



## Sorbonne Université

Ecole doctorale ED3C (cerveau, cognition, comportement) : N° ED158

### Thèse de doctorat

Spécialité : Neuropharmacologie

## Rôle du peptide amyloïde dans les maladies neurodégénératives.

Présentée par :

**Maud Combes**

Dirigée par le **Pr Jean Mariani** (UMR 8256 B2A Biological Adaptation and Ageing

Team Brain Development, Repair and Aging (BDRA) et co-dirigée par le **Dr Noelle Callizot** (CSO Neuro-sys)

Présentée et soutenue publiquement le 11 décembre 2018

Devant le jury composé de :

**Pr Jean Mariani**

Sorbonne Université, Directeur de thèse

**Dr Noelle Callizot**

Neuro-sys, Co-encadrante de la thèse

**Pr Jean-Philippe LOEFFLER**

Université de Strasbourg, Rapporteur

**Pr Michel VIGNES**

Université de Montpellier, Rapporteur

**Dr Natalia Popa**

Institut des neurosciences de la Timone, Examineur

**Pr Bruno CAULI**

Sorbonne Université, Président



# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Noelle Callizot de m'avoir encadrée tout au long de cette thèse. Merci Noelle pour ta confiance, ainsi que pour ton soutien tant scientifique que moral. Au-delà de ton savoir et ton enthousiasme communicatif pour la Science, tu as su me transmettre ta passion, qui je l'espère, continuera de me porter longtemps.

Je remercie le Professeur Philippe Poindron pour ses précieux conseils, ses nombreuses corrections. Toujours disponible et à l'écoute vous êtes tout simplement un génie...

Je remercie le Professeur Jean Mariani pour sa patience et son soutien durant ces années de thèse.

Je tiens à remercier les membres du jury, le docteur Natalia POPA et les Professeurs Jean-Philippe Loeffler, Michel Vignes, Bruno Cauli de m'avoir fait l'honneur et le plaisir d'évaluer et de critiquer ce travail.

J'adresse tous mes remerciements à toute l'équipe de Neuro-sys, en particulier Sylvain et Clémence, qui ont été un soutien sans faille dans les manips. Ainsi qu'à Yann qui m'a permis de faire cette thèse.



# RÉSUMÉ

Les maladies neurodégénératives touchent plus de 33 millions de personnes dans le monde. Elles sont caractérisées par la dégénérescence progressive des neurones et un dysfonctionnement dans le cerveau et/ou la moëlle épinière.

Leurs mécanismes (perte des cellules neuronales, axonopathie, perte synaptique, inflammation, dysfonction immunitaire...) ont une incidence sur les fonctions moteurs et cognitives et peuvent générer une dépendance croissante des malades.

Le traitement de la plupart des maladies neurodégénératives reste à l'heure actuelle essentiellement symptomatique ; s'il permet d'améliorer la qualité de vie des patients, il est le plus souvent sans effet sur l'évolution de la maladie.

L'ensemble de nos résultats a permis de mettre en évidence des mécanismes physiopathologiques inédits de la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique, et d'imaginer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Nous avons étudié les effets toxiques des A $\beta$ O, sur un modèle *in vitro* de neurones primaires ainsi que sur un modèle de coculture nerf muscle reproduisant des jonctions neuromusculaires, en nous concentrant sur leur cinétique de développement, puis sur leur mécanismes moléculaires et cellulaires. Nous avons pu avancer l'hypothèse d'un lien de causalité étroit entre le glutamate et les A $\beta$ O aussi bien dans la maladie d'Alzheimer que dans la sclérose latérale amyotrophique.

Il a été mis en évidence que des modèles de culture cellulaire permettaient de répondre à des questions ciblées, dans la mesure où ils reproduisent certains phénomènes neuropathologiques observés chez les malades.

**Mots clés** : A $\beta$ , glutamate, neurones, JNM, Alzheimer, SLA.

# ABSTRACT

Neurodegenerative diseases affect more than 33 million people in the world. They are characterized by the progressive degeneration of neurons and a dysfunction of the brain and/or the spinal cord.

Their mechanisms (loss of the neuronal cells, axonopathy, synaptic loss, inflammation, immunizing dysfunction...) have an impact on the motor and cognitive functions and can generate an increasing dependence of the patient.

The treatment of most of the neurodegenerative diseases remains at the moment essentially symptomatic. Many treatments improve the quality of life of the patients, but most of them remain ineffective on the evolution of the disease.

The results allowed us to reveal some unprecedented facts about physiopathological mechanisms of Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis, and to imagine new therapeutic targets.

We studied the toxic effects of the A $\beta$ O on an *in vitro* model of primary neurons as well as on a model of coculture nerve muscle reproducing neuromuscular junctions, by concentrating on their kinetics development, then on their molecular and cellular mechanisms. We were able to move forward the hypothesis of a link of causality between the glutamate and the A $\beta$ O in the Alzheimer's disease as well as in amyotrophic lateral sclerosis.

Using the models of cell cultures and observing how they reproduce, we were able to answer some of the targeted questions concerning some of the neuropathological phenomena observed in the patients.

**Keywords** : A $\beta$ , glutamate, neurons, NMJ, Alzheimer, ALS.

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	3
RÉSUMÉ.....	5
ABSTRACT.....	6
TABLE DES MATIÈRES.....	7
LISTE DES FIGURES .....	11
LISTE DES TABLEAUX .....	12
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	13
<b>1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>18</b>
<b>2. ÉTAT DE L'ART.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Le peptide amyloïde et les maladies neurodégénératives. ....</b>	<b>22</b>
2.1.1. Les amyloïdoses ou amyloses.....	22
2.1.2. La maladie d'Alzheimer. ....	25
2.1.3. La sclérose latérale amyotrophique. ....	28
<b>2.2. Le peptide amyloïde .....</b>	<b>33</b>
2.2.1. La protéine précurseur du peptide bêta-amyloïde et son traitement par les voies dites canoniques, non-amyloïdogène et amyloïdogène. ....	33
2.2.1.1. Traitement du précurseur du peptide bêta-amyloïde par la voie de l'alpha-sécrétase : la voie non amyloïdogène. ....	35
2.2.1.1.1. Implication d'ADAM17. ....	35
2.2.1.1.2. Implication d'ADAM9. ....	36
2.2.1.1.3. Implication d'ADAM10. ....	36
2.2.1.2. Traitement du précurseur du peptide bêta-amyloïde par la voie de la bêta-sécrétase ou voie amyloïdogène. ....	37
2.2.1.2.1. Implication de la $\beta$ -amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. ....	37
2.2.1.2.2. Implication de la $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 2 .....	39
2.2.1.2.3. Implication de la cathepsine B. ....	40
2.2.1.3. Production de précurseurs solubles bêta de la protéine précurseur du peptide bêta-amyloïde. ....	40
2.2.1.4. Production des fragments carboxyterminaux alpha et bêta. ....	40
2.2.1.4.1. Traitement des fragments carboxyterminaux par la voie de la gamma-sécrétase.....	41
2.2.1.4.1.1. Les présénilines.....	44
2.2.1.4.1.2. La nicastrine. ....	49
2.2.1.4.1.3. Le facteur anterior pharynx-defective-1.....	50
2.2.1.4.1.4. Le presenilin enhancer-2. ....	50
2.2.1.4.1.5. Autres facteurs impliqués dans l'activité de la gamma-sécrétase.....	51
2.2.1.4.1.6. Hétérogénéité des complexes $\gamma$ -sécrétase. ....	54
2.2.1.4.1.7. Localisation subcellulaire du complexe de la gamma-sécrétase. ....	54
2.2.2. La voie non canonique.....	54
2.2.3. Biologie du peptide amyloïde.....	55
2.2.3.1. Production physiologique.....	55
2.2.3.2. Modification du peptide amyloïde. ....	56
2.2.3.2.1. Troncations aminotermiales. ....	56

2.2.3.2.2.	Dégradation par des aminopeptidases.....	56
2.2.3.2.3.	Racémisation et isomérisation.....	57
2.2.3.2.4.	Le motif YENPTY.....	58
2.2.4.	Dégradation et élimination des peptides amyloïdes.....	60
2.2.4.1.	Les différentes enzymes impliquées.....	60
2.2.4.1.1.	La néprilysine.....	60
2.2.4.1.2.	L'endothelin converting enzyme.....	61
2.2.4.1.3.	L'insulin degrading enzyme.....	62
2.2.4.1.4.	L'angiotensin converting enzyme.....	63
2.2.4.1.5.	La membrane metallo-endopeptidase like.....	63
2.2.4.1.6.	La plasmine.....	64
2.2.4.2.	Élimination du peptide amyloïde.....	65
2.2.5.	Rôles physiologiques et pathologiques connus ou supposés du peptide amyloïde. ....	66
2.2.5.1.	Rôles physiologiques.....	66
2.2.5.2.	Rôles pathologiques : l'hypothèse amyloïde de la maladie d'Alzheimer.....	67
2.2.5.2.1.	Éléments en faveur de l'hypothèse amyloïde.....	67
2.2.5.2.2.	Les limites de l'hypothèse amyloïde.....	69
2.2.6.	Relations entre les fonctions et la conformation du peptide amyloïde.....	70
2.2.6.1.	Les diverses conformations du peptide amyloïde.....	70
2.2.6.1.1.	Comportement du peptide bêta-amyloïde en solution.....	70
2.2.6.1.2.	Propriétés des agrégats protofibrillaires.....	71
2.2.6.1.3.	Propriétés des fibrilles amyloïdes matures.....	71
2.2.6.2.	Quel type de toxicité pour quelle conformation ?.....	72
2.2.7.	Nomenclature des structures formées par le peptide bêta-amyloïde.....	75
2.2.7.1.	Amyloïde.....	75
2.2.7.2.	Fibrille.....	75
2.2.7.3.	Protofilament.....	76
2.2.7.4.	Oligomères.....	76
2.2.7.4.1.	Oligomères de bas poids moléculaires.....	77
2.2.7.4.2.	Oligomères de bas poids moléculaires stables au dodécylsulfate de sodium.....	77
2.2.7.4.3.	Oligomères de haut poids moléculaire.....	78
2.2.7.4.3.1.	Protofibrilles.....	78
2.2.7.4.3.2.	Ligands diffusibles dérivés du peptide bêta-amyloïde.....	78
2.2.7.4.3.3.	Globulomères annulaires.....	79
2.2.7.4.4.	Nucleus.....	79
2.2.7.4.5.	Semence.....	79
<b>2.3.</b>	<b>La protéine transactive response-DNA binding protein 43.....</b>	<b>80</b>
2.3.1.	Fonctions de la protéine Transactive response DNA binding protein 43 normale.....	80
2.3.2.	Propriétés de la protéine Transactive response DNA binding protein 43 anormale. ...	81
<b>3.</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>83</b>
<b>3.1.</b>	<b>Culture cellulaire.....</b>	<b>83</b>
3.1.1.	Culture primaire de neurones corticaux.....	83
3.1.2.	Culture primaire de neurones corticaux enrichie en microglie.....	83
3.1.3.	Culture d'astrocytes purifiés.....	84
3.1.4.	Culture primaire de motoneurones non purifié.....	84
3.1.5.	Coculture nerf muscle.....	85
<b>3.2.</b>	<b>Traitement pharmacologique.....</b>	<b>86</b>
3.2.1.	Préparation et intoxication par le peptide $\beta$ amyloïde 1-42 humain.....	86
3.2.2.	Intoxication par le glutamate.....	86
3.2.3.	Application d'antagonistes / inhibiteurs.....	87



<b>3.3. Techniques de quantification et d'analyse</b> .....	<b>87</b>
3.3.1. Fixation et immunomarquage des cultures primaires de neurones, astrocytes et cellules musculaires.....	87
3.3.2. Fixation et immunomarquage des cocultures nerfs muscle .....	87
3.3.3. Analyses d'image .....	88
3.3.4. Evaluation des flux calciques.....	89
3.3.5. Dosage du glutamate.....	89
3.3.6. Dosage des oligomères de peptide A $\beta$ .....	90
3.3.7. Dosage de cytokine (TNF alpha, IL-1 $\beta$ et IL-6) .....	90
3.3.8. Absorption du glucose.....	90
3.3.9. Quantification de protéine par western blot .....	91
<b>4. RÉSULTATS</b> .....	<b>92</b>
<b>4.1. Publication N°1 : “Operational Dissection of <math>\beta</math>-Amyloid Cytopathic Effects on Cultured Neurons”</b> .....	<b>92</b>
4.1.1. Résumé .....	92
Operational Dissection of $\beta$ -Amyloid Cytopathic Effects on Cultured Neurons J Neurosci Res. 2013 May;91(5):706-16. doi: 10.1002/jnr.23193. Epub 2013 Feb 13.....	95
4.1.2. Résultats complémentaires.....	109
4.1.2.1. Effet de différents antagonistes des récepteurs du glutamate sur une intoxication de neurones corticaux par des A $\beta$ O.....	109
4.1.2.2. Effet des A $\beta$ O sur les flux calciques convoyés par les récepteurs du NMDA. ....	112
4.1.2.3. Effet des A $\beta$ O sur la libération de glutamate par les neurones et les cellules associées de la culture .....	114
4.1.2.4. Effet du glutamate sur une intoxication A $\beta$ O .....	115
4.1.2.5. Effet d'A $\beta$ O sur l'activation de la GSK3 $\beta$ et sur l'hyperphosphorylation de tau.....	116
4.1.2.6. Effet d'A $\beta$ O sur des astrocytes purifiés .....	117
4.1.3. Discussion .....	118
4.1.4. Toxicité chronique du peptide A $\beta$ induite par l'activation de la microglie. ....	122
4.1.4.1. Effet d'A $\beta$ O sur les neurones corticaux cultivés en présence de microglie.....	123
4.1.4.2. Effet des A $\beta$ O sur les neurones corticaux cultivés en présence de microglie : phénomènes neuro-inflammatoires.....	124
<b>4.2. Publication N°2: “Glutamate Protects Neuromuscular Junctions from Deleterious Effects of b-Amyloid Peptide and Conversely: an In Vitro Study in a Nerve–Muscle Coculture”</b> .....	<b>125</b>
4.2.1. Résumé .....	125
Glutamate Protects Neuromuscular Junctions from Deleterious Effects of b-Amyloid Peptide and Conversely: an In Vitro Study in a Nerve–Muscle Coculture. J Neurosci Res. 2015 Apr;93(4):633-43. doi: 10.1002/jnr.23524. Epub 2014 Dec 9.....	127
4.2.2. Résultats complémentaires.....	141
4.2.2.1. Effet d'A $\beta$ O sur une culture primaire de motoneurones.....	141
4.2.2.2. Effet du glutamate sur une culture primaire de motoneurones .....	142
4.2.2.3. Effet des A $\beta$ O sur la concentration de glutamate extracellulaire en culture primaire de motoneurones. ....	143
4.2.2.4. Effet de différents antagonistes sur une intoxication par les A $\beta$ O d'une culture primaire de motoneurones. ....	144
4.2.2.5. Effet des A $\beta$ O sur l'accumulation de la protéine TDP-43 dans le cytoplasme de motoneurones de rat en culture primaire. ....	145
4.2.2.6. Effet du glutamate sur l'accumulation de la protéine TDP-43 dans le cytoplasme de motoneurones de rat en culture primaire. ....	146
4.2.2.7. Effet des A $\beta$ O sur la survie des cellules musculaires humaines. ....	147

4.2.2.8.	Effet du glutamate sur la survie des cellules musculaires humaines. ....	148
4.2.2.9.	Effet des A $\beta$ O sur l'expression du transporteur du glucose 1 des cellules musculaires humaines. ....	149
4.2.2.10.	Effet des A $\beta$ O sur l'absorption du glucose par les cellules musculaires humaines. ....	150
4.2.3.	Discussion .....	150
<b>5.</b>	<b>DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION .....</b>	<b>154</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>163</b>
<b>7.</b>	<b>ANNEXES .....</b>	<b>187</b>
<b>7.1.</b>	<b>Publications.....</b>	<b>187</b>
	A new long term in vitro model of myelination. ....	189
	Necrosis, apoptosis, necroptosis, three modes of action of dopaminergic neuron neurotoxins	201
<b>7.2.</b>	<b>Posters .....</b>	<b>241</b>
	<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>244</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>244</b>

# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : PORTRAIT D'ALOÏS ALZHEIMER ET D'AUGUSTE DETER.....	25
FIGURE 2 : LESIONS ANATOMOPATHOLOGIQUES SPECIFIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER .....	26
FIGURE 3 : COMPARAISON DU CERVEAU D'UN SUJET SAIN ET D'UN PATIENT ATTEINT DE MALADIE D'ALZHEIMER. ....	27
FIGURE 4 : CLIVAGE SEQUENTIEL DE LA PROTEINE PRECURSEUR DU PEPTIDE BETA-AMYOÏDE.....	42
FIGURE 5 : STRUCTURE DU COMPLEXE DE LA GAMMA-SECRETASE. ....	53
FIGURE 6 : DEGRADATION ENZYMATIQUE DU PEPTIDE AMYOÏDE.....	65
FIGURE 7 : CARACTERISATION D'OLIGOMERES DE PEPTIDE AMYOÏDE 1-42 EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE. ....	71
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FORMATION DES PLAQUES SENILES. ....	72
FIGURE 9 : STRUCTURE D'UN MONOMERE DE PEPTIDE BETA-AMYOÏDE. ....	76
FIGURE 10 : EXEMPLE D'ANALYSE D'IMAGE .....	89
FIGURE 11 : EFFET DE DIFFERENTS ANTAGONISTES DE RECEPTEURS DU GLUTAMATE .....	111
FIGURE 12: EFFET DE L'AbO SUR LES FLUX CALCIQUES EN PRESENCE DE BAPTA. ....	113
FIGURE 13: EFFET DU BAPTA SUR A) LA SURVIE NEURONALE B) LA CASPASE 3 APRES UNE INTOXICATION A L'AbO.....	114
FIGURE 14: EFFET D'AbO SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE EXTRACELLULAIRE APRES 2 MIN D'APPLICATION. ....	115
FIGURE 15: EFFET DU GLUTAMATE SUR A) LA SURVIE B) LE RESEAU NEURITIQUE DES NEURONES CORTICAUX APRES UNE INTOXICATION A L'AbO (2 µMOL/L, A DIFFERENTS TEMPS). ....	116
FIGURE 16: EFFET D'AbO SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION DE LA PROTEINE GSK3B ET SUR L'HYPERPHOSPHORYLATION DE TAU APRES UNE INTOXICATION DE 8 H.....	116
FIGURE 17: EFFET D'AbO A DIFFERENTES CONCENTRATIONS AVEC ET SANS BAPTA SUR LA SURVIE DES ASTROCYTES PURIFIES APRES UNE INTOXICATION DE 4 H.....	117
FIGURE 18 : SEQUENCE PUTATIVE DES EVENEMENTS CONDUISANT A L'EXPRESSION DES EFFETS TOXIQUES DES AbO.....	120
FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES EVENEMENTS IMPLIQUES DANS LA TOXICITE DES AbO [A] ET DE LEUR PREVENTION PAR DES ANTAGONISTES DE DIFFERENTS RECEPTEURS DU GLUTAMATE [B]. ....	121
FIGURE 20: EFFET D'AbO SUR A) LA SURVIE B) LE RESEAU NEURITIQUE C) L'HYPERPHOSPHORYLATION DE TAU DES NEURONES CORTICAUX CULTIVE EN PRESENCE DE MICROGLIE APRES UNE INTOXICATION DE 72 H.....	123
FIGURE 21: EFFET D'AbO SUR A) L'ACTIVATION DE LA MICROGLIE B) LA LIBERATION DE TNFA C) LA LIBERATION D'IL-1B D) LA LIBERATION D'IL-6 SUR DES CULTURES DE NEURONES CORTICAUX CULTIVES EN PRESENCE DE MICROGLIE APRES UNE INTOXICATION DE 72 H. ....	124
FIGURE 22: EFFET D'AbO SUR A) LA SURVIE B) LE RESEAU NEURITIQUE SUR DES CULTURES DE MOTONEURONES. ....	141
FIGURE 23: EFFET DU GLUTAMATE SUR A) LA SURVIE B) LE RESEAU NEURITIQUE SUR DES CULTURES DE MOTONEURONES.....	142
FIGURE 24: EFFET D'AbO SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE EXTRACELLULAIRE D'UNE CULTURE PRIMAIRE DE MOTONEURONES. ....	143
FIGURE 25 : EFFET DE DIFFERENTS ANTAGONISTES SUR A) LA SURVIE, B) LE RESEAU NEURITIQUE DES MOTONEURONES APRES UNE INTOXICATION A L'AbO (2 µMOL/L, 24 H). ....	144
FIGURE 26: EFFET D'AbO SUR L'ACCUMULATION DE LA PROTEINE TDP-43 DANS LE CYTOPLASME DE DE MOTONEURONES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE. ....	145
FIGURE 27: EFFET DU GLUTAMATE SUR L'ACCUMULATION DE LA PROTEINE TDP-43 DANS LE CYTOPLASME DE MOTONEURONES DE RAT EN CULTURE PRIMAIRE. ....	146
FIGURE 28: EFFET D'AbO SUR LA SURVIE DE CELLULES MUSCULAIRES HUMAINES. ....	147
FIGURE 29: EFFET DU GLUTAMATE SUR LA SURVIE DE CELLULES MUSCULAIRES HUMAINES.....	148
FIGURE 30: EFFET DES AbO SUR L'EXPRESSION DE LA GLUT-1 APRES UNE INTOXICATION DE 24 H SUR DES CELLULES MUSCULAIRES HUMAINES. ....	149
FIGURE 31: EFFET DES AbO (APPLIQUES PENDANT 24 H) SUR L'ABSORPTION DU GLUCOSE RAPPORTE AU NOMBRE DE CELLULES MUSCULAIRES HUMAINES. ....	150
FIGURE 32 : DEVELOPPEMENT D'UN NEURONE EN CULTURE IN VITRO. ....	155

# LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION DES AMYLOSES	23
TABLEAU 2 : INCLUSIONS INTRACELLULAIRES DE TYPE AMYLOÏDE.	24
TABLEAU 3 : SIGNES CLINIQUES ET SYMPTOMES ASSOCIES A LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE.	31
TABLEAU 4 : PROPRIETES NEUROTOXIQUES ET NEUROTROPES DU PRECURSEUR DU PEPTIDE AMYLOÏDE ET DE SES FRAGMENTS DERIVES.	60
TABLEAU 5 : LISTE DES INHIBITEURS ET DES ANTAGONISTES UTILISES DANS NOS ETUDES.	87
TABLEAU 6 : LISTE ET ORIGINE DES ANTICORPS UTILISES DANS NOS ETUDES.	88

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA: acides aminés

A $\beta$ : bêta-amyloïde

A $\beta$ <sub>1-42</sub>: peptide bêta-amyloïde 1-42

A $\beta$ O: Oligomères d'A $\beta$

Ac: Anticorps

*ACE: angiotensin converting enzyme*

*ADAM: a disintegrin and metalloproteinase domain*

*AICD: APP intracellular domain*

*AP1: adaptor protein 1*

*AP2: adaptor protein 2*

APA: aminopeptidase A

APH-1: facteur anterior pharynx-defective-1

*APP: Amyloid Precursor Protein*

ATF-6: activating transcription factor 6

*ATM: atomic force microscope (Microscope à force atomique)*

*BACE1:  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1*

BDNF: brain derived neurotrophic factor

BHE: barrière hémato-encéphalique

BPM: bas poids moléculaire

BSA: Sérum d'albumine bovin

*C9ORF72: chromosome 9 open reading frame 72*

CREB: *C-AMP Response Element-binding protein*

c-Rel: oncogène cellulaire de la réticuloendothéliose

CTF: fragments carboxyterminaux

DNF: dégénérescences neurofibrillaires

DRG: ganglions de la racine dorsale

DS: syndrome de Down

EAAT: *excitatory amino acid transporter*

ECE: *endothelin converting enzyme*

eNMDAR: récepteur NMDA extracellulaire

Egr-1: *early growth response-1*

Eps15: *epidermal growth factor receptor substrate 15*

FDA: *Food and Drug Administration*

FTD: démences fronto-temporales

FUS: *fused in sarcoma*

GATA-1: *Globin Transcription Factor 1*

GSAP: gamma-secretase activating protein

HIF-1: *Hypoxia Inducible Factors 1*

HPM: haut poids moléculaire

HSF-1: *Heat shock factor 1*

I-CliPs: *Intramembrane-cliving proteases*

IDE: *insulin degrading enzyme*

IL: Interleukine

JNM: jonctions neuromusculaires

KI: knock-in

*KO: knockout*

LDDP : Ligands diffusibles dérivés du peptide bêta-amyloïde

LRC: liquide céphalo-rachidien

LRP: *low-density lipoprotein receptor related protein*

LTD: *long term depression*

LTP: long term potentialisation

MA: Maladie d'Alzheimer

MM: masse moléculaire

MMEL: *membrane metallo-endopeptidase like*

MN: motoneurones

MPEP: *2-Methyl-6-(phényléthynyl)pyridine*

NEP: néprilysine

NFκB: *nuclear factor-kappa B*

NICD: Notch intracellular domain

NMDA: acide N-méthyl-D-aspartique

NMDAR: récepteur NMDA

NTF: fragment aminoterminal

PenStr: Penicilline (10,000 U/ml) streptomycine (10 mg/ml)

Prt: protéine τ

PS: Plaques séniles

PSé: préséniline

*PSGL1: P-selectin glycoprotein ligand 1*

RAGE: *receptor for advanced glycation end products*

RE: réticulum endoplasmique

RIP: *regulated intramembrane proteolysis*

RNAi: RNA inhibiteur

RRM: RNA recognition motif

RTG: réseau trans-golgien

S2P: *site-2 protease*

sAPP $\alpha$ : APP soluble alpha

SLA: Sclérose latérale amyotrophique

SLAf: Sclérose latérale amyotrophique familiale

SLAs: Sclérose latérale amyotrophique sporadique

SNC: système nerveux central

SOD1: *superoxide dismutase 1*

Sp1: *specific protein 1*

SPP: *signal peptide peptidase*

SREBP: *sterol responsive*

STAT1: *Signal transducer and activator of transcription 1*

SVF: sérum foetal de veau

TDP-43: *transactive response DNA Binding protein 43*

TMP21/23: *transmembrane protein 21/23*

TEM: *transmission electron microscope* (électronique à transmission)

TNF- $\alpha$ : *Tumor necrosis factor- $\alpha$*

UBI: inclusions ubiquitinylées



*Vps35: vacuolar sorting protein 35*

Ne sont pas incluses dans cette liste les abréviations internationales utilisées pour les unités de mesure (ml, min par exemple).

Les locutions anglaises figurent en italiques.

# 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Donc, toutes choses étant causées et causantes,  
Aidées et aidantes,  
Médiates et immédiates,  
et toutes s'entretenant par un lien naturel et insensible,  
qui lie les plus éloignées et les plus différentes,  
je tiens impossible de connaître les parties  
sans connaître le tout,  
non plus que de connaître le tout,  
sans connaître particulièrement les parties.

Blaise PASCAL.

Pensées, article VI, première partie.

Le titre que nous avons donné à ce travail peut surprendre. Il nous faut le justifier, en rendant au passage justice à Blaise PASCAL dont nous avons mis en exergue une célèbre pensée.

Que vient faire le peptide bêta-amyloïde [A $\beta$ ] dans LES ou dans DES maladies neurodégénératives ? N'est-il pas généralement admis que son rôle est confiné à celui d'un déterminant essentiel de la maladie d'ALZHEIMER [MA] ? Pourquoi faudrait-il qu'en plus il le soit dans des maladies comme la sclérose latérale amyotrophique [SLA] et peut-être même, sans qu'on le sache encore avec certitude, dans d'autres maladies du système nerveux ?

Certes, dans le cerveau des patients atteints de cette démence, qualifiée jadis de "précoce" par son découvreur, on trouve à l'examen anatomo-pathologique deux types de lésions pathognomoniques : des formations appelées plaques séniles [PS] formées pour

l'essentiel d'A $\beta$  dans une forme courte (A $\beta_{1-40}$ ) et dans une forme longue (A $\beta_{1-42}$ ), associées en fibrilles insolubles, et des dégénérescences neurofibrillaires [DNF], constituées par l'accumulation d'une protéine dite protéine  $\tau$  [P $\tau$ ] anormalement et exagérément phosphorylée, dans le cytoplasme des neurones (Buxbaum and Linke, 2012; Grateau et al., 2005). Cette anomalie l'empêche de jouer son rôle physiologique dans l'assemblage des microtubules neuronaux (Rodríguez-Martín et al., 2013). Mais la question demeure et, selon nous, aucune réponse vraiment satisfaisante ne lui a été apportée. Ces caractéristiques anatomo-pathologiques sont-elles la cause ou la conséquence de la maladie ? Résultent-elles d'une anomalie située en amont de la voie de clivage de l'APP [pour *amyloid precursor protein*] dont la cause est encore inconnue et qui orienterait ce clivage vers la production d'A $\beta$  ? Une chose est avérée : on peut retrouver des PS dans le cerveau de sujet âgés qui n'ont présenté aucun symptôme (notamment la désorientation, la perte de mémoire immédiate et des signes de démence) de MA avant leur mort, et ceci en des densités analogues à celles que l'on retrouve dans le cerveau de sujets malades. Les PS, à elles seules, ne peuvent donc rendre compte des symptômes de la MA. Mais la formation de ces fibrilles insolubles est précédée de toute une série d'étapes d'oligomérisation engendrant des structures complexes ; il convenait de voir si certains de ces intermédiaires sont pourvus d'une toxicité propre. Dans la section consacrée à l'état de l'art, on verra que c'est en effet le cas. Il faudrait alors voir comment, dans un cerveau sain, les formes putativement toxiques d'oligomères d'A $\beta$  [A $\beta$ O] sont éliminées ou ne sont pas engendrées. On a quelques lumières sur cette question, dans la mesure où certains sujets présentant un allèle particulier d'apolipoprotéine, l'apolipoprotéine E4 présente une plus grande sensibilité à la MA (Bian et al., 2004). Des travaux relativement récents ont du reste montré que la stimulation de la production d'ApoE par un agent antiméiotique chez des souris transgéniques présentant des symptômes de MA a des effets thérapeutiques manifestes (Cramer et al., 2012). Il faut donc selon nous ré-envisager à frais nouveaux la physiopathologie de la MA, en essayant de se départir des préjugés et des idées reçues. L'une de ces idées reçues ou en tout cas une idée prédominante, est que l'APP est produit essentiellement par les cellules du système nerveux central [SNC], ce qui conduit les chercheurs à concentrer leur intérêt sur les neurones. Mais l'APP, qui est une glycoprotéine membranaire intégrale, se retrouve aussi dans de nombreuses autres cellules appartenant à des tissus très divers. Et rien ne prouve que ces tissus ne peuvent pas engendrer aussi de l'A $\beta$  en utilisant l'une des deux voies possibles de

clivage de l'APP : la voie physiologique qui aboutit à la production d'un fragment soluble, le sAPP $\alpha$  et la voie pathologique qui aboutit à la forme amyloïde ou A $\beta$  (en fait le fragment amyloïde peut être constitué de 39 à 43 acides aminés [AA] avec une prédominance des formes A $\beta$ <sub>1-40</sub> et A $\beta$ <sub>1-42</sub>, cette dernière forme étant majoritaire dans les PS (Lewczuk et al., 2004). Dans la section consacrée à l'état de l'art, ces diverses voies seront décrites en détail.

Notre attention a été attirée par une observation de (Stéphan et al., 2001). Travaillant sur un modèle murin de MA associé à la production d'une importante quantité d'A $\beta$ , les auteurs ont remarqué que les motoneurones [MN] de ces animaux mouraient en grand nombre. Le fait nous a conduit à rechercher un éventuel lien entre l'A $\beta$  et d'autres maladies neurodégénératives dont la SLA.

C'est donc tout naturellement vers les modèles murins de SLA d'origine génétique que nous avons cherché des informations susceptibles de fournir des indices suffisants en faveur de ce lien. Plusieurs auteurs (Bryson et al., 2012) ont montré qu'il existe une forte concentration d'A $\beta$  dans la moelle épinière de souris SOD1 G93A (animaux modèles d'une forme héréditaire de SLA), colocalisé dans les zones où abonde la mort des MN. De plus des souris mutées pour le gène de la SOD1, et dont on a invalidé le gène de l'APP voient la mortalité de leurs MN considérablement diminuée et l'intégrité de leurs jonctions neuromusculaires [JNM] protégée. Ces observations suggèrent que l'APP endogène contribue à la physiopathologie de la MA (Bryson et al., 2012).

Par ailleurs, nous nous sommes intéressées, par une sorte d'effet de contiguïté — dont nous nous expliquerons le moment venu —, à la TDP-43 qui s'accumule anormalement dans le cytoplasme des neurones moteurs de sujet atteints de SLA, au lieu de rester confinée en son lieu physiologique, le noyau (Pelletier et al., 2012). Une telle accumulation évoque, au moins par ses possibles effets, l'accumulation de Pr $\tau$  dans les neurones des patients atteints de MA.

Toutes ces observations nous ont mené à étudier les mécanismes neurotoxiques des oligomères de l'A $\beta$  et le lien possible entre le glutamate et le peptide A $\beta$  dans les maladies neurodégénératives et plus particulièrement dans la MA et dans la SLA.

Enfin, nous voudrions terminer ce court avant-propos par ne remarque très importante. Nous avons réalisé ce travail au sein de l'entreprise Neuro-Sys, une société de service qui se propose de développer et développe effectivement des modèles robustes de cultures primaires de divers neurones, associées le cas échéant à d'autres cellules d'intérêt, mimant autant qu'il est possible des maladies neurodégénératives. Il s'agit pour cette société d'étudier les propriétés de nouvelles molécules développées par les compagnies pharmaceutiques, à un stade situé en amont des études précliniques, mais dans des conditions qui permettent à ces compagnies d'arrêter ou de continuer le développement de leurs composés. Notre objectif a été de comprendre, dans le cadre de la mise au point de différents modèles, le rôle de l'A $\beta$  dans le développement des maladies neurodégénératives, telles que la MA et la SLA, de façon à trouver de nouvelles issues thérapeutiques.

## 2.ÉTAT DE L'ART

### 2.1. Le peptide amyloïde et les maladies neurodégénératives.

#### 2.1.1. Les amyloïdoses ou amyloses.

Les amyloïdoses ou amyloses se définissent par l'accumulation tissulaires de protéines anormalement repliées, et qui, pour cette raison s'agrègent sous forme de fibres, dans des conditions pourtant physiologiques de pH et de force ionique. Cette accumulation conduit à la formation de dépôts qualifiés d'amyloïdes (Buxbaum and Linke, 2012; Grateau et al., 2005). On doit au très célèbre anatomopathologiste Rudolph VIRCHOW la paternité du qualificatif "amyloïde" ; en effet il décrit la coloration bleue que prennent ces dépôts sous l'action conjuguée de l'iode et de l'acide sulfurique, une coloration analogue à celle que, dans ces conditions, prend l'amidon. C'est très récemment que les méthodes d'analyse biochimique ont permis d'identifier des protéines très diverses, susceptibles de former ces dépôts (Tableau 1 selon l'International Society of amyloidosis).

Les précurseurs de ces fibres sont des protéines sériques, circulantes, solubles, entières ou tronquées. Le mécanisme exact qui conduit à leur changement de conformation et à la formation de fibres dans des tissus très divers selon la molécule responsable, n'est pas encore élucidé. Les protéines amyloïdogènes ne possèdent pas de séquences, de propriétés structurales ou fonctionnelles communes. Il n'y a pas davantage de mécanisme physiopathologique commun à toutes les amyloses. Leur aspect clinique dépend de la molécule responsable et du tissu atteint. Le seul trait commun est cette propension inexpiquée à former des dépôts fibrillaires. Une classification des amyloses a été établie par l'ISA [*International Society of amyloidosis*] (Tableau 1). On dénombre une trentaine de protéines susceptibles d'engendrer des amyloïdoses humaines. Dix d'entre elles ont été identifiées chez l'animal (Sipe et al., 2012).

Fibril protein	Precursor protein	Systemic and/or localized	Acquired or hereditary	Target organs
AL	Immunoglobulin light chain	S, L	A, H	All organs, usually except CNS
AH	Immunoglobulin heavy chain	S, L	A	All organs except CNS
AA	(Apo) Serum amyloid A	S	A	All organs except CNS
ATTR	Transthyretin, wild type	S	A	Heart mainly in males, ligaments, tenosynovium
	Transthyretin, variants	S	H	PNS, ANS, heart, eye, leptomeninges
A $\beta$ 2M	$\beta$ 2-Microglobulin, wild type	S	A	Musculoskeletal system
	$\beta$ 2-Microglobulin, variant	S	H	ANS
AApoAI	Apolipoprotein A I, variants	S	H	Heart, liver, kidney, PNS, testis, larynx (C-terminal variants), skin (C-terminal variants)
AApoAII	Apolipoprotein A II, variants	S	H	Kidney
AApoAIV	Apolipoprotein A IV, wild type	S	A	Kidney medulla and systemic
AApoCII	Apolipoprotein C II, variants	S	H	Kidney
AApoCIII	Apolipoprotein C III, variants	S	H	Kidney
AGel	Gelsolin, variants	S	H	PNS, cornea
ALys	Lysozyme, variants	S	H	Kidney
ALECT2	Leukocyte chemotactic factor-2	S	A	Kidney, primarily
AFib	Fibrinogen $\alpha$ , variants	S	H	Kidney, primarily
ACys	Cystatin C, variants	S	H	PNS, skin
ABri	ABriPP, variants	S	H	CNS
ADan*	ADanPP, variants	L	H	CNS
A $\beta$	A $\beta$ protein precursor, wild type	L	A	CNS
	A $\beta$ protein precursor, variant	L	H	CNS
A $\alpha$ Syn	$\alpha$ -Synuclein	L	A	CNS
ATau	Tau	L	A	CNS
APp	Prion protein, wild type	L	A	CJD, fatal insomnia
	Prion protein variants	L	H	CJD, GSS syndrome, fatal insomnia
	Prion protein variant (Pro)calcitonin	S	H	PNS
ACal	(Pro)calcitonin	L	A	C-cell thyroid tumors
AIAPP	Islet amyloid polypeptide**	L	A	Islets of Langerhans, insulinomas
AANF	Atrial natriuretic factor	L	A	Cardiac atria
APro	Prolactin	L	A	Pituitary prolactinomas, aging pituitary
AIns	Insulin	L	A	Iatrogenic, local injection
ASPC***	Lung surfactant protein	L	A	Lung
AGal7	Galectin 7	L	A	Skin
ACor	Corneodesmosin	L	A	Cornified epithelia, hair follicles
AMed	Lactadherin	L	A	Senile aortic, media
AKer	Kerato-epithelin	L	A	Cornea, hereditary
ALac	Lactoferrin	L	A	Cornea
AOAAP	Odontogenic ameloblast-associated protein	L	A	Odontogenic tumors
ASem1	Semenogelin I	L	A	Vesicula seminalis
AEnf	Enfurvitide	L	A	Iatrogenic

\*Proteins are listed, when possible, according to relationship. Thus, apolipoproteins are grouped together, as are polypeptide hormones.

\*ADan is the product of the same gene as ABri.

\*\*Also called amylin.

\*\*\*Not proven by amino acid sequence analysis.

Tableau 1: Classification des amyloses [selon l'International Society of amyloidosis]

On divise les amyloses en deux catégories, selon qu'elles sont localisées à hauteur d'un seul organe ou d'un tissu spécifique, ou qu'elles sont systémiques lorsqu'elles siègent dans plusieurs tissus ou organes (Chiti and Dobson, 2006). Certaines de ces amyloses sont sporadiques d'autres sont héréditaires et transmissibles.

Pour être qualifiées avec certitude de fibres amyloïdes, ces formations doivent posséder des caractéristiques physicochimiques particulières. Elles présentent une biréfringence verte lorsqu'elles sont observées au microscope à lumière polarisée après avoir

été marquées au rouge Congo (Klunk et al., 1999). On observe un déplacement du pic d'absorption du colorant de 500 nm à 530-540 nm. Les fibres amyloïdes peuvent également se lier à la thioflavine T. Cette liaison entraîne un déplacement du maximum du spectre d'absorption de 385 à 450 nm, et un déplacement du maximum du spectre d'émission de 445 à 480 nm.

En outre, lorsque ces fibres amyloïdes sont observées au microscope électronique à transmission [TEM pour *transmission electron microscope*] ou à force atomique [ATM pour *atomic force microscope*], elles apparaissent comme rectilignes, enchevêtrées mais non ramifiées, et possèdent un diamètre de 10 nm environ (Cohen and Calkins, 1959) .

Enfin, les fibres amyloïdes, comme le montrent les études de diffraction des rayons possèdent toutes des feuillets  $\beta$  croisés, disposés perpendiculairement ou presque à l'axe de la fibre, et liés entre eux par des liaisons hydrogènes intermoléculaires s'étendant parallèlement à l'axe de la fibre. Il s'agit là de motifs architecturaux et non de séquences communes.

Ainsi qu'il a été dit plus haut, les dépôts ou plaques amyloïdes se retrouvent principalement dans les espaces intercellulaires de divers organes et tissus. Néanmoins, il existe des inclusions intracellulaires dites "de type amyloïde" (Tableau 2). Parmi ces inclusions, seules les inclusions de la protéine Tau (Prt) présentent toutes les caractéristiques des fibres amyloïdes citées plus haut.

Nom de l'inclusion	Site	Nature de la protéine	Nombre de résidus	Structure à l'état natif	Exemples de maladies associées
Corps de Lewy	Neurones	$\alpha$ -synucléine	140	Non structurée	Maladie de Parkinson
Corps de Huntington	Neurones	Huntingtine avec extension de polyglutamate	3 144	Non structurée	Maladie de Huntington
Dégénérescences neurofibrillaires	Neurones	Tau	352-441	Non structurée	Maladie d'Alzheimer

Tableau 2 : Inclusions intracellulaires de type amyloïde. (D'après (Sipe et al., 2012))



Le diagnostic clinique d'une amylose est difficile. La détermination de sa nature précise exige un examen histologique et par conséquent une biopsie.

### 2.1.2. La maladie d'Alzheimer.

La MA est une maladie neurodégénérative sévère. La gloire de son identification revient à un neuropsychiatre allemand, Aloïs ALZHEIMER, qui l'a décrite en 1907, chez une patiente répondant au nom d'Auguste DETER (cf. la traduction de l'article original, 1995 ; Fig. 1). Ce travail lui vaudra de voir son nom attaché à l'une des maladies neurodégénératives la plus fréquente et des plus redoutées. Alzheimer remarque, chez cette patiente de 51 ans, une réduction de la compréhension du langage, et de la mémoire, une aphasie très prononcée, un comportement imprévisible, de la paranoïa et de hallucinations auditives (Hippius and Neundörfer, 2003).

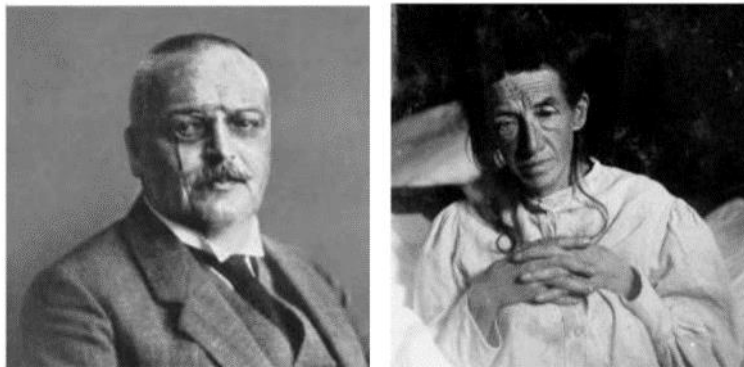


Figure 1 : Portrait d'Aloïs Alzheimer et d'Auguste Deter.

D'après (Hippius and Neundörfer, 2003).

Alzheimer est un neuropathologiste qualifié. Il décrit les deux lésions pathognomoniques retrouvées dans le cortex cérébral de la patiente atteinte de MA : la présence de dépôts ou plaques amyloïdes ou PS, extracellulaires, et les dégénérescences neurofibrillaires [DNF ou *neurofibrillary tangles* en anglais] intracellulaires (Fig. 2 ; (Blennow et al., 2006; Kundra et al., 2017; Stelzma et al., 1995). Les PS sont constituées majoritairement d'A $\beta$ , peptides de 40 à 42 acides aminés [AA] (Glennner and Wong, 1984; Hardy and Selkoe, 2002; Sandebring et al., 2013). Les dépôts amyloïdes résultent de l'agrégation d'A $\beta$  sous forme de fibres, et les DNF sont des agrégats de Pr $\tau$  anormalement phosphorylée et formés de fibres possédant les caractéristiques d'une protéine amyloïde (Kosik et al., 1986).

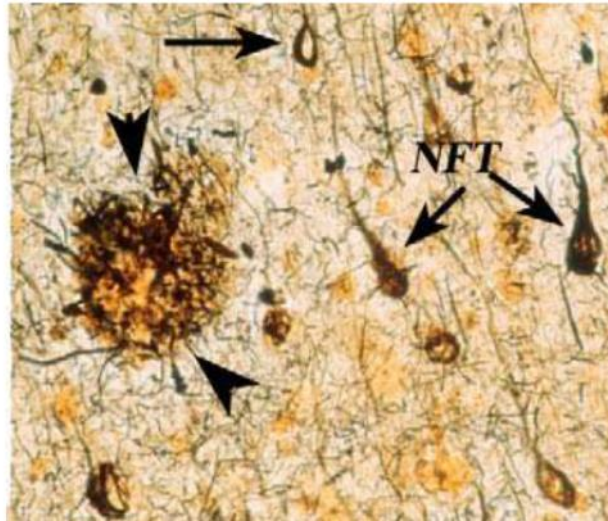


Figure 2 : Lésions anatomopathologiques spécifiques de la maladie d'Alzheimer (Mroczko et al., 2018) NFT (flèches) plaque sénile (pointes de flèches).

La MA est la première cause de démence humaine. En 2015, elle touchait 46,8 millions de sujets de par le monde, essentiellement dans les pays développés, sans doute en raison de l'allongement de la durée de vie dans ces régions. Les projections prévoient qu'il pourrait y avoir 75,6 millions d'êtres humains frappés de MA en 2030, et 131,5 millions en 2050 (Mroczko et al., 2018). La MA a un impact économique et social considérable. Son coût total actuel s'élève à environ un trillion de dollars américains par an. (*World Alzheimer Report*, 2018).

Cliniquement, la MA se caractérise par des troubles de la mémoire, de l'attention, de l'élocution, de la compréhension et du comportement (troubles de la personnalité). Elle commence par une phase asymptomatique de plusieurs années avant que n'apparaissent les premiers symptômes et signes cliniques. Les troubles vont alors s'aggraver inexorablement, et rendre la maladie de plus en plus invalidante. Incurable, la MA peut durer de 15 à 20 ans.

Il existe deux types de MA. Le premier est constitué des formes sporadiques. Il inclut l'écrasante majorité des cas puisqu'on y range 99 % d'entre eux. Dans les formes sporadiques, l'âge est le principal facteur de risque. Le deuxième est constitué par les formes familiales. Ces dernières sont d'origine génétique. Elles sont beaucoup plus agressives et apparaissent chez des sujets plus jeunes.

Chez les patients souffrant de MA, l'anatomopathologie montre que la dégénérescence neuronale apparaît d'abord dans le cortex entorhinal. La lésion progresse

alors petit à petit dans les zones voisines (de Calignon et al., 2012). On note alors l'apparition de lésions dans l'hippocampe, zone impliquée dans le processus de mémorisation, puis une atrophie corticale diffuse avec une prédominance pariéto-occipitale qui rend compte de la symptomatologie triadique : aphasie, apraxie, agnosie. Globalement le cerveau présente une perte neuronale massive (Fig. 3).

Le premier signe clinique frappant est la perte de mémoire à court terme ou amnésie ; elle se manifeste initialement par des distractions mineures qui s'accroissent alors que la maladie progresse, tandis que les souvenirs plus anciens sont relativement préservés. Au fur et à mesure que les désordres s'accroissent, le déclin cognitif s'étend au langage (aphasie), aux mouvements qui deviennent maladroits (apraxie), et à la reconnaissance des personnes ou des objets (agnosie).

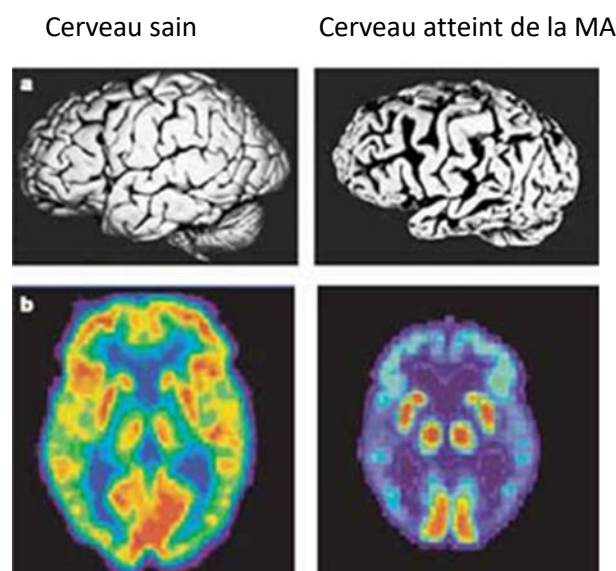


Figure 3 : Comparaison du cerveau d'un sujet sain et d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer.

(D'après (Mattson, 2004)) a) Volume global du cerveau (rétrécissement marqué du lobe temporal (partie basse) et des lobes frontaux (partie gauche)). b) Imagerie TEP révélant le glucose : le patient atteint d'Alzheimer montre une forte diminution du métabolisme énergétique dans le cortex frontal (haut du cerveau) et les lobes temporaux (sur les côtés).

Actuellement, la maladie n'est diagnostiquée que de façon souvent très tardive, 15 à 20 ans après l'enclenchement du processus neurodégénératif (Jack and Holtzman, 2013) ; elle l'est essentiellement sur la base d'épreuves neuropsychologiques. En dépit de nettes avancées dans le domaine de l'imagerie, il n'est toujours pas possible de procéder à un dépistage précoce et fiable de la MA. Elle reste confinée au statut de « supposée ». Le diagnostic définitif

ne peut être fermement établi qu'après l'examen histologique *post-mortem* de coupes de cerveau.

Dans l'état actuel de nos connaissances, on ne dispose que de traitements symptomatiques, qui ne font que retarder le cours de la maladie, sans s'attaquer à ses causes. Comme le nombre de cas ne peut qu'augmenter en raison du vieillissement de la population, la MA constitue d'ores et déjà un enjeu majeur de santé publique. Pour être galvaudé par les médias, le terme n'en désigne pas moins une situation bien réelle. C'est pourquoi se développent aujourd'hui de nombreux travaux consacrés à l'étude de nouvelles voies thérapeutiques. Il est loisible de comprendre que seule la connaissance des mécanismes physiopathologiques de la maladie permettra de concevoir rationnellement des traitements s'attaquant aux causes plutôt qu'aux symptômes.

Pour l'instant, nous disposons d'éléments assurés qui orientent, à tort ou à raison, les études physiopathologiques : la présence des PS ou plaques amyloïdes, les DNF (Huang and Mucke, 2012). L'atrophie cérébrale, la perte de neurones, l'inflammation des tissus cérébraux atteints, sont également des éléments importants de l'énigme physiopathologique. De nombreux rapports décrivent la perte des synapses dans les cerveaux des sujets atteints de MA, lesquelles semblent être corrélatives aux changements observés, notamment au déclin cognitif (Terry et al., 1991). Mais c'est l'A $\beta$  qui à l'heure actuelle est au centre de tous les intérêts. Les nouvelles thérapeutiques visent donc à réduire le taux d'A $\beta$  dans le cerveau.

Nous pensons que cette approche n'est certes pas inutile ou inefficace, mais qu'elle est encore très en aval de la cause initiale qui entraîne l'apparition de l'A $\beta$  et de la Pr $\tau$ .

### 2.1.3. La sclérose latérale amyotrophique.

Plus connue sous le nom de maladie de CHARCOT, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) doit son nom au neurologue français Jean-Martin CHARCOT (1825-1893) qui a été le premier à la décrire en 1869. C'est à l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière, à Paris, que le célèbre neurologue présenta son étude sur cette maladie. Il montra que les patients étaient atteints d'un rétrécissement des bords de la moelle épinière qu'il qualifia de « sclérose latérale » associée à une fonte musculaire ou « amyotrophie ».

La SLA est une maladie neurodégénérative évolutive conduisant à la dégradation (sclérose) des voies motrices spinales (cordons latéraux) et à l'atrophie musculaire

(amyotrophie), consécutives à l'atteinte des neurones moteurs. Sur le plan clinique, elle se caractérise par des faiblesses musculaires, puis des paralysies, conduisant progressivement et quasiment toujours à la mort par insuffisance respiratoire (Zufiría et al., 2016). La SLA est la troisième maladie neurodégénérative de l'adulte la plus fréquente, après la MA et la maladie de PARKINSON (Renton et al., 2014).

Dans l'ensemble des pays développés (Europe et États-Unis), l'incidence de la SLA est de l'ordre de 2 pour 100 000, et sa prévalence est de 4-5 pour 500 000 (Tan et al., 2014; Turner and Talbot, 2008). Il existe deux formes de SLA, la forme sporadique [SLAs] qui représente 90 % des cas diagnostiqués, et la forme familiale ou héréditaire [SLAf] qui constitue le reste du contingent, soit 10 % des cas. Environ 60 % des patients atteints de SLAf et 20 % des patients atteints de SLAs présentent une mutation génétique identifiée responsable de la maladie (SLA) (Vucic et al., 2014). Plus de 20 gènes semblent impliqués directement ou non dans la maladie ; les quatre plus importants sont SOD1 [*superoxide dismutase*], C9ORF72 [*chromosome 9 open reading frame 72*], FUS [*fused in sarcoma*] et TARDBP [TDP-43] [*TAR DNA Binding protein 43*] (Patten et al., 2014); ils sont impliqués dans la surexpression ectopique de protéines mal configurées (Blokhuis et al., 2013). La mutation de C9ORF72 est la plus fréquemment identifiée dans les SLA et dans les démences fronto-temporales [FTD pour *frontotemporal dementia*].

L'étiologie de la SLA, comme du reste celle de nombreuses autres maladies neurodégénératives, est fortement multifactorielle (Ferraiuolo et al., 2011). Elle est associée, mais non limitée à l'excitotoxicité induite par le glutamate, au stress oxydatif, à l'inflammation, à la limitation ou la perte de facteurs neurotrophiques, au repliement anormal des protéines [*protein misfolding*] et l'accumulation de la protéine défectueuse, à un contrôle déficient de la qualité des protéines produites, et enfin à un dysfonctionnement mitochondrial (Dunkel et al., 2012). Malgré de multiples études précliniques et essais cliniques, le mécanisme physiopathologique exact de la maladie et de sa progression est toujours en grande partie inconnu.

Il existe quelques différences entre les SLAs et les SLAf. L'âge d'apparition des symptômes est compris entre 60 et 85 ans pour les SLAs, alors qu'il est plus précoce dans le cas des SLAf, puisqu'il est situé entre 47 et 52 ans (Kiernan et al., 2011). La SLAs frappe plus fréquemment les hommes que les femmes puisque l'on compte 1,3 à 1,5 cas masculins pour 1 cas féminin, (Couratier et al., 2016) alors que la SLAf frappe autant les hommes que les

femmes. L'espérance moyenne de vie est de l'ordre de 3 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes et signes cliniques.

En raison de l'hétérogénéité phénotypique de la maladie et de l'absence de biomarqueur spécifique, le diagnostic de la SLA est souvent difficile et surtout retardé. On estime qu'il s'écoule en moyenne entre 9 et 13 mois entre l'apparition de signes et le diagnostic. Par moyenne, il faut entendre « médiane », ce qui signifie que la moitié des cas seulement sont diagnostiqués dans ce délai (Swinnen and Robberecht, 2014). Le lieu de départ de la maladie est variable ; mais son évolution est caractérisée par une extension progressive des déficits moteurs conduisant à une atteinte motrice diffuse (Pradat et al., 2009).

L'excitabilité des neurones moteurs est augmentée dans des proportions pathologiques. Il en résulte une cascade d'événements toxiques dépendant du calcium, lesquels conduisent à la mort du neurone atteint. Ces phénomènes sont définis par le vocable général d'excitotoxicité. L'excitabilité des neurones moteurs dépend de leurs propriétés électriques intrinsèques et extrinsèques ; l'augmentation de l'excitabilité peut ainsi résulter soit d'une hyperexcitabilité liée au neurone, soit d'une hyperexcitation extérieure au neurone lui-même (Ilieva et al., 2009; King et al., 2016; Leroy and Zytnicki, 2015).

Le Tableau 3 présente quelques signes cliniques retrouvés dans la SLA.

	Tronc cérébral	Muscles axiaux	Membres
Atteinte des motoneurones périphériques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Paralysie labio-glosso-pharyngée : troubles de la mastication, dysphagie, dysarthrie, stase salivaire</li> <li>- Atrophie de la langue avec fasciculations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Camptocormie : anomalie posturale marquée par une flexion antérieure du tronc en position debout.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amyotrophie</li> <li>- Crampes et fasciculations</li> <li>- Perte des réflexes ostéo-tendineux</li> <li>- Faiblesse musculaire</li> </ul>
Atteinte des motoneurones centraux	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spasticité mandibulaire</li> <li>- Dysphagie</li> <li>- Dysarthrie</li> <li>- Hypersialorrhée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence de réflexes cutanés abdominaux</li> <li>- Troubles de l'équilibre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spasticité</li> <li>- Hyper-réflexie</li> <li>- Signe de Babinsky</li> <li>- Troubles de la coordination</li> </ul>

Tableau 3 : Signes cliniques et symptômes associés à la sclérose latérale amyotrophique ; (D'après(Brooks, 1994)).

Comme le début de la maladie est insidieux, marqué par des signes peu spécifiques, le diagnostic de SLA est souvent posé tardivement, avec un délai moyen (et non plus médian) de 13,4 mois (Gil et al., 2009). Il peut même être posé jusqu'à 24 mois après l'entrée discrète dans la maladie. C'est pourquoi, pour affirmer le diagnostic de SLA, il a été développé des critères dit de l'El Escorial, par la *World Federation of Neurology Group on Motor Neuron Disease*. Pour être posé, le diagnostic de SLA requiert de répondre positivement à ces quatre signes :

1. Il y a des preuves de dégénérescence des motoneurones périphériques.
2. Il y a des preuves de dégénérescence des motoneurones centraux.
3. L'aggravation des signes est progressive et se fait de proche en proche.

4. Il n'existe pas d'arguments neuro-anatomiques, électrophysiologiques, anatomopathologiques en faveur d'une autre maladie neurologique.

La présence ou l'absence de ces signes permet de déterminer le degré de probabilité de l'existence de la maladie chez le sujet examiné. Dans cette classification, quatre régions du corps sont examinées indépendamment et successivement : région bulbaire, région cervicale, région thoracique, région lombo-sacrée. Si trois de ces régions présentent des atteintes des motoneurones centraux et périphériques, la maladie est classée comme SLA certaine ; elle est probable si deux régions sont atteintes ; et n'est que possible si une seule est touchée. L'excitotoxicité du glutamate est une des hypothèses invoquées pour expliquer la dégénérescence des motoneurones. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace pour combattre la SLA. Les soins aux patients se limitent à des traitements symptomatiques. Le riluzole (Rilutek®) s'est montré neuroprotecteur grâce à son action anti-glutamate. C'est à l'heure actuelle le seul traitement qui ait montré un bénéfice très modeste mais significatif sur la survie des patients atteints de SLA, en dehors des stades avancés de la maladie, quand il est employé à la dose de 100 mg/j (Lamanauskas and Nistri, 2008).

L'edaravone (Radicava®) est le premier traitement contre la SLA autorisé par la *Food and Drug Administration* [FDA] depuis 20 ans. C'est le seul agent anti-oxydant à avoir démontré une efficacité clinique pour le traitement de la SLA (Petrov et al., 2017). Comme il l'a été évoqué, le stress oxydant est supposé contribuer à la physiopathologie de la SLA. Les effets de l'edaravone ont été mis en évidence dans un modèle préclinique, des souris *wobbler* présentant des signes de SLA, avant le commencement des essais cliniques qui se sont révélés encourageants (Yoshino and Kimura, 2006). Les effets indésirables les plus sérieux observés avec un traitement à l'edaravone ont rapporté l'hypersensibilité et réactions allergiques aux sulfites, incluant des symptômes anaphylactiques. Les effets secondaires les plus communs ont été des bleus ou contusions, des perturbations de démarche, des maux de tête, des dermatites et de l'eczéma. Ces réactions ont été observé à hauteur de 10 % chez les patients traités (Cruz, 2018).

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majeur du SNC. Il est impliqué dans la transmission ainsi que dans la plasticité synaptique, dans la croissance et la différenciation neuronale, dans l'apprentissage, dans la mémoire (Butterfield and Pocernich, 2003). La fonction du système glutamatergique est de convertir une impulsion électrique nerveuse en



un stimulus chimique, en contrôlant finement la concentration du glutamate dans les synapses. Quand, pour diverses raisons, la concentration synaptique de glutamate est augmentée, il se produit une entrée massive de calcium dans le neurone post-synaptique, laquelle entraîne sa mort ( Sen et al., 2015; Van Den Bosch and Robberecht, 2000). Les motoneurones sont particulièrement sensibles aux fortes concentrations de glutamate (Van Den Bosch and Robberecht, 2000).

Parmi les changements pathologiques spécifiques du muscle, observés chez les patients aussi bien que sur des souris transgéniques pour le gène SOD1, on note une forte concentration de l'APP, coïncidant du reste avec l'apparition des premiers signes (Koistinen et al., 2006). Cette corrélation trouve une confirmation dans le fait que la surexpression de l'APP dans les muscles inhibe l'innervation *in vitro* (McFerrin et al., 1998). De plus et enfin, on a observé une augmentation de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> dans les motoneurones spinaux des souris SOD1 (Bryson et al., 2012).

## 2.2. Le peptide amyloïde

### 2.2.1. La protéine précurseur du peptide bêta-amyloïde et son traitement par les voies dites canoniques, non-amyloïdogène et amyloïdogène.

L'APP non tronquée, de pleine longueur, est une protéine transmembranaire de type I. Elle est biosynthétisée dans le réticulum endoplasmique [RE], puis elle est transportée à travers l'appareil de Golgi vers le réseau trans-golgien [RTG]. C'est dans les neurones qu'on la retrouve en plus grande concentration à l'état stable. Son expression est localisée principalement autour des synapses neuronales. C'est une protéine hautement conservée. Bien que son rôle primaire ne soit pas entièrement élucidé, il est acquis qu'il joue un rôle essentiel dans la plasticité neuronale et la formation des synapses (Nhan et al., 2015). L'APP subit un rapide transport antérograde dans les neurones. On a montré que lors de ce transport, elle interagit avec la kinésine-1 et fonctionnerait peut-être comme un récepteur membranaire de kinésine pour convoier le transport de la  $\beta$ -sécrétase [BACE1] et de préséniline 1. Il convient de mentionner que l'APP est un composant majeur du virus de

l'herpès humain, composant que ce dernier emprunte à sa cellule hôte. L'APP subit de nombreuses et complexes modifications post-traductionnelles : sulfatations, N- et O-glycosylations, phosphorylations (Weidemann et al., 1989). L'expression de l'APP est ubiquiste. Il en existe trois isoformes, engendrées par épissage alternatif du transcrit engendré par le gène. La forme neuronale de l'APP compte 695 AA (Suh and Checler, 2002), la forme astrocytaire en compte 751.

Le gène de l'APP est porté par le chromosome 21. Il y a été identifié environ 30 mutations ponctuelles dont nombre sont responsables des formes familiales de MA. Elles sont situées en général à hauteur ou à proximité des sites de clivages reconnus par les enzymes impliquées dans les deux voies de maturation de l'APP, non-amyloïdogène et amyloïdogène. Ces mutations n'engendrent pas forcément une augmentation de la production du peptide amyloïde, mais elles peuvent modifier le rapport des  $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$  (Lewczuk et al., 2004). Il existe des mutations qui ne semblent pas associées à des manifestations pathogènes et il en existe d'autres pour lesquelles il est difficile de les mettre en évidence et dont il convient de poursuivre l'étude.

La fonction de l'APP demeure mal connue. Des souris dont le gène APP a été invalidé sont viables et fertiles, mais elles présentent certaines anomalies, et notamment un défaut de croissance marqué par une taille et un poids nettement inférieur à ceux de leur contrepartie sauvage, associé également à une altération du développement cérébral, à des troubles de l'homéostasie du cuivre et des lipides, et à un net affaiblissement des capacités d'apprentissage et de mémorisation (Tremml et al., 1998).

Une fois produite, l'APP est soumis à un processus complexe de maturation, impliquant, notamment, une protéolyse particulière. Les principaux événements protéolytiques de l'APP sont imputables à groupe de protéases appelées sécrétases  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Epis et al., 2012). Elles reconnaissent, comme on va le voir, des sites transmembranaires ou péri-membranaires. Il est important de noter que les deux voies de maturation de l'APP sont physiologiques, la voie non-amyloïdogène comme la voie amyloïdogène (Sambamurti et al., 2002). C'est la prédominance de la dernière voie sur la première qui est pathologique (Mattson, 2004; Zhang et al., 2017). Nous envisagerons d'abord les rôles des  $\alpha$ - et  $\beta$ -sécrétases, avant d'envisager celui de la  $\gamma$ -sécrétase qui intervient dans les deux voies. Il existe aussi une voie de traitement de l'APP, dite non canonique (Nhan et al., 2015) qui sera traitée dans une section séparée.

L'ensemble des données qui suivent est illustré dans la Figure 4.

#### 2.2.1.1. Traitement du précurseur du peptide bêta-amyloïde par la voie de l'alpha-sécrétase : la voie non amyloïdogène.

L'A $\beta$  est produite dans le RE et le RTG. Mais l'APP peut être transporté dans des vésicules sécrétoires dérivées du RTG à la surface de la cellule. Il y est alors clivé par l' $\alpha$ -sécrétase en un produit soluble appelé APP soluble alpha [sAPP $\alpha$ ] ou bien réinternalisé, et il suit alors le chemin de la dégradation par la voie du système des endosomes/lysosomes. Il a été suggéré que le peptide A $\beta$  pourrait être également produit dans ce système. Alors que l'A $\beta$  est neurotoxique, le sAPP $\alpha$  est neuroprotecteur. On conçoit donc que la distribution subcellulaire de l'APP est très certainement un facteur important du processus de neurodégénérescence. C'est pourquoi la délimitation des mécanismes impliqués dans le trafic cellulaire de l'APP est absolument déterminante pour la compréhension de la physiopathologie de la MA.

Le clivage de l'APP par l' $\alpha$ -sécrétase empêche la génération de peptide A $\beta$ , car la liaison clivée est celle qui lie la Lys 16 à la Leu 17. L'hydrolyse de cette liaison engendre le sAPP $\alpha$  [fraction soluble d'APP engendrée par l' $\alpha$ -sécrétase], qui correspond à un grand ectodomaine de l'APP. La génération de sAPP $\alpha$  est un événement constitutif, mais elle peut être régulée par divers agents. L' $\alpha$ -sécrétase est sans doute une endoprotéase liée à la membrane qui clive l'APP essentiellement à hauteur de la membrane cytoplasmique. L'usage d'inhibiteurs de protéases appartenant à diverses classes a permis de montrer que l' $\alpha$ -sécrétase est une métalloprotéase à zinc. Plusieurs membres de la famille des métalloprotéases ADAM [*ADAM* (*Disintegrin and metalloproteinase domain*)] présentent une activité de type  $\alpha$ -sécrétase. Il en existe de nombreux sous-types. On a suggéré que trois d'entre elles pouvaient être l' $\alpha$ -sécrétase : ADAM9, ADAM10 et ADAM17. Comme l'APP, ce sont des protéines transmembranaires de type I.

##### 2.2.1.1.1. Implication d'ADAM17.

L'ADAM17 est aussi connu sous le nom d'enzyme de conversion du *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  [TNF- $\alpha$ ]. Le domaine extracellulaire du précurseur membranaire du TNF- $\alpha$  est clivé en

TNF- $\alpha$  soluble par cette enzyme. Des manipulations d'ADAM17 peuvent modifier le clivage  $\alpha$  de l'APP et la génération de peptide A $\beta$ . Des cellules déficientes en ADAM17 ne peuvent plus utiliser la voie du clivage  $\alpha$ -régulé. ADAM17 est donc très probablement l' $\alpha$ -sécrétase responsable de la production régulée de sAPP $\alpha$ . De plus, un inhibiteur d'ADAM 17 empêche le fonctionnement de la voie régulée de l'activité  $\alpha$ -sécrétase dans les neurones humains, tandis que la régulation négative de l'expression d'ADAM17 au moyen de RNA inhibiteur [RNAi] n'a pas d'effet sur la voie du clivage  $\alpha$ . D'autres études confirment qu'ADAM17 affecte la production régulée de sAPP $\alpha$ , mais non la production constitutive.

#### 2.2.1.1.2. *Implication d'ADAM9.*

La co-expression d'ADAM9 et d'APP promeut la production de sAPP $\alpha$  lors d'un traitement par un ester de phorbol. Ce résultat suggère qu'ADAM9 pourrait avoir une activité d' $\alpha$ -sécrétase. Cependant le RNAi d'ADAM9 n'a pas d'effet sur la production de sAPP $\alpha$ . ADAM9 interviendrait donc dans la production régulée de sAPP $\alpha$ .

#### 2.2.1.1.3. *Implication d'ADAM10.*

La surexpression d'ADAM10 augmente le clivage  $\alpha$ , tandis qu'une forme dominante négative de cette enzyme et son RNAi inhibent l'activité de clivage  $\alpha$  dans plusieurs lignées et types cellulaires, y compris les neurones de souris en culture primaire. Chose significative, on a noté que la génération de sAPP $\alpha$  est pratiquement abolie dans les neurones de souris présentant une mutation conditionnelle du gène ADAM10. On a également observé une chute brutale du niveau d'ADAM10 dans les plaquettes de patients atteints de MA sporadique. Cette chute est corrélative à la décroissance des niveaux de sAPP $\alpha$  retrouvés dans les plaquettes et le liquide céphalo-rachidien. L'ensemble de ces études suggèrent qu'ADAM10 est l' $\alpha$ -sécrétase constitutive, active à la surface de la cellule. Cette conclusion n'exclut pas que d'autres membres de la famille des enzymes ADAM exercent une fonction de clivage  $\alpha$  et soient donc fonctionnellement redondante. ADAM10 a sans doute une importance prédominante dans le cadre de la MA (Kuhn et al.,2016).

2.2.1.2. Traitement du précurseur du peptide bêta-amyloïde par la voie de la bêta-sécrétase ou voie amyloïdogène.

La première étape de production du peptide A $\beta$  est le clivage de l'APP par la  $\beta$ -sécrétase.

2.2.1.2.1. *Implication de la  $\beta$ -amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1.*

En 1999-2000 plusieurs groupes de recherche ont identifié une enzyme appelée BACE1 [ *$\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1*, encore appelée Asp2 ou mémapsine2] qu'ils ont identifiée à la principale  $\beta$ -sécrétase. BACE1 est le nom le plus commun de cette enzyme. C'est une aspartyl-protéase possédant un domaine transmembranaire de type I près de son extrémité carboxyterminale. La surexpression ou la régulation négative de l'expression de BACE1 induit ou supprime le clivage de l'APP aux sites  $\beta$  identifiés, Asp1 et Glu11 respectivement. Des études conduites *in vitro* avec des peptides synthétiques confirment la localisation du clivage de l'APP par BACE1 à ces sites. Ces résultats montrent de façon convaincante que BACE1 est bien la  $\beta$ -sécrétase impliquée dans le métabolisme de l'APP. Son activité, pense-t-on, est le facteur limitant de la production d'A $\beta$  à partir d'APP.

BACE1 est donc capable de cliver l'APP à son site  $\beta$  (en 1 et en 11 comme on vient de la dire ; numérotation de l'A $\beta$  ; Vassar et al., 1999). Mais la protéase reconnaît aussi des homologues de l'APP, APPLP1 et 2 (sans qu'il en résulte une production d'A $\beta$ ), une sialyltransférase résidant dans l'appareil de Golgi, ST6Gal1 (Kitazume et al., 2001), une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, PSGL1 [*P-selectin glycoprotein ligand 1*]. Dans les neurones, BACE1 est localisée dans les axones et les boutons terminaux présynaptiques (Kandalepas et al., 2013). Son transport axonal est régulé par des variations de niveaux de la calsynténine 1 (Steuble et al., 2012; Vagnoni et al., 2013), de rétromère vps35 [*vacuolar sorting protein 35*] (Wen et al., 2011), de Rab 11 et de protéines à domaine d'homologie Eps15 [*epidermal growth factor receptor substrate 15*] (Buggia-Prévot et al., 2013). L'augmentation de la concentration de BACE1 aux sites synaptiques peut conduire à augmenter la sortie d'A $\beta$  à hauteur des terminaisons synaptiques et faciliter ainsi la formation de dépôts amyloïdes (Sadleir et al., 2016). Il a été développé de très puissants inhibiteurs de BACE1 et ils ont été ou

sont étudiés en phase II/III dans des essais en cours (Chris Min et al., 2018; Dobrowolska Zakaria and Vassar, 2018; Ghosh and Tang, 2015; Oehlrich et al., 2014; Yan, 2016).

Un plus grand précurseur, pro-BACE1, est modifié par glycosylation et phosphorylation, puis clivé par une endoprotéase de type furine (Bennett et al., 2000) ; il engendre alors la BACE1 mature. BACE1 exige un environnement acide pour exprimer une activité optimale. Comme on s'y attend, la BACE1 surexprimée dans diverses cellules pré-mitotiques est retrouvée principalement dans l'appareil de GOLGI précoce, dans l'appareil de GOLGI tardif/endosomes précoces et dans les endosomes, qui justement fournissent un environnement acide. Les mécanismes régulant le trafic et l'activité de BACE1 ne sont pas encore entièrement élucidés. On notera simplement que BACE1 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles, dont des sulfatations, des palmitoylations, des N-glycosylations et la formation de trois ponts disulfures.

L'activité de BACE1 est très dépendante de son environnement lipidique. Ainsi, les glycosphingolipides neutres (cérébrosides), les glycérophospholipides anioniques et les stérols (cholestérol) induisent directement une augmentation de l'activité de l'enzyme alors que d'autres lipides, comme les céramides, agissent plutôt sur la stabilité de l'enzyme (Lu et al., 2019; Mielke et al., 2014). Les uns et les autres contribuent *in fine* à augmenter l'activité  $\beta$ -sécrétase globale. Inversement, l'interaction de BACE1 avec certaines protéines entraîne une baisse de son activité (sorLA/LR11 par exemple). La modulation du trafic de l'enzyme est également un moyen d'en réguler l'activité. BACE1 possède des séquences d'adressage vers certains compartiments subcellulaires, mais ces signaux sont modulables par certaines modifications comme la phosphorylation de S498 qui en modifie l'interaction avec la protéine cargo.

Il n'a pas encore été découvert de mutations du gène BACE1 susceptible d'être impliquées dans le développement de la MA (Cruts et al., 2001). Mais il est établi que l'activité de la  $\beta$ -sécrétase augmente significativement dans les cerveaux de patients atteints de formes sporadiques de MA (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2002). Le rôle physiologique de cette augmentation d'activité présente aussi chez le sujet sain non dément, et retrouvée au cours du vieillissement cérébral normal chez la souris, ou le singe, n'est pas encore élucidé (Fukumoto et al., 2002).

Le gène *BACE1* est porté par le chromosome 11. Son promoteur comporte de nombreux éléments de réponse à différents facteurs de transcription, dont ceux qui active

Sp1 [*specific protein 1*], GATA-1 [*Globin Transcription Factor 1*], AP1 [*adaptator protein 1*], AP2 [*adaptator protein 2*], CREB [C-AMP Response Element-binding protein], ainsi que les récepteurs des oestrogènes et des glucocorticoïdes. De même NFκB [*nuclear factor-kappa B*], STAT1 [*Signal transducer and activator of transcription 1*], HSF-1 [*Heat shock factor 1*], HIF-1 [*Hypoxia Inducible Factors 1*] peuvent également s'y lier. Il convient de remarquer que nombre des sites précités sont activés lors de stress cellulaires. De plus, on observe une intense réaction inflammatoire dans le cerveau des patients atteints de MA, laquelle pourrait induire indirectement une hausse de l'expression de BACE1 consécutivement à la production de cytokines pro-inflammatoires.

Au cours du vieillissement, NFκB est augmenté aussi bien chez les malades que chez les sujets sains. De plus le traitement de cellules HEK293 par de l'Aβ se traduit par une régulation positive de l'expression de NFκB qui se traduit ensuite par augmentation de la transcription de BACE1 (Chami et al., 2012). L'ensemble de ces données mettent en évidence l'existence d'une boucle de régulation positive reliant la hausse de production de NFκB à celle de BACE1 qui en retour augmenterait encore la production de ce facteur et de la β sécrétase.

#### 2.2.1.2.2. *Implication de la β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 2*

Une autre protéase, BACE2, homologue de BACE1, et dont le gène est localisé en 21q22.3, région critique dans la survenue du syndrome de Down [DS] ou trisomie 21, semble être impliquée dans l'activité de clivage β. Le DS est, lui aussi, associé à l'accumulation de peptide Aβ. La localisation du gène *BACE2* a suggéré qu'il existait un lien entre BACE2 et le traitement cellulaire de l'APP. Mais BACE2 est beaucoup moins efficace dans cette fonction que BACE1. En effet, elle coupe aussi l'APP près du site de clivage α et beaucoup plus efficacement qu'elle ne le fait pour le site β. BACE1 est donc la principale β-sécrétase, mais il n'est pas exclu que BACE2 puisse contribuer à la physiopathologie de la MA. Des souris *knockout* [KO] pour BACE2 sont globalement saines. Une double déficience en BACE1 et BACE2 augmente la létalité du phénotype de souris KO pour BACE1. Il y aurait donc une légère redondance fonctionnelle des deux enzymes.

#### 2.2.1.2.3. Implication de la cathepsine B.

Outre BACE1 et BACE2, la cathepsine B a été aussi présentée comme une  $\beta$ -sécrétase supplémentaire. L'inhibition de la cathepsine B, en effet, réduit la production d'A $\beta$  *in vivo* et *in vitro*. Mais ce rôle de  $\beta$ -sécrétase demande à être validé en profondeur.

#### 2.2.1.3. Production de précurseurs solubles bêta de la protéine précurseur du peptide bêta-amyloïde.

Lors du clivage  $\beta$ , l'ectodomaine de l'APP est libéré sous la forme de précurseur soluble bêta de la protéine précurseur du peptide bêta amyloïde [sAPP $\beta$ ]. Cette forme ne diffère du sAPP $\alpha$  que par l'absence de la région 1-16 à son extrémité carboxyterminale. Elle fonctionne cependant comme un ligand du *death receptor 6*. Elle est responsable de la mort des neurones et de la disparition progressive des neurites.

#### 2.2.1.4. Production des fragments carboxyterminaux alpha et bêta.

Après les clivages alpha et bêta, les fragments carboxyterminaux  $\alpha$  et  $\beta$  de l'APP [ $\alpha$ CTF et  $\beta$ CTF] restent associés à la membrane cytoplasmique et seront ultérieurement clivés par la  $\gamma$ -sécrétase. Comme les CTF de l'APP sont des produits intermédiaires, leurs fonctions ont été moins bien caractérisées. Cependant la surexpression du  $\beta$ CTF a des effets cytotoxiques et provoque la mort des neurones peut-être en perturbant la transduction du signal convoyé par l'APP. Les effets cytotoxiques du  $\beta$ CTF sont peut-être dus aux produits de clivages terminaux engendrés par la  $\gamma$ -sécrétase et par une caspase, au nombre desquels figureraient l'*APP intracellular domain* [AICD], C31 et Jcasp. Il se pourrait que le  $\beta$ CTF régule la délivrance de la  $\gamma$ -sécrétase à la surface de la cellule, par liaison directe enzyme-substrat. L' $\alpha$ CTF pourrait aussi posséder ces propriétés, car c'est aussi un substrat de la  $\gamma$ -sécrétase.



