aux souris APP/PS1.

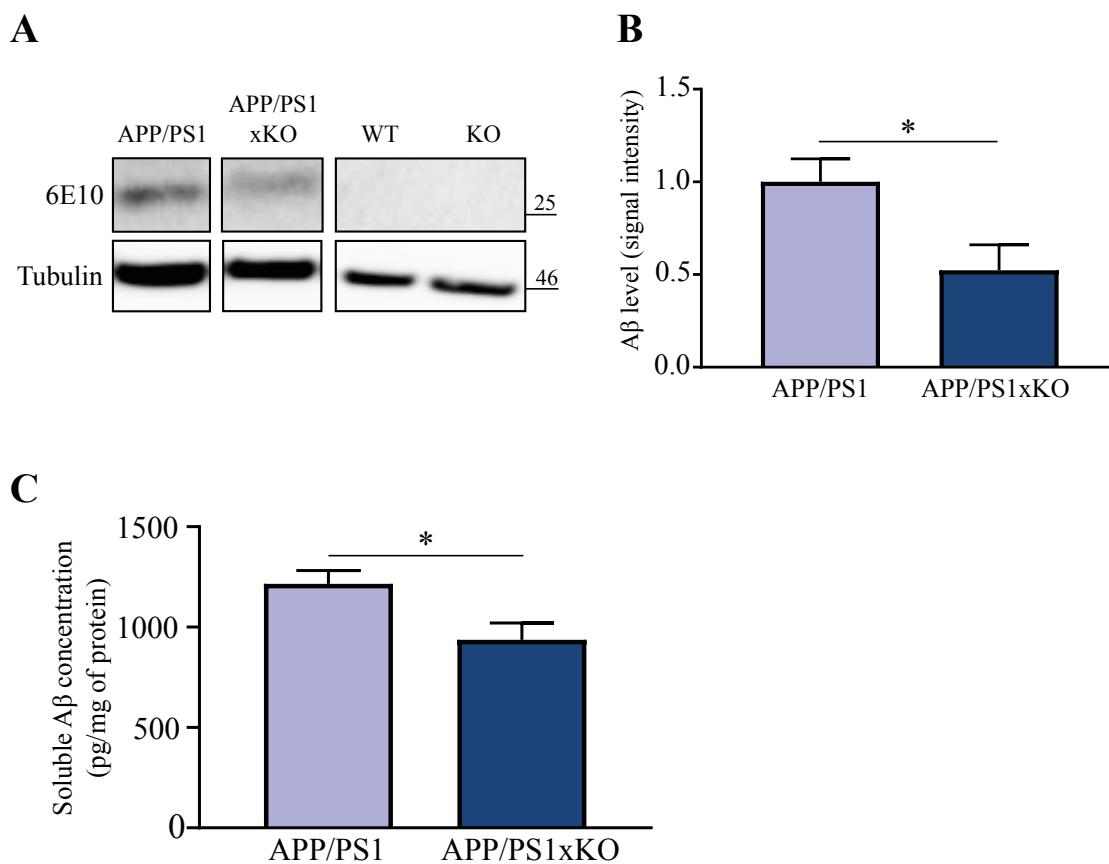


Figure 34 : Diminution du peptide A β soluble chez les APP/PS1xKO

(A) WB représentatif d'A β (6E10) dans le cortex de souris APP/PS1, APP/PS1xKO, WT et KO. (B) Quantification du signal 6E10 observé WB dans le cortex de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO (n=7 souris, moyenne \pm SEM, * p<0,05, unpaired t-test). (C) Quantification de la concentration d'A β soluble par ELISA (n=7 et 6 souris pour APP/PS1 et APP/PS1xKO respectivement, moyenne \pm SEM, * p<0,05, unpaired t-test).

2.3 Caractérisation synaptiques

Hormis les déficits cognitifs et les plaques amyloïdes, la MA est également caractérisée par une forte perte synaptique. De ce fait, elle a également été évaluée dans nos conditions.

2.3.1 Quantification des épines dendritiques par marquage Golgi

Dans un premier temps, les neurones ont été marqués à l'aide d'un marquage Golgi et les épines dendritiques des neurones corticaux ont été quantifiées. Aucune différence n'est observée dans le nombre d'épines entre les différents génotypes (WT : $14,9 \pm 2,0$; APP/PS1 : $12,3 \pm 0,8$; KO : $13,3 \pm 0,2$; APP/PS1xKO : $12,7 \pm 0,1$) (Figure 35), bien que les souris WT semblent avoir un nombre légèrement plus élevé.

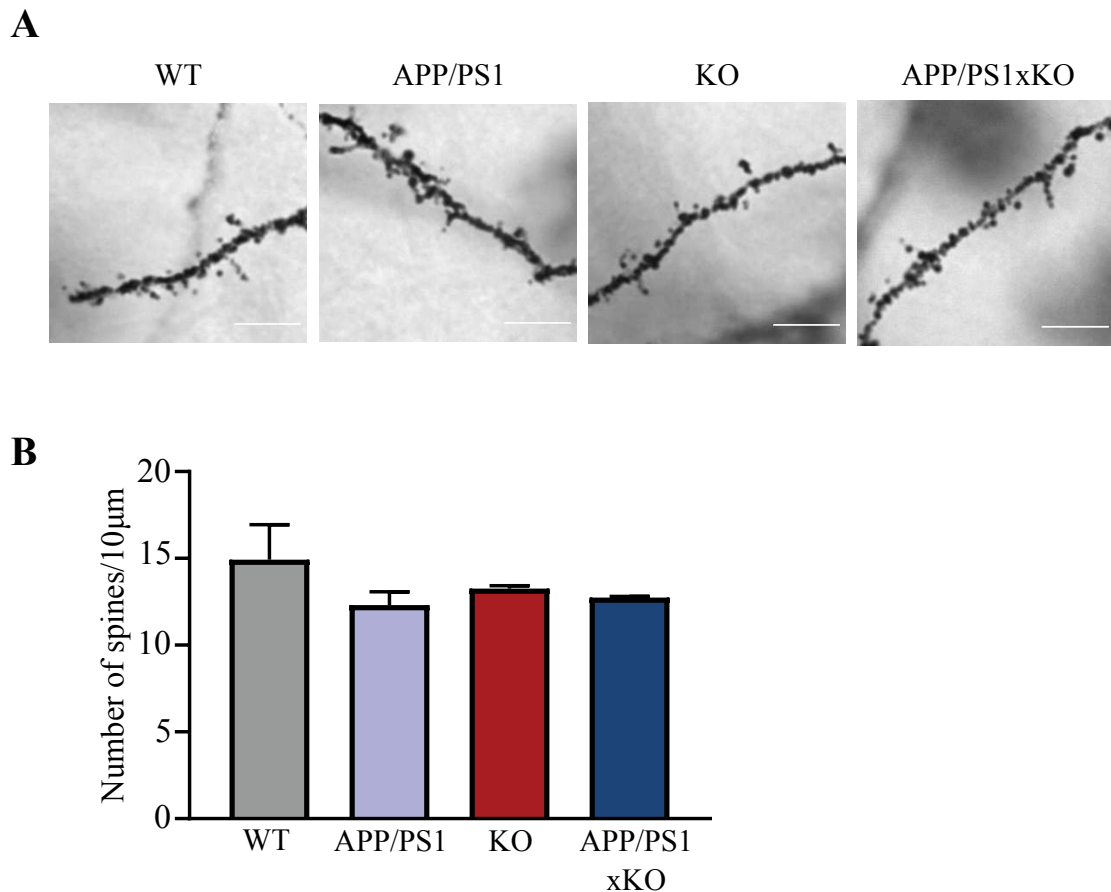


Figure 35 : Nombre d'épines dendritiques corticales identique entre les APP/PS1 et les APP/PS1xKO

(A) Images représentatives d'axones marqués au marquage Golgi de WT, APP/PS1, KO et APP/PS1xKO (barre d'échelle : 5 µm). (B) Quantification des épines dendritiques observées par marquage Golgi (n=3, 4, 4 et 4 souris pour WT, APP/PS1, KO et APP/PS1xKO respectivement, moyenne \pm SEM, Kruskal-Wallis test).

2.3.2 Etudes de marqueurs synaptiques

Dans un deuxième temps, les marqueurs synaptiques NR1A et PSD95 ont été quantifiés. Pour cela, des synaptosomes de cortex ont été préparés et l'expression de ces protéines a été analysée en WB. Les souris APP/PS1 semblent présenter une réduction de NR1A comparativement aux WT (WT : $1,1 \pm 0,9$ vs $0,57 \pm 0,07$; $p=0,0542$) bien que ceci ne soit pas significativement différent, dû à une grande variabilité interindividuelle (Figure 36). Les souris APP/PS1 présentent également une diminution de l'expression du marqueur post-synaptique PSD95 comparativement aux WT (WT : $3,5 \pm 0,4$ vs APP/PS1 : $2,0 \pm 0,4$) (Figure 36). Les APP/PS1 semblent présenter des déficits de marqueurs synaptiques, ce qui est cohérent avec les données de la littérature^{450,451}.

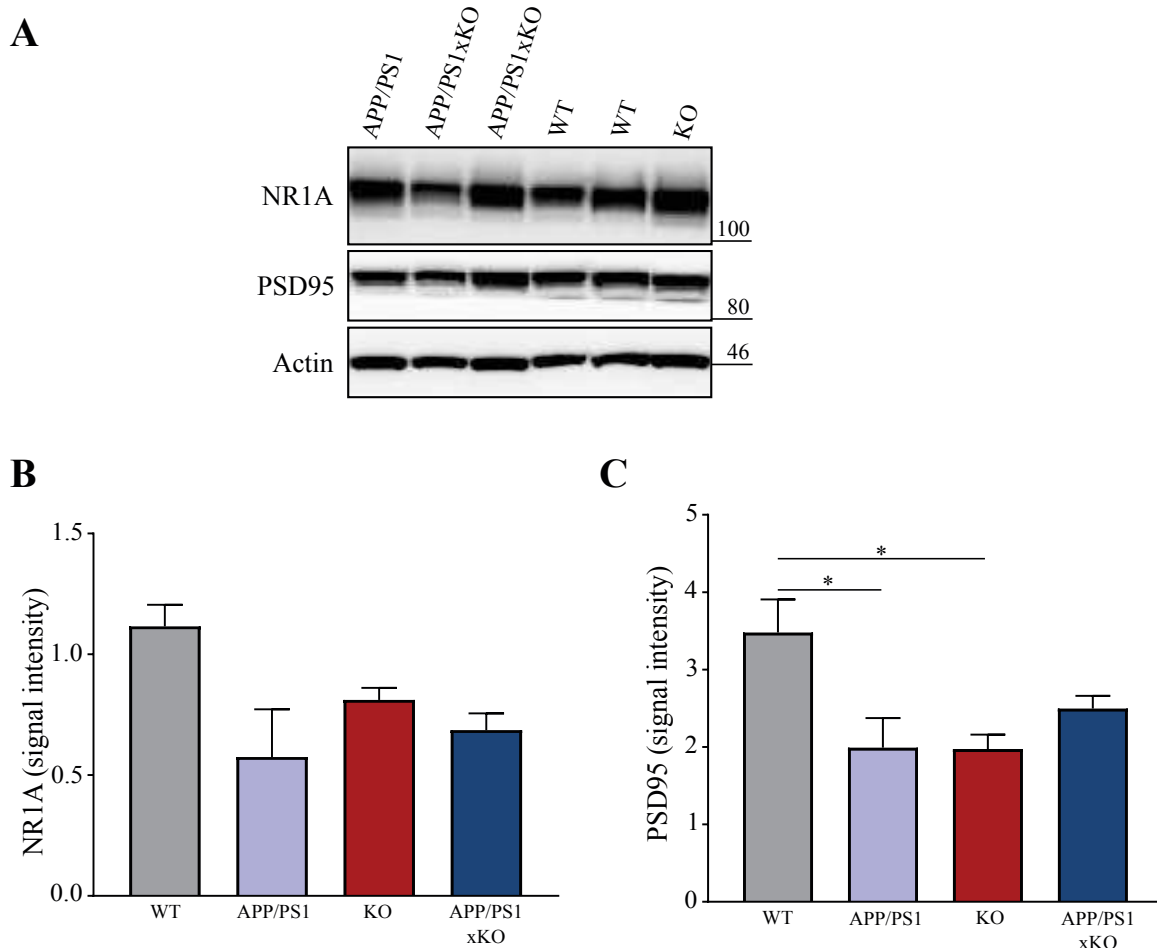


Figure 36 : Quantification des marqueurs synaptiques NR1A et PSD95

(A) WB représentatif de NR1A et de PSD95 dans les synaptosomes de cortex. (B) Quantification du signal de NR1A observé en WB. (C) Quantification du signal de PSD95 observé en WB (n=4, 5, 4 et 5 animaux pour WT, APP/PS1, KO et APP/PS1xKO respectivement, moyenne \pm SEM, * $p<0,05$ One-way ANOVA test).

RESULTATS : Caractérisation de la maladie d'Alzheimer dans les souris P2X4R-KO

Ces mêmes analyses ont été réalisées sur des synaptosomes de souris P2X4R-KO et il est intéressant de noter une légère diminution de l'expression de NR1A chez ces souris comparativement aux WT (WT : $1,1 \pm 0,1$ vs KO : $0,8 \pm 0,2$) bien que cela ne soit pas significatif. Cependant ces souris présentent une réduction significative de PSD95 (WT $3,5 \pm 0,4$ vs KO : $2,0 \pm 0,2$), suggérant ainsi que les souris n'exprimant pas P2X4R, dans un contexte hors MA, présentent des déficits synaptiques. Dans ces conditions, il est difficile d'interpréter les résultats obtenus pour les souris APP/PS1xKO. Les souris APP/PS1xKO ont tendance à présenter une diminution de NR1A comparativement aux P2X4R-KO et aux WT mais une augmentation comparativement aux APP/PS1 (APP/PS1xKO : $0,7 \pm 0,1$; P2X4R-KO : $0,8 \pm 0,04$; WT : $1,1 \pm 0,1$; APP/PS1 : $0,6 \pm 0,2$), bien que cela ne soit pas statistiquement pertinent. Quant à PSD95, les souris APP/PS1xKO présentent une augmentation de cette protéine comparativement aux souris APP/PS1 mais également comparativement aux souris P2X4R-KO (APP/PS1xKO : $2,5 \pm 0,2$; APP/PS1 : $2,0 \pm 0,4$; KO : $2,0 \pm 0,2$). Les souris P2X4R-KO présentant un niveau basal de NR1A et de PSD95 (Figure 36) plus faible que le WT, il n'est pas possible de tirer une conclusion claire de ces résultats.

L'ensemble de ces résultats permet de mettre en évidence une amélioration des capacités cognitives ainsi qu'une diminution de la quantité d'A β soluble corticale chez les souris APP/PS1xKO comparativement aux souris APP/PS1.

2.4 Etude des microglies

Les souris APP/PS1xKO présentant une amélioration de la pathologie, il a ensuite été question de comprendre comment l'absence de P2X4R conduisait à ces phénotypes.

2.4.1 Localisation de P2X4R dans le cortex

Afin d'étudier le rôle de P2X4R, la localisation du récepteur a, dans un premier temps, été étudiée par immunofluorescence. Dans le cortex de souris APP/PS1, P2X4R est fortement localisé dans les microglies réactives se situant autour des plaques. Au contraire, aucun marquage de P2X4R n'est présent dans les microglies du parenchyme, éloignées des dépôts amyloïdes. P2X4R est donc fortement exprimé dans les microglies réactives (Figure 37A). De plus, un marquage des lysosomes à l'aide d'un anticorps anti-CD68 a permis de confirmer la localisation lysosomale de P2X4R dans les microglies réactives, décrite dans la littérature (Figure 37B).

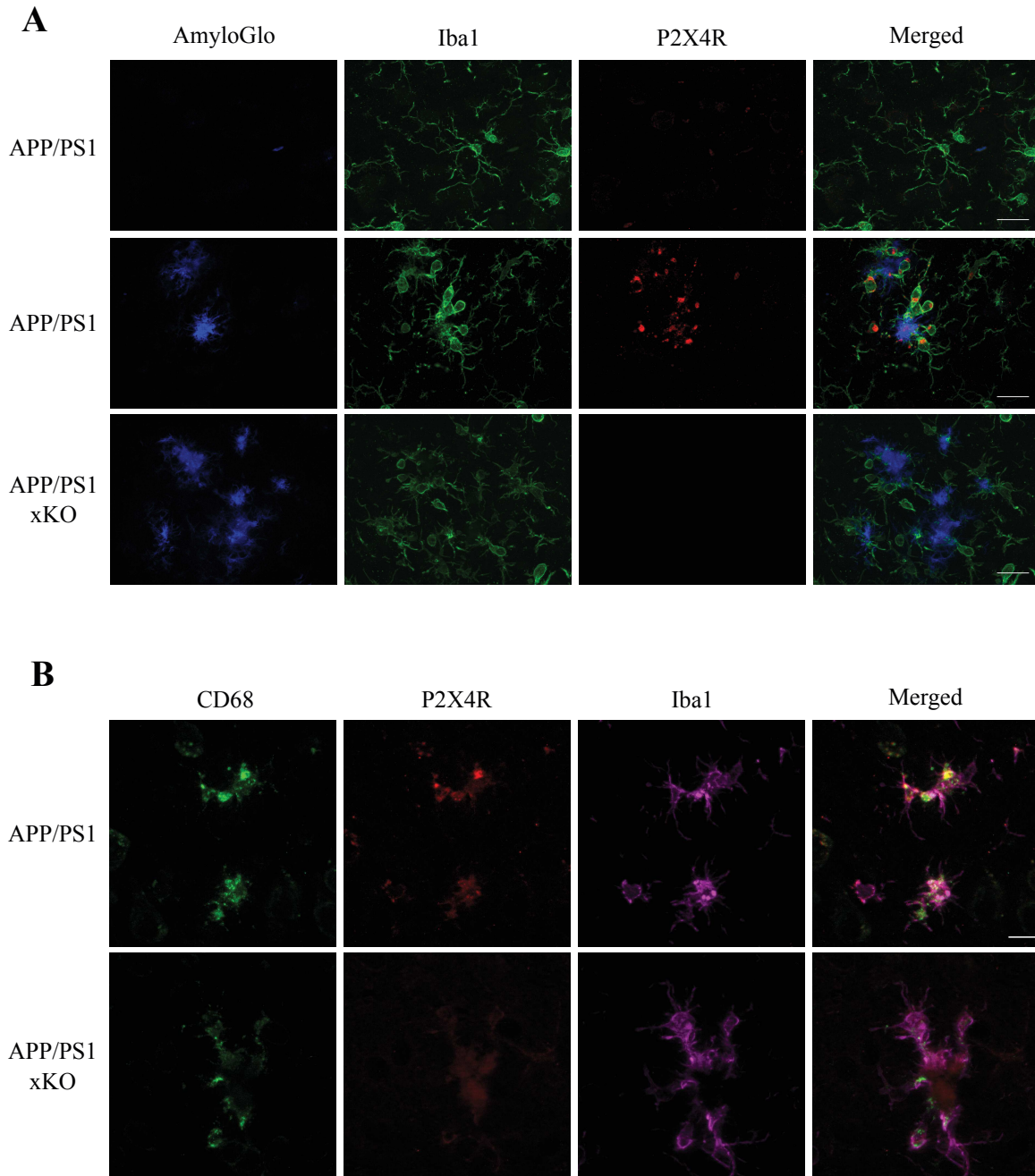


Figure 37 : Localisation de P2X4R dans les lysosomes des microglies réactives

(A) Marquage des plaques amyloïdes (AmyloGlo, *bleu*), des microglies (Iba1, *vert*) et de P2X4R (*rouge*) dans le parenchyme de souris APP/PS1 (*haut*) et autour des plaques amyloïdes dans le cortex de souris APP/PS1 (*milieu*) et APP/PS1xKO (bas) (barre d'échelle : 20 μ m). (B) Marquage des lysosomes (CD68, *vert*) et de P2X4R (*rouge*) dans les microglies (Iba1, *magenta*) (barre d'échelle : 10 μ m).

2.4.2 Caractérisation des microglies réactives

P2X4R étant surexprimé dans les microglies réactives situées près des plaques amyloïdes, il a été intéressant de se demander si l'absence de P2X4R affecte le recrutement ou le nombre de

microglies autour des plaques. Des marquages de microglies et de plaques amyloïdes ont donc été effectués sur des coupes de cerveaux de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO. Les microglies étant réactives et formant des clusters autour des plaques, il est difficile de les individualiser pour les quantifier. Afin de contourner ce problème, l'aire occupée par les microglies a été analysée, représentant ainsi la couverture microgliale autour des plaques. Les premières observations laissent supposer que l'aire occupée par les microglies est dépendante de la taille de la plaque autour de laquelle elles sont situées. En effet, plus la plaque est grande, plus le marquage Iba1 est étendu. De ce fait, il est important de définir la région d'analyse en fonction de la taille des plaques. Ainsi, la région est définie comme un cercle de rayon égal à 4 fois le rayon de la plaque (Figure 38A), permettant ainsi de prendre en compte la taille de la plaque. L'aire occupée par Iba1 n'est pas différente entre les souris APP/PS1 et les souris APP/PS1xKO (APP/PS1 : $2,2 \pm 0,1$ vs APP/PS1xKO : $2,0 \pm 0,2$) (Figure 38A), montrant ainsi que l'absence de P2X4R n'affecte pas la couverture microgliale autour des plaques amyloïdes. De manière intéressante, on note une corrélation positive entre l'aire occupée par les microglies et la taille des plaques amyloïdes au sein des deux génotypes ($r=0,57$ et $r=0,51$ pour APP/PS1 et APP/PS1xKO respectivement) (Figure 38B).

