

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
CAROLINE MÉNARD**

**L'ACTIVITÉ CONSTITUTIVE DE LA PHOSPHOLIPASE A₂
INDÉPENDANTE DU CALCIUM : SON IMPLICATION DANS LE
CONTRÔLE DES RÉCEPTEURS AU GLUTAMATE ET DES PROCESSUS
NEURODÉGÉNÉRATIFS**

OCTOBRE 2008

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Merci à mon directeur de recherche, le Dr. Guy Massicotte, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et initiée au monde merveilleux de la neurobiologie de la mémoire, un univers complexe mais ô combien passionnant. J'ai appris énormément à ses côtés, des concepts scientifiques évidemment mais surtout les rouages de la recherche et les valeurs humaines qui s'y rattachent. Lors de mon départ pour le post-doctorat j'espère sincèrement conserver au moins une chose de mon passage dans son laboratoire et c'est un brin de sa sagesse.

Merci à tous les collègues que j'ai eu la chance de côtoyer au cours des années, plus particulièrement à Barbara Valastro et Marc-André Martel qui résident maintenant en Allemagne et en Écosse respectivement. Ces personnes ont été pour moi des collègues mais surtout des inspirations et, avec les années, le respect s'est transformé en une amitié profonde qui transcende aujourd'hui l'océan Atlantique.

Merci à l'Université du Québec à Trois-Rivières, que j'ai avant tout choisie pour un programme unique au Québec, le baccalauréat en biophysique. L'UQTR m'a permis de découvrir une région magnifique, la Mauricie. Elle m'a permis d'acquérir d'abord des connaissances académiques puis, aux cycles supérieurs, j'ai eu la chance de découvrir comment ça se passe dans le ventre de la bête à travers l'enseignement, plusieurs comités, associations étudiantes et la Commission des Études. Ces expériences m'ont permis d'appivoiser le monde universitaire sous toutes ses coutures mais surtout de travailler avec des personnes passionnées qui y consacrent leur carrière.

Merci au Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada qui a concrétisé mon rêve de me consacrer à temps plein à la

recherche. L'obtention d'une bourse d'études est un moment crucial dans le cheminement d'un étudiant gradué, cela permet de repousser ses limites mais aussi de croire en l'avenir de la recherche de haut niveau au Québec et au Canada.

Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu de manière inconditionnelle. Ils m'ont inculqué des valeurs indispensables au monde de la recherche : la persévérance, l'honnêteté intellectuelle, la diplomatie, une vision ouverte sur le monde et un enthousiasme contagieux. Je tiens aussi à remercier ma sœur Priscilla qui m'a rejoint à Trois-Rivières il y a quelques années et qui est pour moi beaucoup plus qu'une sœur.

Finalement, merci à mon conjoint, Sylvain, un homme exceptionnel qui croit en moi et qui partage stoïquement l'instabilité de mon quotidien d'étudiante au doctorat : le bonheur d'un article publié, la satisfaction d'être choisie pour une bourse, l'appréhension d'une nouvelle expérimentation, l'angoisse d'un stage à l'étranger ou encore le stress d'un examen doctoral. Merci d'écouter inlassablement mes histoires de laboratoire mais surtout d'être là, avec et pour moi.

RÉSUMÉ

Comment s'« impriment » mais surtout s'« effacent » les souvenirs dans notre cerveau ? Ces questions fascinent les neurobiologistes travaillant sur la mémoire et son dysfonctionnement depuis des décennies. Encore aujourd'hui, beaucoup de mécanismes demeurent inexpliqués. Toutefois, l'exploitation par le cerveau de la plasticité des neurones fait de plus en plus consensus. On entend par plasticité la capacité qu'ont les cellules nerveuses de s'adapter à leur environnement, aux besoins ou aux expériences de l'organisme, notamment par la croissance de nouvelles connexions ou la formation de nouveaux neurones. Au fil des ans, les chercheurs ont constaté que la plasticité implique, chez l'animal, l'accroissement des réponses neuronales assurées par le système de neurotransmission au glutamate, le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. Malheureusement, la plasticité n'a pas que de bons côtés. Si les récepteurs du glutamate deviennent très sensibles, ils peuvent engendrer une forme de toxicité appelée « excitotoxicité ». Cet état, s'il n'est pas contrôlé, entraîne la mort des neurones. Plusieurs études impliquent l'excitotoxicité dans le développement d'affections neurologiques (maladie d'Alzheimer, ischémie, maladie de Parkinson).