2.2.1.4.1. *Traitement des fragments carboxyterminaux par la voie de la gamma-sécrétase.*

L' $\alpha$ CTF ou le  $\beta$ CTF sont ensuite clivés par la  $\gamma$ -sécrétase, qui engendre, respectivement, le fragment p83 et le peptide A $\beta$ . Il s'agit là d'une protéolyse très particulière, dans la mesure où le site de clivage se situe au cœur de la membrane, un environnement hydrophobe, *a priori* peu propice à la protéolyse. Ce clivage est du type RIP [*regulated intramembrane proteolysis*] et fait intervenir un ensemble de protéases appelées I-CliPs [*Intramembrane-cliving proteases*] qui comprend, outre la  $\gamma$ -sécrétase, les protéines SPP [*signal peptide peptidase*], S2P [*site-2 protease*] et les rhomboïdes. Le premier substrat des I-CliPs à avoir été identifié a été la protéine SREBP [pour *sterol responsive*] impliquée dans le métabolisme des acides gras et des stérols. Dans une situation de déplétion en cholestérol, SREBP est transportée vers l'appareil de Golgi où elle subit successivement deux clivages : le premier se fait à hauteur de la lumière et le second se fait dans la membrane. Le clivage intramembranaire est opéré par S2P qui libère un fragment cytosolique. Après translocation dans le noyau, ce fragment soluble est susceptible d'activer la transcription de gènes cibles.

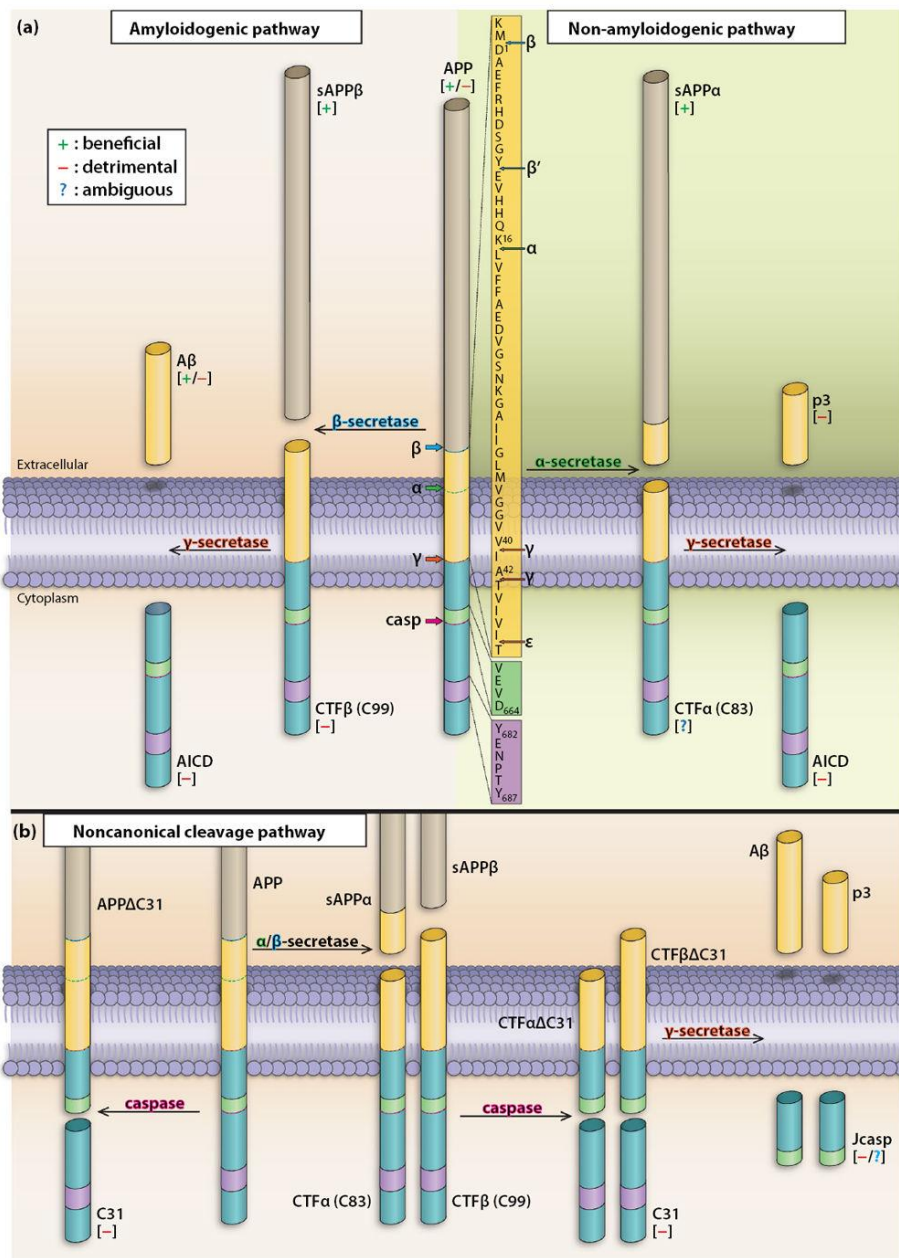


Figure 4 : Clivage séquentiel de la protéine précurseur du peptide bêta-amyloïde.

D'après (Nhan et al., 2015) (a) Voie non-amyloïdogène. Les protéines de la famille de l'APP présentent de grands ectodomains aminoterminaux, biologiquement actifs ainsi qu'un plus court domaine carboxyterminal qui contient une séquence cruciale, Tyrosine-Acide glutamique-Asparagine-Proline-Thréonine-Tyrosine [YENPTY] qui constitue un domaine de tri (a sorting domain) auquel se lient les protéines adaptatrices X11 et Fe65. Le peptide Aβ commence dans l'ectodomaine et continue dans la région transmembranaire. C'est l'α-sécrétase qui réalise le travail de production de le sAPPα.

(b) Voie amyloïdogène. Sont impliquées dans cette voie la β-sécrétase ou BACE1, d'abord, puis dans un deuxième temps la γ-sécrétase. Les deux processus produisent des ectodomains solubles, le sAPPα et le sAPPβ, et un fragment carboxyterminal intracellulaire identique dans les deux cas, l'AICD.

S2P est transmembranaire et possède toutes les propriétés d'une métalloprotéase à zinc (Rawson, 2013). Les SPP appartiennent à la deuxième famille des I-CliPs. Ce sont également des enzymes transmembranaires qui possèdent un signal de rétention dans le RER. Il s'agit d'aspartyl-protéases possédant deux résidus aspartyls au sein d'une séquence consensus formant le site catalytique, localisée au milieu de deux segments transmembranaires. Les rhomboïdes forment la troisième famille des I-CliPs. Le membre fondateur de cette famille est rhomboid-1, découvert chez la Drosophile (Urban, 2006). Les rhomboïdes sont des protéases à sérine. Ils ont pour particularité de ne pas exiger que leur substrat ait subi un clivage préalable pour les protéolyser. Il semble que les rhomboïdes requièrent une spécificité de séquence.

De toutes les protéases intramembranaires, la  $\gamma$ -sécrétase est de loin la plus étudiée, et ceci en raison du rôle qu'on lui attribue dans la physiopathologie de la MA. Contrairement aux autres I-CliPs, l'activité  $\gamma$ -sécrétase est portée par un ensemble multiprotéique complexe de haute masse moléculaire [MM] (Fig. 5). Le complexe porterait une activité aspartyl-protéase (Wolfe, 2010), dont les deux résidus aspartyls, supposés être impliqués dans la catalyse, sont portés par l'un par des composants du complexe, la préséniline [PSé] (Wolfe et al., 1999a). On verra plus bas que cette affirmation peut être discutée bien qu'elle soit couramment admise.

Nombre de preuves biochimiques semblent indiquer que l'activité  $\gamma$ -sécrétase réside en au moins quatre composants : la préséniline [PSé, PSé1 ou PSé2], la nicastrine, le facteur *anterior pharynx-defective-1* [APH-1], et l'augmenteur de la préséniline 2 [PEN-2 ; *presenilin enhancer 2*] (Edbauer et al., 2003). En effet, la co-transfection des quatre partenaires à une levure (qui ne possède pas d'activité  $\gamma$ -sécrétase) suffit à l'y créer. Inversement, l'inactivation de l'un ou l'autre des quatre partenaires réduit drastiquement la production d'A $\beta$  (Francis et al., 2002). La formation du complexe a lieu très tôt dans la voie de sécrétion (Capell et al., 2005). L'assemblage des quatre partenaires est séquentiel. Et il n'existe qu'un exemplaire de chacun d'eux dans le complexe (Sato et al., 2007). Dans l'un des modèles d'assemblage proposés, la nicastrine s'associe d'abord avec APH-1 (Shirovani et al., 2004), puis cet ensemble stabilise la PSé sous sa forme intacte ; le complexe ternaire recrute alors PEN-2, et ce recrutement va permettre la maturation de la PSé. Elle se fait par clivage de l'holoprotéine en deux fragments carboxy et aminotermiaux. Il en résulte la formation d'un hétérodimère de ces deux fragments, entité biologiquement active des PSé au sein du complexe (Wolfe, 2010).

Il existe deux homologues de la PSé chez les Mammifères, PSé1 et PSé2. Des mutations dans ces gènes, et tout spécialement, dans le gène *PSé1*, sont les responsables de la majorité des cas familiaux de MA.

#### 2.2.1.4.1.1. Les présénilines.

Les PSé sont des protéines à multidomains transmembranaires ; le nombre exact de ces domaines n'est pas clairement déterminé. Les PSé naissantes subissent un clivage endoprotéolytique. Le fragment aminoterminal [NTF] et le fragment carboxyterminal [CTF] résultants forment un hétérodimère. Les PSé possèdent deux résidus aspartyls hautement conservés, indispensables semble-t-il à l'expression de l'activité  $\gamma$ -sécrétase. Les hétérodimères NTF/CTF de la PSé1 sont liés par des inhibiteurs d'analogues de transition de la  $\gamma$ -sécrétase. Cet effet suggère que les PSé sont vraiment les éléments catalytiques centraux de cette enzyme. Ce point a été confirmé par des essais conduits *in vitro*.

##### a. La préséniline 1.

Le gène codant la PSé1 a été identifié chez l'homme en 1995. Il est localisé sur le chromosome 14. Il s'est trouvé associé à une forme familiale de MA quand il est porteur de mutations (Citron et al., 1997). La région promotrice minimale du gène ne comprend que 28 paires de bases, mais comporte un site de liaison pour les protéines Ets [*E-twenty six*] et un site de liaison pour CREB (Mitsuda et al., 2001). Le facteur de transcription p53 agit comme un répresseur du promoteur de *PSé1* (Pastorcic and Das, 2007).

On connaît aujourd'hui plus d'une centaine de mutations du gène *PS1*. Elles sont toutes dominantes et sont impliquées dans plus de 80 % des formes familiales de MA. Il s'agit en général de formes très agressives, de déclenchement précoce (entre 25 et 30 ans). La PSé1 est exprimée dans le SNC ainsi que dans les tissus périphériques. Il s'agit d'une protéine très conservée au cours de l'évolution dont on a trouvé des gènes orthologues aussi bien chez le nématode *Cenorhabditis elegans* (Levitan and Greenwald, 1995) que chez la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* (van de Hoef et al., 2009).

Dans la cellule, la PSé1 est principalement localisée dans les membranes intracellulaires de l'enveloppe périmoléculaire, dans les membranes du RE et dans celles de l'appareil de Golgi (De Strooper et al., 2012; Hashimoto and Saido, 2018). De plus faibles quantités en ont été toutefois détectées dans la membrane plasmique (Kaether et al., 2004) ainsi que dans celle des lysosomes (Pasternak et al., 2003). Le marquage de coupes de cerveau par des méthodes immunohistochimiques a permis de montrer que la PSé1 est exprimée dans les neurones et les cellules gliales (Agca et al., 2016; Kovacs et al., 1996). La PSé1 est une protéine transmembranaire de 467 AA. Les auteurs discutent encore sur le nombre réel de segments transmembranaires qu'elle comporte. La protéine en effet possède dix segments hydrophobes et deux domaines hydrophiles, de sorte qu'il a été décrit des modèles à six, sept, huit et même neuf domaines transmembranaires (Laudon et al., 2005; Spasic et al., 2006). Dans le cas du modèle à huit domaines transmembranaires qui a prévalu jusqu'à un passé très récent, les extrémités aminotermine et carboxyterminale de la protéine, ainsi qu'une grande boucle située entre les domaines 6 et 7 sont réputées être intracellulaires (De Strooper et al., 2012; Thinakaran, 2001). Dans le modèle à neuf segments transmembranaires (Fig. 6), l'extrémité aminotermine et la boucle située entre les domaines 6 et 7 sont cytosoliques, et l'extrémité carboxyterminale est extracellulaire (Spasic et al., 2006). La boucle cytosolique comporte un court fragment hydrophobe qui pourrait être attaché à la face interne de la membrane (Nakai et al., 1999).

La PSé1 (49 kDa) subit un clivage à hauteur de sa boucle cytoplasmique soit entre les AA 292 et 293, soit entre les AA 298 et 299. La protéase responsable de cette coupure a reçu le nom de présénilase (Podlisny et al., 1997; Thinakaran, 2001), mais elle est toujours inconnue ! Consécutivement à cette coupure, un fragment aminoterminal, NTF (28 kDa) et sa contrepartie carboxyterminale, le CTF (18 kDa) s'apparient et forment un hétérodimère qui est la forme active de la PSé ou des PSé au sein du complexe  $\gamma$ -sécrétase (Capell et al., 2005). On a supposé que le clivage des PSé était essentiel à l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase. Il semble toutefois que ce phénomène ne soit pas prérequis. En effet l'abolition du clivage par mutation dirigée des sites de coupure ne modifie pas la production d'A $\beta$  (Steiner et al., 1999). En outre, la mutation d'un site accepteur d'épissage du gène *PSé1* conduit à la production d'un mRNA amputé de l'exon 9, et d'une protéine dépourvue d'une partie de la boucle cible de la présénilase. Cette forme tronquée de PSé1 n'est pas clivée, elle conserve toutefois une

activité biologique et elle est même responsable d'une forme familiale de MA (Perez-Tur et al., 1995).

L'holoprotéine PSé1 qui ne serait pas intégrée au complexe est rapidement dégradée par le protéasome après polyubiquitinylation. Sa demi vie est comprise entre 1 et 2 h (Podlisny et al., 1997). Les fragments NTF et CTF sont également dégradés par le protéasome mais sous la forme intégrée au complexe. Ils sont beaucoup plus stables ; leur demi vie est supérieure à 24 h (Steiner et al., 1998).

NTF et CTF sont présents surtout dans l'appareil de Golgi alors que l'holoprotéine ne se trouve que dans le RER. Ces faits permettent de situer plus précisément le lieu où agit la présénilase et qui est le complexe lui-même. Les mutations ponctuelles retrouvées dans certaines formes familiales de MA ne modifient pas la répartition subcellulaire des fragments et de l'holoprotéine. En dépit de nombreuses études, l'activité enzymatique responsable de la maturation des PSé au sein du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase reste toujours inconnue. On en est réduit à quelques hypothèses. On a postulé que l'enzyme responsable du clivage des PSé serait une aspartyl-protéase et plus précisément que cette activité serait portée par les PSé elles-mêmes. En effet (Wolfe et al., 1999b), la mutation des résidus aspartate des domaines transmembranaires 6 et 7 de la PSé1 abolit l'activité  $\gamma$ -sécrétase ainsi que la maturation des PSé. Le développement d'inhibiteurs de  $\gamma$ -sécrétase a permis d'identifier des composés qui bloquent aussi la maturation de PSé1. Mais cette propriété ne s'étend pas à tous les inhibiteurs de  $\gamma$ -sécrétase. Il a été montré également (Brunkan et al., 2005) que la co-expression de la forme sauvage de PSé1 et de sa forme mutée D257A dans des fibroblastes préparés à partir de tissu conjonctif de souris invalidés pour les PSé ne se traduit pas par une protéolyse en *trans* de la forme D257A par la protéine sauvage. Ces différentes expériences ont sans aucun doute permis de mieux comprendre le fonctionnement de la présénilase, mais elles laissent dans l'ombre et sans réponse certaine la possibilité que les PSé soient des aspartyl-protéases capables de s'autocliver.

Pour déterminer la fonction de la PSé1, on a comparé les effets des formes sauvages et mutées, dans des conditions de surexpression. Les embryons de souris déficientes en PSé1 présentent le même phénotype que ceux dont le gène *notch1* a été invalidé (Zhang et al., 2018). Ces diverses expériences ont permis de mettre en évidence des phénotypes particuliers associés à des mutations de la PSé1 retrouvées dans des formes familiales de MA.

La PSé1 est impliquée dans l'homéostasie calcique de cellules en culture. L'expression d'une forme mutée de PSé1 entraîne une réponse calcique anormalement élevée après traitement par un composé induisant la libération d'ions calcium hors du réticulum endoplasmique et contribue à augmenter significativement la vulnérabilité des cellules aux agents toxiques (Guo et al., 1996). Une étude plus récente montre que la PSé1 joue un rôle de canal calcique de fuite et que des mutations impliquées dans des formes familiales de MA modifient drastiquement cette propriété (Gibson and Thakkar, 2017). La surcharge calcique du réticulum et de l'appareil de Golgi est à l'origine du relargage excessif d'ions calcium évoquée ci-dessus.

La PSé1 est également impliquée dans l'apoptose. Dans sa forme sauvage, elle a un effet anti-apoptotique ; mais l'expression d'une PSé1 mutée augmente la sensibilité des cellules à des agents pro-apoptotiques comme la staurosporine (Kovacs et al., 1999). Cet effet des PSé1 mutées est confirmé dans d'autres études qui, en outre, montrent que l'effet anti-apoptotique de la forme sauvage implique des voies de survie cellulaire, telle que la voie des ERK [*extracellular regulated kinases*] et la voie de la PI3K [phosphatidyl-inositol-3 kinase] (Kang et al., 2005). Inversement, la déplétion en PSé1 provoquée par transfection d'antisens en cellules NT2 entraîne une augmentation de l'apoptose (Kang et al., 2017). Il semble que le fragment carboxyterminal de la PSé1 soit capable, lorsqu'il est surexprimé, de moduler le clivage de l'APP, en amont des activités  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases. Cette fonction dépend du niveau d'expression du fragment, laquelle est contrôlée par le protéasome.

Pour s'affranchir de la barrière que constitue l'effet létal de l'inactivation de *ps1* ou l'absence de PSé1, il est possible de créer des souches mutantes conditionnelles pour ce gène. Chez ces animaux, la déplétion en PSé1 entraîne des déficits cognitifs, des altérations synaptiques et une mort neuronale dépendante de l'âge (Saura et al., 2004). La même équipe, dirigée par Shen, montre que l'inactivation conditionnelle post-natale de la PSé1 dans le cerveau, chez une souris transgénique exprimant une forme mutée d'APP, permet de restaurer la mémoire et l'apprentissage, réduit la production d'A $\beta$  et celle de PS et diminue la réponse inflammatoire associée à l'expression de l'APP mutée. Cependant l'inactivation de la PSé1 ne permet pas de rétablir un fonctionnement synaptique normal. De plus, les effets bénéfiques de l'inactivation post-natale n'apparaissent que si cette dernière est pratiquée avant six mois, et ils sont malheureusement transitoires. De toutes ces données, on peut

conclure fermement que la PSé1 a un rôle essentiel dans les mécanismes de survie cellulaire et dans l'expression de fonctions neuronales normales.

b. La préséniline 2.

La PSé2 est codée par un gène localisé chez l'Homme sur le chromosome 1. Elle présente 67 % d'homologie avec la PSé1 dont elle partage également la topologie. Elle subit également un clivage que convoie la présénilase. Elle est également impliquée dans la production d'A $\beta$  ; en effet, des cellules dont les gènes codant les deux PSé ont été invalidés, sont capables de produire de l'A $\beta$  lorsqu'on leur apporte de la PSé2 (Steiner et al., 1999). Cependant, en dépit de ces similitudes, les PSé1 et 2 présentent de très notables différences.

La PSé2 est exprimée plus tardivement que la PSé1 au cours du développement embryonnaire murin (Lee et al., 1996). Son gène possède deux séquences promotrices distinctes qui sont impliquées dans la régulation de son expression. Le premier site, P1, intervient dans la production basale de la PSé2 et son activation dépend de Sp1 (Renbaum et al., 2003). Le second site, P2, contient des éléments spécifiques de régulation neuronale et deux sites de liaison à Egr-1 [*early growth response-1*], un facteur de transcription impliqué dans les processus d'apprentissage et de plasticité synaptique.

La PSé2 est peu exprimée dans le cerveau mais l'est surtout dans les tissus périphériques. L'invalidation du gène de la PSé2 n'est pas létale (Herreman et al., 1999). Cependant le phénotype de l'invalidation du gène de la PSé1 est beaucoup plus sévère quand on y associe celle du gène de la PSé2. Ce fait suggère que la PSé2 participe, même faiblement, aux fonctions remplies habituellement par la PSé1.

Quand elle est mutée, la PSé2 prend un caractère pro-apoptotique, tout comme les mutations qui affectent la PSé1. En revanche, la PSé2 sauvage a un comportement diamétralement opposé à celui de la PSé1 sauvage ; elle prend un caractère pro-apoptotique lorsqu'elle est surexprimée (Alves da Costa et al., 2002). Cet effet est porté par le fragment carboxyterminal résultant de la coupure opérée par la présénilase dans l'holoprotéine, indépendamment de sa contrepartie aminotermine (Alves da Costa et al., 2003). On a peu étudié les fonctions engagées par la PSé2. On peut toutefois signaler son implication dans la



régulation du signal calcique dans le muscle cardiaque, où elle est fortement exprimée (Contino et al., 2017).

#### 2.2.1.4.1.2. La nicastrine.

La nicastrine est le premier cofacteur de la PSé à avoir été identifié. Elle a été isolée par co-immunoprécipitation, à partir de cellules humaines, en vertu de son interaction avec la PSé1 au sein du complexe  $\gamma$ -sécrétase (Yu et al., 2000). C'est une glycoprotéine transmembranaire de type I, comportant 709 AA. Elle possède une très courte partie intracellulaire et un long domaine extracellulaire. Son expression est ubiquiste. Dans la cellule, la nicastrine se retrouve sous sa forme immature (100 kDa) dans le RER. Elle est glycosylée dans l'appareil de Golgi, puis sialylée lors de son transport dans le réseau trans-golgien. La forme mature est retrouvée dans la membrane plasmique, dans la mitochondrie et dans la membrane des lysosomes. Les modifications post-traductionnelles de la nicastrine conditionnent ses capacités d'interaction avec les PSé. Celles-ci semblent se lier préférentiellement à la forme glycosylée (Yang et al., 2002). Toutefois, l'inhibition de sa glycosylation n'affecte pas l'activité  $\gamma$ -sécrétase (Herreman et al., 2003).

L'invalidation du gène de la nicastrine abolit la signalisation Notch1 chez *C. elegans* comme chez la Drosophile (Hu et al., 2016). Les embryons de Souris dont on a invalidé le gène de la nicastrine meurent au dixième jour de la vie embryonnaire et présentent des défauts dans la segmentation de leurs somites, des malformations caudales et des déficits vasculaires qui composent un phénotype semblable à celui des embryons de Souris invalidées pour le gène *notch1* (Conlon et al., 1995; Donoviel et al., 1999; Huppert et al., 2005).

L'invalidation de la nicastrine déstabilise le complexe  $\gamma$ -sécrétase. Elle serait la protéine de maintien (*scaffolding protein*) de la structure de ce dernier. Il a été montré que l'ectodomaine de la nicastrine se lie à l'APP et à Notch qu'elle peut ainsi faire recruter par le complexe de la  $\gamma$ -sécrétase. La nicastrine jouerait le rôle d'un récepteur de substrats de  $\gamma$ -sécrétase par l'intermédiaire de son long domaine extracellulaire (Shah et al., 2005).

#### 2.2.1.4.1.3. Le facteur anterior pharynx-defective-1

L'Aph-1 est une protéine d'environ 30 kDa de MM. Elle a été identifiée par criblage génétique de mutants de la voie de signalisation Notch chez *C. elegans* (Francis et al., 2002). Elle possède sept domaines transmembranaires et tire son nom du phénotype observé chez ce nématode lorsqu'elle n'y est pas exprimée. C'est une protéine très conservée au cours de l'évolution. Chez l'Homme, il en existe deux formes, l'Aph-1a et l'Aph-1b dont les gènes sont localisés respectivement sur les chromosomes 1 et le chromosome 15. Du gène *APH-1A* peuvent être engendrées deux isoformes par épissage alternatif, Aph-1aL [*Long*] et Aph1aS [*Short*], dont l'expression est ubiquiste, quand bien même la forme courte semble être prépondérante. Aph1b est exprimée préférentiellement dans le cerveau. On a identifié un variant d'épissage qui présente une délétion de l'exon 4 codant le quatrième segment transmembranaire (Saito et al., 2005). Ce segment contient un motif GXXXG très conservé qui semble être impliqué dans l'assemblage ainsi que dans l'activité du complexe  $\gamma$ -sécrétase (Lee et al., 2004). La délétion de ce segment entraîne une modification conformationnelle très importante et ce variant semble moins stable. Chez les Rongeurs, il existe un troisième gène *Aph-1c* qui est une duplication du gène *Aph-1b* (Hébert et al., 2004). Le rôle des différentes formes de l'Aph-1 dans le complexe  $\gamma$ -sécrétase n'est pas encore clairement connu.

L'inactivation simple ou combinée des gènes codant les formes d'Aph-1b et Aph-1c chez l'animal, n'est pas létale. Les animaux sont viables et fertiles et ils présentent une diminution de la production d'A $\beta$  dans certaines aires cérébrales. Mais l'inactivation du gène *Aph-1a* conduit à un phénotype proche de celui qui est observé après inactivation du gène *Notch* (Huppert et al., 2005). Les embryons meurent au dixième jour de gestation. La protéine Aph-1a est donc la forme préférentiellement impliquée dans le développement embryonnaire (Ma et al., 2005). L'inactivation de l'une des formes d'Aph ne paraît pas avoir d'influence sur l'expression des autres formes (Saito and Araki, 2005).

#### 2.2.1.4.1.4. Le presenilin enhancer-2.

Comme Aph-1, Pen-2 a été identifié par criblage génétique (Francis et al., 2002). C'est une petite protéine de 12 kDa de MM. Elle est d'expression ubiquiste. Elle comporte deux domaines transmembranaires, une boucle cytosolique et des extrémités amino et

carboxyterminale orientée vers la lumière des organites intracellulaires. L'expression de Pen-2 est régulée par CREB (Wang et al., 2006). Le promoteur du gène *PEN-2* comporte des sites de liaison putatifs pour différents facteurs tels *activator protein 1*, ATF-6 [*activating transcription factor 6*], c-Rel [oncogène cellulaire de la réticuloendothéliose], et HIF-1 [*hypoxia inducible factor-1*]. *PEN-2* est codé par le chromosome 19. L'étude d'une cohorte de 789 patients américains a montré qu'il n'existe aucune corrélation entre les mutations de *PEN-2* et l'apparition de MA (Bertram and Tanzi, 2012). Néanmoins, on a retrouvé une mutation de Pen-2 (D90N) chez un patient atteint d'une forme familiale de MA, bien que cette mutation, qui affecte une zone critique pour l'interaction de la molécule avec les autres composants du complexe  $\gamma$ -sécrétase, n'ait aucun effet sur le métabolisme de l'APP (Sala Frigerio et al., 2005). Cette interaction se fait par l'intermédiaire de l'extrémité carboxyterminale de Pen-2, porteuse d'un motif DYLSF (AA 90 à 94), très conservé dans l'évolution (Hasegawa et al., 2004).

Peu étudiées, les fonctions de Pen-2 sont mal connues et les études se sont limitées à cerner son rôle dans le fonctionnement de la  $\gamma$ -sécrétase. L'invalidation de l'expression de Pen-2 au moyen de RNA interférant conduit à perturber la maturation de la nicastrine et des PSé, et à faire diminuer drastiquement l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase (Steiner et al., 2002; Takasugi et al., 2003). L'invalidation de *Pen-2* chez le poisson zèbre aboutit à l'apparition d'un phénotype de type Notch ainsi qu'à une apoptose massive dépendante de p53. La complémentation avec Pen-2 entière rétablit un phénotype normal, ce que la complémentation avec Pen-2 amputé de sa boucle cytosolique est incapable de faire (Campbell et al., 2006). Pen-2 et Aph-1 contrôlent la mort cellulaire dépendante de p53 dans les cellules TSM1 d'origine neuronale — il s'agit d'apoptose et non de nécrose — à condition que soit maintenue l'intégrité structurale du complexe  $\gamma$ -sécrétase ; cette activité anti-apoptotique ne dépend pas de l'exercice de l'activité protéolytique (Dunys et al., 2007).

#### 2.2.1.4.1.5. Autres facteurs impliqués dans l'activité de la gamma-sécrétase.

En plus des quatre composants qui viennent d'être passés en revue, plusieurs autres facteurs pourraient encore intervenir dans la constitution du complexe  $\gamma$ -sécrétase. Mais ils jouent un rôle modulateur et non pas un rôle critique. C'est ainsi qu'on a identifié près d'une

quarantaine de protéines dont certaines peuvent moduler la production de peptide amyloïde. Trois d'entre elles méritent une courte description.

Le CD147 est une glycoprotéine transmembranaire de type I, d'environ 50 kDa de MM ; elle possède un court domaine intracellulaire de 40 AA et un grand domaine extracellulaire. Elle interagit avec les quatre composants essentiels du complexe  $\gamma$ -sécrétase. La régulation négative de son expression par des RNA interférants augmente la production d'A $\beta$ , mais sa surexpression n'a aucun effet sur cette dernière (Zhou et al., 2005). Les effets du CD147 sur la production des AICD restent à déterminer.

La TMP21/23 [*transmembrane protein 21/23*] se lierait au complexe  $\gamma$ -sécrétase et régulerait le clivage  $\gamma$ , mais non le clivage  $\epsilon$ , par l'intermédiaire de son domaine transmembranaire. Mais ce résultat demande à être confirmé. Il semblerait que TMP21/p23, qui appartient à la famille des protéines *cargo* p24, soit impliquée dans la régulation du trafic vésiculaire entre le RER et l'appareil de Golgi, qu'elle influence le trafic de l'APP et par conséquent la production de peptide A $\beta$ . Elle est co-immunoprécipitée avec le complexe  $\gamma$ -sécrétase endogène et associée à des complexes de haute MM (Pardossi-Piquard et al., 2009). La surexpression de TMP21 ne module pas l'expression de NICD, d'AICD (C50) ni du reste celle d'A $\beta$ . Mais sa déplétion augmente la production de ce dernier, sans affecter celle de l'AICD (C50) ni celle du NICD. L'ensemble de ces données confirment la dichotomie fonctionnelle entre les activités responsables de la production des ICD (clivage  $\epsilon$ ) et l'activité  $\gamma$ -sécrétase.

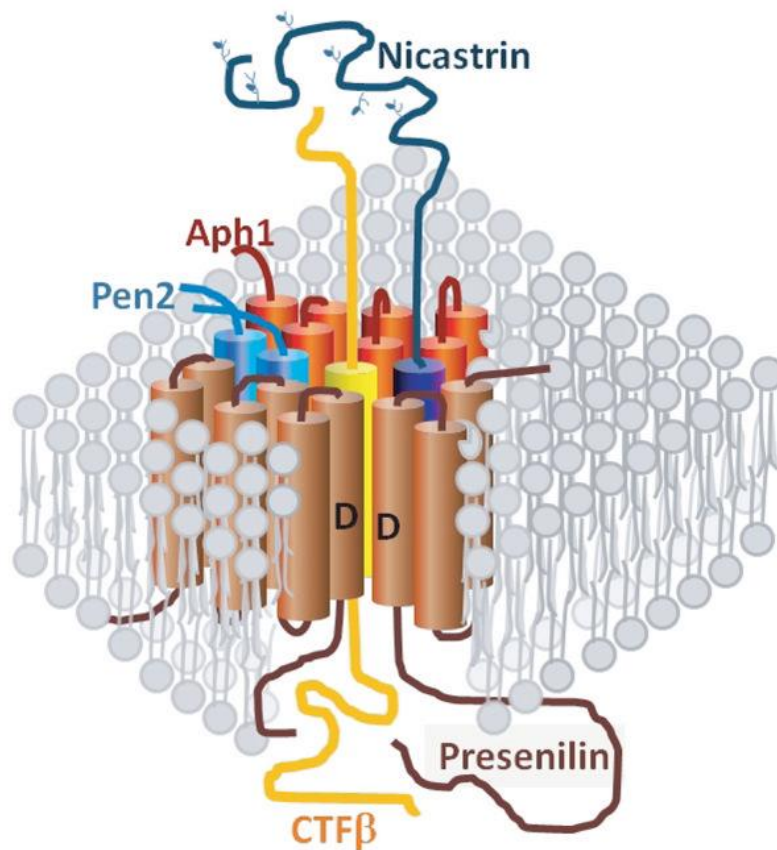


Figure 5 : Structure du complexe de la gamma-sécrétase.

D'après (Xu, 2009)). Le complexe de la  $\gamma$ -sécrétase est constitué de quatre protéines membranaires intégrales. La PSé (PSé1 ou PSé2 ; brun), qui comporte 9 domaines transmembranaires, la nicastrine (bleu) qui n'en a qu'un, APH (rouge orangé) qui en a 7, et PEN-2 qui en a 2. Le substrat, CTF $\beta$  (jaune) est également représenté. Lors de sa maturation, la PSé subit une endoprotéolyse. Les fragments résultants restent associés. Les deux résidus Aspartate conservés (D) dans les 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> domaines transmembranaires adjacents, sont essentiels à l'expression de l'activité  $\gamma$ -sécrétase. La nicastrine mûre possède un ectodomaine hautement glycosylé à son extrémité aminoterminal.

La protéine activatrice de la  $\gamma$ -sécrétase [GSAP pour *gamma-secretase activating protein*] est un cofacteur de découverte récente. La GSAP augmente sélectivement la production de peptide A $\beta$  par le biais d'une interaction avec la  $\gamma$ -sécrétase et son substrat, le CTF (He et al., 2010).

D'autres protéines interagissent avec le complexe  $\gamma$ -sécrétase et modulent la production d'A $\beta$ . Mais elles semblent agir sur le trafic endocellulaire du complexe et de ses substrats plutôt que sur l'activité enzymatique du complexe (Verdile et al., 2007). Le rôle exact de tous ces cofacteurs demande à être vérifié.

La structure probable du complexe  $\gamma$ -sécrétase est présenté Figure 5.

#### 2.2.1.4.1.6. Hétérogénéité des complexes $\gamma$ -sécrétase.

Il existe deux formes d'Aph-1 (Aph-1a et Aph-1b) et deux PSé (PSé1 et PSé 2). Si l'on considère que les membres formant le complexe  $\gamma$ -sécrétase  $\gamma$  sont présents en un seul exemplaire, un simple calcul conduit à supposer qu'il en existe au moins six formes différentes, en ne tenant pas compte des cofacteurs. Si les six types possibles sont réellement formés et sont fonctionnels (Ebke et al., 2011), il est probable qu'un nombre plus élevé de complexes sont effectivement formés en raison de l'existence des cofacteurs susceptibles de leur être associés. Effectivement, le complexe  $\gamma$ -sécrétase actif se retrouve en des formes de MM très diverses, qui vont de 250 kDa pour les plus petites à 600 et même 2000 kDa pour les plus grandes (Farmery et al., 2003; Kimberly and Wolfe, 2003). Il s'agit là de tailles très supérieures à la taille théorique que l'on obtient en faisant la somme des MM des quatre partenaires du complexe, qui avoisine les 200 kDa.

#### 2.2.1.4.1.7. Localisation subcellulaire du complexe de la gamma-sécrétase.

Il est pratiquement démontré que le complexe  $\gamma$ -sécrétase réside essentiellement dans le RER, l'appareil de Golgi, le RTG [réseau transgolgien] et dans les compartiments endocytaires et intermédiaires, qui pour la plupart ne sont pas les localisations subcellulaires majeures de l'APP. En plus de sa fonction de clivage du CTF, le complexe  $\gamma$ -sécrétase clive toute une série de protéines transmembranaires responsables de très importantes fonctions, et notamment : Notch, la cadhérine, la tyrosinase, ErbB4, CD44.

### 2.2.2. La voie non canonique.

Le terme de voie non canonique est utilisé pour désigner une voie jusqu'ici peu étudiée et qui fait intervenir d'autres mécanismes de traitement de l'APP. À notre connaissance, il a été forgé par Nhan et al. (2015), à qui nous empruntons les données qui suivent.

En plus des sécrétases, les caspases, la caspase-3 essentiellement, peuvent en effet cliver l'APP à la position Asp664 (numérotation des AA de la séquence de l'APP à 695 AA), de la partie cytoplasmique, lors de l'apoptose. Elle libère alors un fragment constitué des derniers

31 AA de l'APP, et appelé C31. Un clivage  $\gamma$  supplémentaire engendre le fragment appelé Jcasp qui contient la région située entre le site de clivage  $\gamma$  et le site de clivage de la caspase. En dépit de quelques résultats initiaux contraires, il ne semble pas que le clivage caspase affecte le traitement amyloïdogène de l'APP. Cependant, dans le processus neurotoxique induit par le peptide A $\beta$ , les caspases activées clivent l'APP et engendrent du C31 et du Jcasp qui sont également neurotoxiques. Il en résulte l'activation d'une cascade délétère. C31 agirait peut-être en formant avec l'APP des complexes capables de recruter des partenaires déclenchant les signaux reliés à la toxicité cellulaire. En comparaison de C31, Jcasp semble ne jouer qu'un rôle mineur dans la cytotoxicité. Il est important de remarquer que le clivage caspase de l'APP semble être crucial pour l'expression de la neurotoxicité induite par le peptide A $\beta$ . Chez la souris transgénique pour l'APP humaine, une mutation de l'APP à la position Asp664, destinée à inhiber le clivage caspase, supprime les anomalies synaptiques, comportementales et électrophysiologiques, quand bien même les PS $\epsilon$  sont encore abondantes dans le cerveau.

Le clivage de l'APP à la position Asp664 est connu depuis 1999. Le motif qui est clivé est celui que privilégient les caspases-3 et -7 (caspases du groupe II). La caspase-3 est probablement celle qui est préférentiellement impliquée dans le développement de cette voie non canonique, bien que certains auteurs impliquent les caspases 2-, -8, -9 et -12. L'auteur du fait reste donc encore mystérieux sinon controversé. Ce qui ne l'est pas en revanche, c'est la fonction neurotoxique de C31, toxicité qui dépend de l'APP (Lu et al., 2003a). La dimérisation de l'APP conduirait au recrutement des caspases initiatrices de la mort cellulaire (Lu et al., 2003b).

### 2.2.3. Biologie du peptide amyloïde.

#### 2.2.3.1. Production physiologique.

L'A $\beta$  est donc produit par l'action conjuguée de la  $\beta$ -sécrétase et de la  $\gamma$ -sécrétase. Le clivage  $\gamma$  conditionne la structure de la partie carboxyterminale des espèces d'A $\beta$ . En effet, cette action ne conduit pas à la production d'un seul type d'A $\beta$ , mais de plusieurs, dont la taille s'étage de 36 à 43 AA, si l'on considère l'existence de formes tronquées issues des clivages en 17 par l' $\alpha$ -sécrétase ou en 11 par la  $\beta$ -sécrétase. Cependant deux formes principales émergent de cette apparente complexité : la forme A $\beta$ <sub>1-40</sub> qui représente environ 90 % de l'A $\beta$  produit, et l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> qui représente les 10 % restant. Les autres formes sont très minoritaires (Gouras et

al., 2000). La formation et la libération de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> consécutive à l'action de la voie amyloïdogène du traitement de l'APP, est le résultat neurophysiologique normal si l'on considère que le précurseur et ses produits ont un rôle physiologique à jouer dans le SNC. Dans la MA, la fonction de l'APP subit un dévoiement, un passage de son traitement non-amyloïdogène à un traitement préférentiel amyloïdogène (Zhang et al., 2011).

#### 2.2.3.2. Modification du peptide amyloïde.

##### 2.2.3.2.1. *Troncations aminotermiales.*

Les formes tronquées d'A $\beta$  sont retrouvées dans les PS de patients souffrant de MA aussi bien sporadiques que familiales, particulièrement, du reste, quand ces dernières formes sont liées à des mutations du gène codant la PS $\epsilon$ 1 (Fernandez et al., 2014; Saido et al., 1996; Veugelen et al., 2016).

Une première forme tronquée en 3 a été identifiée par spectrométrie de masse dans des PS extraites et purifiées de cerveaux de patients atteints de MA (Mori et al., 1992). Puis d'autres formes tronquées ont été identifiées dans les cerveaux de malades : on y a découvert des peptides commençant en 2, 3, 4, 6, 8 et 11 et se terminant en 40 ou en 42. Mais de toutes ces formes tronquées, les deux prédominantes sont du type A $\beta$ 3-x et A $\beta$ 11-x. Dans le cerveau de sujets sains, on retrouve essentiellement des formes intactes et une forme commençant en 11 (Näslund et al., 1994). Ultérieurement, on a aussi identifié une forme commençant en 5, chez des sujets atteints de MA (Takeda et al., 2004).

##### 2.2.3.2.2. *Dégradation par des aminopeptidases.*

On a soupçonné l'intervention d'aminopeptidase dans les phénomènes de dégradation de l'A $\beta$  lorsque l'analyse a permis d'en identifier des formes tronquées qui ne pouvaient pas être produites par l'intervention de l' $\alpha$ -sécrétase ou de la  $\beta$ -sécrétase. L'apparition des formes tronquées commençant en 3 n'est pas liée à un processus normal de maturation de l'APP (Shirovani et al., 2002). Parmi les aminopeptidases candidates, on soupçonne l'aminopeptidase A [APA] d'être la première à jouer ce rôle de dégradation. En effet, le



premier résidu de l'Aβ est un acide aspartique qui, comme l'acide glutamique, est un substrat de l'APA.

L'APA a pour rôle principal de dégrader l'angiotensine II en angiotensine III par élimination d'un résidu aspartate. C'est une protéine transmembranaire de type II, de 160 kDa de MM. C'est une métalloprotéase à zinc qui porte une activité ectopeptidasique. Elle est exprimée dans de nombreux tissus, dont surtout la bordure en brosse de l'épithélium intestinal, les cellules épithéliales rénales, l'endothélium vasculaire et le cerveau (Zini et al., 1997). Résumons : l'APA est un excellent candidat à la transformation des formes d'Aβ1-x en formes d'Aβ2-x.

L'excision du deuxième résidu, une alanine, conduit à la formation des Aβ3-x. Les formes d'Aβ3-40 et d'Aβ3-42 représentent 51 % des formes totales d'Aβ au sein des PS neuritiques et 11 % dans les dépôts amyloïdes vasculaires (Kuo et al., 1997).

L'alanyl-aminopeptidase sensible à la puromycine est fortement suractivée dans le cerveau de patients atteints de MA (Minnasch et al., 2003). Cette aminopeptidase est impliquée dans la maturation d'épitopes associés au complexe majeur d'histocompatibilité de type I. On l'avait pressentie pour être la β-sécrétase. La suite a montré qu'il n'en était rien, et à l'heure actuelle, son rôle dans la maladie n'est pas encore clairement établi. On la soupçonne de participer au métabolisme de l'Aβ dans le cerveau des malades.

#### 2.2.3.2.3. *Racémisation et isomérisation.*

Certains résidus, et plus particulièrement les résidus aspartate en 1 et en 7 sont sujets à la racémisation (Russo et al., 1997). Au sein des PS, les formes isomérisées d'Aβ se retrouvent au cœur de l'agrégat (qui est logiquement supposé être formé le premier). Elles sont souvent entourées de formes non isomérisées, déposées plus tardivement. De telles modifications sont à mettre au compte du vieillissement du peptide, car il n'a pas été possible de mettre en évidence une quelconque activité enzymatique responsable de ce phénomène. Par ailleurs, et de manière fort intéressante, il a été montré que l'isomérisation du résidu aspartate en 7 est cruciale pour l'activation du complément.

#### 2.2.3.2.4. Le motif YENPTY.

Il convient enfin de dire un mot sur le domaine YENPTY (nomenclature uni littérale des AA), qui est un motif cytoplasmique de l'APP, présent dans plusieurs des fragments de protéolyse qui viennent d'être passés en revue. Les animaux invalidés pour le gène de l'APP, qui par conséquent n'expriment aucun fragment portant le motif, ont un phénotype peu sévère marqué par une diminution du poids du corps et du cerveau, une réduction des fonctions locomotrices et de la force d'agrippement, et une diminution de la LTP pour les animaux les plus âgés. Mais la transgénèse d'animaux invalidés pour l'APP par un gène d'APP dépourvu de la région codant le domaine YENPTY ou la totalité du domaine CTF après action de l' $\alpha$ -sécrétase (animaux dits KI [knock-in]) peuvent récupérer une partie des fonctions perdues par les animaux invalidés pour le gène de l'APP, et notamment, la perte de poids du cerveau, la force d'agrippement et les déficits de LTP. On ne s'attend pas à de tels résultats si le motif YENPTY est critique pour l'expression des fonctions physiologiques de l'APP. Et de fait, il est observé chez ces souris KI que la fonction primaire de l'APP est portée par le fragment extracellulaire sAPP $\alpha$ , et qu'elle peut se dispenser de la plus grande partie du CTF, dont le motif YENPTY. Dans ce contexte, il est très surprenant de constater qu'une souris KI par un gène d'APP Y682G, dans lequel la première tyrosine est remplacée par une glycine, présente un déficit dans son développement, et ceci en absence de dépôt et d'accumulation d'A $\beta$ . D'autres résultats conduisent à conclure que le motif YENPTY, et plus spécialement la tyrosine 682 joue des rôles multiples et contrastés dans les fonctions assumées par l'APP. Par le moyen de la phosphorylation et déphosphorylation de la Tyr682, il est possible de moduler les interactions des fragments portant ce motif avec diverses protéines adaptatrices, ce qui aboutit à des conséquences diverses voire opposées.

Le Tableau 4 résume les principales données concernant les fonctions des divers fragments issus du traitement cellulaire de l'APP.

	Fonctions normales / propriétés neurotrophiques	Propriétés neurotoxiques	Premier site d'action (proposé)
FL-APP	Adhésion cellulaire	Neurodégénérescence lors de l'over expression  Changement neurodégénératif de tripliqua d'APP (trisomie 21 chez l'homme et trisomie 16 chez la souris)	Espace extracellulaire
	Récepteur cellulaire de surface (via le domaine cytoplasmique)		
	Promoteur et maintien de la formation de synapses et		
	Promoteur de la plasticité synaptique		
	Transporteur de fer		
	Neuroprotection (de la toxicité du glutamate et de l'Aβ)		
Aβs	Facteur de transcription	Inhibition de la LTP et de la transmission synaptique par le faible nombre d'oligomères d'Aβ soluble	Espaces extracellulaire et intracellulaire
	Activateur de kinase		
	Transporteur de cholestérol	Toxicité synaptique	
	Anti-microbien	Trouble cognitif	
	Neuroprotection contre le stress oxydant (Aβ40)		
	Promoteur de neurogenèse et pousse neuritique (Aβ40)		
p3	Non renseigné	Cytotoxique en culture	Espace extracellulaire
		Promoteur de réponse inflammatoire	
sAPPα et sAPPβ	Propriétés trophiques sur les neurones et les cellules non neuronales	Dérégulation de la croissance cellulaire (promoteur d'oncogenèse)	Espace extracellulaire
	Neuroprotection	Stimule l'activation de la microglie	
	Promoteur de la prolifération de cellules souches	Génère des produits pro-inflammatoires	
	Améliore les fonctions de la mémoire		
CTFα	Orienté le système loin de la voie amyloïdogénique	Non renseigné	Espace intracellulaire
CTFβ	Non renseigné	Cytotoxique sur les neurones et les cellules non neuronales	Espace intracellulaire
		Neurotoxicité après une injection intracrânienne	
		Perturbe l'activité des canaux ioniques et l'homéostasie	

		Promoteur d'astroglie	
		Perturbation de la LTP	
		Trouble cognitif	
AICD	Médiateur de l'activité transcriptionnelle	Pro-apoptotique	Espace intracellulaire et noyau
	L'activité peut être dépendante de la modification transcriptionnelle du motif YENPTY	Activateur de la GSK-3 $\beta$ induisant la toxicité	
		Dégénérescence des neurones hippocampiques	
		Induit une activité électrique aberrante	
		Trouble cognitif	
Jcasp	Non renseigné	Pro-apoptotique	Espace intracellulaire
C31	Non renseigné	Pro-apoptotique et neurotoxique	Espace intracellulaire
		Produit après clivage de la caspase	
		Toxicité dépendante de l'APP	

Tableau 4 : Propriétés neurotoxiques et neurotrophes du précurseur du peptide amyloïde et de ses fragments dérivés.

(D'après Nhan et al., 2015.)

#### 2.2.4. Dégradation et élimination des peptides amyloïdes.

L'A $\beta$  est continuellement produit et dégradé, et il reste à des concentrations seuils physiologiques grâce à l'instauration d'un équilibre dynamique entre production et dégradation. Un certain nombre d'enzymes sont impliqués dans les processus de dégradation (Fig. 6).

##### 2.2.4.1. Les différentes enzymes impliquées

###### 2.2.4.1.1. La néprilysine.

La néprilysine [NEP] est une protéine transmembranaire de type II, de 97 kDa de MM. On la connaît aussi sous le nom de *neutral endopeptidase*, CALLA [pour *common acute lymphoblastic leukaemia antigen*], enképhalinase (EC 3.4.24.11). Elle possède un court domaine intracellulaire et un grand domaine extracellulaire qui porte le site actif de l'enzyme. C'est une métalloprotéinase à zinc qui clive préférentiellement les peptides circulant d'une taille inférieure à 5 kDa. Elle est impliquée dans l'inactivation de nombreux peptides biologiquement actifs, comme la substance P, les endorphines, les enképhalines, la

neurotensine. La NEP est codée par un gène porté par le chromosome 3. Le gène comporte 24 exons et peut produire par épissage alternatif quatre types de molécules.

L'hydrolyse d'A $\beta$ <sub>1-40</sub> synthétique par la NEP a été observée d'abord *in vitro* (Howell et al., 1995). Son rôle dans la dégradation de l'A $\beta$  *in vivo* est démontré quelques années plus tard ; après injection d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> dans le cerveau de rat, il est observé une dégradation endogène non négligeable, qui peut être abolie par un traitement au thiorphan ; il apparaît d'ailleurs que la NEP dégrade préférentiellement l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Iwata et al., 2005). Des souris dont on a invalidé le gène codant la NEP présentent une augmentation des dépôts cérébraux d'A $\beta$ <sub>1-40</sub> et <sub>1-42</sub>. Inversement, la surexpression de NEP dans des souris transgéniques servant de modèle animal de MA se traduit par une diminution significative de la formation de dépôts amyloïdes (Iwata et al., 2004).

L'expression de la NEP diminue au cours du vieillissement, et spécialement dans des zones du cerveau préférentiellement atteintes dans la MA, comme l'hippocampe. La baisse d'expression peut atteindre 50 % et elle est corrélative à l'augmentation du nombre et de la taille des PS (Yasojima et al., 2001). Cette baisse d'expression est interprétée comme une étape clé dans la séquence des événements conduisant à l'apparition des formes sporadiques de MA.

Inversement, le fragment AICD (C50), issu du clivage  $\epsilon$  de l'APP, peut réguler positivement l'expression de la NEP (Pardossi-Piquard et al., 2005). L'A $\beta$ <sub>1-42</sub> est capable d'induire une augmentation de l'expression et de l'activité de la NEP (Mohajeri et al., 2002). La cellule aurait ainsi un moyen de limiter la formation des PS.

#### 2.2.4.1.2. *L'endothelin converting enzyme.*

L'*endothelin converting enzyme* [ECE] est une métalloprotéinase de 120 kDa de MM. Son site catalytique est extracellulaire. Mais elle se distingue de la NEP par deux traits. Elle est active sous forme de dimère et elle n'est sensible qu'au phosphoramidon, contrairement à la NEP qui, elle, est également sensible au thiorphan (Turner and Tanzawa, 1997). Initialement, l'ECE a été impliquée dans la conversion de l'endothéline inactive en endothéline active. Ultérieurement, la substance P, la bradykinine, la neurotensine sont venues allonger la liste des substrats.

L'effet de l'ECE sur l'A $\beta$  a été démontré en culture de cellules CHO transfectées avec un vecteur codant cette enzyme. Il a été montré que le milieu de culture de ces cellules contient moins d'A $\beta_{1-40}$  et d'A $\beta_{1-42}$  que le milieu de culture de cellules CHO transfectées avec un vecteur vide (Eckman et al., 2001). Enfin, des souris dont le gène de l'ECE a été invalidé voient un accroissement notable de l'accumulation d'A $\beta_{1-40}$  et d'A $\beta_{1-42}$  par comparaison avec leur contrepartie sauvage (Pacheco-Quinto et al., 2016).

#### 2.2.4.1.3. *L'insulin degrading enzyme.*

L'*insulin degrading enzyme* [IDE] ou insulinase est une protéase à thiol de 120 kDa de MM. Elle est ubiquiste. On la retrouve essentiellement dans le cytosol des cellules ou à l'intérieur des peroxysomes, contrairement à la NEP et à l'ECE. Il semble qu'elle reconnaisse ses substrats grâce à leur structure secondaire en feuillet  $\beta$ , structure que l'on retrouve chez l'insuline, le glucagon ou l'amyline.

L'IDE a d'abord été impliquée dans la dégradation d'A $\beta$  synthétique *in vitro* par une préparation purifiée de cette protéase (Kurochkin and Goto, 1994). Puis il est montré que des extraits de cerveaux humains peuvent hydrolyser de l'A $\beta$  synthétique, et que cette hydrolyse peut être empêchée si l'on ajoute à la préparation une quantité saturante d'insuline, ce qui permet de montrer que l'IDE est bien la responsable ; de plus l'hydrolyse est neutralisée par des Ac dirigés contre l'IDE (McDermott and Gibson, 1997). Des expériences analogues montrent que des extraits de cerveaux de patients atteints de MA hydrolysent beaucoup plus malaisément l'A $\beta$  synthétique que des extraits de cerveaux sains, la diminution de l'activité hydrolytique pouvant atteindre 50 % (Pérez et al., 2000).

L'IDE participe à la dégradation de l'A $\beta$  extracellulaire. Comme l'enzyme est essentiellement cytosolique, on suppose qu'il existe une sécrétion d'IDE responsable de cette dégradation (Vekrellis et al., 2000). Qu'en est-il alors de l'A $\beta$  intracellulaire ? Il en existe deux fractions ; l'une est soluble et associée aux vésicules golgiennes ; l'autre est insoluble et associée aux membranes. Ces deux fractions sont hydrolysables par une enzyme sensible aux inhibiteurs de protéases à thiols, mais peu sensible au thiorphan et au phosphoramidon. La surexpression de l'IDE réduit dans les mêmes proportions les deux fractions. Mais, curieusement, la surexpression de NEP se traduit par une baisse de la fraction insoluble d'A $\beta$ , associée aux membranes (Sudoh et al., 2002). Les auteurs de l'étude concluent que l'IDE est

majoritairement impliquée dans la dégradation de l'A $\beta$  intracellulaire soluble et insoluble, tandis que la NEP est impliquée principalement dans la dégradation de l'A $\beta$  insoluble, ce qui est conforme à la localisation membranaire de l'enzyme, mais est moins classique puisqu'il est admis qu'elle dégrade surtout les peptides circulants. L'implication de l'IDE dans la MA a été confirmée par des études qui mettent en lumière le rôle aggravant du polymorphisme de l'IDE (forme IDE2, allèle c), mais dans le seul cadre d'une association avec le génotype *APOE4*, qui est lui-même un facteur prédisposant à la maladie (Bian et al., 2004).

L'expression de l'IDE baisse fortement au cours du vieillissement et son niveau d'expression est inversement corrélé au nombre de PS. (Caccamo et al., 2005), tout comme l'expression de la NEP.

#### 2.2.4.1.4. *L'angiotensin converting enzyme.*

L'*angiotensin converting enzyme* [ACE] ou enzyme de conversion de l'angiotensine est capable de cliver l'A $\beta$  humain entre les résidus 7 et 8 (Hu et al., 2001). L'adjonction d'ACE purifiée à de l'A $\beta$ <sub>1-40</sub> synthétique entraîne une diminution de la formation des fibrilles à un niveau identique à celle que l'on observe avec une préparation d'A $\beta$ <sub>8-40</sub>, ou d'un mélange de fragments 1-7 et 8-40. Par ailleurs la dégradation de l'A $\beta$ <sub>1-40</sub> par l'ACE a pour effet d'en diminuer la toxicité.

Ces premiers résultats ont été à la fois confirmés et infirmés par une étude ultérieure (Sun et al., 2008). L'A $\beta$  humain et l'A $\beta$  murin (qui diffèrent l'un de l'autre par leurs résidus 5, 10 et 13) sont bien clivés par les formes humaine et murine d'ACE. Mais le clivage ne se fait pas entre les résidus 7 et 8. L'ACE humaine agit aux mêmes sites que l'ACE murine, tant sur l'A $\beta$  humain que sur l'A $\beta$  murin, mais l'ACE humaine est responsable de cinq clivages supplémentaires sur les deux espèces d'A $\beta$ .

#### 2.2.4.1.5. *La membrane metallo-endopeptidase like*

La *membrane metallo-endopeptidase like* [MMEL] est une protéine analogue à la NEP ; on l'appelle aussi NEP2. Il en existe chez la Souris deux isoformes engendrées par épissage alternatif du transcrit du gène *Mmel* : l'une, la MMEL- $\beta$  est sécrétée et l'autre, la MMEL- $\alpha$  est liée à la membrane. L'isoforme  $\alpha$ , tout comme la NEP, est sensible au thiorphan et au

phosphoramidon et elle est capable de cliver l'A $\beta$  (Shirotani et al., 2001). Le gène orthologue humain de *Mmel* est exprimé entre autres dans le cerveau : la MMEL humaine possède 77 % d'homologie avec la MMEL murine (Bonvouloir et al., 2001). Chez l'homme, il en existe trois isoformes,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  produites par épissage alternatif du transcrit codé par le gène MMEL. Seule l'isoforme  $\beta$  peut dégrader avec la même efficacité les A $\beta$ <sub>1-40</sub> et <sub>1-42</sub>. Le site principal de clivage est situé entre les résidus 17 et 18 ; il en résulte la libération d'un fragment 1-17 et de la contrepartie 18-40 ou 18-42, selon le substrat. La MMEL peut aussi, mais dans une moindre mesure, cliver l'A $\beta$  entre les résidus 16 et 17 (Huang et al., 2008).

#### 2.2.4.1.6. La plasmine.

La plasmine fait partie de la cohorte des enzymes capables de dégrader l'A $\beta$ . Elle est active aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. À l'image d'autres enzymes impliquées dans le catabolisme de l'A $\beta$ , son immuno-réactivité et son activité sont diminuées dans le cerveau des patients souffrant de MA (Ledesma et al., 2003).

La plasmine a un fonctionnement particulier. Il semble qu'elle ne participe pas au maintien d'une faible concentration d'A $\beta$  soluble dans un cadre physiologique, mais qu'elle intervienne plutôt dans un contexte pathologique en dégradant les agrégats. Ces derniers, du reste, sont capable d'activer la plasmine (Tucker et al., 2004). Des souris invalidées pour le gène de la plasmine ne présentent pas d'agrégats d'A $\beta$  dans leur cerveau ce qui confirme l'intervention particulière de cette enzyme dans la dégradation du peptide (Tucker et al., 2004).

La Figure 6 résume et synthétise l'ensemble des données connues sur la dégradation protéolytique de l'A $\beta$ .



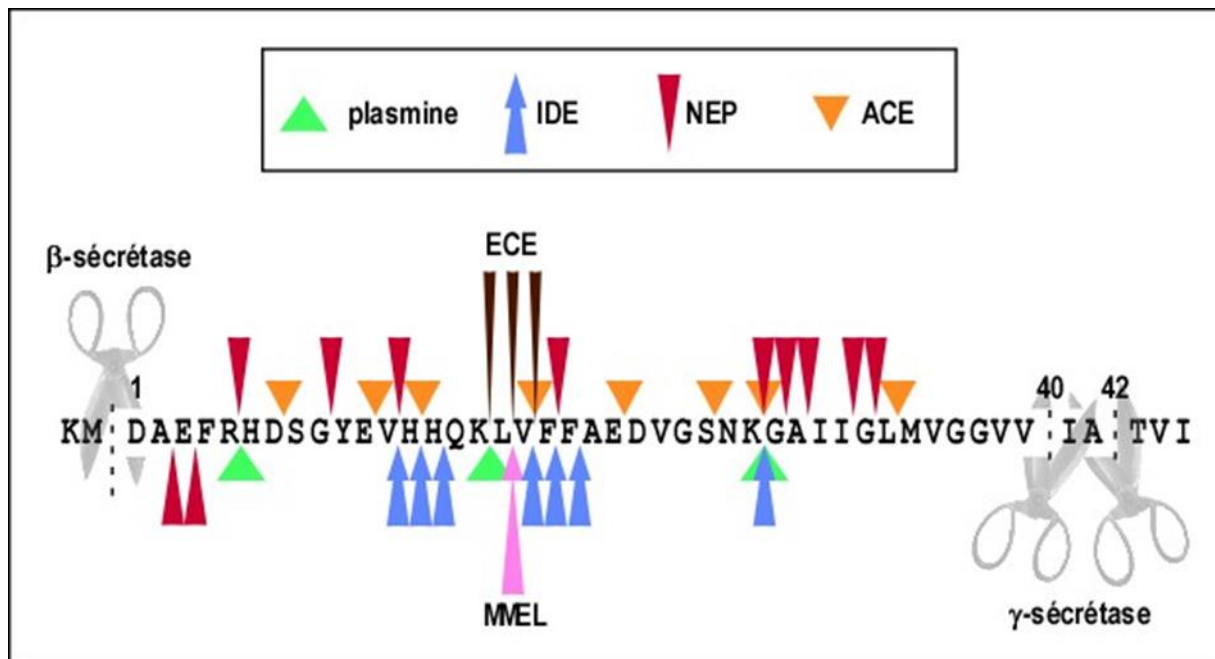


Figure 6 : Dégradation enzymatique du peptide amyloïde.

D'après (Wang et al., 2006).

#### 2.2.4.2. Élimination du peptide amyloïde.

L'A $\beta$  est protéolysé dans les liquides interstitiels cérébraux. Mais outre cette dégradation enzymatique, il existe des mécanismes de régulation de la concentration d'A $\beta$  libre dans le SNC. Ils font intervenir des échanges continus entre le liquide interstitiel, le liquide céphalo-rachidien [LCR] et le sang qui se font à hauteur de la barrière hémato-encéphalique [BHE]. Celle-ci ne permet pas la libre circulation des solutés du genre de l'A $\beta$  ; les transferts sont donc assurés par des récepteurs.

Les récepteurs du type LRP [pour *low-density lipoprotein receptor related protein*] sont impliqués dans le flux sortant ou efflux de l'A $\beta$ , du cerveau vers le plasma, tandis que les récepteurs RAGE [pour *receptor for advanced glycation end products*] sont responsables du flux entrant ou influx de l'A $\beta$ , du plasma vers le cerveau.

LRP1 est impliqué naturellement dans le transport et le métabolisme des protéines associées au cholestérol et à l'Apolipoprotéine E [ApoE]. Il en résulte la production de peptide A $\beta$  qui est alors rejeté dans l'espace extracellulaire consécutivement au recyclage des vésicules. Mais il peut aussi être dégradé dans les lysosomes. Bien que la majeure partie de l'APP doit passer par la voie de la protéolyse superficielle normale, cette étape se déroule très rapidement, de sorte qu'à chaque moment de la vie de la cellule, il ne s'en trouve que de très

petites quantités à la surface de la cellule. On ne sait pas encore pourquoi une partie de l'APP est internalisée dans des endosomes alors qu'une autre partie est protéolysée par l' $\alpha$ -sécrétase, bien que la ségrégation de l'APP et de BACE1 dans des radeaux lipidiques puisse être un élément crucial de ce choix. Enfin, pour compléter la boucle du cycle de l'APP, il existe une communication rétrograde entre les compartiments endosomiques et le RTG. Elle est convoyée par un complexe de molécules appelé rétromère.

Quatre-vingt pour cents de la libération du peptide A $\beta$  est bloqué quand on bloque l'endocytose de surface. En outre, toutes les enzymes semblent être correctement localisées. Il est montré que la BACE1 interagit majoritairement avec l'APP dans les endosomes en conditions natives (avant exposition à la surface de la cellule) tandis que la  $\gamma$ -sécrétase est présente à la surface de la cellule où elle vient compléter l'activité de l' $\alpha$ -sécrétase et dans les compartiments endosomiques où elle complète celle de la BACE1 ( $\beta$ -sécrétase).

## 2.2.5. Rôles physiologiques et pathologiques connus ou supposés du peptide amyloïde.

### 2.2.5.1. Rôles physiologiques.

L'A $\beta$  est produit en conditions physiologiques, aussi bien par les neurones que par les cellules non neuronales. Cette production normale ne dépasse pas des concentrations nanomolaires. À cette concentration, l'A $\beta_{1-40}$  possède des propriétés neurotrophes quand il est appliqué à des cultures de neurones d'hippocampe de Rat. L'A $\beta_{1-40}$  conserve son activité protectrice jusqu'à des concentrations de 20  $\mu\text{mol/L}$ , tant qu'il reste à l'état de monomère (Zou et al., 2003). En raison de son rôle central dans la MA, du moins dans l'hypothèse physiopathologique privilégiée par beaucoup d'auteurs, on peut s'étonner de voir que cette forme d'A $\beta$  possède beaucoup d'autres propriétés que celle d'être neurotoxique. L'A $\beta$  peut fonctionner comme molécule de signalisation, comme un facteur de transcription, comme un régulateur du transport du cholestérol, et comme agent antimicrobien. Mais l'étude de ces diverses propriétés est rendue très difficile en raison de la diversité de conformation que l'A $\beta$  peut adopter, depuis le monomère jusqu'aux fibrilles en passant par les oligomères de diverses MM et les fibrilles. En effet la conformation du peptide peut changer du tout au tout sa fonction biologique.

L'Aβ<sub>1-40</sub> inhibe l'oxydation des lipoprotéines dans le LCR et le plasma (Kontush, 2001). Il manifeste en effet une activité anti-oxydante (Zou et al., 2002). Il est également capable d'inhiber l'oligomérisation de l'Aβ<sub>1-42</sub> ce qui lui confère un autre aspect neuroprotecteur (Murray et al., 2009). L'Aβ<sub>1-40</sub> interagit directement avec l'Aβ<sub>1-42</sub> et bloque son changement de conformation en feuillet β, une étape essentielle dans la formation des fibrilles. Ces effets protecteurs de l'Aβ<sub>1-40</sub> sur la neurotoxicité de l'Aβ<sub>1-42</sub> ont été confirmés en cultures de cellules et *in vivo* (Zou et al., 2003). Le rapport des formes 1-40/1-41 conditionne directement les capacités anti-agrégantes de l'Aβ<sub>1-40</sub>. Les effets protecteurs de ce peptide sont cependant controversés ; les études qui en font état utilisent des concentrations très élevées de peptide, en général supérieure au μmol/L. Si ces concentrations se justifient au regard des études des effets nocifs du peptide, il est difficile de les transposer à l'étude des effets physiologiques, puisqu'elles ne correspondent jamais à ces conditions. Si dans certaines zones du cerveau de patients atteints de MA, il est fréquent de retrouver des concentrations d'Aβ de l'ordre de 1,5 μg par g de tissu, alors que dans les mêmes zones cérébrales de sujets sains, elles sont environ mille fois moindres (2 ng par g de tissu) (Russo et al., 2002).

Il est clair que les effets protecteurs de l'Aβ sont imputables à ses formes monomériques. L'Aβ<sub>1-40</sub>, de fait, a des capacités d'oligomérisation réduite en comparaison de celle de l'Aβ<sub>1-42</sub> (Gulisano et al., 2018).

#### 2.2.5.2. Rôles pathologiques : l'hypothèse amyloïde de la maladie d'Alzheimer.

##### 2.2.5.2.1. *Éléments en faveur de l'hypothèse amyloïde.*

L'Aβ est l'élément clé de la théorie physiopathologique de la MA, appelée hypothèse amyloïde, développée par J. Hardy et G.A. Higgins. Ces auteurs décrivent une cascade d'événements qui commencent avec une dérégulation de la production d'Aβ, se poursuit avec son agrégation et se conclut par l'apparition de la maladie (Hardy and Higgins, 1992). Dans cette hypothèse, l'Aβ (quelles qu'en soient les formes 1-40 ou 1-42) est responsable de tous les maux. Sa surproduction conduirait d'une part à une accumulation extracellulaire du peptide suivie de son agrégation et de la formation de PS, et d'autre part à une entrée massive d'ions calcium dans le neurone, entraînant sa mort, ainsi que l'hyperphosphorylation de la Prt et consécutivement la formation de DNF. Depuis sa formulation initiale, l'hypothèse amyloïde s'est enrichie d'un nombre croissant d'éléments, impliquant l'Aβ<sub>1-42</sub> et des formes tronquées

d'A $\beta$  dans les effets pathogènes des peptides amyloïdes, ainsi que d'informations provenant de l'étude des mutations dans les formes familiales de MA.

Les formes familiales, en particulier, se caractérisent toujours par la modulation de la production d'A $\beta$  marquée soit par une augmentation globale de sa production, soit par un renversement du rapport des concentrations A $\beta_{1-40}$ /A $\beta_{1-42}$  en faveur de cette dernière forme. De plus, la plupart des mutations des gènes des PS $\epsilon$  ou de l'APP n'augmentent pas la quantité globale d'A $\beta$  produite, mais favorise la production d'A $\beta_{1-42}$  au détriment de l'A $\beta_{1-40}$ . Or, chez l'animal, la concentration en A $\beta_{1-42}$  est directement liée à l'apparition des PS. Enfin, il existe une corrélation entre l'âge du déclenchement de la MA et le rapport A $\beta_{1-40}$ /A $\beta_{1-42}$  (Duering et al., 2005).

Les sujets atteints de trisomie 21 ou syndrome de Down possèdent trois copies du gène de l'APP dans leur génome. Ils développent presque invariablement des symptômes neuropathologiques de MA. Ceux d'entre eux qui meurent à l'adolescence présentent dans leur cerveau des PS diffuses abondantes, sans dystrophie neuritique, de la microgliose, de l'astrocytose et des DNF (Selkoe and Hardy, 2016).

Il est un autre aspect qui vient conforter l'hypothèse amyloïde, celui des vaccinations. Les souris transgéniques, modèles de MA, produisant de grandes quantités d'A $\beta$  et des dépôts de PS typiques ont été immunisées contre le peptide A $\beta$  afin de leur faire produire des Ac. Ces animaux, après vaccination, présentent une diminution des dépôts amyloïdes, et, plus intéressant encore, améliorent significativement leurs capacités cognitives (Morgan et al., 2000). Ces approches vaccinales ont été concluantes chez l'animal. On les a donc tentées chez l'Homme. Les premiers résultats font état d'une amélioration du comportement des patients, d'une baisse du nombre de PS et de bons résultats neurologiques (Carare et al., 2013; Hock et al., 2002). Mais ces essais ont dû être interrompus après apparition de 18 cas de méningite dans la cohorte des patients inclus dans l'essai. Depuis, de nombreux groupes pharmaceutiques ont conduit des essais avec des Ac monoclonaux dirigés contre l'A $\beta$ , tels le solanezumab (Eli Lilly) qui se sont soldés par un échec ou le verubecesta (Merck & Co) qui n'a donné aucun résultat sur des patients atteints d'une MA à un stade avancé. Ce dernier Ac est en cours d'essai chez des patients atteints de Ma à un stade prodromique (Karran and Hardy, 2014). Actuellement il est essayé sur des patients en phase prodromique, l'adecanumab (Biogen) qui vise à empêcher l'accumulation des PS (Sevigny et al., 2016). Les résultats de l'étude sont attendus pour 2019.

#### 2.2.5.2.2. *Les limites de l'hypothèse amyloïde.*

En dépit de nombreux éléments en sa faveur, l'hypothèse amyloïde présente quelques limites. La première est d'ordre plutôt conceptuel. L'hypothèse, en effet, fait la part belle au peptide A $\beta$  et délaisse quelque peu le rôle de la Pr $\tau$  hyperphosphorylée.

La Pr $\tau$  est normalement localisée au niveau des axones, elle facilite le transport axonal en interagissant avec les microtubules via des domaines spécifiques de liaison et de favoriser l'assemblage et la stabilité des microtubules. L'interaction de la Pr $\tau$  avec les microtubules est régulée par phosphorylation. La Pr $\tau$  est une phosphoprotéine qui contient environ 80 sites potentiels de phosphorylation (Serrano-Pozo et al., 2011). Dans la MA, la Pr $\tau$  est transféré au compartiment somatodendritique et subit une hyperphosphorylation provoquant la formation de DNF.

Sous sa forme hyperphosphorylée, cette protéine désagrège les microtubules, forme elle-même des agrégats et provoque la mort du neurone (Rodríguez-Martín et al., 2013). De plus des mutations de la Pr $\tau$  sont impliquées dans l'apparition de FTD, et il existe une corrélation directe entre la quantité de DNF et le déclin cognitif. Cependant les lésions produites par la Pr $\tau$  ne sont pas spécifiques de la MA ; on les retrouve dans une série d'autres maladies appelées de manière générique des tauopathies. De plus l'hyperphosphorylation de la Pr $\tau$  implique nombre d'étapes dont des interactions protéine-protéine et un stress oxydant. La production d'A $\beta$  est indispensable à l'hyperphosphorylation de la Pr $\tau$  dans la MA. La production et l'accumulation d'oligomères d'A $\beta$  [A $\beta$ O] incite au développement d'une triade neurodégénérative figurée par la perte synaptique, la simplification (ou désorganisation) du réseau dendritique et la dégénérescence neuronale convoyée par des phénomènes dépendants et indépendants de la Pr $\tau$ . L'augmentation d'A $\beta$  crée un stress oxydant qui aboutit à cette hyperphosphorylation pathologique de la Pr $\tau$  et à la formation de DNF (Bennett et al., 2017; Patil and Chan, 2005).

Selon des études récentes, la Pr $\tau$  agrégée peut être directement transmise de neurones en neurones (Hall and Patuto, 2012). La propagation transcellulaire de la Pr $\tau$  pourrait conduire la progression de la MA d'une façon semblable au prion (Chu and Liu, 2018). La diffusion de la Pr $\tau$  inclut les étapes suivantes : 1) l'assimilation de tau, 2) l'agrégation de tau, 3) la sécrétion et 4) le transfert transcellulaire de tau (Mudher et al., 2017). L'assimilation de

la Prt est obtenue via endocytoses clatherine-indépendante et macropinocytoses impliquant heparan sulfate proteoglycans (HSPG) ou l'APP (Falcon et al., 2018; Holmes et al., 2013; Takahashi et al., 2015; Wu et al., 2013).

Pour conclure, de multiples preuves viennent soutenir la plausibilité de l'hypothèse amyloïde et lui confère presque un statut de dogme neuropathologique. Toutefois, et toujours en référence à la citation de Blaise Pascal, il n'est pas démontré que les PS sont responsables de la MA ; il est simplement démontré que leur apparition coïncide avec son apparition. Mais l'hypothèse n'explique pas pourquoi il peut apparaître de nombreuses PS dans le cerveau de sujets demeurés parfaitement sains.

## 2.2.6. Relations entre les fonctions et la conformation du peptide amyloïde.

### 2.2.6.1. Les diverses conformations du peptide amyloïde.

#### 2.2.6.1.1. *Comportement du peptide bêta-amyloïde en solution.*

En solution le peptide A $\beta$  n'est pas structuré, mais il acquiert une structure  $\beta$ -plissée par agrégation. La formation d'amyloïde par le peptide A $\beta$  suit une voie de polymérisation et nucléation, caractérisée par une phase initiale de latence où dominent les formes monomériques [M], suivie de la formation d'oligomères de bas poids moléculaire [BPM] : ce sont des dimères, des trimères et des oligomères < 8-mères.

Puis il se forme un '*nucleus*' oligomérique riche en structures  $\beta$ . Celui-ci subit une croissance supplémentaire pour former des agrégats d'ordre supérieur de distribution, de taille et de forme hétérogène. Ces intermédiaires riches en structure  $\beta$ -plissée sont appelés collectivement agrégats préfibrillaires ; ils disparaissent lors de la formation des fibrilles. Certaines des formes préfibrillaires sont bien décrites. Il faut inclure dans ces formes connues les protofibrilles (des structures curvilinéaires de moins de 200 nm de long et de 4 à 6 nm de diamètre), les ligands diffusibles dérivés du peptide A $\beta$  [LDDP] (des agrégats sphériques de 3 à 5 nm de diamètre), des assemblages en forme de beignet (diamètre extérieur : 8 à 12 nm ; diamètre intérieur : 2 à 2,5 nm) et les oligomères BPM (Fig. 8).

On ne sait pas si certaines de ces espèces sont des intermédiaires conduisant à la formation des fibrilles amyloïdes, ou correspondent à des formes non évolutives.

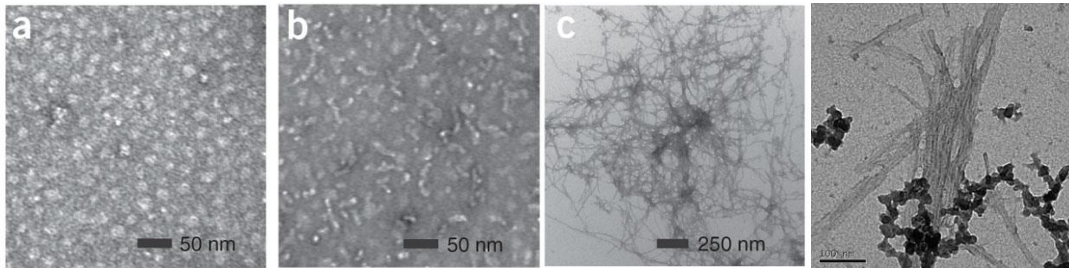


Figure 7 : Caractérisation d'oligomères de peptide amyloïde 1-42 en microscopie électronique.

a) oligomères, b) protofibrilles et C1 et C2) fibrilles (D'après (Ahmed et al., 2010)).

#### 2.2.6.1.2. Propriétés des agrégats protofibrillaires.

Les agrégats protofibrillaires sont dotés de propriétés caractéristiques distinctives. (a) Ils contiennent un mélange d'éléments présentant diverses structures secondaires, avec toutefois une prédominance des structures  $\beta$ -plissées. (b) Ils lient des colorants spécifiques des amyloïdes, comme le Rouge Congo ou la ThT. (c) Ils sont moins stables que les fibrilles amyloïdes et existent en équilibre avec les formes monomériques du peptide  $A\beta$ . En présence de peptide  $A\beta$ , toutes ces espèces finissent par se convertir en fibrilles amyloïdes par addition de monomères.

#### 2.2.6.1.3. Propriétés des fibrilles amyloïdes matures.

Les fibrilles amyloïdes matures sont décrites comme des structures insolubles, riches en feuillets  $\beta$ , et qui font plus de 1  $\mu\text{m}$  de long, un diamètre de 8 à 12 nm, et sont composés de 2 à 6 protofilaments. *In vitro*, les formes synthétiques et recombinantes de peptide  $A\beta$  forment des agrégats et des fibrilles amyloïdes qu'il est impossible de distinguer de ceux que l'on isole du cerveau des patients atteints de MA. Ce fait suggère que le processus physiologique de la formation de l'amyloïde peut être reproduit *in vitro*, et donne du prix et de la pertinence aux études conduites *in vitro* pour élucider les mécanismes moléculaires de la formation de l'amyloïde *in vivo*. La Figure 9 récapitule sous forme schématique l'ensemble de ces données.