L'étude de la MA chez des souris APP/PS1 n'exprimant pas P2X4R a mis en avant une amélioration des capacités mnésiques ainsi qu'une diminution de la concentration d'A β soluble dans le cortex de ces souris, sans altération du nombre de plaques amyloïdes. Par ailleurs, P2X4R est surexprimé dans les lysosomes des microglies réactives se situant autour des plaques mais son absence n'affecte pas la couverture microgliale. Comment l'absence de P2X4R induit de tels changements chez les APP/PS1 restent donc à déterminer.

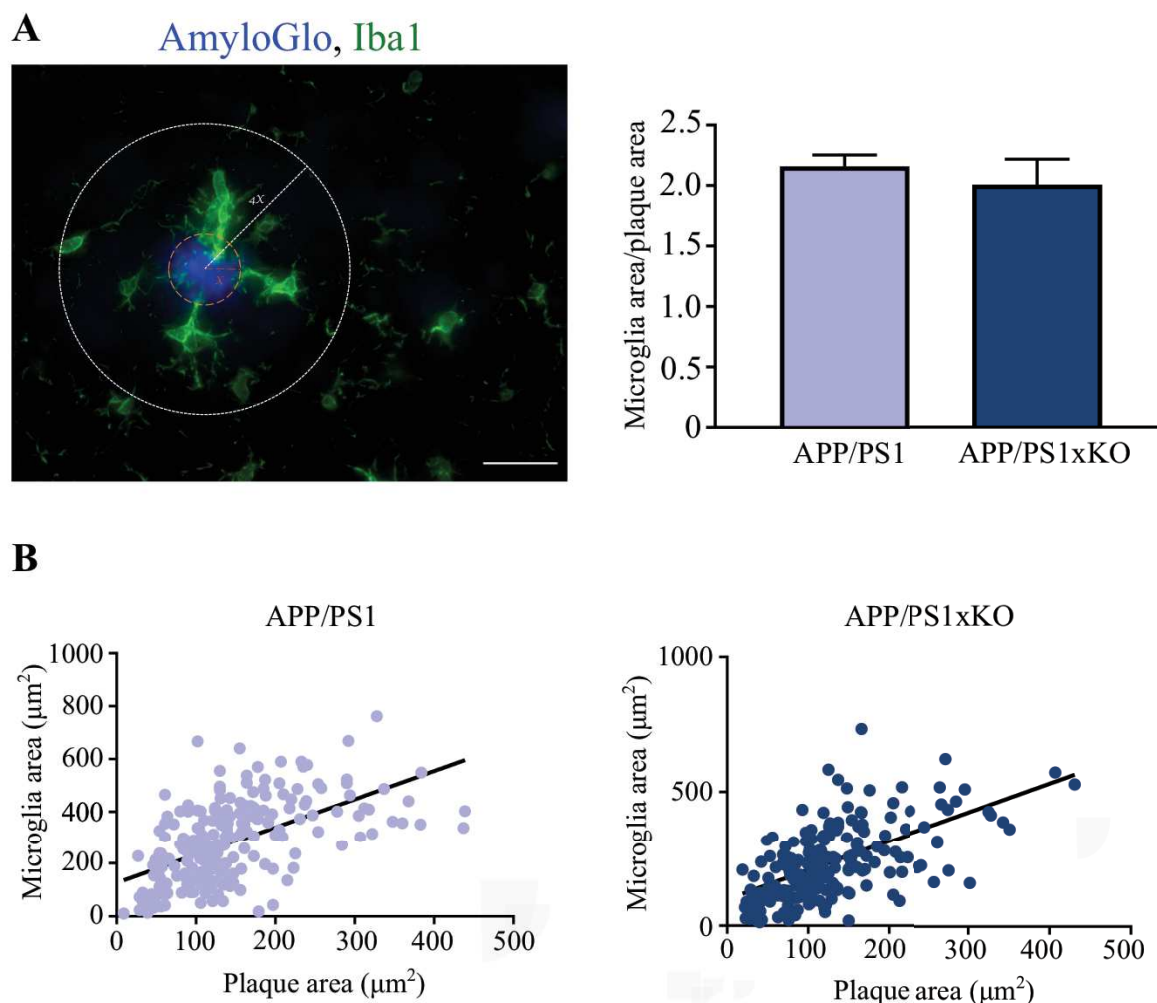


Figure 38 : Aire microgliale autour des plaques amyloïdes identique entre les APP/PS1 et APP/PS1xKO

(A) *Gauche*, Image représentative des microglies autour des plaques. Le rayon de la plaque est mesuré (x , ligne orange) et l'aire occupée par les microglies est analysée dans une région (cercle blanc) déterminée comme un cercle de rayon 4 fois supérieur à celui de la plaque ($4x$, ligne blanche) (barre d'échelle : $30\mu\text{m}$). *Droite*, quantification de l'aire occupée par les microglies ($n=11$ animaux, moyenne \pm SEM, unpaired t-test). (B) l'aire occupée par les microglies est exprimée en fonction de la taille des plaques autour desquelles elles sont situées ($r=0,57$, $p<0,001$ et $r=0,51$, $p<0,001$ pour APP/PS1 et APP/PS1xKO respectivement, Pearson correlation test).

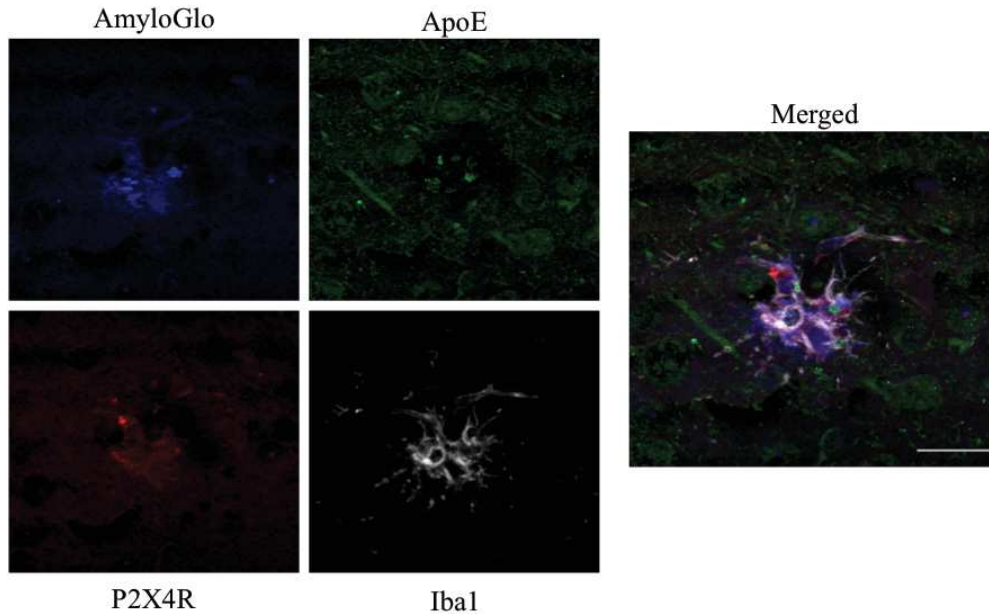
3 Etude de P2X4R et d'ApoE dans la MA

Les résultats précédents montrent que l'absence de P2X4R induit des changements phénotypiques chez les APP/PS1. Par ailleurs, dans les macrophages *in vitro*, P2X4R interagit avec ApoE et est impliqué dans sa dégradation. ApoE est fortement impliquée dans la MA et est particulièrement connue pour moduler la dégradation et l'agrégation du peptide A β . L'absence de P2X4R induisant une diminution de la concentration d'A β soluble chez les

RESULTATS : Etude de P2X4R et d'ApoE dans la MA

souris APP/PS1xKO et une augmentation d'ApoE dans les macrophages et microglies P2X4R-KO, la dernière partie de ces travaux a été consacrée à déterminer si l'absence de P2X4R dans des souris APP/PS1 provoquait également une augmentation d'ApoE, pouvant expliquer les changements observés tels que la réduction d'A β soluble.

APP/PS1



APP/PS1xKO

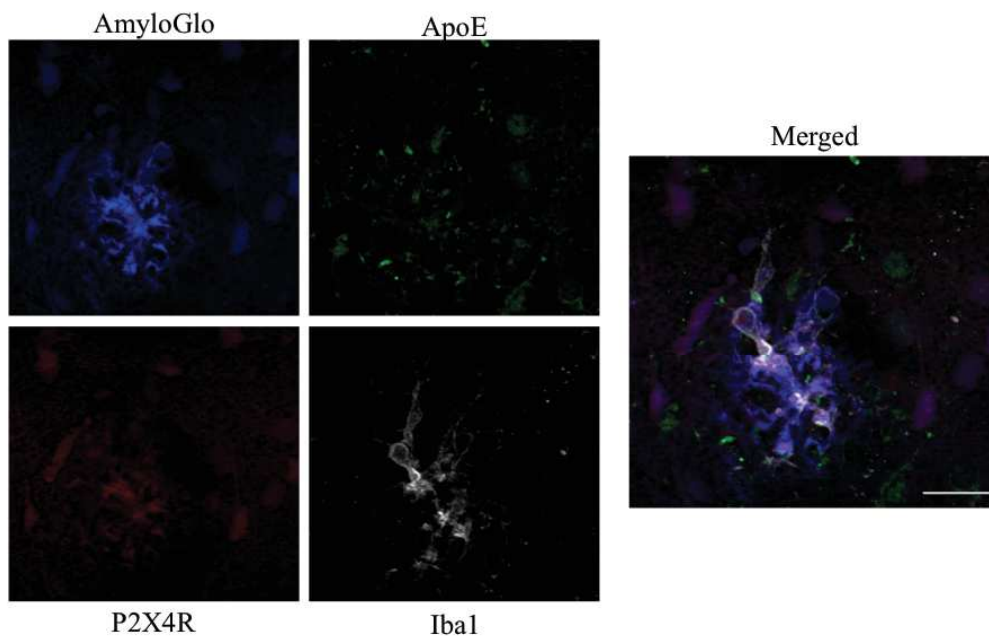


Figure 39 : Localisation d'ApoE dans le cortex de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO

ApoE (*vert*) est exprimé dans les microglies (*gris*) réactives situées autour des plaques amyloïdes (barre d'échelle: 20 μ m)

3.1 Expression d'ApoE dans le cortex de souris APP/PS1

3.1.1 Localisation d'ApoE dans le cortex de souris APP/PS1

Dans le cerveau, ApoE est principalement exprimée et sécrétée par les astrocytes. Cependant, de nombreuses études montrent qu'ApoE est également exprimée par les microglies et par les neurones³²⁴. De ce fait, la localisation d'ApoE dans les cerveaux de souris APP/PS1 a été étudiée afin de déterminer si elle est exprimée dans les microglies réactives situées autour des plaques amyloïdes. Des marquages d'ApoE en immunofluorescence montrent une large expression de cette protéine. Plus spécifiquement, ApoE est exprimée au sein des microglies réactives situées autour des plaques amyloïdes (Figure 39). Chez les APP/PS1, ApoE est exprimée dans les microglies exprimant également P2X4R (Figure 39).

En outre, ApoE co-localise avec CD68 dans les microglies réactives, suggérant ainsi qu'ApoE est localisée dans les lysosomes de ces cellules (Figure 40). La localisation lysosomale et microgliale d'ApoE ainsi que sa co-localisation avec P2X4R concordent avec un rôle potentiel de P2X4R dans la dégradation lysosomale d'ApoE, comme observée *in vitro*.

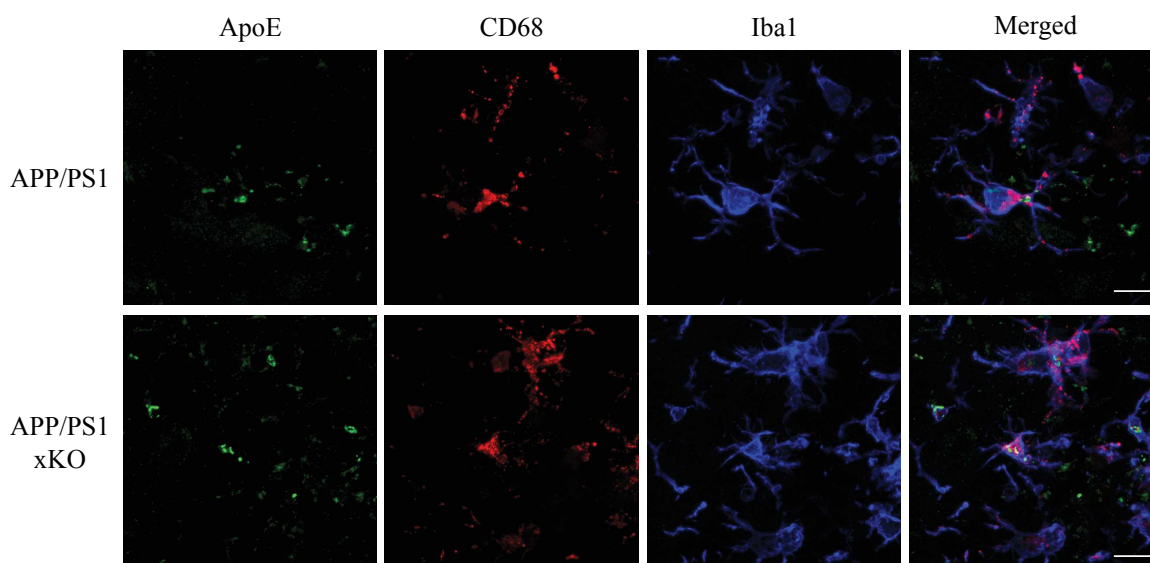


Figure 40 : Localisation d'ApoE dans les lysosomes des microglies de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO

ApoE (*vert*) est exprimée dans les lysosomes (*rouge*) des microglies (*bleu*) (barre d'échelle : 10µm)

3.1.2 Expression d'ApoE dans les souris APP/PS1

Par la suite, des expériences ont été conduites afin de déterminer si l'augmentation d'ApoE observée dans les macrophages et microglies en culture pouvait également être présente dans les microglies des souris APP/PS1xKO. Pour cela, des microglies ont été isolées à partir de cortex de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO. Elles ont ensuite été marquées avec un anticorps Cd11b-PE et triées par FACS afin de récupérer le même nombre de cellules pour chaque condition. Les microglies ont ensuite été lysées et l'expression d'ApoE a été analysée par WB. La Figure 41 montre un WB ainsi que la quantification d'ApoE dans ces cellules. Les microglies de souris APP/PS1xKO semblent exprimer une plus grande quantité d'ApoE comparativement aux APP/PS1 (APP/PS1 : $0,13 \pm 0,02$ vs APP/PS1xKO : $0,36 \pm 0,001$). Cependant, cette expérience n'a pu être reproduite que deux fois et des analyses statistiques ne sont pas applicables.

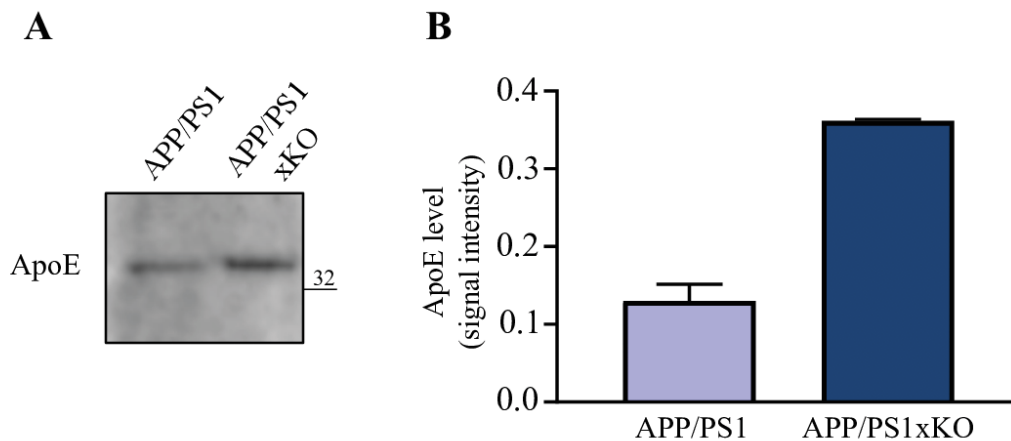


Figure 41 : Augmentation d'ApoE dans les microglies corticales de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO

(A) WB représentatif d'ApoE dans les microglies de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO. (B) Quantification du signal d'ApoE observé en WB dans les microglies corticales (n=2, moyenne ± SEM)

L'ensemble de ces résultats indique que les microglies réactives situées autour des plaques expriment ApoE et que cette dernière est plus fortement exprimée chez les souris APP/PS1xKO. Bien que ce dernier résultat reste à confirmer, il semble donc que l'augmentation de l'expression d'ApoE puisse être observée dans les microglies n'exprimant pas P2X4R, confortant ainsi les résultats observés *in vitro*.

3.2 Mise en relation avec la pathologie humaine

Enfin, les derniers travaux de cette thèse consistent à déterminer si les observations précédentes sont présentes dans le cortex de patients atteints de la MA, permettant ainsi de déterminer leur pertinence vis à vis de la MA. Pour cela, des échantillons de cortex de patients atteints de la MA et de témoins ont été obtenus à la banque d'échantillon IHU-A-ICM-Neuro-CEB de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière à Paris.

3.2.1 Etude de P2X4R et ApoE dans le cortex de patient

L'expression de P2X4R dans le cortex de patients a été observée en immunofluorescence. P2X4R est faiblement exprimé chez les témoins et fortement exprimé dans les microglies autour des plaques dans le cortex de patients atteints de la MA (Figure 42A), reflétant l'observation faite chez les souris APP/PS1. De même, l'expression d'ApoE est faible dans le cortex de témoins tandis qu'ApoE est fortement exprimée chez les patients. Ces derniers montrent une vaste expression d'ApoE mais son expression est observée dans les microglies (Figure 42B). Les patients atteints de la MA expriment donc P2X4R et ApoE dans les microglies activées se situant autour des plaques amyloïdes, confortant les observations réalisées chez les souris APP/PS1.

3.2.2 Etude des différentes isoformes d'ApoE

Enfin, les dernières expériences ont consisté à étudier l'effet de P2X4R sur les différentes isoformes d'ApoE. En effet, il existe trois différentes isoformes d'ApoE (ϵ_2 , ϵ_3 et ϵ_4) chez l'humain tandis qu'il n'existe qu'une seule forme chez la souris. Il est alors pertinent de se demander si l'absence de P2X4R affecte le métabolisme des trois isoformes humaines d'ApoE. Des cellules COS-7 ont été transfectées avec la forme humaine de P2X4R et différentes isoformes humains d'ApoE. L'expression protéique d'ApoE dans le surnageant de ces cellules en culture a ensuite été analysée en WB. La co-expression de P2X4R et d'ApoE- ϵ_3 induit une diminution de l'expression d'ApoE comparativement aux cellules exprimant seulement ApoE- ϵ_3 . En revanche, aucune différence significative n'est notée entre les cellules co-transfectées avec P2X4R et ApoE- ϵ_2 et les cellules transfectées seulement avec ApoE- ϵ_2 . Il en est de même pour les cellules transfectées avec ApoE- ϵ_4 (Figure 43). L'isoforme ϵ_3 est donc la seule à être sensible à P2X4.