Étant donné qu'elles peuvent influencer la fluidité des membranes, certaines enzymes s'avèrent d'excellentes candidates pour explorer les mécanismes liés à la plasticité. Ces enzymes, les phospholipases A₂ (PLA₂), sont considérées comme des gardiennes de l'environnement lipidique. En plus de maintenir l'intégrité de la membrane cellulaire, les PLA₂ libèrent, par l'hydrolyse des phospholipides, divers acides gras dont l'acide docosahexaénoïque (DHA ou oméga-3). Fait intéressant : l'activité des PLA₂ semble perturbée dans des conditions pathologiques où la mémoire s'avère déficiente comme dans le cas de la maladie d'Alzheimer. Curieusement, les effets des PLA₂ sont bien connus pour certains systèmes cellulaires (ex.: le

cœur) mais jusqu'à maintenant, très peu d'équipes se sont intéressées à leur rôle dans les processus de la mémoire...

Dans le cadre de mes travaux au doctorat, nous avons cherché à mieux définir les bases des interactions entre les PLA₂ et les récepteurs du glutamate ainsi que leurs conséquences. En tirant profit de nombreuses méthodes biochimiques ainsi que de la culture d'hippocampes de type organotypique, nous avons découvert qu'une altération de l'activité phospholipasique basale, c'est-à-dire indépendante du calcium (iPLA₂), entraîne une hausse dramatique de la sensibilité des récepteurs au glutamate de type AMPA dans l'hippocampe, une région cérébrale essentielle à la formation de la mémoire. De plus, si cette perturbation persiste, elle favorise la mort des neurones. Il est cependant possible de contrer ce phénomène par un traitement spécifique au DHA, un autre oméga-3, l'acide eicosapentaénoïque, s'avérant sans effet. Fait intéressant : l'inhibition irréversible de la iPLA₂ provoque, chez des souris transgéniques, l'apparition d'un marqueur pathologique observé chez les patients souffrants de la maladie d'Alzheimer, l'hyperphosphorylation de la protéine tau du cytosquelette. Globalement, ces résultats permettent de poser la théorie suivante : l'activité de la iPLA₂ pourrait peut-être retarder l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie d'Alzheimer en favorisant les processus sous-jacents de la mémoire, voire même éliminer les déclin cognitifs « normalement » associé au vieillissement.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xiv
LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS.....	xvii

CHAPITRE 1	INTRODUCTION.....	1
1.1	La maladie d'Alzheimer.....	1
1.1.1	Historique de la maladie d'Alzheimer.....	2
1.1.2	Épidémiologie de la maladie d'Alzheimer.....	4
1.2	La mémoire et la maladie d'Alzheimer.....	4
1.2.1	Les atteintes à l'hippocampe.....	5
1.2.2	L'anatomie de l'hippocampe.....	6
1.2.3	La plasticité de l'hippocampe et les mécanismes de la mémoire.....	10
1.3	Le glutamate dans le cerveau.....	12
1.3.1	Les récepteurs au glutamate.....	12
1.3.2	La pharmacologie des récepteurs AMPA.....	14
1.3.3	Les animaux transgéniques de type MA.....	17
1.3.4	La plasticité fonctionnelle sous-jacente à la mémoire et son dysfonctionnement.....	20
1.3.5	La plasticité cellulaire et moléculaire de la mémoire.....	24
1.3.6	Le transport des récepteurs AMPA.....	26
1.4	Les mécanismes initiateurs de la maladie d'Alzheimer.....	31
1.4.1	Les marqueurs pathologiques de la MA.....	31
1.4.2	L'inflammation et le stress oxydatif.....	36
1.4.3	Une plasticité néfaste : l'excitotoxicité.....	37