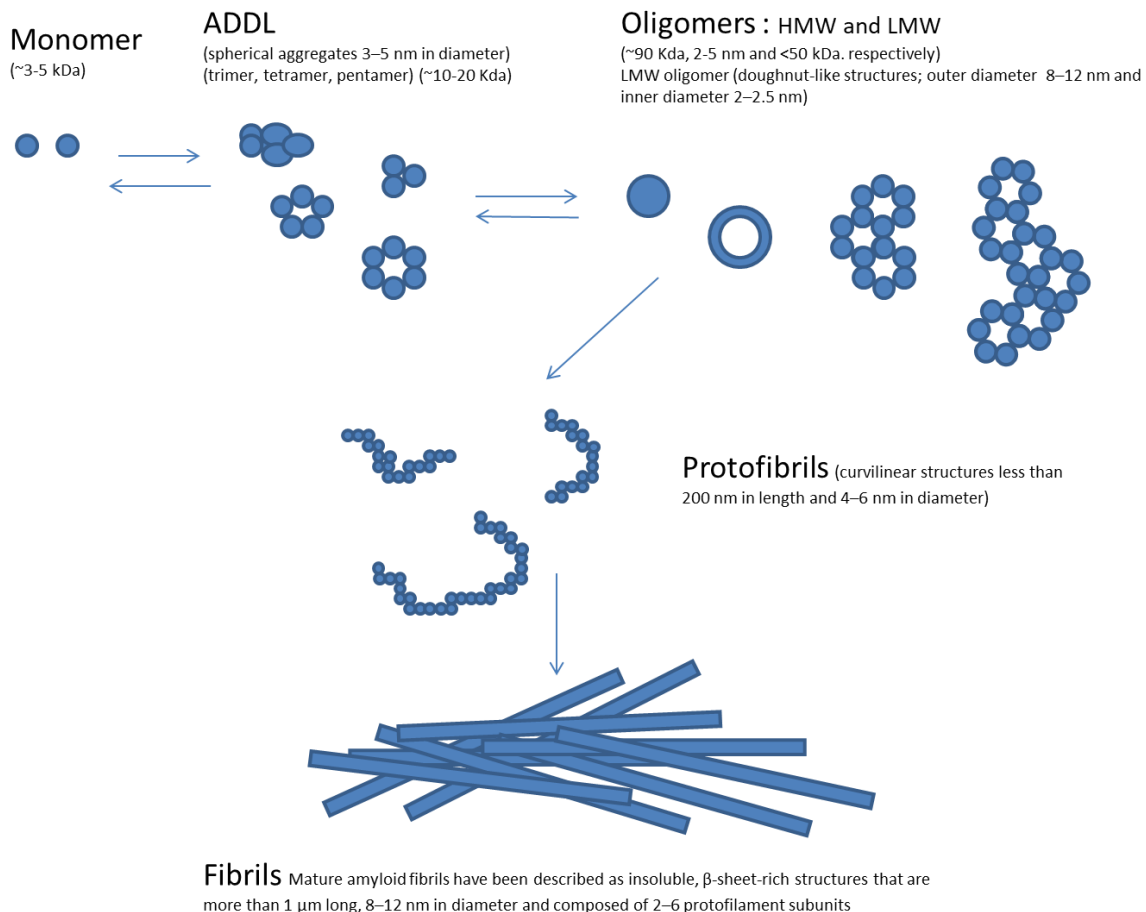


Figure 8 : Représentation schématique de la formation des plaques séniles.

(D'après (Callizot et al., 2013)).

#### 2.2.6.2. Quel type de toxicité pour quelle conformation ?

L'accumulation intracellulaire d'A $\beta$  est sans doute un événement précoce de la MA. Elle précède l'apparition des PS (Gouras et al., 2000; Oddo et al., 2006). Mais la corrélation temporelle et spatiale entre quantité intracellulaire et les autres lésions de la MA (dont les DNF) n'est pas toujours forte. Voilà qui remet en question le statut de précurseur de la cascade biologique pathologique dont on qualifie souvent ces phénomènes (Wegiel et al., 2007). Par ailleurs, ce n'est pas tant la quantité d'A $\beta$  que son état d'oligomérisation qui affecte de façon critique, semble-t-il, son pouvoir toxique (Hayden and Teplow, 2013). L'oligomérisation est l'une des principales modifications conformationnelles subies par l'A $\beta$  après qu'il a été produit. Les formes oligomérisées, A $\beta$ O, représenteraient près de 45 % des espèces d'A $\beta$  (Kuo et al., 1996). Dans les oligomères, extraits des dépôts amyloïdes vasculaires et des PS, on trouve des dimères et des trimères d'A $\beta$  formés par une liaison covalente établie entre les



résidus tyrosines en position. Les liaisons covalentes tyrosine-tyrosine sont très résistantes à la protéolyse et elles renforcent la stabilité des PS lors de leur formation.

*In vitro*, cette oligomérisation est induite par des phénomènes d'oxydation, et plus précisément, par l'action du cuivre. Mais les phénomènes d'oxydation induits par le cuivre n'affectent pas l'A $\beta$  de Rat qui ne possède pas de tyrosine (Atwood et al., 2004). Les oligomères d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, formés naturellement (par des cellules transfectées ou dans les extraits de cerveaux de malades) sont beaucoup plus toxiques (plus de mille fois !) que les oligomères formés à partir d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> synthétiques. Le phénomène pourrait s'expliquer par l'absence de modifications post-traductionnelles du peptide synthétique ou par l'action de l'environnement cellulaire, et notamment la présence de partenaires protéiques (Hayden and Teplow, 2013). Ainsi, le glycosphingolipide GM1, que l'on retrouve dans les membranes lipidiques peut interagir avec l'A $\beta$  qu'il complexe ; il agirait comme un catalyseur d'oligomérisation pouvant déclencher la mort neuronale via le récepteur du *nerve growth factor* [NGF] (Yamamoto et al., 2007; Yanagisawa, 2015).

Les A $\beta$ O et les protofibrilles d'A $\beta$  sont toxiques pour les neurones et ils perturbent plus fortement la plasticité synaptique que ne font les fibrilles (Sakono and Zako, 2010). L'accumulation intracellulaire d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> déclenche une apoptose dépendante de p53 (Ohyagi et al., 2005). En outre, l'augmentation de la concentration intracellulaire des ions calcium se traduit par une augmentation de la production d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> intracellulaire suivi d'une importante mort cellulaire (Pierrot et al., 2004).

La toxicité de la forme A $\beta$ <sub>1-42</sub> pourrait bien être liée à ses capacités d'agrégation. Les cinétiques d'agrégation des A $\beta$ <sub>1-40</sub> et <sub>1-42</sub> sont très différentes. L'A $\beta$ <sub>1-42</sub> s'agrège beaucoup plus vite, et la formation d'A $\beta$ O<sub>1-42</sub> s'en trouverait accélérée *in vivo*. L'A $\beta$ O est détecté dans le LCR des patients souffrant de MA ainsi que dans leur plasma, mais l'utilisation de ce marqueur sanguin pour le diagnostic de la MA est sujet à controverse (Koyama et al., 2012; Savage et al., 2014; Xia et al., 2009).

L'A $\beta$ <sub>1-42</sub> est supposé devoir sa plus grande toxicité à sa capacité à former des fibrilles (Walsh and Selkoe, 2007). Bien que les diverses études disponibles portent surtout sur les formes hautement agrégées d'A $\beta$ , il y en a qui insistent sur le rôle joué par de simples dimères (Shankar et al., 2008). Ainsi, des neurones d'hippocampe provenant de rats traités avec des dimères d'A $\beta$  isolés directement de cerveaux de patients atteints de MA voient leur LTP [pour *long term potentiation*] inhibée, et leur LTD [pour *long term depression*] accrue, associée du

reste à une diminution de la densité des épines dendritiques (Shankar et al., 2008). Mais les auteurs s'accordent pour conclure que les A $\beta$ O induisent une multitude d'effets neurotoxiques, dont une réduction de la densité synaptique, une perturbation de la transmission synaptique, une inhibition de la LTP et une détérioration des fonctions cognitives. Mais toutes les conformations d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> ne sont pas toxiques. Son monomère est neuroprotecteur, particulièrement dans des gammes de concentrations de l'ordre de la pmol/L (Shankar et al., 2007).

Les PS se forment progressivement (Fig. 9). Les monomères d'A $\beta$  s'assemblent en oligomères, les A $\beta$ O, lesquels vont ensuite former des protofibrilles. Celles-ci forment les PS après avoir acquis la conformation fibrillaire.

On a vu que les monomères ne sont pas toxiques (Giuffrida et al., 2009, 2010). Elles seraient même protectrices. Les monomères d'A $\beta$  peuvent spécifiquement activer CREB, un point convergeant pour des mécanismes et des voies impliqués dans la mémoire (Zimbone et al., 2018). Cependant dès que leur concentration atteint un certain seuil, les A $\beta$ , dont l'A $\beta$ <sub>1-40</sub>, perdent cette propriété protectrice et deviennent toxiques. Nous avons déjà signalé que dans les expériences conduites aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* pour étudier la toxicité de l'A $\beta$  soluble, ces concentrations sont largement dépassées.

Il est assuré que les A $\beta$ O sont les plus neurotoxiques de toutes les espèces conformationnelles d'A $\beta$ , en raison de leur capacité à induire un stress oxydatif ou à susciter une réponse calcique anormale. Les fibrilles et les protofibrilles semblent être dotés d'une moindre neurotoxicité. Cependant il existe une mutation dite *artic* (E22G), responsable d'une forme familiale de MA qui confère au peptide A $\beta$ E22G la capacité à former des fibrilles beaucoup plus rapidement. Des souris transgéniques pour le gène *APPE22G* forment un nombre de PS beaucoup plus élevé que leur contrepartie transgénique pour l'APP humain sauvage, mais elles présentent, paradoxalement, un moindre déficit cognitif ou un déficit comparable à celui de leur contrepartie transgénique pour l'APP sauvage (Cheng et al., 2007). Ces expériences confirment donc que les PS ne sont pas l'entité la plus toxique.

Des dépôts diffus sont présents chez le sujet sain et ne sont entourés que de cellules microgliales quiescentes, alors qu'inversement, les PS sont entourées, pour 80 % d'entre elle, de cellules activées. La microglie semble donc jouer un rôle direct dans la régulation du nombre de PS, comme le font les macrophages dans le cas d'amyloïdoses périphériques. Les

PS sont formées majoritairement par l'accumulation et l'agrégation d'A $\beta$  conformés en feuillets  $\beta$  insolubles (Masters et al., 1985). Ces formes à feuillets  $\beta$  constituent le cœur de la PS et réagissent, comme on l'a déjà mentionné, au rouge Congo, une réaction devenue un classique en histopathologie. Une couronne d'axones ou de dendrites (neurites) malformés ou immatures enserme ces PS. De telles atteintes à la structure neuronale peut contribuer aux signes cliniques de la MA (Marin et al., 2016).

Il convient de signaler enfin que certains auteurs attribuent au PS un rôle de mécanisme de détoxification par leur capacité à séquestrer les formes les plus toxiques d'A $\beta$ , *i.e.* les A $\beta$ O (Krabbe et al., 2013; Yuan et al., 2016)

### 2.2.7. Nomenclature des structures formées par le peptide bêta-amyloïde.

Il nous paraît essentiel de clarifier la nomenclature des structures formées par l'A $\beta$ , quitte à ce que cette section soit quelque peu redondante avec ce qui vient d'être dit.

#### 2.2.7.1. Amyloïde.

Un amyloïde est un composé protéique formant des dépôts extracellulaires insolubles, (les PS dans le cas de la MA). Ces dépôts sont composés essentiellement d'agrégats fibrillaires constitués d'une espèce protéique unique, le peptide A $\beta$  dans le cas de la MA. [Il existe d'autres types d'amyloïdes en effet.] Un amyloïde est défini par la propriété qu'il a de lier certains colorants et de leur conférer (ou de prendre) des propriétés nouvelles par cette liaison : augmentation de fluorescence avec la Thiolane et biréfringence verte avec le Rouge Congo. Outre la protéine constitutive des fibrilles, les dépôts amyloïdes (les PS par conséquent) contiennent d'autres protéines, des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes.

#### 2.2.7.2. Fibrille.

Une fibrille est une structure filamenteuse consistant en 2 à 6 protofilaments, visibles dans les sections transversales de tissus malades, et observée également lors de la formation

(agrégation) du peptide A $\beta$  *in vitro*. Les fibrilles matures sont caractérisées par (a) un diagramme de diffraction aux rayons X spécifique des structures à feuillets  $\beta$  ; (b) des spectres

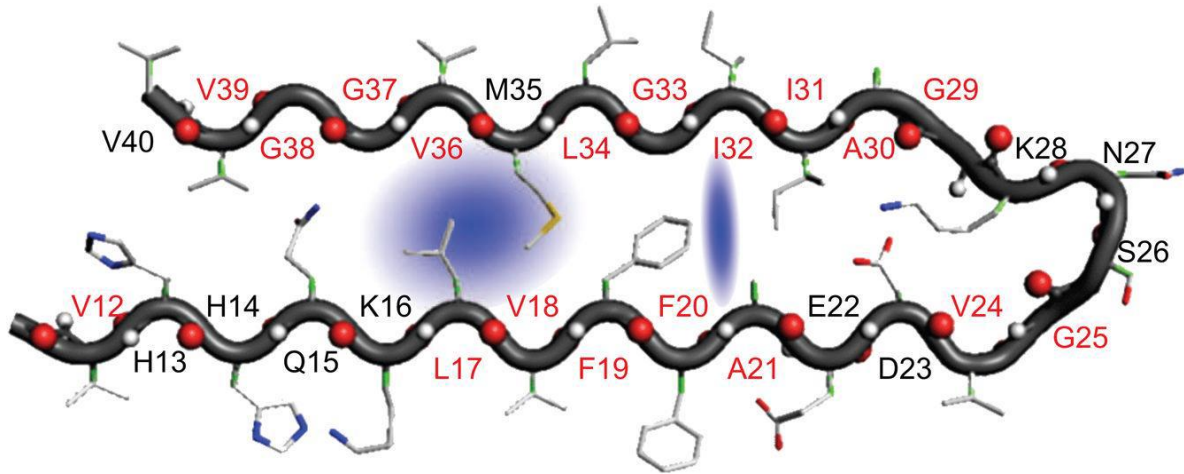


Figure 9 : Structure d'un monomère de peptide bêta-amyloïde.

(D'après (Straub and Thirumalai, 2010)). Structure du monomère hydraté des fibrilles de peptide A $\beta$ 1-40. L'ombre bleue représente les molécules d'eau qui sont emprisonnées dans une poche hydrophobe.

de dichroïsme circulaire indiquant la présence importante de structures à feuillets  $\beta$  ; (c) la liaison à la Thiolane et au Rouge Congo ; (d) une morphologie filamenteuse caractéristique (diamètre : 8 à 12 nm ; longueur supérieure à 1  $\mu$ m) à l'observation au TEM. Cette morphologie peut varier en fonction de la solution et des conditions d'incubation.

#### 2.2.7.3. Protofilament.

Le protofilament est une sous-unité structurale de la fibrille mature. Il apparaît comme un fil tordu selon une périodicité donnée et un arrangement hélicoïdal. Cette structure ne doit pas être confondue avec la protofibrille.

#### 2.2.7.4. Oligomères.

Le terme d'oligomères s'applique à toute une série d'espèces moléculaires, allant des espèces de BPM (dimères, trimères et tétramères) aux oligomères de haut poids moléculaire [HPM] telles les structures sphériques, en forme de chaîne, ou annulaires, ou des structures

encore plus longues. Les fibrilles sont, par définition, des oligomères protéiques. Différents types d'espèces oligomérisées ont été décrits, et se distinguent les uns des autres par leur composition, leur stabilité et leur poids moléculaires.

#### 2.2.7.4.1. *Oligomères de bas poids moléculaires.*

En général, les préparations d'oligomères de BPM contiennent un mélange d'espèces oligomérisées, et sont en équilibre avec le monomère de peptide A $\beta$ , comme l'indique l'électrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium [SDS-PAGE] ou les études de réticulation photo-induite. En général, ces espèces ne sont pas visibles au TEM utilisé selon les méthodes standards. La plus petite espèce d'oligomère de peptide A $\beta$  qui a pu être visualisée en microscopie électronique et dont on a pu mesurer la taille fait de 42 à 80 kDa. Les preuves en faveur de l'existence d'oligomères de BPM sont tirées des résultats de l'analyse en gel SDS-PAGE dénaturante, et des expériences de réticulation photo-induite. Aucune preuve n'indique que ces oligomères s'accumulent en forme stable. On ne peut exclure que les oligomères de BPM dérivent des oligomères de HPM.

#### 2.2.7.4.2. *Oligomères de bas poids moléculaires stables au dodécylsulfate de sodium.*

Les oligomères de BPM stables au SDS (inférieurs à des 8-mères) ont été préparés *in vitro* ou isolés de sources naturelles. Ceux qui sont excrétés par les cellules CHO surexprimant l'APP de type sauvage ou l'APP portant des mutations liées aux MAF, présentent une très grande stabilité au SDS et aux dissociations chimiques, tandis que la majorité des espèces d'oligomères de BPM recueillis après chromatographie d'exclusion sur gel est sensible au SDS, à moins qu'ils ne soient stabilisés par réticulation chimique. Les oligomères de BPM sécrétés naturellement inhibent le phénomène de LTP, quand ils sont injectés dans le cerveau du rat, à des concentrations beaucoup plus faibles que les oligomères de BPM préparés à partir de peptide A $\beta$  synthétique. En dépit des efforts consacrés par diverses équipes de recherche pour établir l'identité chimique et la vraie stœchiométrie des oligomères naturels résistants au SDS et des agrégats par spectrométrie de masse, les données relatives à cette question manquent et les tailles habituellement estimées ne sont fondées que sur la mobilité en gel dénaturant.

#### 2.2.7.4.3. Oligomères de haut poids moléculaire.

Les oligomères de HPM sont des oligomères métastables de peptide A $\beta$  qui peuvent être mis en évidence en microscopie électronique. Leur taille s'étage d'environ 42 kDa à plus de plus de 10<sup>6</sup> Da.

##### 2.2.7.4.3.1. Protofibrilles.

Les protofibrilles sont des structures métastables, hétérogènes, riches en structures  $\beta$ -plissées, et préfibrillaires. Elles ont été observées en TEM et ATM, lors de la formation de fibrilles amyloïdes. Différentes préparations de protofibrilles de peptide A $\beta$  révèlent la présence de mélanges hétérogènes de discrets agrégats  $\beta$ -plissés de tailles (50 à 1 500 kDa) et de morphologies (structures sphériques : 5 à 20 nm de diamètre ; annulaires ; curvilinéaires et lisses [diamètre : 5 nm ; longueur : supérieure à 200 nm]) différentes. Les études de TEM et ATM confortent l'existence d'un lien structural entre ces différentes formes, mais la dynamique de leur interconversion et leur relation avec les fibrilles amyloïdes restent très mal comprises. Bien qu'initialement on ait pensé que les protofibrilles soient sur un chemin qui conduit en ligne droite aux fibrilles, dans son usage courant, le terme de protofibrilles s'applique à tous les agrégats préfibrillaires (taille supérieure ou égale à 4 nm) qui peuvent être détectées en microscopie électronique. Les protofibrilles se lient au Rouge Congo et à la Thiolane, bien qu'à un moindre degré que les fibrilles mûres. De ce fait, dans la présente acception du terme, les protofibrilles sont des intermédiaires cinétiques, tandis que les protofilaments représentent la substructure de la fibrille amyloïde.

##### 2.2.7.4.3.2. Ligands diffusibles dérivés du peptide bêta-amyloïde.

Les LDDP sont aussi appelés globulomères. Ce sont des structures globulaires de 3 à 5 nm de diamètre. On a d'abord déduit des études de SDS-PAGE que ces préparations contiennent essentiellement des oligomères de type 10- à 12-mères. Mais ultérieurement, il a été montré que ces préparations sont constituées d'une population hétérogène d'espèces

de peptide A $\beta$ , embrassant des tailles allant du monomère à l'agrégat de taille supérieure à 10<sup>6</sup> Da. Cette distribution ressemble à celle que l'on observe pour les protofibrilles.

#### 2.2.7.4.3.3. Globulomères annulaires.

Les globulomères annulaires sont des structures en forme de beignet, dont le diamètre extérieur est de 8 à 12 nm et le diamètre intérieur de 2 à 2,5 nm.

#### 2.2.7.4.4. *Nucleus*.

Le nucleus est une entité rare et instable (comme les oligomères de BPM et les protofibrilles) qui influencent le taux d'un processus nucléé de polymérisation. Les nuclei sont métastables. Ils peuvent former des semences (*seed*) et agir comme telles pour faire croître des fibrilles ou peut-être les désassembler et réduire alors leur croissance.

#### 2.2.7.4.5. *Semence*.

Une semence est une entité relativement stable (comme les fibrilles et les fibrilles fragmentés) qui, lorsqu'elle est introduite dans une solution de monomères de peptide A $\beta$  sert de nucleus efficace et accélère la formation des fibrilles (peut-être en éliminant la phase de latence associée à la formation des nuclei) dans le processus de polymérisation-nucléation.

## 2.3. La protéine transactive response-DNA binding protein 43.

La TDP-43 ou *transactive response DNA binding protein 43* a été identifiée dans les années 2000 comme un composant majeur des inclusions protéiques retrouvées dans les neurones de sujets atteints de la plupart des formes de SLA et de dégénérescence fronto-temporale lobaire [FTLD-TDP pour *fronto-temporal lobar degeneration* à TDP-43] (Forman et al., 2007; Winton et al., 2008); voir aussi (Boeve and Graff-Radford, 2012; Nag et al., 2017; Rosen et al., 1993) pour leurs études génétiques montrant l'association de mutations de *TDP-43* avec des maladies neurodégénératives comme la MA, la démence frontotemporale ou la SLA). Des inclusions ne contenant ni Prt ni  $\alpha$ -synucléine, mais riches en protéines ubiquitinylées spécifiques des FTLD et de la SLA avaient bien été décrites sans que l'on connaisse la nature des protéines les constituant jusqu'à ce qu'il soit montré qu'elles contiennent essentiellement de la TDP43. "La TDP-43 pathologique est hyperphosphorylée, ubiquitinylée et clivée pour engendrer des fragments carboxyterminaux ; on ne la récupère que dans les régions du SNC affectées par la maladie, dont l'hippocampe, le néocortex et la moelle épinière" dit le résumé de cet article. On considère que ces inclusions appelées UBI sont les stigmates de la SLA et de FTLD-TDP. Les UBI sont retrouvées dans le cytoplasme et la partie initiale de l'axone des neurones moteurs de la moelle épinière en voie de dégénérescence ; on la trouve aussi dans les astrocytes.

Comme dans le cas de l'APP et de ses fragments dérivés, il convient de passer en revue les rôles physiologiques et pathologiques de la TDP-43.

### 2.3.1. Fonctions de la protéine Transactive response DNA binding protein 43 normale.

La TDP-43 est impliquée dans la régulation des fonctions et du trafic des RNA. C'est une protéine de 414 AA. Elle possède deux domaines de reconnaissance du RNA, appelés respectivement RRM1 [pour *RNA recognition motif 1*] et RRM2. Son domaine carboxyterminal



est riche en glycine. Toutes les mutations de TDP-43 associées à des formes familiales de SLA sont des mutations non-sens siégeant dans la région du gène codant cette séquence protéique. Le fait suggère donc que la modification de cette région est suffisante pour induire la neurodégénérescence (Pesiridis et al., 2009; Pradat et al., 2015; Sreedharan, 2010).

Dans la mesure où les travaux consacrés à cette protéine ne font pas le cœur de notre thèse, nous nous bornerons à résumer ce que l'on sait de ses fonctions connues. (a) La TDP43 est un composant des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes [nnRNP], des particules qui participent à la régulation de l'épissage des espèces de pré-mRNA. On la retrouve dans les hnRNPA2/B1, hnRNPA1, hRNPC1/C2 et hnRNPA3 (Appocher et al., 2017; Li et al., 2016; Ling et al., 2015); (b) La TDP-43 se lie à des séquences de mRNA, situées essentiellement dans les régions non traduites et en affecte la stabilité et le *turnover* ; ainsi est-elle va-t-elle des mRNA de la kinase 6 dépendante des cyclines, de l'histone désacétylase, ou du neurofilament de basse MM (Fiesel et al., 2010) ; (c) La TDP-43 jouerait un rôle dans le trafic des mRNA ; en effet elle subit un mouvement rapide de navette nucléo-cytoplasmique et on la retrouve dans les granules dendritiques de RNA (Gu et al., 2017)(d) La TDP-43 fait partie du complexe Drosha lequel est impliqué dans le traitement des microRNA (Kawahara and Mieda-Sato, 2012) ; (e) la TDP-43 agit comme répresseur de la transcription en se liant à des brins monocaténares de DNA (Kuo et al., 2009); (f) la TDP-43 est colocalisée avec des granules de stress, dont on pense qu'ils ont pour rôle de protéger de la dégradation les mRNA dans des conditions qui induisent le stress (Dewey et al., 2011; McDonald et al., 2011).

### 2.3.2. Propriétés de la protéine Transactive response DNA binding protein 43 anormale.

L'association des UBI et des formes familiales de SLA a conduit tout naturellement à rechercher l'existence de mutations dans le gène codant la TDP-43. Il a été trouvé au moins quatre mutations ponctuelles dans la région du gène codant l'exon 6 (Sreedharan et al., 2008) dont une consiste en un changement de méthionine en valine à la position 337. La protéine mutée n'est pas directement toxique, mais la transfection d'embryon de poulet par le gène muté induit un profond retard dans le développement du système nerveux. L'excision du gène de la TDP sur des cellules embryonnaires suscite l'activation de l'épissage de nombreux exons. Ce phénomène est observé aussi chez des patients atteints de SLA (Ling et al., 2015).

Il est probable que la toxicité de la TDP-43, ou du moins son rôle pathologique dans les maladies neurodégénératives soit lié à son accumulation intracytoplasmique anormale. Il a été montré que la surexpression de la TDP-43 amputée d'un motif NLS (nomenclature unilatérale des AA) ou la surexpression de sa partie carboxyterminale conduit à son accumulation intracytoplasmique de nombreuses inclusions de type UBI.

Fait très intéressant, il semble que la partie carboxyterminale de TDP-43 contienne un motif de type prion (Cushman et al., 2010) qui confère à la molécule des propriétés que l'on retrouve dans les protéines prions, dont l'agrégation, la résistance aux protéases, et la propagation de cellule à cellule mais pas obligatoirement au pouvoir infectieux (Ayers and Cashman, 2018; Gitler and Shorter, 2011).

Enfin, il est intéressant de noter que les patients atteints de SLA sporadique à évolution lente (durant de 10 à 20 ans) présentent un nombre d'UBI relativement faible en comparaison de celui que l'on trouve chez les patients atteints de SLA classique. Cette observation permet de conclure de manière plausible que la dégénérescence des neurones est bien liée à la présence de ces inclusions.

Ces précisions sommaires suffiront à éclairer les résultats que nous présentons dans le présent travail.

# 3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

## 3.1. Culture cellulaire

### 3.1.1. Culture primaire de neurones corticaux

Les neurones corticaux de rat sont cultivés comme il a été décrit par Singer et al., 1999. Des femelles (Rat Wistar) au 15<sup>ème</sup> j de gestation sont euthanasiées dans une chambre à CO<sub>2</sub>. Les embryons sont prélevés de l'utérus et immédiatement placés dans du milieu L15 contenant 2 % d'une solution de Pénicilline (10,000 U/mL) et streptomycine (10 mg/mL) (PenStr) et 1 % de sérum d'albumine bovin (BSA). Le cortex est prélevé et dissocié par un mélange de trypsine EDTA pendant 20 min à 37° C, à une concentration finale de 0,05 % de trypsine et 0,02 % d'EDTA. La dissociation enzymatique est arrêtée par adjonction de DMEM à 4,5 g/L de glucose additionné de DNase grade II (à la concentration finale de 0,5 mg/ml) et de 10 % de sérum foetal de veau (SVF). Les cellules sont ensuite dissociées par aspiration et refoulement au moyen d'une pipette graduée de 10 mL munie d'un cône de 300 µL. La suspension cellulaire est alors centrifugée à 515 x g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans un milieu de culture constitué de milieu Neurobasal à 2 % de PenStr, 2 % de supplément B27, 2 mmol/L de L-glutamine et 10 ng/mL de BDNF. Les cellules viables sont comptées dans une cellule de Malassez en présence de bleu trypan.

Elles sont alorsensemencées à une densité de 74 000 cellules par cm<sup>2</sup> dans des plaques à 96 puits « précoatées » de poly-L-Lysine. La moitié du milieu est renouvelé tous les deux jours et les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée d'air (95 %) - CO<sub>2</sub> (5 %).

### 3.1.2. Culture primaire de neurones corticaux enrichie en microglie

Les neurones corticaux de rat enrichis en microglie sont cultivés de la même manière que précédemment aux détails près suivants.

Le surnageant est aspiré pour être éliminé et le culot cellulaire est repris dans un milieu de culture constitué de milieu Neurobasal additionné de 2 % de PenStr, 2 % de supplément B27,

2 mmol/L de L-glutamine et 10 ng/mL de BDNF, 2 % de sérum de cheval inactivé 2 % de SVF inactivé, 1 g/L de glucose, 1 mmol/L de sodium pyruvate, et 100 µmol/L d'acide aminé non essentiel. Les cellules viables sont comptées dans une cellule de Malassez en présence de bleu trypan.

Les cellules sontensemencées à une densité de 132 350 cellules par cm<sup>2</sup> dans des plaques à 96 puits « précoatées » de poly-L-Lysine. La moitié du milieu est renouvelé tous les deux jours et les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée d'air (95 %) - CO<sub>2</sub> (5 %).

### 3.1.3. Culture d'astrocytes purifiés

Le cerveau total (sans le cervelet) est prélevé sur des embryons de rat Wistar au 15<sup>ème</sup> j de gestation. Le tissu est dissocié par un mélange de trypsine EDTA pendant 20 min à 37°C, à une concentration finale de 0.05 % de trypsine et 0.02 % EDTA. La dissociation enzymatique est arrêtée par adjonction de DMEM contenant 4.5 g/L de glucose additionné de DNase grade II (concentration finale de 0.5 mg/mL) et 10 % de SVF. Les cellules sont ensuite dissociées par aspiration et refoulement au moyen d'une pipette graduée de 10 mL munie d'un cône de 300 µL. La suspension cellulaire est centrifugée à 515 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé par aspiration et le culot cellulaire est repris dans un milieu de culture défini constitué de DMEM à 10 % de SVF et 2 % de PenStr. Les cellules sontensemencées à une densité de 267 000 cellules par cm<sup>2</sup> dans une flasque. Quand les cellules sont à confluence, la flasque est agitée pendant 3 h à température ambiante sur un vortex. Cette étape permet d'obtenir une culture très pure en astrocyte. Le surnageant est éliminé et les cellules adhérentes au support sont traitées à la trypsine EDTA pendant 5 min afin de les décoller du support. Les astrocytes sont ensuite démultipliés par 4 passages successifs. Une banque d'astrocytes purs est conservée dans l'azote liquide.

### 3.1.4. Culture primaire de motoneurones non purifié

Les motoneurones de rat sont cultivés comme il est décrit par (Martinou et al., 1992; Wang et al., 2013). Les rats Wistar au 14<sup>e</sup> j de gestation sont euthanasiées dans une chambre à CO<sub>2</sub>. Les embryons sont prélevés de l'utérus et immédiatement placés dans du milieu L15

contenant 2 % de PenStr et 1 % de BSA. La moelle épinière est prélevée et traitée à la trypsine EDTA pendant 20 min à 37 °C à une concentration finale de 0.05 % de trypsine et 0.02 % EDTA. La dissociation enzymatique est arrêtée par adjonction de DMEM contenant 4.5 g/L de glucose additionné de DNase grade II (à la concentration finale de 0.5 mg/mL) et 10 % de SVF. Les cellules sont ensuite dissociées par aspiration et refoulement au moyen d'une pipette graduée de 10 mL munie d'un cône de 300 µL. Puis, la suspension cellulaire est centrifugée à 515 x *g* pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans un milieu de culture constitué de milieu Neurobasal à 2 % de PenStr, 2 % de supplément B27, 2 mmol/L de L-glutamine et 10 ng/mL de BDNF. Les cellules viables sont comptées dans une cellule de Malassez en présence de bleu trypan.

Les cellules sontensemencées à une densité de 59 000 cellules par cm<sup>2</sup> dans des plaques à 96 puits « précoatées » avec de la poly-L-Lysine. La moitié du milieu est renouvelé tous les deux jours et les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée d'air (95 %) - CO<sub>2</sub> (5 %).

### 3.1.5. Coculture nerf muscle

Les cellules musculaires humaines proviennent de Promocell. 21 000 cellules sontensemencées dans des plaques 48 puits « précoatées » avec une solution de gélatine de 1 % (diluée dans l'eau) et cultivées dans un milieu de prolifération constitué d'un mélange de MEM (Medium Essentiel, 62 %) et de milieu M199 à (25 %) additionné de 2 mmol/L de glutamine, 10 mg/mL d'insuline humaine, 10 ng/mL de facteur de croissance épidermique recombinant (EGF), 2 ng/mL de facteur de croissance de fibroblaste recombinant humain (FGF), 10 % de SVF et 2% de solution de PenStr. Le milieu est renouvelé de moitié tous les 2 jours. Cinq jours après le début de la culture et immédiatement après la fusion des cellules satellite en myotubes, des tranches transversales entières de moelle épinière d'embryon de rat Wistar de 13 jours munies des ganglions de la racine dorsale (DRG) sont déposés sur le tapis de cellules musculaires (un explant par puit dans la zone centrale ; (Braun et al., 1996). Les DRG sont nécessaires pour réaliser une bonne innervation (Askanas et al., 1987). Les cultures innervées sont maintenues dans un milieu (appelé milieu d'innervation) contenant 67 % de MEM et 25 % de milieu M199 complémenté avec 5 % de SVF, 5 mg/mL d'insuline, 2 mmol/L de glutamine et 2 % de PenStr. Après 24 h de coculture, on observe une pousse

neuritique (*neuritic outgrowth*) sortant de l'explant de moelle épinière. Ces neurites contactent les myotubes et suscitent les premières contractions après 8 j de coculture. Les fibres innervées sont morphologiquement et spatialement distinctes des cellules non innervées et peuvent donc être facilement identifiées.

## 3.2. Traitement pharmacologique

Les traitements sont effectués après 11 j de culture pour les neurones corticaux, 13 jours pour les motoneurones et après 33 jours pour les cocultures nerf muscle.

### 3.2.1. Préparation et intoxication par le peptide $\beta$ amyloïde 1-42 humain

Pour ces expériences on utilise le peptide  $\beta$  amyloïde 1-42 humain ( $A\beta$ ) synthétique est utilisé. L' $A\beta$  est reconstitué dans du milieu de culture dépourvu de sérum. La solution est agitée pendant trois j à l'obscurité, dans un incubateur à  $CO_2$  à 37 °C. L'agitation permet d'obtenir une solution stable et reproductible. La solution utilisée pour les résultats complémentaires a été titrée par WB, elle contient 10 % de fraction oligomérique ( $A\beta O$ ). Après agitation, la solution mère est diluée afin d'obtenir les concentrations à étudier

### 3.2.2. Intoxication par le glutamate

Le glutamate est dilué aux concentrations désirées dans du milieu de culture.

Dans le cas des motoneurones, le glutamate est laissé pendant 20 min au contact, puis le milieu est soutiré et remplacé par du milieu de culture sans glutamate pendant le temps fixé pour l'étude.

Dans le cas des cocultures nerf muscle, le glutamate est laissé tout le temps fixé pour l'étude.

### 3.2.3. Application d'antagonistes / inhibiteurs

La liste des inhibiteurs et des antagonistes utilisés pour nos expériences figure dans le tableau 5.

Antagonistes / inhibiteurs	Effets	Concentrations ( $\mu\text{mol/L}$ )	Solvant de dissolution	Incubation	Fournisseur	Référence
BAPTA	chélateur sélectif des ions calcium	0.020	milieu de culture	1h avant la toxine	molecular probes	B1214
ifenprodil	inhibiteur des sous-unités 2B des récepteurs NMDA	1, 2.5, 5, 10	DMSO	1h avant la toxine	sigma-aldrich	I2892
mémantine	antagoniste des récepteurs extrasynaptiques du NMDA	5, 10, 15, 20	eau	1h avant la toxine	sigma-aldrich	M9292
MK801	antagoniste sélectif non compétitif des récepteurs du NMDA	5, 10, 20	DMSO	1h avant la toxine	sigma-aldrich	M107
MPEP	inhibiteur du mGlu5	0.15, 0.3, 0.6, 0.9, 5	DMSO	1h avant la toxine	sigma-aldrich	M5435

Tableau 5 : liste des inhibiteurs et des antagonistes utilisés dans nos études.

## 3.3. Techniques de quantification et d'analyse

### 3.3.1. Fixation et immunomarquage des cultures primaires de neurones, astrocytes et cellules musculaires

Après le temps de traitement souhaité, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution d'éthanol à 95 % et d'acide acétique à 5 % pendant 5 min à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . On pratique ensuite deux lavages au PBS azide. Les cellules sont perméabilisées par traitement avec une solution de saponine à 0.1 % pendant 15 min ; puis les cellules sont incubées pendant 2 h avec les anticorps primaires dilués dans du PBS contenant 1 % de SVF et 0.1 % de saponine. Les anticorps primaires sont révélés avec un anticorps de chèvre anti-souris marqué à l'Alexa 488 ou un anticorps de chèvre anti-lapin marqué à l'Alexa 568, l'un et l'autre dilués au  $1/400^{\text{ème}}$  dans du PBS contenant 1 % de SVF et 0.1 % de saponine ; les préparations sont incubées pendant 1 h à température ambiante. On pratique ensuite deux lavages au PBS azide.

### 3.3.2. Fixation et immunomarquage des cocultures nerfs muscle

Après que le temps fixé pour les traitements est écoulé, les cocultures sont traitées par une solution à 500 nmol/L d' $\alpha$ -bungarotoxine couplée à l'Alexa fluor 488, pendant 15 min à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde (4 %, pH 7,3) pendant 20 min à température ambiante. On procède

ensuite à deux lavages au PBS azide. Puis on perméabilise les cellules par traitement avec une solution saponine à 0.1 % pendant 15 min et on les laisse pendant 2 h au contact de l'anticorps primaire anti neurofilament, dilué dans du PBS à 1 % de SVF et 0.1 % de saponine. L'anticorps primaire est révélé par un anticorps de chèvre anti-souris marqué à l'Alexa 568, dilué au 1/400<sup>ème</sup> dans du PBS contenant 1 % de SVF et 0.1 % de saponine qu'on laisse agir pendant 1 h à température ambiante.

La liste des anticorps utilisé figure dans le Tableau 6

Anticorps	Clone	Isotypes	Fixation	Concentration	Fournisseur	Référence
Amyloid fibril OC		Polyclonal rabbit IgG	Acide acétique	1/2000	Milipore	AB2286
alpha- bungarotoxine conjugué à l'Alexa fluor 488			cellules vivantes	500 nmol/L	Molecular probes	B13422
Beta Amyloid	6E10	Mouse IgG1 isotype	Acide acétique	1/1000	Covance	SIG-39320-0500
Caspase 3		Polyclonal rabbit IgG fraction anti serum	Acide acétique	1/500	Sigma Aldrich	C8487
			WB	1/25	cell signaling	9662
Cytochrome C (CytC)		Polyclonal rabbit IgG	Acide acétique	1/100	Abcam	ab90529
glial fibrillary acidic protein (GFAP)		Polyclonal rabbit IgG	Acide acétique	1/400	Abcam	G9269
glucose transporter 1 (GLUT-1)		Polyclonal rabbit IgG	WB	1/50	Sigma Aldrich	SAB45020803
GSK-3 beta (27C10)		Polyclonal rabbit IgG	WB	1/25	cell signaling	9315P
Methionine sulfoxide (MetO)		Polyclonal rabbit fraction anti serum	Acide acétique	1/100	Novus biologicals	NBP1-06707
Microtubule associated protein (MAP-2)	HM-2	Mouse IgG1 isotype	Acide acétique	1/400	Sigma Aldrich	M4403
Myosin	My-32	Mouse IgG1 isotype	Acide acétique	1/400	Sigma Aldrich	M4276
Neurofilament 200KDa	N52	Mouse IgG1 isotype	Paraformaldéhyde	1/400	Sigma Aldrich	N0142
Oligomer A11		Polyclonal rabbit IgG	Acide acétique	1/500	Invitrogen	AHB0052
Post synaptic density 95KDa (PSD95)	6G6-1C9	Mouse IgG2a isotype	Acide acétique	1/100	Abcam	ab2723
SIRP alpha/CD172a (OX-41)		Mouse IgG2a isotype	Acide acétique	1/500	Novus	NB100-65530
synaptophysine		Polyclonal rabbit IgG	Acide acétique	1/100	Abcam	ab7837
Tau Phospho SER212 / Thr214	AT100	Mouse IgG1 isotype	Acide acétique	1/100	Invitrogen	11818711
TDP43		Polyclonal rabbit IgG	Acide acétique	1/100	ozyne	3448S

Tableau 6 : Liste et origine des anticorps utilisés dans nos études.

### 3.3.3. Analyses d'image

L'intégralité de chaque puits de culture marqué est automatiquement prise en photo avec l'ImageXpress à un grossissement x 20. Pour chaque condition (6 puits de culture), 20 champs par puits (représentant 80 % de la surface totale du puits) sont automatiquement analysés à l'aide du logiciel Custom module editor MetaXpress. Le logiciel permet notamment de déterminer le nombre total de neurones, le nombre de neurones coexprimant différents marqueurs, la longueur du réseau neuritique. La figure 10 illustre ce qu'il est possible d'analyser grâce à ce logiciel.



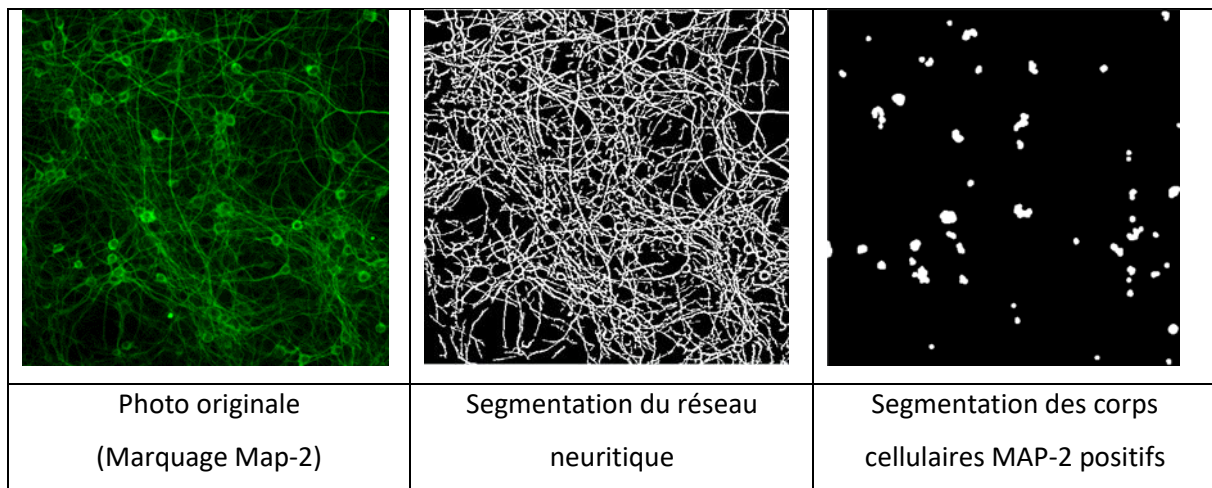


Figure 10 : exemple d'analyse d'image

### 3.3.4. Evaluation des flux calciques

La sonde fluorescente Fluo 4AM est diluée (4  $\mu\text{mol/L}$ ) dans du milieu de culture et incubée en présence des cellules pendant 30 min à 37 °C. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu de culture.

On injecte alors de l'A $\beta$  à l'aide des injecteurs du glomax (Promega). La mesure du niveau de calcium intra cellulaire (toutes cellules confondues) est faite juste après l'injection, puis à 1, 2, 5 et 10 min par mesure de la fluorescence (Exc 490 nm / Emm 510-570 nm).

### 3.3.5. Dosage du glutamate

Le glutamate est dosé dans les surnageants de culture au moyen d'un test « *plex red glutamic acid* ». L'acide L-glutamique est oxydée par la glutamate oxydase pour produire de l' $\alpha$ -ketoglutarate, du NH<sub>3</sub> et de l'eau oxygénée. La L-alanine et la L-glutamate-pyruvate transaminase sont inclus dans la réaction pour régénérer l'acide L-glutamique par transamination de l' $\alpha$ -ketoglutarate, ce qui conduit à multiplier en de nombreux cycles la réaction initiale et à amplifier significativement l'eau oxygénée produite. L'eau oxygénée réagit avec le 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Rouge) dans un rapport stœchiométrique de 1:1. La réaction est catalysée par la HRP (horseradish peroxydase) pour produire de la fluorescence.

Les réactifs sont incubés pendant 1 h à 37° C avec les échantillons. La fluorescence produite est ensuite mesurée (Exc 530 nm, Emm 600nm)

### 3.3.6. Dosage des oligomères de peptide A $\beta$

Les A $\beta$ O sont dosés dans le surnageant de culture à l'aide d'un test ELISA permettant la quantification préférentielle de peptides A $\beta$  sous leur forme oligomérique. Les plaques sont avec un anticorps de capture monoclonal de souris anti-A $\beta$  (MOAB-2), un anticorps de détection MOAB-2 biotinylé conjugué à la streptavidine HRP. L'adjonction d'un substrat de l'HRP (3,3', 5,5' - tetramethylbenzidine, TMB) fait apparaître une réaction colorée dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration d'A $\beta$ O. L'absorbance de la solution est mesurée à 450 nm.

### 3.3.7. Dosage de cytokine (TNF alpha, IL-1 $\beta$ et IL-6)

Le TNF $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL1 $\beta$  sont titrés dans les surnageants de culture à l'aide d'un test ELISA. Les plaques sont « précoatées » avec un anticorps monoclonal spécifique du TNF $\alpha$  ou de l'IL-6 ou de l'IL1 $\beta$ . Les échantillons sont déposés dans les puits. Pendant la première incubation, les échantillons et l'anticorps biotinylé sont simultanément incubés. Après lavage, l'adjonction de TMB produit une réaction colorée, comme on l'a déjà dit, dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration de la cytokine d'intérêt. L'absorbance de la solution est mesurée à 450 nm.

### 3.3.8. Absorption du glucose

L'absorption du glucose est étudiée par une méthode de bioluminescence non-radioactive, fondée sur la détection de 2-deoxyglucose-6-phosphate (2DG6P). Quand le 2-deoxyglucose (2DG) est ajouté aux cellules, il est transporté à travers la membrane et il est rapidement phosphorylé, de la même manière que le glucose. Cependant, les enzymes qui dégradent le glucose, glucose-6-phosphate (G6P), ne peuvent pas dégrader le 2DG6P et ainsi cet analyte s'accumule dans la cellule. Après une période brève d'incubation, une solution de lyse est ajoutée aux cellules. La luminescence des échantillons est alors mesurée.

### 3.3.9. Quantification de protéine par western blot

Les échantillons sont lysés avec du « CelLytic ». La quantité de protéine est déterminée à l'aide d'un test BCA. Les lysats sont dilués au 50<sup>ème</sup> dans du PBS et mélangés à volume égal avec le réactif BCA. Les solutions sont incubées à 60° C durant 1 h et la quantité de protéine est mesurée à 562 nm avec un spectromètre Nanovue ; la concentration est déduite de la comparaison avec la gamme de BSA (Bovin Serum Albumine).

Les solutions sont diluées dans de l'eau distillée à 1 mg/mL de protéine.

Chaque échantillon de protéine est chauffé pendant 5 min à 95° C.

Les échantillons sont préparés selon les recommandations de Protein Simple ([www.proteinsimple.com](http://www.proteinsimple.com)).

5 µL de préparation sont déposés dans les puits de la plaque à 384 puits prévus à cet effet.

L'analyseur Simon™ est préparé en ajoutant le tampon de séparation de la matrice, le tampon de lavage et le tampon de migration. Les capillaires et la plaque à 384 puits contenant les échantillons, les anticorps et les matrices sont alors placés à l'intérieur de l'instrument. L'instrument remplit les capillaires des différentes matrices de concentration et de séparation puis des extraits de protéine. Les échantillons sont alors séparés par application d'un courant de 250 V pendant 40 min et immobilisés ensuite aux parois des capillaires. La matrice de séparation est retirée grâce au tampon spécifique.

Les capillaires sont alors lavés avec le tampon de lavage et bloqués avec le diluant d'anticorps pendant 15 min. Ensuite, les anticorps primaires sont incubés dans les capillaires pendant 2 h, les anticorps secondaires conjugués à l'HRP sont incubés pendant 1 h. Après lavage, le luminol-S/ substrat de peroxyde est incubé dans les capillaires et le signal chimio-luminescent est détecté en utilisant le Dispositif Couplé de charge (CCD). L'analyse de données est effectuée en utilisant le Logiciel Compass (ProteinSimple).

## 4. RÉSULTATS

### 4.1. Publication N°1 : “Operational Dissection of $\beta$ -Amyloid Cytopathic Effects on Cultured Neurons”

#### 4.1.1. Résumé

Dans l'avant-propos de notre mémoire, nous avons indiqué que si l'A $\beta$  est bien impliqué dans la physiopathologie de la MA, ce n'est pas sous sa forme de plaques séniles, puisque celles-ci se retrouvent aussi en abondance dans le cerceau de patients âgés morts sans signes de démence. Ce sont des oligomères (A $\beta$ O) de MM intermédiaires qui sont les porteurs de la toxicité, comme l'indiquent des études réalisées sur des neurones en culture. Nous faisons donc l'hypothèse que c'est l'accumulation d'A $\beta$ O au voisinage des neurones qui provoquent l'apparition de protéine  $\tau$  anormalement phosphorylées et leur dégénérescence, une accumulation à concentration critique.

Néanmoins la MA est une maladie qui évolue sur le long terme, et qui se propage du cortex entorhinal vers le cortex proprement dit. Il apparaît donc qu'il faut distinguer (a) les effets toxiques aigus des A $\beta$ O ; (b) leurs possibles effets chroniques quand ils sont présents en concentrations subcritiques ; (c) la propagation des lésions qui relève d'un autre mécanisme que les effets toxiques proprement dits.

Nous présentons dans cet article un modèle d'étude des effets toxiques aigus des A $\beta$ O *in vitro* en nous concentrant sur trois de leurs aspects : (a) leur nature ; (b) leur ordre d'apparition (nous supposons en effet que les premiers effets toxiques à apparaître vont déclencher une série d'autres effets par une relation de cause à effet) ; (c) leur cinétique de développement. Nous appelons effets cytopathologiques les modifications métaboliques et structurales néfastes qui surviennent dans les neurones exposés aux A $\beta$ O.

Afin d'obtenir des résultats reproductibles d'une expérience à l'autre, nous avons mis au point une technique de préparation de solution de peptide contenant des concentrations reproductibles et stables d'A $\beta$ O et des autres formes (monomériques ou polymériques de haute MM). Nous montrons que les événements toxiques observés ont un lien avec les A $\beta$ O, qu'ils se développent effectivement dans un ordre et une cinétique spécifique, et que les A $\beta$ O

sont probablement un des éléments clés de la physiopathologie de la MA. La présence d'A $\beta$ O en conformation amyloïde a été mise en évidence par l'usage d'Ac spécifiques de cette forme, préparés par Glabe (Kayed et al., 2007).

Dans le modèle présenté ici, et qui fait usage d'une solution du peptide A $\beta$  contenant des A $\beta$ O, nous reproduisons les caractéristiques neuropathologiques de la MA, ce qui donne à penser que ces derniers sont bien dus à des effets toxiques aigus. Ils sont semblables que l'on applique les A $\beta$ O à des neurones corticaux ou à des neurones hippocampiques. En utilisant ce système relativement simple, il est possible d'étudier tous les mécanismes toxiques à des temps et des concentrations bien définis, de mettre en évidence les voies impliquées dans ces effets et in fine d'étudier l'intérêt thérapeutique potentiel de nouvelles molécules sur les différentes voies neurotoxiques responsables du développement de la MA.

A la suite de ces travaux, nous avons entrepris d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires qui surviennent en amont de la séquence décrite dans cet article. Nous avons pu analyser de manière plus détaillée les premiers effets des A $\beta$ O sur les neurones. En effet, nous avons montré que les récepteurs NMDA sont impliqués dans leur toxicité, en utilisant différents antagonistes des dits récepteurs. Nous montrons qu'une entrée massive de calcium et une augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate surviennent très précocement après l'adjonction des A $\beta$ O. Il y aurait donc un lien de causalité étroit entre le glutamate et les derniers.

Dans la MA, la neuro-inflammation joue un rôle très important. Nous avons donc également développé un modèle de culture permettant d'étudier la toxicité chronique de l'A $\beta$  induite par l'activation de la microglie. À cette fin, nous avons mis au point une culture primaire de neurones corticaux enrichie en microglie et nous avons étudié l'effet du peptide sur les neurones et sur la microglie sur un assez long terme.



Operational Dissection of  $\beta$ -Amyloid Cytopathic Effects on Cultured  
Neurons J Neurosci Res. 2013 May;91(5):706-16. doi: 10.1002/jnr.23193. Epub 2013 Feb 13.





# Operational Dissection of $\beta$ -Amyloid Cytopathic Effects on Cultured Neurons

Noelle Callizot,<sup>\*</sup> Maud Combes, Rémy Steinschneider, and Philippe Poindron

Neuron Experts SAS, Faculté de Médecine Nord, Marseille, France

Alzheimer disease (AD) affects mainly people over the age of 65 years, suffering from different clinical symptoms such as progressive decline in memory, thinking, language, and learning capacity. The toxic role of  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ) has now shifted from insoluble  $A\beta$  fibrils to smaller, soluble oligomeric  $A\beta$  aggregates. The urgent need for efficient new therapies is high; robust models dissecting the physiopathological aspects of the disease are needed. We present here a model allowing study of four cytopathic effects of  $A\beta$  oligomers ( $A\beta O$ ): oxidative stress, loss of synapses, disorganization of the neurite network, and cellular death. By generating a solution of  $A\beta O$  and playing on the concentration of and time of exposure to  $A\beta O$ , we have shown that it was possible to reproduce early effects (oxidative stress) and the long-term development of structural alterations (death of neurons). We have shown that 1) all toxic events were linked to  $A\beta O$  according to a specific timing and pathway and 2)  $A\beta O$  were probably the key intermediates in AD pathogenesis. The present model, using  $A\beta$  peptide solution containing  $A\beta O$ , reproduced essential neuropathological features of AD; the effects involved were similar whatever the kind of neurons tested (cortical vs. hippocampal). By using a single system, it was possible to embrace all toxic mechanisms at defined times and concentrations, to study each involved pathway, and to study the effects of new molecules on the different neurotoxic pathways responsible for development of AD. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** oxidative stress; mitochondrial lesions; synapses loss; neuronal death;  $\beta$ -amyloid peptide; Alzheimer disease

A large amount of evidence suggests that accumulation of  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) peptide in brain is one of the main causes of Alzheimer disease (AD). However, the critical concentration of peptide required for triggering cognitive dysfunction together with development of senile plaques and intraneuronal neurofibrillary tangles consisting of hyperphosphorylated tau protein, the two anatomical-pathological hallmarks of AD, is not yet fully known, nor is the toxic form involved in vivo in the pathological process (soluble form, oligomers, protofibrils, or senile plaques of  $A\beta$ ). However, it has been proved that in vitro the toxic forms are oligomers (Kelly,

1999; Bitan et al., 2003; Jan et al., 2010). Numerous neurodegenerative mechanisms have been evoked to explain both the effects of  $A\beta$  peptide on cognitive functions and its cytopathic effects. By “cytopathic effects,” we mean biochemical and structural alterations appearing in brain at tissue and cellular levels.

As listed by Longo and Massa (2004), these cytopathic effects could result from interaction of  $A\beta$  with binding targets, activation of stress kinases, hyperphosphorylation of tau protein, caspase activation, loss of synapse, neuronal death, loss of cholinergic function, generation of reactive intermediates of oxygen (oxidative stress), or glutamate excitotoxicity. At first glance, these mechanisms, which occur at various steps of the pathological process, could act synergistically and rely on different logical and biological categories, which in turn makes difficult the evaluation of drugs possibly useful for treating AD.

We present here a model allowing for separately study of four cytopathic effects: oxidative stress, loss of synapses, disorganization of the neurite network, and cellular death. To establish this model, we used a systemic approach. The cell culture is considered as a black box; the input signal is the  $A\beta$  peptide, used at different concentrations for different times; and the output signal is the cytopathic alterations quantitatively evaluated. The only hypothesis needed here to exploit this cellular system is that it contains all the cell types (or main cell types) required for these effects to appear. As soon as this model is validated at molecular and pharmacological levels, it will be possible to screen new molecules and to observe their effects on one or all of the phenomena mimicked in vitro. With pharmacological tools, it will be easier to unravel AD physiopathology and improve treatment.

We were able to generate a solution of  $A\beta$  oligomers ( $A\beta O$ ); forms of  $A\beta$  proved to be toxic. By using the concentration of and time of exposure to  $A\beta O$ , it was possible to reproduce their early effect (oxi-

\*Correspondence to: Noelle Callizot, PharmD, PhD, Faculté de médecine nord, 51 Boulevard Pierre Dramard, 13916 Marseille Cedex 20, France. E-mail: noelle.callizot@neuronexperts.com

Received 11 July 2012; Revised 8 November 2012; Accepted 27 November 2012

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23193

ductive stress) and their long-term structural alteration development (death of neurons). Two dimensions, time and space (from synapse to cellular body), can therefore be taken into consideration. Indeed, it is observed in the brain of AD patients that, starting from the hippocampal region, the anatomical-pathological lesions progress contiguously, probably because of the disorganization of synapses, leading to neurite degeneration and, finally, death of neurons.

This work was performed mainly with primary cortical neurons, one of the cell types affected in AD. Indeed, it has been observed in the brain of AD patient that cell damage starts from the entorhinal cortex and that lesion progression involves spreading from the initially damaged area to proximal areas (Liu et al., 2012; De Calignon et al., 2012). Moreover, for preclinical studies of new molecules, it is easier to use cortical neurons than hippocampal neurons. Establishing the equivalent quality of both sources of cells offers an obvious advantage to the pharmaceutical industry.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Cultures

All experiments were carried out in accordance with legal regulations and faculty of medicine guidelines.

**Cortical neurons.** Rat cortical neurons were cultured as described by Singer et al. (1999). Three pregnant females (Wistar; Janvier, St. Berthevin, France) at 15 days of gestation were killed by cervical dislocation. Fetuses were collected and immediately placed in ice-cold L15 Leibovitz medium (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) with a 2% penicillin (10,000 U/ml) and streptomycin (10 mg/ml) solution (PS; Pan Biotech) and 1% bovine serum albumin (BSA; Pan Biotech).

Cortex was treated for 20 min at 37°C with a trypsin-EDTA (Pan Biotech) solution at a final concentration of 0.05% trypsin and 0.02% EDTA. The dissociation was stopped by addition of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4.5 g/liter of glucose (Pan Biotech), containing DNase I grade II (final concentration 0.5 mg/ml; Pan Biotech) and 10% fetal calf serum (FCS; Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were mechanically dissociated by three forced passages through the tip of a 10-ml pipette. Cells were then centrifuged at 515g for 10 min at 4°C. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in a defined culture medium consisting of Neurobasal medium (Invitrogen) with a 2% solution of B27 supplement (Invitrogen), 2 mmol/liter of L-glutamine (Pan Biotech), 2% of PS solution, and 10 ng/ml of brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Pan Biotech). Viable cells were counted in a Neubauer cytometer, using the trypan blue exclusion test. The cells were seeded at a density of 30,000 per well in 96-well plates precoated with poly-L-lysine (Greiner, Courtaboeuf, France) and were cultured at 37°C in an air (95%)-CO<sub>2</sub> (5%) incubator. The medium was changed every 2 days. The cortical neurons were intoxicated with A $\beta$  solutions (see below) after 11 days of culture.

**Hippocampal neurons.** Rat hippocampal neurons were cultured as described by Harrison (1990). Pregnant

females (Wistar; Janvier) at 17 days of gestation were killed by cervical dislocation. Fetuses were collected and immediately placed in ice-cold L15 Leibovitz medium with 2% PS and 1% BSA. Hippocampi were treated for 20 min at 37°C with a trypsin-EDTA solution. The dissociation and treatment used to obtain hippocampal neurons were the same as those used for the cortical neurons. Viable cells were counted in a Neubauer cytometer, using the trypan blue exclusion test. The cells were seeded at a density of 30,000 per well in 96-well plates precoated with poly-L-lysine and were cultured at 37°C in an air (95%)-CO<sub>2</sub> (5%) incubator. The medium was changed every 2 days. The hippocampal neurons were intoxicated with A $\beta$  solutions after 14 days of culture.

### Preparation of A $\beta$ Peptide Solutions

To prepare a mother solution, A $\beta$  peptide 1–42 (Bachem, Weil-am-Rhein, Germany) was dissolved in the defined culture medium mentioned above, devoid of serum, at an initial concentration of 40  $\mu$ mol/liter. (We observed that toxicity of A $\beta$  peptide can vary from a batch to another; it is highly recommended to select a batch generating toxic A $\beta$ O before carrying out experiments). This solution was gently agitated for 3 days at 37°C in the dark and immediately used after being properly diluted in culture medium to the concentrations used. The nonagitated solution is referred to subsequently as “unprepared” solution.

### Western Blotting

The A $\beta$  peptide 1–42 solution was prepared in defined medium at the concentration of 40  $\mu$ mol/liter with or without gentle agitation for 3 days at 37°C, and 60- $\mu$ l samples were directly applied to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (12%) gel electrophoresis (SDS-PAGE) acrylamide (32.6% of water (Biosolve, Valkenswaard, The Netherlands), 25.3% of Tris-HCl, pH 8.8 (Invitrogen), 40% of acrylamide 30% solution (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France), 1% of SDS 10% solution (Sigma Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France), 1% of ammonium persulfate 10% solution (Sigma Aldrich), and 0.1% Temed (Sigma Aldrich). After electrophoresis (100 V, 40 mA, 90 min), the proteins were electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Hybord-P, Vélizy-Villacoublay, France) at 100 V, 300 mA, for 120 min.

The blot membranes were then incubated in blocking buffer (5% nonfat, dry milk in phosphate-buffered saline [PBS; Pan Biotech]) for 30 min at room temperature. The membranes were then incubated with 1) a mouse monoclonal antibody directed against the A $\beta$  1–16 sequence of A $\beta$  peptide (1:1,000 in blocking buffer; Covance, Princeton, NJ; see Table I), 2) a rabbit polyclonal antibody directed against prefibrillar oligomer A11 (1:500 in blocking buffer; Invitrogen; see Table I), and 3) a rabbit polyclonal antibody directed against fibrils and fibrillar oligomers OC (1:2,000 in blocking buffer; Millipore, Molsheim, France; see Table I) for 60 min at room temperature. Binding of the primary antibodies was detected with a goat anti-mouse or anti-rabbit IgG, alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (1:2,000 in blocking buffer; Sigma) for 60 min at room temperature. The blot was

**TABLE I. Antibodies Used in This Study**

Antibody	Clone	Antibody isotypes	Dilution	Provider	Catalog reference
Amyloid fibrils OC		Polyclonal rabbit	1/2,000	Millipore	AB2286
Beta amyloide	6E10	Mouse igG1 isotype	1/1,000	Covance	SIG-39320-0500
Caspase 3		Polyclonal rabbit IgG fraction anti serum	1/5,00	Sigma Aldrich	C8487
Cytochrome C		Polyclonal rabbit IgG	1/5,00	Abcam	ab90529
Microtubule associated protein (MAP-2)	HM-2	Mouse igG1 isotype	1/4,00	Sigma Aldrich	M 4403
Methionine sulfoxide(MetO)		Lonal rabbit	1/1,00	Novus biologicals	NBP1-06707
Oligomer A11		Polyclonal rabbit	1/5,00	Invitrogen	AHB0052
Post synaptic density 95kDa (PSD95)	6G6-1C9	Mouse igG2a	1/1,00	Abcam	ab2723
Synaptophysin	SVP-38	Mouse IgG1 isotype	1/1,00	Sigma Aldrich	S 5768

revealed with a solution of NTB/BCIP (Roche Applied Science, Meylan, France) for 10 min, and the reaction was stopped by addition of water. Molecular weight was estimated by kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

#### Mitochondrial Death Pathway: Cytochrome C Assessment on Neurons

To evaluate the effect of A $\beta$  peptide on the mitochondrial death pathway, expression of CytC in neuronal cytoplasm was measured using a rabbit polyclonal antibody (see Table I). Only the CytC label colocalizing with microtubule-associated protein 2 (MAP2, a specific marker of neurons) was taken into consideration. (For secondary antibody see the section Immunofluorescence labeling.)

#### Oxidative Stress: Detection of Methionine Sulfoxide on Neurons

Methionine sulfoxide (MetO) was detected using a rabbit polyclonal antibody anti-MetO (Novus, Littleton, CO; see Table I). Only the MetO label colocalizing with MAP2 was taken into consideration. (For secondary antibody see the section Immunofluorescence labeling.)

#### Loss of Synapses: Detection of Pre- and Postsynaptic Markers

Presynaptic and postsynaptic structures were detected by labeling specifically a presynaptic molecule, synaptophysin (SYN), and a postsynaptic molecule, postsynaptic density protein 95 kDa (PSD95). Double labeling was performed with a rabbit polyclonal antibody anti-SYN (Abcam, Cambridge, United Kingdom; see Table I) and mouse monoclonal antibody anti-PSD95 (Abcam; see Table I), and colocalization of both markers was assessed after fusion of images. (For secondary antibody see the section Immunofluorescence labeling.)

#### Apoptosis of Neurons: Caspase-3 Assessment

To investigate the effect of A $\beta$  peptide on the apoptotic cell death program, we measured the presence of caspase-3, one of the main proteases related to apoptosis, under stress conditions. The presence of caspase-3 was detected using a rabbit polyclonal antibody (Sigma Aldrich; see Table I). Only the caspase-3 label colocalizing with microtubule-associated protein 2 (MAP2) was taken into consideration.

#### Disorganization of Neurite Network and Death of Neurons

The length of the neurite network was measured at several times after intoxication with A $\beta$  peptide. The neurite network was detected by a mouse monoclonal antibody directed against MAP2 (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France; see Table I). This antibody stains specifically cell bodies and neurites, allowing study of both the neurite network and cell death (as indicated by a decreased number of cell bodies).

#### Immunofluorescence Labeling

At chosen times after intoxication with A $\beta$  peptide, the cultures were washed with PBS and fixed with an ethanol (Sigma Aldrich)/pure acetic acid (Sigma Aldrich) solution (95%/5%) for 5 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The cells were washed three times with PBS after fixation. The cells were then permeabilized, and nonspecific sites were blocked with 0.1 mg/ml saponin (Sigma Aldrich) in PBS containing 1% FCS for 15 min at room temperature. All primary antibody incubations were performed in PBS containing 1% FCS, 0.1 mg/ml saponin, for 60 min at room temperature. The cells were then washed with PBS containing 1% FCS, 0.1 mg/ml saponin, and incubated with the appropriate secondary antibodies (goat anti-mouse, labeled with Alexa 488 [H+L; Invitrogen], or goat anti-rabbit, labeled with Alexa 568 [H + L; Invitrogen], used at 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS containing 1% FCS, 0.1 mg/ml saponin, for 1 hr at room temperature. Cell nuclei were labeled with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bis-benzimide (Hoechst solution; Sigma).

#### Image Analyses

The immunolabeled cultures were examined with InCellAnalyzer TM1000 (GE Healthcare, Cardiff, United Kingdom) equipped with a xenon lamp (excitation 360/480/565 nm; emission 460/535/620 nm) at  $\times 20$  magnification. For each condition, 10 randomly selected fields per well (representing 40% of the total surface of the well) from six wells were analyzed. The total length of neurites, the total number of neuronal cell bodies, the number of synapses (assessed by determining colocalization of SYN and PSD-95), the number of colocalized MAP2 and MetO labels, the area of staining with caspase-3, and the number of neurons labeled for CytC colocalized with MAP2 labeling were analyzed in Developer software (GE Healthcare).

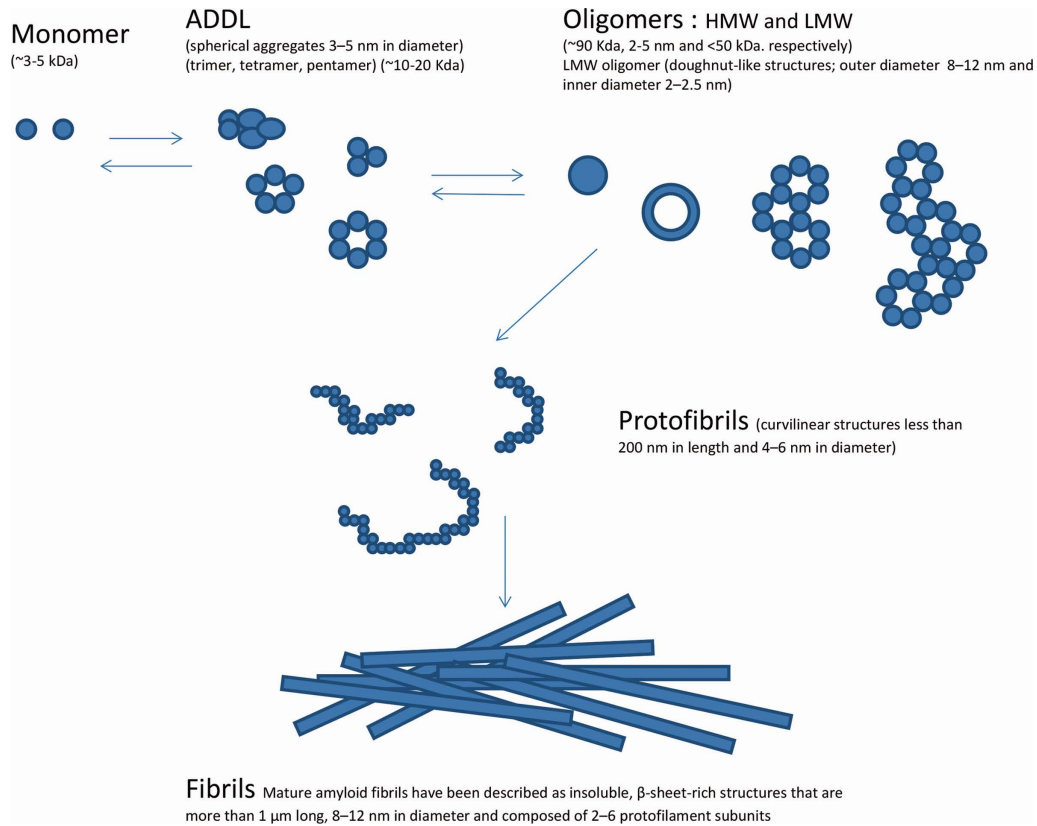


Fig. 1. Schematic representation of the A $\beta$  fibril formation pathway (modified from Bitan et al., 2003). Monomers, under certain conditions, can cluster to form nonfibrillar aggregates, based on their molecular size and/or morphology. These species are dimers; trimers; pentamers; or higher molecular weight complex formations, known as ADDLs ranging

from LMW oligomers ( $n = 2-8$ ) to HMW oligomers ( $n = 15-20$ ); and structures of higher order such as protofibrils (string of oligomers). The nonfibrillar aggregates can be the “on pathway” to fibril formation. Structures are not drawn to scale. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

### Confocal Microscopy

To assess colocalization of synaptic markers, we used immunofluorescence confocal microscopy; the immunolabeled cultures were observed with a Zeiss LSM 700 laser scanning microscope (excitation 488 nm, 7.5% laser, 555 nm, 2.8% laser; intensities were recorded simultaneously in the range emission 420–578 nm and 568–700 nm for the two channels, respectively) with a  $\times 63$  objective (Carl Zeiss, Le Pecq, France).

### Statistical Analyses

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by using one-way ANOVA followed by Dunnett’s test.  $P \leq 0.05$  was considered significantly different.

## RESULTS

### A $\beta$ Preparation

A $\beta$  fibril formation is preceded by multiple conformational changes, including trimer, pentamer, or higher molecular weight (MW) complex formation, also known as A $\beta$ -derived diffusible ligands (ADDLs), dodecameric

A $\beta$ O, A $\beta$ O<sub>n</sub> composed of 15–20 monomers, and protofibrils (string of A $\beta$ O<sub>n</sub>; Jan et al., 2010). These intermediate A $\beta$  species are collectively named “soluble A $\beta$ ” (Deshpande et al., 2004; Fig. 1).

The “unprepared” solution contained many monomers, tetramers, and pentamers but no low-molecular-weight (LMW) or high-molecular-weight (HLW) diffusible species (Fig. 2A). The agitated solution contained some species with an MW of at most between 110 kDa (HMW) and  $\sim 40$  kDa (LMW) oligomers. It should be mentioned that fibrils and protofibrils present in the preparation were not transferred onto the membranes because of their large MW; only LMW and HMW diffusible species from “unprepared” and agitated solutions were therefore studied and compared. However, the amounts of these different species were highly dependent on the initial lyophilized peptides used, as has been observed by Wogulis et al. (2005).

The 40–100-kDa fraction was shown to contain both prefibrillar and fibrillar oligomers as revealed by its reactivity with A11 and OC antibodies (Fig. 2B,C) specific for prefibrillar (Kayed et al., 2003) and fibrillar

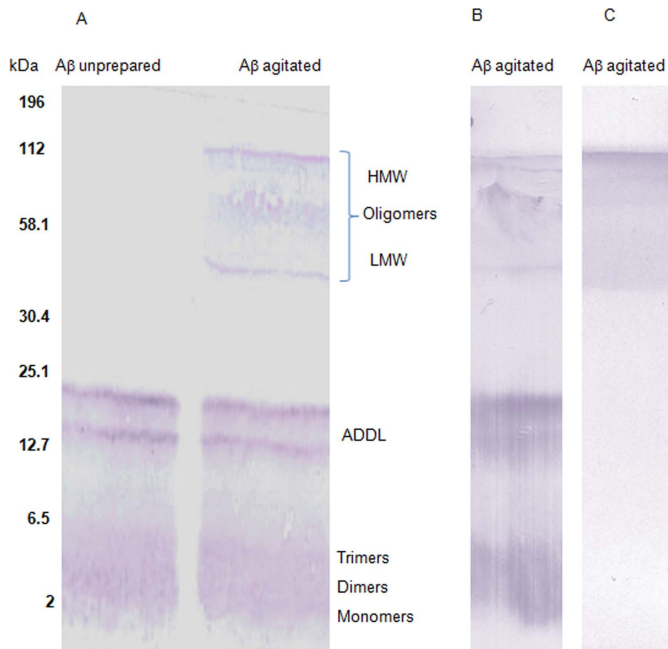


Fig. 2. Representative WB analysis of agitated and unprepared A $\beta$  preparations probed with monoclonal mouse 6E10 antibody with alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse antibody (A). Left “unprepared” A $\beta$  solution, right “agitated” solution. B: Polyclonal rabbit OC antibody with alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse antibody of agitated A $\beta$  preparations. C: Polyclonal rabbit A11 antibody with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit antibody of agitated A $\beta$  preparations. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

(Kayed et al., 2007) conformations, respectively (Kayed et al., 2009; Tomic et al., 2009). A nonnegligible amount of agitated A $\beta$  preparations. C: Polyclonal rabbit A11 antibody (Fig. 2C) and could be classified as prefibrillar.

### Mitochondrial Death Pathway and Oxidative Stress

The pivotal role of CytC in apoptosis is well established. Its translocation after apoptotic stimuli from mitochondria to cytoplasm and activation of caspases (9 and 3) involved in the execution of cell death program is well documented (for review see Emerit et al., 2004). Here, in very early stage, a small but significant increase of CytC was observed for the lowest A $\beta$ O concentration and after 1 hr incubation time; this increase became very clear after 2 hr and was at its highest level after 4 hr of culture in the presence of A $\beta$ O (Fig. 3a,a1,a2). After 8 hr, the CytC expression started to decrease, probably because of the mitochondrial final lesions.

Surface Met residues are particularly sensitive to oxidative stress, which transforms them into MetO. MetO is considered as an early marker of this phenomenon. Indeed, Met may function as a “radical sink” and protect cells from oxidative damage. MetO is rapidly reduced to Met by methionine sulfoxide reductase, so the system of Met–MetO functions as a natural oxidore-

duction buffer (Moskovitz, 2005). Consecutively with increase in cytoplasmic CytC, a MetO elevation was observed that started weakly 2 hr and 4 hr after A $\beta$ O addition at a concentration of 0.3  $\mu$ mol/liter (Fig. 3b,b1,b2). This increase became significant after 16 hr and 24 hr of intoxication. For the highest test concentrations (0.6 and 1.25  $\mu$ mol/liter), the oxidative stress was significant at all times of culture in the presence of A $\beta$ O.

### Apoptosis Evaluation and Cell Death

Our results show that the caspase-3 (Fig. 4a,a1,a2) activation could still be recorded after 4 hr of A $\beta$ O intoxication at the highest concentration of peptide (10  $\mu$ mol/liter). After 16 hr of culture in the presence of A $\beta$ , significant caspase activation was observed at 5  $\mu$ mol/liter, after 24 hr at 2.5  $\mu$ mol/liter, and after 48 hr at 1.25  $\mu$ mol/liter.

The neuronal survival was evaluated by counting cell bodies stained with MAP2. As shown in Figure 4b, neuronal loss appeared after neurite network loss. Between 1.25 and 5  $\mu$ mol/liter, the number of neuronal cell bodies did not significantly decrease even after 16 hr of culture in the presence of A $\beta$ O. A significant effect was reached at a concentration of 5  $\mu$ mol/liter and after 24 hr of culture, and also for longer times of incubation. A massive neuronal death was observed after 48 hr of intoxication (Fig. 5b,c). No toxic effect was observed after treatment with the unprepared solution of A $\beta$  after 24 or 48 hr (Figs. 4c, 5d). It should also be mentioned that no difference was observed in death kinetics of hippocampal vs. cortical neurons (Figs. 4d, 5b,c).

### Synapse Loss, Neurite Network Loss, and Colocalization of A $\beta$ O and Synapses

Synapses not only control transmission of neuronal signals thanks to neuromediators but also regulate growth, differentiation, and death of neurons. The microstructure of synapses was extensively studied to elucidate the relationships between synaptic activity and neuropathological phenomena as well as the mechanisms involved in synaptogenesis and regulation of synapse functioning (Nimchinsky et al., 2002).

The loss of neuronal synapses was evaluated by measuring the decrease in the number of sites showing colocalization of PSD95 and SYN in hippocampal neurons (Fig. 6a). The significant decrease in synapse number started after 24 hr of culture in the presence of A $\beta$ O, was more pronounced after 48 hr of contact with A $\beta$ O, and was dose dependent. After 8 hr of intoxication, a slight decrease in synapse number was observed at 0.6 and 1.25  $\mu$ mol/liter concentrations. It was also observed that A $\beta$ O and synapses were colocalized (Fig. 6d).