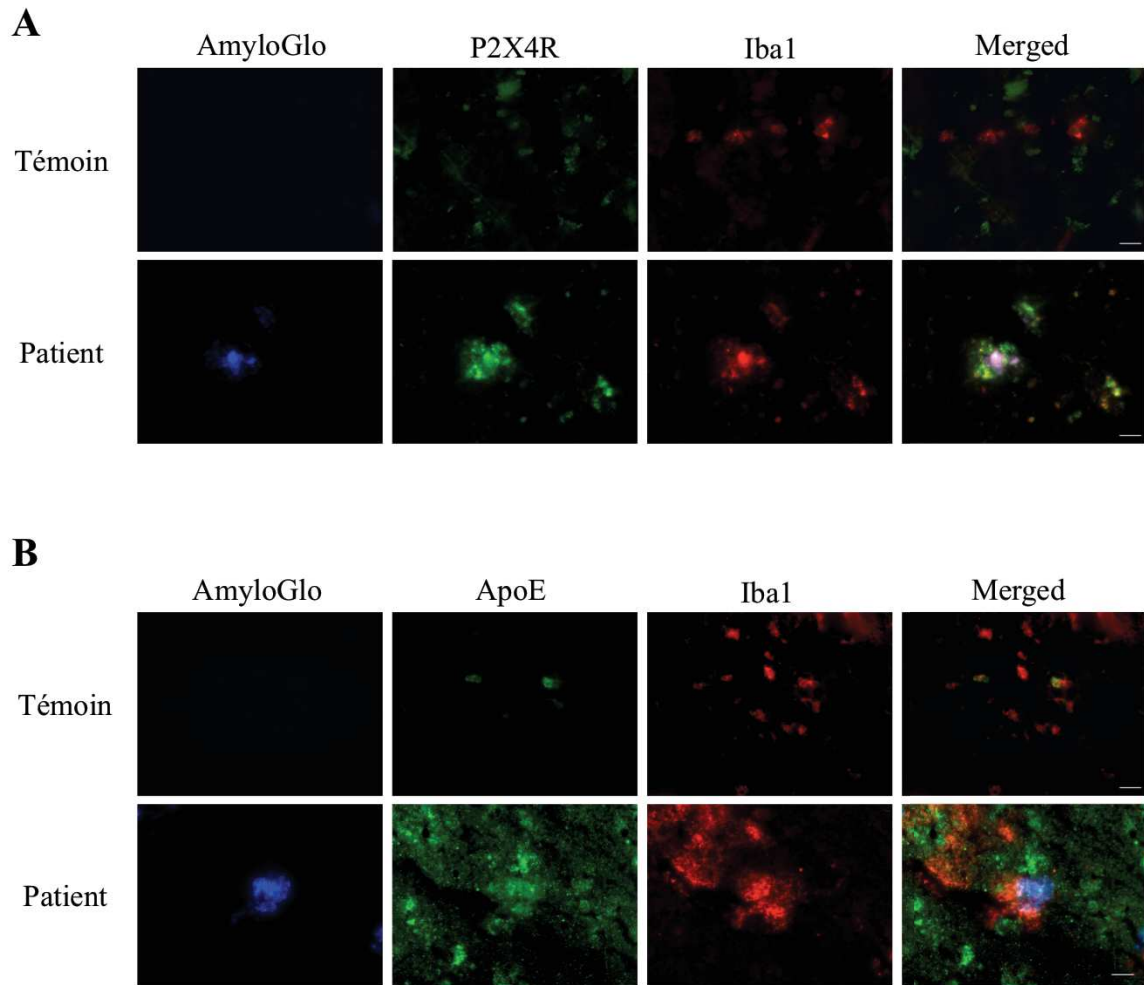


Figure 42 : Localisation de P2X4R et d'ApoE dans le cortex de patients atteints de la maladie d'Alzheimer

(A) Marquage des plaques (AmyloGlo, *bleu*), de P2X4R (*vert*) et des microglies (Iba1, *rouge*).
 (B) Marquage des plaques (amyloGlo, *bleu*), d'ApoE (*vert*) et des microglies (Iba1, *rouge*)
 (Barre d'échelle: 20 μ m)

Dans l'ensemble, ces travaux soulignent une implication de P2X4R dans la dégradation d'ApoE ainsi qu'un rôle dans la maladie d'Alzheimer. En effet, dans les macrophages, l'absence de P2X4R conduit à une altération de l'activité de la cathepsine B, conduisant ainsi à une diminution de la dégradation d'ApoE et donc une augmentation de son expression dans ces cellules. D'autre part, l'absence de P2X4R dans des souris APP/PS1, modèle de la MA, entraîne une diminution de la concentration d'A β soluble dans le cortex de ces souris ainsi qu'une amélioration des capacités mnésiques. Enfin, ces souris montrent une expression plus élevée d'ApoE dans les microglies du cortex. De manière intéressante, certains de ces résultats sont observés dans le cortex de patients atteints de la MA. En effet, P2X4R et ApoE

sont exprimés dans les microglies des patients et la co-expression de P2X4R et d'ApoE- ϵ 3 entraîne une diminution de l'expression de cette dernière.

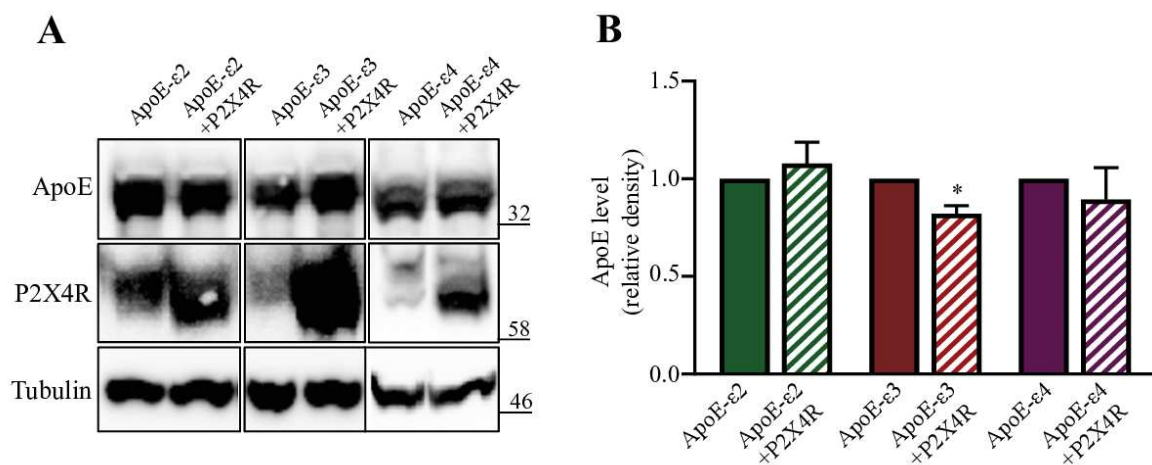


Figure 43 : Diminution d'ApoE dans les cellules COS-7 transfectées avec P2X4R et l'isoforme ApoE- ϵ 3

(A) WB représentatif d'ApoE dans les cellules COS-7 transfectées avec P2X4R et ApoE- ϵ 2, ApoE- ϵ 3 ou ApoE- ϵ 4. (B) Quantification du signal d'ApoE observé en WB (n=5, 5 et 4 cultures indépendantes pour ApoE- ϵ 2, ApoE- ϵ 3 et ApoE- ϵ 4 respectivement, , moyenne \pm SEM, * p<0,05 one-sample t-test comparé à 1)

DISCUSSION

1 Rôle de P2X4R dans la dégradation d'ApoE

Des expériences préalablement conduites au sein du laboratoire ont montré une interaction physique entre P2X4R et ApoE ainsi qu'une augmentation d'ApoE dans les macrophages et microglies provenant de souris P2X4R-KO. Les travaux de cette thèse ont cherché à caractériser les mécanismes sous-jacents et ont permis d'établir une implication de P2X4R dans l'activité de la cathepsine B, intervenant dans la dégradation d'ApoE.

1.1 Spécificité de l'implication de P2X4R dans l'augmentation d'ApoE

Les cellules myéloïdes P2X4R-KO présentant une augmentation d'ApoE comparativement aux WT, l'un des premiers prérequis était de vérifier si cet effet était spécifique des sous-unités P2X4R. En système recombinant, les cellules exprimant P2X2R montrent un niveau d'expression d'ApoE identique à celui des WT, confirmant la spécificité de l'effet de P2X4R sur ApoE. Il aurait également été intéressant de vérifier cet effet dans des macrophages primaires mais la transfection et transduction de ces cellules n'ont pas fonctionné. En outre, il est aussi pertinent de mentionner la spécificité vis à vis de P2X7R. En effet, P2X4R et P2X7R sont exprimés dans les macrophages, dans lesquels ils peuvent interagir, et P2X7R stabilise l'expression de P2X4R à la membrane⁷⁵. Des expériences ont donc été conduites afin d'étudier l'expression d'ApoE dans les macrophages issus de souris P2X7R-KO. De manière intéressante, ApoE est également augmentée dans les cellules P2X7R-KO. Cependant, ce résultat est à interpréter avec précaution. En effet, les gènes *p2rx4* et *p2rx7* étant adjacents, l'insertion de la cassette neomycin dans le gène *p2rx4* de ce modèle P2X4R-KO peut induire une altération de *p2rx7*. En outre, dans ce modèle, bien que P2X7R soit fonctionnel¹⁴⁶, son expression est réduite dans les macrophages P2X4R-KO.

1.2 Implication de la cathepsine B dans la dégradation d'ApoE

Bien que les hépatocytes et les cellules de Kupffer, soient les principales cellules exprimant et sécrétant ApoE⁴⁵², cette dernière est également exprimée en grande quantité dans le cerveau³²⁴ et dans les macrophages⁴⁴⁷. De manière intéressante, une étude de Dory et *al.* montre que, dans des cultures de macrophages péritonéaux, seulement 44% des protéines ApoE synthétisées sont sécrétées. Lorsqu'elle n'est pas sécrétée, ApoE s'accumule dans les cellules et est dégradée⁴⁵³. Plusieurs voies de dégradation d'ApoE ont été mises en évidence. Dans les macrophages, ApoE est observée dans les lysosomes et l'inhibition de différentes

DISCUSSION : Rôle de P2X4R dans la dégradation d'ApoE

protéases lysosomales, incluant des protéases à cystéine (cathepsines A, B, D et L), mène à une diminution de 60% de la dégradation d'ApoE⁴⁴⁹. Une voie non lysosomale, mais protéasomale, impliquant des protéases à cystéine et des hydrolases, a également été observée dans ces cellules⁴⁵⁴. D'autres voies de dégradation ont été mises en évidence. Par exemple, dans des cultures primaires de neurones et de cellules gliales, il a été montré qu'ApoE peut être dégradée dans le milieu extracellulaire par des protéases à serine sécrétées par les neurones⁴⁴⁸.

Les résultats de cette thèse confirment l'implication de la cathepsine B dans la dégradation d'ApoE. Plus particulièrement, ils montrent l'implication de P2X4R dans la modulation de son activité puisque son altération dans les macrophages P2X4R-KO conduit à une augmentation de l'expression d'ApoE dans ces cellules. Cette observation résulte de différentes expériences utilisant divers outils tels que des inhibiteurs pharmacologiques et des substrats fluorescents.

1.2.1 Implication des protéases à cystéine

Afin d'identifier la protéase responsable de la dégradation d'ApoE, ces travaux se sont appuyés sur l'utilisation de divers inhibiteurs dont celui de la cathepsine B, le Z-Phe-Ala-FKM. Bien qu'inhibant la cathepsine B, il est également capable d'inhiber la cathepsine L et S. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces dernières ne provoque pas de différence significative, suggérant une implication spécifique de la cathepsine B. Il est cependant important de remarquer que l'inhibition de la cathepsine L entraîne également une faible augmentation d'ApoE dans les cellules WT, qui n'est pas observée chez les P2X4R-KO. Au contraire, l'inhibiteur de cathepsine L semble provoquer une diminution d'ApoE dans le surnageant des cellules KO, provoquant ainsi une amélioration de la dégradation ou une inhibition de sa sécrétion. Il semble donc que l'inhibition de la cathepsine L provoque des effets opposés dans les cellules WT et P2X4R-KO. De manière intéressante, l'étude de Deng et *al.* montre que l'inhibition pharmacologique de la dégradation lysosomale d'ApoE, dans des macrophage péritonéaux, a un effet biphasique sur sa sécrétion : une faible inhibition stimule la sécrétion d'ApoE tandis qu'une forte inhibition réduit sa sécrétion de 50-90%⁴⁴⁹. Une hypothèse possible serait que, de manière analogue, l'inhibition de la dégradation d'ApoE par l'inhibiteur de la cathepsine L provoque un effet biphasique sur sa sécrétion, expliquant ainsi nos résultats.

L'implication de la cathepsine B a ensuite été confirmée à l'aide de substrats fluorescents. L'utilisation du substrat Z-RR-AMC, a permis d'évaluer l'activité de la cathepsine B et de montrer son altération dans les cellules P2X4R-KO. Cette altération a été confirmée avec la quantification de la dégradation du substrat cathepsine B-Magic Red en microscopie. L'expression protéique de la cathepsine B étant identique chez les WT et P2X4R-KO, l'effet de P2X4R sur ApoE est dû à une altération de l'activité de la cathepsine B plutôt qu'une diminution de son expression.

Ainsi, ces données démontrent un rôle de la cathepsine B dans la dégradation lysosomale d'ApoE. Afin d'appuyer ce résultat, l'expression d'ApoE a été étudiée dans les macrophages de souris Cathepsine B-KO. Dans le surnageant de ces cellules, l'absence de cette protéase conduit à une augmentation d'ApoE, confirmant ainsi un rôle de la cathepsine B dans la dégradation d'ApoE.

1.2.2 Implication d'autres enzymes ?

L'ensemble de ces résultats a donc permis de mettre en évidence une altération de l'activité de la cathepsine B dans les cellules P2X4R-KO. Cependant, il est important de considérer l'implication probable d'autres protéines dans la dégradation d'ApoE. En effet, la première approche permettant d'étudier la dégradation d'ApoE a été d'utiliser un inhibiteur de protéases à cystéine, l'E64. Cependant, comme mentionné précédemment, différentes protéases ont été identifiées dans les voies de dégradation d'ApoE, telles que les protéases à sérine, qui n'ont pas été étudiées ici. Bien qu'il soit important de considérer la possible implication d'autres protéases, il est intéressant de remarquer que l'utilisation de l'inhibiteur de cathepsine B chez les souris WT permet de retrouver un niveau d'ApoE similaire aux P2X4R-KO, suggérant ainsi que l'altération chez les P2X4R-KO est majoritairement due à la cathepsine B.

Dans l'ensemble, ces données démontrent un rôle de la cathepsine B dans la dégradation lysosomale d'ApoE. De plus, l'activité de cette protéase est altérée dans les macrophages provenant de souris P2X4R-KO, conduisant à une augmentation de la concentration d'ApoE dans ces cellules. Il semblerait donc que P2X4R module l'activité de la cathepsine B, impliquée dans la dégradation d'ApoE.

1.3 Implication de P2X4R dans la dégradation d'ApoE

L'absence de P2X4R conduit à un défaut d'activité de la cathepsine B, entraînant une augmentation d'ApoE. Cependant, les mécanismes par lesquels P2X4R module l'activité de la cathepsine B ne sont pas connus. Afin de les étudier, il a fallu, dans un premier temps, déterminer si l'effet de P2X4R sur ApoE était dépendant de l'activité du récepteur. A ces fins, des expériences utilisant des antagonistes de P2X4R ont été tentées. Le 5-BDBD, fort antagoniste de P2X4R a été incubé avec le substrat fluorescent de la cathepsine B, le Z-RR-AMC. Cependant, les effets obtenus sur des cultures de BMDM issues de souris P2X4R-KO ont démontré un effet non spécifique de cet antagoniste. Aucun antagoniste spécifique de P2X4R n'étant à ce jour disponible, il n'a donc pas été possible d'étudier l'activité de P2X4R dans les macrophages. Des expériences ont donc été conduites en système hétérologue, dans lequel des cellules COS-7 ont été transfectées avec un mutant d'activité de P2X4R, P2X4R-K69A. Celles-ci ont permis de conclure que la modulation d'ApoE est indépendante de l'activité du récepteur. Certains récepteurs sont connus pour avoir des rôles indépendamment de la liaison de leurs agonistes. A titre d'exemple, le récepteur ErbB3 module l'adressage de l'intégrine $\beta 1$ de manière indépendante de la liaison de son agoniste⁴⁴⁶. A ce jour, aucune étude ne montre de rôles de P2X4R ne nécessitant pas son activation. En outre, les expériences ont été conduites avec un mutant P2X4R-K69A, muté sur le site de liaison de l'ATP, suggérant que l'effet de P2X4R sur ApoE ne dépend pas de la liaison de l'ATP sur P2X4R. Bien qu'il n'existe pas d'étude montrant une activité de P2X4R indépendante de la liaison de l'ATP, il ne faut pas exclure la possibilité que P2X4R puisse être activé de manière indépendante de l'ATP. En effet, une étude récente suggère que P2X7R peut être activé de manière indépendante de son ligand⁴⁵⁵. De ce fait, un mutant du pore de P2X4R aurait été nécessaire afin de confirmer que cet effet soit effectivement indépendant de son activité.

Les expériences de co-immunoprécipitation, préalablement menées dans le laboratoire, ont mis en évidence une interaction physique entre les protéines P2X4R et ApoE. Bien que cette interaction n'ait pas été développée au cours de cette thèse, il serait intéressant de savoir si elle est capable de moduler la dégradation d'ApoE. En effet, les P2XR interagissent avec d'autres protéines et ces interactions peuvent moduler les fonctions de ces dernières. A titre d'exemple, Jo et *al.* ont montré une interaction physique entre P2X4R et le récepteur GABA_A, essentielle à l'inhibition croisée observée lors de l'activation de ces deux récepteurs¹⁰⁶. Il a également été montré que l'interaction de récepteurs P2X avec d'autres protéines modifie l'adressage de ces dernières. En effet, Boué-Grabot et *al.* montrent que la co-expression de

P2X2R et GABA promeut le recrutement des récepteurs GABA à la membrane¹³¹ tandis que Pougnet *et al.* observent une internalisation des récepteurs AMPAR dépendante de P2X2R dans des cultures de neurones hippocampiques¹²⁵. Ainsi, il est possible que l'interaction entre P2X4R et ApoE facilite la dégradation d'ApoE par la cathepsine B, en supposant, par exemple, que l'interaction de P2X4R avec ApoE favorise l'adressage de cette dernière dans les lysosomes. Des études approfondies de cette interaction, par exemple en identifiant les sites d'interactions entre les protéines, seront donc nécessaires afin de définir si elle tient un rôle dans la dégradation d'ApoE.

Enfin, un dernier point qui n'a pas été abordé ici est l'effet de l'activation des macrophages sur l'augmentation d'ApoE. En effet, les macrophages sont des cellules immunitaires qui peuvent s'activer suite à l'introduction d'agents pathogènes et adopter des phénotypes particuliers. Des études montrent que le LPS provoque une baisse de la sécrétion d'ApoE ainsi qu'une diminution de la quantité de ARNm d'ApoE dans des cultures de macrophages⁴⁵⁶. En outre, différentes cytokines pro-inflammatoires provoquent également une diminution d'ApoE et l'interferon- γ induit une augmentation de la dégradation intracellulaire d'ApoE⁴⁵⁶. Dans ce contexte, il semble intéressant de se demander si stimuler des BMDM avec du LPS provoque également une diminution de l'expression d'ApoE et si celle-ci est observée dans les BMDM provenant de souris P2X4R-KO. En effet, P2X4R étant impliqué dans divers processus inflammatoires, l'absence de P2X4R pourrait empêcher la diminution d'ApoE provoquée par les cytokines inflammatoires dans les macrophages activés.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent une interaction physique entre P2X4R et ApoE, dans les macrophages issus de la moelle osseuse et dans les cellules COS-7. Ces travaux soulignent également un rôle spécifique de P2X4R dans la dégradation d'ApoE, indépendante de son activité, ainsi qu'une modulation de l'activité enzymatique de la cathepsine B par P2X4R.

2 Modulation d'ApoE chez les souris APP/PS1

Dans le SNC, ApoE est sécrétée par les astrocytes et les microglies et est particulièrement connue comme facteur de risque majeur dans le développement de la maladie d'Alzheimer. De nombreuses études démontrent l'implication d'ApoE dans la MA, et notamment dans l'oligomérisation et la dégradation du peptide A β . Dans ce contexte, il a donc été pertinent d'étudier l'implication de P2X4R dans la MA et particulièrement son rôle dans l'expression

d'ApoE dans la pathologie. L'utilisation de souris APP/PS1 a permis de mettre en évidence une amélioration mnésique, une diminution de la concentration de peptide A β ainsi qu'une augmentation de l'expression d'ApoE microgliale chez les souris n'exprimant pas P2X4R.

2.1 Expression d'ApoE dans les souris APP/PS1xKO

ApoE représente le plus grand facteur de risque connu pour la MA. Diverses études montrent une interaction entre ApoE et le peptide A β ^{332,333} et ApoE est observée au niveau des plaques amyloïdes^{433,457}. En concordance avec cela, les immunomarquages dans les cerveaux de souris APP/PS1 montrent également une localisation d'ApoE au sein des plaques amyloïdes et dans les microglies associées aux plaques, comme il a pu être montré précédemment⁴³³.

Les cellules myéloïdes P2X4KO en culture montrant une augmentation d'ApoE, la dernière partie de cette thèse a cherché à déterminer si ce phénotype était retrouvé *in vivo*. Les microglies triées et isolées du cortex de souris APP/PS1xKO présentent une quantité d'ApoE supérieure aux souris APP/PS1. Cependant, l'isolation des microglies par FACS ne permettant de récupérer que peu de cellules (environ 400 000 microglies corticales par souris), il a été nécessaire de rassembler les microglies de deux animaux afin de pouvoir détecter un signal en WB. De ce fait, chaque puits représente les microglies de deux animaux du même génotype, pouvant ainsi induire un biais dans la variabilité interindividuelle. De plus, par manque d'animaux disponibles, ces expériences n'ont été réalisées que deux fois, ne permettant donc pas de valider statistiquement ces résultats. Ces résultats préliminaires laissent cependant supposer que l'expression d'ApoE est supérieure dans les microglies corticales des souris APP/PS1xKO comparativement aux souris APP/PS1, confirmant ainsi les résultats observés *in vitro*.