1.5	Les phospholipases A ₂	39
1.5.1	Les familles de phospholipases A ₂	43
1.5.2	Les sPLA ₂	43
1.5.3	Les cPLA ₂	45
1.5.4	Les iPLA ₂	46
1.6	L'acide docosahexaénoïque.....	47
1.7	Les hypothèses et les objectifs.....	49
CHAPITRE 2	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	53
2.1	Les inhibiteurs de PLA ₂	53
2.2	Les systèmes	55
2.2.1	Les sections de cerveaux congelés.....	55
2.2.2	Les cultures d'hippocampes de type organotypique.....	56
2.3	Le dosage biochimique des récepteurs au glutamate.....	60
2.3.1	Le fractionnement cellulaire par centrifugation.....	60
2.3.2	L'immunoprécipitation.....	61
2.3.3	La biotinylation.....	62
CHAPITRE 3	AMPA RECEPTOR PHOSPHORYLATION IS SELECTIVELY REGULATED BY CONSTITUTIVE PHOSPHOLIPASE A₂ AND 5-LIPOXYGENASES ACTIVITIES.....	64
3.1	Résumé.....	65
3.1.1	Contribution des auteurs de l'article.....	66
3.2	Abstract.....	66
3.3	Introduction.....	67
3.4	Material and Methods.....	71
3.4.1	Animals and tissue preparation.....	71
3.4.2	Electrophoresis and immunoblotting.....	71
3.4.3	Immunoprecipitation.....	73

3.4.4	Quantitative and qualitative ^3H -AMPA receptor autoradiography in rat brain sections.....	74
3.4.5	Drugs.....	75
3.4.6	Statistical analysis.....	75
3.5	Results.....	76
3.5.1	iPLA ₂ , but not cPLA ₂ inhibitors, increase GluR1 phosphorylation in rat brain sections.....	76
3.5.2	iPLA ₂ inhibition does not influence GluR2/3 or NR1 subunit phosphorylation in rat brain sections.....	79
3.5.3	Arachidonate metabolites generated primarily via LO enzymes mediate iPLA ₂ -induced inhibition of GluR1 phosphorylation.....	81
3.5.4	iPLA ₂ inhibition influences calcium-mediated truncation of but not the subcellular localization of GluR1 proteins in rat brain sections.....	81
3.5.5	iPLA ₂ and 5-LO inhibitors increase ^3H -AMPA binding in rat brain sections.....	86
3.6	Discussion.....	88
3.7	References.....	94
3.8	Acknowledgements.....	104
3.9	Abbreviations.....	104

CHAPITRE 4 PHOSPHORYLATION OF AMPA RECEPTORS SUBUNITS IS DIFFERENTIALLY REGULATED BY PHOSPHOLIPASE A₂ INHIBITORS.....105

4.1	Résumé.....	106
4.1.1	Contribution des auteurs de l'article.....	107
4.2	Abstract.....	107
4.3	Introduction.....	108
4.4	Material and Methods.....	109
4.4.1	Animals and tissue preparation.....	109
4.4.2	Immunoprecipitation.....	110
4.4.3	Electrophoresis and immunoblotting.....	111
4.4.4	Agents.....	111

4.4.5	Statistical analysis.....	112
4.5	Results.....	112
4.5.1	PLA ₂ inhibitors differentially modulate phosphorylation of AMPA receptors subunits.....	112
4.5.2	PLA ₂ inhibitors do not the amount of membrane- bound AMPA receptor subunits.....	115
4.6	Discussion.....	118
4.7	References.....	121
4.8	Acknowledgements.....	126
4.9	Abbreviations.....	127

**CHAPITRE 5 CALCIUM-INDEPENDENT PHOSPHOLIPASE A₂
INFLUCENCES AMPA-MEDIATED TOXICITY OF
HIPPOCAMPAL SLICES BY REGULATING
GLUR1 SUBUNIT IN SYNAPTIC MEMBRANES....128**

5.1	Résumé.....	129
5.1.1	Contribution des auteurs de l'article.....	130
5.2	Abstract.....	130
5.3	Introduction.....	131
5.4	Material and Methods.....	133
5.4.1	Drugs.....	133
5.4.2	Organotypic hippocampal slices.....	133
5.4.3	Electrophoresis and immunoblotting.....	134
5.4.4	Immunoprecipitation.....	135
5.4.5	Biotinylation.....	136
5.4.6	Cell death induction and propidium iodide (PI) uptake.....	137
5.4.7	Statistical analysis.....	138
5.5	Results.....	138
5.5.1	GluR1 subunit phosphorylation levels are under the influence of iPLA ₂ γ.....	138
5.5.2	GluR1 subunit levels are elevated at cellular membranes after inhibition of iPLA ₂ γ	141

5.5.3	(R)-BEL exacerbates AMPA-mediated toxicity.....	144
5.6	Discussion.....	151
5.7	References.....	156
5.8	Acknowledgements.....	162
5.9	Abbreviations.....	163