The first significant effects on neurite network organization appeared 4 hr after A $\beta$ O addition and at the highest concentrations (5 and 10  $\mu$ mol/liter; Fig. 6b). In cultures in the presence of the lowest concentrations of

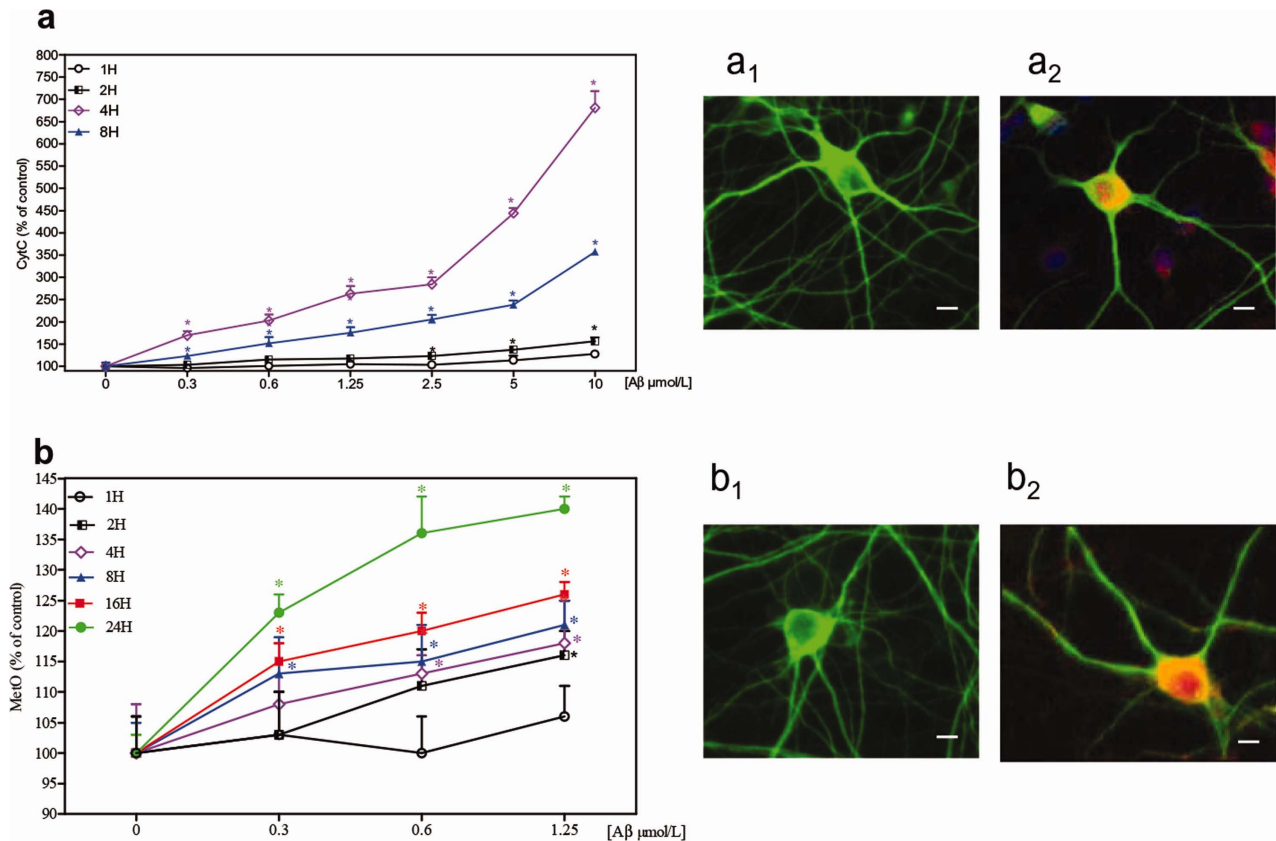


Fig. 3. Mitochondrial death and oxidative stress induced by A $\beta$ O. Dose-dependent and time-dependent effect of A $\beta$ O on CytC apparition in the cytoplasm of cortical neurons (a) and on MetO formation of neuronal cytoplasmic membrane assessed by MetO formation (b). All data are expressed in mean  $\pm$  SEM of three separate cultures in percentage of control. \* $P = 0.05$ . The values of control cultures were referred to as 100%. Representative pictures of cortical

neurons after 0 hr (a1,b1) and 4 hr (a2) or 24 hr (b2) of incubation with 1.25  $\mu$ mol/liter of peptide; neurons were fixed and doubly immunolabeled with anti-MAP2 antibodies (green) and anti-CytC or anti-MetO antibodies (red) and examined by double-immunofluorescence microscopy. Objective  $\times 40$ . Scale bar = 10  $\mu$ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

A $\beta$ O, the first significant effects were observed after 16 hr of intoxication (2.5  $\mu$ mol/liter). The low concentration of A $\beta$ O induced some significant decrease in the neurite network length only after a longer incubation time (48 hr). It should be underscored that no difference was observed in the kinetics of neurite network injuries between hippocampal and cortical neurons (Fig. 6c).

## DISCUSSION

### Cytopathic Effects Are Due to LMW and HMW A $\beta$ O

A $\beta$  peptides are produced as soluble monomers and undergo oligomerization and amyloid fibril formation via a nucleation-dependent polymerization process (Jan et al., 2010). During the course of in vitro A $\beta$  fibril formation, various nonfibrillar intermediary aggregates are formed; collectively called "soluble oligomers and protofibrils," they were shown to precede the appearance of fibrils (Fig. 1). Increasing evidence from various sources points to A $\beta$ O/protofibrils as putative toxic spe-

cies in AD pathogenesis. Dimers and trimers have been found in the soluble fractions of human brain and amyloid plaque extracts, which suggests that these LMW A $\beta$ O could be the fundamental building blocks of larger oligomers or insoluble amyloid fibrils (Kayed et al., 2009). Furthermore, the exact mechanisms by which these species contribute to A $\beta$  toxicity in vivo and the nature of the toxic species are not yet fully understood. Recent evidence suggests that accelerating the process of A $\beta$  fibrillation greatly enhances A $\beta$  toxicity in vitro (Wogulis et al., 2005) and the spread of amyloid pathology in vivo (Eisele et al., 2009). Deshpande et al. (2006) showed that A $\beta$ -soluble species caused a fast and massive toxic effect, whereas A $\beta$  fibrils induce progressive dystrophy and low cell death of cortical neurons in culture.

Our results support this observation. Only the agitated solution contained LMW and HMW, and A $\beta$ O induced rapid cell damage and death, whereas the unprepared solution containing A $\beta$  monomers and fibrils (which were not transfer onto WB membrane because of their size but were visible under optical microscopy;

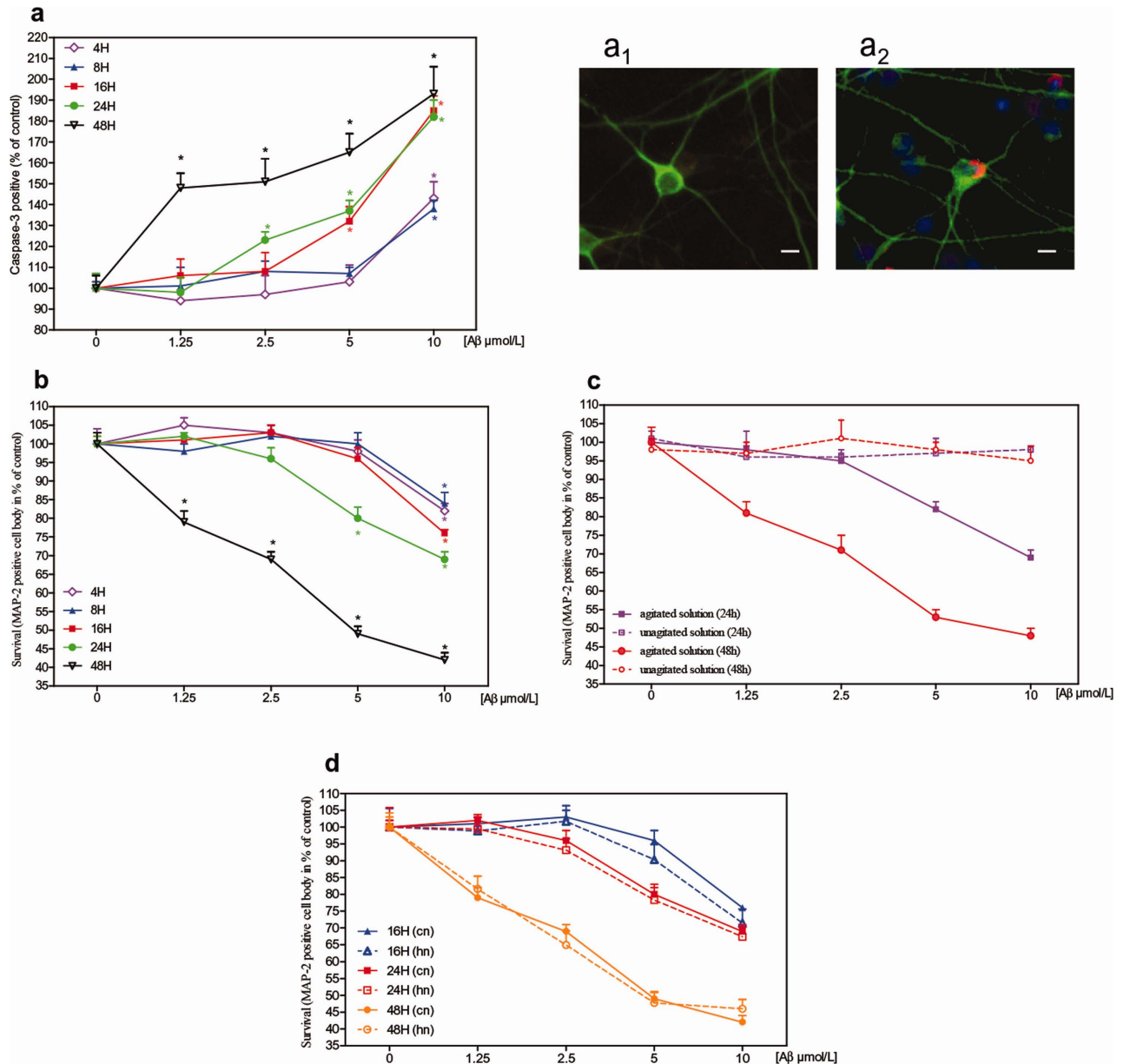


Fig. 4. Dose-dependent and time-dependent effect of A $\beta$ O on caspase-3 appearance in the cytoplasm of cortical neurons (a) and on neuron survival (b; neurons were identified by specific immunostaining for MAP2). c: Comparative dose-dependent and time-dependent effect of unprepared and agitated solutions of A $\beta$  peptide on cortical neuron survival. d: Comparative dose-dependent and time-dependent effects of A $\beta$ O on cortical (cn) and hippocampal (hn) survival. All data are mean  $\pm$  SEM of three separate cultures in percentage of con-

trol. \* $P = 0.05$ . The values of control cultures were referred to as 100%. Representative pictures of cortical neurons after 0 hr (a1) and 48 hr (a2) of incubation with 10  $\mu$ mol/liter peptide. Neurons were fixed and doubly immunolabeled with anti-MAP2 (green) and anticaspase 3 antibodies (red) and examined by double-immunofluorescence microscopy. Nuclei appear in blue after Hoechst labeling (a2). Objective  $\times 40$ . Scale bar = 10  $\mu$ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

data not shown) was lightly toxic within the same interval of time. We showed that our agitated preparation contains a mixture of LMW and HMW oligomers (with an average size of  $\sim 90$  kDa; see WBs) a fraction of which was prefibrillar and possibly toxic (discussion by Caughey and Lansbury, 2003). It has to be mentioned that, when we suspended A $\beta$  lyophilized peptides in

water solution (as done by many researchers and recommended by commercial manufacturers) and agitated as mentioned in Materials and Methods, a clear solution was produced (composed mainly of A $\beta$  monomers and devoid of A $\beta$ O), and no toxicity was observed in the first 48 hr of cortical and hippocampal neurons (data not shown).

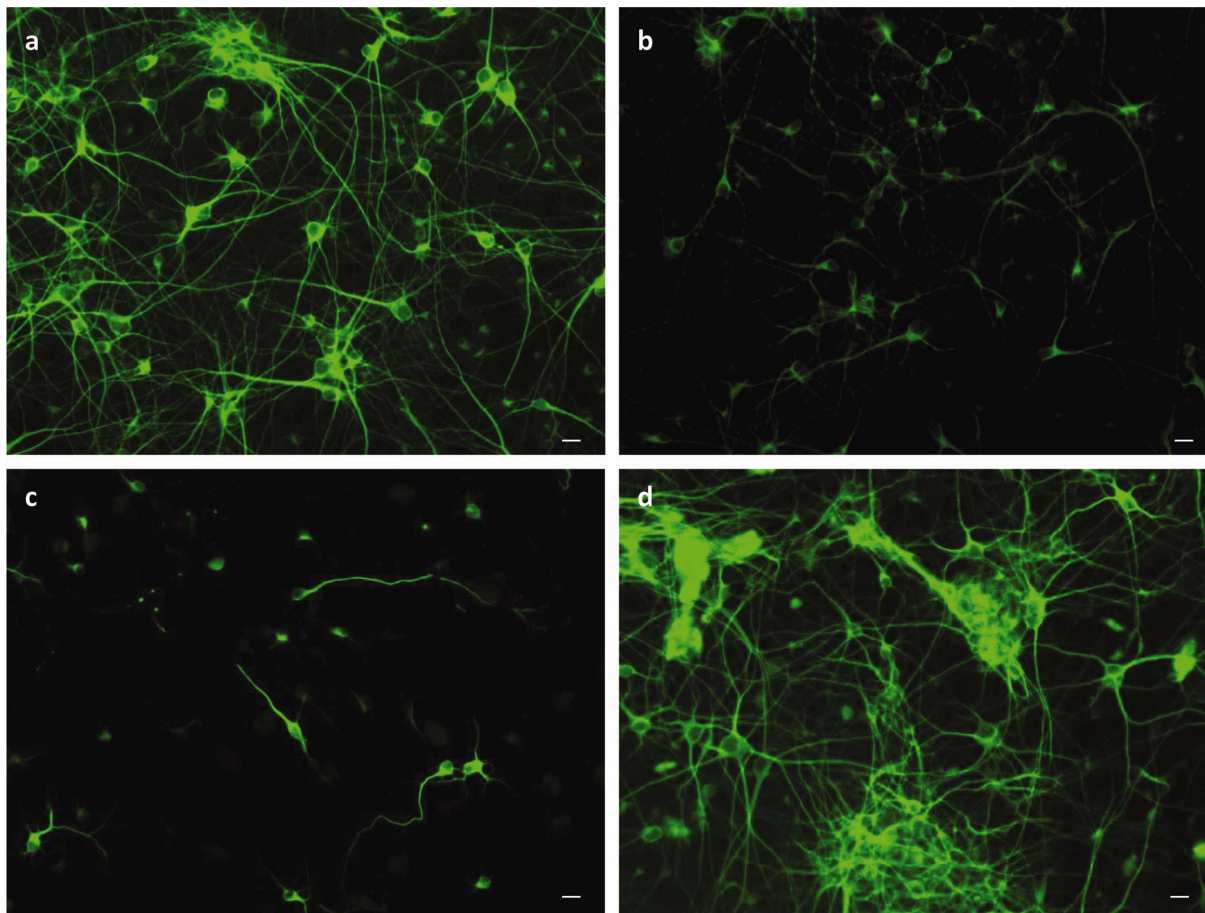


Fig. 5. Representative pictures of control (no peptide) cortical neurons (a), and after 48 hr application of 10  $\mu\text{mol/liter}$  of peptide in cortical neurons (b), in hippocampal neurons (c), and in cortical neurons of unagitated solution of peptide (d). Neurons were fixed

and doubly immunolabeled with anti-MAP2 and examined by double-immunofluorescence microscopy. Objective  $\times 20$ . Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

The 40–110-kDa fraction was predominantly fibrillar. It has been shown that soluble fibrillar oligomers were significantly increased but prefibrillar oligomer ( $\text{A}\beta 11^+$ ) have been shown not to be correlated with cognitive dysfunction in AD brains (Tomic et al., 2009). Nevertheless,  $\text{A}\beta 11^+$  prefibrillar oligomers were toxic in vitro (Kayed et al., 2003; Demuro et al., 2005). Tomic et al. (2009) suggested that, in brains of nondemented individuals, unknown factors could modulate their toxicity, and, because prefibrillar oligomers ( $\text{A}\beta 11^+$ ) were intermediates in fibril formation (Kayed et al., 2003), it is possible that their conformational conversion to fibrillar oligomers ( $\text{OC}^+$ ) is an important factor in toxicity.

#### **$\text{A}\beta\text{O}$ Induces a Rapid, Massive, and Transient Oxidative Stress in Neurons and Caspase-3 Activation**

$\text{A}\beta\text{O}$  produced a rapid increase in oxidative stress as measured by elevation of MetO levels, already observed with low concentrations of peptide, within the

2 hr following its addition to the cultures. This early event occurred before any physical damage to neurons (loss of synapses or cell death) or any activation of the death pathway (increase in caspase level). The mitochondrial death pathway (seen by the increase of CytC in neuronal cytoplasm) was triggered after 2 hr of contact with  $\text{A}\beta\text{O}$ . The greatest effect was reached after 4 hr at the lowest concentration tested. This effect was dose dependent; at low concentrations,  $\text{A}\beta\text{O}$  induced a chronic mitochondrial alteration without cell death. These changes occurred simultaneously with the increase in cell membrane oxidation (elevation in MetO levels). Such subtle mechanisms could explain the first cognitive impairments observed in AD. Indeed, mitochondria are crucial for energy supply and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulation; their disruption induces alteration of neuronal transmission. Oxidative damage from superoxide is thought to be prevented primarily by mitochondrial superoxide dismutase (for review see Murphy, 2009). When the capacity of mitochondria and cells to detoxify has been exceeded, the resulting oxidative stress can acti-



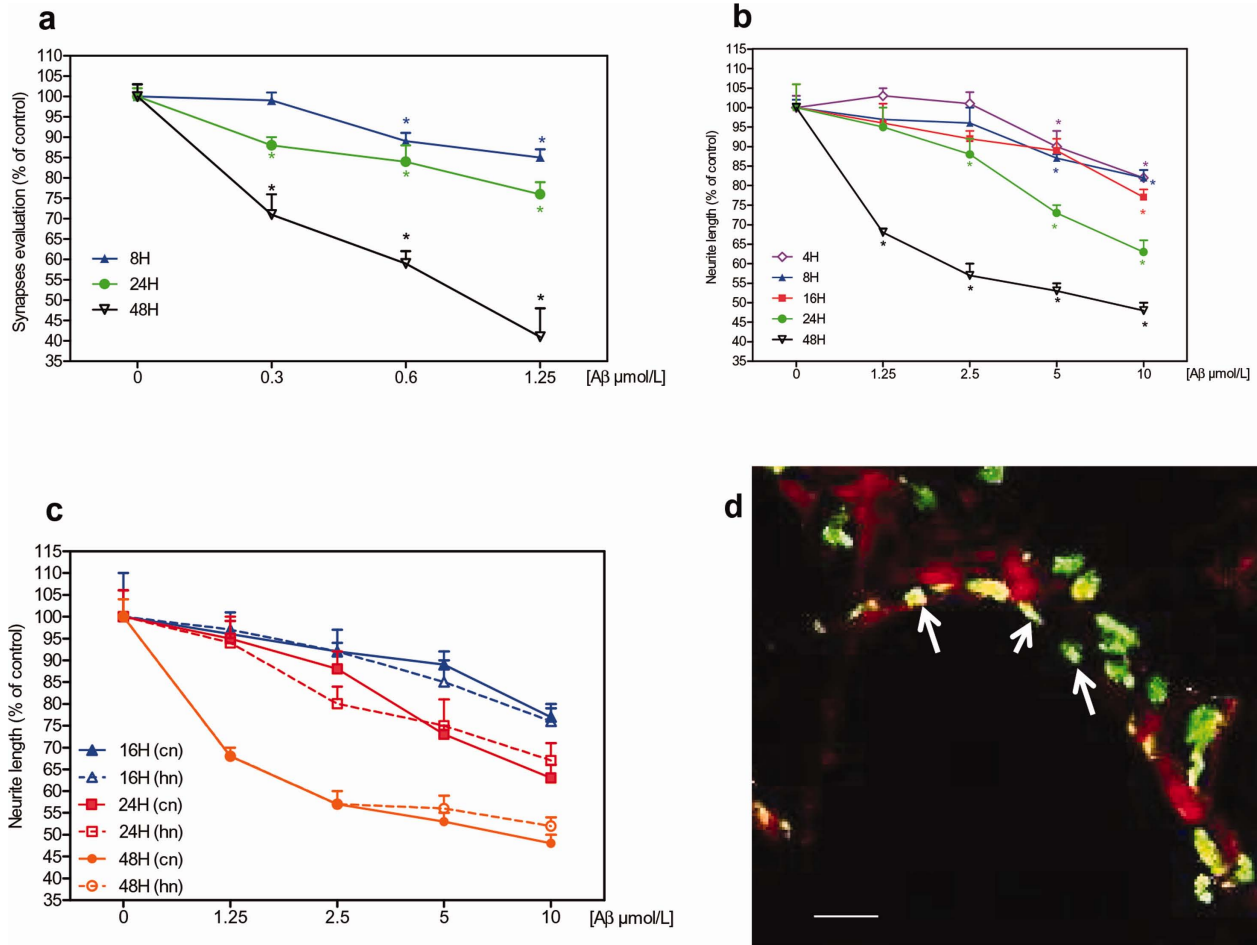


Fig. 6. Dose-dependent and time-dependent effect of A $\beta$ O on synaptic loss of cortical neurons (a) and on neurite network disappearance of cortical neurons (b). c: Comparative dose-dependent and time-dependent effect of A $\beta$ O on neurite network disappearance of cortical (cn) and hippocampal (hn) neurons. All data are mean  $\pm$  SEM of three separate cultures in percentage of control. \* $P = 0.05$ . The values of control cultures were referred to as 100%. d: Colocali-

zation of A $\beta$ O (arrows) added for 4 hr at 0.3  $\mu$ mol/liter and synapses (red) of cortical neurons; neurons were fixed and immunolabeled with anti-SYN (red), and A $\beta$ O was immunolabeled with anti-6E10 antibodies (green) and examined by double-immunofluorescence confocal microscopy. Objective  $\times 63$ . Scale bar = 10  $\mu$ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

vate the mitochondrial permeability transition pore. This allows free diffusion of mitochondrial molecules of less than 1,500 Da from mitochondrial matrix to cytosol, resulting in swelling of mitochondria, with massive release of CytC and caspase activation (Emerit et al., 2004). One cannot exclude that mitochondrial injuries play a role in synapse loss, because it has been shown (Li et al., 2003) that mitochondria located within dendritic spines are essential for the formation and maintenance of synapses.

Caspase-3 moves to the nucleus, initiating the apoptosis death program, and finally an enhanced loss of neurons was noted. In this study, we observed a high elevation of caspase-3 within the 8 hr following exposure to high A $\beta$ O concentrations. Neuronal death occurred within the following 24 hr of exposure to the lowest doses of A $\beta$ O. A $\beta$ O has been shown to induce perforation of neuronal membranes (causing an

increase in membrane conductance and intracellular calcium influx and extracellular ethidium bromide diffusion into cytoplasm [Sepulveda et al., 2010]). This could explain the massive oxidant species (superoxide) production.

### Synaptic Loss, the First Structural Cytopathic Effect Induced by A $\beta$ O

Loss of synapses was observed (within the first 8 hr) at low concentrations of A $\beta$ O (0.3–0.6  $\mu$ mol/liter) before any cell death and caspase activation; it appeared together with CytC release and Met oxidation. Previous studies showed that, independently of oxidative stress, A $\beta$ O was able to inhibit mitochondrial movement in hippocampal neurons. This damage seemed to be independent of cell death and other major alterations of cellular structures. Indeed, Rui et al. (2006, 2010) have

proved that inhibition of mitochondria transport occurred within the first minutes after application of A $\beta$ , which suggested a very early effect of the peptide, unlike other long-term toxic effects involved in cell death and degenerative phenomena. Our results support this hypothesis; death of neurons was initiated when synaptic loss had already occurred. Moreover, we observed a specific localization of A $\beta$ O at the synapses (see Fig. 5b). Within the first 2 hr of intoxication, A $\beta$ O was shown to bind specifically and preferentially to synapses. Such a preferential colocalization could be linked to the high N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor concentration existing in the postsynaptic membrane; the specific binding to NMDA receptors could partially induce synapse disorganization. These results were in agreement with previous work showing that A $\beta$ O could decrease dendritic spine density and alter glutamatergic signaling in CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal organotypic slices (Hsieh et al., 2006; Selkoe, 2008).

In hippocampal neurons, A $\beta$ O exerts not only an acute inhibition of mitochondria trafficking but also of receptors (Rui et al., 2010) such as AMPA postsynaptic receptors. In fact, A $\beta$ O induced synapse destabilization, and their loss is already important at low concentrations (nanomolar range), within a mean time of 8–24 hr. As a consequence, A $\beta$  causes tau missorting, loss of cell polarity, and loss of dendritic microtubules. This in turn leads to impaired mitochondria transport whereby synapses cannot be maintained (Zempel and Mandelkow, 2012).

### Disorganization of the Neurite Network

Taken together, these results agree with previous observations showing that A $\beta$  dimers could be isolated from cortices of patients with typical AD and at subnanomolar concentrations. They also induced early hyperphosphorylation of protein tau at AD-relevant epitopes in hippocampal neurons. They disrupted microtubule cytoskeleton and caused neuritic degeneration, in the absence of amyloid fibrils (Jin et al., 2011). Here, similar structural effects were observed with a synthetic preparation of A $\beta$ O (containing mainly large oligomers). Disorganization of the neurite network occurring at low concentrations and within the first 8 hr of intoxication could be due to hyperphosphorylation; this issue is currently under investigation in our laboratory.

Concomitantly with or subsequent to loss of synapses, the neurite network is disorganized and the length of neuritic structures progressively decreases as soon as the disease progresses. Although it is not known whether loss of neurites is responsible for loss of synapses or, conversely and more probably, loss of synapses results in disappearance of neurites, this phenomenon certainly plays an important role during AD.

### Effects of A $\beta$ O Develop Sequentially

Our results show the sequential events occurring in the presence of extracellular A $\beta$ O and lead to the fol-

lowing general conclusions: 1) all toxic events are linked to A $\beta$ O and develop according to a precise timing through a specific pathway; 2) A $\beta$ O are probably the key intermediates in AD pathogenesis; 3) the present model, using A $\beta$  peptide preparation containing A $\beta$ O, allows reproduction of some essential neuropathological features of AD; and 4) the pathological mechanisms involved were similar whatever the kind of neurons tested (cortical vs. hippocampal neurons). For many years, it has been argued that insoluble A $\beta$  fibrillar aggregates found in amyloid plaques were the causes of AD and initiated the neurodegenerative cascades observed in the disease. We have observed here that only a specific amyloid entity (A $\beta$ O with a size of 40–100 kDa) is involved in the neurotoxicity process. These results were in accordance with recent findings indicating that only oligomers (intermediate species) were involved in the toxicity of A $\beta$  (for review see Sakono and Zako, 2010). According to these results, we cannot exclude that plaques play a role in the degeneration of neurons. Indeed, there is evidence that periplaque A $\beta$  assemblies were associated with local dendritic spine loss and neuritic dystrophy in AD brains (Koffie et al., 2009). The presence of bioactive dimers within amyloid plaque cores (Jin et al., 2011) suggests that plaques serve as local reservoirs of small oligomers that can diffuse away from them and cause surrounding neuritic/synaptic injury (Haass and Selkoe, 2007). Thus, therapeutic approaches focused solely on fibril destabilization may have the undesirable side effect of increasing a soluble pool of neurotoxic A $\beta$ O and protofibrils.

To understand better the mode of action of A $\beta$ O and to find new potential treatments against AD, robust and specific *in vitro* systems are needed. Our *in vitro* primary cell culture model mimicking *in vivo* neuropathological lesions allows reproducing the sequential damages of A $\beta$ O occurring in cortical/hippocampal neurons. With a single system, it is therefore possible 1) to embrace all toxic mechanisms at defined times and concentrations and to study each involved pathway (the early mechanisms as well as the late cell death) and 2) to study effects of new molecules on the different neurotoxic pathways responsible for the development of AD.

### REFERENCES

- Bitan G, Vollers SS, Teplow DB. 2003. Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid beta-protein oligomerization. *J Biol Chem* 278:34882–34889.
- Caughey B, Lansbury PT. 2003. Protofibrils, pores, fibrils and neurodegeneration: separating protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26:267–298.
- De Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spire-Jones TL, Hyman BT. 2012. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 73:685–697.
- Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG. 2005. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280:17294–17300.

- Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J. 2006. Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci* 26:6011–6018.
- Eisele YS, Bolmont T, Heikenwalder M, Langer F, Jacobson LH, Yan ZX, Roth K, Aguzzi A, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M. 2009. Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral vs. systemic Abeta inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12926–12931.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58:39–46.
- Haass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101–112.
- Harrison NL. 1990. On the presynaptic action of baclofen at inhibitory synapses between cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 422:433–446.
- Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R. 2006. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52:831–843.
- Jan A, Hartley DM, Lashuel HA. 2010. Preparation and characterization of toxic Abeta aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat Protoc* 5:1186–1209.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300:486–489.
- Kayed R, Head E, Sarsoza F, Saing T, Cotman CW, Necula M, Margol L, Wu J, Breydo L, Thompson JL, Rasool S, Gurlo T, Butler P, Glabe CG. 2007. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol Neurodegener* 26:18.
- Kayed R, Pensalfini A, Margol L, Sokolov Y, Sarsoza F, Head E, Hall J, Glabe C. 2009. Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J Biol Chem* 284:4230–4237.
- Kelly JS. 1999. Alzheimer's disease: the tacrine legacy. *Trends Pharmacol Sci* 20:127–129.
- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, Hyman BT, Spires-Jones TL. 2009. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4012–4017.
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352–357.
- Liu L, Drouot V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C, Duff K. 2012. Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS One* 7:e31302.
- Longo FM, Massa SM. 2004. Neuroprotective strategies in Alzheimer's disease. *NeuroRx* 1:117–127.
- Moskovitz J. 2005. Roles of methionine sulfoxide reductases in antioxidant defense, protein regulation and survival. *Curr Pharm Des* 11:1451–1457.
- Murphy MP. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1–13.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64:313–353.
- Rui Y, Tiwari P, Xie Z, Zheng JQ. 2006. Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons. *J Neurosci* 26:10480–10487.
- Rui Y, Gu J, Yu K, Hartzell HC, Zheng JQ. 2010. Inhibition of AMPA receptor trafficking at hippocampal synapses by beta-amyloid oligomers: the mitochondrial contribution. *Mol Brain* 26:10.
- Sakono M, Zako T. 2010. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J* 277:1348–1358.
- Selkoe DJ. 2008. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192:106–113.
- Sepulveda FJ, Parodi J, Peoples RW, Opazo C, Aguayo LG. 2010. Synaptotoxicity of Alzheimer beta amyloid can be explained by its membrane perforating property. *PLoS One* 27:5–7.
- Singer C, Figueroa-Masot X, Batchelor R, Dorsa D. 1999. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* 19:2455–2463.
- Tomic JL, Pensalfini A, Head E, Glabe CG. 2009. Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiol Dis* 35:352–358.
- Wogulis M, Wright S, Cunningham D, Chilcote T, Powell K, Rydel RE. 2005. Nucleation-dependent polymerization is an essential component of amyloid-mediated neuronal cell death. *J Neurosci* 25:1071–1080.
- Zempel H, Mandelkow EM. 2012. Linking amyloid- $\beta$  and tau: amyloid- $\beta$  induced synaptic dysfunction via local wreckage of the neuronal cytoskeleton. *Neurodegener Dis* 10:64–72.



#### 4.1.2. Résultats complémentaires.

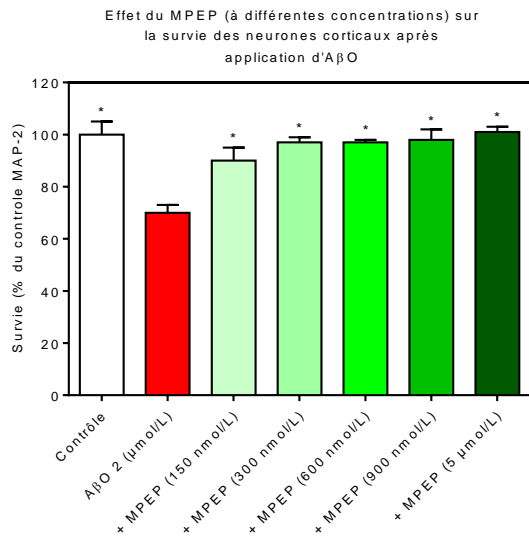
Il est important de noter que le lot d'A $\beta$  utilisé dans l'article présenté ci-dessus et celui qui l'a été dans les résultats qui vont suivre n'est pas le même.

En effet, pour l'article de 2013 la solution d'A $\beta$  contenait 20 % d'oligomères (pour une concentration totale de peptide de 10  $\mu\text{mol/L}$ , il y avait 2  $\mu\text{mol/L}$  d'A $\beta\text{O}$ ). En revanche pour les manipulations complémentaires, le lot d'A $\beta$  utilisé contenait 10 % d'oligomères (pour une concentration totale de peptide de 20  $\mu\text{mol/L}$ , il y avait 2  $\mu\text{mol/L}$  d'A $\beta\text{O}$ ).

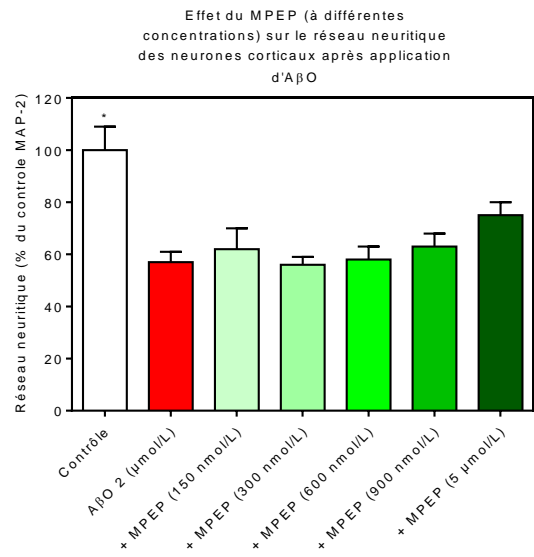
C'est pourquoi les résultats sont exprimés en concentration d'A $\beta$  total dans l'article et en concentration d'A $\beta\text{O}$  dans les résultats complémentaires ce qui permet une comparaison plus aisée, au prix d'un simple calcul.

##### 4.1.2.1. Effet de différents antagonistes des récepteurs du glutamate sur une intoxication de neurones corticaux par des A $\beta\text{O}$ .

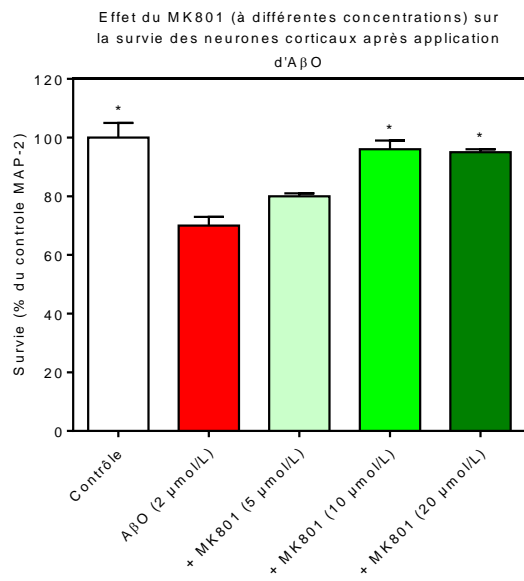
Pour étudier la possible implication des récepteurs du NMDA, nous avons utilisé différents antagonistes des récepteurs du NMDA et d'un récepteur métabotrope du Glutamate, le mGlu5. Le MK801 est un antagoniste général des récepteurs du NMDA, la mémantine est un antagoniste des récepteurs extra synaptiques du NMDA et l'ifenprodil, un inhibiteur des sous-unités 2B des récepteurs NMDA. Quant au MPEP, c'est un inhibiteur du mGlu5. L'hypothèse sous-jacente à ces expériences consiste à supposer que les A $\beta\text{O}$  peuvent se lier à l'un de ces récepteurs, et que les antagonistes les empêchent de les reconnaître. La Figure ci-dessous rend compte des résultats obtenus lors de ces études.



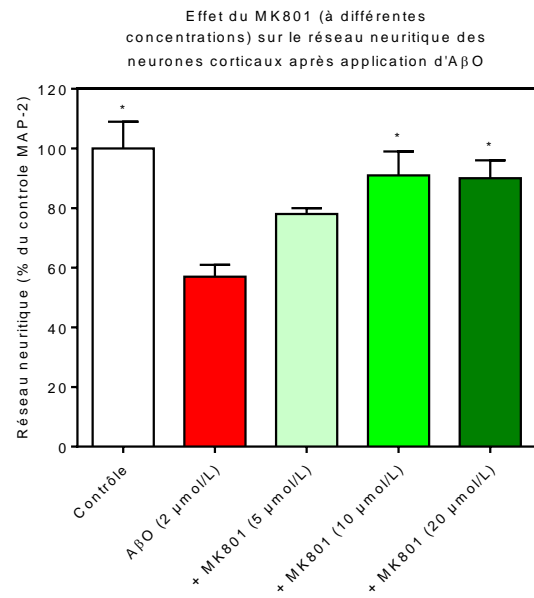
a<sub>1</sub>)



a<sub>2</sub>)



b<sub>1</sub>)



b<sub>2</sub>)

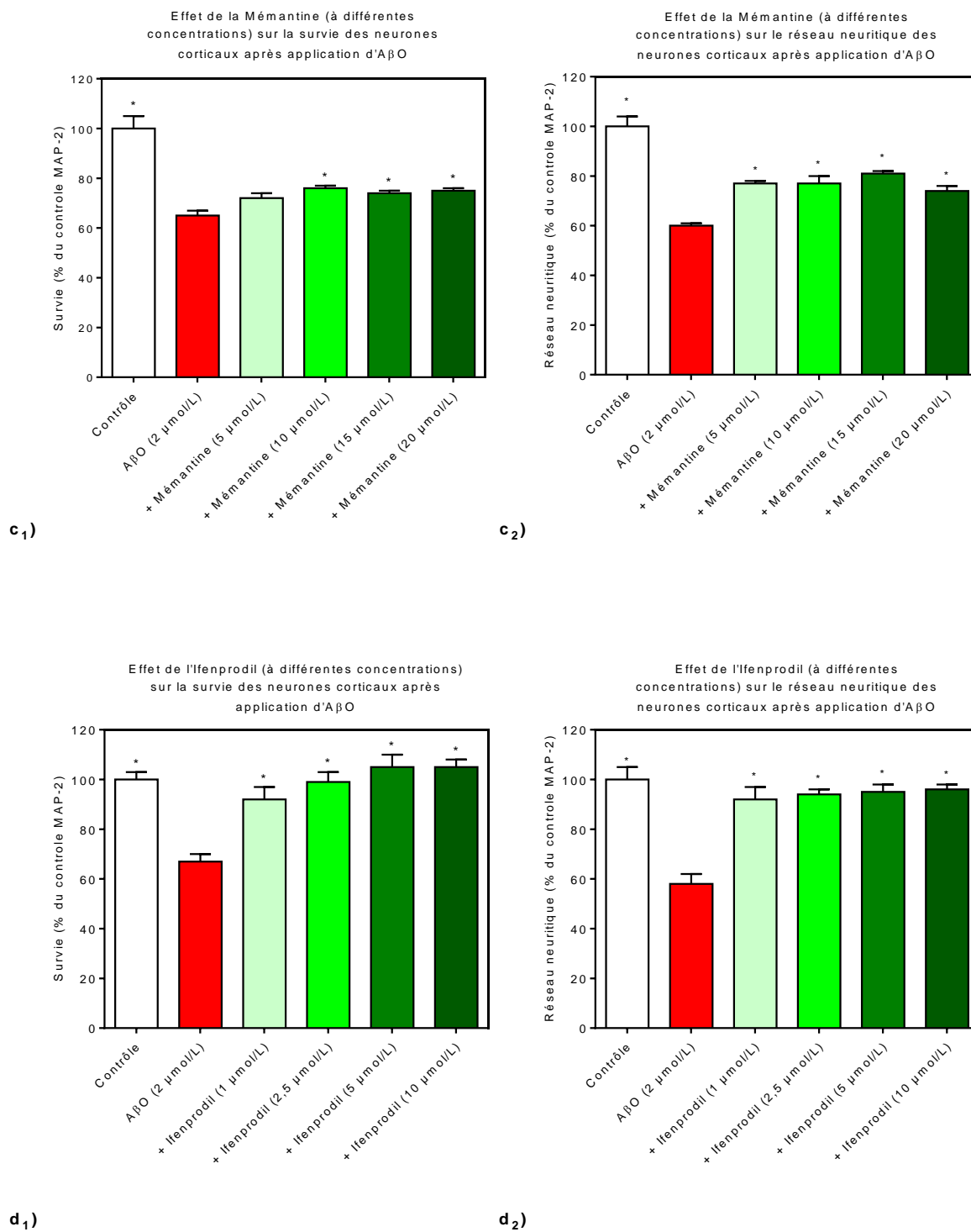


Figure 11 : Effet de différents antagonistes de récepteurs du glutamate

(a) MPEP ; (b) MK801 ; (c) Mémantine, (d) Ifenprodil, sur la survie (1) et le réseau neuritique (2) des neurones corticaux après une intoxication à l'AβO (2 μmol/L, 24h). Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement) \* p < 0.05 est considéré comme significatif \* p < 0.05 vs AβO (one-way ANOVA suivi d'un test Dunnett).

L'A $\beta$ O à 2  $\mu$ mol/L appliqué pendant 24 h induit une mort neuronale (~30 %) et une diminution du réseau neuritique (~40 %).

Le MPEP (2-Methyl-6-(phényléthynyl)pyridine à 5  $\mu$ mol/L), antagoniste sélectif des récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR5), pré-incubé 1 h avant l'adjonction du peptide, protège totalement les neurones corticaux de la mort mais n'a pas d'effet sur le réseau neuritique.

Le MK801 (à 10 et 20  $\mu$ mol/L), antagoniste général des récepteurs NMDA, protège totalement les neurones corticaux d'une intoxication par l'A $\beta$ O.

La mémantine, antagoniste non compétitif de faible affinité des NMDAR, dépendant du voltage, peut inhiber l'influx prolongé d'ions Ca<sup>2+</sup>, particulièrement celui qui est convoyé par les récepteurs extra synaptiques. La mémantine à partir de 5  $\mu$ mol/L protège partiellement les neurones corticaux ainsi que le réseau neuritique, tandis que l'ifenprodil, antagoniste sélectif des sous unités 2b des récepteurs NMDA, protège totalement les neurones corticaux d'une intoxication par l'A $\beta$ O.

#### 4.1.2.2. Effet des A $\beta$ O sur les flux calciques convoyés par les récepteurs du NMDA.

L'effet toxique des A $\beta$ O impliquant l'engagement des récepteurs du glutamate, une augmentation massive de la concentration intra neuronale en ions Ca<sup>2+</sup> pourrait en expliquer les effets toxiques aigus. C'est pourquoi nous avons tenté de déterminer si la complexation des ions Ca<sup>2+</sup> extracellulaires pouvait diminuer l'influx calcique éventuellement déclenché par l'adjonction d'A $\beta$ O à des cultures de neurones corticaux.



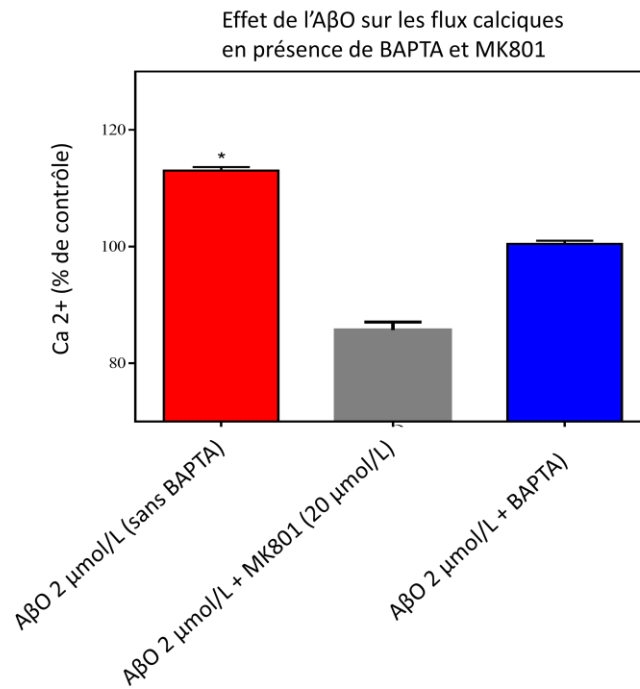


Figure 12: Effet de l'A $\beta$ O sur les flux calciques en présence de BAPTA.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement) \*  $p < 0.05$  est considéré comme significatif \*  $p < 0.05$  vs groupe contrôle (one-way ANOVA suivi d'un test Dunnett).

La Figure 12 montre que les A $\beta$ O provoquent effectivement une augmentation massive de la concentration des ions Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme des neurones, après 10 min d'application. De plus en présence du MK801, antagoniste de RNMDA, l'augmentation de la concentration des ions Ca<sup>2+</sup> est totalement inhibée. En présence de BAPTA, chélateur sélectif des ions calcium, le flux calcique est aboli ce qui indique que cette augmentation à bien pour origine les ions Ca<sup>2+</sup> extracellulaires (Fig. 12).

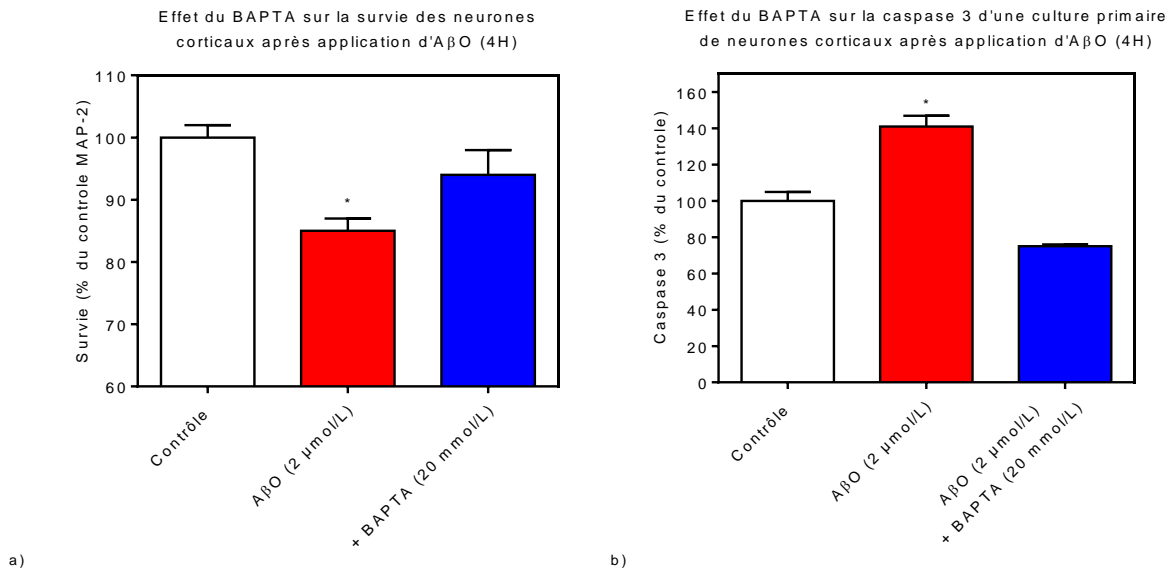


Figure 13: Effet du BAPTA sur a) la survie neuronale b) la caspase 3 après une intoxication à l'AβO.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement) \* p < 0.05 est considéré comme significatif \* p < 0.05 vs groupe contrôle (one-way ANOVA suivi d'un test Dunnett).

Après 4 h d'application d'AβO (2 μmol/L), 15 % des neurones sont tués et l'activité de la caspase 3 est augmentée. En présence de BAPTA, le peptide β amyloïde n'exerce plus d'effet toxique sur les neurones corticaux, et l'activation de la caspase 3 est totalement abolie.

#### 4.1.2.3. Effet des AβO sur la libération de glutamate par les neurones et les cellules associées de la culture

Les AβO provoquent une augmentation légère mais significative de la concentration du glutamate extracellulaire, dans les 2 premières minutes qui suivent leur adjonction aux cultures de neurones corticaux (Fig. 14). Comme la culture contient, outre les neurones, des astrocytes et d'autres types cellulaires, il n'est pas possible d'assigner une origine cellulaire certaine à cette portion de glutamate : il peut provenir des neurones (glutamate présynaptique par exemple) ou des astrocytes.

Effet d'A $\beta$ O sur la concentration de glutamate extracellulaire après 2 min d'application

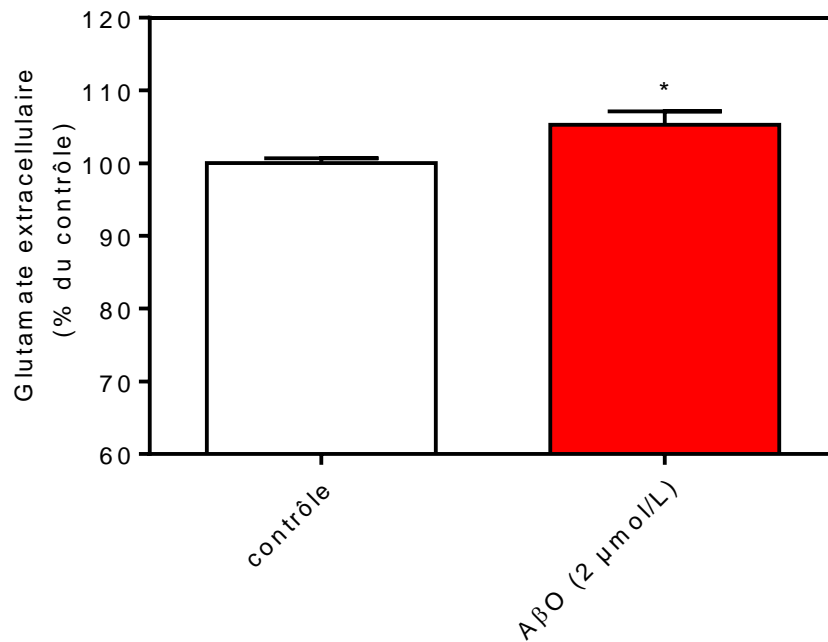
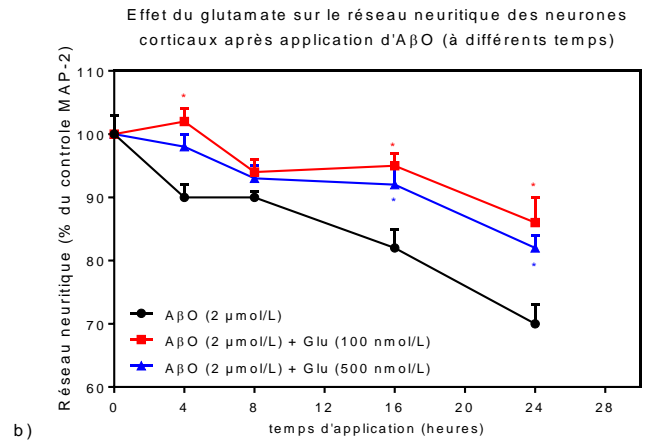
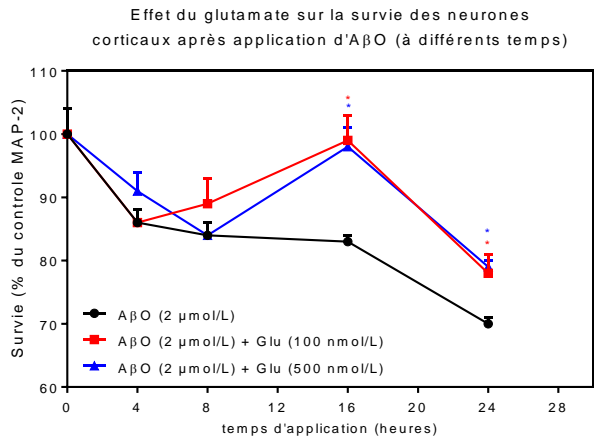


Figure 14: Effet d'A $\beta$ O sur la concentration de glutamate extracellulaire après 2 min d'application.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement) \*  $p < 0.05$  est considéré comme significatif \*  $p < 0.05$  t test contrôle vs A $\beta$ O.

#### 4.1.2.4. Effet du glutamate sur une intoxication A $\beta$ O

Quoi qu'il en soit, cette excrétion ou sécrétion de glutamate invite à rechercher les possibles interactions existantes entre glutamate et A $\beta$ O, en faisant l'hypothèse raisonnable qu'il s'agit d'une réaction d'homéostasie destinée à maintenir un état d'excitabilité normal ou quasi normal des neurones exposés aux A $\beta$ O. La Figure 15 vérifie la validité de cette hypothèse. Les A $\beta$ O à 2  $\mu$ mol/L induisent une mort neuronale et une désorganisation du réseau neuritique qui s'accroît avec le temps de traitement. Le glutamate, à la concentration de 100 et 500 nmol/l protège significativement les neurones ; il diminue leur mortalité et protège le réseau neuritique de la désorganisation, ces effets se manifestant après 16 h d'application.



a)

b)

Figure 15: Effet du glutamate sur a) la survie b) le réseau neuritique des neurones corticaux après une intoxication à l'AβO (2 μmol/L, à différents temps).

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement) \* p < 0.05 est considéré comme significatif \* p < 0.05 vs AβO (one-way ANOVA suivi d'un test Dunnett).

#### 4.1.2.5. Effet d'AβO sur l'activation de la GSK3β et sur l'hyperphosphorylation de tau.

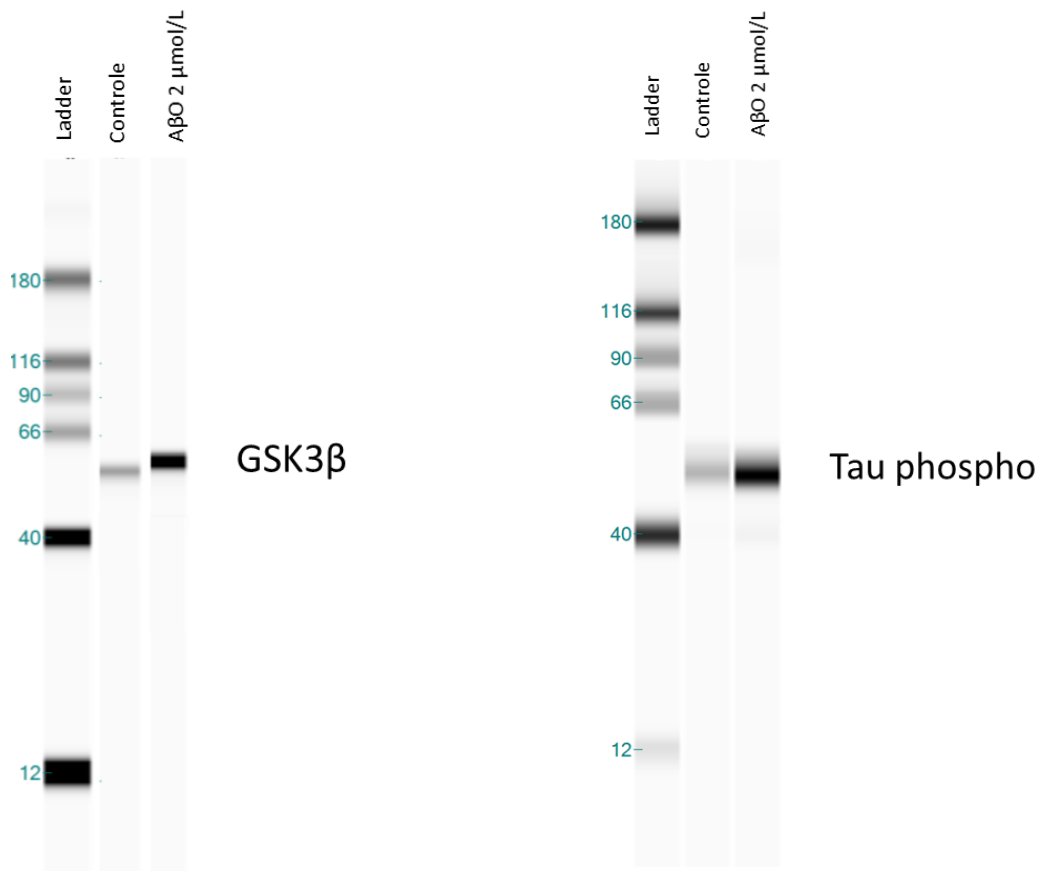


Figure 16: Effet d'AβO sur le niveau d'expression de la protéine GSK3β et sur l'hyperphosphorylation de tau après une intoxication de 8 h.

A $\beta$ O provoque une activation de la GSK3 $\beta$  et donc une hyperphosphorylation de tau après 8 h d'intoxication.

#### 4.1.2.6. Effet d'A $\beta$ O sur des astrocytes purifiés

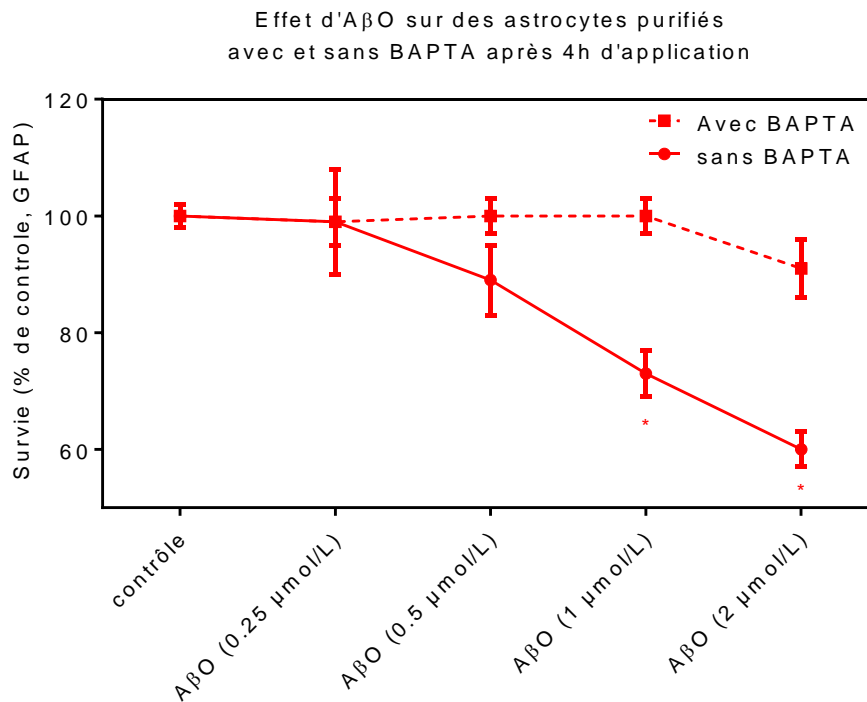


Figure 17: Effet d'A $\beta$ O à différentes concentrations avec et sans BAPTA sur la survie des astrocytes purifiés après une intoxication de 4 h. Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement) \* p < 0.05 est considéré comme significatif \* p < 0.05 vs contrôle (one-way ANOVA suivi d'un test Dunnett).

A $\beta$ O a un effet toxique non seulement sur les neurones comme vue précédemment mais aussi sur les astrocytes. Cet effet est dépendant de la dose après 4 h d'application.

En présence de BAPTA dans le milieu, A $\beta$ O n'a plus d'effet sur les astrocytes.

A $\beta$ O a une nouvelle fois besoin du calcium extracellulaire pour agir sur cette cible.

### 4.1.3. Discussion

Les NMDAR sont impliqués dans la neurotoxicité de l'A $\beta$ O comme le montrent les résultats obtenus avec le MK801 (Fig. 11b), un antagoniste général de ces récepteurs. L'usage d'un antagoniste plus spécifique a permis d'identifier celle des sous-unités des NMDAR qui sont les plus impliquées dans ce phénomène : il s'agit des sous-unités 2B comme le prouve la protection totale des neurones contre la toxicité des A $\beta$ O par l'Ifenprodil (Fig. 11d). La Mémantine n'a qu'un effet protecteur minime (Fig. 11c) ce qui indique que les NMDAR extra synaptiques sont faiblement impliqués dans la toxicité des A $\beta$ O. Enfin d'autres récepteurs glutamatergiques, tel que les mGluR5, semblent aussi intervenir dans la toxicité A $\beta$ O (Fig. 11a). La localisation exacte de ces récepteurs métabotropes (elle peut être neuronale et/ou astrocytaire) impliqués dans la toxicité des A $\beta$ O demande à être plus finement étudiée. Nous émettons l'hypothèse que les mGluR5 astrocytaires sont indirectement impliqués dans la mesure où les A $\beta$ O sont toxiques pour les astrocytes et que cette toxicité exige un influx calcique pour se manifester. Il est donc nécessaire de vérifier le type de mort, apoptotique ou nécrotique qu'induisent les A $\beta$ O sur les astrocytes. Une mort par nécrose pourrait alors rendre compte partiellement de l'augmentation de la concentration de glutamate dans les cultures : elle résulterait d'un effet quasi mécanique de désintégration des vésicules astrocytaires à glutamate, sans compter la libération de ce médiateur sous l'effet de la rentrée de calcium.

Les NMDAR sont perméables aux ions Ca<sup>2+</sup> ; un influx de ces ions dans le neurone joue un rôle important dans la modulation de la plasticité synaptique. Nous avons étudié les flux calciques induits par les A $\beta$ O : le peptide A $\beta$ O induit effectivement un influx massif d'ions Ca<sup>2+</sup> peut-être à hauteur des épines dendritiques (Fig. 12), après 10 min d'application ; il peut donc intervenir dans le processus de LTD, et, bien entendu, dans l'excitotoxicité et la mort neuronale.

Ce flux calcique n'est observé qu'après 10 min d'application des A $\beta$ O. Il se peut donc que les NMDAR ne soient pas la première cible d'A $\beta$ O, ou que leur affinité pour ces récepteurs soit faible, ou encore que la forme oligomérique de l'A $\beta$  ait du mal à se positionner convenablement sur eux en raison de son encombrement stérique. Nous avons observé une légère augmentation du glutamate extracellulaire, 2 min après l'application des A $\beta$ O. Elle peut être consécutive à une inhibition de la recapture du

glutamate, ou à une libération d'origine neuronale ou astrocytaire. Talantova et al., 2013 ont montré que l'activation des eNMDAR est déclenchée par le glutamate libéré par les astrocytes en réponse à l'A $\beta$  et nos propres résultats viennent confirmer ces conclusions. La stimulation des eNMDAR est rapidement suivie d'une diminution de l'excitation postsynaptique, de la génération de monoxyde d'azote, de l'hyperphosphorylation de la protéine  $\tau$  et de l'activation de la caspase-3.

La recapture du glutamate est réalisée par des transporteurs membranaires localisés aussi bien sur les neurones que sur les cellules gliales. Il en existe cinq sous-types, dont les gènes ont été clonés (Danbolt et al., 2016). Les transporteurs montrent un grand degré de conservation interspécifique. Chez l'homme, ils sont appelés transporteurs des acides aminés excitateurs (EAAT1-5 pour excitatory amino acid transporter). Les transporteurs astrocytaires sont présents en plus grande quantité sur la membrane plasmique des astrocytes que sur celle des neurones, et comme les astrocytes en général "encadrent" littéralement les synapses, ils constituent un rempart efficace contre la diffusion du glutamate dans l'espace extracellulaire. Han et al., 2016 ont montré que les A $\beta$ O induisaient une diminution de l'expression des EAAT1 et EAAT2. Il se pourrait donc que l'augmentation du glutamate extracellulaire induit par les A $\beta$ O soit également due à l'inhibition de la recapture du glutamate par les EAAT astrocytaires à quoi s'ajoute, nous l'avons déjà signalé, une augmentation de la libération du glutamate convoyée par les mgluR.

En raison de la toxicité des A $\beta$ O pour les astrocytes (Fig. 17), et de l'importance des EAAT dans la régulation de la concentration extracellulaire de glutamate, il apparaît que ces cellules jouent certainement un rôle important dans la toxicité globale de l'A $\beta$  pour les neurones corticaux en culture.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous permet d'établir une séquence chronologique putative des événements qui conduisent à l'expression des effets toxiques des A $\beta$ O (Fig. 18) :

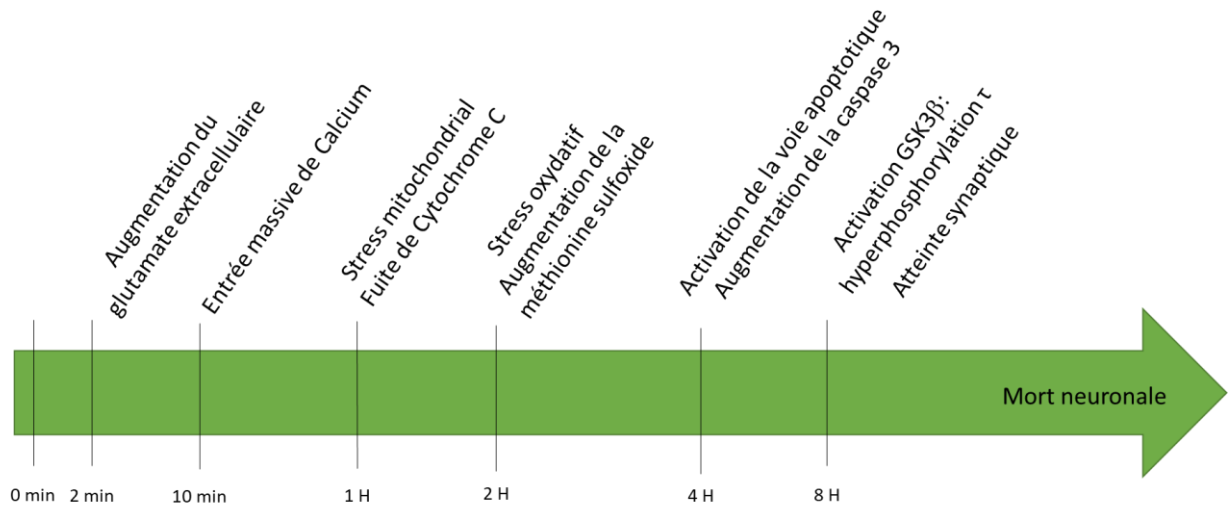


Figure 18 : Séquence putative des événements conduisant à l'expression des effets toxiques des AβO.

De plus les résultats obtenus permettent d'inférer que les hypothèses suivantes :

- Augmentent la concentration du glutamate dans la fente synaptique soit par un relargage provenant du bouton présynaptique et/ ou des astrocytes soit par inhibition du système de recapture par les EAAT.
- Induisent un transport latéral des NMDAR2B
- Interagissent avec les mGluR5, favorisent leur agrégation dans la zone synaptique, les activent en s'y engageant, et exercent des effets délétères sur le fonctionnement des NMDAR et l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> cytosolique intra neuronal.
- Susciteraient un influx massif de Ca<sup>2+</sup> à hauteur des épines dendritiques, et participeraient au processus de LTD.

À titre d'hypothèse, nous schématisons dans la Figure 19 les mécanismes susceptibles d'être impliqués dans la toxicité des AβO, et dans sa prévention par des antagonistes de différents récepteurs du glutamate.



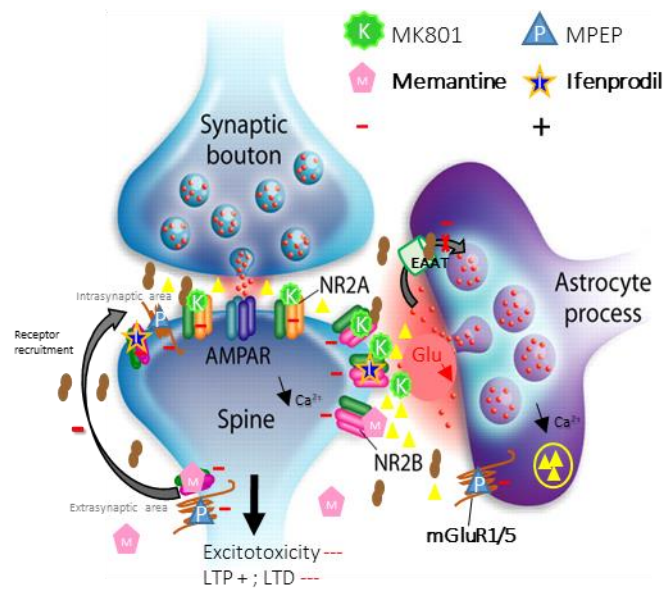
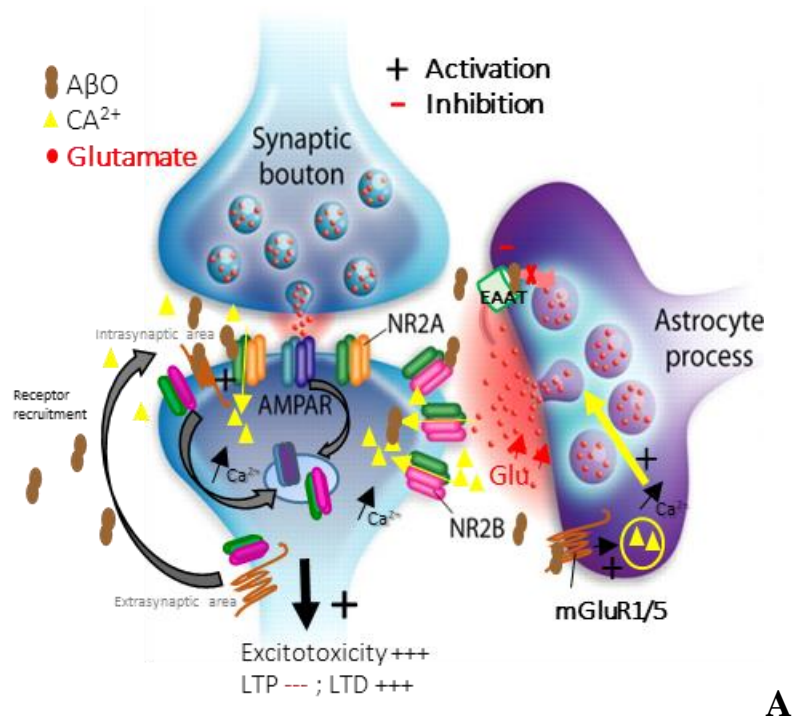


Figure 19 : Représentation schématique des événements impliqués dans la toxicité des AβO [A] et de leur prévention par des antagonistes de différents récepteurs du glutamate [B].

PosterAD/PD 2015: Neurodegeneration induced by Ab oligomeric fractions : Role of NMDA receptors and mGluR5  
 Maud Combes, Philippe Poindron, Jean Mariani and Noelle Callizot

#### 4.1.4. Toxicité chronique du peptide A $\beta$ induite par l'activation de la microglie.

Nous ouvrons avec cette section un dernier chapitre relatif aux résultats complémentaires. Il a trait à l'intervention de la microglie dans les phénomènes neuropathologiques liés à la MA.

Dans l'article présenté ci-dessus, et avec les résultats complémentaires que nous venons d'exposer sommairement, nous observons qu'en jouant sur la concentration et le temps d'exposition des cultures aux A $\beta$ O, il est possible de reproduire aussi bien les premiers effets de ce traitement, tels que l'augmentation du glutamate extracellulaire, le stress oxydatif que nous qualifions d'effets aigus, que les effets à long terme tel que la mort neuronale qui en reflète les effets chroniques.

Dans le modèle qui suit, qui inclut la présence dûment contrôlée de cellules microgliales, et en utilisant une préparation contenant des A $\beta$ O à des concentrations relativement faibles, nous observons dans un premier temps le développement des caractéristiques neuropathologiques de la MA et dans un second, une réponse neuroinflammatoire liée à une activation de la microglie et à une libération de cytokines pro inflammatoire. Les oligomères et les fibrilles sont des activateurs puissants des cellules microgliales. Classiquement, la microglie activée libère des molécules pro-inflammatoires et neurotoxiques qui contribuent à la perte neuronale (Schlachetzki and Hüll, 2009; Tao et al., 2018). C'est à cette question que tentent de répondre les expériences complémentaires dont les résultats sont présentés ci-après.

#### 4.1.4.1. Effet d'AβO sur les neurones corticaux cultivés en présence de microglie.

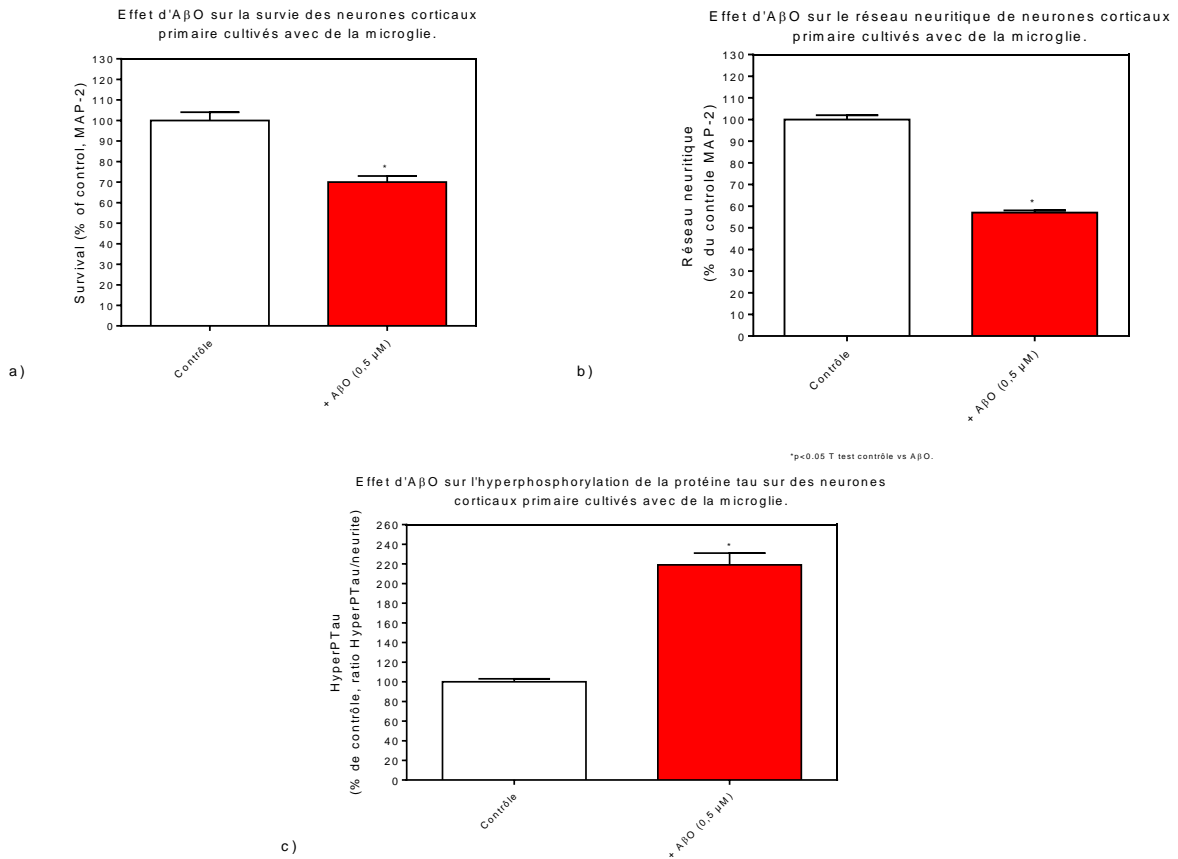


Figure 20: Effet d'AβO sur a) la survie b) le réseau neuritique c) l'hyperphosphorylation de tau des neurones corticaux cultivés en présence de microglie après une intoxication de 72 h.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement) \* p < 0.05 est considéré comme significatif \* p < 0.05 t test contrôle vs AβO.

Les AβO appliqués pendant 72 h à la concentration de 0,5 μmol/L induisent une mort neuronale importante et significative ainsi qu'une perte neuritique et une augmentation la phosphorylation de la protéine τ. Ces résultats viennent confirmer ceux que nous avons présentés dans l'article et dans des résultats complémentaires obtenus dans des conditions où les cultures contiennent peu de cellules microgliales.

4.1.4.2. Effet des A $\beta$ O sur les neurones corticaux cultivés en présence de microglie : phénomènes neuro-inflammatoires.

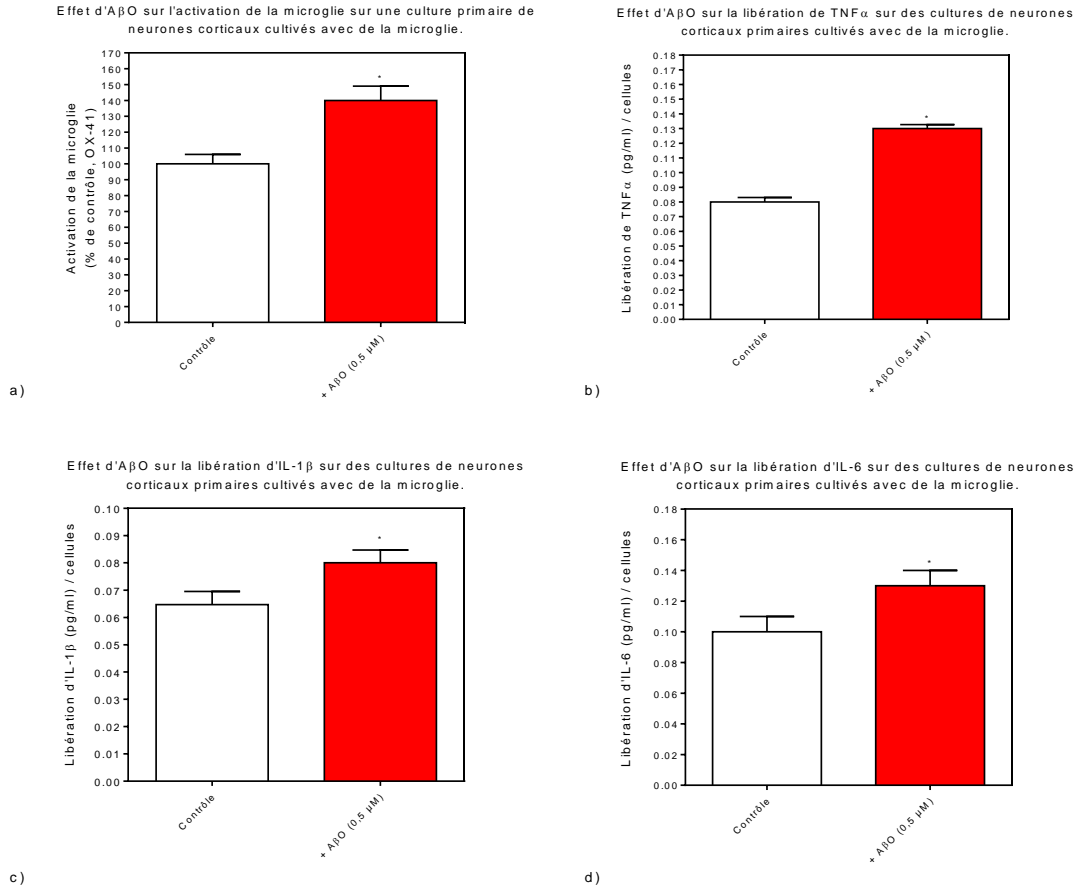


Figure 21: Effet d'A $\beta$ O sur a) l'activation de la microglie b) la libération de TNF $\alpha$  c) la libération d'IL-1 $\beta$  d) la libération d'IL-6 sur des cultures de neurones corticaux cultivés en présence de microglie après une intoxication de 72 h.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement) pour la figure a et en quantité (pg/ml) pour les autres figures. \*  $p < 0.05$  est considéré comme significatif \*  $p < 0.05$  t test contrôle vs A $\beta$ O.