Au cours de la maladie d'Alzheimer, les monocytes circulants peuvent infiltrer le cerveau et sont capables d'éliminer le peptide A β ⁴⁵⁸. Les cellules ayant été triées à l'aide d'un marquage Cd11b, un marqueur de cellules myéloïdes, il n'est pas possible de distinguer les microglies des monocytes infiltrants. Ces derniers ne sont donc pas à exclure et peuvent contribuer à l'augmentation d'ApoE observée dans ces expériences. Cependant, Martin et *al.* montrent que les monocytes ne sont présents qu'à des stages très tardifs, au-delà de 15 mois, dans le cerveau de souris APP/PS1⁴⁵⁹. Les expériences ayant été conduites à 12 mois, il paraît raisonnable d'estimer que la majorité des cellules isolées soient des microglies.

2.2 Implication de P2X4R dans la maladie d'Alzheimer

Afin d'étudier la MA en l'absence de P2X4R, des souris APP/PS1xP2X4R-KO ont été générées. Ces animaux présentent une amélioration de la capacité mnésique dans des tests de mémoire spatiale. L'observation d'un tel phénotype a conduit à étudier la charge amyloïde, caractéristique majeure de la MA. Des quantifications de plaques amyloïdes compactes, marquées par la Thioflavine n'ont révélé aucune différence dans le nombre et la taille des plaques amyloïdes. De manière intéressante, la quantification du peptide A β soluble par WB et par ELISA montre une diminution de sa concentration dans le cortex de souris APP/PS1xKO. Ainsi P2X4R semble impliquer dans la MA et les souris déficientes pour ce récepteur présentent une amélioration des capacités mnésiques et une concentration plus faible de peptides A β solubles.

Les marquages immunofluorescents de P2X4R montrent une localisation lysosomale dans les microglies réactives se situant autour des plaques amyloïdes. La quantification du marquage Iba1 a cependant révélé que l'absence de P2X4R n'induit pas de changement dans la couverture microgliale autour des plaques. Par ailleurs, la phagocytose du peptide A β fluorescent dans des cultures de microglies a été quantifiée lors d'expériences préalablement conduites dans le laboratoire. Cette quantification n'a montré aucune différence entre les cellules WT et P2X4R-KO. Ainsi, bien que P2X4R soit surexprimé dans les microglies réactives, il ne semble pas moduler la couverture microgliale autour des plaques amyloïdes ni leur capacité de phagocytose.

De manière intéressante, P2X7R, le seul autre P2XR exprimé dans la microglie, est également impliqué dans la MA. En effet, l'expression de P2X7R est augmentée chez les patients atteints de la MA^{136,436} ainsi que dans des modèles murins^{460,461}. Son expression est observée dans les microglies autour des plaques amyloïdes à des stades avancés de la pathologie⁴⁶⁰. Elle augmente avec le développement de la pathologie et en parallèle avec l'accumulation de fibrilles A β ainsi qu'avec la perte du marqueur synaptique PSD95⁴⁶¹. Les souris P2X7R-KO présentent de meilleures capacités cognitives et une diminution des déficits synaptiques⁴³⁶. L'administration de BBG, un antagoniste de P2X7R, diminue les déficits cognitifs dans des modèles murins de la MA⁴⁶². De nombreuses études montrent l'implication de P2X7R dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (cf. introduction §2.2.2a). *In vitro*, l'inhibition de P2X7R conduit à une diminution de la libération d'Il-1 β après stimulation par l'A β et l'ATP⁴³⁹ et les microglies P2X7R-KO présentent une sécrétion d'Il-1 β moins élevée comparativement aux cellules WT après stimulation à l'A β ⁴⁶³. Ces travaux suggèrent que

DISCUSSION : Modulation d'ApoE chez les souris APP/PS1

l'implication de P2X7R dans la MA est due à son rôle dans l'inflammation. Il a également été montré que P2X7R module la production du peptide A β . En effet, l'activation de P2X7R promeut le clivage d'APP par la voie non-amyloïdogénique⁴³⁸. P2X7R promeut la libération de sAPP α et simultanément la diminution de sAPP β . Le clivage de l'APP par la voie non-amyloïdogénique est mené par une metalloprotéase et implique la phosphorylation de Erk1/2 et JNK⁴⁶⁴. A l'opposé, les travaux de Leon-Otegui et *al.* montrent que l'activation de P2X7R induit une diminution d' α -CTF, suggérant ainsi une inhibition de l' α -secretase par P2X7R⁴⁶⁵.

2.3 Modulation d'ApoE, amélioration du phénotype ?

Les travaux de cette thèse montrent une implication de P2X4R dans la dégradation d'ApoE ainsi que dans la MA. Ainsi, l'hypothèse ressortant de ces résultats est que, dans les souris APP/PS1xKO, l'augmentation d'ApoE, via la diminution de l'activité de la cathepsine B, induit une amélioration des capacités mnésiques et une diminution de la charge amyloïde. Des études supplémentaires sont nécessaires, cependant, différentes données de la littérature soutiennent l'implication de ces deux protéines d'ApoE et de la cathepsine B dans la MA.

2.3.1 Modulation d'ApoE

Premièrement, ApoE joue un rôle dans le dépôt du peptide A β (cf. introduction §3.4.2), bien que des études utilisant des modèles amyloïdes ApoE-KO montrent des résultats contradictoires avec les observations présentes. En effet, dans ces études, l'absence d'ApoE induit une diminution d'A β et des plaques amyloïdes^{466,467}, tandis que les résultats présentés dans cette thèse montrent une diminution d'A β lors de l'augmentation d'ApoE. En outre, ApoE est impliquée dans l'agrégation du peptide A β , bien que les études à ces sujets présentent des conclusions contradictoires. Déterminer si ApoE facilite ou inhibe l'agrégation du peptide reste donc contreversée³²⁷. *In vivo*, Holtzman et *al.* montrent qu'ApoE facilite la formation de fibrilles⁴⁶⁸ et Ulrich et *al.* montrent que les souris déficientes pour ApoE présentent des plaques plus diffuses et moins compactes⁴⁶⁹. Dans ce contexte, il aurait été intéressant de se demander si les plaques amyloïdes chez les APP/PS1xKO présentent la même morphologie et le même niveau de compaction que les celles des souris APP/PS1, permettant ainsi de faire un lien entre l'augmentation d'ApoE et les dépôts amyloïdes.

Deuxièmement, l'expression d'ApoE est modulée par la libération de cytokines et certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α et l'Il-1 β , induisent une diminution de l'expression d'ApoE⁴⁵⁶. P2X4R est impliqué dans les processus inflammatoires, en particulier

dans la libération de cytokines pro-inflammatoires^{285,286}, et les souris P2X4R-KO présentent une libération d'Il-1 β moins élevée que les souris WT (cf. introduction §2.2.2b). De ce fait, une hypothèse serait que, dans le contexte de la MA, les souris WT libèrent des cytokines pro-inflammatoires provoquant une diminution de l'expression d'ApoE. Au contraire, les souris APP/PS1xKO libèrent moins de cytokines inflammatoires et présentent une atténuation de la diminution d'ApoE, résultant en une quantité d'ApoE supérieure aux souris WT.

Dernièrement, différentes études montrent qu'ApoE et ses produits de dégradation sont neurotoxiques^{470,471}. En effet, le fragment N-terminal de 22kDa issu de la protéolyse d'ApoE provoque une mort neuronale *in vitro*⁴⁷⁰, et l'inhibition de cette protéolyse entraîne une diminution de la mort neuronale⁴⁷¹. Ces études suggèrent donc que l'inhibition de la dégradation d'ApoE, et donc de la génération de fragments, aurait un effet bénéfique, en prévenant la mort neuronale. Ainsi, une altération de la dégradation d'ApoE, comme observée dans les cellules P2X4R-KO, soutiendrait une amélioration de la pathologie.

Au vu des différentes implications d'ApoE dans la pathologie, il semble qu'une diminution de sa dégradation, comme il est observé dans les cellules n'exprimant pas P2X4R, puisse être bénéfique dans la MA.

2.3.2 Modulation de la cathepsine B

Plusieurs études impliquent également la cathepsine B dans la MA^{365,366}. Elle est impliquée dans la dégradation lysosomale du peptide A β ³¹¹ et a été identifiée comme β -sécrétase, contribuant ainsi à la génération de peptide A β ₄₂³⁶⁷. Une étude de Hook et *al.* montre que l'inhibition de la cathepsine B diminue la charge amyloïde et améliore les déficits cognitifs³⁶⁷. Ceci va dans le sens de l'hypothèse émise précédemment, puisque les souris P2X4R, ayant une altération de la cathepsine B, présentent une amélioration des capacités mnésiques et une diminution du peptide soluble. Cet effet semble cependant passer par la fonction β -sécrétase de la cathepsine B et donc par sa capacité à générer le peptide A β ³⁶⁷, plutôt que par sa capacité à dégrader ApoE.

Enfin, la cathepsine B est impliquée dans l'inflammation. En effet, sa libération module l'activation de l'inflammasome NLRP3, et par conséquent la libération d'Il-1 β , par les microglies traitées avec du peptide A β ³⁶¹. De plus, inhiber la cathepsine B réduit la libération d'Il-1 β . De ces données, une hypothèse à émettre serait que, en plus de moduler la dégradation directe d'ApoE, la cathepsine B promeut la libération de cytokines pro-inflammatoires, provoquant ainsi une diminution de l'expression d'ApoE. Dans les cellules

DISCUSSION : Modulation d'ApoE chez les souris APP/PS1

n'exprimant pas P2X4R, la cathepsine B étant altérée, une augmentation d'ApoE est observée par le biais de ces deux mécanismes. De manière intéressante, des expériences préliminaires de WB montrent que des BMDM issus de souris P2X4R-KO présentent un signal NLRP3 moins élevé que ceux issus de souris WT. Lorsque les macrophages sont stimulés avec du LPS et de la Nigéricine, afin d'activer l'inflammasome NLRP3, les BMDM P2X4R-KO montrent une augmentation du signal de la pro-caspase-1 comparativement aux cellules WT. Bien que préliminaires, ces résultats semblent concorder avec l'hypothèse émise précédemment : les cellules P2X4R-KO, ayant une cathepsine B altérée, présentent plus de pro-caspase 1 et moins de NLRP3, et donc supposément moins de cytokines Il-1 β , entraînant ainsi une augmentation d'ApoE comparativement aux cellules WT.

La cathepsine B module donc différents aspects de la maladie d'Alzheimer et modifier son activité, par le biais de P2X4R, pourrait mener à l'amélioration de la pathologie. Dans ce contexte, des quantifications de fluorescence dans des lysats de cortex de souris APP/PS1 et APP/PS1xKO incubés avec du substrat fluorescent Z-RR-AMC ont été effectuées afin d'étudier l'activité de la cathepsine B chez ces souris. Ces quantifications ne montrent pas de différence de fluorescence entre les deux génotypes. Cependant, ces expériences ont été conduites sur des extraits de cortex entiers et il serait plus pertinent de les réaliser sur les microglies corticales isolées.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent une implication de P2X4R dans la modulation de l'activité de la cathepsine B, et par conséquent dans la dégradation d'ApoE. De manière intéressante, les souris déficientes pour P2X4R présentent une augmentation d'ApoE microgliale, une amélioration de la mémoire spatiale ainsi qu'une diminution de la concentration du peptide A β soluble, soulignant une implication de P2X4R dans la MA. Les données de la littérature montrant des rôles importants d'ApoE et de la cathepsine B dans la MA, il est possible que P2X4R soit impliqué dans la MA via son rôle sur la cathepsine B et sur ApoE.

3 Etudes de la maladie d'Alzheimer chez les APP/PS1xKO : limites et considérations

3.1 De nouveaux phénotypes chez les souris P2X4R-KO

Les travaux visant à étudier le MA dans les souris déficientes pour P2X4R ont révélé des phénotypes chez les souris P2X4R-KO, qui n'ont pas été décrits auparavant. En effet, dans le test de la piscine de Morris, les souris P2X4R-KO présentent une courbe d'apprentissage similaire aux souris APP/PS1 et APP/PS1-KO plutôt qu'aux WT, bien que cela ne soit pas statistiquement différent. De même, dans le test de rétention, il semblerait que les souris P2X4R-KO aient des performances moins bonnes que les souris WT. Il semblerait donc que les souris P2X4R-KO ont tendance à être moins performantes que les WT, suggérant un léger déficit cognitif. De plus, la caractérisation des épines dendritiques et des marqueurs synaptiques suggère également des altérations chez ces souris. En effet, la quantification des épines dendritiques suggèrent un léger déficit tandis que la quantification de NR1A et de PSD95 montrent une diminution de ces marqueurs dans les synaptosomes de souris P2X4R-KO. De manière intéressante, Sim et *al.* ont montré l'expression de P2X4R dans le CA1 ainsi qu'une réduction de la LTP chez les souris P2X4R-KO¹²⁹. Les résultats présentés ici concordent avec ces observations, mais sont en opposition avec l'étude de Lalo et *al.*, qui suggère que P2X4R inhibe la LTP et que celle-ci est induite plus facilement chez les souris P2X4R-KO¹²⁸.

Une autre observation qui mérite d'être abordée est le temps de latence des souris P2X4R-KO dans le test du Hamlet. En condition non assoiffée, celui-ci est plus faible que celui des autres génotypes. P2X4R étant exprimé dans les cellules rénales dans lesquelles il est impliqué dans le transport de sodium⁴⁷², son absence dans ces cellules pourrait expliquer cette observation. Dans le test du Hamlet, la capacité mnésique est mesurée en comparant le temps de latence entre les conditions assoiffée et non assoiffée au sein de chaque génotype. De ce fait, les différences de latence entre les génotypes en conditions basale, non assoiffée, n'induisent pas de biais dans la mesure.

3.2 Implication de P2X4R microglial ou neuronal ?

Chez les souris P2X4R-KO, une cassette β -galactosidase (LacZ)-neomycine a été insérée à la place du premier exon codant du gène P2X4R. De ce fait, le promoteur de P2X4R promeut l'expression de la β -galactosidase et ces souris n'expriment pas P2X4R. Cependant, dans le

DISCUSSION : Etudes de la maladie d'Alzheimer chez les APP/PS1xKO : limites et considérations

SNC, P2X4R est exprimé dans les neurones et dans les microglies. L'utilisation de ces souris permet donc d'étudier les conséquences de l'absence de P2X4R mais ne permet pas de discriminer l'implication des récepteurs neuronaux de celle des récepteurs microgliaux. Dans cette étude, P2X4R est surexprimé dans les microglies réactives, conduisant à supposer une forte implication des récepteurs microgliaux. Cependant, l'implication des P2X4R neuronaux ne peut être exclue et l'utilisation de modèles KO spécifiques des P2X4R microgliaux serait plus pertinente. Dans cette optique, des souris exprimant la CRE recombinase sous le promoteur du gène *sall1*, exclusivement exprimé dans les microglies, ont été générées et croisées avec des animaux *p2rx4* flox. Ces croisements permettront d'obtenir des souris privées de P2X4R microgliaux et permettront ainsi de déterminer la part neuronale et microgliale de P2X4R dans nos observations.

3.3 Limites du modèle d'études de la pathologie

3.3.1 Les limites du modèles APP/PS1

Afin d'étudier la progression de la maladie d'Alzheimer des souris modèles APP/PS1 ont été utilisées. Ces souris, décrites par Jankowsky et *al.* sont des modèles amyloïdes portant la mutation APP_{Swe}, encodant la mutation 695K670N-M671L, ainsi qu'une délétion de l'exon E9 dans le gène presenilin 1 (PS1dE9)⁴⁴³. Dans ce modèle, des plaques amyloïdes sont observées dès 3 mois et leur nombre et taille augmentent jusqu'à l'âge de 12 mois. L'Aβ soluble est détecté à 4 mois et augmente également avec l'âge³⁴⁸. Des déficits de mémoire sont observés en piscine de Morris dès 6 mois et s'aggravent à 8 et 12 mois⁴⁷³. Les souris montrent également des déficits dans des expériences de conditionnement de peur à 8 mois³⁵¹. Elles ne montrent cependant pas de perte neuronale bien que des dystrophies neuritiques⁴⁷⁴ ainsi qu'une perte d'activité neuronale localement autour des plaques⁴⁷⁵ sont observées. A 8 mois, ces souris montrent des déficits dans les comportements de « burrowing » et de « nest building », comportements supposément équivalents à des tâches quotidiennes chez l'être humain et qui sont altérées dans la MA³⁵¹. Ces souris récapitulent donc de nombreuses caractéristiques de la MA, mais quelques limites sont cependant à noter. Premièrement, les déficits cognitifs se développent plus précocement que dans la MA, à des âges proches de l'apparition des plaques amyloïdes, tandis que chez l'humain, ces déficits apparaissent des années après l'apparition des plaques. Deuxièmement, ces souris ne présentent pas de neurodégénération ni d'atrophie cérébrale, caractéristiques de la MA. Enfin, ces souris ne

développent pas de dégénérescences neurofibrillaires, mettant de côté la deuxième caractéristique majeure de la pathologie⁴⁷⁶.

3.3.2 Les limites du test de la piscine de Morris

Au cours de cette thèse, des souris de 12 mois ont été utilisées, âge auquel la pathologie est déjà bien établie. Dans un premier temps, le test de la piscine de Morris a été utilisé afin d'étudier les déficits mnésiques. Ce test met en jeu la mémoire spatiale et a largement été utilisé dans différentes études de la pathologie. Il a permis de mettre en évidence un déficit de rétention de mémoire chez les souris APP/PS1 sans altération de l'apprentissage. Cependant, l'eau étant aversive pour les souris, ce test présente des facteurs stressants les animaux⁴⁷⁷. De plus, les animaux APP/PS1 présentent une activité locomotrice plus élevée comparativement aux souris WT, pouvant ainsi induire un biais dans l'interprétation des résultats. Bien que la locomotion des souris APP/PS1 ait été évaluée dans différentes études, des résultats contradictoires sont observés^{478,479} et il serait plus pertinent d'évaluer la capacité de nage des souris dans ce contexte.

Enfin, il a été montré que les souris APP/PS1 montrent un thigmotactisme plus élevé comparativement aux souris WT, reflétant probablement une anxiété plus forte chez ces souris. Ceci peut induire un biais dans l'interprétation des résultats puisque les souris ayant un thigmotactisme élevé peuvent mettre plus de temps à rejoindre la plateforme ou le cadran cible, sans que cela ne reflète un déficit de mémoire³⁵¹. De ce fait, il aurait fallu étudier plus précisément les parcours des souris APP/PS1 et APP/PS1xKO pendant le test de la piscine de Morris ou bien mener des tests comportementaux d'anxiété.

3.3.3 Les limites de la caractérisation synaptique

Afin d'étudier les synapses, un marquage Golgi a été effectué et a permis de quantifier les épines dendritiques. Cette expérience n'a révélé aucune différence dans le nombre d'épines dendritiques entre les différents génotypes. Cependant, ces résultats sont à interpréter avec précaution. En effet, bien que le marquage Golgi permette d'observer les neurones, tous les neurones ne sont pas marqués. De ce fait, il est impossible de savoir si les cellules marquées représentent seulement des neurones autour des plaques amyloïdes ou, au contraire, des neurones du parenchyme éloignés des plaques, ou bien si les deux populations sont représentées. Ainsi, ce marquage peut induire des biais dans les neurones quantifiés.

4 Mise en relation avec la pathologie humaine

Ces expériences ont été conduites dans des modèles cellulaires ainsi que dans des souris APP/PS1. Cependant, il a été également important d'étudier si certaines de ces observations sont présentes dans des modèles humains.

Les études conduites ici utilisent des modèles souris ; or, ces dernières ne présentent qu'une seule forme d'ApoE contrairement à l'humain, qui en présente trois (ApoE- ϵ 2, ApoE- ϵ 3 et ApoE- ϵ 4). Au niveau protéique, la forme murine diffère des formes humaines d'environ 100 acides aminés, et la forme murine de la protéine est plus amyloïgène que les formes humaines³³⁷. L'impact des formes humaines et murines sur la pathologie diffèrent sur de nombreux aspects tels que le dépôt de peptides amyloïdes, leur dégradation, l'inflammation, la plasticité neuronale et la pathologie Tau⁴⁸⁰. De manière intéressante, seules les cellules COS-7 transfectées avec l'isoforme humaine ApoE- ϵ 3 répliquent les résultats observés avec ApoE murine. ApoE- ϵ 3 étant l'isoforme qui se rapproche le plus d'ApoE murin⁴⁸¹, ces résultats concordent avec une implication de P2X4R dans la pathologie humaine.

Chez l'humain, l'isoforme ApoE- ϵ 4 confère un risque majeur de développer la maladie. Certaines études montrent que les individus porteurs de cette isoforme présentent une quantité protéique d'ApoE plus faible que les porteurs d'ApoE- ϵ 2 et ApoE- ϵ 3⁴¹³ et suggèrent que la pathogénicité d'ApoE- ϵ 4 lui est conférée par une différence dans son expression protéique. Suivant cette hypothèse, augmenter l'expression protéique d'ApoE, comme il est observé chez les souris APP/PS1xKO pourrait donc mener à des améliorations de la pathologie.