**CHAPITRE 6 AMPA RECEPTOR-MEDIATED CELL DEATH IS
REDUCED BY DOCOSAHEXAENOIC ACID BUT
NOT BY EICOSAPENTAENOIC ACID IN AREA
CA1 OF HIPPOCAMPAL SLICE CULTURES164**

6.1	Résumé.....	165
6.1.1	Contribution des auteurs de l'article.....	166
6.2	Abstract.....	166
6.3	Introduction.....	167
6.4	Material and Methods.....	169
6.4.1	Drugs.....	169
6.4.2	Organotypic hippocampal slices.....	169
6.4.3	Detection of cell damage by lactate deshydrogenase (LDH) release and propidium iodide (PI) uptake.....	170
6.4.4	Biotinylation.....	172
6.4.5	Electrophoresis and immunoblotting.....	173
6.4.6	Data presentation and statistical analysis.....	173
6.5	Results.....	174
6.5.1	DHA, but not EPA, reduces AMPA-induced excitotoxicity.....	174
6.5.2	DHA reduces AMPA-induced excitotoxicity in area CA1.....	175
6.5.3	DHA reduces GluR1 and GluR2 subunit levels on the cell surface	182
6.6	Discussion.....	184
6.7	References.....	188
6.8	Acknowledgements.....	197
6.9	Abbreviations.....	197

CHAPITRE 7	REGULATION OF TAU PHOSPHORYLATION BY iPLA₂ ACTIVITY IN HIPPOCAMPAL SLICES CULTURES FROM TRANSGENIC P301L MICE....	198
7.1	Résumé.....	199
	7.1.1 Contribution des auteurs de l'article.....	200
7.2	Abstract.....	200
7.3	Introduction.....	201
7.4	Material and Methods.....	203
	7.4.1 Antibodies.....	203
	7.4.2 Drugs.....	204
	7.4.3 Preparation of cultured hippocampal slices.....	204
	7.4.4 Electrophoresis and immunoblotting.....	205
	7.4.5 Immunofluorescence.....	205
	7.4.6 LDH release.....	206
	7.4.7 Statistical analysis.....	207
7.5	Results.....	207
	7.5.1 R-BEL treatment enhanced tau phosphorylation in cultured hippocampal slices.....	207
	7.5.2 Tau hyperphosphorylation induced by iPLA ₂ inhibition was mediated by cdk5 and mitogen- activated protein kinases (MAPK)	208
	7.5.3 R-BEL-induced tau increase was associated with mammalian target of rapamycin (mTor) and ribosomal S6 protein kinase p70 (p70S6 kinase) activation.....	211
	7.5.4 iPLA ₂ inhibition did not result in acute cell death.....	212
7.6	Discussion.....	215
7.7	References.....	218
7.8	Acknowledgements.....	225
7.9	Abbreviations.....	226
CHAPITRE 8	DISCUSSION.....	227

8.1	Les effets cellulaires de la iPLA ₂	227
8.1.1	La iPLA ₂ et la PKC.....	227
8.1.2	La iPLA ₂ et les protéines accessoires – une relation potentielle.....	232
8.1.3	La iPLA ₂ et les calpaines.....	237
8.1.4	La iPLA ₂ et l'apoptose.....	240
8.2	Les acides gras et les récepteurs au glutamate.....	243
8.2.1	L'acide docosahexaénoïque et les récepteurs au glutamate.....	243
8.2.2	L'acide arachidonique et les récepteurs au glutamate.....	245
8.2.3	L'acide palmitique et le phénomène de la palmitoylation.....	246
8.2.4	La cardiolipine et l'excitotoxicité.....	247
8.3	La plasticité et les rafts lipidiques.....	248
8.3.1	Les rafts lipidiques.....	249
8.3.2	Les PLA ₂ et les rafts lipidiques.....	250
8.3.3	Les acides gras et les rafts lipidiques.....	251
8.4	La plasticité à long terme et les PLA ₂	252
8.4.1	Les PLA ₂ et la LTP/LTD.....	253
8.4.2	Les acides gras et la LTP/LTD.....	254
8.5	Un lien entre la iPLA ₂ , l'acide docosahexaénoïque et la maladie d'Alzheimer ?.....	255
8.5.1	Les PLA ₂ et la maladie d'Alzheimer.....	256
8.5.2	La iPLA ₂ et l'hyperphosphorylation de tau.....	259
8.5.3	L'acide docosahexaénoïque et la maladie d'Alzheimer.....	263
8.5.4	La iPLA ₂ , l'acide docosahexaénoïque et le vieillissement.....	264
8.6	Conclusion.....	265
CHAPITRE 9 BIBLIOGRAPHIE.....		266