La mort neuronale induite par l'application d'A $\beta$ O à 0.5  $\mu$ mol/L pendant 72 h est associée à une activation massive de la microglie ainsi qu'à une libération de plusieurs cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6) dans le milieu de culture. La présence et l'activation de la microglie est vérifiée par un Ac dirigé contre un marqueur d'activation. Bien que ces expériences ne permettent pas de conclure de l'effet des A $\beta$ O en absence de microglie, ils sont significatifs d'un phénomène qui survient sans aucun doute dans un tissu cérébral adulte. L'effet des cytokines pures sur des cultures pauvres en microglie n'a pas été étudié, faute de temps, mais il est raisonnable de supposer qu'elles jouent un rôle non négligeable dans les phénomènes neuro-inflammatoires.

## 4.2. Publication N°2: “Glutamate Protects Neuromuscular Junctions from Deleterious Effects of b-Amyloid Peptide and Conversely: an In Vitro Study in a Nerve–Muscle Coculture”

### 4.2.1. Résumé

Dans des modèles de souris Alzheimer on observe une perte substantielle du réseau neuritique associée à une mort importante des motoneurones. De plus une accumulation notable d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> dans les motoneurones spinaux et la moelle épinière de patients atteints de SLA a été observé. Les neurones moteurs sont très sensibles aux effets excitotoxiques du glutamate qui est connu pour jouer un rôle important dans la physiopathologie de la SLA et notamment dans la dégénérescence des neurones moteurs.

De plus il a été montré que les niveaux d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> sont élevés dans les moelles épinières de souris SOD1 (G93A) (modèle murin de sclérose latérale amyotrophique familiale [SLAf]) et que le peptide A $\beta$  est localisé principalement dans des motoneurones affectés. La perte de jonction neuromusculaire (JNM) et la dégénérescence des motoneurones est réduite chez les souris SOD1 quand l'APP est génétiquement enlevé, suggérant que l'APP endogène contribue activement à la physiopathologie de cette forme de SLA.

Dans l'article que nous présentons ci-après, nous étudions le lien qui est susceptible d'exister entre l'A $\beta$  et le glutamate dans l'installation et le développement du processus neurodégénératif, en utilisant le modèle de coculture nerf-muscle. À cette fin nous procédons à une étude quantitative du réseau neuritique et des jonctions neuromusculaires [JNM] dans différentes conditions expérimentales. Il apparaît que les JNM sont extrêmement sensibles à l'A $\beta$  dont la toxicité implique l'intervention du glutamate et des récepteurs du NMDA. Glutamate et A $\beta$  agissent donc de manière liée.

Dans des résultats complémentaires publiés sous forme de posters, nous étudions les mécanismes par lesquels l'A $\beta$  suscite la perte des JNM. Nous utilisons différents antagonistes

des récepteurs du glutamate qui exercent leurs effets antagonistes en précisant certains aspects sur différentes sous unités de ces récepteurs. Ces travaux confirment l'intervention des récepteurs NMDA dans la toxicité de l'A $\beta$  et la précisent.

Enfin, pour mieux comprendre les rôles respectifs des compartiments de la coculture, les effets de l'A $\beta$  et du glutamate ont été étudiés sur des cultures de cellules musculaires humaines pures et sur des cultures de motoneurones ; s'y est aussi ajouté, une étude du métabolisme du glucose et des transporteurs.

Glutamate Protects Neuromuscular Junctions from Deleterious Effects of  $\beta$ -Amyloid Peptide and Conversely: an In Vitro Study in a Nerve–Muscle Coculture. *J Neurosci Res.* 2015 Apr;93(4):633-43. doi: 10.1002/jnr.23524. Epub 2014 Dec 9.





# Glutamate Protects Neuromuscular Junctions From Deleterious Effects of $\beta$ -Amyloid Peptide and Conversely: an In Vitro Study in a Nerve–Muscle Coculture

Maud Combes, Philippe Poindron, and Noelle Callizot\*

Department of Research and Development, Neuro-Sys SAS, Gardanne, France

Murine models of Alzheimer's disease with elevated levels of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide present motor axon defects and neuronal death. A $\beta_{1-42}$  accumulation is observed in motor neurons and spinal cords of sporadic and familial cases of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Motor neurons are highly susceptible to glutamate, which has a role in ALS neuronal degeneration. The current study investigates the link between A $\beta$  and glutamate in this neurodegenerative process. Primary rat nerve and human muscle cocultures were intoxicated with glutamate or A $\beta$ . Neuromuscular junction (NMJ) mean size and neurite length were evaluated. The role of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) was investigated by using MK801. Glutamate and A $\beta$  production were evaluated in culture supernatant. The current study shows that NMJs are highly sensitive to A $\beta$  peptide, that the toxic pathway involves glutamate and NMDAR, and that glutamate and A $\beta$  act in an interlinked manner. Some motor diseases (e.g., ALS), therefore, could be considered from a new point of view related to these balance disturbances. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** amyloid- $\beta$  peptide; glutamate; NMJ; ALS; NMDAR

Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide is found in large amounts in Alzheimer's disease (AD) patient brains. Although it is deleterious at high concentrations, A $\beta$  is present at low concentrations in normal brains throughout life (Giedraitis et al., 2007). Its dual role is often evoked in the literature; A $\beta$  exerts a neurotrophic action in differentiating neurons, whereas high concentrations cause degeneration of mature neurons (Yankner et al., 1990). A $\beta$  promotes neuronal growth and survival (Bishop and Robinson, 2004; Giuffrida et al., 2010) and protects neurons against excitotoxic death (Giuffrida et al., 2009). A $\beta$  has also been implicated in neurogenesis (López-Toledano et al., 2004) and, in the picomolar range, in neuronal plasticity (Puzzo et al., 2008). Similarly, it has been shown that

mice treated with A $\beta$  antibody or an amyloid precursor protein (APP) siRNA show synaptic plasticity and memory impairments (Puzzo and Arancio, 2013). The addition of human A $\beta_{1-42}$  abolished these deficits, suggesting that physiological A $\beta$  concentrations are required. Other studies have suggested that A $\beta$  stimulates or inhibits the pre-synaptic release of excitatory neurotransmitters (i.e., aspartate and glutamate), depending on the dose (Mura et al., 2012). Depending on the concentration, A $\beta$  might exert a positive regulation on excitatory synaptic transmission (low physiological concentrations) or a negative one (high pathological concentrations).

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system; it is involved in synaptic transmission, neuronal growth and differentiation, synaptic plasticity, learning, and memory (Butterfield and Pocernich, 2003). The role of the glutamatergic system is to convert nerve impulses into a chemical stimulus by controlling the concentration of glutamate at the synapse. However, excitotoxicity occurs when the levels of synaptic glutamate are increased, resulting in increased calcium intake and neuronal injury (Sen et al., 2005). Motor neurons (MN) are particularly susceptible to high levels of glutamate (Van Den Bosch and Robberecht, 2000). MN axon defects (Malm et al., 2006) and MN death (Stephan et al., 2001) have been observed in murine models of familial AD in which elevated levels of A $\beta$  are produced. Additionally, some authors have shown that A $\beta$  levels are elevated in spinal cords of late-stage superoxide dismutase 1 (SOD1) G93A mice (model of familial amyotrophic lateral sclerosis [ALS]) and that A $\beta$  peptide(s) were localized predominantly within affected MN and surrounding glial cells. Moreover, neuromuscular junction (NMJ) loss and MN degeneration were reduced in SOD1 mice when

\*Correspondence to: N. Callizot, 410 CD 60, Parc de l'Oratoire de Bouc, 13120 Gardanne, France. E-mail: nc@neuro-sys.fr

Received 28 July 2014; Revised 14 October 2014; Accepted 21 October 2014

Published online 00 Month 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23524

APP was genetically ablated, suggesting that endogenous APP actively contributes to the pathophysiology of this form of ALS (Bryson et al., 2012). Additionally, A $\beta$  and glutamate have been physiologically found in NMJs (Van Den Bosch and Robberecht, 2000; Bryson et al., 2012). This observation raises the question of the physiological relationship between effects of A $\beta$  and glutamate in the regulation of motor functions. The current study investigates the possible link between A $\beta$  and glutamate in motor neurodegenerative processes. This study seeks to determine whether A $\beta$  influences glutamate release and interferes with A $\beta$ -mediated toxicity at the NMJ. For this purpose, we used a nerve–muscle coculture and a systemic analysis. The black box is the coculture and the input signals to the system are the different treatments applied to it and to the output, the NMJ structure, and the length of the neurite network. This study shows that glutamate and A $\beta$  act in an interlinked manner, mutually influencing their release. We hypothesized that, when this fragile equilibrium was broken (in favor of one or the other protagonists), toxic damage would occur (to NMJ and the neurite network). From these results, some motor diseases (e.g., ALS) could be considered from a new point of view related to these balance disturbances.

## MATERIALS AND METHODS

All experiments were carried out in accordance with French regulations (Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, accreditation No. A-13-013-10).

### Primary Nerve–Muscle Cocultures

Human muscle cells were purchased from Promocell (Heidelberg, Germany). Twenty-one thousand cells were plated onto 48-well plates (Greiner, Frickenhausen, Germany) coated with 1% gelatin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) solution in water (Dutscher, Brumath, France) and grown in a proliferation medium consisting of a mixture of 62% Minimum Essential Medium (MEM; Pan Biotech, Aidenbach, Germany) and 25% M199 medium (Pan Biotech) supplemented with 2 mmol/liter glutamine (Pan Biotech), 10  $\mu$ g/ml human insulin (Pan Biotech), 10 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (Life Technologies, Saint Aubin, France), 2 ng/ml basic human recombinant fibroblast growth factor (Pan Biotech), 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies), and 2% penicillin (10,000 U/ml) and streptomycin (10,000  $\mu$ g/ml; PS; Pan Biotech) solutions. The medium was changed every 2 days. Five days after the beginning of the culture and immediately after satellite cell fusion, whole transverse slices of 13-day-old Wistar rat embryo (Janvier Labs, Saint Berthevin, France) spinal cord with dorsal root ganglia (DRG) attached were placed onto the muscle cell monolayer (one explant per well in the central area; Braun et al., 1996). DRG were required to achieve a good innervation (Askanas et al., 1987). Innervated cultures were maintained in a medium (referred to as *innervation medium*) consisting of 67% MEM and 25% M199 medium supplemented with 5% FBS, 5  $\mu$ g/ml insulin, 2 mmol/liter glutamine, and 2% PS. After 24 hr of cocul-

ture, neurites were observed growing out of spinal cord explants. These neurites made contact with myotubes and induced the first contractions after  $\sim$ 8 days. Quickly thereafter, innervated muscle fibers located in proximity to the spinal cord explants were continuously contracting. Innervated fibers were morphologically and spatially distinct from the noninnervated ones and could easily be distinguished from them (Fig. 1a).

### Pharmacological Treatments

On day 33 following innervation, the cocultures were treated with glutamate (Sigma-Aldrich) diluted in culture medium to different concentrations (0.1, 0.5, 1, 10, and 30  $\mu$ mol/liter) and/or with A $\beta$  solution (see below) at 0.6, 1.25, 2.5, 5, and 10  $\mu$ mol/liter, for 4, 8, 16, and 24 hr. Untreated cultures served as controls. MK801 (Sigma-Aldrich), a non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonist, was diluted in culture medium and used at 20  $\mu$ mol/liter. All compounds were prepared immediately before use.

### Preparation of A $\beta$ Solution

A $\beta$  solution was prepared as described by Callizot et al. (2013). Briefly, A $\beta_{1-42}$  (Abcam, Cambridge, United Kingdom) was dissolved in the culture medium devoid of serum, agitated for 3 days at 37°C in the dark, and used immediately after being properly diluted in culture medium to the concentrations required. The level of oligomeric fraction (A $\beta$ O) was measured by Western blotting (WB). A mother solution of 10  $\mu$ mol/liter contained approximately 3  $\mu$ mol/liter of A $\beta$ O (average molecular weight [MW]  $\sim$ 90 kDa; see Fig. 2).

### Quantification of A $\beta$ in Coculture Supernatants

After 4, 8, 16, and 24 hr, A $\beta$  was dosed in supernatant with a sandwich ELISA kit (Biosensis, Thebarton, Australia) that allows the preferential quantification of oligomeric A $\beta$  peptides without respect to their conformations, according to the manufacturer's specifications. Briefly, plates were precoated with mouse monoclonal anti-antibody (Ab) capture Ab (MOAB-2), a biotinylated MAOB-2 detection Ab, and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin. The addition of the HRP substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) transforms it into a colored reaction product, the optical density of which is directly proportional to the concentration of A $\beta$  present in samples and protein standards.

### Quantification of Glutamate in Coculture Supernatants

After 4, 8, and 16 hr, glutamate was dosed in supernatant with an Amplex red glutamic acid assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, this kit provides an ultrasensitive method for continuously detecting glutamic acid in a fluorescence microplate reader. In the assay, L-glutamic acid is oxidized by glutamate oxidase to produce  $\alpha$ -ketoglutarate, NH<sub>3</sub>, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L-alanine and L-glutamate-pyruvate transaminase are included in the reaction to regenerate L-glutamic acid by transamination of  $\alpha$ -ketoglutarate, resulting in multiple cycles of the initial reaction and a significant amplification of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced. The hydrogen peroxide reacts with 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex red reagent) in a 1:1

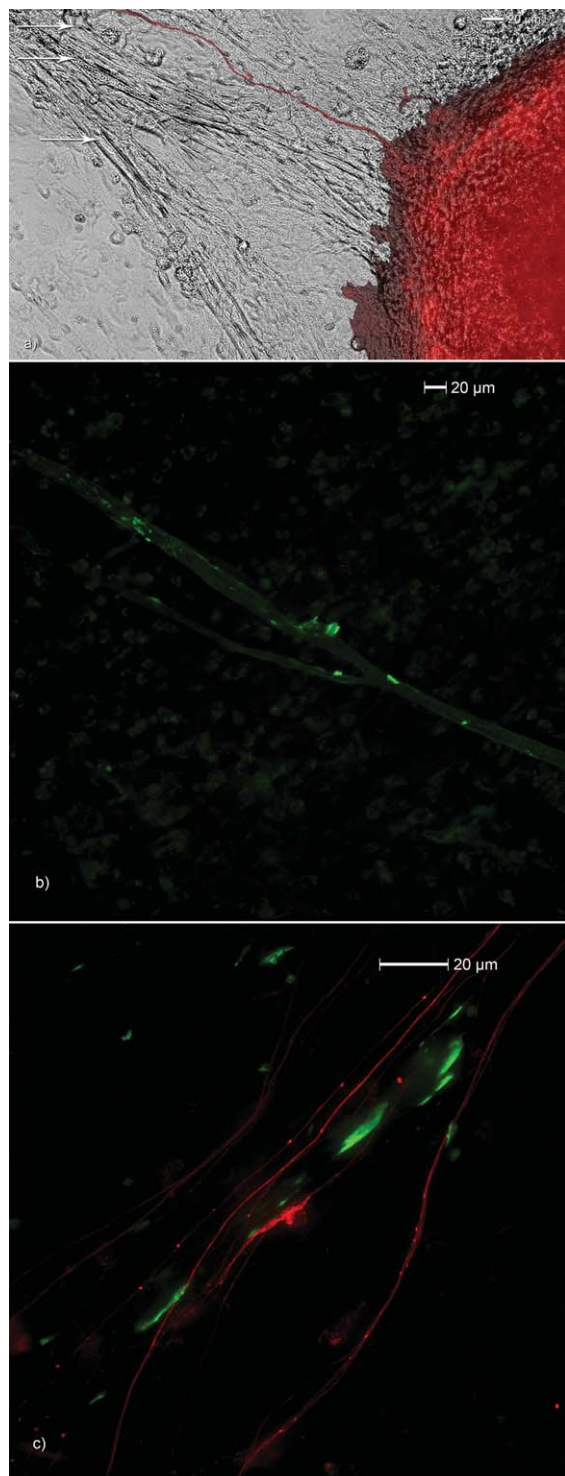


Fig. 1. **a:** Representative picture of nerve–muscle coculture in phase contrast microscopy ( $\times 20$ ) merged with the immunolabeled picture for NF (red). In red, a neurite emerging from spinal explant, innervating myotubes (arrows). **b:** Representative picture of control labeled for NMJs (green). **c:** Merged picture of control NMJs (green) and neurite (red). Cocultures were examined by double-immunofluorescence microscopy.  $\times 20$  and  $\times 40$ . Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

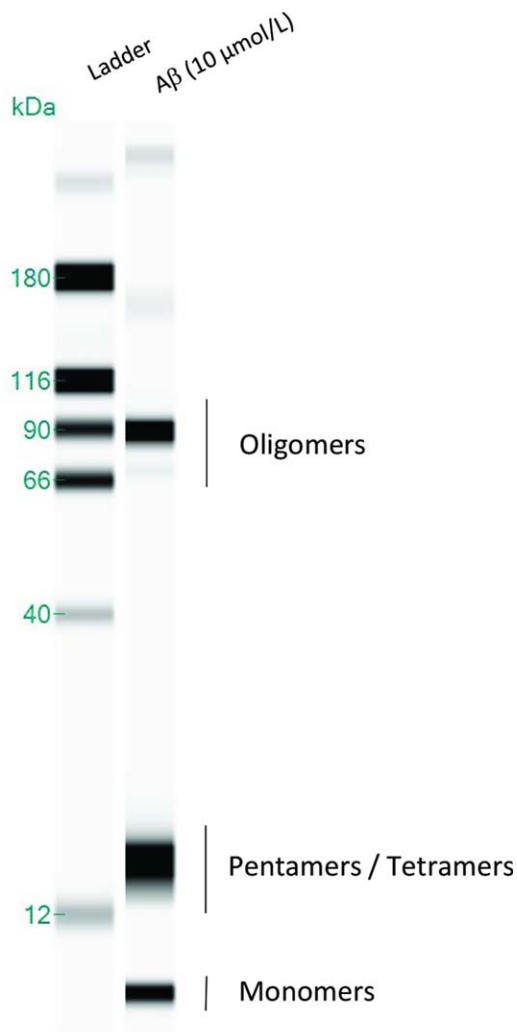


Fig. 2. WB analysis of A $\beta$  preparation, 10  $\mu\text{mol/liter}$  concentration (for details see Callizot et al., 2013) showing the different forms of peptide in the preparation probed with monoclonal mouse 6E10 antibody. Presence of oligomeric fractions (MW  $\sim 90$  kDa) and of monomers, tetramers, and pentamers ( $\sim$ MW 2–10 kDa). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

stoichiometry in the reaction catalyzed by HRP to generate the highly fluorescent (530–560 nm) product resorufin.

#### Staining of NMJs and Immunostaining of Axons

After 4, 8, 12, or 24 hr, cocultures were incubated with 500 nmol/liter  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ Bgt) coupled with Alexa 488 (Molecular Probes) for 15 min in innervation medium at 37°C to detect NMJs. After having been washed twice in phosphate-buffered saline (PBS; Pan Biotech), cells were fixed with a 4% solution of paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS, pH 7.3, for 20 min at room temperature.

Cultures were washed twice in PBS; they were then permeabilized, and nonspecific sites were blocked with a solution of PBS containing 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) and 1% FBS for 15 min at room temperature, and cocultures were incubated with a mouse monoclonal anti-200 kDa neurofilament (NF)

Ab (Sigma-Aldrich) diluted to 1:400 in PBS containing 1% FBS and 0.1% saponin for 2 hr at room temperature. Anti-NF Ab stained the axons of motor neurons. These Abs were revealed with Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (Life Technologies) diluted to 1:400 in PBS containing 1% FBS and 0.1% saponin for 1 hr at room temperature. Nuclei of neurons were labeled with Hoechst (Sigma-Aldrich), a nuclear fluorescent marker, diluted to 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in the same solution

The mean size of NMJs (evaluated as apparent area of  $\alpha\text{Bgt}$ -labeled zones) was measured to assess the quality of innervation; then, only clusters of acetylcholine receptors (AChRs) were recorded. The mean size of NMJs was assessed under the experimental conditions described above. Because there was a good correlation between evolution of size and number of NMJs, only mean size was evaluated as a significant parameter. The total length of the neurite network was also measured to verify the quality of muscle innervation.

The immunolabeled cultures were examined with ImageXpress Micro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) equipped with an LED lamp (excitation 360/480/565 nm, emission 460/535/620 nm) at  $\times 20$ . For each condition, 63 fields per well were observed (representing the total surface of the well), and six wells per condition were analyzed.

#### Simon Automated WB Analysis

All reagents were prepared and used according to the manufacturer's recommendations for use with the Simon apparatus (ProteinSimple, San Jose, CA; [www.proteinsimple.com/simon.html](http://www.proteinsimple.com/simon.html)). Reagents included biotinylated MW ladder, streptavidin-HRP, fluorescent standards, luminol-S, hydrogen peroxide, sample buffer, dithiothreitol (DTT), stacking matrix, separation matrix, running buffer, wash buffer, matrix removal buffer, capillaries containing a proprietary UV-activated chemical linked reagent, Ab diluents, and secondary Abs (goat anti-rabbit secondary antibody or goat anti-mouse secondary antibody). Six microliters of sample was diluted 3:1 by adding 2  $\mu\text{l}$  of the twofold ( $2\times$ ) concentrated master mix (containing 80 mmol/liter DTT,  $2\times$  sample buffer, and  $2\times$  fluorescent standards). The final samples were boiled for 5 min at  $95^\circ\text{C}$ , and 5  $\mu\text{l}$  of these preparations was applied to proper wells.

The Simon apparatus was prepared by adding 2 ml matrix removal buffer to trough one, 2 ml wash buffer to trough two, and 0.8 ml running buffer to trough three. Capillaries and the 384-well plate containing samples, Abs, and matrices were then placed inside the instrument. The simple Western was run with capillaries filled with separation matrix for 150 sec, with stack-

ing matrix for 12 sec, and with protein extracts for 8 sec. The samples were then separated (current, 250 V) for 40 min, immobilized to the capillary wall by using default immobilization conditions, and washed with matrix removal buffer for 140 sec to remove the separation matrix. Capillaries were then washed with wash buffer for 150 sec and blocked with Ab diluent for 15 min. Capillaries were next incubated with primary Ab (2 hr), washed, and incubated with HRP-conjugated secondary Abs for 1 hr. After removal of unbound secondary Abs, the capillaries were incubated with the luminol-S/peroxide substrate, and chemiluminescent signal was collected by using the charge-coupled device camera of the Simon apparatus for six different exposure times (30, 60, 120, 240, 480, and 960 sec). Data analysis was performed in the Simon Compass software (ProteinSimple).

#### Abs

All details concerning Abs used in this study are given in Table I.

#### Statistical Analysis

All data are expressed as a percentage of control conditions (no glutamate or no A $\beta$  set at 100%) to express the glutamate- or A $\beta$ -induced damages. All values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$  per condition for all measures). Statistical analyses were by one-way ANOVA, followed by Dunnett's test when allowed, or by two-way ANOVA.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### A $\beta$ - and Glutamate-Induced Alterations of NMJ Structure and the Neurite Network

Effect of glutamate on NMJ mean size and the neurite network of nerve-muscle cocultures. Glutamate, applied for 4, 8, 16, or 24 hr, induced a decrease in the NMJ mean size; this effect was dependent on the concentration of glutamate and the duration of application. At the lowest concentration (0.1  $\mu\text{mol}/\text{liter}$ ), no decrease was observed even for the longest time of incubation (24 hr). By contrast, the highest concentration (30  $\mu\text{mol}/\text{liter}$ ) induced progressive damages all along the time of application; after 24 hr, a reduction of 30% of the NMJ mean size was observed (Fig. 3a). The length of the neurite network implied in innervation of muscle cells was significantly reduced, depending on the duration of application (Fig. 3b). This effect was dependent on the dose, except

TABLE I. Antibodies Used in This Study

Antibody	Clone	Antibody isotypes	Dilution (use)	Provider	Catalog reference
A $\beta$	6E10	Mouse IgG1 isotype	1:500 (WB*)	Covance	SIG-39320-0500
Caspase-3		Polyclonal rabbit IgG fraction antiserum	1:25 (WB)	Cell Signaling Technologies	9662
NF- 200	N52	Mouse IgG1 isotype	1:400 (immuno <sup>†</sup> )	Sigma-Aldrich	N0142
$\alpha\text{Bgt}$ conjugated to Alexa Fluor 488			500 nmol/liter (immuno)	Molecular Probes	B13422

\*WB, use for Western blot analysis.

<sup>†</sup>Immuno, use for immunostaining analysis.

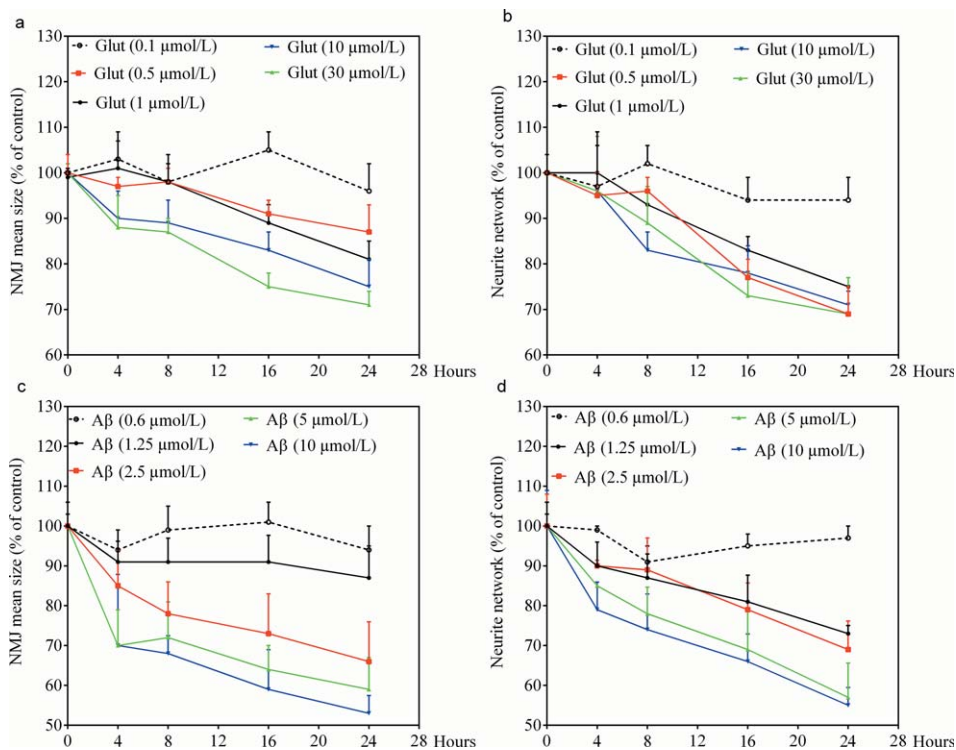


Fig. 3. Effect of different concentrations of glutamate (Glut; **a,b**) and A $\beta$  (**c,d**) applied for different times on the NMJ mean size (**a,c**) and the neurite network (**b,d**) of nerve–muscle cocultures. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

for the lowest dose, which did not modify this parameter; all the other concentrations quickly induced a significant decrease.

Effect of A $\beta$  on NMJ mean size and the neurite network of nerve–muscle cocultures. Only a minor effect was observed on the NMJ mean size when A $\beta$  was applied at 0.6 and 1.25  $\mu\text{mol/liter}$ . At the highest concentrations, the toxic effect was significant (Fig. 3c). This effect was dependent on the time of exposure to, and the concentrations of, A $\beta$ . A $\beta$  exerted its toxic effect on the neurite network at all concentrations tested (except for the lowest one; Fig. 3d).

### Protective Effects of Glutamate and A $\beta$ on NMJ Mean Size and the Neurite Network of Nerve–Muscle Cocultures

Protective effect of glutamate on NMJ mean size and the neurite network of nerve–muscle cocultures injured by A $\beta$ . Glutamate (0.1 and 0.5  $\mu\text{mol/liter}$ ) exerted a protective effect against the deleterious effects of A $\beta$  (2.5, 5, and 10  $\mu\text{mol/liter}$ ), as seen from measurement of NMJ mean size (Fig. 4a,c,e). This protective effect reached significance after 4 hr of exposure to A $\beta$  (5 and 10  $\mu\text{mol/liter}$ ) for the highest concentration of glutamate (0.5  $\mu\text{mol/liter}$ ). Treatment with glutamate at 0.1  $\mu\text{mol/liter}$  resulted in significant protection against deleterious effects of A $\beta$ . This effect was observed after 16 hr (5

$\mu\text{mol/liter}$  A $\beta$  concentration) and after 8 hr on damage induced by the highest dose of peptide (10  $\mu\text{mol/liter}$ ). It should be emphasized that, in the current study, glutamate was used at nontoxic concentrations. Cotreatment of cocultures with glutamate and A $\beta$  (all concentrations) never induced any increase in injury. Similar effects were observed on the length of the neurite network innervating the muscle cells (Fig. 4b,d,f).

Protective effect of A $\beta$  on NMJ mean size and the neurite network of nerve–muscle cocultures injured by glutamate. A $\beta$  (0.6 and 1.25  $\mu\text{mol/liter}$ ) protected the coculture against the deleterious effects of glutamate as assessed by measurement of NMJ mean size when exposed to 10 and 30  $\mu\text{mol/liter}$  glutamate (Fig. 5a,c); this effect reached significance at 30  $\mu\text{mol/liter}$  glutamate. A $\beta$  concentrations used to protect NMJs from glutamate did not modify NMJ mean size (0.6 and 1.25  $\mu\text{mol/liter}$ ) when used alone, whereas 1.25  $\mu\text{mol/liter}$  of A $\beta$  induced a significant decrease of the neurite network (between 8 and 24 hr of peptide; Fig. 3c,d). A protective effect on the neurite network against glutamate toxicity was observed after treatment with A $\beta$ . This effect became significant after 16 and 24 hr exposure at the lowest dose of peptide tested (0.6  $\mu\text{mol/liter}$ ) in the presence of 10  $\mu\text{mol/liter}$  glutamate. After the strong injury induced by 30  $\mu\text{mol/liter}$  glutamate, 1.25  $\mu\text{mol/liter}$  A $\beta$  induced a significant protective effect (Fig. 5c,d).

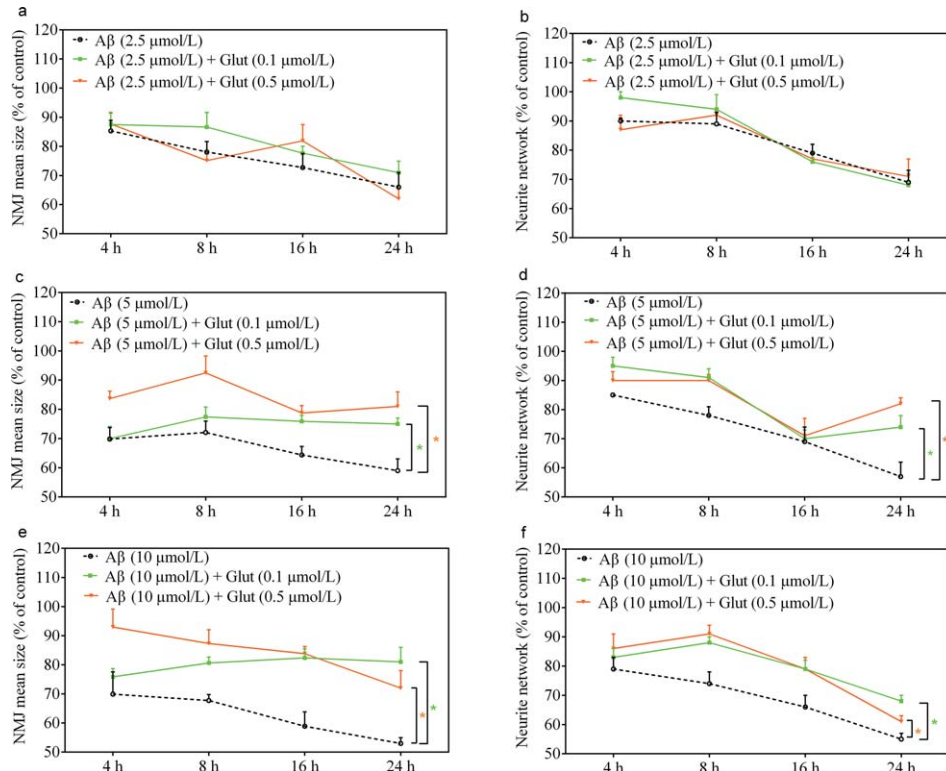


Fig. 4. Protective effect of glutamate (Glut; 0.1 and 0.5  $\mu\text{mol/liter}$ ) against  $\text{A}\beta$ -induced injury at the concentration of 2.5  $\mu\text{mol/liter}$  on NMJ mean size (a) and the neurite network (b), of 5  $\mu\text{mol/liter}$  on NMJ mean size (c) and the neurite network (d), and of 10  $\mu\text{mol/liter}$  on NMJ mean size (e) and the neurite network (f). \* $P < 0.05$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

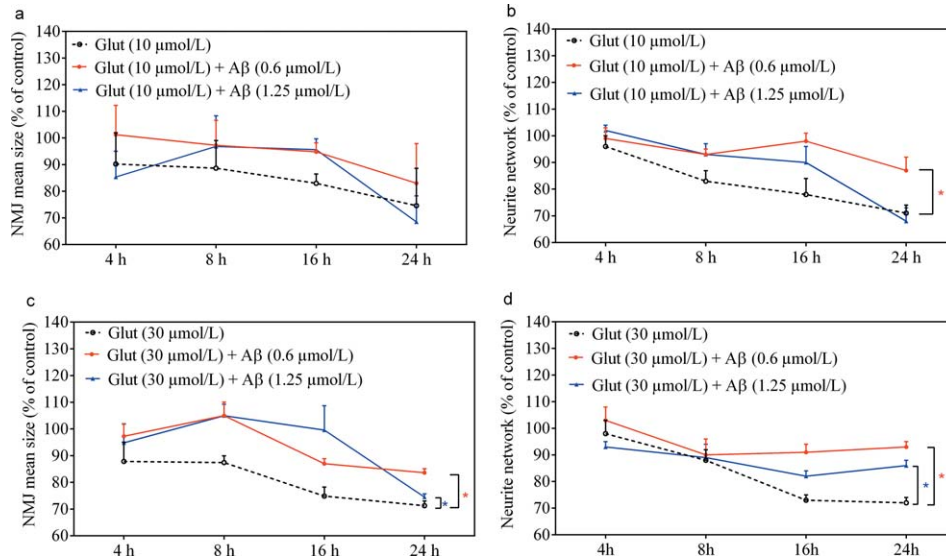


Fig. 5. Protective effect of  $\text{A}\beta$  (0.6 and 1.25  $\mu\text{mol/liter}$ ) against glutamate (Glut)-induced injuries at the concentration of 10  $\mu\text{mol/liter}$  on NMJ mean size (a) and the neurite network (b) and of 30  $\mu\text{mol/liter}$  on NMJ mean size (c) and the neurite network (d). \* $P < 0.05$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

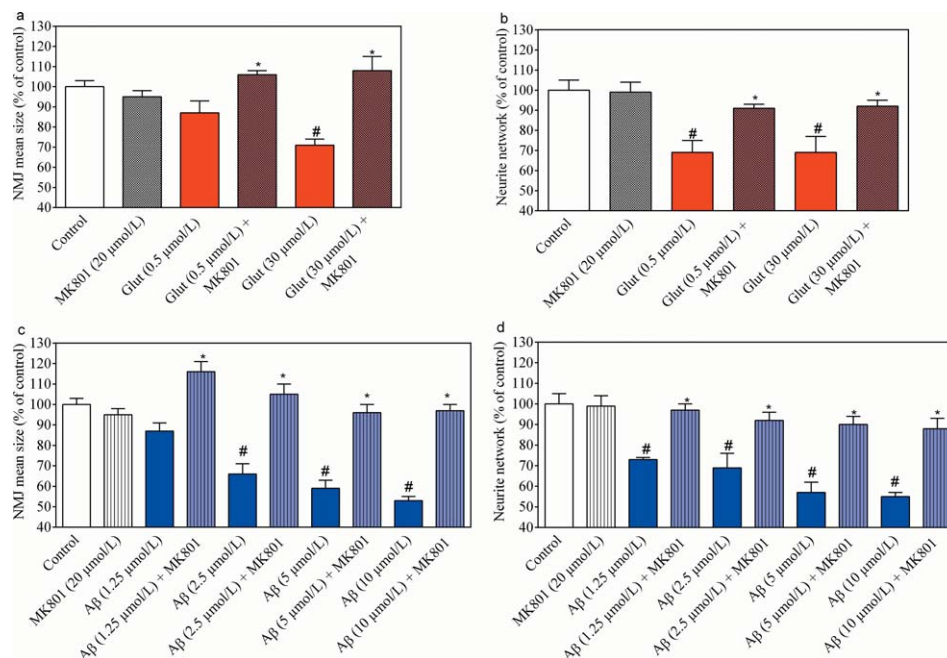


Fig. 6. Protective effect of MK801 (20  $\mu$ mol/liter) against glutamate (Glut)-induced injuries (0.5 and 30  $\mu$ mol/liter; **a,b**) and A $\beta$ -induced injuries (1.25, 2.5, 5, and 10  $\mu$ mol/liter; **c,d**) on NMJ mean size (**a,c**) and the neurite network (**b,d**) after a 24 hr application. \* $P < 0.05$  vs. glutamate or A $\beta$  condition; # $P < 0.05$  control vs. glutamate or A $\beta$  conditions. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

Protective effect of MK801 (NMDAR antagonist) on NMJ mean size and the neurite network of nerve-muscle cocultures injured by glutamate or A $\beta$ . MK801, a noncompetitive antagonist of NMDAR (used at 20  $\mu$ mol/liter), fully protected NMJs from glutamate (0.5 and 30  $\mu$ mol/liter) in agreement with Gerardo-Nava et al. (2013; Fig. 6a). The same results were observed for the neurite network (Fig. 6b). The integrity of the cocultures exposed to glutamate was preserved in the presence of MK801. The same observation concerning the protective effect of this drug was made after A $\beta$  treatment (all concentrations tested; Fig. 6c,d).

Diffusible glutamate production after A $\beta$  application and A $\beta$  production after glutamate application to nerve-muscle cocultures. After 16 hr of A $\beta$  treatment, a large glutamate concentration was detected in the supernatant of the nerve-muscle cocultures (Fig. 7a). This production was significant for all concentrations of peptide tested except for the lowest one (1.25  $\mu$ mol/liter). The glutamate production was observed after a 16 hr exposure to A $\beta$ . A $\beta$  was detected in significant amounts in the supernatant of nerve-muscle cocultures treated with glutamate at 30  $\mu$ mol/liter (Fig. 7b,c). This effect was observed soon after glutamate application and was present up to 16 hr.

Caspase-3 evaluation. An increase in caspase-3 level was observed after an 8-hr glutamate (30  $\mu$ mol/liter) treatment and corresponded to apoptotic cellular death. A slight increase of caspase-3 was observed after application

of 1.25  $\mu$ mol/liter A $\beta$ ; this observation is in line with data on the A $\beta$ -induced apoptotic pathway (Kawahara, 2010). Cotreatment with glutamate and A $\beta$  (1.25  $\mu$ mol/liter) dramatically decreased the caspase-3 level in the coculture, which indicated apoptosis abolition (Fig. 8).

## DISCUSSION

This study shows that A $\beta$  was able to injure the NMJs in a model of rat nerve-human muscle coculture. The toxic role of the peptide (through its oligomeric fraction) on cortical and hippocampal neurons (involved in AD) is well known (Callizot et al., 2013); its role on motor neurons is less well described. Some neuromuscular dysfunctions triggered by A $\beta$  oligomers have been shown in a *C. elegans* model of inclusion of body myositis (Rebolledo et al., 2001). In mammals only, motor neuron axon defects (Wirhth et al., 2007) and death in the spinal cord (Seo et al., 2010) have recently been observed in murine models of AD that produce elevated levels of A $\beta$ . In contrast, it has been known for years that APP is required for differentiation of skeletal muscle and formation and maturation of NMJs (Akaaboune et al., 2000; Caldwell et al., 2013). Additionally, mice deficient in APP and APP-like protein 2 exhibit aberrant apposition of presynaptic marker proteins with postsynaptic AChRs and excessive nerve terminal sprouting (Wang et al., 2005); the double KO mice die soon after birth (Von Koch et al., 1997).

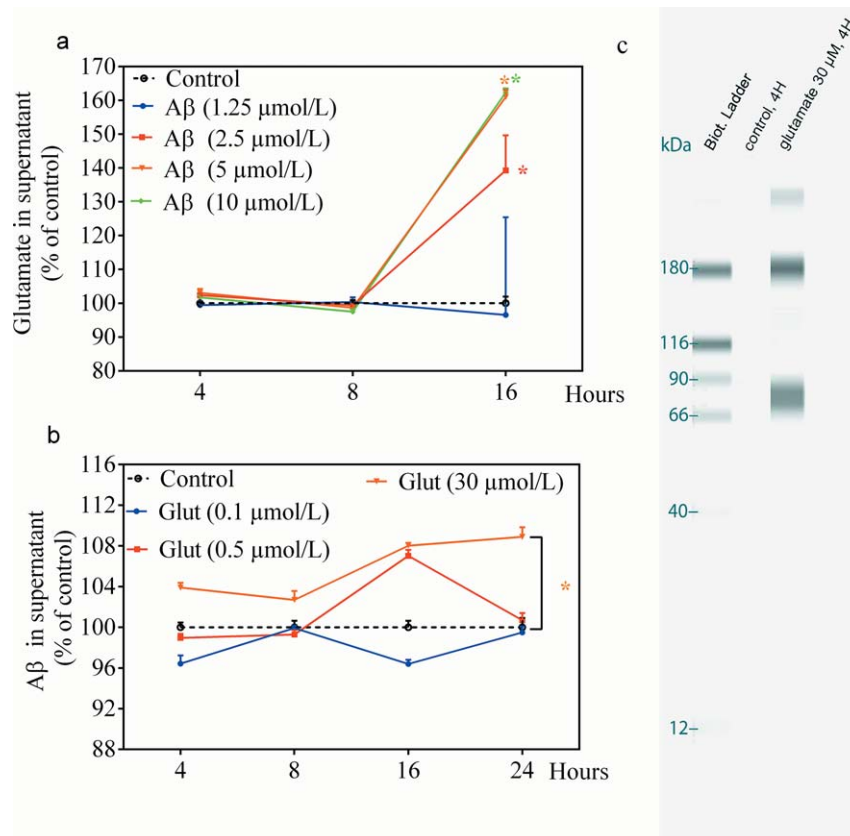


Fig. 7. Glutamate (Glut) production after A $\beta$  application (different concentrations) in coculture supernatant (a), A $\beta$  production after glutamate application (different concentrations) with ELISA kit (after 4, 8, 16, and 24 hr; b), and WB analysis (after 4 hr) coculture supernatant (c). \* $P < 0.05$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

Bryson et al. (2012) demonstrated that APP plays a detrimental role in disease progression in the SOD1 G93A mouse model of ALS. Previous studies showed some intracellular A $\beta_{1-42}$  accumulation in motor neurons and spinal cord of both sporadic and familial ALS cases (Calingasan et al., 2005). Additionally Koistinen et al. (2006) detected elevated levels of APP in muscle of ALS patients as well as in a mouse model of the disease. These findings strongly suggest that APP and A $\beta$  might contribute to pathology in humans, irrespective of the initial trigger.

The current study shows a direct toxic effect of A $\beta_{1-42}$  on NMJs and on the neurite network, sprouting from spinal cord explant and innervating the muscle cells. This effect is dependent on the dose and the exposure time and seems to involve glutamate. Indeed, in this study, glutamate was detected in the coculture supernatant (16 hr after application), and cotreatment with MK801 fully abolished the toxic effect of A $\beta$ . In agreement with these results, it has been shown that, on cortical neurons, A $\beta$  toxic events could be mediated, at least in part, by excessive activation of extrasynaptic or perisynaptic NMDARs (eNMDARs) containing predominantly NR2B subunits (Palop and Mucke, 2010; Li et al., 2011).

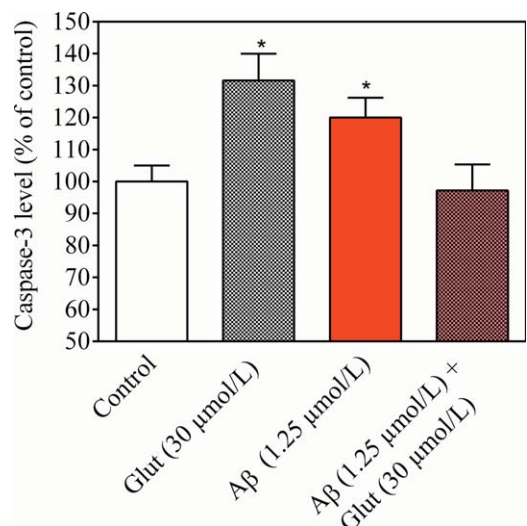


Fig. 8. Quantification of caspase-3 in total cell lysate after 8 hr of glutamate (Glut; 30 μmol/liter), A $\beta$  (1.25 μmol/liter), and glutamate (Glut; 30 μmol/liter) + A $\beta$  (1.25 μmol/liter) incubation. \* $P < 0.05$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]



Recently, Talantova et al. (2013) showed that eNMDAR activation is triggered by extrasynaptic glutamate released from astrocytes in response to A $\beta$ . eNMDAR stimulation is rapidly followed by a decrease in excitatory postsynaptic current frequency with accompanying generation of nitric oxide, hyperphosphorylation of tau protein, and activation of caspase-3. They found that pharmacological blockade of NMDAR abrogated the injuries. The current study proves the involvement of NMDAR and glutamate in the toxic role of A $\beta$ , suggesting that a similar pathway of toxicity exists in the brain and in the NMJ. In agreement with previous studies (Callizot et al., 2013; Talantova et al., 2013), the current study shows an increase in caspase-3 levels in cocultures treated with A $\beta$ , illustrating intervention of the apoptotic pathway in cell death. In parallel to A $\beta$  injuries, the effect of MK801 on glutamate injuries on the NMJ structure was assessed. The massive toxic effect of glutamate on NMJs and the neuritic network was fully abolished by MK801 application, as described by Gerardo-Nava et al. (2013). A release of A $\beta$  was observed in the coculture supernatant after glutamate application. This effect was dose and time dependent. In parallel to the ELISA dosage, we performed WB on the supernatant to confirm the presence of A $\beta$ . The WB analysis showed the presence of oligomeric forms of the peptide (mean MW  $\sim$ 90 kDa). Larger forms were present as well, but no monomers were detected, possibly because of the lack of sensitivity of the method. It has been proved that subtoxic activation of cerebral NMDAR enhances neuronal A $\beta$  production and induces a prolonged activation of eNMDAR (Bordji et al., 2010). Additionally, recent studies have shown that Ca<sup>2+</sup> stimulates the formation of A $\beta$ O (Itkin et al., 2011). Lundgren et al. (2014) proved that A $\beta$  can be produced in synaptic vesicles and could be rapidly released. Danysz and Parsons (2012) hypothesized that prolonged Ca<sup>2+</sup> influx via pathological activation of NMDAR could promote intracellular generation of toxic A $\beta$ O. In the current study, production of A $\beta$  was observed at a toxic concentration of glutamate (30  $\mu$ mol/liter) soon after application (4 hr); at this time, glutamate did not show any toxicity or induced visible neuronal damage (on the neurite network or NMJs). These data suggest that A $\beta$  plays an important role in the neurotoxic action of glutamate in the cocultures.

Glutamate has also been shown to induce production of A $\beta$ , which in turn is able to induce production of glutamate. The current study shows that the toxic effects of each of these two molecules involved the other. An interconnection between the two molecules is probable in nerve-muscle cocultures, as has been described for the brain (Danysz and Parsons, 2012).

Given these observations, we decided to study the role of each protagonist for its individual effects. In a result that was quite unexpected, A $\beta$  solution (containing some oligomeric and monomeric entities) was able to protect NMJs and the neurite network from glutamate damage. The more severe the glutamate injury, the more significant was the protective effect of A $\beta$ . A $\beta$  was more

efficient at a low concentration (0.6 mol/liter). This protective action of A $\beta$  has been mentioned in the literature. Some authors have shown that A $\beta$  monomers protect cortical neurons against excitotoxic death by activating phosphoinositide 3-kinase, one of the major neuronal survival pathways (Giuffrida et al., 2009, 2010). The fact cannot be excluded that only monomers, present in our preparation, are responsible for this protective effect that involves a lesser activation of the apoptosis cascade in the coculture (as shown by the abolition of caspase-3 increase observed after glutamate application). A $\beta$  is known to induce caspase-3 activation in neurons (Koistinen et al., 2006; Callizot et al., 2013). When applied to coculture, A $\beta$  (1.25  $\mu$ mol/liter) induced a small increase of caspase-3 (in line with what is already known); by contrast, when applied with glutamate, no caspase-3 production was detected. The protective pathway could involve the activation of insulin growth factor (IGF)-1/insulin receptors either by local production of IGF-1 or by direct activation of IGF-1/insulin receptor (Giuffrida et al., 2009). Soluble A $\beta$  binds to insulin receptor, altering its autophosphorylation; then, it interferes with receptor functions in hippocampal neurons, preventing rapid activation of specific kinases involved in the long-term potentiation (Townsend et al., 2007). Additionally, IGF-1 activation induces a decrease of apoptosis and caspase-3 activation (Park et al., 2014). This could explain our results.

When glutamate was applied with A $\beta$  (5 or 10  $\mu$ mol/liter), a decrease or even abolition of damages was observed. This effect was seen early (4 hr) and was dependent on the dose of glutamate used. The protective effect of glutamate (0.1 and 0.5  $\mu$ mol/liter) did appear when concentrations of A $\beta$  were equal to or greater than 5  $\mu$ mol/liter. The more severe the peptide injury, the more significant was the protective effect of glutamate. However, with higher concentrations of glutamate (1, 10, and 30  $\mu$ mol/liter), this protective effect disappeared, and an even greater toxicity of A $\beta$  was observed (data not shown). This confirms the delicate balance between interlinked A $\beta$  and glutamate effects. At low concentrations of A $\beta$  (less than or equal to 2.5  $\mu$ mol/liter), glutamate (0.1 and 0.5  $\mu$ mol/liter) did not protect NMJs against A $\beta$ -induced lesions. The protective effect of glutamate (or NMDA) has already been demonstrated (Zhou and Sheng, 2013). There are many different ways in which NMDAR-dependent Ca<sup>2+</sup> influx can convey the signal downstream, either to confer neuroprotection or to trigger programs of cell death. The magnitude of NMDAR activation (intensity and/or duration) seems to be important in determining the nature of the response. The classic bell-shaped-curve model of neuronal response to NMDA or glutamate indicates that intermediate modest/physiological NMDAR activity levels can promote neuroprotection, whereas too little or too much NMDAR activity promotes cell death (for review see Hardingham and Bading, 2010). Location of the NMDAR (extrasynaptic or synaptic) may also profoundly affect the neuronal response (Hardingham, 2009). Finally, the subunit composition of NMDAR could explain the

different effect of glutamate; receptors containing NR2B subunits would be involved in excitotoxicity and cell death, whereas receptors containing NR2A subunits would promote survival (Zhou and Sheng, 2013). In light of this information, one might suppose that A $\beta$  acts through the toxic NMDA pathway and glutamate (at a suitable concentration) acts through the survival pathway, resulting in the absence of NMJ or network defects. Further investigations are ongoing in our laboratory to understand this protective effect better, especially to identify the target cells because NMDARs are localized on neurons and on postsynaptic parts of NMJs (Mays et al., 2009; Malomouzh et al., 2011).

In conclusion, the current study shows 1) that NMJs are highly sensitive to A $\beta$  peptide and that the toxic pathway involves glutamate and NMDAR and 2) that glutamate induces A $\beta$  production, possibly involved in glutamate toxicity. Moreover, the interconnection between glutamate and A $\beta$  peptide, as already demonstrated with cortical and hippocampal neurons, is also operating in nerve–muscle cocultures. These results suggest that targeting A $\beta$  may be helpful in the design of new treatments of ALS.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Mrs. Aurélie Fontaine for her technical assistance.

## REFERENCES

- Akaaboune M, Allinquant B, Farza H, Roy K, Magoul R, Fiszman M, Festoff BW, Hantai D. 2000. Developmental regulation of amyloid precursor protein at the neuromuscular junction in mouse skeletal muscle. *Mol Cell Neurosci* 15:355–367.
- Askanas V, Kwan H, Alvarez RB, Engel WK, Kobayashi T, Martinuzzi A, Hawkins EF. 1987. De novo neuromuscular junction formation on human muscle fibres cultured in monolayer and innervated by foetal rat spinal cord: ultrastructural and ultrastructural–cytochemical studies. *J Neurocytol* 16:523–537.
- Bishop GM, Robinson SR. 2004. Physiological roles of amyloid-beta and implications for its removal in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* 21:621–630.
- Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A. 2010. Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- $\beta$  production. *J Neurosci* 24:15927–15942.
- Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P. 1996. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord–human muscle cocultures. *J Neurol Sci* 136:17–23.
- Bryson JB, Hobbs C, Parsons MJ, Bosch KD, Pandraud A, Walsh FS, Doherty P, Greensmith L. 2012. Amyloid precursor protein (APP) contributes to pathology in the SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 21:3871–3882.
- Butterfield DA, Pocernich CB. 2003. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 17:641–652.
- Caldwell JH, Klevanski M, Saar M, Müller UC. 2013. Roles of the amyloid precursor protein family in the peripheral nervous system. *Mech Dev* 130:433–446.
- Calingasan, NY, Chen J, Kiaei M, Beal MF. 2005. Beta-amyloid 42 accumulation in the lumbar spinal cord motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Dis* 19:340–347.
- Callizot N, Combes M, Steinschneider R, Poindron P. 2013. Operational dissection of  $\beta$ -amyloid cytopathic effects on cultured neurons. *J Neurosci Res* 91:706–716.
- Danysz W, Parsons CG. 2012. Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors, and memantine: searching for the connections. *Br J Pharmacol* 167:324–352.
- Gerardo-Nava J, Mayorenko II, Grehl T, Steinbusch HW, Weis J, Brook GA. 2013. Differential pattern of neuroprotection in lumbar, cervical, and thoracic spinal cord segments in an organotypic rat model of glutamate-induced excitotoxicity. *J Chem Neuroanat* 53:11–17.
- Giedraitis V, Sundelöf J, Irizarry MC, Gärevik N, Hyman BT, Wahlund LO, Ingelsson M, Lannfelt L. 2007. The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 427:127–131.
- Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, Molinaro G, Pappalardo G, Messina A, Palmigiano A, Garozzo D, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A. 2009. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci* 29:10582–10587.
- Giuffrida ML, Caraci F, De Bona P, Pappalardo G, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A. 2010. The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology. *Rev Neurosci* 21:83–93.
- Hardingham GE. 2009. Decoupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* 37:1147–1160.
- Hardingham GE, Bading H. 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11:682–696.
- Itkin A, Dupres V, Dufrene YF, Bechinger B, Ruyschaert JM, Raussens V. 2011. Calcium ions promote formation of amyloid  $\beta$ -peptide (1–40) oligomers causally implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease. *PLoS One* 28:e18250.
- Kawahara M. 2010. Neurotoxicity of  $\beta$ -amyloid protein: oligomerization, channel formation, and calcium dyshomeostasis. *Curr Pharm Des* 16:2779–2789.
- Koistinen H, Prinjha R, Soden P, Harper A, Banner SJ, Pradat PF, Loeffler JP, Dingwall C. 2006. Elevated levels of amyloid precursor protein in muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis and a mouse model of the disease. *Muscle Nerve* 34:444–450.
- Li S, Jin M, Koeglspberger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. 2011. Soluble A $\beta$  oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 31:6627–6638.
- López-Toledano MA, Shelanski ML. 2004. Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J Neurosci* 24:5439–5444.
- Lundgren JL, Ahmed S, Winblad B, Gouras GK, Tjernberg LO, Frykman S. 2014. Activity-independent release of the amyloid  $\beta$ -peptide from rat brain nerve terminals. *Neurosci Lett* 30:125–130.
- Malm T, Ort M, Tähtivaara L, Jukarainen N, Goldsteins G, Puoliväli J, Nurmi A, Pussinen R, Ahtoniemi T, Miettinen TK, Kanninen K, Leskinen S, Vartiainen N, Yrjänheikki J, Laatikainen R, Harris-White ME, Koistinaho M, Frautschy SA, Bures J, Koistinaho J. 2006. Beta-amyloid infusion results in delayed and age-dependent learning deficits without role of inflammation or beta-amyloid deposits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8852–8857.
- Malomouzh AI, Nurullin LF, Arkhipova SS, Nikolsky EE. 2011. NMDA receptors at the endplate of rat skeletal muscles: precise postsynaptic localization. *Muscle Nerve* 44:987–989.
- Mays TA, Sanford JL, Hanada T, Chishti AH, Rafael-Fortney JA. 2009. Glutamate receptors localize postsynaptically at neuromuscular junctions in mice. *Muscle Nerve* 39:343–349.
- Mura E, Zappettini S, Preda S, Biundo F, Lanni C, Grilli M, Cavallero A, Olivero G, Salamone A, Govoni S, Marchi M. 2012. Dual effect of beta-amyloid on  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors controlling the

- release of glutamate, aspartate, and GABA in rat hippocampus. *PLoS One* 7:e29661.
- Palop JJ, Mucke L. 2010. Amyloid- $\beta$ -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 13:812–818.
- Park S, Nozaki K, Smith JA, Krause JS, Banik NL. 2014. Cross-talk between IGF-1 and estrogen receptors attenuates intracellular changes in ventral spinal cord motoneuron cells because of interferon- $\gamma$  exposure. *J Neurochem* 128:904–918.
- Puzzo D, Arancio O. 2013. Amyloid- $\beta$  peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimers Dis* 33:S111–S120.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszevski A, Palmeri A, Arancio O. 2008. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 28:14537–14545.
- Rebolledo DL, Aldunate R, Kohn R, Neira I, Minniti AN, Inestrosa NC. 2011. Copper reduces A $\beta$  oligomeric species and ameliorates neuromuscular synaptic defects in a *C. elegans* model of inclusion body myositis. *J Neurosci* 31:10149–10158.
- Sen I, Nalini A, Joshi NB, Joshi PG. 2005. Cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients preferentially elevates intracellular calcium and toxicity in motor neurons via AMPA/kainate receptor. *J Neurol Sci* 235:45–54.
- Seo JS, Leem YH, Lee KW, Kim SW, Lee JK, Han PL. 2010. Severe motor neuron degeneration in the spinal cord of the Tg2576 mouse model of Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 21:263–276.
- Stephan A, Laroche S, Davis S. 2001. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci* 21:5703–5714.
- Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S, Dziewczapolski G, Nakamura T, Cao G, Pratt AE, Kang YJ, Tu S, Molokanova E, McKercher SR, Hires SA, Sason H, Stouffer DG, Buczynski MW, Solomon JP, Michael S, Powers ET, Kelly JW, Roberts A, Tong G, Fang-Newmeyer T, Parker J, Holland EA, Zhang D, Nakanishi N, Chen HS, Wolosker H, Wang Y, Parsons LH, Ambasadhan R, Masliah E, Heinemann SF, Piña-Crespo JC, Lipton SA. 2013. A $\beta$  induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E2518–E2527.
- Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ. 2007. Soluble A beta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 282:33305–33312.
- Van Den Bosch L, Robberecht W. 2000. Different receptors mediate motor neuron death induced by short and long exposures to excitotoxicity. *Brain Res Bull* 53:383–388.
- Von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, Van der Ploeg LH, Price DL, Sisodia SS. 1997. Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* 18:661–669.
- Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong YD, Zhao NM, Dominguez B, Lee KF, Gan WB, Zheng H. 2005. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2. *J Neurosci* 25:1219–1225.
- Wirths O, Weis J, Kayed R, Saido TC, Bayer TA. 2007. Age-dependent axonal degeneration in an Alzheimer mouse model. *Neurobiol Aging* 28:1689–1699.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279–282.
- Zhou Q, Sheng M. 2013. NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology* 74:69–75.

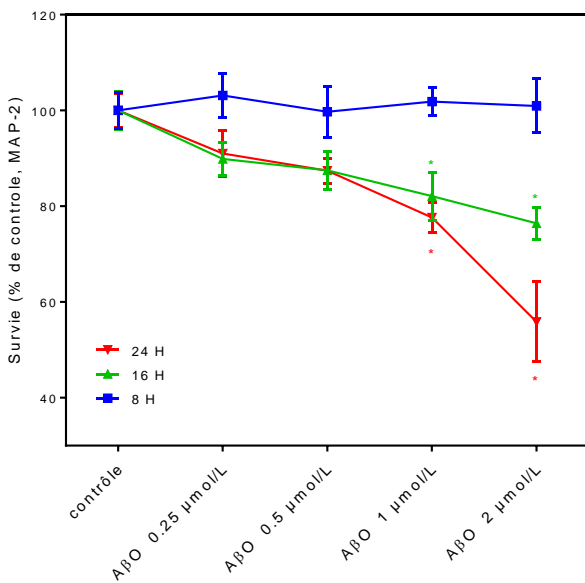


#### 4.2.2. Résultats complémentaires

Ces résultats complémentaires portent sur les effets de l'Aβ et du glutamate sur les deux principaux compartiments (motoneurones, cellules musculaires humaines), de la coculture nerf muscle.

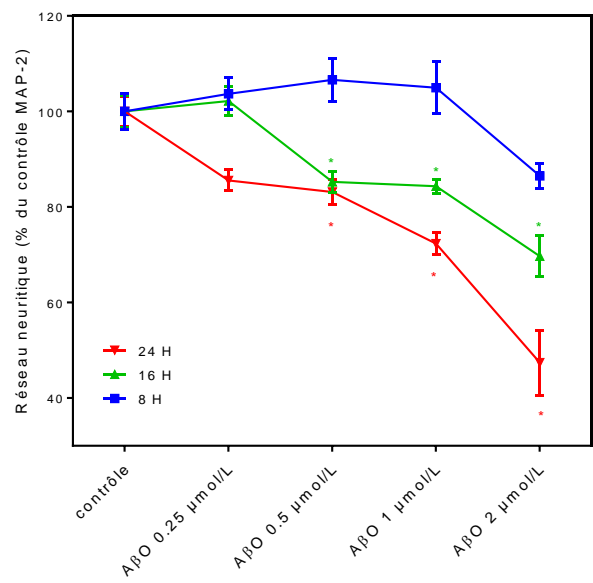
##### 4.2.2.1. Effet d'AβO sur une culture primaire de motoneurones

Effet d'AβO appliqué à différentes concentrations et différents temps sur la survie d'une culture primaire de motoneurones



a)

Effet d'AβO appliqué à différentes concentrations et différents temps sur le réseau neuritique d'une culture primaire de motoneurones



b)

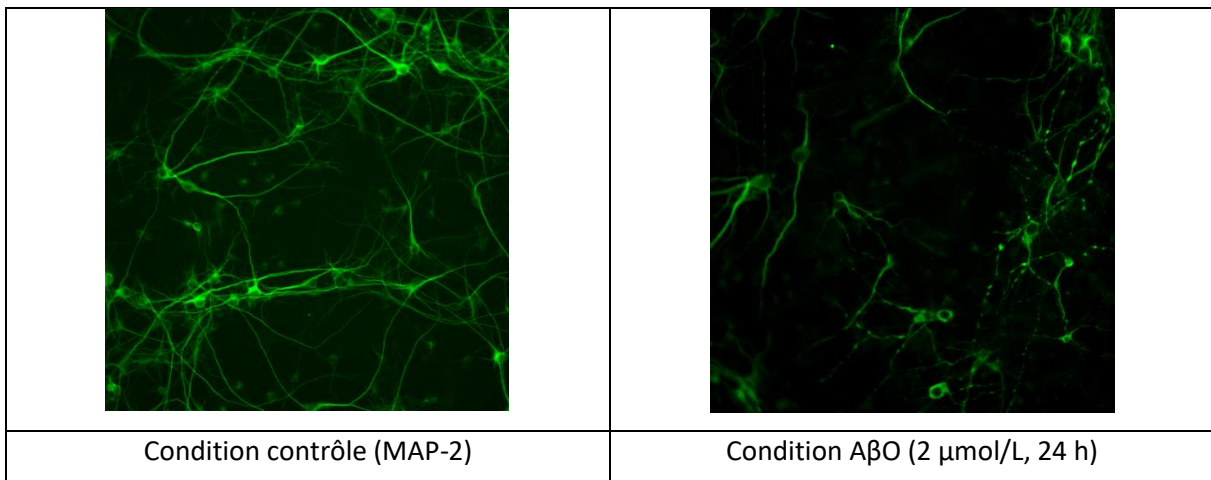


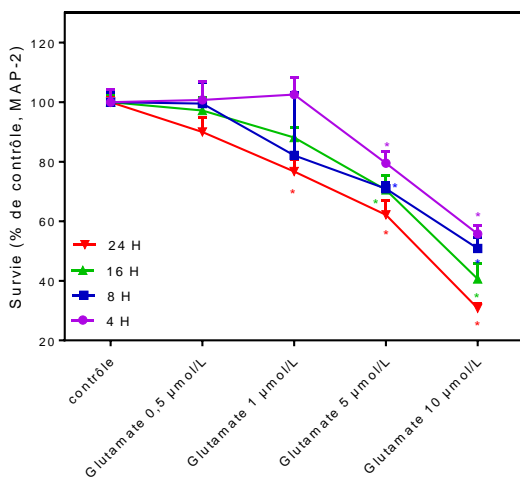
Figure 22: Effet d'AβO sur a) la survie b) le réseau neuritique sur des cultures de motoneurones.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement). \* p < 0.05 est considéré comme significatif \* p < 0.05 vs groupe contrôle One way ANOVA suivi d'un test Dunnett.

Les A $\beta$ O induisent une mort neuronale dépendante de la dose et du temps. Les A $\beta$ O (jusqu'à 2  $\mu$ mol/L) incubés pendant 8 h n'induisent aucun effet létal significatif mais provoquent une légère diminution de la longueur du réseau neuritique. A partir de 16 h d'application on observe une importante toxicité qui se manifeste par une désorganisation du réseau neuritique, une diminution de sa longueur et une mort neuronale importante.

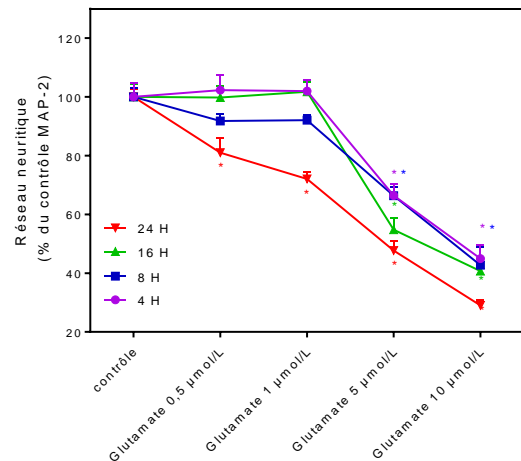
#### 4.2.2.2. Effet du glutamate sur une culture primaire de motoneurones

Effet du glutamate appliqué à différentes concentrations et différents temps sur la survie d'une culture primaire de motoneurones



a)

Effet du glutamate appliqué à différentes concentrations et différents temps sur le réseau neuritique d'une culture primaire de motoneurones



b)

Figure 23: Effet du glutamate sur a) la survie b) le réseau neuritique sur des cultures de motoneurones.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement). \*  $p < 0.05$  est considéré comme significatif \*  $p < 0.05$  vs groupe contrôle One way ANOVA suivi d'un test Dunnett.

L'application du glutamate provoque une mort neuronale importante qui dépend du temps et de la dose. Les effets toxiques du glutamate sont observés après des temps d'incubation courts (4 h).

4.2.2.3. Effet des A $\beta$ O sur la concentration de glutamate extracellulaire en culture primaire de motoneurones.

Effet d'A $\beta$ O sur le concentration de glutamate extracellulaire d'une culture primaire de motoneurones après différents temps d'application.

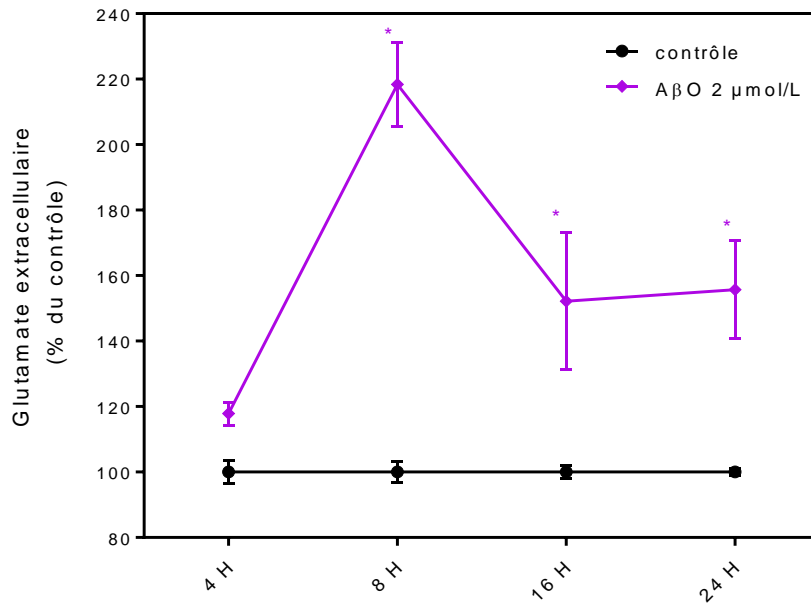


Figure 24: Effet d'A $\beta$ O sur la concentration de glutamate extracellulaire d'une culture primaire de motoneurones.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement). \*  $p < 0.05$  est considéré comme significatif \*  $p < 0.05$  vs groupe contrôle One way ANOVA suivi d'un test Dunnett.

Après 8 h d'application d'A $\beta$ O à 2  $\mu$ mol/L une augmentation massive de la concentration de glutamate extracellulaire est observée dans le surnageant de culture des motoneurones. Cette augmentation intervient donc relativement rapidement après l'application du peptide.

4.2.2.4. Effet de différents antagonistes sur une intoxication par les A $\beta$ O d'une culture primaire de motoneurones.

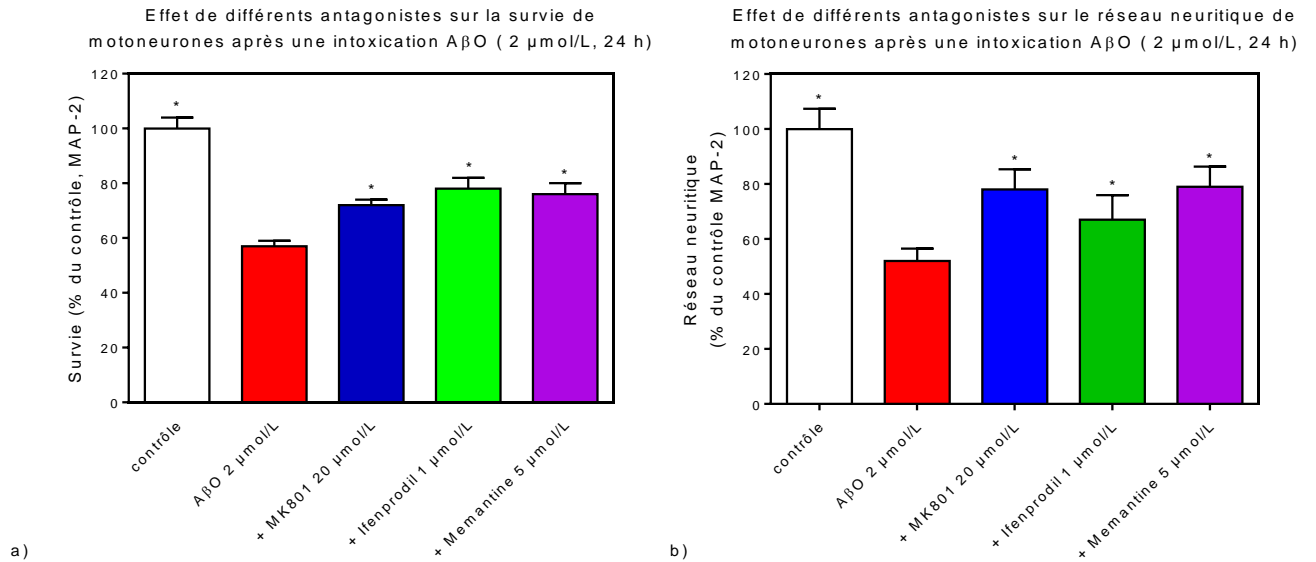


Figure 25 : Effet de différents antagonistes sur a) la survie, b) le réseau neuritique des motoneurones après une intoxication à l'A $\beta$ O (2  $\mu$ mol/L, 24 h).

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement) \* p < 0.05 est considéré comme significatif \* p < 0.05 vs groupe A $\beta$ O (one-way ANOVA suivi d'un test Dunnett).

Le MK801 (à 20  $\mu$ mol/L, antagoniste total des récepteurs du NMDA), l'ifenprodil (à 1  $\mu$ mol/L, antagoniste sélectif des sous unités 2b des récepteurs du NMDA) et la mémantine (à 5  $\mu$ mol/L, antagoniste sélectif des récepteurs extra synaptiques du NMDAR) protègent partiellement les motoneurones d'une intoxication par les A $\beta$ O. Ces résultats vont dans le sens d'une implication du glutamate dans la toxicité induite par les A $\beta$ O.



4.2.2.5. Effet des A $\beta$ O sur l'accumulation de la protéine TDP-43 dans le cytoplasme de motoneurones de rat en culture primaire.

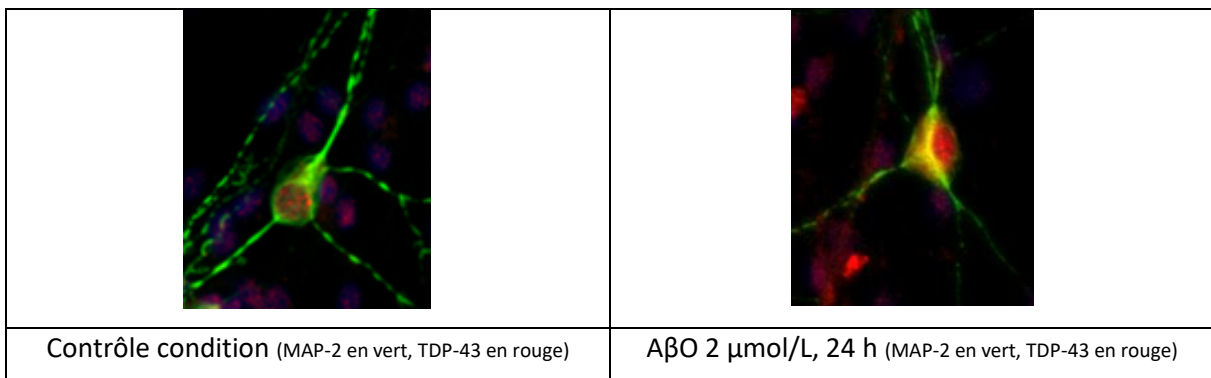
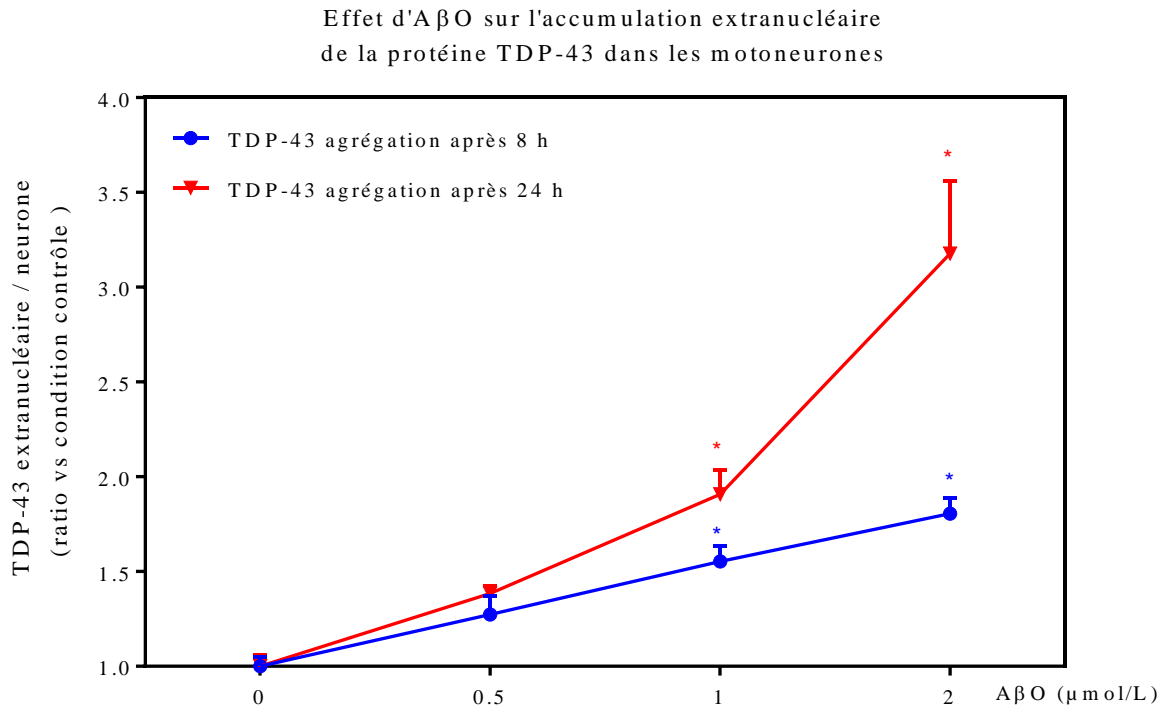


Figure 26: Effet d'A $\beta$ O sur l'accumulation de la protéine TDP-43 dans le cytoplasme de de motoneurones de de rat en culture primaire.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement). \*  $p < 0.05$  est considéré comme significatif \*  $p < 0.05$  vs groupe contrôle One way ANOVA suivi d'un test Dunnett.

Des cas de SLA ont été associés à des mutations présentes sur des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN (e.g. tarbp/TDP-43). Des agrégats protéiques, composés de la protéine TDP-43, sont présents dans les neurones de patients SLA d'origine génétique mais également d'origine sporadique et non-génétique.

Les A $\beta$ O induisent une forte accumulation de la protéine TDP-43 dans le cytoplasme des motoneurones à partir de 8 h de traitement et aux concentrations d'1  $\mu$ mol/L et plus.

4.2.2.6. Effet du glutamate sur l'accumulation de la protéine TDP-43 dans le cytoplasme de motoneurones de rat en culture primaire.