Pour finir, des expériences d'immunohistochimie ont permis d'observer l'expression de P2X4R et d'ApoE dans les microglies associées aux plaques amyloïdes chez les patients, concordant ainsi avec les résultats observés chez les souris. En outre, l'expression de ces protéines chez les patients et témoins a été examinée par WB. Aucune différence dans l'expression de ces deux protéines n'est observable. Cependant, ces expériences ont été conduites avec des petits échantillons ne provenant pas des mêmes régions du cortex, prélevés à des temps post-mortem différents et de patients d'âges différents, induisant ainsi des grandes variabilité.

L'étude de P2X4R et d'ApoE dans des contextes de la pathologie humaine a permis de mettre en évidence une similarité entre le rôle de P2X4R sur ApoE murin et ApoE- ϵ 3 humain. De plus, l'expression de P2X4R et d'ApoE est observée dans les microglies situées autour des

plaques, de manière similaire aux souris APP/PS1. L'ensemble de ces travaux suggère donc que les résultats obtenus dans nos modèles murins et cellulaires sont susceptibles d'être applicables chez l'humain.

Conclusion générale

Dans l'ensemble, les travaux de cette thèse ont permis de caractériser l'implication de P2X4R dans la dégradation d'ApoE par la cathepsine B. Ils ont également permis de mettre en évidence un rôle de ce récepteur dans la maladie d'Alzheimer. Il apparaît que P2X4R joue un rôle délétère dans la pathologie, concordant avec ses rôles précédemment décrits dans différentes pathologies telles que la douleur, l'épilepsie et l'inflammation.

L'hypothèse majeure de ces travaux est que P2X4R module la MA via son implication dans la dégradation d'ApoE. ApoE est fortement impliquée dans la MA mais également dans d'autres pathologies telles que l'athérosclérose, dans laquelle elle semble avoir un rôle anti-inflammatoire et ainsi atténuer la pathologie^{482,483}. Puisque P2X4R est impliqué dans la dégradation d'ApoE, il pourrait également l'être dans d'autres pathologies impliquant ApoE.

De plus amples études restent à conduire afin de comprendre comment P2X4R régule l'activité de la cathepsine B et de déterminer si cela implique l'interaction physique entre le récepteur et ApoE. Déterminer si cette interaction est directe et identifier les sites d'interaction des protéines constitueraient un premier pas vers la compréhension de ce mécanisme. D'autres études sont nécessaires afin de mettre en relation les observations faites *in vitro* et *in vivo*, et de déterminer si l'effet de P2X4R dans la pathologie implique la cathepsine B et ApoE microgliales. L'utilisation de souris n'exprimant pas P2X4R spécifiquement dans les microglies permettrait dans un premier temps de discriminer l'implication des P2X4R microgliaux des récepteurs neuronaux. Enfin, l'utilisation d'inhibiteur de la cathepsine B *in vivo* permettrait de déterminer si cette dernière est impliquée dans les phénotypes observés chez les souris APP/PS1xKO.

Bien que de plus amples travaux soient nécessaires, l'ensemble de ces résultats révèle un rôle de P2X4R dans la modulation de l'activité de la cathepsine B, et par conséquent, dans la dégradation d'ApoE, ainsi qu'une implication de ce récepteur dans la maladie d'Alzheimer.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fiske, C. H. & Subbarow, Y. Phosphorus compounds of muscle and liver. *Science (80-)*. **70**, 381–382 (1929).
2. Kresge, N., Simoni, R. D. & Hill, R. L. Fritz Lipmann and the Discovery of Coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **280**, 164–166 (2005).
3. Drury, A. N. & Szent-Györgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **68**, 213–37 (1929).
4. Gaddum, J. H. & Holtz, P. The localization of the action of drugs on the pulmonary vessels of dogs and cats. *J. Physiol.* **77**, 139–158 (1933).
5. Gillespie, J. H. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J. Physiol.* **80**, 345–359 (1934).
6. EMMELIN, N. & FELDBERG, W. Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **3**, 273–284 (1948).
7. Holton, F. A. & Holton, P. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J. Physiol.* **126**, 124–140 (1954).
8. Holton, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol.* **145**, 494–504 (1959).
9. Burnstock G, Campbell G, Bennett M, H. M. Inhibition of the smooth muscle of the Taeni Coli. *Nature* **200**, 581–582 (1963).
10. Burnstock, G., Campbell, G., Bennett, M. & Holman, M. E. Innervation of the guinea-pig taenia coli: Are there intrinsic inhibitory nerves which are distinct from sympathetic nerves? *Int. J. Neuropharmacol.* **3**, 163–166 (1964).
11. Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. & Smythe, A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmac* **40**, 668–688 (1970).
12. Knight, G. E. Purinergic Receptors. in *Encyclopedia of Neuroscience* **62**, 1245–1252 (Elsevier, 2009).
13. Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhatsky, A. & North, R. A. Quantal Release of ATP in Mouse Cortex. *J. Gen. Physiol.* **129**, 257–265 (2007).

BIBLIOGRAPHIE

14. Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A. & North, R. A. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **452**, 589–597 (2006).
15. Burnstock, G. & Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoreceptor. *Gen. Pharmacol.* **16**, (1985).
16. Webb, T. E. *et al.* Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* **324**, 219–225 (1993).
17. Valera, S. *et al.* A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* **371**, 516–519 (1994).
18. Lustig, K. D., Shiau, A. K., Brake, A. J. & Julius, D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5113–5117 (1993).
19. Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F. & Varani, K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol. Rev.* **98**, 1591–1625 (2018).
20. Cunha, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 107–125 (2001).
21. Stenberg, D. *et al.* Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor. *J. Sleep Res.* **12**, 283–290 (2003).
22. Sawynok, J. Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience* **338**, 1–18 (2016).
23. Boison, D. Adenosine and Epilepsy: From Therapeutic Rationale to New Therapeutic Strategies. *Neurosci.* **11**, 25–36 (2005).
24. LeWitt, P. A. *et al.* Adenosine A_{2A} receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces “off” time in Parkinson’s disease: A double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005). *Ann. Neurol.* **63**, 295–302 (2008).
25. Abbracchio, M. P. & BURNSTOCK, G. *Purinoreceptors: are there families of p2x and p2y purinoreceptors?* **64**, (1994).
26. Chang, K., Hanaoka, K., Kumada, M. & Takuwa, Y. *Molecular Cloning and Functional Analysis of a Novel P₂ Nucleotide Receptor** Downloaded from. *The Journal of biological chemistry* **270**, (1995).
27. Nguyen, T. *et al.* Cloning, Expression, and Chromosomal Localization of the Human

- Uridine Nucleotide Receptor Gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 30845–30848 (1995).
28. Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M. & Boeynaems, J.-M. Cloning of a Human Purinergic P2Y Receptor Coupled to Phospholipase C and Adenylyl Cyclase. *J. Biol. Chem.* **272**, 31969–31973 (1997).
 29. Hollopeter, G. *et al.* Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**, 202–207 (2001).
 30. Chambers, J. K. *et al.* A G Protein-coupled Receptor for UDP-glucose*. (2000).
 31. Communi, D. *et al.* Identification of a Novel Human ADP Receptor Coupled to Gi. **276**, 41479–41485 (2001).
 32. Zhang, K. *et al.* Structure of the human P2Y₁₂ receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature* **509**, 115–118 (2014).
 33. Zhang, D. *et al.* Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y₁ receptor. *Nature* **520**, 317–321 (2015).
 34. Jiang, Q. *et al.* A Mutational Analysis of Residues Essential for Ligand Recognition at the Human P2Y₁ Receptor. *Mol. Pharmacol.* **52**, 499–507 (1997).
 35. Abbracchio, M. P. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol. Rev.* **58**, 281–341 (2006).
 36. Hechler, B. & Gachet, C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal.* **7**, 293–303 (2011).
 37. Sperlágh, B., Heinrich, A. & Csölle, C. P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release—an update. *Purinergic Signal.* **3**, 269–284 (2007).
 38. Guzman, S. J. & Gerevich, Z. P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. *Neural Plast.* **2016**, 1207393 (2016).
 39. Franke, H. *et al.* P2Y receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* **127**, 431–441 (2004).
 40. Fujita, T., Tozaki-Saitoh, H. & Inoue, K. P2Y₁ receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia* **57**, 244–257 (2009).
 41. Fountain, S. J., Cao, L., Young, M. T. & North, R. A. Permeation Properties of a P2X

BIBLIOGRAPHIE

- Receptor in the Green Algae *Ostreococcus tauri*. *J. Biol. Chem.* **283**, 15122–15126 (2008).
42. North, R. A. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol. Rev.* **82**, 1013–1067 (2002).
43. Brake, A. J., Wagenbach, M. J. & Julius, D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 519–523 (1994).
44. Ennion, S. J. & Evans, R. J. Conserved Cysteine Residues in the Extracellular Loop of the Human P2X 1 Receptor Form Disulfide Bonds and Are Involved in Receptor Trafficking to the Cell Surface. **61**, 303–311 (2002).
45. Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T. & Gouaux, E. Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature* **460**, 592–598 (2009).
46. Hattori, M. & Gouaux, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**, 207–212 (2012).
47. Mansoor, S. E. *et al.* X-ray structures define human P2X3 receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* **538**, 66–71 (2016).
48. Rettinger, J., Aschrafi, A. & Schmalzing, G. Roles of Individual N -Glycans for ATP Potency and Expression of the Rat P2X 1 Receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 33542–33547 (2000).
49. Newbolt, A. *et al.* Membrane Topology of an ATP-gated Ion Channel (P2X Receptor). *J. Biol. Chem.* **273**, 15177–15182 (1998).
50. Torres, G. E., Egan, T. M. & Voigt, M. M. N-Linked Glycosylation Is Essential for the Functional Expression of the Recombinant P2X 2 Receptor. *Biochemistry* **37**, 14845–14851 (1998).
51. Vacca, F. *et al.* N-Glycans mutations rule oligomeric assembly and functional expression of P2X3 receptor for extracellular ATP. *Glycobiology* **21**, 634–643 (2011).
52. Lenertz, L. Y. *et al.* Mutation of Putative N-Linked Glycosylation Sites on the Human Nucleotide Receptor P2X 7 Reveals a Key Residue Important for Receptor Function. *Biochemistry* **49**, 4611–4619 (2010).
53. Clarke, C. E., Benham, C. D., Bridges, A., George, A. R. & Meadows, H. J. Mutation of histidine 286 of the human P2X 4 purinoceptor removes extracellular pH sensitivity.

- J. Physiol.* **523**, 697–703 (2000).
54. Boué -Grabot, E., Archambault, V. & Sé Gué La, P. A Protein Kinase C Site Highly Conserved in P2X Subunits Controls the Desensitization Kinetics of P2X 2 ATP-gated Channels. *J. Biol. Chem.* **275**, 10190–10195 (2000).
 55. Ennion, S. J. & Evans, R. J. P2X1 Receptor Subunit Contribution to Gating Revealed by a Dominant Negative PKC Mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 611–616 (2002).
 56. Franklin, C., Braam, U., Eisele, T., Schmalzing, G. & Hausmann, R. Lack of evidence for direct phosphorylation of recombinantly expressed P2X2 and P2X3 receptors by protein kinase C. *Purinergic Signal.* **3**, 377–388 (2007).
 57. Kim, M. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.* **20**, 6347–6358 (2001).
 58. Brown, D. A. & Yule, D. I. Protein kinase A regulation of P2X4 receptors: Requirement for a specific motif in the C-terminus. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1803**, 275–287 (2010).
 59. Wirkner, K. Regulation of Human Recombinant P2X3 Receptors by Ecto-Protein Kinase C. *J. Neurosci.* **25**, 7734–7742 (2005).
 60. Stanchev, D. *et al.* Decrease of current responses at human recombinant P2X3 receptors after substitution by Asp of Ser/Thr residues in protein kinase C phosphorylation sites of their ecto-domains. *Neurosci. Lett.* **393**, 78–83 (2006).
 61. Bean, B. P. ATP-Activated Channels in Rat and Bullfrog Sensory Neurons: Concentration Dependence and Kinetics. *J. Neurosci.* **10**, 1–10 (1990).
 62. Nicke, A. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* **17**, 3016–3028 (1998).
 63. Barrera, N. P., Ormond, S. J., Henderson, R. M., Murrell-Lagnado, R. D. & Edwardson, J. M. Atomic Force Microscopy Imaging Demonstrates that P2X 2 Receptors Are Trimers but That P2X 6 Receptor Subunits Do Not Oligomerize. *J. Biol. Chem.* **280**, 10759–10765 (2005).
 64. Mio, K., Kubo, Y., Ogura, T., Yamamoto, T. & Sato, C. Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochem. Biophys. Res.*

BIBLIOGRAPHIE

- Commun.* **337**, 998–1005 (2005).
65. Torres, G. E., Egan, T. M. & Voigt, M. M. Hetero-oligomeric Assembly of P2X Receptor Subunits. *J. Biol. Chem.* **274**, 6653–6659 (1999).
 66. Aschrafi, A., Sadtler, S., Niculescu, C., Rettinger, J. & Schmalzing, G. Trimeric Architecture of Homomeric P2X2 and Heteromeric P2X1+2 Receptor Subtypes. *J. Mol. Biol.* **342**, 333–343 (2004).
 67. Lalo, U. *et al.* P2X1 and P2X5 Subunits Form the Functional P2X Receptor in Mouse Cortical Astrocytes. *J. Neurosci.* **28**, 5473–5480 (2008).
 68. Compan, V. *et al.* P2X2 and P2X5 Subunits Define a New Heteromeric Receptor with P2X7-Like Properties. *J. Neurosci.* **32**, 4284–4296 (2012).
 69. Cockayne, D. A. *et al.* P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J. Physiol.* **567**, 621–639 (2005).
 70. Dunn, P. M., Liu, M., Zhong, Y., King, B. F. & Burnstock, G. Diinosine pentaphosphate: an antagonist which discriminates between recombinant P2X 3 and P2X 2/3 receptors and between two P2X receptors in rat sensory neurones. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1378–1384 (2000).
 71. Calvert, J. A. Heterogeneity of P2X Receptors in Sympathetic Neurons: Contribution of Neuronal P2X1 Receptors Revealed Using Knockout Mice. *Mol. Pharmacol.* **65**, 139–148 (2004).
 72. Kennedy, C., Tasker, P. N., Gallacher, G. & Westfall, T. D. Identification of Atropine- and P2X1 Receptor Antagonist-Resistant, Neurogenic Contractions of the Urinary Bladder. *J. Neurosci.* **27**, 845–851 (2007).
 73. Resende, R. R., Britto, L. R. G. & Ulrich, H. Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* **26**, 763–777 (2008).
 74. Antonio, L. S., Stewart, A. P., Varanda, W. A. & Edwardson, J. M. Identification of P2X2/P2X4/P2X6 heterotrimeric receptors using atomic force microscopy (AFM) imaging. *FEBS Lett.* **588**, 2125–2128 (2014).
 75. Guo, C., Masin, M., Qureshi, O. S. & Murrell-Lagnado, R. D. Evidence for Functional

- P2X4/P2X7 Heteromeric Receptors. *Mol. Pharmacol.* **72**, 1447–1456 (2007).
76. Nicke, A. Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 803–808 (2008).
77. Boumechache, M., Masin, M., Edwardson, J. M., Górecki, D. C. & Murrell-Lagnado, R. Analysis of Assembly and Trafficking of Native P2X4 and P2X7 Receptor Complexes in Rodent Immune Cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 13446–13454 (2009).
78. Antonio, L. S. *et al.* P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1069–1077 (2011).
79. Ding, S. & Sachs, F. Evidence for non-independent gating of P2X2 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *BMC Neurosci.* (2002). doi:10.1186/1471-2202-3-17
80. Clyne, J. D., Brown, T. C. & Hume, R. I. Expression level dependent changes in the properties of P2X2 receptors. *Neuropharmacology* **44**, 403–412 (2003).
81. Fujiwara, Y. & Kubo, Y. Density-dependent changes of the pore properties of the P2X2 receptor channel. *J. Physiol.* **558**, 31–43 (2004).
82. Schneider, M. *et al.* Interaction of Purinergic P2X4 and P2X7 Receptor Subunits. *Front. Pharmacol.* **8**, 1–14 (2017).
83. Toulme, E. *et al.* P2X4 receptors in activated C8-B4 cells of cerebellar microglial origin. *J. Gen. Physiol.* **135**, 333–353 (2010).
84. Toulme, E. Functional Properties of Internalization-Deficient P2X4 Receptors Reveal a Novel Mechanism of Ligand-Gated Channel Facilitation by Ivermectin. *Mol. Pharmacol.* **69**, 576–587 (2005).
85. Chaumont, S., Jiang, L.-H., Penna, A., North, R. A. & Rassendren, F. Identification of a Trafficking Motif Involved in the Stabilization and Polarization of P2X Receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 29628–29638 (2004).
86. Ennion, S. J. & Evans, R. J. Agonist-stimulated internalisation of the ligand-gated ion channel P2X1 in rat vas deferens. *FEBS Lett.* **489**, 154–158 (2001).
87. Vacca, F., Giustizieri, M., Ciotti, M. T., Mercuri, N. B. & Volonté, C. Rapid constitutive and ligand-activated endocytic trafficking of P2X3 receptor. *J. Neurochem.* **109**, 1031–1041 (2009).
88. Ennion, S., Hagan, S. & Evans, R. J. The Role of Positively Charged Amino Acids in

BIBLIOGRAPHIE

- ATP Recognition by Human P2X 1 Receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 29361–29367 (2000).
89. Jiang, L.-H., Rassendren, F., Surprenant, A. & North, R. A. Identification of Amino Acid Residues Contributing to the ATP-binding Site of a Purinergic P2X Receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 34190–34196 (2000).
90. Roberts, J. A. & Evans, R. J. ATP Binding at Human P2X 1 Receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 9043–9055 (2004).
91. Roberts, J. A. & Evans, R. J. Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP. *J. Neurochem.* **96**, 843–852 (2006).
92. Roberts, J. A. *et al.* Cysteine Substitution Mutagenesis and the Effects of Methanethiosulfonate Reagents at P2X 2 and P2X 4 Receptors Support a Core Common Mode of ATP Action at P2X Receptors. *J. Biol. Chem.* **283**, 20126–20136 (2008).
93. Zemkova, H. *et al.* Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X 4 receptor functions. *J. Neurochem.* **102**, 1139–1150 (2007).
94. Wilkinson, W. J., Jiang, L.-H., Surprenant, A. & North, R. A. Role of Ectodomain Lysines in the Subunits of the Heteromeric P2X2/3 Receptor. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1159–1163 (2006).
95. Marquez-Klaka, B., Rettinger, J., Bhargava, Y., Eisele, T. & Nicke, A. Identification of an Intersubunit Cross-Link between Substituted Cysteine Residues Located in the Putative ATP Binding Site of the P2X1 Receptor. *J. Neurosci.* **27**, 1456–1466 (2007).
96. Bo, X. *et al.* Pharmacological and Biophysical Properties of the Human P2X5 Receptor. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1407–1416 (2003).
97. Egan, T. M. & Khakh, B. S. Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. *J. Neurosci.* **24**, 3413–3420 (2004).
98. Khakh, B. S. & North, R. A. Neuromodulation by Extracellular ATP and P2X Receptors in the CNS. *Neuron* **76**, 51–69 (2012).
99. Migita, K., Haines, W. R., Voigt, M. M. & Egan, T. M. Polar Residues of the Second Transmembrane Domain Influence Cation Permeability of the ATP-gated P2X 2

- Receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 30934–30941 (2001).
100. Samways, D. S. K. & Egan, T. M. Acidic Amino Acids Impart Enhanced Ca²⁺ Permeability and Flux in Two Members of the ATP-gated P2X Receptor Family. *J. Gen. Physiol.* **129**, 245–256 (2007).
 101. Werner, P., Seward, E. P., Buell, G. N. & North, R. A. Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 15485–15490 (1996).
 102. Wei, L., Caseley, E., Li, D. & Jiang, L.-H. ATP-induced P2X Receptor-Dependent Large Pore Formation: How Much Do We Know? *Front. Pharmacol.* **7**, (2016).
 103. Peverini, L., Beudez, J., Dunning, K., Chataigneau, T. & Grutter, T. New Insights Into Permeation of Large Cations Through ATP-Gated P2X Receptors. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 265 (2018).
 104. Li, M., Toombes, G. E. S., Silberberg, S. D. & Swartz, K. J. Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* **18**, 1577–1583 (2015).
 105. Boué-Grabot, É., Toulmé, E., Émerit, M. B. & Garret, M. Subunit-specific Coupling between γ -Aminobutyric Acid Type A and P2X₂ Receptor Channels. *J. Biol. Chem.* **279**, 52517–52525 (2004).
 106. Jo, Y.-H. *et al.* Cross-talk between P2X₄ and γ -Aminobutyric Acid, Type A Receptors Determines Synaptic Efficacy at a Central Synapse. *J. Biol. Chem.* **286**, 19993–20004 (2011).
 107. Rodrigues, R. J., Almeida, T., De Mendonça, A. & Cunha, R. A. Interaction Between P2X and Nicotinic Acetylcholine Receptors in Glutamate Nerve Terminals of the Rat Hippocampus. *J. Mol. Neurosci.* **30**, 172–176 (2006).
 108. Birdsong, W. T. *et al.* Sensing Muscle Ischemia: Coincident Detection of Acid and ATP via Interplay of Two Ion Channels. *Neuron* **68**, 739–749 (2010).
 109. Pelegrin, P. & Surprenant, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *EMBO J.* **25**, 5071–5082 (2006).
 110. Kaczmarek-Hájek, K., Lőrinczi, É., Hausmann, R. & Nicke, A. Molecular and functional properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges.