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Les trois grandes familles de PLA_2	44
-----	---	----

LISTE DES FIGURES

1.1	La progression de la MA dans le cerveau.....	2
1.2	Aperçu de l'opération subie par le patient H.M.....	7
1.3	Comparaison entre un cerveau sain et celui d'une personne souffrant de la MA à un stade avancé.....	9
1.4	La neurotransmission entre les neurones.....	13
1.5	La structure des récepteurs au glutamate de type AMPA et NMDA.....	15
1.6	Les régions de l'hippocampe et les trois voies excitatrices.....	22
1.7	Les mécanismes de la LTP.....	25
1.8	Marquage à l'argent des dépôts intracellulaires et extracellulaires caractéristiques de la MA.....	32
1.9	Processus de formation des NFT.....	35
1.10	Les processus liés au phénomène d'excitotoxicité.....	38
1.11	Le site d'action des PLA ₂	40
1.12	Est-ce que l'inhibition de la iPLA ₂ influence les récepteurs AMPA ?.....	51
2.1	Les inhibiteurs de iPLA ₂	54
3.1	Hydrolytic sites of PLA ₂ on phospholipids and metabolic pathways of AA.....	77
3.2	iPLA ₂ , but not cPLA ₂ inhibition, increase GluR1 phosphorylation in rat brain sections.....	78
3.3	iPLA ₂ inhibition does not modify phosphorylation of GluR2/3 and NR1 subunits in rat brain sections.....	80
3.4	Arachidonate metabolites generated primarily via LO enzymes mediate iPLA ₂ -induced GluR1 phosphorylation.....	82
3.5	iPLA ₂ inhibitors suppress calcium-mediated truncation of GluR1 subunits of AMPA receptors in rat brain sections.....	84
3.6	iPLA ₂ inhibitors do not modify subcellular localization of AMPA receptor subunits in rat brain sections.....	85
3.7	iPLA ₂ and 5-LO inhibitors stimulate ³ H-AMPA binding in rat brain sections.....	87
3.8	Schematic model of iPLA ₂ -mediated modulation of AMPA receptor properties.....	92

4.1	cPLA ₂ and iPLA ₂ inhibitors differentially modulate the phosphorylation of AMPA receptor subunits.....	114
4.2	Phosphorylation of AMPA receptor subunits by PLA ₂ inhibitors is blocked by a cell-permeable PKC inhibitor.....	116
4.3	Levels of glutamate receptor subunits in synaptic membranes are not influenced by cPLA ₂ and iPLA ₂ inhibitors.....	117
5.1	Effects of racemic mixture of BEL on phosphorylation levels of GluR1 subunits.....	140
5.2	Effects of (R)-BEL and (S)-BEL enantiomers on GluR1 phosphorylation in crude synaptic membranes.....	142
5.3	Effect of the iPLA ₂ γ inhibitor (R)-BEL on GluR1 levels in crude synaptic membranes.....	143
5.4	Effect of the iPLA ₂ β inhibitor (S)-BEL on the subcellular distribution of subunits of AMPA and NMDA receptors.....	145
5.5	GluR1 subunits surface expression in BEL-treated cultured hippocampal slices.....	146
5.6	Effects of AMPA on PI uptake in organotypic hippocampal slice cultures.....	148
5.7	Effects of iPLA ₂ γ or iPLA ₂ β inhibitors on AMPA-induced excitotoxicity in cultured hippocampal slices.....	149
5.8	Effects of iPLA ₂ γ or iPLA ₂ β inhibitors on NMDA-induced excitotoxicity in cultured hippocampal slices.....	150
5.9	Prevention of (R)-BEL-induced increase in AMPA-mediated toxicity by Ca ²⁺ -permeable AMPA receptor antagonists.....	151
6.1	Effects of DHA and EPA on basal LDH release.....	175
6.2	Effects of DHA and EPA on LDH release induced by glutamate receptor agonists.....	176
6.3	Effect of DHA on AMPA-induced excitotoxicity is specific to the CA1 region	178
6.4	Effect of DHA is selective to AMPA-mediated toxicity.....	179
6.5	No effect of EPA on PI uptake induced by glutamate receptor agonists	180
6.6	No effect of arachidonic acid (AA) on PI uptake induced by glutamate receptor agonists	181
6.7	Cell surface expression of GluR1 and GluR2 subunits in DHA- and EPA-treated slices	183
7.1	Effects of iPLA ₂ inhibition on tau phosphorylation and total	