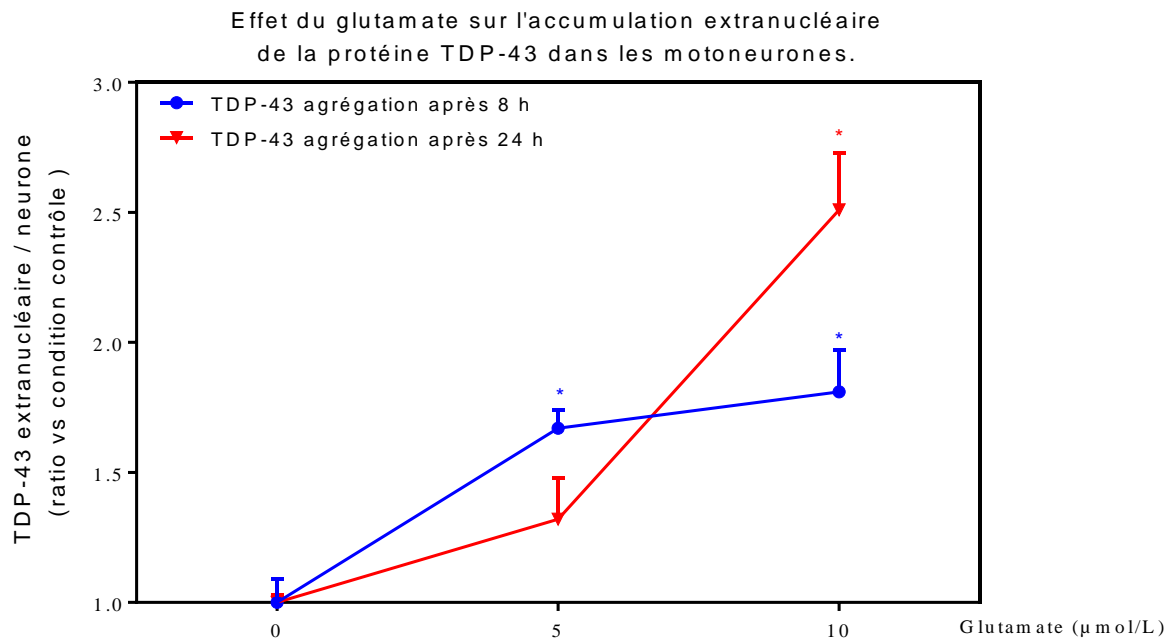


Figure 27: Effet du glutamate sur l'accumulation de la protéine TDP-43 dans le cytoplasme de motoneurones de rat en culture primaire. Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement). \*  $p < 0.05$  est considéré comme significatif \*  $p < 0.05$  vs groupe contrôle One way ANOVA suivi d'un test Dunnett.

Le glutamate, comme les A $\beta$ O, induit une importante accumulation de la protéine TDP-43 dans le cytoplasme à partir de 8 h de traitement et aux concentrations de 5  $\mu$ mol/L et plus.

4.2.2.7. Effet des A $\beta$ O sur la survie des cellules musculaires humaines.

Effet d'A $\beta$ O appliqué à différentes concentrations et différents temps sur la survie de cellules musculaires humaines.

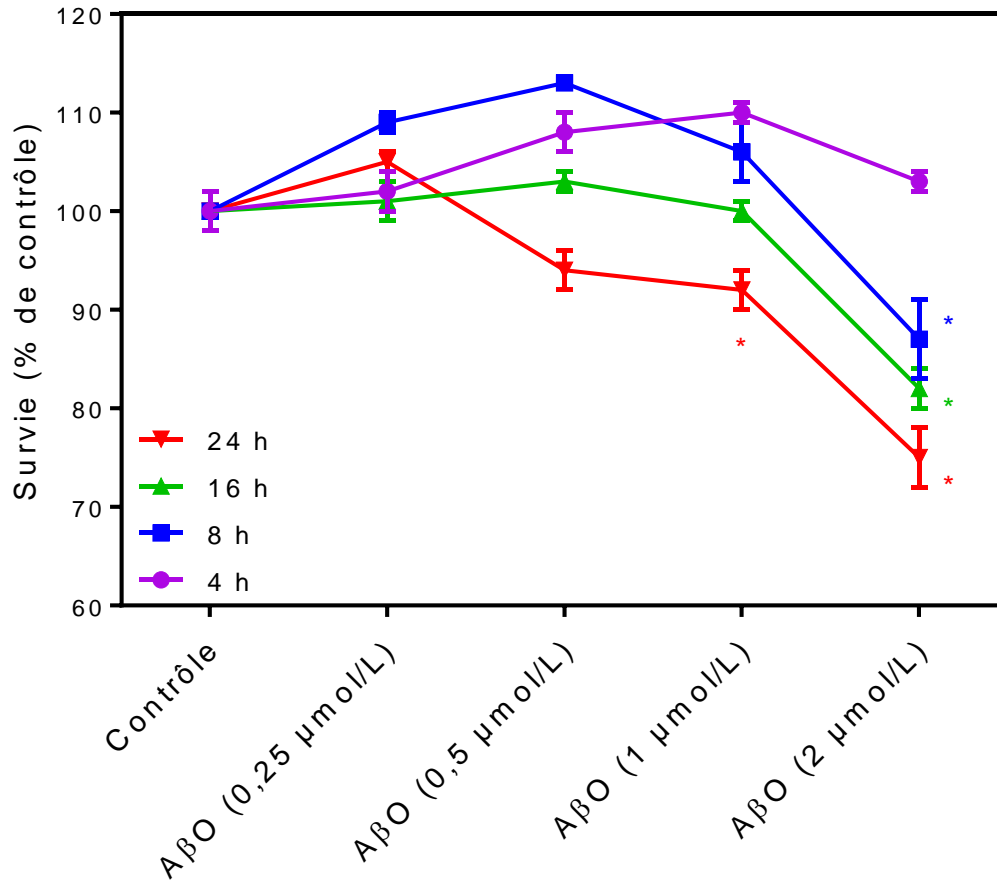


Figure 28: Effet d'A $\beta$ O sur la survie de cellules musculaires humaines.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement). \*  $p < 0.05$  est considéré comme significatif \*  $p < 0.05$  vs groupe contrôle One way ANOVA suivi d'un test de Dunnett.

Les A $\beta$ O présentent une importante toxicité pour les cellules musculaires humaines dès 8 h d'application et à la concentration de 2  $\mu$ mol/L. L'effet est dépendant de la dose et du temps d'application des A $\beta$ O. Aux faibles concentrations (jusqu'à 0.5  $\mu$ mol/L) les A $\beta$ O n'induisent pas de mort cellulaire.

#### 4.2.2.8. Effet du glutamate sur la survie des cellules musculaires humaines.

Effet du glutamate appliqué à différentes concentrations et différents temps sur la survie de cellules musculaires humaines.

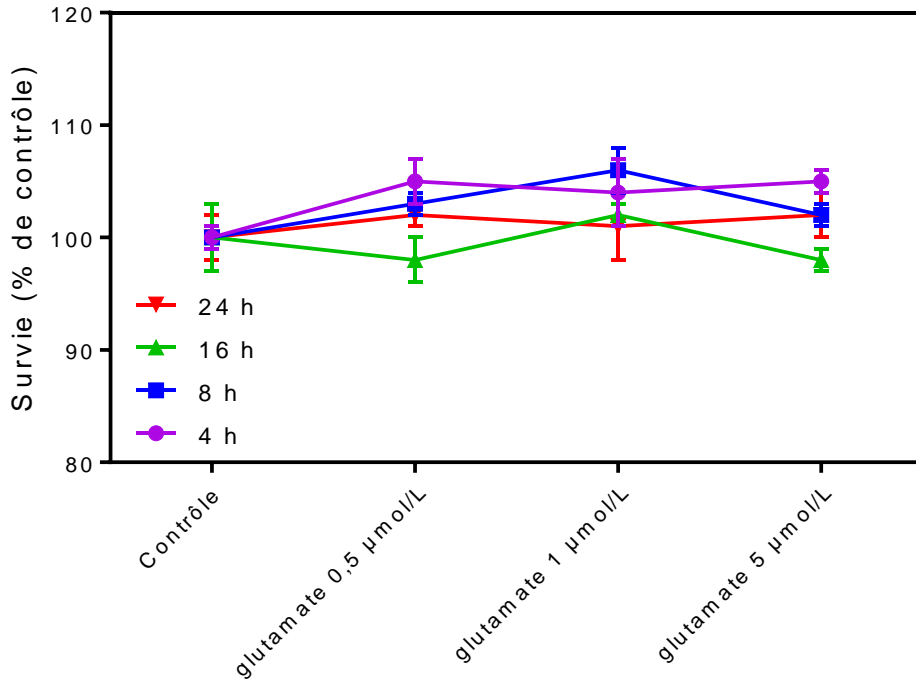


Figure 29: Effet du glutamate sur la survie de cellules musculaires humaines.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement). \*  $p < 0.05$  est considéré comme significatif \*  $p < 0.05$  vs groupe contrôle One way ANOVA suivi d'un test Dunnett.

Le glutamate n'a aucun effet sur la survie des cellules musculaires. Rappelons que, par contraste, dans les mêmes conditions (temps et concentration) nous avons observé une toxicité sur les motoneurones (Fig. 11).

4.2.2.9. Effet des A $\beta$ O sur l'expression du transporteur du glucose 1 des cellules musculaires humaines.

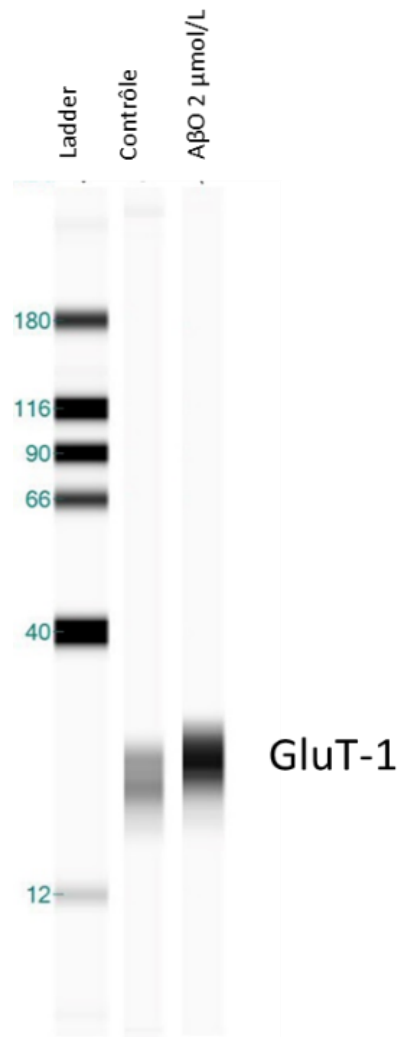


Figure 30: Effet des A $\beta$ O sur l'expression de la GluT-1 après une intoxication de 24 h sur des cellules musculaires humaines.

Une importante augmentation ( environ 4 fois plus) du niveau d'expression du transporteur du glucose 1 des cellules musculaires humaines est observée après 24 h d'intoxication à l'A $\beta$ O (à 2  $\mu$ mol/L).

#### 4.2.2.10. Effet des A $\beta$ O sur l'absorption du glucose par les cellules musculaires humaines.

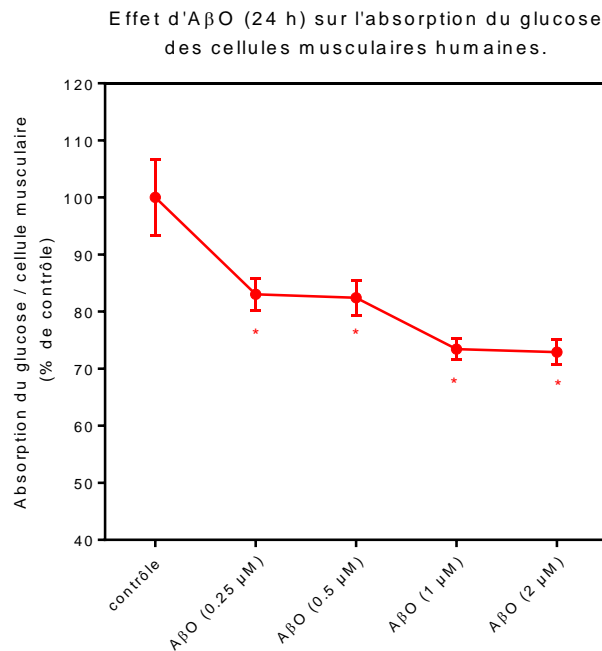


Figure 31: Effet des A $\beta$ O (appliqués pendant 24 h) sur l'absorption du glucose rapporté au nombre de cellules musculaires humaines. Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle +/- SEM (100 % = pas de traitement). \*  $p < 0.05$  est considéré comme significatif \*  $p < 0.05$  vs groupe contrôle One way ANOVA suivi d'un test Dunnett.

Une diminution de l'absorption du glucose est observée après 24 h d'application des A $\beta$ O. De manière intéressante cette diminution est observée à partir de 0.25  $\mu$ mol/L d'A $\beta$ O avant que n'apparaisse la mort cellulaire (visible à partir de 1  $\mu$ mol/L d'A $\beta$ O).

#### 4.2.3. Discussion

Nous avons pu analyser l'effet toxique du glutamate ainsi que celui de l'A $\beta$ O sur les JNM des cocultures nerf muscle. L'effet toxique est amoindri en présence des deux molécules (A $\beta$ O + glutamate). En effet l'application de 0.5 et 1  $\mu$ mol/L d'A $\beta$ O (soit 5 et 10  $\mu$ mol/L d'A $\beta$ ) pendant 24 h induit une toxicité de 40 et 50 %. L'adjonction de glutamate à faible concentration (0,1 et 0,5  $\mu$ mol/L) réduit significativement cette toxicité. L'inverse est également valable : l'adjonction de faibles concentrations d'A $\beta$ O, 60 et 125 nmol/L (soit 0,6 et 1,25  $\mu$ mol/L d'A $\beta$ ), à des neurones intoxiqués par du glutamate en diminue l'effet toxique. Nous montrons que cette diminution de toxicité est liée à un effet sur la caspase 3. De plus, une intoxication au glutamate à forte dose (30  $\mu$ mol/L) provoque une libération de l'A $\beta$ O

dans le milieu extracellulaire et inversement une intoxication à l'A $\beta$ O (à partir de 0.25  $\mu$ mol/L, soit 2.5  $\mu$ mol/L d'A $\beta$ ) provoque une libération de glutamate dans ce milieu. Les résultats obtenus en présence de l'antagoniste MK801 montrent que la toxicité de l'A $\beta$  passe par les voies des NMDAR. Il semble donc qu'il existe un lien étroit entre le glutamate et l'A $\beta$ . Le modèle de coculture nerf muscle est extrêmement complexe et fait intervenir un grand nombre de types cellulaires différents. Afin de mieux comprendre le rôle de chacun d'entre eux, nous avons conduit des expériences sur des cellules musculaires humaines isolées et sur des cultures primaires de motoneurones. Leurs résultats nous ont permis de mettre en évidence la sensibilité des cellules musculaires aux A $\beta$ O. Ces derniers induisent une mort des cellules musculaires dès une concentration de 1  $\mu$ mol/L (après 16 h). Les cellules musculaires ne sont pas sensibles au glutamate, les A $\beta$ O agissent donc sur les cellules musculaires par une autre voie. Nous avons pu mettre en évidence une importante augmentation du transporteur Glut-1 ainsi qu'une diminution de l'absorption du glucose après intoxication à l'A $\beta$ O. Cette diminution d'absorption du glucose met la cellule dans un état de stress et il est probable que l'augmentation des transporteurs GluT-1 soit une réponse à ce stress.

Le métabolisme énergétique est critique pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et leur dysrégulation pourrait se trouver à l'origine de beaucoup de maladies humaines. Le glucose et les lipides sont les deux principales sources d'énergie. Lors du manque de glucose, les lipides servent de source d'approvisionnement en énergie, fournissant les acides gras (FAs) dont le métabolisme est crucial pour la survie de cellules, y compris des neurones (Cabodevilla et al., 2013; Liu et al., 2018). Le glucose est stocké sous forme de glycogène dans les cellules musculaires. Lors d'effort musculaire le glycogène est dégradé en glucose. Ce glucose ainsi produit par la cellule musculaire ne peut être utilisé que par cette même cellule. Une fois le stock de glucose diminué la cellule musculaire métabolise les lipides (Cabodevilla et al., 2013; Palamiuc et al., 2015). Il a été montré chez les souris SOD1G93A une altération du métabolisme du glucose (Dobrowolny et al., 2018).

De plus, le bilan énergétique est sévèrement compromis chez les patients SLA. On retrouve aussi bien chez les patients SLA que chez les souris SLA (Schmitt et al., 2014) une perte massive de poids et de quantité de glucose disponible, le métabolisme lipidique est réduit et les dépenses énergétiques au repos sont accrues (Bouteloup et al., 2009; Desport et al., 2005; Dupuis et al., 2008; Ferri and Coccurello, 2017; Funalot et al., 2009; Kasarskis et al.,

1996). De façon intéressante, tandis que les patients ayant une faible masse graisseuse ont un facteur de prémorbidité à développer une SLA plus important (Gallo et al., 2013), les patients en surpoids ou obèses ont un risque inférieur de développer une SLA (O'Reilly et al., 2013). Une étude récente a indiqué que des patients SLA perdent du poids environ 10 ans avant l'apparition des symptômes moteurs (Peter et al., 2017) et ont une consommation d'énergie quotidienne plus haute pour compenser la consommation d'énergie plus haute présente avant le début clinique de la maladie qui a été documentée (Huisman et al., 2015). Le stress oxydatif change la transcription des transporteurs de glucose responsables de l'assimilation basale du glucose et de l'absorption stimulée par l'insuline (GLUT1 et GLUT4, respectivement) ; il en résulte une assimilation basale accrue, une diminution de l'assimilation de glucose stimulée par l'insuline et l'exacerbation de stress oxydatif dans la cellule (Bloch-Damti and Bashan, 2005).

Nous avons observé, ce qui était attendu, que les motoneurones sont sensibles à la fois au glutamate et à l'A $\beta$ O. Les motoneurones sont capables de libérer de l'A $\beta$ O après une intoxication au glutamate et de libérer du glutamate après une intoxication à l'A $\beta$ O. Lors de l'intoxication à l'A $\beta$ O et au glutamate une augmentation de la TDP-43 extranucléaire est observée dans les motoneurones. La TDP-43 est normalement exprimée dans le noyau de neurones où sa fonction la plus importante est de réguler le traitement des ARN, y compris l'épissage des ARNm (Polymenidou et al., 2011). Or, chez les patients atteints de SLA, les inclusions de la TDP-43 sont typiquement trouvées dans le cytoplasme neuronal et on observe une disparition de la localisation nucléaire de la protéine (Vanden Broeck et al., 2014). En conséquence, plusieurs mécanismes de gain-de-fonction et de perte-de-fonction ont été proposés (Lee et al., 2012). Il est donc possible que les inclusions cytoplasmiques de TDP-43 aient des propriétés toxiques indépendantes de la fonction normale de la TDP-43. La toxicité pourrait également résulter d'une activité normale accrue de la TDP-43. Finalement, la TDP-43 cytoplasmique pourrait n'avoir aucune propriété toxique intrinsèque mais la diminution de la TDP-43 nucléaire serait responsable de la toxicité. Il se peut enfin qu'une combinaison des trois effets hypothétiques agissent de conserve.

Le modèle de coculture nerf muscle mime assez fidèlement, semble-t-il, la physiopathologie de la SLA. L'A $\beta$  semble bien avoir un rôle dans la SLA. Les deux intoxications à savoir glutamate et A $\beta$  sont complémentaires. Les différents paramètres que l'on peut mesurer



(Survie, Stress oxydatif, métabolisme du glucose, TDP-43...) sont très importants dans l'analyse et l'évaluation de la maladie et ils peuvent constituer de nouvelles pistes thérapeutiques.

## 5. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Au cours de notre thèse nous avons utilisé des modèles de cultures de cellules nerveuses soumises à des traitements mimant certaines maladies neurodégénératives. Il nous semble important de justifier ici le choix et la pertinence de ces modèles.

Le cerveau est un tissu d'une très grande complexité. Tout en se gardant de rentrer dans une approche réductionniste de la physiopathologie des maladies neurodégénératives, il est souvent nécessaire d'utiliser des systèmes d'étude simplifiés pour répondre à de questions qui ne peuvent trouver de réponse que par des manipulations et des observations sélectives portant sur des cellules déterminées. Certes, la chose est possible sur l'animal entier, mais les techniques de quantification sont très lourdes à mettre en œuvre, et frappées d'une relative imprécision. L'une des principales techniques simplificatrices consiste à utiliser des cultures primaires de tissus nerveux qu'il est possible de dissocier et de mettre en culture relativement aisément, composées de divers types cellulaires facilement identifiables par immunomarquage.

Les neurones prélevés pour les cultures primaires sont des cellules déjà différenciées, provenant d'un tissu que l'on a dissocié chimiquement et mécaniquement. Le processus de dissociation entraîne une disparition des prolongements que les neurones avaient éventuellement commencé à émettre. Après dissociation, les cellules se présentent donc sous la forme de sphères d'un diamètre moyen de 6  $\mu\text{m}$ . L'étape initiale de l'ensemencement consiste à laisser ces cellules sédimenter sur un substrat traité de façon telle qu'il permet aux cellules d'adhérer. Quelques minutes après l'ensemencement, on observe le développement spontané de structures d'exploration qui ressemblent à des filopodia, (voir ci-après) puis à celui de nouveaux prolongements, et la formation de connexions entraînant la formation d'un réseau. L'établissement de ces connexions dans les premiers jours ou semaines de la culture est nécessaire à la survie des cellules ensemencées (Ikegaya et al., 2000).

Les différentes étapes du développement d'un neurone en culture ont été bien caractérisées, notamment en cultures de neurones d'hippocampe de rat (Fig. 32) (Arimura and Kaibuchi, 2007). Peu de temps après l'ensemencement, il se développe des lamellipodia

(antérieurement aux filopodia) autour du corps cellulaire (stade 1). Quelques heures plus tard, il apparaît des prolongements appelés neurites (stade 2) ; ils ont une activité de croissance dissymétrique marquée par l'élongation plus rapide de l'un des neurites. La cellule apparaît alors nettement polarisée : on donne le nom de polarisation axonale à ce phénomène. En effet, ce plus long prolongement deviendra l'axone (stade 3 de développement). Cette dénomination est justifiée car la cellule acquiert une polarité morphologique. Si l'on considère l'ensemble des prolongements ou neurites, on parle de différenciation ou spécialisation axonale ou dendritique. Quelques jours plus tard, les autres neurites se différencient en dendrites. Le réseau de neurones n'est mature, c'est-à-dire pourvu de connexions fonctionnelles qu'après 10 à 12 jours (stade 5).

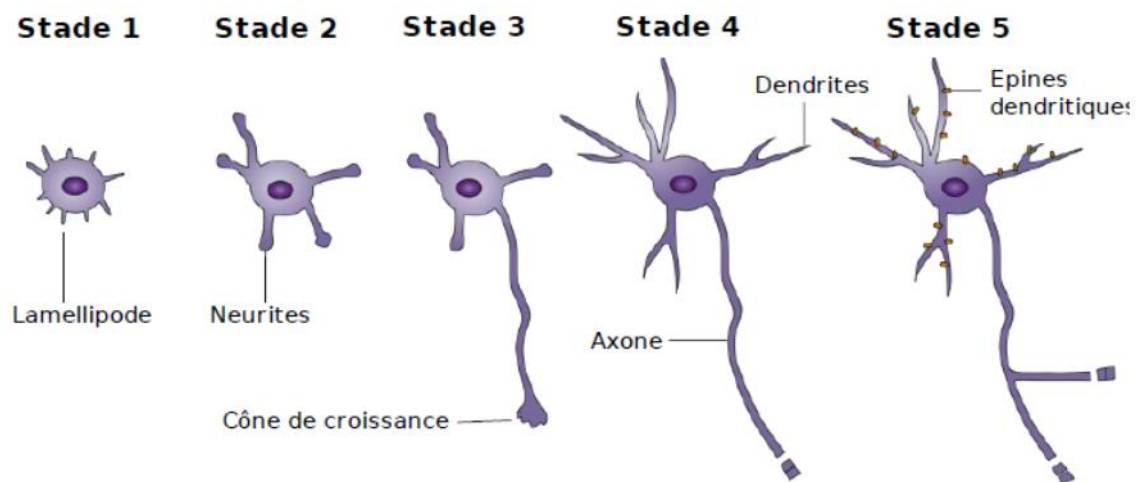


Figure 32 : Développement d'un neurone en culture *in vitro*.  
(Arimura and Kaibuchi, 2007)

Les caractéristiques morphologiques des neurones, le profil d'expression et la localisation des protéines neuronales *in vitro* miment les phénomènes que l'on observe *in vivo*. Un tel constat valide la pertinence du modèle (Garner et al., 2006) pour ce qui est du type d'études que nous avons conduites.

Les cellules qui environnent les neurones, comme les cellules gliales, ont un rôle très important dans leur développement et leur fonctionnement. La culture primaire de tissu nerveux permet de conserver chaque type cellulaire (neurones, astrocytes, microglie, oligodendrocytes) à peu près dans les proportions qui existent dans le cerveau, ce qui

permet d'inférer qu'elle reproduit, ne fût-ce que partiellement, les interactions cellulaires du tissu originel.

Longtemps, l'astrocyte a été relégué au rôle supplétif de support structural. Puis, de simple cellule de soutien, l'astrocyte est devenu l'acteur principal de toutes sortes d'effets. Lors du développement, la première tâche de l'astrocyte est de protéger le système nerveux central et de contrôler l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Au cours de l'embryogenèse, l'établissement des fonctions neuronales échelles temporelles et spatiale semble bien être un mécanisme indispensable à l'activité cérébrale, et à la plasticité cérébrale.

Le modèle de synapse tripartite rend compte de l'interaction entre la partie pré-synaptique neuronale, la partie post synaptique neuronale et un astrocyte (Araque et al., 1999). La transmission synaptique peut activer les astrocytes en y élevant la concentration d'ions calcium intracellulaires. Cette signalisation locale peut moduler la signalisation, intervenir dans la création d'une boucle de contrôle neurone-glie, qui permet d'augmenter ou de diminuer l'activité neuronale en fonction des besoins (Hansson and Rönnbäck, 2004). Les astrocytes communiquent avec les synapses au moyen de divers neurotransmetteurs (Perea et al., 2014) comme le glutamate, qui suscite une réponse calcique astrocytaire (augmentation des ions calcium intracellulaires). L'activité synaptique peut être aussi affecté par des processus globaux comme des molécules diverses qui n'ont pas d'origine neuronale (El et al., 2018).

Toutes les fonctions potentielles de l'astrocyte qui viennent d'être évoquées laissent entrevoir l'importance putative des interactions neurone-glie et de leurs perturbations, dans certaines maladies neurologiques.

Le rôle putatif de l'activation des astrocytes dans la MA est toujours débattu (Chun and Lee, 2018; Osborn et al., 2016).

Des études conduites en cultures cellulaires ou sur des modèles de souris mimant la MA, mettent en évidence des changements fonctionnels spécifiques des astrocytes, y compris dans le métabolome (Sancheti et al., 2014, 2014), la recapture des neurotransmetteurs (Masliah et al., 1996) et la transmission synaptique (Jo et al., 2014). Cependant, la contribution globale des astrocytes à la MA reste mal connue.

La culture primaire de neurones corticaux, que nous avons utilisé pour étudier la MA, contient 80 % de neurones et 20 % de cellules gliales (5% de microglie dans le modèle d'intoxication chronique) reproduisant les pourcentages présents dans le cerveau humain (Herculano-Houzel, 2014). Nous avons pu y étudier l'effet toxique des A $\beta$ O ainsi que les modifications métaboliques et structurales néfastes qui surviennent dans les neurones exposés à ces derniers. (Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'article de Callizot, Combes et al 2013).

À l'aide d'antagonistes, il nous a été possible de montrer que la voie glutamatergique était impliquée dans cette toxicité (Fig. 11). Sa stimulation engendre des dérégulations calciques (Fig. 12 et 13). Nous avons pu établir un lien étroit entre le glutamate et les A $\beta$ O. En effet une faible concentration de glutamate co-incubé avec de l'A $\beta$ O réduit l'effet toxique de ces derniers (Fig. 15). Les astrocytes sont fortement impliqués dans la régulation du glutamate. Il semblerait donc qu'un équilibre entre la concentration synaptique et pérисynaptique du glutamate d'une part et de l'A $\beta$ O de l'autre soit nécessaire pour éviter ou en tout cas retarder la survenue de la MA.

Les A $\beta$ O exercent également un effet délétère sur des astrocytes maintenus en culture pure. Ils exigent du reste du calcium extracellulaire pour agir sur cette cible (Fig. 17).

Le glutamate en excès est recapturé par des transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAAT). Ces transporteurs sont essentiels au maintien d'une homéostasie de la concentration de glutamate et d'aspartate dans la fente synaptique, grâce à l'intervention conjointe des astrocytes et des neurones. Les transporteurs EAAT-1 (GLAST) et EAAT2 (GLT-1) sont exprimés par les astrocytes, (Kanai et al., 1993; Parkin et al., 2018; Storck et al., 1992). EAAT3 (EAAC-1) et EAAT4 le sont par les neurones (Nagao et al., 1997). Or, de manière intéressante et curieuse, il a été montré qu'EAAT1 est exprimé par des neurones présentant des NFT chez des patients atteints de MA (Scott et al., 2002). Les EAAT sont sous-exprimés dans la MA (Masliah et al., 1996) et le nombre d'EAAT2 exprimé par les astrocytes dans la zone corticale est diminué (Li et al., 1997). Les niveaux protéiques d'EAAT1 et d'EAAT2 corticaux diffèrent d'un cerveau normal à un cerveau de patient atteint de MA où ils sont notablement diminués (Beckstrøm et al., 1999; Huang et al., 2018). L'A $\beta$  est capable de réduire l'assimilation du glutamate par des astrocytes en culture (Harris et al., 1995) et

EAAT2 est connu pour jouer un rôle important, quoiqu'indirect, dans le traitement protéolytique de l'APP.

L'EAAT2 spécifique des astrocytes peut être exprimé par les neurones dans des conditions pathologiques et cette induction neuronale d'EAAT2 ne survient que dans des neurones qui expriment de manière anormale la protéine  $\tau$  hyperphosphorylée (Thai, 2002). Puisqu'une expression anormale d'EAAT1 dans des neurones a récemment été rapportée (Pow and Cook, 2009; Scott et al., 2002), la découverte d'une expression anormale d'EAAT2 dans des neurones favorise fortement l'hypothèse selon laquelle des anomalies dans le transport de glutamate par les neurones et les astrocytes jouent un rôle important dans la pathogénie de la MA.

Il a été observé une réduction de l'expression d'EAAT1 chez les patients atteints de MA (Woltjer et al., 2010; Zoia et al., 2004, 2011). Il serait donc intéressant de déterminer dans la suite logique de nos travaux, le rôle des EAAT ainsi que leur niveau d'expression après une intoxication par les A $\beta$ O, en fonction de leurs localisations (astrocyte ou neurones). Il conviendrait aussi d'étudier la quantité de glutamate extracellulaire dans les premières minutes d'application du peptide sur une culture d'astrocytes purifiées.

Nombre d'études biochimiques et neuropathologiques conduites sur des cerveaux de patients atteints de la MA montrent qu'ils sont le siège d'une importante réaction neuro-inflammation dans laquelle la microglie joue un rôle essentiel. La microglie est une cellule immunitaire résidente du cerveau et de la moelle épinière. Elle joue un rôle important dans le neurodéveloppement, dans les maladies neurodégénératives et dans l'homéostasie (Nayak et al., 2014). Contrairement aux neurones et d'autres types cellulaires gliaux, la microglie dérive de la moelle osseuse, et elle apparaît tôt pendant le développement (Hutchins et al., 1990) ; elle tire son origine de précurseurs érythromyeloïdes (EMP) (Ginhoux et al., 2010). Elle est connue pour réguler la quantité de dépôt d'A $\beta$  par phagocytose (Laporte et al., 2004), et semble exercer un effet protecteur sur la progression de la MA (Lee and Landreth, 2010). La microglie des cerveaux de patients atteints de MA apparaît sous forme de grappes cellulaires centrées sur les dépôts fibrillaire d'A $\beta$  ; les cellules microgliales adoptent une morphologie polarisée et elles émettent des prolongements hypertrophiques qui s'étendent vers les plaques (Condello et al., 2015). Il se crée une barrière physique

protectrice empêchant la propagation de l'A $\beta$  fibrillaire, et promouvant ainsi la formation de plaques très compactes (Condello et al., 2015; Yuan et al., 2016).

Nous avons développé un modèle de culture primaire de cortex contenant de la microglie afin d'étudier la neuro-inflammation résultant de l'application d'A $\beta$ O (Fig. 20). Le modèle nous a permis de montrer que le traitement entraîne la libération de différentes cytokines telles que le TNF $\alpha$ , l'IL1 $\beta$  et l'IL6 (Fig. 21).

Nous avons mis en place un modèle de culture primaire permettant d'étudier les deux mécanismes de toxicité de l'A $\beta$ O. D'abord la toxicité aiguë passant par la voie glutamatergique, qui implique les astrocytes et active la voie apoptotique. Puis, la neuro-inflammation qui fait intervenir l'activation de la microglie par l'A $\beta$  qui suscite une libération de cytokine pouvant engendrer la mort neuronale.

Selon toute vraisemblance, la MA est une maladie impliquant aussi bien l'A $\beta$ O que le glutamate. Il semble se dessiner un lien étroit entre ces deux agents. Comme le glutamate est impliqué dans la plupart des maladies neurodégénératives, nous nous sommes donc interrogés sur le rôle d'A $\beta$  dans celles-ci. C'est à la suite d'une étude bibliographique extensive qu'un certain nombre de données nous ont poussées à chercher le rôle éventuel de l'A $\beta$  dans la SLA.

La recherche portant sur l'APP s'est concentrée presque exclusivement sur son rôle dans la MA. En effet, des mutations dans l'APP sont associées aux formes familiales de la maladie (Selkoe, 2001). Mais il se pourrait qu'un traitement anormal ou erroné de l'APP intervienne dans plusieurs neurodégénérescences (Esler and Wolfe, 2001). Dans le muscle squelettique, l'APP est localisé à la base des plis postsynaptiques de la JNM, mais sa fonction y est peu claire (Askanas et al., 1992a).

De plus une accumulation de peptide A $\beta$  est retrouvée dans des myosites à corps d'inclusion (Askanas et al., 1992b). Une augmentation de l'expression d'APP a été détectée dans les muscles de patients atteints de SLA associée à une myosite à inclusion ; il semble y jouer un rôle pathogène (Askanas and Engel, 2002). La surexpression d'APP chez des souris transgéniques suscite un phénotype ressemblant à des myosites à corps d'inclusion, (Sugarman et al., 2002) et sa surexpression dans des cellules musculaires, inhibe l'innervation *in vitro* (McFerrin et al., 1998). Ces résultats suggèrent que l'APP joue un rôle

central dans la pathologie de certaines myosites à corps d'inclusion (Askanas and Engel, 2002). De plus, BACE1, une protéase clé dans la génération d'A $\beta$  à partir d'APP, est aussi surexprimée dans les muscles de patients atteints de SLA associée à une myosite à corps d'inclusion (Vattemi et al., 2001). De l'A $\beta_{1-42}$  est accumulée dans des fibres musculaires de patients avec myosites à corps d'inclusion (Vattemi et al., 2009). La production de corps d'inclusions, quelle que soit leur nature, peut donc être un facteur important de la pathogénie de la maladie.

Il a été observé une augmentation des niveaux d'APP dans les muscles de souris à SOD1 G93A. Cette augmentation précède l'apparition des premiers signes de la maladie, comme la modification de la démarche et le tremblement. Des niveaux d'APP notablement plus élevés ont été montrés dans les muscles deltoïdes de patients atteints de SLA sporadique, par rapport à ceux des individus exempts de la maladie (Moloney et al., 2014). Comme une élévation des niveaux d'APP est également observée dans d'autres muscles et d'autres maladies neuromusculaires, l'APP ne peut représenter un marqueur spécifique de la SLA, mais il peut être utilisé comme un marqueur de diagnostic présymptomatique lors de l'examen de biopsie musculaire de sujets à haut risque, membre d'une famille présentant plusieurs cas de SLA. Il a été observé la présence d'A $\beta$  intracellulaire dans les neurones moteurs de patients atteints de SLA aussi bien sporadique que familiale (Calingasan et al., 2005; Koistinen et al., 2006). Bien que l'APP soit nécessaire à la formation des JNM (McFerrin et al., 1998), la surexpression d'APP dans des cultures de myocyte humain inhibe la formation des JNM (Wang, 2005). De hauts niveaux d'A $\beta$  sont observés dans la moelle épinière de souris SOD1 G93A localisés principalement dans des neurones moteur et leurs cellules gliales environnantes. La perte de JNM et la dégénérescence de neurone moteur sont considérablement réduites dans des souris SOD1 G93A quand le gène de l'APP est invalidé ; ce fait indique que l'APP endogène contribue activement à la pathologie dans ce modèle animal de SLA d'origine génétique (Bryson et al., 2012).

Pour en terminer, la mort de neurones moteurs (Seo et al., 2002) est observés dans des modèles murins de maladie d'Alzheimer familiale, et des niveaux élevés d'A $\beta$ , mettent en évidence leur particulière sensibilité à ce peptide.

Nous fondant sur ces études, nous avons étudié les effets des préparations d'A $\beta$  sur un modèle cellulaire de SLA. Ce modèle de coculture nerf muscle permet d'innover des



myotubes qui deviendront des myofibres, permet la formation de JNM et la contraction des fibres musculaires matures. Nos résultats ont montré que les JNM sont sensibles aux préparations d'A $\beta$  (Combes et al., 2015). Tout comme dans le modèle de MA, nous avons montré qu'il existe un lien entre glutamate et A $\beta$ O dans la SLA, ou plus précisément dans le modèle qui nous sert à étudier cette maladie.

En raison de la complexité du modèle coculture nerf muscle, l'étude mécanistique de l'effet d'A $\beta$ O a été faite sur des cultures de cellules musculaires humaines d'une part et sur des cultures primaires de motoneurones embryonnaires de rat, de l'autre, de façon à isoler les effets du peptide sur chacun de ces types cellulaires.

L'effet toxique de l'A $\beta$ O sur les motoneurones (Fig. 22) se manifeste notamment par une augmentation de la TDP-43 cytoplasmique (Fig. 26) et de la quantité de glutamate extracellulaire (Fig. 24). Il passe par les voies glutamatergiques (Fig. 25). La caractéristique neuropathologique principale, des neurones moteurs de patients atteints de SLA, est la présence d'inclusions de TDP-43 dans leur cytoplasme et dans d'autres régions du SNC, y compris dans le cortex frontal et temporal (Guerrero et al., 2016). Il existe du reste des formes de SLA dans lesquelles des inclusions intramusculaires de TDP-43 sont des éléments anatomopathologiques fondamentaux de la maladie, qu'elle soit familiale ou sporadique (Cykowski et al., 2018). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression et la localisation (cytoplasmique ?) de la TDP-43 dans des cultures primaires de neurones corticaux comme observé chez certains patients SLA (Shellikeri et al., 2017). Comme TDP-43, dans la SLA, la protéine FUS/TLS s'accumule dans le cytoplasme des motoneurones. Les mutations FUS entraînent une perte sévère de motoneurones et sont associées à la SLA juvénile (Kwiatkowski et al., 2009; Ticozzi et al., 2009). Nous nous proposons d'étudier l'accumulation cytoplasmique de FUS sur une culture primaire de motoneurones dans des conditions expérimentales reproduisant les caractéristiques principales de la SLA.

Nous avons pu montrer que les cellules musculaires humaines sont sensibles à l'A $\beta$  mais ne le sont pas au glutamate ; dans cette toxicité, une autre voie est donc impliquée. Il semble que la dérégulation du transport et/ou du métabolisme du glucose intervienne dans l'effet délétère de l'A $\beta$  (Fig. 30 et 31). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression génique des transporteurs du glucose sur notre modèle de coculture nerf muscle.

Nous pensons développer le modèle coculture nerf muscle dans différentes directions afin d'y étudier les effets du glutamate et des A $\beta$ O, notamment sur le métabolisme du glucose.

- Cellules musculaires humaines saines avec explant de moelle épinière issu de rat transgénique SOD1 G93A.
- Cellules musculaires humaines issues de patient atteint de la SLA avec un explant de moelle épinière issu de rat sain.
- Cellules musculaires humaines issues de patient atteint de la SLA avec un explant de moelle épinière issu de rat transgénique SOD1 G93A.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats a permis de mettre en évidence quelques mécanismes physiopathologiques inédits de la MA et la SLA, et d'imaginer de nouvelles cibles thérapeutiques. Il a aussi permis de montrer que des modèles de culture cellulaire permettaient de répondre à plusieurs questions ciblées, dans la mesure où ils reproduisent certains des phénomènes neuropathologiques observés chez les malades. Nous sommes parfaitement conscients des limites et des imperfections de notre travail, mais nous pensons qu'il a pour mérite d'ouvrir des perspectives nouvelles pour l'étude de la physiopathologie de la MA et de la SLA.

## 6. BIBLIOGRAPHIE

- Agca, C., Klakotskaia, D., Schachtman, T.R., Chan, A.W., Lah, J.J., and Agca, Y. (2016). Presenilin 1 transgene addition to amyloid precursor protein overexpressing transgenic rats increases amyloid beta 42 levels and results in loss of memory retention. *BMC Neurosci.* *17*, 46.
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E., and Smith, S.O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid- $\beta$ (1–42) oligomers to fibrils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 561–567.
- Alves da Costa, C., Paitel, E., Mattson, M.P., Amson, R., Telerman, A., Ancolio, K., Checler, F., and Mattson, M.P. (2002). Wild-type and mutated presenilins 2 trigger p53-dependent apoptosis and down-regulate presenilin 1 expression in HEK293 human cells and in murine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 4043–4048.
- Alves da Costa, C., Mattson, M.P., Ancolio, K., and Checler, F. (2003). The C-terminal fragment of presenilin 2 triggers p53-mediated staurosporine-induced apoptosis, a function independent of the presenilinase-derived N-terminal counterpart. *J. Biol. Chem.* *278*, 12064–12069.
- Appocher, C., Mohagheghi, F., Cappelli, S., Stuani, C., Romano, M., Feiguin, F., and Buratti, E. (2017). Major hnRNP proteins act as general TDP-43 functional modifiers both in *Drosophila* and human neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* *45*, 8026–8045.
- Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V., and Haydon, P.G. (1999). Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *77*, 699–706.
- Arimura, N., and Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 194–205.
- Askanas, V., and Engel, W.K. (2002). Newest pathogenetic considerations in inclusion-body myositis: Possible role amyloid- $\beta$ , cholesterol, relation to aging and to alzheimer's disease. *Curr. Rheumatol. Rep.* *4*, 427–433.
- Askanas, V., Kwan, H., Alvarez, R.B., Engel, W.K., Kobayashi, T., Martinuzzi, A., and Hawkins, E.F. (1987). De novo neuromuscular junction formation on human muscle fibres cultured in monolayer and innervated by foetal rat spinal cord: ultrastructural and ultrastructural-cytochemical studies. *J. Neurocytol.* *16*, 523–537.
- Askanas, V., Engel, W.K., and Alvarez, R.B. (1992a). Strong immunoreactivity of beta-amyloid precursor protein, including the beta-amyloid protein sequence, at human neuromuscular junctions. *Neurosci. Lett.* *143*, 96–100.
- Askanas, V., Engel, W.K., and Alvarez, R.B. (1992b). Light and electron microscopic localization of beta-amyloid protein in muscle biopsies of patients with inclusion-body myositis. *Am. J. Pathol.* *141*, 31–36.
- Atwood, C.S., Perry, G., Zeng, H., Kato, Y., Jones, W.D., Ling, K.-Q., Huang, X., Moir, R.D., Wang, D., Sayre, L.M., et al. (2004). Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 560–568.

- Ayers, J.I., and Cashman, N.R. (2018). Prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Handb. Clin. Neurol.* *153*, 337–354.
- Beckstrøm, H., Julsrud, L., Haugeto, O., Dewar, D., Graham, D.I., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J., and Danbolt, N.C. (1999). Interindividual differences in the levels of the glutamate transporters GLAST and GLT, but no clear correlation with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* *55*, 218–229.
- Bennett, B.D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D.B., Kahn, S., Louis, J.-C., Citron, M., and Vassar, R. (2000). A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's  $\gamma$ -secretase. *J. Biol. Chem.*
- Bennett, R.E., DeVos, S.L., Dujardin, S., Corjuc, B., Gor, R., Gonzalez, J., Roe, A.D., Frosch, M.P., Pitstick, R., Carlson, G.A., et al. (2017). Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid  $\beta$ . *Am. J. Pathol.* *187*, 1601–1612.
- Bertram, L., and Tanzi, R.E. (2012). The genetics of Alzheimer's disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *107*, 79–100.
- Bian, L., Yang, J.D., Guo, T.W., Sun, Y., Duan, S.W., Chen, W.Y., Pan, Y.X., Feng, G.Y., and He, L. (2004). Insulin-degrading enzyme and Alzheimer disease: a genetic association study in the Han Chinese. *Neurology* *63*, 241–245.
- Blennow, K., de Leon, M.J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* *368*, 387–403.
- Bloch-Damti, A., and Bashan, N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* *7*, 1553–1567.
- Blokhuys, A.M., Groen, E.J.N., Koppers, M., van den Berg, L.H., and Pasterkamp, R.J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *125*, 777–794.
- Boeve, B.F., and Graff-Radford, N.R. (2012). Cognitive and behavioral features of c9FTD/ALS. *Alzheimers Res. Ther.* *4*, 29.
- Bonvouloir, N., Lemieux, N., Crine, P., Boileau, G., and DesGroseillers, L. (2001). Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of MMEL2, a gene coding for a novel human member of the neutral endopeptidase-24.11 family. *DNA Cell Biol.* *20*, 493–498.
- Bouteloup, C., Desport, J.-C., Clavelou, P., Guy, N., Derumeaux-Burel, H., Ferrier, A., and Couratier, P. (2009). Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J. Neurol.* *256*, 1236–1242.
- Braun, S., Croizat, B., Lagrange, M.C., Warter, J.M., and Poindron, P. (1996). Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord–human muscle cocultures. *J. Neurol. Sci.* *136*, 17–23.
- Brooks, B.R. (1994). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *124*, 96–107.
- Brunkan, A.L., Martinez, M., Wang, J., Walker, E.S., Beher, D., Shearman, M.S., and Goate, A.M. (2005). Two domains within the first putative transmembrane domain of presenilin 1 differentially influence presenilinase and gamma-secretase activity. *J. Neurochem.* *94*, 1315–1328.

Bryson, J.B., Hobbs, C., Parsons, M.J., Bosch, K.D., Pandraud, A., Walsh, F.S., Doherty, P., and Greensmith, L. (2012). Amyloid precursor protein (APP) contributes to pathology in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 3871–3882.

Buggia-Prévoit, V., Fernandez, C.G., Udayar, V., Vetrivel, K.S., Elie, A., Roseman, J., Sasse, V.A., Lefkow, M., Meckler, X., Bhattacharyya, S., et al. (2013). A Novel Function for EHD Family Proteins in Unidirectional Retrograde Dendritic Transport of BACE1 and Alzheimer's disease A $\beta$  production. *Cell Rep.* *5*, 1552–1563.

Butterfield, D.A., and Pocernich, C.B. (2003). The glutamatergic system and Alzheimer's disease. *CNS Drugs* *17*, 641–652.

Buxbaum, J.N., and Linke, R.P. (2012). A Molecular History of the Amyloidoses. *J. Mol. Biol.* *421*, 142–159.

Cabodevilla, A.G., Sánchez-Caballero, L., Nintou, E., Boiadjieva, V.G., Picatoste, F., Gubern, A., and Claro, E. (2013). Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled  $\beta$ -oxidation of fatty acids. *J. Biol. Chem.* *288*, 27777–27788.

Caccamo, A., Oddo, S., Sugarman, M.C., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2005). Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol. Aging* *26*, 645–654.

de Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D.H., Kopeikina, K.J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K.H., Carlson, G.A., et al. (2012). Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* *73*, 685–697.

Calingasan, N.Y., Chen, J., Kiaei, M., and Beal, M.F. (2005).  $\beta$ -amyloid 42 accumulation in the lumbar spinal cord motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol. Dis.* *19*, 340–347.

Callizot, N., Combes, M., Steinschneider, R., and Poindron, P. (2013). Operational dissection of  $\beta$ -amyloid cytopathic effects on cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* *91*, 706–716.

Campbell, W.A., Yang, H., Zetterberg, H., Baulac, S., Sears, J.A., Liu, T., Wong, S.T.C., Zhong, T.P., and Xia, W. (2006). Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen-2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. *J. Neurochem.* *96*, 1423–1440.

Capell, A., Beher, D., Prokop, S., Steiner, H., Kaether, C., Shearman, M.S., and Haass, C. (2005). Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 6471–6478.

Carare, R.O., Teeling, J.L., Hawkes, C.A., Püntener, U., Weller, R.O., Nicoll, J.A.R., and Perry, V.H. (2013). Immune complex formation impairs the elimination of solutes from the brain: implications for immunotherapy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* *1*, 48.

Chami, L., Buggia-Prévoit, V., Duplan, E., Delprete, D., Chami, M., Peyron, J.-F., and Checler, F. (2012). Nuclear Factor- $\kappa$ B Regulates  $\beta$ APP and  $\beta$ - and  $\gamma$ -Secretases Differently at Physiological and Supraphysiological A $\beta$  Concentrations. *J. Biol. Chem.* *287*, 24573–24584.

Cheng, H., Vetrivel, K.S., Gong, P., Meckler, X., Parent, A., and Thinakaran, G. (2007). Mechanisms of disease: new therapeutic strategies for Alzheimer's disease--targeting APP processing in lipid rafts. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* *3*, 374–382.

- Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333–366.
- Chris Min, K., Dockendorf, M.F., Palcza, J., Tseng, J., Ma, L., Stone, J.A., Kleijn, H.J., Hodsman, P., Masuo, K., Tanen, M., et al. (2018). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the BACE1 Inhibitor Verubecestat (MK-8931) in Healthy Japanese Adults: a Randomized, Placebo-Controlled Study. *Clin. Pharmacol. Ther.*
- Chu, D., and Liu, F. (2018). Pathological Changes of Tau Related to Alzheimer’s Disease. *ACS Chem. Neurosci.*
- Chun, H., and Lee, C.J. (2018). Reactive astrocytes in Alzheimer’s disease: A double-edged sword. *Neurosci. Res.* 126, 44–52.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., et al. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer’s disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* 3, 67–72.
- Cohen, A.S., and Calkins, E. (1959). Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183, 1202–1203.
- Combes, M., Poindron, P., and Callizot, N. (2015). Glutamate protects neuromuscular junctions from deleterious effects of  $\beta$ -amyloid peptide and conversely: An in vitro study in a nerve–muscle coculture. *J. Neurosci. Res.* 93, 633–643.
- Condello, C., Yuan, P., Schain, A., and Grutzendler, J. (2015). Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A $\beta$ 42 hotspots around plaques. *Nat. Commun.* 6, 6176.
- Conlon, R.A., Reaume, A.G., and Rossant, J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Dev. Camb. Engl.* 121, 1533–1545.
- Contino, S., Porporato, P.E., Bird, M., Marinangeli, C., Opsomer, R., Sonveaux, P., Bontemps, F., Dewachter, I., Octave, J.-N., Bertrand, L., et al. (2017). Presenilin 2-Dependent Maintenance of Mitochondrial Oxidative Capacity and Morphology. *Front. Physiol.* 8.
- Couratier, P., Corcia, P., Lautrette, G., Nicol, M., Preux, P.-M., and Marin, B. (2016). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Rev. Neurol. (Paris)* 172, 37–45.
- Cramer, P.E., Cirrito, J.R., Wesson, D.W., Daniel Lee, C.Y., Karlo, J.C., Zinn, A.E., Casali, B.T., Restivo, J.L., Goebel, W.D., James, M.J., et al. (2012). ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear  $\beta$ -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science* 335, 1503–1506.
- Cruts, M., Dermaut, B., Rademakers, R., Roks, G., Van den Broeck, M., Munteanu, G., van Duijn, C.M., and Van Broeckhoven, C. (2001). Amyloid  $\beta$  secretase gene (BACE) is neither mutated in nor associated with early-onset Alzheimer’s disease. *Neurosci. Lett.* 313, 105–107.
- Cruz, M.P. (2018). Edaravone (Radicava). *Pharm. Ther.* 43, 25–28.
- Cushman, M., Johnson, B.S., King, O.D., Gitler, A.D., and Shorter, J. (2010). Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. *J. Cell Sci.* 123, 1191–1201.
- Danbolt, N.C., Furness, D.N., and Zhou, Y. (2016). Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochem. Int.* 98, 29–45.

- Daniel Lee, C.Y., and Landreth, G.E. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 *117*, 949–960.
- De Strooper, B., Iwatsubo, T., and Wolfe, M.S. (2012). Presenilins and  $\gamma$ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006304.
- Desport, J.-C., Torny, F., Lacoste, M., Preux, P.-M., and Couratier, P. (2005). Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegener. Dis.* 2, 202–207.
- Dewey, C.M., Cenik, B., Sephton, C.F., Dries, D.R., Mayer, P., Good, S.K., Johnson, B.A., Herz, J., and Yu, G. (2011). TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1098–1108.
- Dobrowolny, G., Lepore, E., Martini, M., Barberi, L., Nunn, A., Scicchitano, B.M., and Musarò, A. (2018). Metabolic Changes Associated With Muscle Expression of SOD1G93A. *Front. Physiol.* 9.
- Dobrowolska Zakaria, J.A., and Vassar, R.J. (2018). A promising, novel, and unique BACE1 inhibitor emerges in the quest to prevent Alzheimer’s disease. *EMBO Mol. Med.* e9717.
- Donoviel, D.B., Hadjantonakis, A.K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P.S., and Bernstein, A. (1999). Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev.* 13, 2801–2810.
- Duering, M., Grimm, M.O.W., Grimm, H.S., Schröder, J., and Hartmann, T. (2005). Mean age of onset in familial Alzheimer’s disease is determined by amyloid beta 42. *Neurobiol. Aging* 26, 785–788.
- Dunkel, P., Chai, C.L., Sperlágh, B., Huleatt, P.B., and Mátyus, P. (2012). Clinical utility of neuroprotective agents in neurodegenerative diseases: current status of drug development for Alzheimer’s, Parkinson’s and Huntington’s diseases, and amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin. Investig. Drugs* 21, 1267–1308.
- Dunys, J., Kawarai, T., Giaime, E., Wilk, S., Herrant, M., Auberger, P., St George-Hyslop, P., Alves da Costa, C., and Checler, F. (2007). Study on the putative contribution of caspases and the proteasome to the degradation of Aph-1a and Pen-2. *Neurodegener. Dis.* 4, 156–163.
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J.-L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., Seilhean, D., Hauw, J.-J., Lacomblez, L., Loeffler, J.-P., et al. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70, 1004–1009.
- Ebke, A., Luebbbers, T., Fukumori, A., Shirotani, K., Haass, C., Baumann, K., and Steiner, H. (2011). Novel  $\gamma$ -secretase enzyme modulators directly target presenilin protein. *J. Biol. Chem.* 286, 37181–37186.
- Eckman, E.A., Reed, D.K., and Eckman, C.B. (2001). Degradation of the Alzheimer’s amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 276, 24540–24548.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* 5, 486–488.
- El, Y.B., Kanner, S., Barzilai, A., and Hanein, Y. (2018). Activity changes in neuron-astrocyte networks in culture under the effect of norepinephrine. *PLOS ONE* 13, e0203761.
- Epis, R., Marcello, E., Gardoni, F., and Di Luca, M. (2012). Alpha, beta-and gamma-secretases in Alzheimer’s disease. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 4, 1126–1150.

- Esler, W.P., and Wolfe, M.S. (2001). A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science* 293, 1449–1454.
- Falcon, B., Noad, J., McMahon, H., Randow, F., and Goedert, M. (2018). Galectin-8-mediated selective autophagy protects against seeded tau aggregation. *J. Biol. Chem.* 293, 2438–2451.
- Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., Pursglove, S.E., Bergman, A., Winblad, B., and Näslund, J. (2003). Partial purification and characterization of gamma-secretase from post-mortem human brain. *J. Biol. Chem.* 278, 24277–24284.
- Fernandez, M.A., Klutkowski, J.A., Freret, T., and Wolfe, M.S. (2014). Alzheimer presenilin-1 mutations dramatically reduce trimming of long amyloid  $\beta$ -peptides (A $\beta$ ) by  $\gamma$ -secretase to increase 42-to-40-residue A $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 289, 31043–31052.
- Ferraiuolo, L., Higginbottom, A., Heath, P.R., Barber, S., Greenald, D., Kirby, J., and Shaw, P.J. (2011). Dysregulation of astrocyte–motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134, 2627–2641.
- Ferri, A., and Coccurello, R. (2017). What is “Hyper” in the ALS Hypermetabolism? *Mediators Inflamm.* 2017.
- Fiesel, F.C., Voigt, A., Weber, S.S., Van den Haute, C., Waldenmaier, A., Görner, K., Walter, M., Anderson, M.L., Kern, J.V., Rasse, T.M., et al. (2010). Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. *EMBO J.* 29, 209–221.
- Forman, M.S., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2007). TDP-43: a novel neurodegenerative proteinopathy. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 548–555.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., et al. (2002). aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell* 3, 85–97.
- Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T., and Irizarry, M.C. (2002). Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59, 1381–1389.
- Funalot, B., Desport, J.-C., Sturtz, F., Camu, W., and Couratier, P. (2009). High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 10, 113–117.
- Gallo, V., Wark, P.A., Jenab, M., Pearce, N., Brayne, C., Vermeulen, R., Andersen, P.M., Hallmans, G., Kyrozis, A., Vanacore, N., et al. (2013). Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 80, 829–838.
- Garner, C.C., Waites, C.L., and Ziv, N.E. (2006). Synapse development: still looking for the forest, still lost in the trees. *Cell Tissue Res.* 326, 249–262.
- Ghosh, A.K., and Tang, J. (2015). Prospects of  $\beta$ -Secretase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *ChemMedChem* 10, 1463–1466.
- Gibson, G.E., and Thakkar, A. (2017). Interactions of Mitochondria/Metabolism and Calcium Regulation in Alzheimer’s Disease - A Calcineurin Point of View. *Neurochem. Res.* 42, 1636–1648.



- Gil, J., Vazquez, M.C., Ketzoian, C., Perna, A., Marin, B., Preux, P.M., and Couratier, P. (2009). Prognosis of ALS: Comparing data from the Limousin referral centre, France, and a Uruguayan population. *Amyotroph. Lateral Scler.* *10*, 355–360.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* *330*, 841–845.
- Gitler, A.D., and Shorter, J. (2011). RNA-binding proteins with prion-like domains in ALS and FTLD-U. *Prion* *5*, 179–187.
- Giuffrida, M.L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., Molinaro, G., Pappalardo, G., Messina, A., Palmigiano, A., et al. (2009). Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 10582–10587.
- Giuffrida, M.L., Caraci, F., De Bona, P., Pappalardo, G., Nicoletti, F., Rizzarelli, E., and Copani, A. (2010). The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology. *Rev. Neurosci.* *21*, 83–93.
- Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *120*, 885–890.
- Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J.P., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Xu, H., et al. (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* *156*, 15–20.
- Grateau, G., Verine, J., Delpech, M., and Ries, M. (2005). Les amyloses, un modèle de maladie du repliement des protéines. *Médecine/Sciences* *21*, 627–633.
- Gu, J., Wu, F., Xu, W., Shi, J., Hu, W., Jin, N., Qian, W., Wang, X., Iqbal, K., Gong, C.-X., et al. (2017). TDP-43 suppresses tau expression via promoting its mRNA instability. *Nucleic Acids Res.* *45*, 6177–6193.
- Guerrero, E.N., Wang, H., Mitra, J., Hegde, P.M., Stowell, S.E., Liachko, N.F., Kraemer, B.C., Garruto, R.M., Rao, K.S., and Hegde, M.L. (2016). TDP-43/FUS in Motor Neuron Disease: Complexity and Challenges. *Prog. Neurobiol.* *145–146*, 78–97.
- Gulisano, W., Melone, M., Li Puma, D.D., Tropea, M.R., Palmeri, A., Arancio, O., Grassi, C., Conti, F., and Puzzo, D. (2018). The effect of amyloid- $\beta$  peptide on synaptic plasticity and memory is influenced by different isoforms, concentrations, and aggregation status. *Neurobiol. Aging* *71*, 51–60.
- Guo, Q., Furukawa, K., Sopher, B.L., Pham, D.G., Xie, J., Robinson, N., Martin, G.M., and Mattson, M.P. (1996). Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. *Neuroreport* *8*, 379–383.
- Hall, G.F., and Patuto, B.A. (2012). Is tau ready for admission to the prion club? *Prion* *6*, 223–233.
- Han, X., Yang, L., Du, H., Sun, Q., Wang, X., Cong, L., Liu, X., Yin, L., Li, S., and Du, Y. (2016). Insulin Attenuates Beta-Amyloid-Associated Insulin/Akt/EAAT Signaling Perturbations in Human Astrocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* *36*, 851–864.

Hansson, E., and Rönnbäck, L. (2004). Glial-neuronal signaling and astroglial swelling in physiology and pathology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 559, 313–323.

Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.

Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.

Harris, M.E., Carney, J.M., Cole, P.S., Hensley, K., Howard, B.J., Martin, L., Bummer, P., Wang, Y., Pedigo, N.W., and Butterfield, D.A. (1995). beta-Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 6, 1875–1879.

Hasegawa, H., Sanjo, N., Chen, F., Gu, Y.-J., Shier, C., Petit, A., Kawarai, T., Katayama, T., Schmidt, S.D., Mathews, P.M., et al. (2004). Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes. *J. Biol. Chem.* 279, 46455–46463.

Hashimoto, S., and Saido, T.C. (2018). Critical review: involvement of endoplasmic reticulum stress in the aetiology of Alzheimer's disease. *Open Biol.* 8.

Hayden, E.Y., and Teplow, D.B. (2013). Amyloid  $\beta$ -protein oligomers and Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 5, 60.

He, G., Luo, W., Li, P., Remmers, C., Netzer, W.J., Hendrick, J., Bettayeb, K., Flajolet, M., Gorelick, F., Wennogle, L.P., et al. (2010). Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature* 467, 95–98.

Hébert, S.S., Serneels, L., Dejaegere, T., Horré, K., Dabrowski, M., Baert, V., Annaert, W., Hartmann, D., and De Strooper, B. (2004). Coordinated and widespread expression of gamma-secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol. Dis.* 17, 260–272.

Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62, 1377–1391.

Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Umans, L., Schrijvers, V., Checler, F., Vanderstichele, H., et al. (1999). Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11872–11877.

Herreman, A., Van Gassen, G., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W., and De Strooper, B. (2003). gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J. Cell Sci.* 116, 1127–1136.

Hippius, H., and Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 5, 101–108.

Hock, C., Konietzko, U., Papassotiropoulos, A., Wollmer, A., Streffer, J., von Rotz, R.C., Davey, G., Moritz, E., and Nitsch, R.M. (2002). Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nat. Med.* 8, 1270–1275.

- van de Hoef, D.L., Hughes, J., Livne-Bar, I., Garza, D., Konsolaki, M., and Boulianne, G.L. (2009). Identifying genes that interact with Drosophila presenilin and amyloid precursor protein. *Genes*. N. Y. N 2000 *47*, 246–260.
- Holmes, B.B., DeVos, S.L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., Ouidja, M.O., Brodsky, F.M., Marasa, J., Bagchi, D.P., et al. (2013). Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E3138-3147.
- Holsinger, R.M.D., McLean, C.A., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Evin, G. (2002). Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* *51*, 783–786.
- Howell, S., Nalbantoglu, J., and Crine, P. (1995). Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides* *16*, 647–652.
- Hu, C., Zeng, L., Li, T., Meyer, M.A., Cui, M.-Z., and Xu, X. (2016). Nicastrin is required for APP but not Notch processing, while Aph-1 is dispensable for processing of both APP and Notch. *J. Neurochem.* *136*, 1246–1258.
- Hu, J., Igarashi, A., Kamata, M., and Nakagawa, H. (2001). Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* *276*, 47863–47868.
- Huang, Y., and Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* *148*, 1204–1222.
- Huang, J.Y., Bruno, A.M., Patel, C.A., Huynh, A.M., Philibert, K.D., Glucksman, M.J., and Marr, R.A. (2008). Human membrane metallo-endopeptidase-like protein degrades both beta-amyloid 42 and beta-amyloid 40. *Neuroscience* *155*, 258–262.
- Huang, S., Tong, H., Lei, M., Zhou, M., Guo, W., Li, G., Tang, X., Li, Z., Mo, M., Zhang, X., et al. (2018). Astrocytic glutamatergic transporters are involved in A $\beta$ -induced synaptic dysfunction. *Brain Res.* *1678*, 129–137.
- Huisman, M.H.B., Seelen, M., van Doormaal, P.T.C., de Jong, S.W., de Vries, J.H.M., van der Kooij, A.J., de Visser, M., Schelhaas, H.J., van den Berg, L.H., and Veldink, J.H. (2015). Effect of Presymptomatic Body Mass Index and Consumption of Fat and Alcohol on Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* *72*, 1155–1162.
- Huppert, S.S., Ilagan, M.X.G., De Strooper, B., and Kopan, R. (2005). Analysis of Notch function in presomitic mesoderm suggests a gamma-secretase-independent role for presenilins in somite differentiation. *Dev. Cell* *8*, 677–688.
- Hutchins, K.D., Dickson, D.W., Rashbaum, W.K., and Lyman, W.D. (1990). Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *55*, 95–102.
- Ikegaya, Y., Itsukaichi-Nishida, Y., Ishihara, M., Tanaka, D., and Matsuki, N. (2000). Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150  $\mu$ m. *Neuroscience* *97*, 215–217.
- Ilieva, H., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J. Cell Biol.* *187*, 761–772.

- Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Ozawa, K., and Saido, T.C. (2004). Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 991–998.
- Iwata, N., Higuchi, M., and Saido, T.C. (2005). Metabolism of amyloid- $\beta$  peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* *108*, 129–148.
- Jack, C.R., and Holtzman, D.M. (2013). Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron* *80*, 1347–1358.
- Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y.J., Chun, Y.E., Park, M., Woo, D.H., Bae, J.Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., et al. (2014). GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* *20*, 886–896.
- Kaether, C., Capell, A., Edbauer, D., Winkler, E., Novak, B., Steiner, H., and Haass, C. (2004). The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and  $\gamma$ -secretase activity. *EMBO J.* *23*, 4738–4748.
- Kanai, Y., Smith, C.P., and Hediger, M.A. (1993). A new family of neurotransmitter transporters: the high-affinity glutamate transporters. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *7*, 1450–1459.
- Kandalepas, P.C., Sadleir, K.R., Eimer, W.A., Zhao, J., Nicholson, D.A., and Vassar, R. (2013). The Alzheimer's  $\beta$ -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *126*, 329–352.
- Kang, D.E., Yoon, I.S., Repetto, E., Busse, T., Yermian, N., Je, L., and Koo, E.H. (2005). Presenilins mediate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and ERK activation via select signaling receptors. Selectivity of PS2 in platelet-derived growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 31537–31547.
- Kang, J., Shin, S., Perrimon, N., and Shen, J. (2017). An Evolutionarily Conserved Role of Presenilin in Neuronal Protection in the Aging *Drosophila* Brain. *Genetics* *206*, 1479–1493.
- Karran, E., and Hardy, J. (2014). A critique of the drug discovery and phase 3 clinical programs targeting the amyloid hypothesis for Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* *76*, 185–205.
- Kasarskis, E.J., Berryman, S., Vanderleest, J.G., Schneider, A.R., and McClain, C.J. (1996). Nutritional status of patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to the proximity of death. *Am. J. Clin. Nutr.* *63*, 130–137.
- Kawahara, Y., and Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3347–3352.
- Kayed, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C.W., Necula, M., Margol, L., Wu, J., Breydo, L., Thompson, J.L., et al. (2007). Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol. Neurodegener.* *2*, 18.
- Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., and Zoing, M.C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* *377*, 942–955.
- Kimberly, W.T., and Wolfe, M.S. (2003). Identity and function of gamma-secretase. *J. Neurosci. Res.* *74*, 353–360.

- King, A.E., Woodhouse, A., Kirkcaldie, M.T.K., and Vickers, J.C. (2016). Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? *Exp. Neurol.* 275 Pt 1, 162–171.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T.C., and Hashimoto, Y. (2001). Alzheimer's  $\beta$ -secretase,  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13554–13559.
- Klunk, W.E., Jacob, R.F., and Mason, R.P. (1999). Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods Enzymol.* 309, 285–305.
- Koistinen, H., Prinjha, R., Soden, P., Harper, A., Banner, S.J., Pradat, P.-F., Loeffler, J.-P., and Dingwall, C. (2006). Elevated levels of amyloid precursor protein in muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis and a mouse model of the disease. *Muscle Nerve* 34, 444–450.
- Kontush, A. (2001). Alzheimer's amyloid-beta as a preventive antioxidant for brain lipoproteins. *Cell. Mol. Neurobiol.* 21, 299–315.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., and Selkoe, D.J. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4044–4048.
- Kovacs, D.M., Fausett, H.J., Page, K.J., Kim, T.W., Moir, R.D., Merriam, D.E., Hollister, R.D., Hallmark, O.G., Mancini, R., Felsenstein, K.M., et al. (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat. Med.* 2, 224–229.
- Kovacs, D.M., Mancini, R., Henderson, J., Na, S.J., Schmidt, S.D., Kim, T.W., and Tanzi, R.E. (1999). Staurosporine-induced activation of caspase-3 is potentiated by presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutations in human neuroglioma cells. *J. Neurochem.* 73, 2278–2285.
- Koyama, A., Okereke, O.I., Yang, T., Blacker, D., Selkoe, D.J., and Grodstein, F. (2012). Plasma amyloid- $\beta$  as a predictor of dementia and cognitive decline: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Neurol.* 69, 824–831.
- Krabbe, G., Halle, A., Matyash, V., Rinnenthal, J.L., Eom, G.D., Bernhardt, U., Miller, K.R., Prokop, S., Kettenmann, H., and Heppner, F.L. (2013). Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *PLoS ONE* 8.
- Kuhn, P.-H., Colombo, A.V., Schusser, B., Dreymueller, D., Wetzell, S., Schepers, U., Herber, J., Ludwig, A., Kremmer, E., Montag, D., et al. Systematic substrate identification indicates a central role for the metalloprotease ADAM10 in axon targeting and synapse function. *eLife* 5.
- Kundra, R., Ciryam, P., Morimoto, R.I., Dobson, C.M., and Vendruscolo, M. (2017). Protein homeostasis of a metastable subproteome associated with Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E5703–E5711.
- Kuo, P.-H., Doudeva, L.G., Wang, Y.-T., Shen, C.-K.J., and Yuan, H.S. (2009). Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Res.* 37, 1799–1808.
- Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J., and Roher, A.E. (1996). Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* 271, 4077–4081.

- Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Woods, A.S., Cotter, R.J., and Roher, A.E. (1997). Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 188–191.
- Kurochkin, I.V., and Goto, S. (1994). Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* 345, 33–37.
- Kwiatkowski, T.J., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., et al. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205–1208.
- Lamanauskas, N., and Nistri, A. (2008). Riluzole blocks persistent Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2501–2514.
- Laporte, V., Lombard, Y., Levy-Benezra, R., Tranchant, C., Poindron, P., and Warter, J.-M. (2004). Uptake of Aβ 1–40- and Aβ 1–42-coated yeast by microglial cells: a role for LRP. *J. Leukoc. Biol.* 76, 451–461.
- Laudon, H., Hansson, E.M., Melén, K., Bergman, A., Farmery, M.R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G., and Näslund, J. (2005). A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J. Biol. Chem.* 280, 35352–35360.
- Ledesma, M.D., Abad-Rodriguez, J., Galvan, C., Biondi, E., Navarro, P., Delacourte, A., Dingwall, C., and Dotti, C.G. (2003). Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep.* 4, 1190–1196.
- Lee, K., Suzuki, H., Aiso, S., and Matsuoka, M. (2012). Overexpression of TDP-43 causes partially p53-dependent G2/M arrest and p53-independent cell death in HeLa cells. *Neurosci. Lett.* 506, 271–276.
- Lee, M.K., Slunt, H.H., Martin, L.J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S.E., Seeger, M., Koo, E., Price, D.L., and Sisodia, S.S. (1996). Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 7513–7525.
- Lee, S.-F., Shah, S., Yu, C., Wigley, W.C., Li, H., Lim, M., Pedersen, K., Han, W., Thomas, P., Lundkvist, J., et al. (2004). A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the gamma-secretase complex. *J. Biol. Chem.* 279, 4144–4152.
- Leroy, F., and Zytnicki, D. (2015). Is hyperexcitability really guilty in amyotrophic lateral sclerosis? *Neural Regen. Res.* 10, 1413–1415.
- Levitan, D., and Greenwald, I. (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 377, 351–354.
- Lewczuk, P., Esselmann, H., Bibl, M., Paul, S., Svitek, J., Miertschischk, J., Meyrer, R., Smirnov, A., Maler, J.M., Klein, C., et al. (2004). Electrophoretic separation of amyloid β peptides in plasma. *ELECTROPHORESIS* 25, 3336–3343.
- Li, S., Mallory, M., Alford, M., Tanaka, S., and Masliah, E. (1997). Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 901–911.

- Li, S., Zhang, P., Freibaum, B.D., Kim, N.C., Kolaitis, R.-M., Molliex, A., Kanagaraj, A.P., Yabe, I., Tanino, M., Tanaka, S., et al. (2016). Genetic interaction of hnRNPA2B1 and DNAJB6 in a *Drosophila* model of multisystem proteinopathy. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 936–950.
- Ling, J.P., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., and Wong, P.C. (2015). TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science* *349*, 650–655.
- Liu, Y., Wang, T., Ji, Y.J., Johnson, K., Liu, H., Johnson, K., Bailey, S., Suk, Y., Lu, Y.-N., Liu, M., et al. (2018). A C9orf72-CARM1 axis regulates lipid metabolism under glucose starvation-induced nutrient stress. *Genes Dev.*
- Lu, D.C., Shaked, G.M., Masliah, E., Bredesen, D.E., and Koo, E.H. (2003a). Amyloid beta protein toxicity mediated by the formation of amyloid-beta protein precursor complexes. *Ann. Neurol.* *54*, 781–789.
- Lu, D.C., Soriano, S., Bredesen, D.E., and Koo, E.H. (2003b). Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. *J. Neurochem.* *87*, 733–741.
- Lu, M.-H., Ji, W.-L., Xu, D.-E., Yao, P.-P., Zhao, X.-Y., Wang, Z.-T., Fang, L.-P., Huang, R., Lan, L.-J., Chen, J.-B., et al. (2019). Inhibition of sphingomyelin synthase 1 ameliorates alzheimer-like pathology in APP/PS1 transgenic mice through promoting lysosomal degradation of BACE1. *Exp. Neurol.* *311*, 67–79.
- Ma, G., Li, T., Price, D.L., and Wong, P.C. (2005). APH-1a is the principal mammalian APH-1 isoform present in gamma-secretase complexes during embryonic development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 192–198.
- Marin, M.A., Ziburkus, J., Jankowsky, J., and Rasband, M.N. (2016). Amyloid- $\beta$  plaques disrupt axon initial segments. *Exp. Neurol.* *281*, 93–98.
- Martinou, J.C., Martinou, I., and Kato, A.C. (1992). Cholinergic differentiation factor (CDF/LIF) promotes survival of isolated rat embryonic motoneurons in vitro. *Neuron* *8*, 737–744.
- Masliah, E., Alford, M., DeTeresa, R., Mallory, M., and Hansen, L. (1996). Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* *40*, 759–766.
- Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N., and Beyreuther, K. (1985). Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* *4*, 2757–2763.
- Mattson, M.P. (2004). Pathways Towards and Away from Alzheimer's Disease. *Nature* *430*, 631–639.
- McDermott, J.R., and Gibson, A.M. (1997). Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochem. Res.* *22*, 49–56.
- McDonald, K.K., Aulas, A., Destroismaisons, L., Pickles, S., Beleac, E., Camu, W., Rouleau, G.A., and Vande Velde, C. (2011). TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1400–1410.
- McFerrin, J., Engel, W.K., and Askanas, V. (1998). Impaired innervation of cultured human muscle overexpressing betaAPP experimentally and genetically: relevance to inclusion-body myopathies. *Neuroreport* *9*, 3201–3205.

- Mielke, M.M., Haughey, N.J., Bandaru, V.V.R., Zetterberg, H., Blennow, K., Andreasson, U., Johnson, S.C., Gleason, C.E., Blazel, H.M., Puglielli, L., et al. (2014). CSF sphingolipids,  $\beta$ -amyloid, and tau in adults at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 35, 2486–2494.
- Minnasch, P., Yamamoto, Y., Ohkubo, I., and Nishi, K. (2003). Demonstration of puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase in Alzheimer disease brain. *Leg. Med. Tokyo Jpn. 5 Suppl 1*, S285-287.
- Mitsuda, N., Ohkubo, N., Maeda, N., Ohkubo, N., Tohyama, M., and Ogihara, T. (2001). [Transcriptional regulation of the presenilin-1 gene by cAMP-response element binding protein]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi Jpn. J. Geriatr.* 38, 772–774.
- Mohajeri, M.H., Wollmer, M.A., and Nitsch, R.M. (2002). Abeta 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 35460–35465.
- Moloney, E.B., de Winter, F., and Verhaagen, J. (2014). ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Front. Neurosci.* 8.
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., et al. (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 982–985.
- Mori, H., Takio, K., Ogawara, M., and Selkoe, D.J. (1992). Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 267, 17082–17086.
- Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J., and Lewczuk, P. (2018). Amyloid  $\beta$  oligomers (A $\beta$ O<sub>s</sub>) in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 125, 177–191.
- Mudher, A., Colin, M., Dujardin, S., Medina, M., Dewachter, I., Alavi Naini, S.M., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., Buée, L., Goedert, M., et al. (2017). What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 99.
- Murray, M.M., Bernstein, S.L., Nyugen, V., Condron, M.M., Teplow, D.B., and Bowers, M.T. (2009). Amyloid beta protein: Abeta40 inhibits Abeta42 oligomerization. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 6316–6317.
- Nag, S., Yu, L., Wilson, R.S., Chen, E.-Y., Bennett, D.A., and Schneider, J.A. (2017). TDP-43 pathology and memory impairment in elders without pathologic diagnoses of AD or FTLD. *Neurology* 88, 653–660.
- Nagao, S., Kwak, S., and Kanazawa, I. (1997). EAAT4, a glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantly localized in Purkinje cell dendrites, and forms parasagittal compartments in rat cerebellum. *Neuroscience* 78, 929–933.
- Nakai, T., Yamasaki, A., Sakaguchi, M., Kosaka, K., Mihara, K., Amaya, Y., and Miura, S. (1999). Membrane topology of Alzheimer's disease-related presenilin 1. Evidence for the existence of a molecular species with a seven membrane-spanning and one membrane-embedded structure. *J. Biol. Chem.* 274, 23647–23658.
- Näslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A.D., Tjernberg, L.O., Silberring, J., Gandy, S.E., Winblad, B., and Greengard, P. (1994). Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8378–8382.



- Nayak, D., Roth, T.L., and McGavern, D.B. (2014). Microglia Development and function. *Annu. Rev. Immunol.* *32*, 367–402.
- Nhan, H.S., Chiang, K., and Koo, E.H. (2015). The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *129*, 1–19.
- Oddo, S., Caccamo, A., Smith, I.F., Green, K.N., and LaFerla, F.M. (2006). A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta. *Am. J. Pathol.* *168*, 184–194.
- Oehlich, D., Prokopcova, H., and Gijzen, H.J.M. (2014). The evolution of amidine-based brain penetrant BACE1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *24*, 2033–2045.
- Ohyagi, Y., Asahara, H., Chui, D.-H., Tsuruta, Y., Sakae, N., Miyoshi, K., Yamada, T., Kikuchi, H., Taniwaki, T., Murai, H., et al. (2005). Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 255–257.
- O'Reilly, É.J., Wang, H., Weisskopf, M.G., Fitzgerald, K.C., Falcone, G., McCullough, M.L., Thun, M., Park, Y., Kolonel, L.N., and Ascherio, A. (2013). Premorbid Body Mass Index and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* *14*, 205–211.
- Osborn, L.M., Kamphuis, W., Wadman, W.J., and Hol, E.M. (2016). Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* *144*, 121–141.
- Pacheco-Quinto, J., Eckman, C.B., and Eckman, E.A. (2016). Major amyloid- $\beta$ -degrading enzymes, endothelin-converting enzyme-2 and neprilysin, are expressed by distinct populations of GABAergic interneurons in hippocampus and neocortex. *Neurobiol. Aging* *48*, 83–92.
- Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S.T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A.-L., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J.-P., et al. (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol. Med.* *7*, 526–546.
- Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Müller, U., et al. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* *46*, 541–554.
- Pardossi-Piquard, R., Böhm, C., Chen, F., Kanemoto, S., Checler, F., Schmitt-Ulms, G., St George-Hyslop, P., and Fraser, P.E. (2009). TMP21 transmembrane domain regulates gamma-secretase cleavage. *J. Biol. Chem.* *284*, 28634–28641.
- Parkin, G.M., Udawela, M., Gibbons, A., and Dean, B. (2018). Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders. *World J. Psychiatry* *8*, 51–63.
- Pasternak, S.H., Bagshaw, R.D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C.A., Pak, B.J., Callahan, J.W., and Mahuran, D.J. (2003). Presenilin-1, Nicastrin, Amyloid Precursor Protein, and  $\gamma$ -Secretase Activity Are Co-localized in the Lysosomal Membrane. *J. Biol. Chem.* *278*, 26687–26694.
- Pastorcic, M., and Das, H.K. (2007). Analysis of transcriptional modulation of the presenilin 1 gene promoter by ZNF237, a candidate binding partner of the Ets transcription factor ERM. *Brain Res.* *1128*, 21–32.