BIBLIOGRAPHIE

- Purinergic Signal.* **8**, 375–417 (2012).
111. Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P. & Stojilkovic, S. S. Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels. *Pharmacol. Rev.* **63**, 641–683 (2011).
 112. Karasawa, A. & Kawate, T. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *Elife* **5**, (2016).
 113. Wang, J. *et al.* Druggable negative allosteric site of P2X3 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 4939–4944 (2018).
 114. Coddou, C., Stojilkovic, S. S. & Huidobro-Toro, J. P. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev. Neurosci.* **22**, 335–354 (2011).
 115. Burnstock, G. & Verkhratsky, A. *Purinergic Signalling and the Nervous System.* (Springer Berlin Heidelberg, 2012). doi:10.1007/978-3-642-28863-0
 116. Lê, K.-T. *et al.* Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience* **83**, 177–190 (1998).
 117. Rubio, M. E. & Soto, F. Distinct Localization of P2X Receptors at Excitatory Postsynaptic Specializations. *J. Neurosci.* **21**, 641–653 (2001).
 118. Khakh, B. S. & Henderson, G. ATP Receptor-Mediated Enhancement of Fast Excitatory Neurotransmitter Release in the Brain. *Mol. Pharmacol.* **54**, 372–378 (1998).
 119. Khakh, B. S., Gittermann, D., Cockayne, D. A. & Jones, A. ATP Modulation of Excitatory Synapses onto Interneurons. *J. Neurosci.* **23**, 7426–7437 (2003).
 120. Donato, R. *et al.* GABA release by basket cells onto Purkinje cells, in rat cerebellar slices, is directly controlled by presynaptic purinergic receptors, modulating Ca²⁺ influx. *Cell Calcium* **44**, 521–532 (2008).
 121. Pankratov, Y., Castro, E., Miras-Portugal, M. T. & Krishtal, O. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 3898–3902 (1998).
 122. Mori, M., Heuss, C., Gähwiler, B. H. & Gerber, U. Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J.*

- Physiol.* **535**, 115–123 (2001).
123. Palygin, O., Lalo, U., Verkhratsky, A. & Pankratov, Y. Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium* **48**, 225–231 (2010).
 124. Gordon, G. R. J. *et al.* Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat. Neurosci.* **8**, 1078–1086 (2005).
 125. Pougnet, J.-T. T. *et al.* ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron* **83**, 417–430 (2014).
 126. Pougnet, J.-T. *et al.* P2X-mediated AMPA receptor internalization and synaptic depression is controlled by two CaMKII phosphorylation sites on GluA1 in hippocampal neurons. *Sci. Rep.* **6**, 31836 (2016).
 127. Pankratov, Y. V, Lalo, U. V & Krishtal, O. A. Role for P2X Receptors in Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* **22**, 8363–8369 (2002).
 128. Lalo, U., Palygin, O., Verkhratsky, A., Grant, S. G. N. & Pankratov, Y. ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex. *Sci. Rep.* **6**, 33609 (2016).
 129. Sim, J. A. *et al.* Altered Hippocampal Synaptic Potentiation in P2X4 Knock-Out Mice. *J. Neurosci.* **26**, 9006–9009 (2006).
 130. Baxter, A. W., Choi, S. J., Sim, J. A. & North, R. A. Role of P2X4 receptors in synaptic strengthening in mouse CA1 hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **34**, 213–220 (2011).
 131. Boué-Grabot, É., Émerit, M. B., Toulmé, E., Séguéla, P. & Garret, M. Cross-talk and Co-trafficking between ρ 1/GABA Receptors and ATP-gated Channels. *J. Biol. Chem.* **279**, 6967–6975 (2004).
 132. Lalo, U. *et al.* Exocytosis of ATP From Astrocytes Modulates Phasic and Tonic Inhibition in the Neocortex. *PLoS Biol.* **12**, e1001747 (2014).
 133. Verkhratsky, A., Pankratov, Y., Lalo, U. & Nedergaard, M. P2X receptors in neuroglia. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **1**, 151–161 (2012).
 134. Ballerini, P. *et al.* Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport* **7**, 2533–2538 (1996).

BIBLIOGRAPHIE

135. Calovi, S., Mut-Arbona, P. & Sperlágh, B. Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience* **405**, 137–147 (2019).
136. McLarnon, J. G., Ryu, J. K., Walker, D. G. & Choi, H. B. Upregulated Expression of Purinergic P2X₇ Receptor in Alzheimer Disease and Amyloid- β Peptide-Treated Microglia and in Peptide-Injected Rat Hippocampus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 1090–1097 (2006).
137. Jiang, K. *et al.* Effects of riluzole on P2X₇R expression in the spinal cord in rat model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* **618**, 127–133 (2016).
138. Hamilton, S. G., Warburton, J., Bhattacharjee, A., Ward, J. & McMahon, S. B. ATP in human skin elicits a dose-related pain response which is potentiated under conditions of hyperalgesia. *Brain* **123**, 1238–1246 (2000).
139. Lewis, C. *et al.* Coexpression of P2X₂ and P2^U receptor subunits can account for AIP-gated currents in sensory neurons. *Nature* **377**, (1995).
140. Chen, C.-C. *et al.* A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* **377**, 428–431 (1995).
141. Souslova, V. *et al.* Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X₃ receptors. *Nature* **407**, 1015–1017 (2000).
142. Honore, P. *et al.* Analgesic profile of intrathecal P2X₃ antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. *Pain* (2002).
143. Jarvis, M. F. *et al.* A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X₃ and P2X_{2/3} receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 17179–17184 (2002).
144. Tsuda, M. *et al.* Behavioral Phenotypes of Mice Lacking Purinergic P2X₄ Receptors in Acute and Chronic Pain Assays. *Mol. Pain* **5**, 1744-8069-5–28 (2009).
145. Tsuda, M. *et al.* P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424**, 778–783 (2003).
146. Ulmann, L. *et al.* Up-Regulation of P2X₄ Receptors in Spinal Microglia after Peripheral Nerve Injury Mediates BDNF Release and Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* **28**, 11263–11268 (2008).
147. Coull, J. A. M. *et al.* BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient

- underlying neuropathic pain. *Nature* **438**, 1017–1021 (2005).
148. Ulmann, L., Hirbec, H. & Rassendren, F. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J.* **29**, 2290–2300 (2010).
 149. Lalisse, S. *et al.* Sensory neuronal P2RX4 receptors controls BDNF signaling in inflammatory pain. *Sci. Rep.* **8**, 964 (2018).
 150. Chessell, I. P. *et al.* Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* **114**, 386–396 (2005).
 151. Kobayashi, K., Takahashi, E., Miyagawa, Y., Yamanaka, H. & Noguchi, K. Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model. *Neurosci. Lett.* **504**, 57–61 (2011).
 152. He, W.-J. *et al.* Spinal P2X7 receptor mediates microglia activation-induced neuropathic pain in the sciatic nerve injury rat model. *Behav. Brain Res.* **226**, 163–170 (2012).
 153. HONORE, P. *et al.* Interleukin-1 $\alpha\beta$ gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav. Brain Res.* **167**, 355–364 (2006).
 154. Rassendren, F. & Audinat, E. Purinergic signaling in epilepsy. *J. Neurosci. Res.* **94**, 781–793 (2016).
 155. Engel, T. *et al.* Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB J.* **26**, 1616–1628 (2012).
 156. Jimenez-Pacheco, A. *et al.* Increased neocortical expression of the P2X7 receptor after status epilepticus and anticonvulsant effect of P2X7 receptor antagonist A-438079. *Epilepsia* **54**, 1551–1561 (2013).
 157. Marchi, N., Granata, T. & Janigro, D. Inflammatory pathways of seizure disorders. *Trends Neurosci.* **37**, 55–65 (2014).
 158. Kim, J.-E. & Kang, T.-C. The P2X7 receptor–pannexin-1 complex decreases muscarinic acetylcholine receptor–mediated seizure susceptibility in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 2037–2047 (2011).
 159. Kim, J.-E., Ryu, H. J. & Kang, T.-C. P2X7 receptor activation ameliorates CA3

BIBLIOGRAPHIE

- neuronal damage via a tumor necrosis factor- α -mediated pathway in the rat hippocampus following status epilepticus. *J. Neuroinflammation* **8**, 62 (2011).
160. Doná, F. *et al.* Alteration of purinergic P2X4 and P2X7 receptor expression in rats with temporal-lobe epilepsy induced by pilocarpine. *Epilepsy Res.* **83**, 157–167 (2009).
161. Avignone, E., Ulmann, L., Levavasseur, F., Rassendren, F. & Audinat, E. Status Epilepticus Induces a Particular Microglial Activation State Characterized by Enhanced Purinergic Signaling. *J. Neurosci.* **28**, 9133–9144 (2008).
162. Ulmann, L. *et al.* Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia* **61**, 1306–1319 (2013).
163. Igawa, T., Abe, Y., Tsuda, M., Inoue, K. & Ueda, T. Solution structure of the rat P2X4 receptor head domain involved in inhibitory metal binding. *FEBS Lett.* **589**, 680–686 (2015).
164. Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F., North, R. A. & Surprenant, A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature* **2**, 315–321 (1999).
165. Khakh, B. S., Bao, X. R., Labarca, C. & Lester, H. A. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nature* **2**, 322–330 (1999).
166. Shinozaki, Y. *et al.* Direct Observation of ATP-Induced Conformational Changes in Single P2X4 Receptors. *PLoS Biol.* **7**, e1000103 (2009).
167. Bobanovic, L. K., Royle, S. J. & Murrell-Lagnado, R. D. P2X Receptor Trafficking in Neurons Is Subunit Specific. *J. Neurosci.* **22**, 4814–4824 (2002).
168. Qureshi, O. S., Paramasivam, A., Yu, J. C. H. & Murrell-Lagnado, R. D. Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J. Cell Sci.* **120**, 3838–3849 (2007).
169. Royle, S. J., Bobanović, L. K. & Murrell-Lagnado, R. D. Identification of a Non-canonical Tyrosine-based Endocytic Motif in an Ionotropic Receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 35378–35385 (2002).
170. Fois, G. *et al.* P2X4 receptor re-sensitization depends on a protonation/deprotonation cycle mediated by receptor internalization and recycling. *J. Physiol.* **596**, 4893–4907 (2018).

171. Huang, P. *et al.* P2X4 Forms Functional ATP-activated Cation Channels on Lysosomal Membranes Regulated by Luminal pH. *J. Biol. Chem.* **289**, 17658–17667 (2014).
172. Cao, Q. *et al.* Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion. *J. Cell Biol.* **209**, 879–894 (2015).
173. Nicke, A., Kerschensteiner, D. & Soto, F. Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *J. Neurochem.* **92**, 925–933 (2005).
174. Lê, K.-T., Babinski, K. & Séguéla, P. Central P2X4 and P2X6 Channel Subunits Coassemble into a Novel Heteromeric ATP Receptor. *J. Neurosci.* **18**, 7151–7159 (1998).
175. Collo, G. *et al.* Cloning of P2X5 and P2X6 Receptors and the Distribution and Properties of an Extended Family of ATP-Gated Ion Channels. *J. Neurosci.* **76**, 2495–2507 (1996).
176. Jones, C. A. *et al.* Functional characterization of the P2X4 receptor orthologues. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 338–394 (2000).
177. Bianchi, B. R. *et al.* Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* **376**, 199–212 (1999).
178. Miller, K. J., Michel, A. D., Chessell, I. P. & Humphrey, P. P. A. Cibacron blue allosterically modulates the rat P2X4 receptor. *Neuropharmacology* **37**, 1579–1586 (1998).
179. Khakh, B. S., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V, Labarca, C. & Lester, H. A. Allosteric Control of Gating and Kinetics at P2X4 Receptor Channels. *J. Neurosci.* **19**, 7289–7299 (1999).
180. Nörenberg, W. *et al.* Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 48–66 (2012).
181. Jelínková, I. *et al.* Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**, 619–625 (2006).
182. Silberberg, S. D., Li, M. & Swartz, K. J. Ivermectin Interaction with Transmembrane Helices Reveals Widespread Rearrangements during Opening of P2X Receptor Channels. *Neuron* **54**, 263–274 (2007).

BIBLIOGRAPHIE

183. Habermacher, C., Dunning, K., Chataigneau, T. & Grutter, T. Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology* **104**, 18–30 (2016).
184. Priel, A. & Silberberg, S. D. Mechanism of Ivermectin Facilitation of Human P2X4 Receptor Channels. *J. Gen. Physiol.* **123**, 281–293 (2004).
185. Balázs, B. *et al.* Investigation of the Inhibitory Effects of the Benzodiazepine Derivative, 5-BDBD on P2X 4 Purinergic Receptors by two Complementary Methods. *Cell. Physiol. Biochem.* **32**, 11–24 (2013).
186. Coddou, C., Sandoval, R., Hevia, M. J. & Stojilkovic, S. S. Characterization of the antagonist actions of 5-BDBD at the rat P2X4 receptor. *Neurosci. Lett.* **690**, 219–224 (2019).
187. Yamamoto, K. *et al.* Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat. Med.* **12**, 133–137 (2006).
188. Brône, B., Moechars, D., Marrannes, R., Mercken, M. & Meert, T. P2X currents in peritoneal macrophages of wild type and P2X4^{-/-} mice. *Immunol. Lett.* **113**, 83–89 (2007).
189. Verma, R. *et al.* Deletion of the P2X4 receptor is neuroprotective acutely, but induces a depressive phenotype during recovery from ischemic stroke. *Brain. Behav. Immun.* **66**, 302–312 (2017).
190. Ozaki, T. *et al.* The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning. *Sci. Rep.* **6**, 25893 (2016).
191. Sierra, A. *et al.* The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* **64**, 1801–1840 (2016).
192. Greter, M. & Merad, M. Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia* **61**, 121–127 (2013).
193. Alliot, F., Godin, I. & Pessac, B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev. Brain Res.* **117**, 145–152 (1999).
194. Ginhoux, F. *et al.* Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science (80-.)*. **330**, 841–845 (2010).
195. Ginhoux, F. & Prinz, M. Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a020537 (2015).

196. Huang, Y. *et al.* Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. *Nat. Neurosci.* (2018). doi:10.1038/s41593-018-0090-8
197. Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F. M. V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* **10**, 1538–1543 (2007).
198. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science (80-.)*. **308**, 1314–1318 (2005).
199. Paolicelli, R. C. *et al.* Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science (80-.)*. **333**, 1456–1458 (2011).
200. Schafer, D. P. *et al.* Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* **74**, 691–705 (2012).
201. Madry, C. *et al.* Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1 β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K⁺ Channel THIK-1. *Neuron* **97**, 299-312.e6 (2018).
202. Deczkowska, A. *et al.* Mef2C restrains microglial inflammatory response and is lost in brain ageing in an IFN-I-dependent manner. *Nat. Commun.* **8**, 717 (2017).
203. Buttgereit, A. *et al.* Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. *Nat. Immunol.* **17**, 1397–1406 (2016).
204. Tremblay, M.-E. *et al.* The Role of Microglia in the Healthy Brain. *J. Neurosci.* **31**, 16064–16069 (2011).
205. Tremblay, M.-È., Lowery, R. L. & Majewska, A. K. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biol.* **8**, e1000527 (2010).
206. Miyamoto, A. *et al.* Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat. Commun.* **7**, 12540 (2016).
207. Kano, M. & Hashimoto, K. Synapse elimination in the central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19**, 154–161 (2009).
208. Rogers, J. T. *et al.* CX3CR1 Deficiency Leads to Impairment of Hippocampal Cognitive Function and Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* **31**, 16241–16250 (2011).

BIBLIOGRAPHIE

209. Parkhurst, C. N. *et al.* Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* **155**, 1596–1609 (2013).
210. Nakamura, Y. Regulating Factors for Microglial Activation. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 945–953 (2002).
211. Biber, K., Neumann, H., Inoue, K. & Boddeke, H. W. G. M. Neuronal ‘On’ and ‘Off’ signals control microglia. *Trends Neurosci.* **30**, 596–602 (2007).
212. Walker, F. R. *et al.* Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain. Behav. Immun.* **37**, 1–14 (2014).
213. Orihuela, R., McPherson, C. A. & Harry, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 649–665 (2016).
214. De Biase, L. M. *et al.* Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia. *Neuron* **95**, 341-356.e6 (2017).
215. Grabert, K. *et al.* Microglial brain region–dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat. Neurosci.* **19**, 504–516 (2016).
216. Keren-Shaul, H. *et al.* A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer’s Disease. *Cell* **169**, 1276-1290.e17 (2017).
217. Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M. & Verkhratsky, A. Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* **91**, 461–553 (2011).
218. Fan, Y., Xie, L. & Chung, C. Y. Signaling Pathways Controlling Microglia Chemotaxis. *Mol. Cells* **40**, 163 (2017).
219. Galloway, D. A., Phillips, A. E. M., Owen, D. R. J. & Moore, C. S. Phagocytosis in the Brain: Homeostasis and Disease. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
220. Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J. J. & Tang, Y. Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases. *Mol. Neurobiol.* **49**, 1422–1434 (2014).
221. Brown, G. C. & Neher, J. J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 209–216 (2014).
222. Colonna, M. & Butovsky, O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 441–468 (2017).
223. Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E. & Godbout, J. P.

- Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia* **64**, 300–316 (2016).
224. Block, M. L., Zecca, L. & Hong, J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 57–69 (2007).
225. Subhramanyam, C. S., Wang, C., Hu, Q. & Dheen, S. T. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2019). doi:10.1016/j.semcdb.2019.05.004
226. Butovsky, O. *et al.* Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.* **17**, 131–143 (2014).
227. Chiu, I. M. *et al.* A Neurodegeneration-Specific Gene-Expression Signature of Acutely Isolated Microglia from an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Cell Rep.* **4**, 385–401 (2013).
228. Gautier, E. L. *et al.* Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* **13**, 1118–1128 (2012).
229. Krasemann, S. *et al.* The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* **47**, 566-581.e9 (2017).
230. Haynes, S. E. *et al.* The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* **9**, 1512–1519 (2006).
231. Streit, W. J., Sammons, N. W., Kuhns, A. J. & Sparks, D. L. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* **45**, 208–212 (2004).
232. Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A. C., McEwen, B. S. & Bulloch, K. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* **55**, 412–424 (2007).
233. Maher, F. ., Martin, D. S. . & Lynch, M. . Increased IL-1 β in cortex of aged rats is accompanied by downregulation of ERK and PI-3 kinase. *Neurobiol. Aging* **25**, 795–806 (2004).
234. Ye, S.-M. & Johnson, R. W. An Age-Related Decline in Interleukin-10 May

BIBLIOGRAPHIE

- Contribute to the Increased Expression of Interleukin-6 in Brain of Aged Mice. *Neuroimmunomodulation* **9**, 183–192 (2001).
235. Nolan, Y. *et al.* Role of Interleukin-4 in Regulation of Age-related Inflammatory Changes in the Hippocampus. *J. Biol. Chem.* **280**, 9354–9362 (2005).
236. Holtman, I. R. *et al.* Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathol. Commun.* **3**, 31 (2015).
237. Norden, D. M. & Godbout, J. P. Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **39**, 19–34 (2013).
238. Ouchi, Y. *et al.* Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **57**, 168–175 (2005).
239. Theodore, S., Cao, S., McLean, P. J. & Standaert, D. G. Targeted Overexpression of Human α -Synuclein Triggers Microglial Activation and an Adaptive Immune Response in a Mouse Model of Parkinson Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **67**, 1149–1158 (2008).
240. Brettschneider, J. *et al.* Microglial Activation Correlates with Disease Progression and Upper Motor Neuron Clinical Symptoms in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* **7**, e39216 (2012).
241. Frakes, A. E. *et al.* Microglia Induce Motor Neuron Death via the Classical NF- κ B Pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron* **81**, 1009–1023 (2014).
242. Zhao, W. *et al.* Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* **58**, 231–243 (2010).
243. Meissner, F., Molawi, K. & Zychlinsky, A. Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1 accelerates ALS pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 13046–13050 (2010).
244. Ouchi, Y., Yagi, S., Yokokura, M. & Sakamoto, M. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **15**, S200–S204 (2009).
245. McCoy, M. K. *et al.* Intranigral Lentiviral Delivery of Dominant-negative TNF Attenuates Neurodegeneration and Behavioral Deficits in Hemiparkinsonian rats. *Mol. Ther.* **16**, 1572–1579 (2008).
246. McCoy, M. K. Blocking Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling with Dominant-

- Negative Tumor Necrosis Factor Inhibitor Attenuates Loss of Dopaminergic Neurons in Models of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* **26**, 9365–9375 (2006).
247. Van Den Bosch, L., Tilkin, P., Lemmens, G. & Robberecht, W. Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS. *Neuroreport* **13**, 1067–1070 (2002).
248. Davalos, D. *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* **8**, 752–758 (2005).
249. Neher, J. J., Neniskyte, U., Hornik, T. & Brown, G. C. Inhibition of UDP/P2Y₆ purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia in vitro and in vivo. *Glia* **62**, 1463–1475 (2014).
250. Koizumi, S. *et al.* UDP acting at P2Y₆ receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* **446**, 1091–1095 (2007).
251. Xu, Y. *et al.* P2Y₆ Receptor-Mediated Microglial Phagocytosis in Radiation-Induced Brain Injury. *Mol. Neurobiol.* **53**, 3552–3564 (2016).
252. Wendt, S. *et al.* Changes in phagocytosis and potassium channel activity in microglia of 5xFAD mice indicate alterations in purinergic signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **58**, 41–53 (2017).
253. Kim, B. *et al.* Uridine 5'-Diphosphate Induces Chemokine Expression in Microglia and Astrocytes through Activation of the P2Y₆ Receptor. *J. Immunol.* **186**, 3701–3709 (2011).
254. Morioka, N. *et al.* The activation of P2Y₆ receptor in cultured spinal microglia induces the production of CCL2 through the MAP kinases-NF- κ B pathway. *Neuropharmacology* **75**, 116–125 (2013).
255. Ohsawa, K. *et al.* P2Y₁₂ receptor-mediated integrin- β 1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* **58**, NA-NA (2010).
256. Wu, L.-J., Vadakkan, K. I. & Zhuo, M. ATP-induced chemotaxis of microglial processes requires P2Y receptor-activated initiation of outward potassium currents. *Glia* **55**, 810–821 (2007).
257. Kobayashi, K. *et al.* P2Y₁₂ Receptor Upregulation in Activated Microglia Is a Gateway of p38 Signaling and Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* **28**, 2892–2902 (2008).