- Patil, S., and Chan, C. (2005). Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* *384*, 288–293.
- Patten, S.A., Armstrong, G.A.B., Lissouba, A., Kabashi, E., Parker, J.A., and Drapeau, P. (2014). Fishing for causes and cures of motor neuron disorders. *Dis. Model. Mech.* *7*, 799–809.
- Pelletier, S., Gingras, S., Howell, S., Vogel, P., and Ihle, J.N. (2012). An early onset progressive motor neuron disorder in Scyl1-deficient mice is associated with mislocalization of TDP-43. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 16560–16573.
- Perea, G., Sur, M., and Araque, A. (2014). Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.
- Pérez, A., Morelli, L., Cresto, J.C., and Castaño, E.M. (2000). Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem. Res.* *25*, 247–255.
- Perez-Tur, J., Froelich, S., Prihar, G., Crook, R., Baker, M., Duff, K., Wragg, M., Busfield, F., Lendon, C., and Clark, R.F. (1995). A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* *7*, 297–301.
- Pesiridis, G.S., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2009). Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* *18*, R156-162.
- Peter, R.S., Rosenbohm, A., Dupuis, L., Brehme, T., Kassubek, J., Rothenbacher, D., Nagel, G., and Ludolph, A.C. (2017). Life course body mass index and risk and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: results from the ALS registry Swabia. *Eur. J. Epidemiol.* *32*, 901–908.
- Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., and Hermine, O. (2017). ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? *Front. Aging Neurosci.* *9*.
- Pierrot, N., Ghisdal, P., Caumont, A.-S., and Octave, J.-N. (2004). Intraneuronal amyloid-beta1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death. *J. Neurochem.* *88*, 1140–1150.
- Podlisny, M.B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., Diehl, T., Levesque, G., Fraser, P., Haass, C., et al. (1997). Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiol. Dis.* *3*, 325–337.
- Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K.R., Huelga, S.C., Moran, J., Liang, T.Y., Ling, S.-C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., et al. (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat. Neurosci.* *14*, 459–468.
- Pow, D.V., and Cook, D.G. (2009). Neuronal expression of splice variants of “glial” glutamate transporters in brains afflicted by Alzheimer's disease: unmasking an intrinsic neuronal property. *Neurochem. Res.* *34*, 1748–1757.
- Pradat, P.-F., Camdessanché, J.-P., Carlier, L., Cintas, P., Corcia, P., Danel-Brunaud, V., Echaniz-Laguna, A., Gonzalez, J., Nicolas, G., Vandenberghe, N., et al. (2009). [Update on fundamental and clinical research in amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev. Neurol. (Paris)* *165*, 532–541.

- Pradat, P.-F., Kabashi, E., and Desnuelle, C. (2015). Deciphering spreading mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis: clinical evidence and potential molecular processes. *Curr. Opin. Neurol.* *28*, 455–461.
- Rawson, R.B. (2013). The site-2 protease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1828*, 2801–2807.
- Renbaum, P., Beerli, R., Gabai, E., Amiel, M., Gal, M., Ehrenguber, M.U., and Levy-Lahad, E. (2003). Egr-1 upregulates the Alzheimer's disease presenilin-2 gene in neuronal cells. *Gene* *318*, 113–124.
- Renton, A.E., Chiò, A., and Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* *17*, 17–23.
- Rodríguez-Martín, T., Cuchillo-Ibáñez, I., Noble, W., Nyenya, F., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (2013). Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation. *Neurobiol. Aging* *34*, 2146–2157.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., and Deng, H.X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* *362*, 59–62.
- Russo, C., Saido, T.C., DeBusk, L.M., Tabaton, M., Gambetti, P., and Teller, J.K. (1997). Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett.* *409*, 411–416.
- Russo, C., Venezia, V., Salis, S., Dolcini, V., and Schettini, G. (2002). Molecular aspects of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Funct. Neurol.* *17*, 65–70.
- Sadleir, K.R., Kandalepas, P.C., Buggia-Prévot, V., Nicholson, D.A., Thinakaran, G., and Vassar, R. (2016). Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A $\beta$  generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *132*, 235–256.
- Saido, T.C., Yamao-Harigaya, W., Iwatsubo, T., and Kawashima, S. (1996). Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* *215*, 173–176.
- Saito, S., and Araki, W. (2005). Expression profiles of two human APH-1 genes and their roles in formation of presenilin complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *327*, 18–22.
- Saito, S., Takahashi-Sasaki, N., and Araki, W. (2005). Identification and characterization of a novel human APH-1b splice variant lacking exon 4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *330*, 1068–1072.
- Sakono, M., and Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J.* *277*, 1348–1358.
- Sala Frigerio, C., Piscopo, P., Calabrese, E., Crestini, A., Malvezzi Campeggi, L., Civita di Fava, R., Fogliarino, S., Albani, D., Marcon, G., Cherchi, R., et al. (2005). PEN-2 gene mutation in a familial Alzheimer's disease case. *J. Neurol.* *252*, 1033–1036.
- Sambamurti, K., Greig, N.H., and Lahiri, D.K. (2002). Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* *1*, 1–31.

- Sancheti, H., Patil, I., Kanamori, K., Brinton, R.D., Zhang, W., Lin, A.-L., and Cadenas, E. (2014). Hypermetabolic State in the 7-Month-Old Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease and the Effect of Lipoic Acid: A <sup>13</sup>C-NMR Study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *34*, 1749–1760.
- Sandebring, A., Welander, H., Winblad, B., Graff, C., and Tjernberg, L.O. (2013). The Pathogenic Aβ<sub>43</sub> Is Enriched in Familial and Sporadic Alzheimer Disease. *PLoS ONE* *8*.
- Sato, T., Diehl, T.S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., and Wolfe, M.S. (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J. Biol. Chem.* *282*, 33985–33993.
- Saura, C.A., Choi, S.-Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., Kelleher, R.J., Kandel, E.R., Duff, K., et al. (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* *42*, 23–36.
- Savage, M.J., Kalinina, J., Wolfe, A., Tugusheva, K., Korn, R., Cash-Mason, T., Maxwell, J.W., Hatcher, N.G., Haugabook, S.J., Wu, G., et al. (2014). A sensitive aβ oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 2884–2897.
- Schlachetzki, J.C.M., and Hüll, M. (2009). Microglial activation in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* *6*, 554–563.
- Schmitt, F., Hussain, G., Dupuis, L., Loeffler, J.-P., and Henriques, A. (2014). A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. *Front. Cell. Neurosci.* *8*, 25.
- Scott, H.L., Pow, D.V., Tannenberg, A.E., and Dodd, P.R. (2002). Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *22*, RC206–1.
- Selkoe, D.J. (2001). Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 11039–11041.
- Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* *8*, 595–608.
- Seo, H., Ferree, A.W., and Isacson, O. (2002). Cortico-hippocampal APP and NGF levels are dynamically altered by cholinergic muscarinic antagonist or M1 agonist treatment in normal mice. *Eur. J. Neurosci.* *15*, 498–506.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *1*.
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P.H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., et al. (2016). The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature* *537*, 50–56.
- Shah, S., Lee, S.-F., Tabuchi, K., Hao, Y.-H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., Südhof, T., and Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* *122*, 435–447.
- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., and Sabatini, B.L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 2866–2875.

- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* *14*, 837–842.
- Shellikeri, S., Karthikeyan, V., Martino, R., Black, S.E., Zinman, L., Keith, J., and Yunusova, Y. (2017). The Neuropathological Signature of Bulbar-onset ALS: A Systematic Review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *75*, 378–392.
- Shirotani, K., Tsubuki, S., Iwata, N., Takaki, Y., Harigaya, W., Maruyama, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H., Iwata, H., Tomita, T., et al. (2001). Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J. Biol. Chem.* *276*, 21895–21901.
- Shirotani, K., Tsubuki, S., Lee, H.-J., Maruyama, K., and Saido, T.C. (2002). Generation of amyloid beta peptide with pyroglutamate at position 3 in primary cortical neurons. *Neurosci. Lett.* *327*, 25–28.
- Shirotani, K., Edbauer, D., Prokop, S., Haass, C., and Steiner, H. (2004). Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants. *J. Biol. Chem.* *279*, 41340–41345.
- Singer, C.A., Figueroa-Masot, X.A., Batchelor, R.H., and Dorsa, D.M. (1999). The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 2455–2463.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J.M., and Westermark, P. (2012). Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* *19*, 167–170.
- Spasic, D., Tolia, A., Dillen, K., Baert, V., De Strooper, B., Vrijens, S., and Annaert, W. (2006). Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* *281*, 26569–26577.
- Sreedharan, J. (2010). Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): what can we learn from genetics? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* *9*, 259–267.
- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., et al. (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* *319*, 1668–1672.
- Steiner, H., Capell, A., Pesold, B., Citron, M., Kloetzel, P.M., Selkoe, D.J., Romig, H., Mendla, K., and Haass, C. (1998). Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J. Biol. Chem.* *273*, 32322–32331.
- Steiner, H., Romig, H., Pesold, B., Philipp, U., Baader, M., Citron, M., Loetscher, H., Jacobsen, H., and Haass, C. (1999). Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry (Mosc.)* *38*, 14600–14605.
- Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002). PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol. Chem.* *277*, 39062–39065.
- Stelzma, R.A., Schnitzlein, H.N., and Murlagh, F.R. *Clinical Anatomy* 8:429-43 1 (1995) VIEWPOINT An English l'ranslation of Alzheimer's 1907 Paper,.

- Stéphan, A., Laroche, S., and Davis, S. (2001). Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 5703–5714.
- Steuble, M., Diep, T.-M., Schätzle, P., Ludwig, A., Tagaya, M., Kunz, B., and Sonderegger, P. (2012). Calsyntenin-1 shelters APP from proteolytic processing during anterograde axonal transport. *Biol. Open* *1*, 761–774.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., and Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 10955–10959.
- Straub, J.E., and Thirumalai, D. (2010). Principles governing oligomer formation in amyloidogenic peptides. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *20*, 187–195.
- Sudoh, S., Frosch, M.P., and Wolf, B.A. (2002). Differential effects of proteases involved in intracellular degradation of amyloid beta-protein between detergent-soluble and -insoluble pools in CHO-695 cells. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 1091–1099.
- Sugarman, M.C., Yamasaki, T.R., Oddo, S., Echegoyen, J.C., Murphy, M.P., Golde, T.E., Jannatipour, M., Leissring, M.A., and LaFerla, F.M. (2002). Inclusion body myositis-like phenotype induced by transgenic overexpression of  $\beta$ APP in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 6334–6339.
- Suh, Y.-H., and Checler, F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* *54*, 469–525.
- Sun, X., Becker, M., Pankow, K., Krause, E., Ringling, M., Beyermann, M., Maul, B., Walther, T., and Siems, W.-E. (2008). Catabolic attacks of membrane-bound angiotensin-converting enzyme on the N-terminal part of species-specific amyloid-beta peptides. *Eur. J. Pharmacol.* *588*, 18–25.
- Swinnen, B., and Robberecht, W. (2014). The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* *10*, 661–670.
- Takahashi, M., Miyata, H., Kametani, F., Nonaka, T., Akiyama, H., Hisanaga, S., and Hasegawa, M. (2015). Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *129*, 895–907.
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* *422*, 438–441.
- Takeda, M., Tanaka, T., Kudo, T., Okochi, M., Kamino, A., and Tagami, S. (2004). [Biological markers for diagnosis of Alzheimer's disease]. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* *106*, 1610–1614.
- Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M.W., Okamoto, S., Dziewczapolski, G., Nakamura, T., Cao, G., Pratt, A.E., et al. (2013). A $\beta$  induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E2518–2527.
- Tan, W., Pasinelli, P., and Trotti, D. (2014). Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* *1842*, 1295–1301.

- Tao, X., Li, N., Liu, F., Hu, Y., Liu, J., and Zhang, Y.-M. (2018). In vitro examination of microglia-neuron crosstalk with BV2 cells, and primary cultures of glia and hypothalamic neurons. *Heliyon* 4.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol. Off. J. Am. Neurol. Assoc. Child Neurol. Soc.* 30, 572–580.
- Thai, D.R. (2002). Excitatory amino acid transporter EAAT-2 in tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 12, 405–411.
- Thinakaran, G. (2001). Metabolism of presenilins. *J. Mol. Neurosci.* MN 17, 183–192.
- Ticozzi, N., Silani, V., LeClerc, A.L., Keagle, P., Gellera, C., Ratti, A., Taroni, F., Kwiatkowski, T.J., McKenna-Yasek, D.M., Sapp, P.C., et al. (2009). Analysis of FUS gene mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis within an Italian cohort. *Neurology* 73, 1180–1185.
- Tremml, P., Lipp, H.P., Müller, U., Ricceri, L., and Wolfer, D.P. (1998). Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Behav. Brain Res.* 95, 65–76.
- Tucker, H.M., Simpson, J., Kihiko-Ehmann, M., Younkin, L.H., McGillis, J.P., Younkin, S.G., Degen, J.L., and Estus, S. (2004). Plasmin deficiency does not alter endogenous murine amyloid beta levels in mice. *Neurosci. Lett.* 368, 285–289.
- Turner, A.J., and Tanzawa, K. (1997). Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 11, 355–364.
- Turner, B., and Talbot, K. (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog. Neurobiol.* 85, 94–134.
- Urban, S. (2006). Rhomboid proteins: conserved membrane proteases with divergent biological functions. *Genes Dev.* 20, 3054–3068.
- Vagnoni, A., Glennon, E.B.C., Perkinson, M.S., Gray, E.H., Noble, W., and Miller, C.C.J. (2013). Loss of c-Jun N-terminal kinase-interacting protein-1 does not affect axonal transport of the amyloid precursor protein or A $\beta$  production. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4646–4652.
- Van Den Bosch, L., and Robberecht, W. (2000). Different receptors mediate motor neuron death induced by short and long exposures to excitotoxicity. *Brain Res. Bull.* 53, 383–388.
- Vanden Broeck, L., Callaerts, P., and Dermaut, B. (2014). TDP-43-mediated neurodegeneration: towards a loss-of-function hypothesis? *Trends Mol. Med.* 20, 66–71.
- Vattemi, G., Engel, W.K., McFerrin, J., Buxbaum, J.D., Pastorino, L., and Askanas, V. (2001). Presence of BACE1 and BACE2 in muscle fibres of patients with sporadic inclusion-body myositis. *Lancet Lond. Engl.* 358, 1962–1964.
- Vattemi, G., Nogalska, A., King Engel, W., D'Agostino, C., Checler, F., and Askanas, V. (2009). Amyloid-beta<sub>42</sub> is preferentially accumulated in muscle fibers of patients with sporadic inclusion-body myositis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 117, 569–574.

- Vekrellis, K., Ye, Z., Qiu, W.Q., Walsh, D., Hartley, D., Chesneau, V., Rosner, M.R., and Selkoe, D.J. (2000). Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 1657–1665.
- Verdile, G., Gandy, S.E., and Martins, R.N. (2007). The role of presenilin and its interacting proteins in the biogenesis of Alzheimer's beta amyloid. *Neurochem. Res.* *32*, 609–623.
- Veugelen, S., Saito, T., Saido, T.C., Chávez-Gutiérrez, L., and De Strooper, B. (2016). Familial Alzheimer's Disease Mutations in Presenilin Generate Amyloidogenic A $\beta$  Peptide Seeds. *Neuron* *90*, 410–416.
- Vucic, S., Rothstein, J.D., and Kiernan, M.C. (2014). Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci.* *37*, 433–442.
- Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* *101*, 1172–1184.
- Wang, P. (2005). Defective Neuromuscular Synapses in Mice Lacking Amyloid Precursor Protein (APP) and APP-Like Protein 2. *J. Neurosci.* *25*, 1219–1225.
- Wang, D.-S., Dickson, D.W., and Malter, J.S. (2006).  $\beta$ -Amyloid Degradation and Alzheimer's Disease. *J. Biomed. Biotechnol.* *2006*.
- Wang, W., Li, L., Lin, W.-L., Dickson, D.W., Petrucelli, L., Zhang, T., and Wang, X. (2013). The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 4706–4719.
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Mazur-Kolecka, B., Imaki, H., Wegiel, J., Mehta, P.D., Silverman, W.P., Reisberg, B., et al. (2007). Intraneuronal Abeta immunoreactivity is not a predictor of brain amyloidosis-beta or neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *113*, 389–402.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* *57*, 115–126.
- Wen, L., Tang, F.-L., Hong, Y., Luo, S.-W., Wang, C.-L., He, W., Shen, C., Jung, J.-U., Xiong, F., Lee, D., et al. (2011). VPS35 haploinsufficiency increases Alzheimer's disease neuropathology. *J. Cell Biol.* *195*, 765–779.
- Winton, M.J., Igaz, L.M., Wong, M.M., Kwong, L.K., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2008). Disturbance of Nuclear and Cytoplasmic TAR DNA-binding Protein (TDP-43) Induces Disease-like Redistribution, Sequestration, and Aggregate Formation. *J. Biol. Chem.* *283*, 13302–13309.
- Wolfe, M.S. (2010). Structure, Mechanism and Inhibition of  $\gamma$ -Secretase and Presenilin-Like Proteases. *Biol. Chem.* *391*, 839–847.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999a). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* *398*, 513–517.
- Wolfe, M.S., De Los Angeles, J., Miller, D.D., Xia, W., and Selkoe, D.J. (1999b). Are Presenilins Intramembrane-Cleaving Proteases? Implications for the Molecular Mechanism of Alzheimer's Disease <sup>†</sup>. *Biochemistry (Mosc.)* *38*, 11223–11230.



- Woltjer, R.L., Duerson, K., Fullmer, J.M., Mookherjee, P., Ryan, A.M., Montine, T.J., Kaye, J.A., Quinn, J.F., Silbert, L., Erten-Lyons, D., et al. (2010). Aberrant Detergent-Insoluble Excitatory Amino Acid Transporter 2 Accumulates in Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 667–676.
- Wu, J.W., Herman, M., Liu, L., Simoes, S., Acker, C.M., Figueroa, H., Steinberg, J.I., Margittai, M., Kaye, R., Zurzolo, C., et al. (2013). Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J. Biol. Chem.* 288, 1856–1870.
- Xia, W., Yang, T., Shankar, G., Smith, I.M., Shen, Y., Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2009). A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 66, 190–199.
- Xu, X. (2009).  $\gamma$ -Secretase Catalyzes Sequential Cleavages of the A $\beta$ PP Transmembrane Domain. *J. Alzheimers Dis. JAD* 16, 211–224.
- Yamamoto, N., Fukata, Y., Fukata, M., and Yanagisawa, K. (2007). GM1-ganglioside-induced Abeta assembly on synaptic membranes of cultured neurons. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1128–1137.
- Yan, R. (2016). Stepping closer to treating Alzheimer’s disease patients with BACE1 inhibitor drugs. *Transl. Neurodegener.* 5.
- Yanagisawa, K. (2015). GM1 ganglioside and Alzheimer’s disease. *Glycoconj. J.* 32, 87–91.
- Yang, D.-S., Tandon, A., Chen, F., Yu, G., Yu, H., Arawaka, S., Hasegawa, H., Duthie, M., Schmidt, S.D., Ramabhadran, T.V., et al. (2002). Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins. *J. Biol. Chem.* 277, 28135–28142.
- Yasojima, K., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2001). Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res.* 919, 115–121.
- Yoshino, H., and Kimura, A. (2006). Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II study). *Amyotroph. Lateral Scler.* 7, 247–251.
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., et al. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48–54.
- Yuan, P., Condello, C., Keene, C.D., Wang, Y., Bird, T.D., Paul, S.M., Luo, W., Colonna, M., Baddeley, D., and Grutzendler, J. (2016). TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron* 92, 252–264.
- Zhang, S., Wang, Z., Cai, F., Zhang, M., Wu, Y., Zhang, J., and Song, W. (2017). BACE1 Cleavage Site Selection Critical for Amyloidogenesis and Alzheimer’s Pathogenesis. *J. Neurosci.* 37, 6915–6925.
- Zhang, S., Cai, F., Wu, Y., Bozorgmehr, T., Wang, Z., Zhang, S., Huang, D., Guo, J., Shen, L., Rankin, C., et al. (2018). A presenilin-1 mutation causes Alzheimer disease without affecting Notch signaling. *Mol. Psychiatry.*
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., and Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer’s disease. *Mol. Brain* 4, 3.

Zhou, S., Zhou, H., Walian, P.J., and Jap, B.K. (2005). CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7499–7504.

Zimbone, S., Monaco, I., Gianì, F., Pandini, G., Copani, A.G., Giuffrida, M.L., and Rizzarelli, E. (2018). Amyloid Beta monomers regulate cyclic adenosine monophosphate response element binding protein functions by activating type-1 insulin-like growth factor receptors in neuronal cells. *Aging Cell* *17*.

Zini, S., Masdehors, P., Lenkei, Z., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1997). Aminopeptidase A: distribution in rat brain nuclei and increased activity in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* *78*, 1187–1193.

Zoia, C., Cogliati, T., Tagliabue, E., Cavaletti, G., Sala, G., Galimberti, G., Rivolta, I., Rossi, V., Frattola, L., and Ferrarese, C. (2004). Glutamate transporters in platelets: EAAT1 decrease in aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *25*, 149–157.

Zoia, C.P., Riva, C., Isella, V., Proserpio, P., Terruzzi, A., Arban, S., Salerno, D., Cassina, V., Mantegazza, F., Tremolizzo, L., et al. (2011). Nonfibrillar Aβ<sub>1-42</sub> inhibits glutamate uptake and phosphorylates p38 in human fibroblasts. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* *25*, 164–172.

Zou, K., Gong, J.-S., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. (2002). A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 4833–4841.

Zou, K., Kim, D., Kakio, A., Byun, K., Gong, J.-S., Kim, J., Kim, M., Sawamura, N., Nishimoto, S., Matsuzaki, K., et al. (2003). Amyloid beta-protein (Aβ<sub>1-40</sub>) protects neurons from damage induced by Aβ<sub>1-42</sub> in culture and in rat brain. *J. Neurochem.* *87*, 609–619.

Zufiría, M., Gil-Bea, F.J., Fernández-Torrón, R., Poza, J.J., Muñoz-Blanco, J.L., Rojas-García, R., Riancho, J., and López de Munain, A. (2016). ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Prog. Neurobiol.* *142*, 104–129.

## 7. ANNEXES

### 7.1. Publications



A new long term in vitro model of myelination.

Exp Cell Res. 2011 Oct 1;317(16):2374-83. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.07.002. Epub 2011 Jul 12.



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/yexcr](http://www.elsevier.com/locate/yexcr)

## Research Article

# A new long term in vitro model of myelination

Noelle Callizot\*, Maud Combes, Rémy Steinschneider, Philippe Pointron

Neuron Experts SAS, Faculté de Médecine Nord, 51 Boulevard Pierre Dramard 13916 Marseille Cedex 20, France

### ARTICLE INFORMATION

#### Article Chronology:

Received 3 May 2011

Revised version received 30 June 2011

Accepted 3 July 2011

Available online 12 July 2011

#### Keywords:

Co-culture

Myelination

MBP

MAG

PO

PMP22

### ABSTRACT

Besides in vivo models, co-cultures systems making use of Rat dorsal root ganglion explants/Schwann cells (SC) are widely used to essentially study myelination in vitro. In the case of animal models of demyelinating diseases, it is expected to reproduce a pathological process; conversely the co-cultures are primarily developed to study the myelination process and in the aim to use them to replace animals in experiences of myelin destruction or functional disturbances. We describe (in terms of protein expression kinetic) a new in vitro model of sensory neurons/SC co-cultures presenting the following advantages: both sensory neurons and SC originate from the same individual; sensory neurons and SC being dissociated, they can be co-cultured in monolayer, allowing an easier microscope observation; the co-culture can be maintained in a serum-free medium for at less three months, allowing kinetic studies of myelin formation both at a molecular and cellular level. Optimizing culture conditions permits to use 96-well culture plates; image analyses conducted with an automatic image analyzer allows rapid, accurate and quantitative expression of results. Finally, this system was proved by measuring the apparition of myelin protein to mimic in vitro the physiological process of in vivo myelination.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

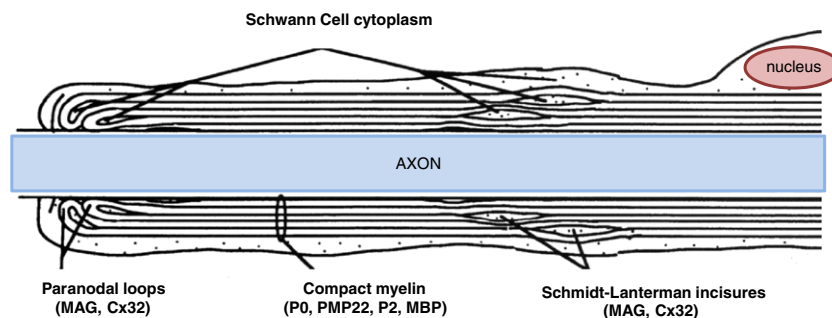
A correct production and maintenance of the myelin sheath is essential to the proper function of the peripheral nervous system (PNS). Resembling insulation of an electrical wire, the myelin sheath enables electrical signals to be rapidly and correctly conducted along the nerve fiber. Today, location, nature, time of appearance and function of myelin proteins are well known (see Fig. 1) [1], so as it is possible to use the accumulated data to appraise the value and relevance of in vivo and in vitro models of demyelination and/or myelination process.

It exist many acquired or inherited diseases affecting integrity and function of myelin sheath, resulting in either motor or sensory neuropathies [2–5]. Therefore, it is interesting to have at disposal convenient models for studying pathogeny and treatment of these invaliding diseases. For this purpose, various in vivo or in vitro models have been developed [for review 6,7]. However their aims are not the same. In the case of animal models of demyelinating

diseases, it is expected to mimic a pathological process. Conversely the co-cultures of neurons and Schwann cells are primarily developed to study the myelination process and to replace animals in experiments of myelin destruction or functional disturbances.

The most commonly used of in vitro models is the co-culture of rat or mouse dorsal root ganglion (DRG) explants [7,8] or dissociated sensory neurons from DRG [9] and Schwann cells (SC) purified from sciatic nerve of rat or mouse pups. In all cases, preliminary steps of purification of DRG explants or dissociated DRG are needed before they can be used in co-culture. This purification step makes use of antimetabolic agents and should be repeated two times over a period of two weeks. The DRG or SN have to be maintained in growth medium before addition to SC. In parallel, SC should also be purified before being expanded [10,11]. These models display several disadvantages. (a) They are time-consuming and use several steps of separate cultures of both DRG explants or dissociated SN and SC before being usable.

\* Corresponding author at: 51 Boulevard Pierre Dramard, Faculté de médecine nord, 13916 Marseille Cedex 20, France.  
E-mail address: [noelle.callizot@neuronexperts.com](mailto:noelle.callizot@neuronexperts.com) (N. Callizot).



**Fig. 1 – Localization of major myelin proteins in PNS.**  
Redrawn from Snipe and Suter [1], with modifications.

(b) Antimitotic agents used to purify SN either in DRG explants or in dissociated suspension of DRG are neurotoxic [12] (not using them presents a decisive advantage for maintaining SN integrity). (c) Some use non-dissociated explants which renders difficult accurate observation of individual SN. (d) SN and SC do not originate from the same individual and are used at different stages of development: SN are prepared from embryo, SC from newborn.

We describe here a new *in vitro* model of SN/SC co-cultures presenting the following advantages: (a) both SN and SC originate from the same individual. (b) SN and SC being dissociated, they can be co-cultured in monolayer, allowing an easier microscope observation. (c) The co-culture can be maintained in a serum-free medium for 2–3 months, allowing kinetic studies of myelin formation both at a molecular and cellular level. (d) Optimizing culture conditions done on an adapted coating and without any anti-mitotic treatment, permits to use 96-well culture plates. (e) Image analyses conducted with an automatic analyzer allowing rapid and accurate expression of results. It should be underlined that we did not intend to quantify the expression of myelin proteins, but to verify that their spatial distribution at the end of myelination process fits with what is known to be *in vivo*. To the best of our knowledge, this point has never been elucidated in rat species.

## Material and methods

### Co-culture of sensory neurons and Schwann cells

Rat SN were prepared as previously described [8,9] with some modifications. Briefly, DRG from spinal cord of 15-day-old Wistar Rat embryos (E15) (Elevage Janvier ref RN-WI-GE-NG, Saint Berthevin, France) were sterilely extracted, treated with trypsin solution (Trypsin 0.25%/EDTA 0.02% in phosphate buffer saline (PBS) without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , PAN Biotech GmbH, Dutscher SAS, Brumath France) at 37 °C for 20 min; the reaction was stopped by addition of Dulbecco modified minimal essential medium of Eagle (DMEM 4.5 g/l of glucose; PAN Biotech GmbH) containing DNase I grade 2 (0.1 mg/ml, PAN Biotech GmbH) and 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were mechanically dissociated by 3 forced passages through the tip of a 10 ml pipette. They were then centrifuged at 500 g for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in a defined culture medium containing neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with B27 nutrient supplement (2%, Invitrogen), L-glutamine (0.2 mmol/l, PAN Biotech GmbH), 1% of Penicillin (10.000 U/ml) and Streptomycin (10 mg/ml) solution (PS; Pan Biotech GmbH)

and 50 ng/ml of Nerve Growth Factor (NGF, Sigma Aldrich, Lyon, France). Viable cells were counted in a Neubauer cytometer using trypan blue exclusion test. The E15 embryo cells were seeded at a density of 12,500 cells/well in 96 well-plates pre-coated with poly-L-lysine (Greiner Bio-One SAS, Courtaboeuf, France) and coated with laminin 1.4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Sigma Aldrich) for 2 h at 37 °C, and were cultured at 37 °C in a humidified air (95%)/CO<sub>2</sub> (5%) atmosphere. Half of the medium was then changed every day. The cultures were maintained one week to allow Schwann cells to proliferate and unsheath the axons of sensory neurons. On day 7, the co-cultures were induced to form myelin with addition of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of L-ascorbic acid (AA, Sigma Aldrich) and half of the medium was then changed every day.

In this optimized system, no serum was added. However some experiments were carried out in the presence either of 5 or 10% horse serum (HS; Invitrogen) or 5 or 10% FCS on day 7 toward. Cultures devoid of serum were maintained up to 25 days after AA addition (a total of 32 days in culture). Randomly chosen plates were selected at intervals after AA addition for myelin protein staining (from day 4 post AA up to day 26 post AA).

NGF was added in the medium (50 ng/ml) to allow cell survival and myelin maturation. On day 19 NGF concentration was decreased to 25 ng/ml, on day 21 to 12.5 ng/ml and on day 23 to 5 ng/ml. The cells were maintained at this concentration to 30 days.

### Immuno-cytochemistry

After removal of the culture medium, cultures were washed with PBS (Pan Biotech GmbH) and fixed with an ethanol/acetic acid solution (95%/5%) for 5 min at –20 °C, the cells were washed 3 times with PBS after fixation. Non-specific antibody binding sites were blocked with a 5 mg/ml of bovine serum albumin (BSA, PAN Biotech GmbH) in PBS, for 15 min at room temperature.

For staining myelin proteins, following antibodies were used: information concerning the antibodies used throughout this study are listed in Table 1.

All primary antibody incubations were performed in PBS containing 5 mg/ml of BSA, 1 mg/ml of saponin (Sigma Aldrich), for 2 h at room temperature. The cells were then washed with PBS containing 5 mg/ml of BSA, 1 mg/ml of saponin for 3 × 5 min, and incubated with the appropriate secondary antibodies (goat anti-rabbit Alexa 568 [H + L] (Invitrogen), or goat anti-mouse Alexa 488 [H + L] (Invitrogen), used at 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS containing 5 mg/ml of BSA, 1 mg/ml of saponin), for 1 h at room temperature. Cell nuclei were labeled with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bis benzimide (Hoechst, Sigma Aldrich).



**Table 1 – List of antibodies used in the study.**

Antibody	Clone	Antibody isotypes	Dilution	Provider	Catalog reference	Reference
Myelin associated glycoprotein (MAG)	513	Mouse IgG1	1 µg/ml	Millipore	MAB1567	[13]
Myelin basic protein (MBP)		Rabbit, affinity isolated antibody	5 µg/ml	Sigma Aldrich	M3821	[14]
Myelin Protein Zero (P0)		Rabbit IgG	5 µg/ml	abcam	ab31851	[15]
Connexin-32/GjB1 (Cx32)	CNX-32	Mouse IgG1	2 µg/ml	abcam	ab66020	[16]
Peripheral myelin protein 22 (PMP22)		Rabbit IgG	2 µg/ml	abcam	Ab61220	[17]
S100 beta (β-S100)	8B10	Mouse IgG	1 µg/ml	abcam	Ab8330	[18]
Contactin-Associated protein 1 (Caspr1)		Rabbit IgG	1 µg/ml	abcam	Ab34151	[19]
Neurofilament 200 (phosphorylated and non-phosphorylated; NF)	N52	Mouse IgG1	1 µg/ml	Sigma Aldrich	N0142	[20]
Neurofilament 200 (phosphorylated and non-phosphorylated; NF)		Rabbit IgG fraction antiserum	0.5 µg/ml	Sigma Aldrich	N4142	[21]
Thy-1.1	TIB-103™	Mouse IgM	Culture supernatant, 1:2	ATCC	TIB-103™	[22]

## Microscopy

For immunofluorescence microscopy, the immuno-labeled cultures were examined with InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) at  $\times 20$  magnification equipped with xenon lamp (excitation 360/480/565 and emission 460/535/620) with  $\times 20$  and  $\times 40$  objectives. For each condition, 20 randomly selected fields from 6 wells were analyzed (representing 80% of the total surface of the well). Results were expressed in terms of cumulated mean length in  $\mu\text{m}$  of myelin sheath, labeled for a given marker and subsequently referred to as CML in the figures. For each label a threshold of fluorescence taken into consideration was determined in order not to measure poorly-labeled or questionably segments. Repeated counts of fluorescent nuclei have shown that the number of cells is constant from well to well, at each time point of the experiments. It should be underlined that this mode of expression pertains to structural organization and distribution of myelin proteins in myelin sheath, not to their relative amount, as would be the case with western blot.

For SC and fibroblasts cell numbers, the results were expressed in number of cells per field, positive cells were those presenting the double labeling : Hoechst and b-S 100 (SC) or Thy-1 + (fibroblast).

## Confocal microscopy

For immuno-fluorescence confocal microscopy, the immuno-labeled cultures were examined with a ZEISS LSM 700 Laser Scanning microscope (excitation 488 nm, 7.5% laser, 555 nm, 2.8% laser and intensities were recorded simultaneously in the range emission 420–578 nm and 568–700 nm for the two channels, respectively) with  $\times 20$  and  $\times 40$  objectives.

## Results

### Kinetic of myelination in the DRG sensory neurons/SC model (Fig. 2)

In the optimized model, SC were cultured for 7 days in medium devoid of AA. In these conditions, SC proliferated and aligned along the axons. AA was added on day 7 in order to trigger myelination process; it induces indeed the synthesis of collagen IV which serves of scaffold for the deposition of other components of basal

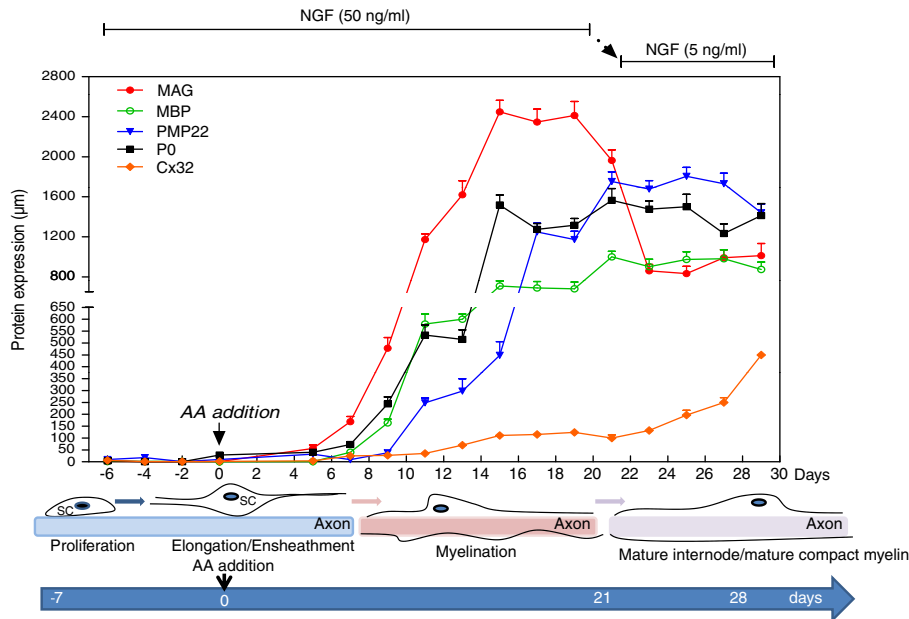
lamina [23]. During that time the SC stopped their proliferation to enter in an elongation and ensheathment process around axon (Fig. 2, diagram). The myelination process itself started about one week after the AA addition.

A large expression of MAG protein was observed starting on day 7 until day 14 and then a plateau seemed to be reached. After few days (day 18 post AA) the mean length of MAG-positive myelin sheath decreased to stay stable from day 22 onwards. During the early phase (between day 7 to day 14) MAG was first expressed along the whole length of SC, from the perinuclear area to the future paranodal area of the axon; at this early stage a overlapping between MAG and MBP was observed along the axons (Plates 1, 2 and 3 and Fig. 2 diagram). SC then undertakes the envelopment of the axon, forming the primary mesaxonal spiral, in which MAG becomes concentrated. In our system, the mean length of MAG-positive segments decreased as myelination progressed into the compaction stage (from day 18 to day 22). In vivo, MAG expression in mature myelin is restricted to Schmidt–Lanterman incisures, periaxonal collar, and paranodal regions (Fig. 1). At this late stage, in our system, MAG was concentrated in very well defined and small areas between large segment of MBP and PMP 22-labeled portion (Plates 4A and C), mimicking the specific localization of MAG in mature myelin (Fig. 1).

Cx32, a late stage protein of mature myelin, appeared around day 14; its expression progressively increased with time proving the maturation of myelin. Cx32 plays an important role in the maintenance of myelin sheaths [24] and significant level of Cx32 was observed after 25 days (post AA); at that late stage Caspr1, a specific marker of Ranvier nodes was also detected; forming discrete spots between MBP and PMP22-labeled portion (Plates 4B and D).

In our system, P0 and MBP expression began on day 9, and increased throughout the time. In vivo both MBP and P0 are involved in formation of the major dense line (Fig. 1). Moreover, P0 plays an important role in determination of myelin thickness and maintenance of myelin and axon integrity [25]. In our system, on day 15, a plateau seemed to be reached, and the mean length of P0-positive myelin segment appeared to be stable along the axons (Plate 4E).

Expression of PMP22 started later (on day 11) and progressively increased up to day 16, from which a plateau was reached. PMP22 expression was co-localized with MBP and P0 in compact



**Fig. 2 – Kinetic curves of myelin protein expression (MAG, MBP, PMP22, P0 and Cx32) from seeding (day – 6) up to 30 days after AA addition (Day 0 = 7 days of culture) expressed in  $\mu\text{m}$ . Data are expressed in mean  $\pm$  s.e. mean of 3 separate cultures ( $n = 3$  wells per culture). Lower: schematic diagram of SC proliferation and ensheathment to myelin formation around axon throughout the time (from seeding day – 6 up to 30 days after AA addition (day 0 = 7 days of culture)).**

areas of myelin and formed long segments finishing with MAG and Cx32 (Plates 4C and D). PMP22 is known to foster myelin formation in early stage formation and has an important role in the control of myelin thickness and myelin integrity in advanced stages of myelination [26].

#### **Number of SC in the co-culture model, effect of AA addition in culture medium (Fig. 3A)**

In absence of AA, SC proliferated all along and around axons. A massive proliferation was observed beginning 4 days before AA addition, corresponding to 3 days of culture. By contrast, the proliferation speeded down after AA addition. From day 10 (post AA) to day 22, in our system, the number of SC stabilized, indicating that cells stopped their proliferation to enter in the elongation and ensheathment process around axon.

#### **Role of serum on fibroblast proliferation and myelin protein expression (Figs. 3B and 4)**

In our system, no serum was added in the culture medium to minimize fibroblast proliferation the number of which was stable throughout the culture. By contrast, addition of 10% of HS or FCS induced a massive proliferation of fibroblasts leading to detachment of the cell layer and loss of the culture. No difference was observed between effects of HS and FCS on this proliferation. Interestingly, high concentration (10%) of FCS or HS significantly decreased the mean length of MAG-positive segments of myelin (Fig. 4). But no major changes were observed in MBP expression in presence of 10% serum (light decrease with FCS); however it should be noted that at early stage expression level of MBP was weak; inhibition was therefore difficult to appraise (Fig. 4). The presence of 5% of serum did not change expression level of MBP,

confirming that myelination of dorsal DRG sensory neuron axons occurs in a fully defined, serum-free medium (B27). Same was observed for MAG expression with HS; by contrast the level of MAG was inhibited in presence of 5% FCS (after 7 days).

#### **Decreasing NGF concentration from day 19 to 21; effect on MBP and MAG expression and maturation of myelin (Fig. 5)**

In our system, compact myelin apparently was formed from day 19 towards (post AA); for this reason NGF concentration was progressively decreased to more physiological levels (5 ng/mL). This decrease of NGF concentration did not influence MBP or MAG levels. Moreover, the process of maturation was not affected by alteration in NGF concentration; distribution and localization of Csp1 reflected indeed the presence of Ranvier nodes, the formation and presence of which were not impaired (Plate 4F).

## **Discussion**

Appearance, distribution and, thanks to KO mice, functions of myelin proteins are now well-known [25–27]. The models of rat DRG explants/SC co-cultures are well established [7,9,10,28–30]. All these co-cultures involve two dissections and culture steps, and attempt to eliminate contaminating fibroblasts or to limit their proliferation (use of antimetabolic agents as arabinoside agent). DRG and SC originate from different individuals at different stages of development. In all cases, the co-cultures are performed in the presence of AA.

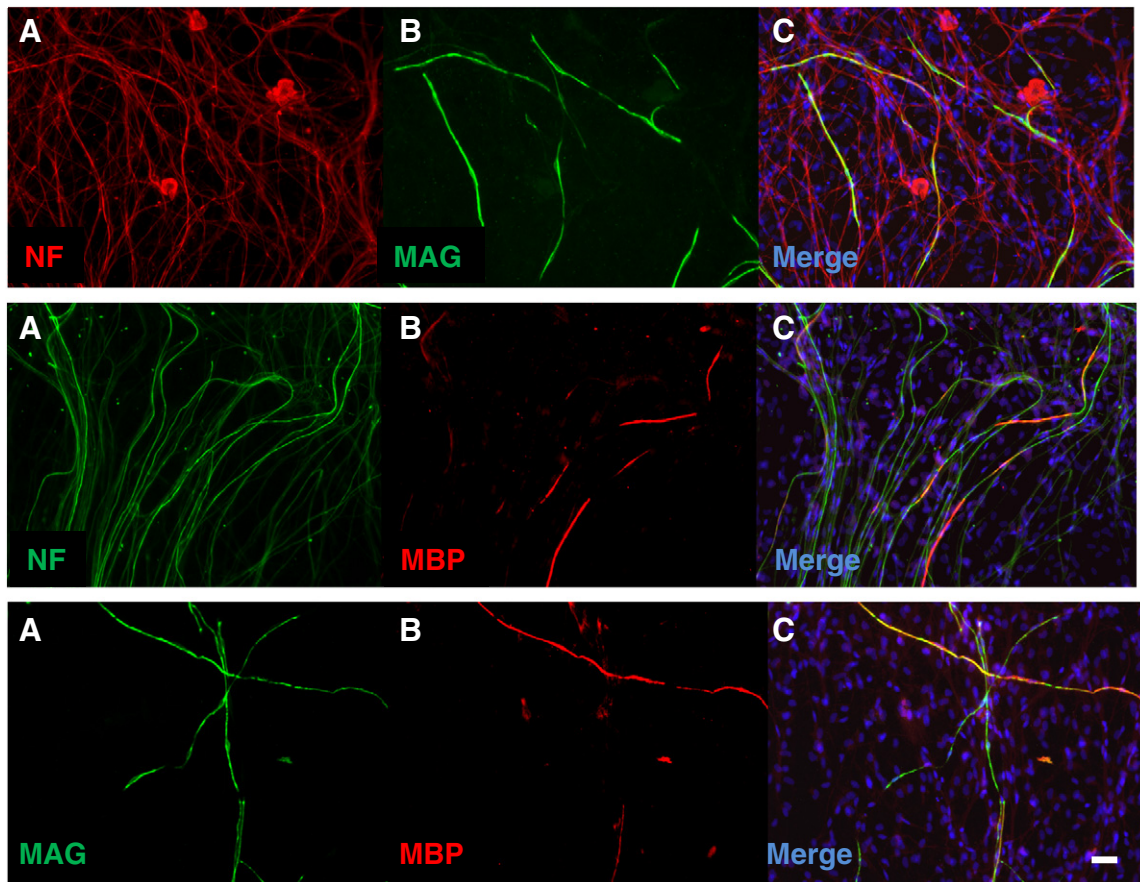
We describe here a model of in vitro myelination with three technical innovations. First, SN and SC originate from the same individual and undergo an only dissection and therefore certainly have the same genetic background. Second, since SN are dissociated, they can be cultured in monolayers which allows

easier microscope observations and accurate image analyses. Third, improvements in the technique of culturing: no aggressive treatment (as antimetabolic agents using to purify the culture and known to be neurotoxic) and an adapted substratum coating are employed to increase the lifespan (up to 3 months) and the quality of the culture (SN presenting long neurites and good adhesion in plastic well that are favorable to myelination process).

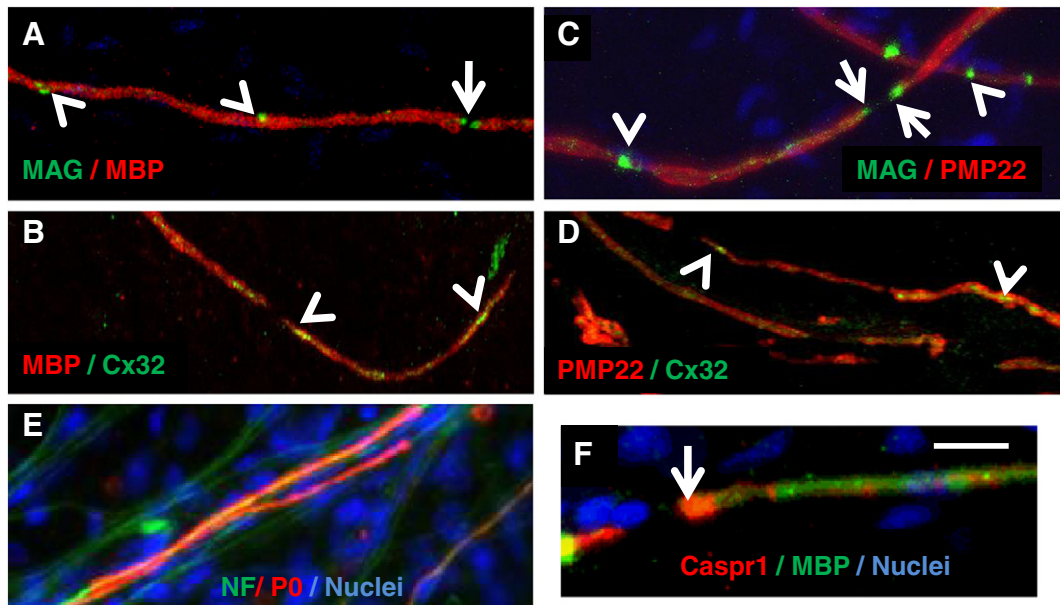
In classical DRG explants/SC co-cultures, myelin synthesis is completed by one week after AA addition [31]. In our system, the co-cultures were maintained for four additional weeks after AA addition (seven days after seeding of the cell suspension, time required for SC to proliferate around the axons), that is a total of 35 days. Under these conditions, the co-cultures could be maintained without any alteration for more than three months (data not shown), instead of two–three weeks in classical co-cultures [7,9]. In absence of serum, there was no fibroblast proliferation, whereas in the presence of either HS or FCS (5 and 10%), there was a massive fibroblast proliferation during the first week of culture. Moreover, as observed by others [32,33], high serum concentrations (15%) inhibited myelination. In our system, lesser concentrations of HS or FCS (10%) also completely abolished MAG expression and partly MBP one (Fig. 4). Cheng and Mudge [34] also have shown that purified SC can be cultured in absence of serum.

In the presence of serum, after 8–9 days of culture post AA, the cell layers detached from the substrate because of the over-crowding of culture with undesirable cells. Serum used at low concentration (5%) did not change maturation of the myelin and level of myelination as compared to cultures carried out in serum-free medium (as also shown by Podratz [32]). The medium used (N2 supplement) contains many factors known to promote differentiation of glial cells and myelination, such as insulin, progesterone [35–37], transferrin and selenium. Progesterone especially activates the P0 promoter and the promoter 1 of PMP 22 [38] and increases the levels of P0 and MBP mRNA [39], together with those of P0, MBP and PMP22 proteins. MAG expression, however, is not affected [40]. In the presence of either HS or FCS (5%), the co-cultures were too dense after 10 days post AA. The SN gathered in the center of the wells, no image analyses were possible, and finally massive detachment from the substrate occurred.

In absence of AA, the SC migrated and associated with neuritis of SN. Under these conditions, expression of early myelin markers such as MAG was up-regulated but no basal lamina was produced [23,41], axons were not sheathed and up-regulation of other myelin components did not occur. Upon addition of AA, MAG expression intensified and became concentrated along a distinct



**Plates 1-2-3 – Early spatial (day 16–19 post AA) development of myelin proteins (MAG and MBP). Sensory neurons/SC cocultured with neurons fixed and doubly immunolabeled with monoclonal anti-MAG (1 and 3), or polyclonal anti-MBP antibodies (2 and 3), and monoclonal anti-NF (2 and 3), and examined by double-immunofluorescence microscopy. Objective 20 $\times$ ; scale bar 20  $\mu$ m. SC completely envelop axons, forming primitive MAG- (1C) and MBP-positive (2C) primary mesaxons, early co-localizations of MAG and MBP are observed (3C). Nuclei appear in blue after Hoechst labeling (1C, 2C and 3C).**

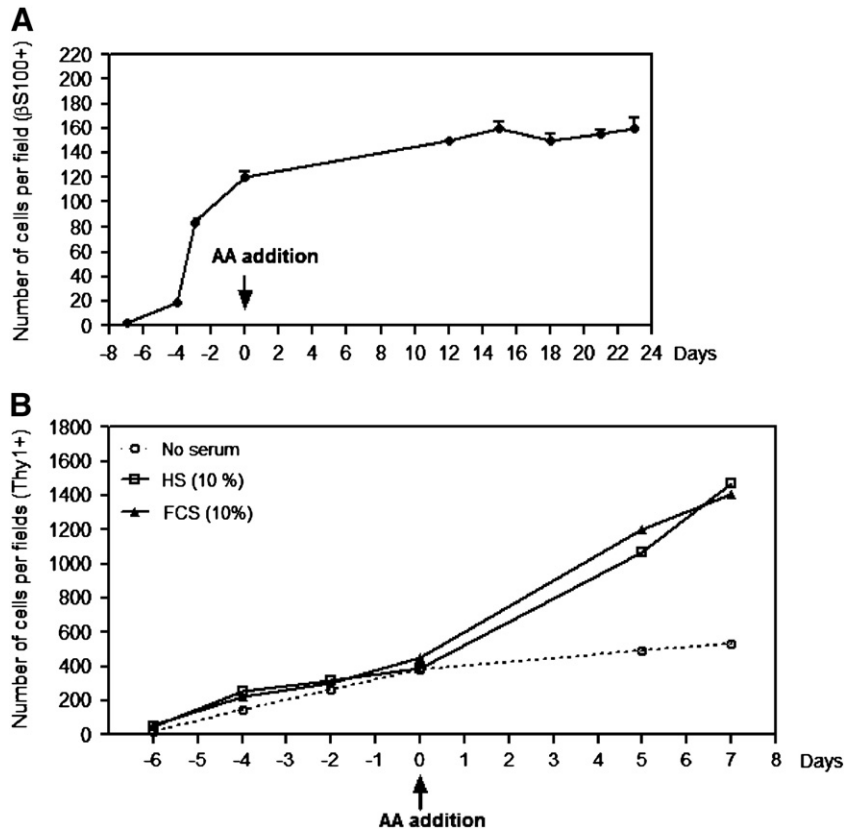


**Plate 4 – Late spatial distribution (day 26 post AA) of myelin proteins (MAG, MBP, PMP2, P0, Cx32).** Sensory neurons/SC cocultured with neurons fixed and doubly immunolabeled with monoclonal anti-MAG (A and C), and/or polyclonal anti-MBP antibodies (A and B), and/or polyclonal anti-PMP22 (C and D) and/or polyclonal anti-P0 (E), and/or monoclonal anti-Cx32 (B and D) and examined by double-immunofluorescence confocal microscopy. Objective 40 $\times$ ; scale bar 10  $\mu$ m. The different fields include mature sheaths in which MAG, MBP and PMP22 are strongly expressed (A and C), MAG is expressed in multiple Schmidt–Lanterman incisures (white arrowheads) disposed at intervals along the whole length of the sheath, and separated by MBP-positive and PMP22-positive regions. MAG is expressed also in paranodal regions (white arrows). The fields B and D show SC with linear, MBP and PMP22-positive (red) mesaxon associated with a uniformly labeled Cx32-positive (green) axon located in Schmidt–Lanterman incisures (white arrowheads). The E field includes a mature sheath in which P0 (red) is strongly expressed. On F field, the white arrow indicates a node of Ranvier. Caspr1 localization is restricted to a small region of expression in the paranodal region.

line extending the full length of the nascent sheath, which probably corresponds to the formation of the primary mesaxon (Plate 1).

Expression of the different myelin components did not occur simultaneously but sequentially, between 5 and 7 days post AA (Fig. 2), as already observed in other models [33]. But at difference from them, under these conditions, myelination started from day 5 post AA, with a large and uniform expression of MAG along the whole length of the SC, from the perinuclear area to the future paranodal area. The SC then began envelopment of axons (primary mesaxonal spirals in which MAG concentrated). The MAG-positive spirals disappeared as myelination progressed into compaction stage (around day 8 post AA). MAG concentrated in the Schmidt–Lanterman incisures, the peri-axonal collar and the paranodal regions. At that time, the mean length of MAG-positive segments of myelin decreased (Fig. 2, Plate 4) since MAG concentrated in discrete, well-defined areas. The formation of mature compact myelin in co-culture was therefore proved by spatial segregation of MAG in the non-compacted membrane compartments and that of MBP in the compacted one, which is the internodal region (Plate 4). From day 9 post AA, a constant increase in mean length of MBP-, P0- and PMP22-positive segments occurred up to a plateau, reached around day 20 post AA. From day 22 toward, expression of Caspr1 – the marker of Ranvier nodes – started and mature segments of myelin could be observed, P0, PMP22 and MBP being localized in compact myelin, MAG and Cx32, in paranodal loops and Schmidt–Lanterman clefts.

Large amounts (50 ng/ml) of NGF were added in the culture medium when seeding the cell suspension. Indeed, neurotrophins have been shown to regulate peripheral myelination [9,42,43] and to enhance myelination of NGF-dependent neurons via activation of TrkA receptors [9,43]. Lesser concentration (20 ng/ml) of NGF resulted in an important decline of compact myelin production (mean length of MAG-positive segments decreased by 88% and MBP-positive segments by 95%, on day 12 post AA; Plate 5 versus Plates 1 and 2), and a decreased density of neurite network. At 5 ng/ml of NGF, no myelination occurred (data not shown). Neurotrophins are known to exert an important effect on the phenotype of developing neurons; they control cell survival, differentiation, neurite outgrowth, excitability, and synapse plasticity and functions [44]. NGF also plays a critical role in the regulation of axonal signals that control myelination through TrkA [43]. Here, when NGF concentration was progressively decreased from day 19 post AA (when a plateau was reached in myelin protein expression, which suggests that myelin is mature) to day 21 post AA, from 50 ng/ml to 5 ng/ml, neither decline in level of compact myelin nor neuronal degeneration were observed. NGF seems to control axonal receptivity to myelin produced by SC at the early stage of myelination. This control could be mediated by the effect of NGF on axon diameter [45]. There exists indeed a strong correlation between axon diameter and degree of myelination in vivo and in vitro [46]. An increase in axon diameter in response to NGF could be the signal triggering myelination [47]. If this hypothesis is true, the role of NGF in myelination could be

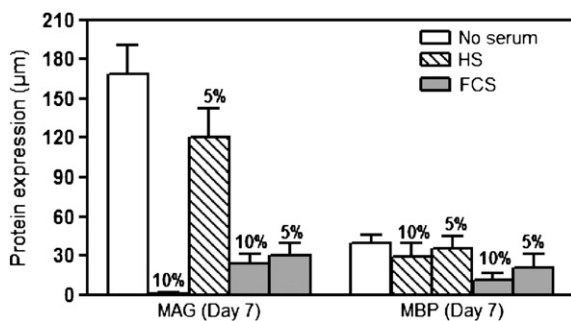


**Fig. 3 – Number of SC (A) expressed in number of cells (BS100 immuno-staining) per field in the culture throughout the time. Effect of HS (10%) and FCS (10%) or absence of serum on fibroblast proliferation (B) expressed in number of cells (Thy1<sup>+</sup> immuno-staining) per field in the culture throughout the time. Data are expressed in mean of 20 fields per well +/- standard error of the mean (s.e.m.) of 3 separate cultures (n = 3 wells per culture).**

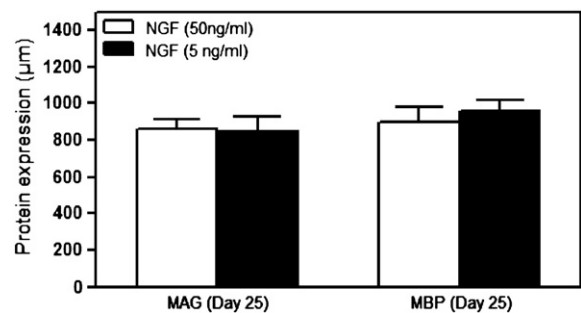
partly or totally topological: a decrease in curvature of axon due to an increase of its diameter could allow a better wrapping of a rather rigid membrane around it. Interestingly, Cheng and Mudge [34] have proved that axonal signal is not required for the synthesis of P0, giving some consistence to the topological role of NGF. In our system, the cultures were kept for weeks (see above) in presence of 5 ng/ml of NGF, without any significant deleterious effect on MBP expression or maturation of myelin sheath, as indicated by Caspr1 and Cx32 expression. This model therefore can be used for pharmacological studies since it could be possible to damage myelin and to tests effects of putative protective drugs.

Moreover, because of the sequential appearance of myelin proteins, addition of drugs possibly active on the expression of a given myelin protein could also be studied.

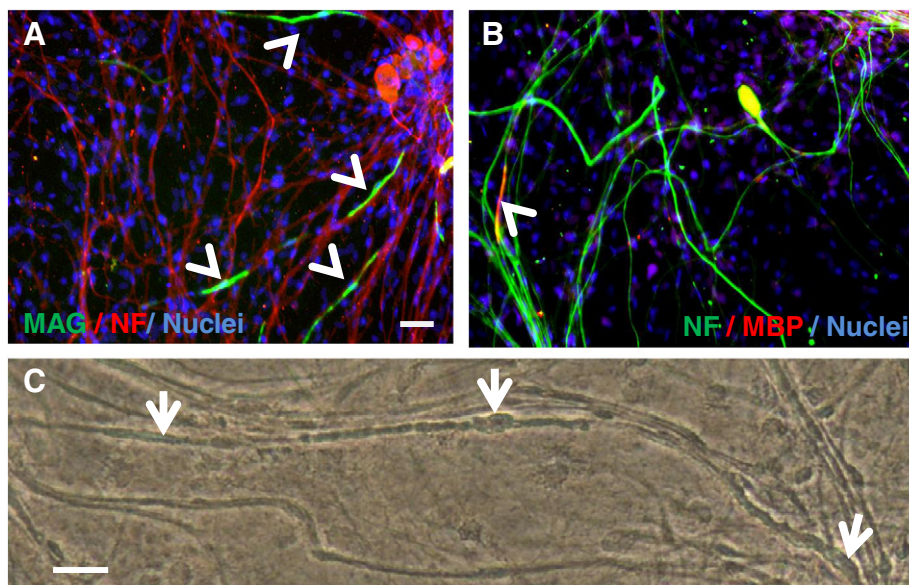
Viability and stability of a cell culture depends on the substrate on which cells are plated. In our hands, employing collagen or poly-L-lysine coated surface resulted in a poor viability of the co-cultures (data not shown). Expression of MAG, MBP or PMP22 was initially normal, but over 15 days, the cultures started degenerating ; most of the SN detached from the well substrate within one week following addition of AA, probably because neuritis failed to establish sufficiently strong interactions with the substrate. This renders the



**Fig. 4 – Effect of HS or FCS on MAG and MBP expression, on day 7 post AA. No serum (open bars), HS (5 or 10%) or FCS (5 or 10%). Data are expressed in mean +/- s.e.m. of 3 separate cultures (n = 3 wells per culture).**



**Fig. 5 – Effect of 50 ng/ml or 5 ng/ml of NGF on MAG and MBP expression determined on day 25 post AA expressed in µm. Data are expressed in mean +/- s.e.m. of 3 separate cultures (n = 3 wells per culture).**



**Plate 5 – Early spatial (day 16–19 post AA) development of myelin proteins (MAG and MBP) in presence of low concentration of NGF (5 ng/ml) in culture medium. The low presence of MAG (A) or MBP (B) along axon under low concentration of NGF is observed (head arrows). Sensory neurons/SC cocultured with neurons fixed and double immunolabeled with monoclonal anti-MAG (A), or polyclonal anti-MBP antibodies (B), and mono or polyclonal anti-NF (A and B) and examined by double-immunofluorescence microscopy. Objective 20 $\times$ ; scale bar 20  $\mu$ m. Phase contrast microscopy (C) of a myelinating coculture (day 26 post AA) immediately prior to fixation for immunocytochemical analysis reveals myelin sheaths that appear as thick, dark strands (arrows). The well area corresponds to the same field shown in the microscopy images (Plate 4). Objective 40 $\times$ ; scale bar 10  $\mu$ m.**

cultures highly sensitive to turbulences created, for example, during the routine handling of the culture plates [30]. The cultures can be stabilized by providing the neuritis with an environment offering a better structural support. It has been shown [30] that using a 3-D culture matrix, such as Matrigel $\text{®}$  in which the growing neuritis can penetrate, lead to an optimal survival rate of DRG explants after seven weeks of cultures. Nevertheless, the routine use of Matrigel $\text{®}$  offers several disadvantages: (a) matrix detached from the substratum by pipetting; (b) matrix binds fairly weakly to plastic surface; (c) the quality of the matrix changes from one batch to another, which results in a poor reproducibility; (d) Matrigel $\text{®}$  have been shown to be not stable after 15 days of culture at 37  $^{\circ}$ C, because of detachment from the plastic surface (on line with what is claimed by the manufacturer). Under these conditions, our co-cultures started to degenerate in the 2 weeks following the seeding, so we discontinued to use Matrigel $\text{®}$ . Laminin, well known to improve neurite production [48] and then to expand neuron survival was used. We observed by coating with laminin-a substrate pre-coated with poly-L-Lysine, it was possible to provide the neuritis with a proper environment, to observe an important neurite outgrowth and a stabilized neurite network (Plates 1A, 2A), and to maintain survival of co-cultures for up to 3 months. Cheng and Mudge [34] also used such a pre-coated substrate for culturing purified SC.

Because it is necessary to fix a threshold of fluorescence to be taken into consideration, it is not possible to accurately quantify the proportion of myelinated axons. However, the Plates 1 to 3 allow evaluating this proportion ( $\sim$ 30% of fibers were myelinated after 24 days post AA under our conditions).

Another important advantage of this model is its adaptation to the 96-well format of culture. It allows development and execution of low-to-medium magnification immunocytochemical investiga-

tions, large series of experiments and, eventually, high-through-put analyses, and testing of promyelinating agents.

In summary, this model represents a useful and relevant system of in vitro peripheral myelination. Having this model at disposal could help to better understand the mechanisms and the control of intrinsic genetic program governed by a network of transcription factors coordinating the whole process of myelination, the sequential expression and sorting of myelin protein necessary to assemble the myelin sheath [49]. Besides its theoretical interest, it provides to pharmaceutical companies with a convenient tool for studying PNS myelination as well as demyelination and for screening compounds.

## REFERENCES

- [1] G.J. Snipes, U. Suter, Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system, *J. Anat.* 186 (1995) 483–494.
- [2] U. Suter, S.S. Scherer, Disease mechanisms in inherited neuropathies, *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003) 714–726.
- [3] M.P. Lunn, H.J. Willison, Diagnosis and treatment in inflammatory neuropathies, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80 (2009) 249–258.
- [4] A.J. Steck, A. Czaplinski, S. Renaud, Inflammatory demyelinating neuropathies and neuropathies associated with monoclonal gammopathies: treatment update, *Neurotherapeutics* 5 (2008) 528–534.
- [5] D.M. Simpson, Selected peripheral neuropathies associated with human immunodeficiency virus infection and antiretroviral therapy, *J. Neurovirol.* 8 (Suppl. 2) (2002) 33–41.
- [6] G. Meyer zu Hörste, K.A. Nave, Animal models of inherited neuropathies, *J. Mol. Neurosci.* 28 (1) (2006) 77–88.

- [7] N. Liu, S. Varma, E.M. Shooter, R.J. Tolwani, Enhancement of Schwann cell myelin formation by K252a in the Trembler-J mouse dorsal root ganglion explant culture, *J. Neurosci. Res.* 79 (2005) 310–317.
- [8] S. Rangaraju, I. Madorsky, J.G. Pileggi, A. Kamal, L. Notterpek, Pharmacological induction of the heat shock response improves myelination in a neuropathic model, *Neurobiol. Dis.* 32 (2008) 105–115.
- [9] J.M. Cosgaya, J.R. Chan, E.M. Shooter, The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination, *Science* 298 (2002) 1245–1248.
- [10] N. Kleitman, P.M. Wood, R.P. Bunge, Tissue culture methods for the study of myelination, in: G. Banker, K. Goselin (Eds.), *Culturing nerve cells*, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, 1995, pp. 545–594.
- [11] H. Honkanen, O. Lahti, M. Nissinen, R.M. Myllylä, S. Kangas, S. Päiväläinen, M.H. Alanne, S. Peltonen, J. Peltonen, A.M. Heape, Isolation, purification and expansion of myelination-competent, neonatal mouse Schwann cells, *Eur. J. Neurosci.* 26 (2007) 953–964.
- [12] P. Leeds, Y. Leng, E. Chalecka-Franaszek, D.M. Chuang, Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons, *Neurochem. Int.* 46 (2005) 61–72.
- [13] J.R. Chan, P.M. Rodriguez-Waitkus, B.K. Ng, P. Liang, M. Glaser, Progesterone synthesized by Schwann cells during myelin formation regulates neuronal gene expression, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 2283–2295.
- [14] A. Görlich, M. Illy, E. Friauf, H. Wagner, H. Luksch, S. Lührke, Development of the delay lines in the nucleus laminaris of the chicken embryo revealed by optical imaging, *Neuroscience* 168 (2010) 564–572.
- [15] B. Garbay, M. Fournier, M.L. Sallafranque, S. Muller, F. Boiron, A. Heape, C. Cassagne, Bonnet J. Po, MBP, histone, and DNA levels in sciatic nerve. Postnatal accumulation studies in normal and trembler mice, *Neurochem. Pathol.* 8 (1988) 91–107.
- [16] Feng-Qiao Li, Kenneth A. Fowler, Jessica E. Neil, Carol A. Colton, Michael P. Vitek, An Apolipoprotein E-mimetic stimulates axonal regeneration and remyelination after peripheral nerve injury, *JPET* 334 (2010) 106–115.
- [17] I. Sargiannidou, N. Vavlitou, S. Aristodemou, A. Hadjisavvas, K. Kyriacou, S.S. Scherer, A. Kleopas, Connexin32 mutations cause loss of function in Schwann cells and oligodendrocytes leading to PNS and CNS myelination defects, *J. Neurosci.* 29 (2009) 4736–4749.
- [18] I. Madorsky, K. Opalach, A. Waber, J.D. Verrier, C. Solmo, T. Foster, W.A. Dunn Jr., L. Notterpek, Intermittent fasting alleviates the neuropathic phenotype in a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease, *Neurobiol. Dis.* 34 (2009) 146–154.
- [19] K. Takahashi, T. Isobe, Y. Ohtsuki, T. Akagi, H. Sonobe, T. Okuyama, Immunohistochemical study on the distribution of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues, *Virchows Arch. (Cell Pathol.)* 45 (1984) 385–396.
- [20] B. Kohl, S. Fischer, J. Groh, C. Wessig, R. Martini, MCP-1/CCL2 modifies axon properties in a PMP22-overexpressing mouse model for Charcot-Marie-tooth 1A neuropathy, *Am. J. Pathol.* 176 (2010) 1390–1399.
- [21] J. Yamamoto, T. Kawamata, Y. Niiyama, K. Omote, A. Namiki, Down-regulation of mu opioid receptor expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons in a murine model of bone cancer pain, *Neuroscience* 151 (2008) 843–853.
- [22] A. Postigo, A.M. Calella, B. Fritzsche, M. Knipper, D. Katz, A. Eilers, T. Schimmang, G.R. Lewin, R. Klein, L. Minichiello, Distinct requirements for TrkB and TrkC signaling in target innervation by sensory neurons, *Genes Dev.* 16 (2002) 633–645.
- [23] C.F. Eldridge, M.B. Bunge, R.P. Bunge, P.M. Wood, Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation, *J. Cell Biol.* 105 (1987) 1023–1034.
- [24] S.S. Scherer, S.M. Deschênes, Y.T. Xu, J.B. Grinspan, K.H. Fischbeck, D.L. Paul, Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS, *J. Neurosci.* 15 (1995) 8281–8294.
- [25] J. Eichberg, Myelin P0: new knowledge and new roles *Neurochem. Res.* 27 (2002) 1331–1340.
- [26] R. Martini, M. Schachner, Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules, *Glia* 19 (1997) 298–310.
- [27] R. Martini, Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves, *J. Neurocytol.* 23 (1994) 1–28.
- [28] S. Einheber, T.A. Milner, F. Giancotti, J.L. Salzer, Axonal regulation of Schwann cell integrin expression suggests a role for alpha 6 beta 4 in myelination, *J. Cell Biol.* 123 (1993) 1223–1236.
- [29] M. Erb, B. Flueck, F. Kern, B. Erne, A.J. Steck, N. Schaeren-Wiemers, Unraveling the differential expression of the two isoforms of myelin-associated glycoprotein in a mouse expressing GFP-tagged S-MAG specifically regulated and targeted into the different myelin compartments, *Mol. Cell. Neurosci.* 31 (2006) 613–627.
- [30] S. Päiväläinen, M. Nissinen, H. Honkanen, O. Lahti, S.M. Kangas, J. Peltonen, S. Peltonen, A.M. Heape, Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures, *Mol. Cell. Neurosci.* 37 (2008) 568–578.
- [31] T.R. Bilderback, J.R. Chan, J.J. Harvey, M. Glaser, Measurement of the rate of myelination using a fluorescent analogue of ceramide, *J. Neurosci. Res.* 49 (1997) 497–507.
- [32] J.L. Podratz, E.H. Rodriguez, A.J. Windebank, Antioxidants are necessary for myelination of dorsal root ganglion neurons, in vitro, *Glia* 5 (2004) 54–58.
- [33] S. Päiväläinen, A.M. Heape, Myelin-associated glycoprotein and galactosylcerebroside expression in Schwann cells during myelination, *Mol. Cell. Neurosci.* 35 (2007) 436–446.
- [34] L. Cheng, A.W. Mudge, Cultured Schwann cells constitutively express the myelin protein P0, *Neuron* 16 (1996) 309–319.
- [35] B. Garbay, A.M. Heape, F. Sargueil, C. Cassagne, Myelin synthesis in the peripheral nervous system, *Prog. Neurobiol.* 61 (2000) 267–304.
- [36] M. Schumacher, R. Guennoun, G. Mercier, F. Désarnaud, P. Lacor, J. Bénavides, B. Ferzaz, F. Robert, E.E. Baulieu, Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37 (2001) 343–359.
- [37] J.R. Chan, L.J. Phillips II, M. Glaser, Glucocorticoids and progestins signal the initiation and enhance the rate of myelin formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 10459–10464.
- [38] F. Désarnaud, A.N. Do Thi, A.M. Brown, G. Lemke, U. Suter, E.E. Baulieu, M. Schumacher, Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells, *J. Neurochem.* 71 (1998) 1765–1768.
- [39] R.C. Melcangi, V. Magnaghi, I. Cavarretta, L. Martini, F. Piva, Age-induced decrease of glycoprotein P0 and myelin basic protein gene expression in the rat sciatic nerve. Repair by steroid derivatives, *Neuroscience* 85 (1998) 569–578.
- [40] L. Notterpek, G.J. Snipes, E.M. Shooter, Temporal expression pattern of peripheral myelin protein 22 during in vivo and in vitro myelination, *Glia* 25 (1999) 358–369.
- [41] C.F. Eldridge, M.B. Bunge, R.P. Bunge, Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro: II. Control of myelin formation by basal lamina, *J. Neurosci.* 9 (1989) 625–638.
- [42] J.R. Chan, J.M. Cosgaya, Y.J. Wu, E.M. Shooter, Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 14661–14668.
- [43] J.R. Chan, T.A. Watkins, J.M. Cosgaya, C. Zhang, L. Chen, L.F. Reichardt, E.M. Shooter, B.A. Barres, NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes, *Neuron* 43 (2004) 183–191.
- [44] G.R. Lewin, Y.A. Barde, Physiology of the neurotrophins, *Annu. Rev. Neurosci.* 19 (1996) 289–317.

- 
- [45] A. Markus, T.D. Patel, W.D. Snider, Neurotrophic factors and axonal growth, *Curr. Opin. Neurobiol.* 12 (2002) 523–531.
- [46] A.J. Windebank, P. Wood, R.P. Bunge, P.J. Dyck, Myelination determines the caliber of dorsal root ganglion neurons in culture, *J. Neurosci.* 5 (1985) 1563–1569.
- [47] J.T. Voyvodic, Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons, *Nature* 342 (1989) 430–433.
- [48] D.J. Orr, R.A. Smith, Neuronal maintenance and neurite extension of adult mouse neurones in non-neuronal cell-reduced cultures is dependent on substratum coating *J. Cell Sci.* 91 (1988) 555–561.
- [49] J. Svaren, D. Meijer, The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells, *Glia* 56 (2008) 1541–1551.



Necrosis, apoptosis, necroptosis, three modes of action of dopaminergic neuron neurotoxins

*(soumis en Octobre 2018 Plos One)*



# PLOS ONE

## Necrosis, apoptosis, necroptosis, three modes of action of dopaminergic neuron neurotoxins

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-18-29929
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Necrosis, apoptosis, necroptosis, three modes of action of dopaminergic neuron neurotoxins
<b>Short Title:</b>	Pharmacological models of Parkinson's disease.
<b>Corresponding Author:</b>	Noëlle CALLIZOT, PhD Neuro-sys Gardanne, FRANCE
<b>Keywords:</b>	Dopaminergic neurons; Parkinson's disease; MPP+; 6OHDA; rotenone; in vitro
<b>Abstract:</b>	Most of the Parkinson's disease (PD) cases are sporadic, although several genes are directly related to PD. Several pathways are central in PD pathogenesis: protein aggregation linked to proteasomal impairments, mitochondrial dysfunctions and impairment in dopamine (DA) release. Here we studied the close crossing of mitochondrial dysfunction and aggregation of $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) and in the extension in the dopaminergic neuronal death. Here, using rat primary cultures of mesencephalic neurons, we induced the mitochondrial impairments using "DA-toxins" (MPP+, 6OHDA, rotenone). We showed that the DA-Toxins induced dopaminergic cell death through different pathways: caspase-dependent cell death for 6OHDA; MPP+ stimulated caspase-independent cell death, and rotenone activated both pathways. In addition, a decrease in energy production and/or a development of oxidative stress were observed and were linked to $\alpha$ -syn aggregation with generation of Lewy body-like inclusions (found inside and outside the dopaminergic neurons). We demonstrated that any of induced mitochondrial disturbances and processes of death led to $\alpha$ -syn protein aggregation and finally to cell death. Our study depicts the cell death mechanisms taking place in in vitro models of Parkinson's disease and how mitochondrial dysfunctions is at the cross road of the pathologies of this disease.
<b>Order of Authors:</b>	Alexandre Henriques Noëlle CALLIZOT Maud COMBES Philippe POINDRON
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<b>Financial Disclosure</b>  Enter a financial disclosure statement that describes the sources of funding for the work included in this submission. Review the <a href="#">submission guidelines</a> for detailed requirements. View published research articles from <a href="#">PLOS ONE</a> for specific examples.  This statement is required for submission and <b>will appear in the published article</b> if the submission is accepted. Please make	This study was funded by internal funds of Neuro-Sys SAS.

1 **Necrosis, apoptosis, necroptosis, three modes of action of dopaminergic neuron**  
2 **neurotoxins**

3

4 Noëlle CALLIZOT<sup>a</sup>, Maud COMBES, Alexandre HENRIQUES, Philippe POINDRON

5 Neuro-Sys SAS, Pharmacology Department, 410 Chemin départemental 60, 13120 Gardanne,  
6 France.

7

8 <sup>a</sup> 410 Chemin départemental 60, 13120 Gardanne, France.

9 + 33 4 13 41 51 71,

10 + 33 4 13 41 51 72

11 [noelle.callizot@neuro-sys.com](mailto:noelle.callizot@neuro-sys.com)

12

13 Running title: Pharmacological models of Parkinson's disease.

14

15 Key words: Dopaminergic neurons, Parkinson's disease, MPP+, 6OHDA, rotenone, in vitro

16 **ABSTRACT**

17

18 Most of the Parkinson's disease (PD) cases are sporadic, although several genes are directly  
19 related to PD. Several pathways are central in PD pathogenesis: protein aggregation linked to  
20 proteasomal impairments, mitochondrial dysfunctions and impairment in dopamine (DA)  
21 release. Here we studied the close crossing of mitochondrial dysfunction and aggregation of  $\alpha$ -  
22 synuclein ( $\alpha$ -syn) and in the extension in the dopaminergic neuronal death. Here, using rat  
23 primary cultures of mesencephalic neurons, we induced the mitochondrial impairments using  
24 "DA-toxins" (MPP<sup>+</sup>, 6OHDA, rotenone). We showed that the DA-Toxins induced  
25 dopaminergic cell death through different pathways: caspase-dependent cell death for 6OHDA;  
26 MPP<sup>+</sup> stimulated caspase-independent cell death, and rotenone activated both pathways. In  
27 addition, a decrease in energy production and/or a development of oxidative stress were  
28 observed and were linked to  $\alpha$ -syn aggregation with generation of Lewy body-like inclusions  
29 (found inside and outside the dopaminergic neurons). We demonstrated that any of induced  
30 mitochondrial disturbances and processes of death led to  $\alpha$ -syn protein aggregation and finally  
31 to cell death. Our study depicts the cell death mechanisms taking place in *in vitro* models of  
32 Parkinson's disease and how mitochondrial dysfunctions is at the cross road of the pathologies  
33 of this disease.

34

35 **Key words**

36 Parkinson's disease, dopamine, mitochondria,  $\alpha$ -synuclein aggregates, ATP, ROS

37

38 **Abbreviations**

39	Ab	: antibody
40	AIF	: apoptosis inducing factor
41	$\alpha$ -syn	: $\alpha$ -synuclein
42	AUC	: area under curve
43	BSA	: bovin serum albumin
44	CytC	: cytochrome C
45	DA	: dopamine
46	DA-toxins	: dopaminergic neuron-specific toxins
47	DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
48	DRG	: dorsal root ganglion
49	FCS	: fetal calf serum
50	HS	: horse serum
51	LB	: Lewy body
52	L15	: Leibovitz medium L15
53	MAP-2	: microtubule associated protein
54	MEM	: minimal essential medium of Eagle
55	MPP <sup>+</sup>	: 1-methyl-4-phenyl pyridinium
56	MPTP	: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine
57	6OHDA	: 6-hydroxydopamine
58	PARP-1	: poly-ADP-ribose polymerase 1
59	PBS	: phosphate-buffered saline
60	PFA	: paraformaldehyde
61	PS	: penicillin-streptomycin solution
62	PD	: Parkinson's disease

- 63 ROS : reactive oxygen species
- 64 RT : room temperature
- 65 SEM : standard error of the mean
- 66 SN : *substantia nigra*
- 67 TH : tyrosine hydroxylase
- 68 TH+ : tyrosine hydroxylase (expressing neurons)

## 69 INTRODUCTION

70

71 Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative movement disorder that affects  
72 around 1 % of the population over the age of 70<sup>1</sup>. It is the second most common  
73 neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. The patients suffering from PD display  
74 symptoms of motor instabilities with resting tremor as the first symptom in 70 % of the cases.  
75 Other clinical symptoms are rigidity, bradykinesia and postural instability, and often include  
76 cognitive impairment, depression and sleep disorders<sup>2</sup>.

77 The etiology of PD remains unknown. Genetic, environmental risk factors and their interaction  
78 play a major role in PD. Although 90 % of PD cases are sporadic, several genes exist which are  
79 directly related to inherited cases of PD. Mutations in the alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn) gene and the  
80 leucine rich repeat kinase LRRK2 (PARK8 gene) cause autosomal dominant PD, while  
81 mutations in Parkin (PARK2 gene), PINK1 (PARK6 gene) or DJ-1 (PARK7 gene) cause  
82 autosomal recessive PD<sup>3-5</sup>. Increased risk factor for PD is also found in carriers of heterozygous  
83 mutations in GBA1<sup>6</sup>. In parallel, it has been well established that intoxication with  
84 dopaminergic neuron-specific toxins (DA-toxins), including 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6  
85 tetrahydropyridine (MPTP), 6-hydroxydopamine (6OHDA) or rotenone, cause parkinsonism in  
86 humans<sup>7</sup>. These toxins are used by scientists to experimentally mimic PD in animals.

87 Although the pathological mechanisms leading to *substantia nigra* (SN) degeneration might be  
88 multiple, several pathways are probably central: protein aggregation linked to proteasomal  
89 impairments, mitochondrial dysfunction, and impairment in dopamine (DA) release. All these  
90 pathways could converge and generate reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress  
91 resulting in cell death<sup>8</sup>.

92 In this study, using rat primary cultures of mesencephalic neurons, we showed that DA-toxins  
93 induced a decrease in energy production, oxidative stress linked to  $\alpha$ -syn aggregation and



94 generation of Lewy body (LB)-like inclusions, and finally dopaminergic neuronal death  
95 through different cell death pathways. We also showed that whatever the mechanisms of cell  
96 death observed (apoptosis and/or necrosis or necroptosis),  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) production and  
97 aggregation always occurred. Additionally,  $\alpha$ -syn aggregates is well known to induce some  
98 mitochondrial dysfunctions. Thus, we hypothesized that whatever the initial causes of TH-  
99 expressing neuron death, production of extracellular aggregated  $\alpha$ -syn triggered subsequent  
100 mitochondrial impairments. Therefore, mitochondria and  $\alpha$ -syn could be linked in an endless  
101 vicious circle leading to the inevitable death of neurons.

## 102 **MATERIALS AND METHODS**

### 103 *Primary Culture of mesencephalic neurons*

104 The collection of embryos was carried out in accordance with the National Institutes of Health  
105 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and followed current European Union  
106 regulations (Directive 2010/63/EU) and was supervised by the local direction of the veterinary  
107 services of the Bouches-du-Rhône (agreement number A1301310).

108 Pregnant female rats of 15 days gestation (Rats Wistar; Janvier Labs France) were killed using  
109 a deep anesthesia with CO<sub>2</sub> chamber followed by cervical dislocation.

110 Rat dopaminergic neurons were prepared and cultured as previously described by Visanji and  
111 colleagues <sup>9</sup>. Briefly, the midbrains obtained from 15-day old rat embryos (Wistar, Janvier  
112 Labs, St. Berthevin, France) were dissected under a stereo zoom binocular microscope. The  
113 embryonic midbrains were removed and placed in ice-cold L15 medium of Leibovitz (L15, Pan  
114 Biotech, Aidenbach, Germany) containing 2 % of penicillin (10,000 U/mL) and streptomycin  
115 (10 mg/mL) solution (PS, Pan Biotech) and 1 % of bovine serum albumin (BSA, Pan Biotech).  
116 The ventral portion of the mesencephalic flexure, a region of the developing brain rich in  
117 dopaminergic neurons, was used for the cell preparations.

118 The midbrains were dissociated by trypsinization for 20 min at 37 °C (Trypsin 0.05 % EDTA  
119 0.02 %, PanBiotech). The reaction was stopped by the addition of Dulbecco's modified Eagle's  
120 medium (DMEM, PanBiotech) containing 0.1 mg/mL of DNase I grade II (PanBiotech) and  
121 10 % of fetal calf serum (FCS, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were then  
122 mechanically dissociated by 3 passages through a 10 mL pipette. They were then centrifuged  
123 at 180 x g for 10 min at +4 °C on a layer of BSA (3.5 %) in L15. The supernatant was discarded  
124 and the cell pellets were re-suspended in a defined culture medium consisting of Neurobasal  
125 medium (Invitrogen) added with 2 % of B27 complement (Invitrogen), 2 mmol/L of L-  
126 glutamine (PanBiotech), 2 % of PS solution, 10 ng/ mL of Brain-derived neurotrophic factor

127 (BDNF, PanBiotech) and 1 ng/ mL of glial-derived neurotrophic factor (Pan Biotech). Viable  
128 cells were counted in a Neubauer cytometer using the trypan blue exclusion test. The cells were  
129 seeded at a density of 40,000 cells/well in 96 well-plates pre-coated with poly-L-lysine  
130 (Corning Biocoat, Le Pont de Claix, France) or 225,000 cells/well in 24 well-plates (Greiner,  
131 Courtaboeuf, France) coated with poly-L-lysine ([10 µg/mL, for 2 h], Sigma Aldrich) and  
132 maintained in an air (95 %)-CO<sub>2</sub> (5 %) humidified incubator, at 37 °C. Half of the medium was  
133 replaced every 2 days with fresh medium. The mesencephalic cell cultures were treated after 6  
134 days of culture. The dopaminergic neurons were identified by immunostaining of TH. As  
135 mentioned by Visanji and colleagues <sup>9</sup>, in our conditions, TH-expressing neurons represented  
136 6 % to 8 % of neuronal population, although under these conditions, a residual population of  
137 microglial cells remain, accounting for ~1 % of all cells.

138

#### 139 *Treatment of primary culture*

140 The medium was removed and replaced with fresh medium containing or not, either 1-methyl-  
141 4-phenyl-pyrididium (MPP<sup>+</sup>, at 2, 4, 8 and 16 µmol/L), a metabolite of MPTP, 6OHDA (at 5,  
142 10, 20 and 30 µmol/L) or rotenone (0.1, 1, 10 and 20 nmol/L) (all from Sigma Aldrich) at  
143 different concentrations, for different times of incubation (6 wells per condition). Here, these  
144 three toxins were used to mimic in cell cultures *in vitro* cytopathic effects observed in the brains  
145 of PD-suffering patients. They were dissolved in the defined culture media mentioned above.  
146 Involvement of poly-ADP-ribose polymerase (PARP-1), a partner involved in necroptosis, was  
147 assessed using AG14361 (Selleckchem, Houston, Texas, USA), a specific inhibitor of PARP-1  
148 (1 µmol/L, added to the cultures 1 h before DA-toxins).

149

150

151 *Immunostaining*

152           General procedure

153 After intoxication, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS; Panbiotech) and  
154 fixed with a solution of 4 % paraformaldehyde (PFA; Sigma Aldrich) in PBS, pH 7.3, for  
155 20 min at room temperature (RT). They were washed twice again in PBS, and were then  
156 permeabilized and the non-specific sites blocked using a solution of PBS containing 0.1 % of  
157 saponin (Sigma Aldrich) and 1 % of FCS, for 15 min at RT. All primary antibody (Ab)  
158 incubations were performed in PBS containing 1 % of FCS, 0.1 mg/mL of saponin, for 2 h, at  
159 RT. The cells were then washed with PBS containing 1 % of FCS, 0.1 % of saponin, and  
160 incubated with the appropriate secondary Ab (goat anti-mouse, labeled with Alexa 488 or goat  
161 anti-rabbit, labeled with Alexa 568, Invitrogen), used at 5 µg/mL in PBS containing 1 % of FCS  
162 and 0.1 % of saponin, for 1 hour at RT.. The different Ab, and detailed procedures used  
163 throughout this study are listed in table 1.

164

165           Labeling TH-expressing neurons

166 TH-expressing (TH+) neurons, here, stand for “TH-immunoreactive neurons”. TH is involved  
167 in the conversion of phenylalanine into DA. Survival of TH-expressing neurons was expressed  
168 in terms of neuronal cell bodies labelled for this enzyme and was evaluated 24 hours and 48  
169 hours after toxin application, unless otherwise mentioned.

170

171           Double labelling

172 Colocalization of markers susceptible to be linked to cytotoxic effects of neurotoxins was  
173 detected by labeling cultures, already marked for TH, for one of the following molecules:  
174 (a) Cytochrome-C (CytC) was detected using an anti-CytC rabbit polyclonal Ab, in order to  
175 evaluate the effects of neurotoxins on the mitochondrial death pathway, (b) Caspase 3 was

176 detected with anti-activated caspase 3 rabbit polyclonal Ab to evaluate the extent of apoptosis,  
177 (c) Apoptosis Inducing Factor (AIF) was detected using an anti-AIF rabbit polyclonal Ab, (d)  
178 LC3B was detected with a rabbit polyclonal anti-LC3B (e)  $\alpha$ -synuclein was detected with a  
179 rabbit polyclonal anti- $\alpha$ syn. For the quantitative studies of marker colocalization, only TH-  
180 expressing neurons were taken into consideration.

181

### 182 *Evaluation of ROS production*

183 ROS production was evaluated by imaging, using the CellROX reagent (Thermo Fisher  
184 Scientific branch, Illkirch, France) following the procedure described by the manufacturer.  
185 CellROX reagent contains a probe that become fluorescence in contact of reactive oxygen  
186 species.

187

### 188 *Quantitative analyses of immunolabeled cultures with cell analyzer*

189 The immunolabeled cultures were automatically examined with ImageXpress (Molecular  
190 Devices, San Jose, CA, USA) equipped with a LED at 10x magnification. For each condition  
191 (6 culture wells), 20 automatically selected fields per well (representing 80 % of the total  
192 surface of the well) were automatically analyzed using MetaXpress software (Molecular  
193 Devices) to determine the total number of TH-expressing neuronal cell bodies, the number of  
194 neuronal cell bodies co-expressing TH along with Cyt-C or caspase 3, or the area of  $\alpha$ -synuclein  
195 in TH expressing neurons. In addition, the area of AIF1 in the nucleus and the area of the dot-  
196 like LC3 signal in the cytoplasm of TH-expressing neurons were determined. The results were  
197 expressed in terms of percentage of neurons displaying the character analyzed, as compared to  
198 control conditions. Preliminary experiments have shown that secondary Abs never stained the  
199 cultured cells. Therefore, the negative control, that is the threshold of negativity, was  
200 determined by examination of cultures after immunostaining.

201

202 *Global evaluation of necrosis and apoptosis*

203 Induction of necrosis and apoptosis were evaluated with ApoTox Glo assay kit (Promega,  
204 Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, the  
205 degradation of a cell impermeant substrate, by proteases released from dead cells, was used as  
206 proxy for necrosis levels. Similarly, apoptosis level was assessed with the presence of a  
207 aminoluciferin, produced by the degradation of its precursor by caspase-3/7 activity.

208

209 *ATP production*

210 After neurotoxic treatment, ATP levels were quantified with Cell titer Glo assay kit (Promega)  
211 according to the manufacturer's recommendations. The assay is based on the recording of  
212 luminescence generated by an ATP-dependent luciferase.

213

214 *Hematein-eosin staining*

215 Lewi bodies were observed using the hematein-eosin staining. After fixation, the cells were  
216 incubated 3 min at RT with hematein (Sigma Aldrich). They were washed twice in water and  
217 then washed twice again in ultra-pure water. The cells were incubated 5 min at room  
218 temperature with eosin (Sigma-Aldrich). They were washed once in water and they were then  
219 washed three times again in ultra-pure water.

220

221 *Statistical analyses*

222 In order to express the level of cytopathic effects, data were expressed in percentage of control  
223 conditions (no intoxication or no  $\alpha$ -syn = 100 %). All values were expressed as mean +/- SEM  
224 (standard error of the mean) of 6 wells. Statistical analyses were done for the different

225 conditions studied, using ANOVA followed by Dunnett's test when allowed, using GraphPad  
226 Prism, version 7,04 (GraphPad software Inc, La Jolla, CA, USA).

## 227 **RESULTS**

228

### 229 *Effects of the DA-toxins on survival of TH-expressing neurons*

230 In a preliminary study, effects of MPP<sup>+</sup>, 6OHDA and rotenone, on survival of TH-expressing  
231 neurons were assessed after 24 h and 48 h of intoxication. MPP<sup>+</sup> mainly acts as a mitochondrial  
232 complex I inhibitor; it has been widely used to induce PD-like symptoms in animals. The neuron  
233 toxin 6OHDA has the longest history of use as a PD model and has been commonly used to  
234 degenerate central catecholaminergic projections, including the nigrostriatal system <sup>10</sup>.  
235 Rotenone, a natural pesticide, was proven to provoke death of dopaminergic neurons. After  
236 being administered to animals, these toxins induce the production of LB-like inclusions in their  
237 brains. LB mainly consists of aggregated  $\alpha$ -syn. Here, these three toxins were used to mimic in  
238 cell cultures *in vitro* cytopathic effects observed in the brains of PD-suffering patients.

239 Whichever type of death they underwent, it was considered that a decrease in number of soma  
240 and disappearance of neurite network of TH-expressing neurons was a relevant expression of  
241 their death (see recommendations of <sup>11</sup>).

242 As shown in Figure 1, 6OHDA (**Figure 1A**) showed a lethal effect which slightly and  
243 progressively increased between 10  $\mu$ mol/L and 30  $\mu$ mol/L. No major differences between the  
244 results observed at 24 h and 48 h were observed except for the highest dose (30  $\mu$ mol/L).

245 By contrast, the maximal toxic effect of MPP<sup>+</sup> evolved with time (**Figure 1B**); after 24 h of  
246 treatment, only 20 % of TH-expressing neurons were killed at the dose of 16  $\mu$ mol/L (the  
247 maximal concentration tested) whereas after 48 h of treatment, this proportion reached 40 %.

248 Rotenone (**Figure 1C**), the most toxic component, already caused 40 % of TH-expressing  
249 neurons to disappear at the lowest dose of 0.1 nmol/L and almost 100 % at 20 nmol/L, the  
250 maximal dose tested, after 48 h of intoxication. Here again, no major difference was observed  
251 between 24 h and 48 h. The lethal effect of rotenone sharply increased beyond 10 nmol/L.



252 In addition to the survival of TH expressing neurons, we have assessed total cell viability, in  
253 presence of the three DA-toxins (**Figure 1 D-F**). After 24 h of intoxication, no significant  
254 decrease in cell viability was observed. Lower viability was however observed after 48 h of  
255 intoxication with all DA-toxins, but this decrease was modest when compared to the toxicity  
256 observed on TH-expressing neurons.

257 Altogether, although the three toxins are known to inhibit complex I of the mitochondrial  
258 respiratory chain, their molecular targets in the complex or in the neuron are probably different  
259 and cannot be limited to their sole mitochondrial effects. These observations prompted us to  
260 determine which kind of death, apoptosis, necrosis or other mode they induced.

261

262 *Evaluation of necrosis and apoptosis in a primary culture of mesencephalic cells, upon*  
263 *intoxication with DA-toxins*

264 We have first assessed the regulation of necrosis (assessed by loss of cell membrane integrity)  
265 and apoptosis (assessed by caspase-3/7 activity) by the three toxins. As shown in **Figure 2A**  
266 **and 2B**, 6OHDA killed mesencephalic cells by inducing apoptosis and had no pro-necrotizing  
267 effect. The apoptotic effect was dose-dependent and reached its maximum (about 250 %) after  
268 a 24-h intoxication. Beyond this time, cell bodies of dead cells probably fragmented and  
269 disappeared from the culture. Hence, the apparently paradoxical results observed after 48 h of  
270 contact with 6OHDA, where the percentage of apoptotic cells fell to about 160 %. By contrast,  
271 MPP<sup>+</sup> killed mesencephalic cells by inducing a cell death independent on apoptosis and partially  
272 dependent on necrosis.

273 This necrotic effect plateaued (240 %, 48 h of intoxication) at the concentration of 8  $\mu\text{mol/L}$ . It  
274 sharply increased after 24 h of intoxication (**Figure 2C**). By contrast, MPP<sup>+</sup> did not massively  
275 trigger apoptosis. The maximal induction of apoptosis (+ 70 % when compared to vehicle) was  
276 observed after 48 h of intoxication with the highest dose of MPP<sup>+</sup> (**Figure 2D**). Other doses of

277 MPP<sup>+</sup> triggered a limited induction of apoptosis, by 20 % to 30 %. Finally, rotenone exerted  
278 both apoptotic and necrotizing effects (expressed as indicated above) in a dose-dependent  
279 manner. Rotenone-induced necrosis was massive (290 %, 48 h of intoxication, 10 nmol/L) and  
280 began rather early (8 h) (**Figure 2E**). The massive necrotic effect explained why at 20 nmol/L,  
281 a lesser percentage of TH-expressing neurons was detected. A large proportion of necrotic  
282 neurons had already disappeared from the culture at this late stage. Apoptotic effects began to  
283 be significant after 24 h of intoxication and reached its maximum (about 240 %; 20 nmol/L)  
284 after 48 h (**Figure 2F**).

285

286 Next, we sought to further delineate the regulation of programmed cell death and sought to  
287 determine whether TH-expressing neurons showed an increased level of caspase3 and CytC  
288 after 24 h of 6OHDA (20  $\mu$ mol/L), MPP<sup>+</sup> (4  $\mu$ mol/L) or rotenone (10 nmol/L) application.  
289 These doses and time point were chosen as they were able to engage cell death mechanisms  
290 without dramatic cell death. The role of CytC in apoptosis is well established (for review see  
291 <sup>12</sup>). Its translocation, from mitochondria to cytoplasm, activates caspases involved in apoptosis.  
292 The number of caspase3-positive TH- expressing neurons was significantly increased upon  
293 6OHDA (+ 110%) or rotenone (+ 45%) application, while MPP<sup>+</sup> had no effect when compared  
294 to the control (**Figure 3A-B**). These results are highly similar to those obtained by measuring  
295 caspase-3/7 activity described above. The three toxins induced an increase in CytC levels, 24  
296 hours after application (**Figure 3C-D**). This effect was an early event after MPP<sup>+</sup> and rotenone  
297 application (observed after 8 h, data not shown).

298 Altogether, these results suggest 6OHDA mainly elicits caspase-dependent apoptosis while  
299 MPP<sup>+</sup> markedly triggers necrosis. Regarding rotenone, both investigated pathways were  
300 strongly stimulated.

301

302 *Effects of the DA-toxins on AIF in TH-expressing neurons*

303 AIF and PARP-1 are involved in the initiation of a caspase-independent pathways of  
304 programmed cell death, namely necroptosis and/or parthanatos <sup>11</sup>. Parthanatos is usually  
305 triggered by DNA damage due to alkylation or oxidative stress, which result in the release of  
306 mitochondrial AIF by PARP1 and its translocation into the nucleus, where AIF acts as the key  
307 actuators of this phenomenon and DNA fragmentation. AIF plays the role of a true “Janus”  
308 molecule, since it is endowed with red-ox activity in the mitochondria and with an apoptotic-  
309 like activity in the nucleus <sup>13</sup>.

310 The presence of AIF in the nucleus of TH-expressing neurons was investigated after application  
311 of the DA-toxins. The translocation of AIF into the nucleus was observed in TH-expressing  
312 neurons cultured for 8 h with MPP<sup>+</sup>. A similar translocation was observed after an application  
313 of 6OHDA and rotenone but only after 24 h, suggesting that necroptosis is a source of toxicity  
314 after an intoxication with these toxins (**Figure 4A, B**).

315 PARP-1 belongs to a family of nuclear enzymes, modulating DNA repair, transcriptional  
316 regulation, chromatin modification and genomic stability through polyADP-ribosylation <sup>14</sup>.  
317 PARP-1 over-activation leads to progressive ATP-depletion, preventing energy-dependent  
318 apoptosis <sup>15</sup>. PARP-1 activation promotes the cleavage of AIF and its translocation into the  
319 nucleus.

320 To determine whether the AIF pathway significantly contributes to the loss of TH-expressing  
321 neurons, we have investigated the toxicity of the three DA-toxins in presence of AG1436,1 an  
322 inhibitor specific of PARP-1 (**Figure 4C**).

323 AG14361 abolished the injury induced by MPP<sup>+</sup> (after 48 h application). In contrast, it did not  
324 protect against toxic effects of 6OHDA or rotenone.

325 These results provide the experimental evidence that AIF/PARP1-dependent cell death pathway  
326 is involved in the loss of nigral dopaminergic neurons caused by administration of MPP<sup>+</sup>, which  
327 is in agreement with the literature<sup>16</sup>.

328

### 329 *Mitochondrial pathology in presence of the DA-toxins*

330 Mitochondrial pathology will shortly translate into abnormal level of ATP and higher reactive  
331 oxygen species (ROS) production. As these events are early, we have extended the duration of  
332 the study, to include predominantly alive cells while under the toxic action of the drugs.

333 Among the three DA-toxins studied, only 6OHDA and rotenone induced a strong depletion in  
334 ATP production by mesencephalic cells (**Figure 5A**). Effects of rotenone appeared very early  
335 (after 4 h of intoxication) and did not evolve with time. Depressive effects of 6OHDA appeared  
336 later (24 h). It is worthy to note that there seemed to be a correlation between induction of  
337 necrosis and ATP depletion<sup>15</sup>, including kinetics of appearance, ATP depletion being known  
338 to trigger necrosis, although MPP<sup>+</sup> did not have an impact on ATP.

339 ROS production was studied between 15 min and 24 h after toxin application. All toxins were  
340 able to increase the number of TH-expressing neurons affected by an increase in ROS  
341 production (**Figure 5B-C**). Notably, ROS production was increased shortly after MPP<sup>+</sup>  
342 application (15 min) and remained high and constant through time. 6OHDA and rotenone have  
343 induced a detectable production of ROS, which started after 1 h of application and was  
344 transient.

345

### 346 *Effects of the DA-toxins on $\alpha$ -syn aggregation in TH-expressing neurons and possible release* 347 *of LB-like bodies*

348

349 Accumulation and aggregation of  $\alpha$ -syn is a key hallmark of Parkinson's disease. The three  
350 DA-toxins induced an apparent aggregation (as shown by the specific detection of the  
351 aggregated form of alpha-synuclein band by production of LB-like inclusions, **Figure 6A**) of  
352  $\alpha$ -syn. After 48 h of application, 6OHDA (20  $\mu$ mol/L) and MPP<sup>+</sup> (4  $\mu$ mol/L) significantly  
353 increased area of total alpha-synuclein staining in dopaminergic neurons showing an  
354 accumulation of  $\alpha$ -syn (**Figure 6B**). Neuronal loss is rapid after 48h of a rotenone injury. For  
355 this reason, the accumulation of  $\alpha$ -syn was investigated 24h after the application of rotenone.  
356 At this time point, a massive appearance of  $\alpha$ -syn was observed at 10 nmol/L. In the three cases,  
357 an accumulation of  $\alpha$ -syn were observed inside dopaminergic neurons.

358 The presence of  $\alpha$ -syn aggregates increases the burden of protein clearance systems such as  
359 macroautophagy<sup>17</sup>. Macroautophagy is a mechanism implying autophagosomes, which engulf  
360 misfolded proteins and injured cytosolic organelles such as mitochondria. During the  
361 progression of autophagy, cytosolic LC3-I is conjugated to phosphatidylethanolamine to form  
362 LC3-II. LC3-II is located in the inner and outer membranes of autophagosomes. Autolysosomes  
363 are then formed by fusing autophagosomes with lysosomes in order to degrade their content.  
364 We investigated the expression of LC3 in TH-expressing neurons after 24 h of exposure to the  
365 DA-toxins by ICC, rather than WB, which is not cell specific. A specific program was applied  
366 during automatic data analysis to select only LC3 positive dot-like vesicles, which were  
367 considered as a surrogate marker for autolysosomes (**Figure 6D**). We observed a significant  
368 increase of dot-like LC3 signal after the application of MPP<sup>+</sup>, 6OHDA and rotenone. We  
369 inferred that macroautophagy is stimulated in response to the intoxication and to the abnormal  
370 accumulation of  $\alpha$ -syn.

## 371 **DISCUSSION**

372

373 For the first time, to the best of our knowledge, the mode of cell death induced by DA-toxins  
374 (usually used as an inducer of PD in animals) on primary culture of mesencephalic  
375 dopaminergic neurons was dissected and compared. As already shown in literature, we  
376 observed that all these toxins were able (at different levels of intensity) to induce aggregation  
377 of  $\alpha$ -syn in dopaminergic neurons<sup>18-20</sup>. Under our conditions, we also observed that many  $\alpha$ -  
378 syn aggregates were found outside the neurons in the culture. These aggregates looked like LB,  
379 known to mainly consist of aggregated  $\alpha$ -syn.

380 The three toxins used in this study were accepted to act on mitochondria and more specifically  
381 on mitochondrial complex 1 (with different degrees of intensity)<sup>16</sup>. This does not exclude that  
382 they act on other cellular targets. However, these three cytopathic effects oriented the discussion  
383 of these results toward a link between induction of mitochondrial functioning impairment and  
384  $\alpha$ -syn involvement in dopaminergic neuron death: production of ROS, CytC release, and ATP  
385 depletion on the one hand, and extension of dopaminergic neuronal death on the other. We shall  
386 therefore concentrate the discussion on mitochondrial effects of the three DA-toxins.

387

388 6OHDA is known to inhibit both complexes I and IV in the mitochondrial respiratory chain.  
389 Here we showed that 6OHDA induced an early (4 h) oxidative stress associated with a large  
390 release of CytC, and activation of caspase 3 leading to apoptotic cell death within the 24 h  
391 following its application. Whatever the dose of toxin used, we only detected apoptosis. These  
392 findings were in accordance with literature showing that 6OHDA massively increased ROS  
393 production in mitochondria and cytosol via auto-oxidation, within the first minutes following  
394 its application<sup>21</sup>. 6OHDA was imported faster in dopaminergic neurons thanks to DA  
395 transporters<sup>22</sup> and quickly auto-oxidized into the mitochondria. Twenty-four hours after

396 6OHDA application, intracellular and, unexpectedly, extracellular  $\alpha$ -syn aggregates were  
397 observed in the culture, consistent with what had already been seen in 6OHDA animal models<sup>23</sup>.  
398 Endoplasmic reticulum stress could play a role in 6OHDA toxicity<sup>23</sup>. Finally, Giordano and  
399 colleagues<sup>24</sup> proved that 6OHDA shares none of the characteristics of an inhibitor of direct or  
400 indirect mitochondrial oxidative phosphorylation, which is in accordance with the oxidative  
401 stress we observed after 6OHDA application. Selegiline, indeed, protects neurons from  
402 6OHDA injuries by reducing the production of ROS, upregulating superoxide dismutase and  
403 catalase, and suppressing non-enzymatic, iron-catalyzed auto-oxidation of DA<sup>25,26</sup>(see **Figure**  
404 **7**). Altogether, these data are in favor of an early oxidative stress leading to neuronal death by  
405 apoptosis.

406

407 Rotenone is a widely used chemical inducer of PD-like symptoms in animals<sup>27</sup>; it is said to be  
408 an inhibitor of complex I of the mitochondrial respiratory chain<sup>20</sup>. Rotenone-induced PD  
409 replicates many features of sporadic PD including  $\alpha$ -syn production and aggregation. We  
410 showed that rotenone exerted a massive toxic effect on TH-expressing neurons, dependent on  
411 dose and time of application. It induced an important necrosis of neurons, especially at the  
412 highest concentrations, whereas at low concentrations it only triggered apoptosis. It induced a  
413 decrease in ATP pools, and a large CytC release (after 8 h of treatment). This is in accordance  
414 with what was previously shown by Pei and colleagues<sup>28</sup> on primary cortical neurons: rotenone,  
415 indeed, was proven to induce activation of the permeability transition pore, mitochondrial  
416 swelling, decrease in mitochondria-driven ATP levels, and induced caspase-3 independent cell  
417 death. We observed that treatment with rotenone (10 nmol/L) induced formation of  $\alpha$ -syn  
418 inclusions, reminiscent of LB, in TH-expressing neurons. Only at low doses, large inclusions  
419 of  $\alpha$ -syn were seen in their cytosol; at the highest doses (probably linked to occurrence of  
420 necrosis)  $\alpha$ -syn aggregates were observed outside of TH-expressing neurons.

421 Rotenone (between 0.1 and 1 nmol/L) induced a large microtubule destabilization in TH-  
422 expressing neurons, that could disrupt vesicular transport along microtubule and cause the  
423 accumulation of DA vesicles in the soma<sup>29</sup>. This probably leads to the oxidative stress due to  
424 DA oxidation in the cytosol, and possibly to protein oxidation as shown by release of CytC  
425 (within 8 h) from mitochondria and triggering of the apoptotic cascade. An effect of rotenone  
426 on the mitochondrial complex I was suspected<sup>30</sup> although proved that in absence of complex  
427 I, dopaminergic neurons were still sensitive to rotenone. For the highest concentration (above  
428 1 nmol/L), apoptosis was moderate and the cell death seemed to largely involve necrosis. ATP  
429 is indispensable for the formation of apoptosome complex and subsequent activation of the  
430 caspase cascade<sup>31</sup>. Rotenone quickly depleted (by 35 %) ATP level in mesencephalic cells; this  
431 could explain the lack of activation of caspase 3. Kang and colleagues<sup>32</sup> showed indeed that  
432 rotenone at high doses (10 nmol/L) induced a dysregulation of apoptosis via the depletion of  
433 ATP that blocked the formation of an adequate apoptosome complex and then induced a  
434 caspase-independent necrotic phenomenon after mitochondrial release of CytC.

435

436 MPP<sup>+</sup> is actively transported inside dopaminergic neurons via DA transporters; it would block  
437 complex I of the respiratory chain, although, here again, Choi and colleagues<sup>30</sup> showed that the  
438 complex I was not required for the toxicity of this toxin to be expressed. In fact, no apoptosis  
439 or oxidative stress occurred after MPP<sup>+</sup> application. Contrary to rotenone, MPP<sup>+</sup> did not induce  
440 ATP depletion within the first 24 h. By contrast, 24 h after application of MPP<sup>+</sup>, a non-  
441 negligible release of CytC was observed. Additionally, while probably inhibiting the respiratory  
442 chain as rotenone, MPP<sup>+</sup> did not induce similar neurotoxicity. Some authors have suggested  
443 that it could act as a cation and thus impair the mitochondrial respiratory chain<sup>24</sup>. We also  
444 observed a large increase in mitochondrial AIF leakage. AIF is required for the maintenance of  
445 the mitochondrial respiratory complex I. This increase was followed by a significant increase



446 in LC3 (a marker of autophagy) after application of MPP<sup>+</sup>. In parallel, aggregation of  $\alpha$ -syn was  
447 observed inside the neurons. This finding may support the role of the autophagy at the early  
448 stage of MPP<sup>+</sup> toxicity, to remove the protein aggregates<sup>33</sup>. The PARP-1 pathway was also  
449 involved in the degenerative process; the release of AIF following the PARP-1 activation is  
450 significant of a necroptotic cell death process. Altogether, these results suggest that at early  
451 stages, MPP<sup>+</sup> induced autophagy, creating an overwhelming amount of aggregated protein  
452 which the cell was unable to remove and the neuron therefore died via necroptosis.

453

454 Altogether, our results suggest that oxidative stress induced TH-expressing neuron death as  
455 well as production of aggregates of  $\alpha$ -syn. These aggregates were localized inside and outside  
456 the neurons. Extracellular  $\alpha$ -syn could activate the microglial cells. The uncontrolled activation  
457 of microglia may directly affect neurons by releasing various inflammatory mediators<sup>34</sup>. In turn,  
458 they could induce oxidative stress, generating new aggregates in unaffected neurons,  
459 contributing to the development of neurodegenerative processes. Alteration of mitochondrial  
460 electrical functions without major oxidative stress (such as that done by MPP<sup>+</sup> acting as a cation  
461 and inducing depolarization) induced autophagy. Depolarization of mitochondria, PINK1 and  
462 parkin modulate transport of damaged mitochondria to the perinuclear region for autophagy<sup>35</sup>.  
463 This pathway metabolizes misfolded or aggregated proteins. Indeed, correct autophagy-  
464 lysosomal activities seem to be essential to prevent neurodegenerative diseases by removing  
465 damaged or dysfunctional proteins and organelles<sup>24</sup>. When the system is overloaded then  
466 necroptosis and cell death would occur.

467 In conclusion, we unraveled in more detail the mode of action of three toxins (traditionally used  
468 *in vitro* and *in vivo* to mimic either cytopathological or clinical features of PD) on primary  
469 dopaminergic neurons in culture. We identified the different processes of death induced by DA-  
470 toxins in dopaminergic neurons in primary culture. It seemed that any mitochondrial

471 disturbances induced aggregation of  $\alpha$ -syn protein. The intracellular aggregates contribute to  
472 the cell death. They could also be found outside of the cells as  $\alpha$ -syn aggregates or LB-like  
473 structures which could activate microglia and then TNF $\alpha$  release. This inflammation could in  
474 turn induce the death of TH-expressing neurons. Such a vicious circle could explain the  
475 propagation of the TH neuronal death occurring in PD;  $\alpha$ -syn would act in two ways, directly  
476 on mitochondria, when intracellular, and on microglia, via inflammatory cytokines, when  
477 extracellular.

478 Finally, these results merit two comments. The first pertains to the choice of DA-toxin  
479 for studying putative antiparkinsonian drugs. One model could prove the efficacy of a new  
480 chemical compound and another not. The second is the question of the role of DA in induction  
481 of the disease. An excess of this mediator, known to be an oxidant molecule, in the TH-  
482 expressing neurons, could be one of the factors triggering the disease, although causes other  
483 than oxidative stress could also be involved.

484

#### 485 **Sources of support:**

486 This study was funded by internal funds of Neuro-Sys SAS.

487

#### 488 **Conflict of Interest**

489 The authors have no conflict of interest to report.

490 **REFERENCES**

- 491 1. Martin, I., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. The impact of genetic research on our  
492 understanding of Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* **183**, 21–41 (2010).
- 493 2. Jankovic, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg.*  
494 *Psychiatry* **79**, 368–376 (2008).
- 495 3. Gasser, T. Genomic and proteomic biomarkers for Parkinson disease. *Neurology* **72**, S27-  
496 31 (2009).
- 497 4. Hardy, J., Lewis, P., Revesz, T., Lees, A. & Paisan-Ruiz, C. The genetics of Parkinson's  
498 syndromes: a critical review. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 254–265 (2009).
- 499 5. Thomas, B. & Beal, M. F. Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **16 Spec No. 2**, R183-  
500 194 (2007).
- 501 6. Nalls, M. A. *et al.* A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with  
502 Lewy bodies. *JAMA Neurol.* **70**, 727–735 (2013).
- 503 7. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**,  
504 889–909 (2003).
- 505 8. Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. K. & Wood, N. W. Expanding insights of  
506 mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 207–219 (2006).
- 507 9. Visanji, N. P. *et al.* PYM50028, a novel, orally active, nonpeptide neurotrophic factor  
508 inducer, prevents and reverses neuronal damage induced by MPP<sup>+</sup> in mesencephalic  
509 neurons and by MPTP in a mouse model of Parkinson's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed.*  
510 *Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 2488–2497 (2008).
- 511 10. Beal, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 325–334  
512 (2001).
- 513 11. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the  
514 Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).

- 515 12. Emerit, J., Edeas, M. & Bricaire, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress.  
516 *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **58**, 39–46 (2004).
- 517 13. Delavallée, L., Cabon, L., Galán-Malo, P., Lorenzo, H. K. & Susin, S. A. AIF-mediated  
518 caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life* **63**,  
519 221–232 (2011).
- 520 14. Szántó, M. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a  
521 DNA-repair protein. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **69**, 4079–4092 (2012).
- 522 15. Skulachev, V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*  
523 *Int. J. Program. Cell Death* **11**, 473–485 (2006).
- 524 16. Iannielli, A. *et al.* Pharmacological Inhibition of Necroptosis Protects from Dopaminergic  
525 Neuronal Cell Death in Parkinson’s Disease Models. *Cell Rep.* **22**, 2066–2079 (2018).
- 526 17. Boland, B. *et al.* Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative  
527 disorders of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2018). doi:10.1038/nrd.2018.109
- 528 18. Alves da Costa, C. *et al.* 6-Hydroxydopamine but not 1-methyl-4-phenylpyridinium  
529 abolishes alpha-synuclein anti-apoptotic phenotype by inhibiting its proteasomal  
530 degradation and by promoting its aggregation. *J. Biol. Chem.* **281**, 9824–9831 (2006).
- 531 19. Hung, K.-C., Huang, H.-J., Lin, M.-W., Lei, Y.-P. & Lin, A. M. Roles of autophagy in  
532 MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity in vivo: the involvement of mitochondria and  $\alpha$ -synuclein  
533 aggregation. *PloS One* **9**, e91074 (2014).
- 534 20. Betarbet, R. *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson’s  
535 disease. *Nat. Neurosci.* **3**, 1301–1306 (2000).
- 536 21. Kapralov, A. *et al.* Peroxidase activity of hemoglobin-haptoglobin complexes: covalent  
537 aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages. *J. Biol. Chem.* **284**, 30395–  
538 30407 (2009).

- 539 22. Storch, A., Kaftan, A., Burkhardt, K. & Schwarz, J. 6-Hydroxydopamine toxicity towards  
540 human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial  
541 energy metabolism. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* **107**, 281–293 (2000).
- 542 23. Wei, X. *et al.* Fibroblast growth factor 1 attenuates 6-hydroxydopamine-induced  
543 neurotoxicity: an in vitro and in vivo investigation in experimental models of parkinson's  
544 disease. *Am. J. Transl. Res.* **6**, 664–677 (2014).
- 545 24. Giordano, S., Lee, J., Darley-USmar, V. M. & Zhang, J. Distinct effects of rotenone, 1-  
546 methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on cellular bioenergetics and cell  
547 death. *PloS One* **7**, e44610 (2012).
- 548 25. Khaldy, H. *et al.* Comparative effects of melatonin, L-deprenyl, Trolox and ascorbate in  
549 the suppression of hydroxyl radical formation during dopamine autoxidation in vitro. *J.*  
550 *Pineal Res.* **29**, 100–107 (2000).
- 551 26. Ghavami, S. *et al.* Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders.  
552 *Prog. Neurobiol.* **112**, 24–49 (2014).
- 553 27. Sherer, T. B., Kim, J. H., Betarbet, R. & Greenamyre, J. T. Subcutaneous rotenone  
554 exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein  
555 aggregation. *Exp. Neurol.* **179**, 9–16 (2003).
- 556 28. Pei, W., Liou, A. K. F. & Chen, J. Two caspase-mediated apoptotic pathways induced by  
557 rotenone toxicity in cortical neuronal cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*  
558 **17**, 520–522 (2003).
- 559 29. Ren, Y., Liu, W., Jiang, H., Jiang, Q. & Feng, J. Selective vulnerability of dopaminergic  
560 neurons to microtubule depolymerization. *J. Biol. Chem.* **280**, 34105–34112 (2005).
- 561 30. Choi, W.-S., Kruse, S. E., Palmiter, R. D. & Xia, Z. Mitochondrial complex I inhibition is  
562 not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat.  
563 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15136–15141 (2008).

- 564 31. Pang, Y. *et al.* Structure of the apoptosome: mechanistic insights into activation of an  
565 initiator caspase from *Drosophila*. *Genes Dev.* **29**, 277–287 (2015).
- 566 32. Kang, H., Han, B.-S., Kim, S.-J. & Oh, Y. J. Mechanisms to prevent caspase activation in  
567 rotenone-induced dopaminergic neurodegeneration: role of ATP depletion and  
568 procaspase-9 degradation. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* (2012).  
569 doi:10.1007/s10495-012-0699-0
- 570 33. Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K. & Stefanis, L. Wild type alpha-synuclein is  
571 degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J.*  
572 *Biol. Chem.* **283**, 23542–23556 (2008).
- 573 34. More, S. V., Kumar, H., Kim, I. S., Song, S.-Y. & Choi, D.-K. Cellular and molecular  
574 mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *Mediators*  
575 *Inflamm.* **2013**, 952375 (2013).
- 576 35. Vives-Bauza, C. *et al.* PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in  
577 mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 378–383 (2010).
- 578
- 579

580 **Figure legend**

581

582 **Figure 1.** Effect of the different doses of DA-toxins on TH-expressing neurons and cell viability. Survival  
583 of TH expressing neurons after application of 6OHDA (A), MPP<sup>+</sup> (B) and Rotenone (C) was studied after  
584 24 hours and 48 hours. Cell viability in a total mesencephalic culture after application of 6OHDA (D),  
585 MPP<sup>+</sup> (E) and rotenone (F) 100% = 61.2 +/- 1. All values were expressed as mean +/- SEM; n=6/group;  
586 \*, p<0,05 with One-way ANOVA followed by Dunnett's test.

587 **Figure 2.** Effect of the different doses of DA-toxins on necrosis and apoptosis. Cell deaths in a total  
588 mesencephalic culture induced by 6OHDA (A, B), MPP<sup>+</sup> (C, D) or rotenone (E, F) is shown. 100%  
589 corresponds to the mean intensity of luminescence or fluorescence in the vehicle condition. All values  
590 were expressed as mean +/- SEM; n=6/group; \*, p<0,05 with One-way ANOVA followed by Dunnett's  
591 test.

592 **Figure 3.** Caspase 3 and cytochrome C in dopaminergic neurons upon DA-toxins application. (A)  
593 Quantification of mesencephalic neurons positive for TH and caspase 3 staining. (B) Representative  
594 pictures of TH neurons, negative (left panel) and positive (right panel) for cleaved caspase 3. (C)  
595 Quantification of mesencephalic neurons positive for TH and cytochrome C staining. (D)  
596 Representative pictures of TH neurons, negative (left panel) and positive (right panel) for cytochrome  
597 C. 100% is equivalent to 8 +/- 0,4 neurons (A) or to 5 +/- 0,4 neurons (C). All values were expressed as  
598 mean +/- SEM; n=6/group; \*, p<0,05 with One-way ANOVA followed by Dunnett's test.

599 **Figure 4.** Effect of the DA-toxins on necroptosis pathway. (A and B) AIF staining in TH expressing  
600 neurons and representative pictures. (B). Survival of TH expressing neurons upon intoxication and  
601 treatment with AG14361 (1µmol/L), an inhibitor of PARP1. 100% = 9 +/- 0.6 neurons (AIF and TH  
602 neurons). 100% = 15 +/- 0.6 neurons (TH neurons). All values were expressed as mean +/- SEM;  
603 n=6/group; \*, p<0,05 with One-way ANOVA followed by Dunnett's test.

604 **Figure 5.** Mitochondrial pathology after DA-toxins application. Level of ATP (A) and oxidative stress (B-  
605 C) were determined at different time points. Representative pictures are showing TH expressing  
606 neurons with low level of ROS (left panel) or high level of ROS (right panel). 100% corresponds at the  
607 mean intensity of luminescence in the vehicle condition (ATP) or at 5 +/- 1 neurons (ROS). All values  
608 were expressed as mean +/- SEM; n=6/group; \*, p<0,05 with One-way ANOVA followed by Dunnett's  
609 test.

610 **Figure 6.** Alpha-synucleinopathy in dopaminergic neurons after exposure to 6OHDA, MPP<sup>+</sup> or  
611 rotenone. **(A).** Upper panel: Representative picture of aggregated  $\alpha$ -syn (in green) inside TH-expressing  
612 neurons (in red) (white arrows) after double-immunofluorescence microscopy, obtained with an  
613 antibody anti-aggregated  $\alpha$ -syn (scale bar 100  $\mu$ m). Lower panel: Representative picture of phase  
614 contrast microscopy reveals intracellular Lewy body-like structures (scale bar 100  $\mu$ m). **(B, C).**  
615 Representative picture of  $\alpha$ -syn, obtained with an antibody anti-ssssssssssss $\alpha$ -syn and the area of  
616  $\alpha$ -syn staining overlapping with TH staining, corrected by the number of TH neurons, after an injury  
617 with 6OHDA (48 h), MPP<sup>+</sup> (48 h) or rotenone (24 h). 100% is equivalent to 7,1 +/- 0,38 neurons. **(D).**  
618 Representative pictures of LC3 staining (red) in TH expressing neurons (green) and the segmentation  
619 resulting from data processing (white). Arrow: TH neurons; star: non TH neuron showing LC3 staining.  
620 Data processing removed background signal to consider only dot structures in TH expressing neurons.  
621 **(E).** LC3 staining in dopaminergic neurons in presence of the toxins. 100% is equivalent to 1.7 +/- 0,2  
622 neurons. All values were expressed as mean +/- SEM; n=6/group; \*, p<0,05 with One-way ANOVA  
623 followed by Dunnett's test.



624 Table 1. List of Ab used in the present study

625

Antibody	Characteristics	Fixation	Dilution	Provider	Reference
Apoptosis inducing factor (AIF)	Polyclonal, rabbit	PFA	1/50	Santa cruz biotechnology	SC5586
aggregated alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn)	Monoclonal, mouse	PFA	1/200	BioLegend	BLE847801
alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn)	Polyclonal, rabbit	PFA	1/200	Cell signaling	2642S
Caspase 3	Polyclonal, rabbit	PFA	1/500	Sigma Aldrich	C8487
Cytochrome C (CytC)	Polyclonal, rabbit	PFA	1/100	Abcam	ab90529
LC3B	Polyclonal, rabbit	PFA	1/25	Cell signaling	4108S
Tyrosine hydroxylase (TH)	Monoclonal, Mouse	PFA	1/10 000	Sigma Aldrich	T1299

626

# Figure 1

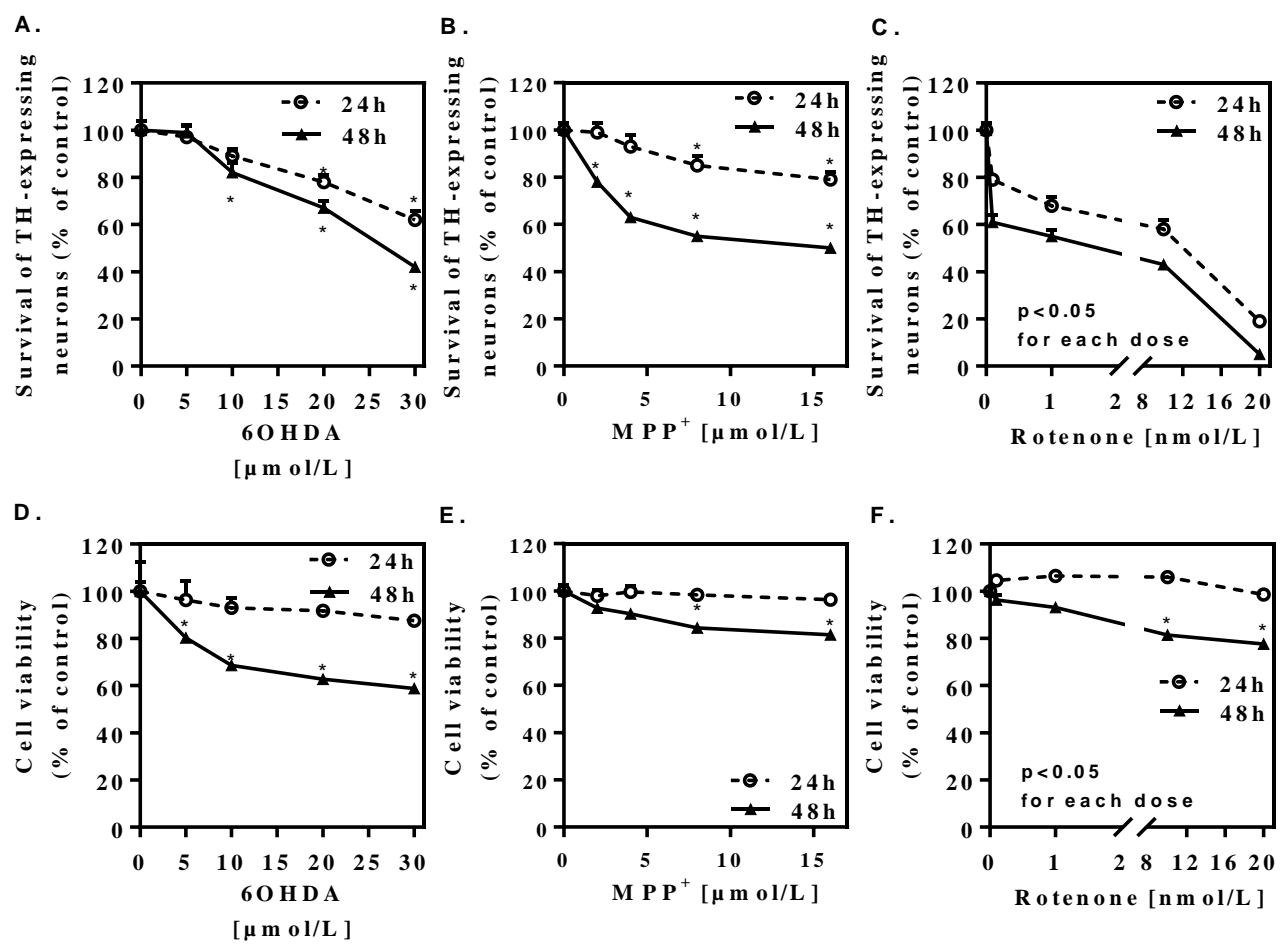


Figure 2

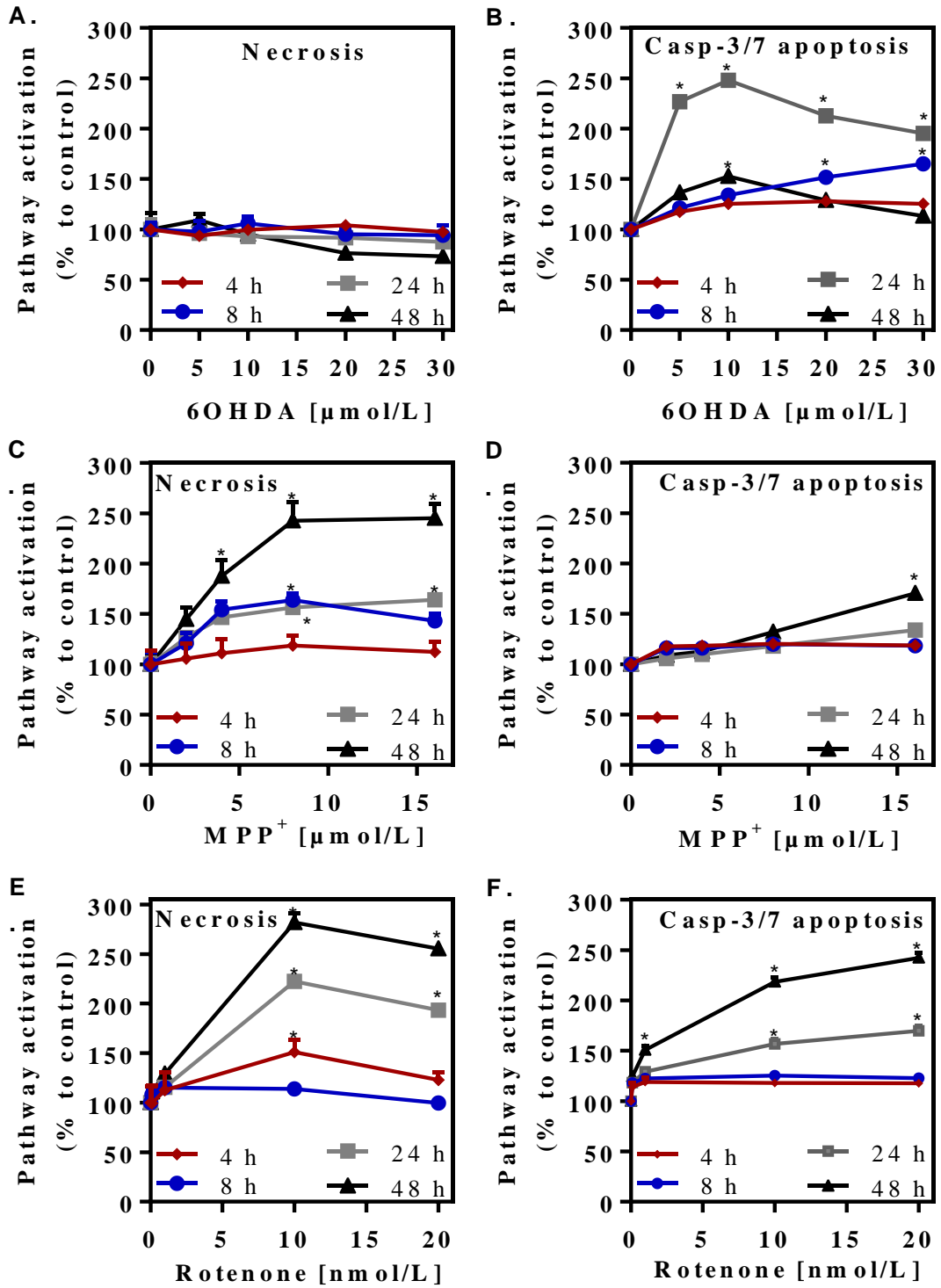


Figure 3

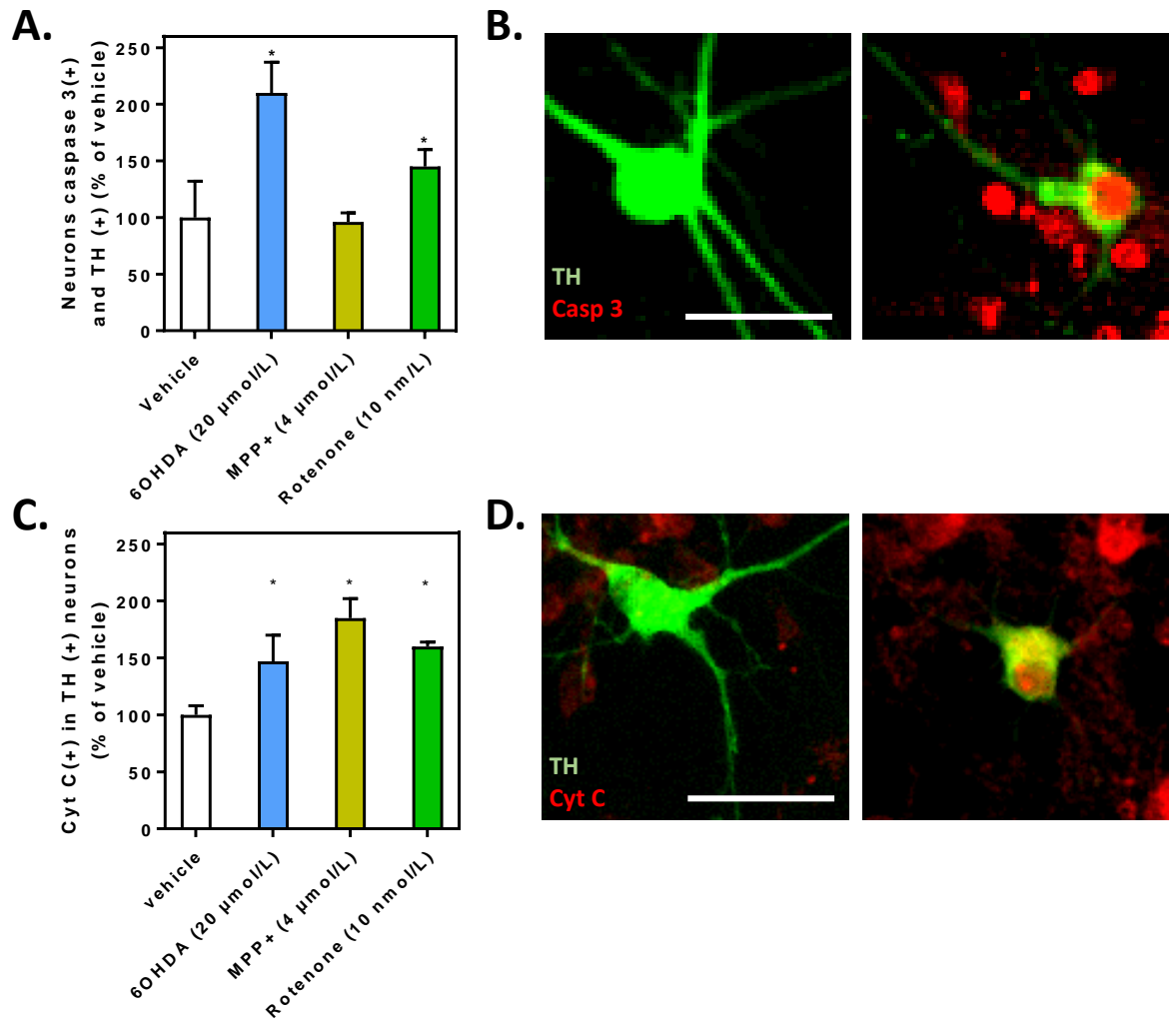
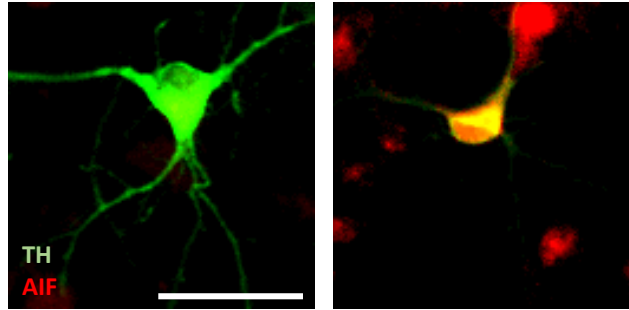
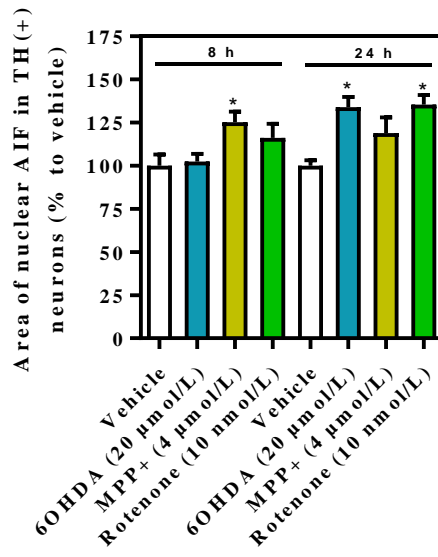


Figure 4

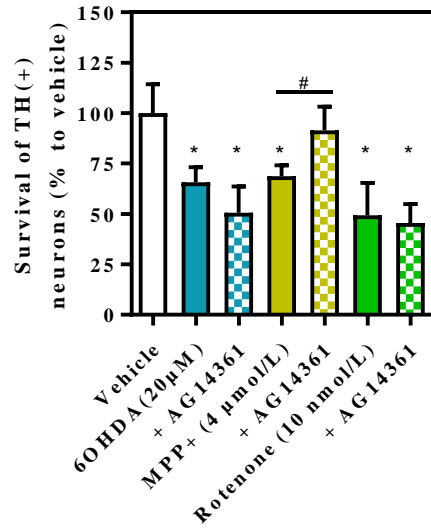
A.



B.



C.



# Figure 5

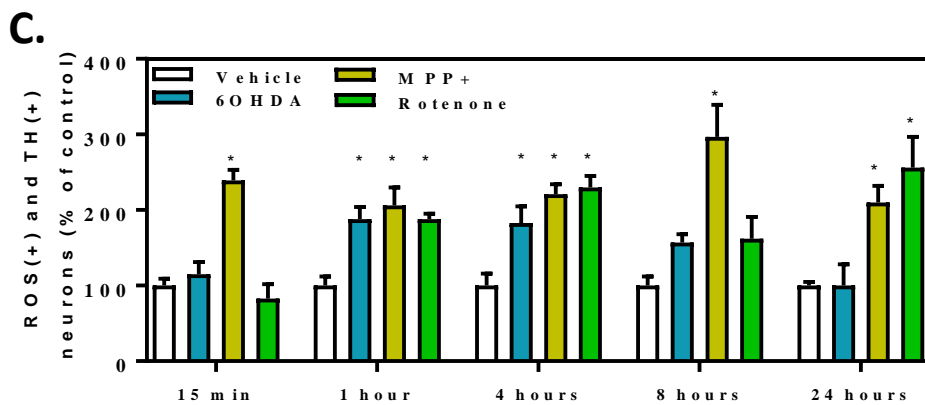
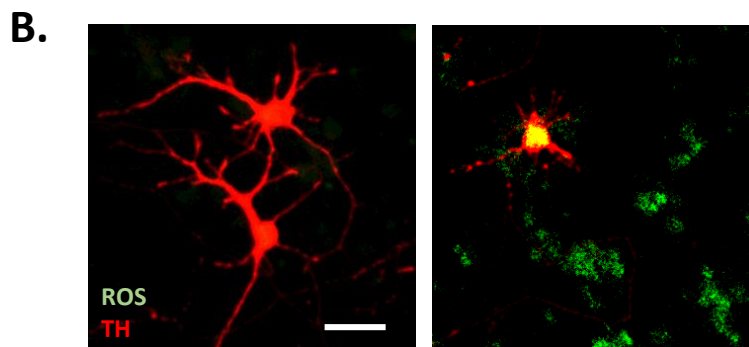
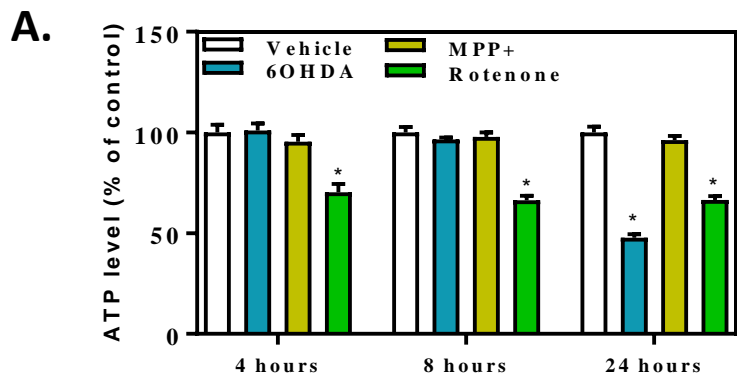


Figure 6

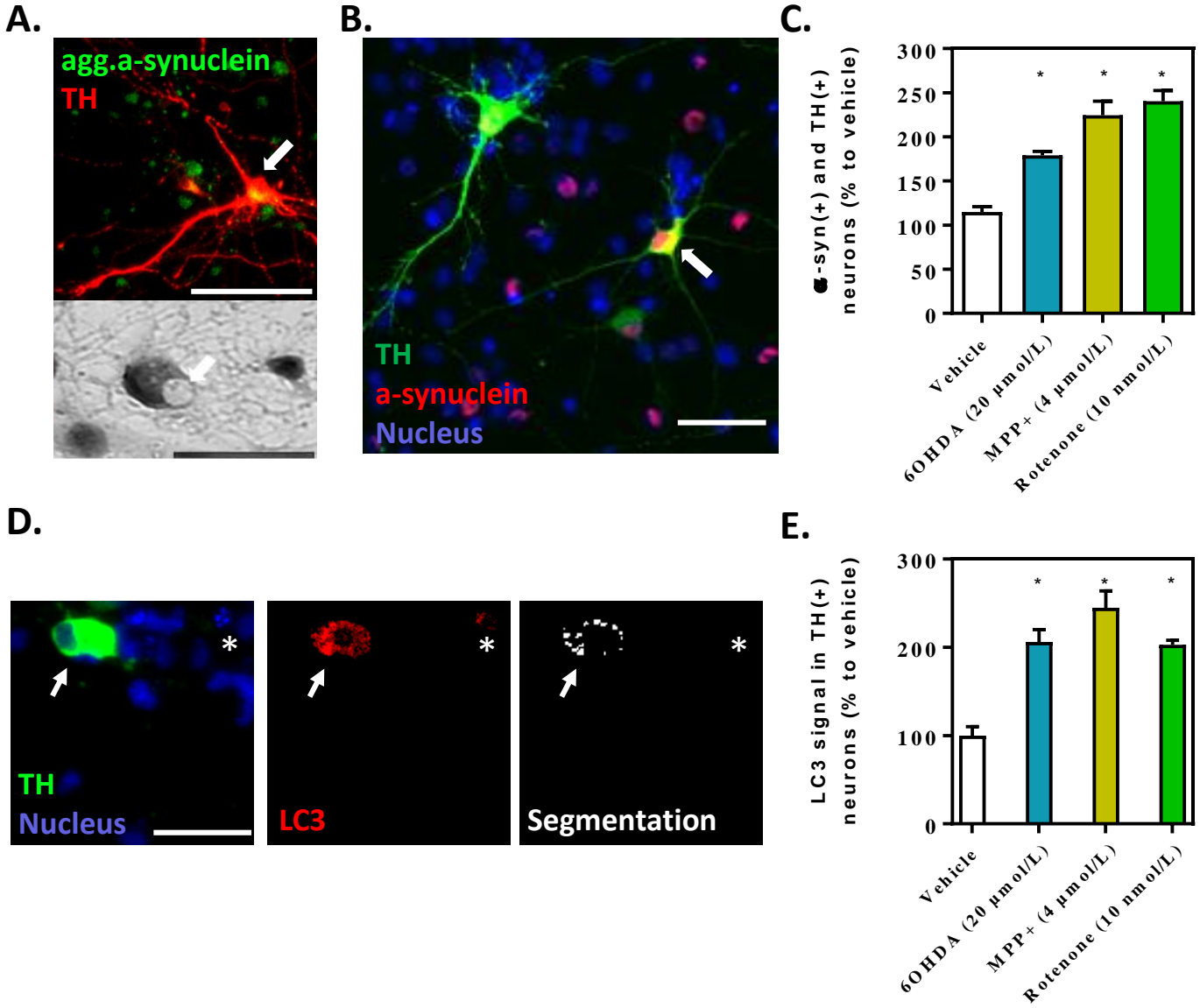
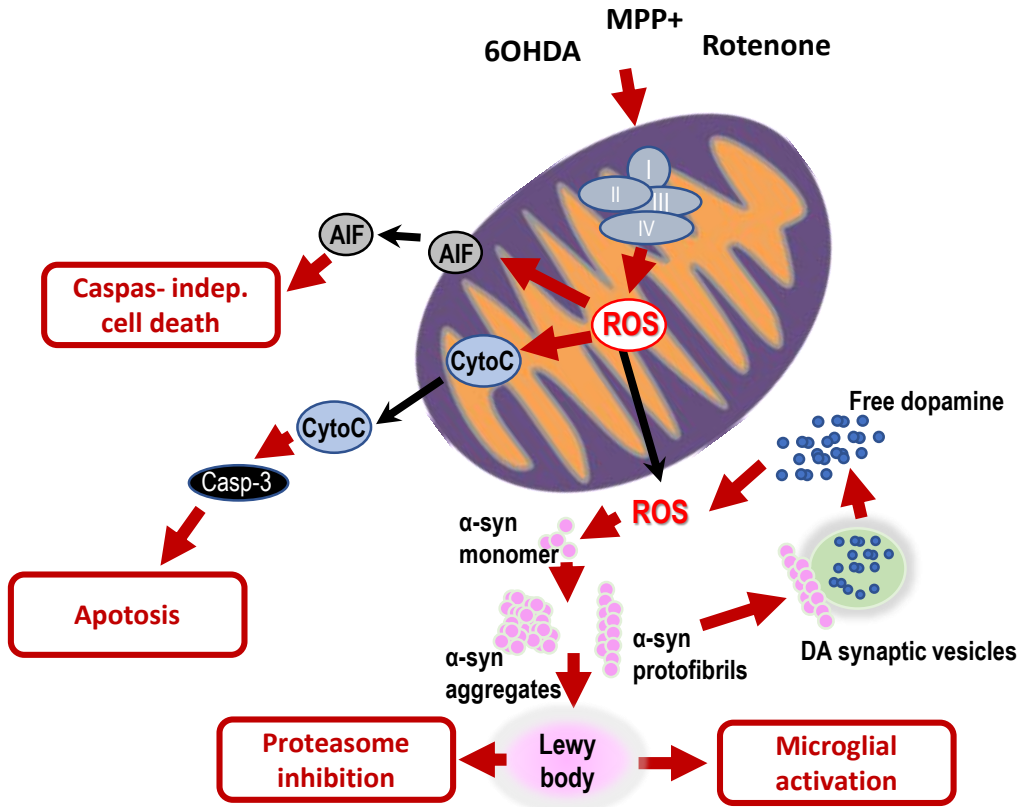


Figure 7





## 7.2. Posters

N Callizot, M Combes, R Steinschneider and P Poindron. Effect of beta-estradiol in a long term in vitro model of central myelination, a treatment for Multiple sclerosis 42<sup>nd</sup> *Society For Neurosciences 2012 New Orleans (LA)*.

M Combes, R Steinschneider and N Callizot. Effect of beta-estradiol on myelination of neurons by oligodendrocytes in coculture: a new long term in vitro model of central myelination 14<sup>th</sup> *ASENT 2012 Washington (DC)*.

### **Published in Neurotherapeutics Jul 2012**

N Callizot, M Combes and R Steinschneider. Protective effect of beta-estradiol on chemotherapeutic agent induced demyelination in a new and useful vitro model for demyelination / remyelination. 13<sup>th</sup> *ASENT 2011 Bethesda (MD)*.

### **Published in Neurotherapeutics Jul 2011**

M Combes, P Poindron, N Callizot. Role of b Amyloid (Ab) Oligomeric fractions in ALS disease. ICNMD June 2014 Nice (France)

M Combes, P Poindron, N Callizot. Beta-estradiol protects cortical neurons from beta-amyloid oligomers toxicity through mediations of the Ras/raf and PI3K pathways. SFN November 2014 Washington (DC)

N Callizot, M Combes, P Poindron. Study of mitochondrial death pathways in different cellular models of Parkinson's disease: effect of 17 $\beta$ -Estradiol. SFN November 2014 Washington (DC)

N Callizot, M Combes, C Tanzi, P Poindron. NSP01-E01 and NSP01-C01: New preparations able to protect from beta-amyloid peptide (A $\beta$ ) injuries. Potential treatments for Alzheimer's disease. ARUK CONFERENCE March 2014 London (UK)

M Combes, P Poindron, J Mariani, N Callizot. Neurodegeneration induced by A $\beta$  oligomeric fractions : Role of NMDA receptors and mGluR5. AD/PD March 2015 Nice (France)

N Callizot, M Combes, P Poindron.  $\alpha$ -synuclein: Cause or consequence of cytopathological lesions observed in in vitro models of Parkinson's disease. AD/PD March 2015 Nice (France)

N Callizot, M Combes, P Poindron, C Tanzi, J Ouazzani, G Arcile, L Cariel, C Rabhi. Neuroprotective effect of SNC-1 a natural plant extract. Promising treatment for Alzheimer's and Parkinson's disease? Phyt'arom June 2015 Grasse (France)

M Combes, P Poindron, J Mariani, N Callizot. Deleterious effects of amyloid beta peptide in the neuromuscular junction: consequences in ALS disease. JSFM Novembre 2015 Lyon (France)

M Combes, P Poindron, J Mariani, N Callizot. Pathological role of amyloid peptide in neuromuscular disease, glutamate and glucose involvement. Myology March 2016 Lyon (France)

M Combes, P Poindron, N Callizot. Mode of action study of NSP01-E, a potential treatment for Alzheimer's disease, in protection against amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) injury. AAIC Juillet 2016 Toronto (Canada)

M Combes, P Poindron, Roisin Owens, N Callizot. A novel triple cell co-culture model for mimicking the BBB into normal or pathological situations. MNM Septembre 2016 Londres (Angleterre)

N Callizot, M Combes, P Poindron. Amyloid peptide and cytoplasmic TDP-43 accumulation in pathogenesis of ALS: an in vitro study. AD/PD Mars 2017 Vienne (Autriche)

M Combes, P Poindron, N Callizot. MPP+ induced dopaminergic neuron death through necroptosis and autophagy. AD/PD Mars 2017 Vienne (Autriche)

Noelle Callizot, Maud Combes, Clémence Farrugia, Roisin Owen, Philippe Poindron. Effects of circulating and neuronal amyloid peptide oligomers on the BBB integrity: consequences on the neurodegeneration process. AAIC Juillet 2017 Londres (Angleterre).

Noelle Callizot, Maud Combes, Clémence Farrugia, Roisin Owen, Philippe Poindron. Effects of circulating and neuronal amyloid peptide oligomers on BBB integrity: consequences for the disease. MNM Septembre 2017 Londres (Angleterre).

Noelle Callizot, Maud Combes, Philippe Poindron, Jamal Ouazzani, Guillaume Arcile, Léon Cariel, Chérif Rabhi. SNC-1 a natural food supplement, a promising candidate for the treatment of Parkinson's Disease. MNM Septembre 2017 Londres (Angleterre).

Noelle Callizot, Cécilia Estrella, Mathieu Barrier, Maud Combes, Stéphane Burlet, Nicolas Sergeant, Patricia Melnyk, Luc Buée and Philippe Verwaerde. A new treatment for Alzheimer's disease : AZP2006 prevents and reverses amyloid and Tau damages via release of one growth factor and reduction of neuroinflammation. AAT-AD/PD Mars 2018 Turin (Italie)

Alexandre Henriques, Maud Combes, Clémence Farrugia, Philippe Poindron, Noelle Callizot. ER-stress regulation and effect of Guanabenz in primary cortical neurons injured with  $A\beta$ 1-42 peptide, an in vitro model of Alzheimer's disease. Société des neurosciences Juin 2018 Strasbourg (France)

Alexandre Henriques, Chérif Rabhi, Maud Combes, Léon Cariel, Philippe Poindron, Guillaume Arcile, Jamal Ouazzani, Noëlle Callizot. Neuroprotective effects of SNC-1 (Ethnodyne Neuro®), a natural product used in ayurvedic traditional medicine, on in vitro models of Parkinson's disease. IAPRD Août 2018 Lyon (France)

Noëlle Callizot, Maud Combes, Alexandre Henriques, Philippe Poindron Acute dopaminergic neurotoxicity of alpha synuclein oligomers is mediated by microglial cells. IAPRD Août 2018 Lyon (France)

Alexandre Henriques, Clémence Farrugia, Maud Combes, Noëlle Callizot. Activation of the PERK pathway reduces the proteinopathy associated with neurodegenerative diseases: evidence from in vitro models of AD, PD and ALS. MNM Octobre 2018 Munich (Allemagne)

Elnur Garayev, Laurent Boyer, Patricia Françon, Philippe Poindron, Maud Combes, Noëlle Callizot. From traditional use to standardized neuroprotective green-extract of *Huperzia serrata*. CNP Novembre 2018 Athènes (Grèce).

Alexandre Henriques, Maud Combes, Clémence Farrugia, Philippe Poindron, Noëlle Callizot. Translocation of TDP-43 and FUS in cortical neurons and spinal motor neurons after glutamatergic stress or in presence of the neurotoxic peptide A $\beta$  1-42. MNDA Décembre 2018 Glasgow (Ecosse)





# RÉSUMÉ

Les maladies neurodégénératives touchent plus de 33 millions de personnes dans le monde. Elles sont caractérisées par la dégénérescence progressive des neurones et un dysfonctionnement dans le cerveau et/ou la moëlle épinière.

Leurs mécanismes (perte des cellules neuronales, axonopathie, perte synaptique, inflammation, dysfonction immunitaire...) ont une incidence sur les fonctions moteurs et cognitives et peuvent générer une dépendance croissante des malades. Le traitement de la plupart des maladies neurodégénératives reste à l'heure actuelle essentiellement symptomatique ; s'il permet d'améliorer la qualité de vie des patients, il est le plus souvent sans effet sur l'évolution de la maladie.

L'ensemble de nos résultats a permis de mettre en évidence des mécanismes physiopathologiques inédits de la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique, et d'imaginer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Nous avons étudié les effets toxiques des A $\beta$ O, sur un modèle *in vitro* de neurones primaires ainsi que sur un modèle de coculture nerf muscle reproduisant des jonctions neuromusculaires, en nous concentrant sur leur cinétique de développement, puis sur leur mécanismes moléculaires et cellulaires. Nous avons pu avancer l'hypothèse d'un lien de causalité étroit entre le glutamate et les A $\beta$ O aussi bien dans la maladie d'Alzheimer que dans la sclérose latérale amyotrophique.

Il a été mis en évidence que des modèles de culture cellulaire permettaient de répondre à des questions ciblées, dans la mesure où ils reproduisent certains phénomènes neuropathologiques observés chez les malades.

**Mots clés** : A $\beta$ , glutamate, neurones, JNM, Alzheimer, SLA.

# ABSTRACT

Neurodegenerative diseases affect more than 33 million people in the world. They are characterized by the progressive degeneration of neurons and a dysfunction in of the brain and/or the spinal cord.

Their mechanisms (loss of the neuronal cells, axonopathy, synaptic loss, inflammation, immunizing dysfunction...) have an impact on the motor and cognitive functions and can generate an increasing dependence of the patient. The treatment of most of the neurodegenerative diseases remains at the moment essentially symptomatic. Many treatments improve the quality of life of the patients, but most of them remain ineffective on the evolution of the disease.

The results allowed us to reveal some unprecedented facts about physiopathological mechanisms of Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis, and to imagine new therapeutic targets.

We studied the toxic effects of the A $\beta$ O on an *in vitro* model of primary neurons as well as on a model of coculture nerve muscle reproducing neuromuscular junctions, by concentrating on their kinetics development, then on their molecular and cellular mechanisms. We were able to move forward the hypothesis of a link of causality between the glutamate and the A $\beta$ O in the Alzheimer's disease as well as in amyotrophic lateral sclerosis.

Using the models of cell cultures and observing how they reproduce, we were able to answer some of the targeted questions concerning some of the neuropathological phenomena observed in the patients.

**Keywords** : A $\beta$ , glutamate, neurons, NMJ, Alzheimer, ALS.