BIBLIOGRAPHIE

258. Tozaki-Saitoh, H. *et al.* P2Y₁₂ Receptors in Spinal Microglia Are Required for Neuropathic Pain after Peripheral Nerve Injury. *J. Neurosci.* **28**, 4949–4956 (2008).
259. Liu, P.-W. *et al.* P2Y₁₂ and P2Y₁₃ receptors involved in ADPβs induced the release of IL-1β, IL-6 and TNF-α from cultured dorsal horn microglia. *J. Pain Res.* **Volume 10**, 1755–1767 (2017).
260. Stefani, J. *et al.* Disruption of the Microglial ADP Receptor P2Y₁₃ Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, (2018).
261. Kobayashi, K., Yamanaka, H., Yanamoto, F., Okubo, M. & Noguchi, K. Multiple P2Y subtypes in spinal microglia are involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia* **60**, 1529–1539 (2012).
262. Quintas, C., Vale, N., Gonçalves, J. & Queiroz, G. Microglia P2Y₁₃ Receptors Prevent Astrocyte Proliferation Mediated by P2Y₁ Receptors. *Front. Pharmacol.* **9**, (2018).
263. Lord, B. *et al.* A novel radioligand for the ATP-gated ion channel P2X₇: [3H] JNJ-54232334. *Eur. J. Pharmacol.* **765**, 551–559 (2015).
264. Cisneros-Mejorado, A., Pérez-Samartín, A., Gottlieb, M. & Matute, C. ATP Signaling in Brain: Release, Excitotoxicity and Potential Therapeutic Targets. *Cell. Mol. Neurobiol.* **35**, 1–6 (2015).
265. Choi, H. B., Ryu, J. K., Kim, S. U. & McLarnon, J. G. Modulation of the Purinergic P2X₇ Receptor Attenuates Lipopolysaccharide-Mediated Microglial Activation and Neuronal Damage in Inflamed Brain. *J. Neurosci.* **27**, 4957–4968 (2007).
266. Swanson, K. V, Deng, M. & Ting, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* (2019). doi:10.1038/s41577-019-0165-0
267. Piccini, A. *et al.* ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 8067–8072 (2008).
268. Solle, M. *et al.* Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X₇ Receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 125–132 (2001).
269. Bhattacharya, A. *et al.* Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X₇ receptor antagonist: JNJ-47965567. *Br. J. Pharmacol.* **170**, 624–640 (2013).

270. Bernardino, L. *et al.* Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: a crucial role of P2X₇ receptor-mediated IL-1 β release. *J. Neurochem.* **106**, 271–280 (2008).
271. Bianco, F. *et al.* Astrocyte-Derived ATP Induces Vesicle Shedding and IL-1 β Release from Microglia. *J. Immunol.* **174**, 7268–7277 (2005).
272. Raouf, R., Chabot-Doré, A.-J., Ase, A. R., Blais, D. & Séguéla, P. Differential regulation of microglial P2X₄ and P2X₇ ATP receptors following LPS-induced activation. *Neuropharmacology* **53**, 496–504 (2007).
273. Kimpel, M. W. *et al.* Functional gene expression differences between inbred alcohol-preferring and –non-preferring rats in five brain regions. *Alcohol* **41**, 95–132 (2007).
274. Wyatt, L. R. *et al.* Contribution of P2X₄ Receptors to Ethanol Intake in Male C57BL/6 Mice. *Neurochem. Res.* **39**, 1127–1139 (2014).
275. Tabakoff, B. *et al.* Genetical genomic determinants of alcohol consumption in rats and humans. *BMC Biol.* **7**, 70 (2009).
276. Ostrovskaya, O. *et al.* Ethanol Is a Fast Channel Inhibitor of P2X₄ Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **337**, 171–179 (2011).
277. Asatryan, L. *et al.* Ivermectin Antagonizes Ethanol Inhibition in Purinergic P2X₄ Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **334**, 720–728 (2010).
278. Yardley, M. M. *et al.* Ivermectin reduces alcohol intake and preference in mice. *Neuropharmacology* **63**, 190–201 (2012).
279. Gofman, L., Cenna, J. M. & Potula, R. P2X₄ Receptor Regulates Alcohol-Induced Responses in Microglia. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **9**, 668–678 (2014).
280. Gofman, L., Fernandes, N. C. & Potula, R. Relative Role of Akt, ERK and CREB in Alcohol-Induced Microglia P2X₄R Receptor Expression. *Alcohol Alcohol.* **51**, 647–654 (2016).
281. Trang, T., Beggs, S., Wan, X. & Salter, M. W. P2X₄-Receptor-Mediated Synthesis and Release of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Microglia Is Dependent on Calcium and p38-Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *J. Neurosci.* **29**, 3518–3528 (2009).
282. Liu, C. *et al.* P2X₄-receptor participates in EAAT3 regulation via BDNF-TrkB

BIBLIOGRAPHIE

- signaling in a model of trigeminal allodynia. *Mol. Pain* **14**, 174480691879593 (2018).
283. Vázquez-Villoldo, N. *et al.* P2X4 receptors control the fate and survival of activated microglia. *Glia* **62**, 171–184 (2014).
284. Cheng, R.-D., Ren, J.-J., Zhang, Y.-Y. & Ye, X.-M. P2X4 receptors expressed on microglial cells in post-ischemic inflammation of brain ischemic injury. *Neurochem. Int.* **67**, 9–13 (2014).
285. Sakaki, H. *et al.* P2X4 receptor regulates P2X7 receptor-dependent IL-1 β and IL-18 release in mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 406–411 (2013).
286. Kawano, A. *et al.* Regulation of P2X7-dependent inflammatory functions by P2X4 receptor in mouse macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **420**, 102–107 (2012).
287. de Rivero Vaccari, J. P. *et al.* P2X4 Receptors Influence Inflammasome Activation after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **32**, 3058–3066 (2012).
288. Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H. & Reed Murtagh, F. An english translation of alzheimer's 1907 paper, Uber eine eigenartige erkankung der hirnrinde? *Clin. Anat.* **8**, 429–431 (1995).
289. DeFina, P. A., Moser, R. S., Glenn, M., Lichtenstein, J. D. & Fellus, J. Alzheimer's Disease Clinical and Research Update for Health Care Practitioners. *J. Aging Res.* **2013**, 1–9 (2013).
290. Zvěřová, M. Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clin. Biochem.* (2019). doi:10.1016/j.clinbiochem.2019.04.015
291. Lane, C. A., Hardy, J. & Schott, J. M. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **25**, 59–70 (2018).
292. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. & Hyman, B. T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a006189–a006189 (2011).
293. Ingelsson, M. *et al.* Early A accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* **62**, 925–931 (2004).
294. Gómez-Isla, T. *et al.* Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles

- in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **41**, 17–24 (1997).
295. Gómez-Isla, T. *et al.* Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **16**, 4491–45-- (1996).
296. Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A. & Mufson, E. J. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* **27**, 1372–1384 (2006).
297. Gong, C.-X. & Iqbal, K. Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease. *Curr. Med. Chem.* **15**, 2321–2328 (2008).
298. Eimer, W. A. & Vassar, R. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol. Neurodegener.* **8**, 2 (2013).
299. Dahlgren, K. N. *et al.* Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- β Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *J. Biol. Chem.* **277**, 32046–32053 (2002).
300. Orre, M. *et al.* Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol. Aging* **35**, 2746–2760 (2014).
301. Basu, A., Krady, J. K. & Levison, S. W. Interleukin-1: A master regulator of neuroinflammation. *J. Neurosci. Res.* **78**, 151–156 (2004).
302. Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H. & Xu, H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* **4**, 3 (2011).
303. FINDER, V. H. & GLOCKSHUBER, R. Amyloid- β Aggregation. *Neurodegener. Dis.* **4**, 13–27 (2007).
304. Lesné, S. *et al.* A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352–357 (2006).
305. Georganopoulou, D. G. *et al.* Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 2273–2276 (2005).
306. Terry, R. D. *et al.* Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* **30**, 572–580 (1991).

BIBLIOGRAPHIE

307. Esparza, T. J. *et al.* Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann. Neurol.* **73**, 104–119 (2013).
308. Ferreira, S. T., Lourenco, M. V, Oliveira, M. M. & De Felice, F. G. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).
309. McLean, C. A. *et al.* Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **46**, 860–866 (1999).
310. Thal, D. R. Clearance of amyloid β -protein and its role in the spreading of Alzheimer's disease pathology. *Front. Aging Neurosci.* **7**, 25 (2015).
311. Baranello, R. J. *et al.* Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and their Role in Alzheimer's Disease HHS Public Access Author manuscript. *Curr. Alzheimer Res. Alzheimer Res* **12**, 32–46 (2015).
312. Ricciarelli, R. & Fedele, E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 926–935 (2017).
313. Lee, J.-E. & Han, P.-L. An Update of Animal Models of Alzheimer Disease with a Reevaluation of Plaque Depositions. *Exp. Neurobiol.* **22**, 84 (2013).
314. Kametani, F. & Hasegawa, M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* **12**, (2018).
315. Naseri, N. N., Wang, H., Guo, J., Sharma, M. & Luo, W. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **705**, 183–194 (2019).
316. Stoothoff, W. H. & Johnson, G. V. W. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1739**, 280–297 (2005).
317. Braak, H. & Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82**, 239–59 (1991).
318. Riley, K. P., Snowdon, D. A. & Markesbery, W. R. Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: Findings from the Nun Study. *Ann. Neurol.* **51**, 567–577 (2002).
319. Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T. & Hyman, B. T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease.

- Neurology* **42**, 631–631 (1992).
320. Bejanin, A. *et al.* Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain* **140**, 3286–3300 (2017).
321. Braak, H. & Del Tredici, K. Are cases with tau pathology occurring in the absence of A β deposits part of the AD-related pathological process? *Acta Neuropathol.* **128**, 767–772 (2014).
322. Bekris, L. M., Yu, C.-E., Bird, T. D. & Tsuang, D. W. Genetics of Alzheimer Disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **23**, 213–227 (2010).
323. Pimenova, A. A., Raj, T. & Goate, A. M. Untangling Genetic Risk for Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* **83**, 300–310 (2018).
324. Kim, J., Basak, J. M. & Holtzman, D. M. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron* **63**, 287–303 (2009).
325. Zhang, J. & Liu, Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* **6**, 254–264 (2015).
326. Mauch, D. H. *et al.* CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol. *Science (80-.)*. **294**, 1354–1357 (2001).
327. Kanekiyo, T., Xu, H. & Bu, G. ApoE and A β in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron* **81**, 740–754 (2014).
328. Fernandez, C. G., Hamby, M. E., McReynolds, M. L. & Ray, W. J. The Role of APOE4 in Disrupting the Homeostatic Functions of Astrocytes and Microglia in Aging and Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 14 (2019).
329. Wolfe, C., Fitz, N., Nam, K., Lefterov, I. & Koldamova, R. The Role of APOE and TREM2 in Alzheimer's Disease—Current Understanding and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 81 (2018).
330. Corder, E. H. *et al.* Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science (80-.)*. **261**, 921–3 (1993).
331. Serrano-Pozo, A., Qian, J., Monsell, S. E., Betensky, R. A. & Hyman, B. T. APOE ϵ 2 is associated with milder clinical and pathological Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* **77**, 917–929 (2015).
332. Näslund, J. *et al.* Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and

BIBLIOGRAPHIE

- the amyloid β peptide in Alzheimer's disease brain. *Neuron* **15**, 219–228 (1995).
333. Strittmatter, W. J. *et al.* Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8098–8102 (1993).
334. Koffie, R. M. *et al.* Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid- β . *Brain* **135**, 2155–2168 (2012).
335. Hashimoto, T. *et al.* Apolipoprotein E, Especially Apolipoprotein E4, Increases the Oligomerization of Amyloid Peptide. *J. Neurosci.* **32**, 15181–15192 (2012).
336. Schmechel, D. E. *et al.* Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 9649–9653 (1993).
337. Fagan, A. M. *et al.* Human and Murine ApoE Markedly Alters A β Metabolism before and after Plaque Formation in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Dis.* **9**, 305–318 (2002).
338. Zhao, W. *et al.* Human APOE genotype affects intraneuronal A 1-42 accumulation in a lentiviral gene transfer model. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 1365–1375 (2014).
339. Hudry, E. *et al.* Gene Transfer of Human Apoe Isoforms Results in Differential Modulation of Amyloid Deposition and Neurotoxicity in Mouse Brain. *Sci. Transl. Med.* **5**, 212ra161-212ra161 (2013).
340. Liu, C.-C. *et al.* ApoE4 Accelerates Early Seeding of Amyloid Pathology. *Neuron* **96**, 1024-1032.e3 (2017).
341. Irizarry, M. C. *et al.* Apolipoprotein E affects the amount, form, and anatomical distribution of amyloid β -peptide deposition in homozygous APP V717F transgenic mice. *Acta Neuropathol.* **100**, 451–458 (2000).
342. Garai, K., Verghese, P. B., Baban, B., Holtzman, D. M. & Frieden, C. The Binding of Apolipoprotein E to Oligomers and Fibrils of Amyloid- β Alters the Kinetics of Amyloid Aggregation. *Biochemistry* **53**, 6323–6331 (2014).
343. Castellano, J. M. *et al.* Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid-Peptide Clearance. *Sci. Transl. Med.* **3**, 89ra57-89ra57 (2011).
344. Jiang, Q. *et al.* ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of A β . *Neuron* **58**, 681–693

- (2008).
345. Cook, D. G. *et al.* Reduced Hippocampal Insulin-Degrading Enzyme in Late-Onset Alzheimer's Disease Is Associated with the Apolipoprotein E-4 Allele. *Am. J. Pathol.* **162**, 313–319 (2003).
 346. Kitazawa, M., Medeiros, R. & Laferla, F. M. Transgenic Mouse Models of Alzheimer Disease: Developing a Better Model as a Tool for Therapeutic Interventions. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 1131–1147 (2012).
 347. Götz, J., Bodea, L.-G. & Goedert, M. Rodent models for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* (2018). doi:10.1038/s41583-018-0054-8
 348. Garcia-Alloza, M. *et al.* Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* **24**, 516–524 (2006).
 349. Edwards, S. R., Hamlin, A. S., Marks, N., Coulson, E. J. & Smith, M. T. Comparative studies using the Morris water maze to assess spatial memory deficits in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **41**, 798–806 (2014).
 350. Zhang, W. *et al.* 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 (2011).
 351. Janus, C., Flores, A. Y., Xu, G. & Borchelt, D. R. Behavioral abnormalities in APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of AD-like pathology: comparative analysis across multiple behavioral domains. *Neurobiol. Aging* **36**, 2519–2532 (2015).
 352. Bilkei-Gorzo, A. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* **142**, 244–257 (2014).
 353. Kinney, J. W. *et al.* Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **4**, 575–590 (2018).
 354. Sudduth, T. L., Schmitt, F. A., Nelson, P. T. & Wilcock, D. M. Neuroinflammatory phenotype in early Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **34**, 1051–1059 (2013).
 355. Gomez-Nicola, D. & Boche, D. Post-mortem analysis of neuroinflammatory changes in human Alzheimer's disease. *Alzheimers. Res. Ther.* **7**, 42 (2015).
 356. Dickson, D. W., Lee, S. C., Mattiace, L. A., Yen, S.-H. C. & Brosnan, C. Microglia

BIBLIOGRAPHIE

- and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* **7**, 75–83 (1993).
357. Griffin, W. S. T. *et al.* Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7611–7615 (1989).
358. Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M. & Hol, E. M. Differential cell proliferation in the cortex of the appsweps1de9 alzheimer's disease mouse model. *Glia* **60**, 615–629 (2012).
359. Itagaki, S., Mcgeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S. & Selkoe, D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits. *J. Neuroimmunol.* **24**, 1689-1699/173–182 (1989).
360. Verheijen, J. & Sleegers, K. Understanding Alzheimer Disease at the Interface between Genetics and Transcriptomics. *Trends Genet.* **34**, 434–447 (2018).
361. Halle, A. *et al.* The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat. Immunol.* **9**, 857–865 (2008).
362. Heneka, M. T. *et al.* NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* **493**, 674–678 (2013).
363. Dempsey, C. *et al.* Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid- β and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain. Behav. Immun.* **61**, 306–316 (2017).
364. Flores, J. *et al.* Caspase-1 inhibition alleviates cognitive impairment and neuropathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat. Commun.* **9**, 3916 (2018).
365. Bai, H. *et al.* Cathepsin B links oxidative stress to the activation of NLRP3 inflammasome. *Exp. Cell Res.* **362**, 180–187 (2018).
366. Mueller-Stainer, S. *et al.* Anti-amyloidogenic and Neuroprotective Functions of Cathepsin B: Implications for Alzheimer's Disease. *Neuron* **51**, 703–714 (2006).
367. Hook, V. Y. H. H., Kindy, M. & Hook, G. Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce β -amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant, β -secretase site of the amyloid precursor protein. *J. Biol.*

- Chem.* **283**, 7745–7753 (2008).
368. Zotova, E., Nicoll, J. A., Kalaria, R., Holmes, C. & Boche, D. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimers. Res. Ther.* **2**, 1 (2010).
369. Maezawa, I., Zimin, P. I., Wulff, H. & Jin, L.-W. Amyloid- β Protein Oligomer at Low Nanomolar Concentrations Activates Microglia and Induces Microglial Neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **286**, 3693–3706 (2011).
370. Giri, R. K., Selvaraj, S. K. & Kalra, V. K. Amyloid Peptide-Induced Cytokine and Chemokine Expression in THP-1 Monocytes Is Blocked by Small Inhibitory RNA Duplexes for Early Growth Response-1 Messenger RNA. *J. Immunol.* **170**, 5281–5294 (2003).
371. Szczepanik, A. M., Rampe, D. & Ringheim, G. E. Amyloid- β peptide fragments p3 and p4 induce pro-inflammatory cytokine and chemokine production in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* **77**, 304–317 (2008).
372. Heneka, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **14**, 388–405 (2015).
373. Sastre, M., Klockgether, T. & Heneka, M. T. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int. J. Dev. Neurosci.* **24**, 167–176 (2006).
374. Fillit, H. *et al.* Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **129**, 318–320 (1991).
375. Forlenza, O. V. *et al.* Increased Serum IL-1 β Level in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **28**, 507–512 (2009).
376. D'Anna, L. *et al.* Serum Interleukin-10 Levels Correlate with Cerebrospinal Fluid Amyloid Beta Deposition in Alzheimer Disease Patients. *Neurodegener. Dis.* **17**, 227–234 (2017).
377. Czirr, E. *et al.* Microglial complement receptor 3 regulates brain A β levels through secreted proteolytic activity. *J. Exp. Med.* **214**, 1081–1092 (2017).
378. Sheng, J. G. *et al.* In Vivo and In Vitro Evidence Supporting a Role for the Inflammatory Cytokine Interleukin-1 as a Driving Force in Alzheimer Pathogenesis.

BIBLIOGRAPHIE

- Neurobiol. Aging* **17**, 761–766 (1996).
379. Shaftel, S. S. *et al.* Sustained hippocampal IL-1 β overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J. Clin. Invest.* **117**, 1595–1604 (2007).
380. Sue, W., Griffin, T. & Mrazek, R. E. Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 233–238 (2013).
381. Di Bona, D. *et al.* Association between the interleukin-1 β polymorphisms and Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Brain Res. Rev.* **59**, 155–163 (2008).
382. Chong, Y. Effect of a carboxy-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. *Life Sci.* **61**, 2323–2333 (1997).
383. Meda, L. *et al.* Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with β -amyloid[25–35]. *J. Neuroimmunol.* **93**, 45–52 (1999).
384. Buxbaum, J. D. *et al.* Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer β 3/A4 amyloid protein precursor (dementia/proteolysis/protein kinase/protein phosphorylation) Pulse-chase labeling for PC12M1 and SH-SY5Y cells was carried out as de. *Medical Sciences* **89**, (1992).
385. Liao, Y.-F., Wang, B.-J., Cheng, H.-T., Kuo, L.-H. & Wolfe, M. S. Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β , and Interferon- γ Stimulate γ -Secretase-mediated Cleavage of Amyloid Precursor Protein through a JNK-dependent MAPK Pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 49523–49532 (2004).
386. Ghosh, S. *et al.* Sustained Interleukin-1 Overexpression Exacerbates Tau Pathology Despite Reduced Amyloid Burden in an Alzheimer's Mouse Model. *J. Neurosci.* **33**, 5053–5064 (2013).
387. Li, Y., Liu, L., Barger, S. W. & Griffin, W. S. T. Interleukin-1 Mediates Pathological Effects of Microglia on Tau Phosphorylation and on Synaptophysin Synthesis in Cortical Neurons through a p38-MAPK Pathway. *J. Neurosci.* **23**, 1605–1611 (2003).
388. Kitazawa, M. *et al.* Blocking IL-1 Signaling Rescues Cognition, Attenuates Tau

- Pathology, and Restores Neuronal β -Catenin Pathway Function in an Alzheimer's Disease Model. *J. Immunol.* **187**, 6539–6549 (2011).
389. Combs, C. K., Karlo, J. C., Kao, S.-C. & Landreth, G. E. β -Amyloid Stimulation of Microglia and Monocytes Results in TNF α -Dependent Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Neuronal Apoptosis. *J. Neurosci.* **21**, 1179–1188 (2001).
390. Yates, S. L. *et al.* Amyloid β and Amylin Fibrils Induce Increases in Proinflammatory Cytokine and Chemokine Production by THP-1 Cells and Murine Microglia. *J. Neurochem.* **74**, 1017–1025 (2000).
391. He, P. *et al.* Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid β generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J. Cell Biol.* **178**, 829–841 (2007).
392. Montgomery, S. L. *et al.* Ablation of TNF-RI/RII Expression in Alzheimer's Disease Mice Leads to an Unexpected Enhancement of Pathology. *Am. J. Pathol.* **179**, 2053–2070 (2011).
393. Szczepanik, A. M., Funes, S., Petko, W. & Ringheim, G. E. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate Ab(1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J. Neuroimmunol.* **113**, 49–62 (2001).
394. Chakrabarty, P. *et al.* IL-10 Alters Immunoproteostasis in APP Mice, Increasing Plaque Burden and Worsening Cognitive Behavior. *Neuron* **85**, 519–533 (2015).
395. Guillot-Sestier, M.-V. *et al.* IL10 Deficiency Rebalances Innate Immunity to Mitigate Alzheimer-Like Pathology. *Neuron* **85**, 534–548 (2015).
396. Cho, M.-H. *et al.* Autophagy in microglia degrades extracellular β -amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy* **10**, 1761–1775 (2014).
397. Bolmont, T. *et al.* Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J. Neurosci.* **28**, 4283–4292 (2008).
398. Baik, S. H., Kang, S., Son, S. M. & Mook-Jung, I. Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid β in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia* **64**, 2274–2290 (2016).
399. Chakrabarty, P. *et al.* Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses A β deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid

BIBLIOGRAPHIE

- deposition. *FASEB J.* **24**, 548–559 (2010).
400. Krabbe, G. *et al.* Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *PLoS One* **8**, e60921 (2013).
401. Babcock, A. A. *et al.* Cytokine-producing microglia have an altered beta-amyloid load in aged APP/PS1 Tg mice. *Brain. Behav. Immun.* **48**, 86–101 (2015).
402. Michaud, J.-P. & Rivest, S. Anti-inflammatory Signaling in Microglia Exacerbates Alzheimer's Disease-Related Pathology. *Neuron* **85**, 450–452 (2015).
403. E. Hirbec, H., Noristani, H. N. & Perrin, F. E. Microglia Responses in Acute and Chronic Neurological Diseases: What Microglia-Specific Transcriptomic Studies Taught (and did Not Teach) Us. *Front. Aging Neurosci.* **9**, 227 (2017).
404. Grathwohl, S. A. *et al.* Formation and maintenance of Alzheimer's disease β -amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat. Neurosci.* **12**, 1361–1363 (2009).
405. Spangenberg, E. E. *et al.* Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain* **139**, 1265–1281 (2016).
406. Daria, A. *et al.* Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia. *EMBO J.* **36**, 583–603 (2017).
407. Egensperger, R., Kösel, S., Eitzen, U. & Graeber, M. B. Microglial Activation in Alzheimer Disease: Association with APOE Genotype. *Brain Pathol.* **8**, 439–447 (1998).
408. Belinson, H. & Michaelson, D. M. ApoE4-dependent A β -mediated neurodegeneration is associated with inflammatory activation in the hippocampus but not the septum. *J. Neural Transm.* **116**, 1427–1434 (2009).
409. Rodriguez, G. A., Tai, L. M., LaDu, M. J. & Rebeck, G. W. Human APOE4 increases microglia reactivity at A β plaques in a mouse model of A β deposition. *J. Neuroinflammation* **11**, 111 (2014).
410. Lynch, J. R., Morgan, D., Mance, J., Matthew, W. D. & Laskowitz, D. T. Apolipoprotein E modulates glial activation and the endogenous central nervous system inflammatory response. *J. Neuroimmunol.* **114**, 107–113 (2001).
411. Guo, L., LaDu, M. J. & Van Eldik, L. J. A Dual Role for Apolipoprotein E in Neuroinflammation: Anti- and Pro-Inflammatory Activity. *J. Mol. Neurosci.* **23**, 205–

- 212 (2004).
412. Zhu, Y. *et al.* APOE genotype alters glial activation and loss of synaptic markers in mice. *Glia* **60**, 559–569 (2012).
 413. Vitek, M. P., Brown, C. M. & Colton, C. A. APOE genotype-specific differences in the innate immune response. *Neurobiol. Aging* **30**, 1350–1360 (2009).
 414. Maezawa, I., Maeda, N., Montine, T. J. & Montine, K. S. Apolipoprotein E-specific innate immune response in astrocytes from targeted replacement mice. *J. Neuroinflammation* **3**, 10 (2006).
 415. Guerreiro, R. *et al.* TREM2 Variants in Alzheimer’s Disease. *N. Engl. J. Med.* **368**, 117–127 (2013).
 416. Jin, S. C. *et al.* Coding variants in TREM2 increase risk for Alzheimer’s disease. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 5838–5846 (2014).
 417. Jonsson, T. *et al.* Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer’s Disease. *N. Engl. J. Med.* **368**, 107–116 (2013).
 418. Schmid, C. D. *et al.* Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J. Neurochem.* **83**, 1309–1320 (2002).
 419. Kiiialainen, A., Hovanes, K., Paloneva, J., Kopra, O. & Peltonen, L. Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS. *Neurobiol. Dis.* **18**, 314–322 (2005).
 420. Colonna, M. & Wang, Y. TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 201–207 (2016).
 421. Daws, M. R. *et al.* Pattern Recognition by TREM-2: Binding of Anionic Ligands. *J. Immunol.* **171**, 594–599 (2003).
 422. Cannon, J. P., O’Driscoll, M. & Litman, G. W. Specific lipid recognition is a general feature of CD300 and TREM molecules. *Immunogenetics* **64**, 39–47 (2012).
 423. Wang, Y., Cirrito, J. R. & Colonna Correspondence, M. TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer’s Disease Model Accession Numbers GSE65067 Wang *et al.* *Cell* **160**, 1061–1071 (2015).
 424. Peng, Q. *et al.* TREM2-and DAP12-Dependent Activation of PI3K Requires DAP10 and Is Inhibited by SHIP1 previously uncharacterized interaction of SHIP1 with

BIBLIOGRAPHIE

- DAP12 that functionally limits TREM2-and DAP12-dependent signaling and identify a mechanism through which SHIP1 regu. *Sci Signal* **3**, 38 (2010).
425. Piccio, L. *et al.* Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1290–1301 (2007).
426. Takahashi, K., Rochford, C. D. P. & Neumann, H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* **201**, 647–57 (2005).
427. Sieber, M. W. *et al.* Attenuated Inflammatory Response in Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) Knock-Out Mice following Stroke. *PLoS One* **8**, e52982 (2013).
428. Jiang, T. *et al.* Upregulation of TREM2 Ameliorates Neuropathology and Rescues Spatial Cognitive Impairment in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology* **39**, 2949–2962 (2014).
429. Lee, C. Y. D. *et al.* Elevated TREM2 Gene Dosage Reprograms Microglia Responsivity and Ameliorates Pathological Phenotypes in Alzheimer's Disease Models. *Neuron* **97**, 1032-1048.e5 (2018).
430. Jay, T. R. *et al.* TREM2 deficiency eliminates TREM2 + inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J. Exp. Med.* **212**, 287–295 (2015).
431. Zhao, Y. *et al.* TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron* **97**, 1023-1031.e7 (2018).
432. Ulrich, J. D. *et al.* Altered microglial response to A β plaques in APPPS1-21 mice heterozygous for TREM2. *Mol. Neurodegener.* **9**, 20 (2014).
433. Parhizkar, S. *et al.* Loss of TREM2 function increases amyloid seeding but reduces plaque-associated ApoE. *Nat. Neurosci.* **22**, 191–204 (2019).
434. Malik, M. *et al.* Genetics ignite focus on microglial inflammation in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **10**, 52 (2015).
435. Mildner, A., Huang, H., Radke, J., Stenzel, W. & Priller, J. P2Y₁₂ receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* **65**, 375–387 (2017).

436. Martin, E. *et al.* New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol. Psychiatry* **24**, 108–125 (2019).
437. Sanz, J. M. *et al.* Possible protective role of the 489C>T P2X7R polymorphism in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* **60**, 117–119 (2014).
438. Diaz-Hernandez, J. I. *et al.* In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases. *Neurobiol. Aging* **33**, 1816–1828 (2012).
439. Ni, J., Wang, P., Zhang, J., Chen, W. & Gu, L. Silencing of the P2X7 receptor enhances amyloid- β phagocytosis by microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 363–369 (2013).
440. Sanz, J. M. *et al.* Activation of Microglia by Amyloid beta Requires P2X7 Receptor Expression. *J Immunol* **182**, 4378–4385 (2009).
441. Suurväli, J., Boudinot, P., Kanellopoulos, J. & Rüütel Boudinot, S. P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed. J.* **40**, 245–256 (2017).
442. Varma, R. *et al.* Amyloid- β Induces a Caspase-mediated Cleavage of P2X4 to Promote Purinotoxicity. *NeuroMolecular Med.* **11**, 63–75 (2009).
443. Jankowsky, J. L. *et al.* Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 159–170 (2004).
444. Deussing, J. *et al.* Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4516–4521 (1998).
445. Crouzier, L., Gilabert, D., Rossel, M., Trousse, F. & Maurice, T. Topographical memory analyzed in mice using the Hamlet test, a novel complex maze. *Neurobiol. Learn. Mem.* **149**, 118–134 (2018).
446. Saez-Ibanez, A. R., Scheffler, J. M., Terabayashi, T., Idevall, O. & Ferby, I. Ligand-independent role of ErbB3 in endocytic recycling. *bioRxiv* 575449 (2019). doi:10.1101/575449
447. Kockx, M., Jessup, W. & Kritharides, L. Regulation of Endogenous Apolipoprotein E Secretion by Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1060–1067 (2008).

BIBLIOGRAPHIE

448. Tamboli, I. Y., Heo, D. & Rebeck, G. W. Extracellular Proteolysis of Apolipoprotein E (apoE) by Secreted Serine Neuronal Protease. *PLoS One* **9**, e93120 (2014).
449. Deng, J., Rudick, V. & Dory, L. Lysosomal degradation and sorting of apolipoprotein E in macrophages. *J. Lipid Res.* **36**, 2129–2140 (1995).
450. Xu, Z. *et al.* Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain A β accumulation and memory deficits. *Mol. Neurodegener.* **10**, 58 (2015).
451. Lee, H. G., Won, S. M., Gwag, B. J. & Lee, Y. B. Microglial P2X₇ receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP swe /PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Mol. Med.* **43**, 7 (2011).
452. Lin, C. T., Xu, Y. F., Wu, J. Y. & Chan, L. Immunoreactive apolipoprotein E is a widely distributed cellular protein. Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in baboon tissues. *J. Clin. Invest.* **78**, 947–958 (1986).
453. Dory, L. Regulation of apolipoprotein E secretion by high density lipoprotein3 in mouse macrophages. *J. Lipid Res.* **32**, 783–792 (1991).
454. Duan, H., Lin, C. Y. & Mazzone, T. Degradation of macrophage ApoE in a nonlysosomal compartment: Regulation by sterols. *J. Biol. Chem.* **272**, 31156–31162 (1997).
455. Strayer, A. L. *et al.* Highlight article: Ligand-independent activation of the P2X₇ receptor by Hsp90 inhibition stimulates motor neuron apoptosis. *Exp. Biol. Med.* **244**, 901–914 (2019).
456. Larkin, L., Khachigian, L. M. & Jessup, W. Regulation of apolipoprotein E production in macrophages (review). *Int. J. Mol. Med.* **6**, 253–258 (2000).
457. Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E. & Ikeda, K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* **541**, 163–166 (1991).
458. Thériault, P., ElAli, A. & Rivest, S. The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Alzheimers. Res. Ther.* **7**, 41 (2015).
459. Martin, E., Boucher, C., Fontaine, B. & Delarasse, C. Distinct inflammatory phenotypes of microglia and monocyte-derived macrophages in Alzheimer's disease

- models: effects of aging and amyloid pathology. *Aging Cell* **16**, 27–38 (2017).
460. Martínez-Frailes, C. *et al.* Amyloid Peptide Induced Neuroinflammation Increases the P2X7 Receptor Expression in Microglial Cells, Impacting on Its Functionality. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, (2019).
461. Lee, H. G., Won, S. M., Gwag, B. J. & Lee, Y. B. Microglial P2X 7 receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP swe /PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Mol. Med.* **43**, 7 (2011).
462. Chen, X. *et al.* Brilliant Blue G improves cognition in an animal model of Alzheimer's disease and inhibits amyloid- β -induced loss of filopodia and dendrite spines in hippocampal neurons. *Neuroscience* **279**, 94–101 (2014).
463. Sanz, J. M. *et al.* Activation of Microglia by Amyloid β Requires P2X 7 Receptor Expression. *J. Immunol.* **182**, 4378–4385 (2009).
464. Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B. & Kanellopoulos, J. M. The Purinergic Receptor P2X7 Triggers α -Secretase-dependent Processing of the Amyloid Precursor Protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 2596–2606 (2011).
465. León-Otegui, M. *et al.* Opposite effects of P2X7 and P2Y 2 nucleotide receptors on α -secretase-dependent APP processing in Neuro-2a cells. *FEBS Lett.* **585**, 2255–2262 (2011).
466. Bales, K. R. *et al.* Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nat. Genet.* **17**, 263–264 (1997).
467. Holtzman, D. M. *et al.* Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid- β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* **103**, R15–R21 (1999).
468. Holtzman, D. M. *et al.* Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 2892–2897 (2000).
469. Ulrich, J. D. *et al.* ApoE facilitates the microglial response to amyloid plaque pathology. *J. Exp. Med.* **215**, 1047–1058 (2018).
470. Marques, M. A., Tolar, M., Harmony, J. A. K. & Crutcher, K. A. A thrombin cleavage fragment of apolipoprotein E exhibits isoform-specific neurotoxicity. *Neuroreport* **7**,

BIBLIOGRAPHIE

- 2529–2532 (1996).
471. Tolar, M. *et al.* Truncated Apolipoprotein E (ApoE) causes increased intracellular calcium and may mediate ApoE neurotoxicity. *J. Neurosci.* **19**, 7100–7110 (1999).
472. Craigie, E., Birch, R. E., Unwin, R. J. & Wildman, S. S. The relationship between P2X4 and P2X7: a physiologically important interaction? *Front. Physiol.* **4**, (2013).
473. Izco, M. *et al.* Changes in the brain and plasma A β peptide levels with age and its relationship with cognitive impairment in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **263**, 269–279 (2014).
474. Garcia-Alloza, M., Borrelli, L. A., Hyman, B. T. & Bacskai, B. J. Antioxidants have a rapid and long-lasting effect on neuritic abnormalities in APP:PS1 mice. *Neurobiol. Aging* **31**, 2058–2068 (2010).
475. Meyer-Luehmann, M. *et al.* A Reporter of Local Dendritic Translocation Shows Plaque- Related Loss of Neural System Function in APP-Transgenic Mice. *J. Neurosci.* **29**, 12636–12640 (2009).
476. Drummond, E. & Wisniewski, T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* **133**, 155–175 (2017).
477. Kennard, J. & Woodruff-Pak, D. Age sensitivity of behavioral tests and brain substrates of normal aging in mice. *Front. Aging Neurosci.* **3**, 9 (2011).
478. Ferguson, S. A., Sarkar, S. & Schmued, L. C. Longitudinal behavioral changes in the APP/PS1 transgenic Alzheimer's Disease model. *Behav. Brain Res.* **242**, 125–134 (2013).
479. Biallosterski, B. T. *et al.* Changes in voiding behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* **7**, 160 (2015).
480. Tai, L. M. *et al.* EFAD transgenic mice as a human APOE relevant preclinical model of Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* **58**, 1733–1755 (2017).
481. Raffai, R. L., Dong, L.-M., Farese, R. V & Weisgraber, K. H. Introduction of human apolipoprotein E4 'domain interaction' into mouse apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 11587–11591 (2001).
482. Getz, G. S. & Reardon, C. A. Apoproteins E, A-I, and SAA in Macrophage Pathobiology Related to Atherogenesis. *Front. Pharmacol.* **10**, (2019).

483. Bai, X.-Q. *et al.* PCSK9: A potential regulator of apoE/apoER2 against inflammation in atherosclerosis? *Clin. Chim. Acta* **483**, 192–196 (2018).

Rôle des récepteurs P2X4 dans la dégradation d'ApoE : implication dans la maladie d'Alzheimer

Les récepteurs purinergiques P2X4 (P2X4R) sont des récepteurs canaux exprimés par les neurones et les microglies du système nerveux central et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Des études préliminaires, menées au sein du laboratoire, ont permis de mettre en évidence une interaction entre P2X4R et l'Apolipoprotéine E (ApoE), ainsi qu'une augmentation d'ApoE dans les macrophages et les microglies provenant de souris déficientes pour P2X4R. Basée sur ces observations, la première partie de cette thèse a cherché à caractériser les mécanismes impliquant P2X4R dans cet effet. ApoE étant un facteur de risque majeur dans la maladie d'Alzheimer, la deuxième partie de cette thèse a été consacrée à étudier l'implication de P2X4R dans cette pathologie.

Les résultats présentés montrent que P2X4R module l'activité de la cathepsine B, enzyme responsable de la dégradation lysosomale d'ApoE. L'utilisation de souris APP/PS1 a permis de montrer que l'absence de P2X4R conduit à une amélioration des capacités mnésiques, une diminution de la concentration de peptide A β soluble ainsi qu'à une augmentation d'ApoE microgliale.

Ces résultats indiquent que P2X4R régule la dégradation d'ApoE par un mécanisme dépendant de la cathepsine B, et que son invalidation permet d'améliorer les symptômes cognitifs de la maladie d'Alzheimer.

Involvement of P2X4 receptors in ApoE degradation: implication in Alzheimer disease

P2X4 receptors (P2X4R) are purinergic ion channels expressed on neurons and microglia in the central nervous system. They have been widely studied and have been implicated in many physiological and pathological processes. Previous studies conducted in the laboratory revealed an interaction between P2X4R and the Apolipoprotein E (ApoE), as well as an increase in ApoE level in primary macrophages and microglia obtained from mice lacking P2X4R. Based on these results, this thesis aimed to decipher the mechanisms underlying P2X4R regulation of ApoE levels. In addition, ApoE being a major risk factor for Alzheimer's disease, part of this work investigated potential implications of P2X4R in this pathology.

Results show that P2X4R modulates cathepsin B activity, which in turn promotes ApoE lysosomal degradation. APP/PS1 mice lacking P2X4R show an increase in cognitive performances, a decrease in soluble A β peptide and an increase of microglia ApoE level.

These results support that P2X4R modulates ApoE degradation in a cathepsin B-dependant manner and that its invalidation leads to an improvement in Alzheimer's pathology.