	protein levels.....	209
7.2	Regional localization of tau phosphorylation induced by R-BEL treatment.....	210
7.3	Effects of iPLA ₂ inhibition on activation and levels of various kinases.....	213
7.4	Effects of R-BEL on mTor and p70S6 kinase phosphorylation and levels.....	214
7.5	Effects of iPLA ₂ inhibition on LDH release.....	215
8.1	L'inhibition de la iPLA ₂ favorise la phosphorylation de GluR1 par la PKC dans la structure post-synaptique.....	231
8.2	La stabilisation des récepteurs au glutamate par les protéines accessoires.....	233
8.3	Est-ce que l'inhibition de la iPLA ₂ influence la liaison de la protéine accessoire SAP97 avec les sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA ?.....	235
8.4	L'inhibition de la iPLA ₂ favorise-t-elle l'activation des calpaines ?.....	239
8.5	Le DHA protège de l'excitotoxicité.....	244
8.6	La structure de l'acide palmitique.....	246
8.7	La structure de la cardiolipine.....	248
8.8	Les rafts lipidiques.....	249
8.9	Le DHA facilite l'internalisation des récepteurs AMPA.....	253
8.10	La structure du cholestérol.....	257
8.11	Les effets de la squalostatine.....	260
8.12	L'inhibition de la iPLA ₂ favorise l'hyperphosphorylation de la protéine tau.....	261

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
AACOCF ₃	Arachidonyl trifluoromethyl ketone
Aβ	Bêta-amyloïde
ABP	« AMPA receptor binding protein »
AD	« Alzheimer's disease »
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate
APP	« Amyloid precursor protein »
ATP	Adénosine triphosphate
BEL	Bromoénol lactone
Ca ²⁺	Ion calcium
CA1/CA3	Corne d'Amon 1 ou 3
CaMKII	« Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II »
cdk5	« Cyclin-dependent kinase 5 »
cPLA ₂	Phospholipases A ₂ dépendantes du Ca ²⁺
CREB	« cAMP response element-binding »
DG	Gyrus dentelé
DHA	Acide docosahexaénoïque
EPA	Acide eicosapentaénoïque
FAD	« Familial Alzheimer's disease »
FTDP-17	Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17
GRIP	« Glutamate receptor interacting protein »
HMGR	Hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase
iPLA ₂	Phospholipases A ₂ indépendantes du Ca ²⁺
KA	Kainate
LDH	Lactate déshydrogénase
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
MA	Maladie d'Alzheimer
MAPK	« Mitogen-activated protein kinases »
Mg ²⁺	Ion magnésium
mTor	« Mammalian target of rapamycin »
Na ⁺	Ion sodium
NFT	Enchevêtrements neurofibrillaires (« tangles »)
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NT	Neurotransmetteur
NPD1	« Neuroprotectin D1 »
PACOCF ₃	Palmityl trifluoromethyl ketone
PAP-1	« Magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase-1 »
PI	Propidium iodide
PICK1	« PKCα binding protein »
PKA	Protéine kinase A

PKC	Protéine kinase C
PLA ₂	Phospholipases A ₂
PP	Phosphatases
PS1/PS2	Préséniline 1/2
PSD95	« Post-synaptic density 95 »
ROS	« Reactive oxygen species »
SAP90	« Synapse-associated protein 90 »
SP	Plaques séniles
sPLA ₂	Phospholipases A ₂ sécrétées
TNF- α	« Tumor necrosis factor- α »

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Comment s'« impriment » mais surtout s' « effacent » les souvenirs dans notre cerveau ? Ces questions fascinent les neurobiologistes travaillant sur la mémoire et son dysfonctionnement depuis des décennies. Avec le vieillissement inéluctable de la population, caractéristique contemporaine de nos sociétés occidentales, et l'avènement de la maladie d'Alzheimer (MA) ce sujet est d'autant plus d'actualité.

1.1 LA MALADIE D'ALZHEIMER

Cette pathologie est la démence la plus commune chez les personnes âgées. Décrite pour la première fois en 1907 par Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907), elle est caractérisée principalement par des pertes de mémoire progressives et irréversibles (FIGURE 1.1). En premier lieu, les changements surviennent dans la structure limbique (Thompson et al., 2007), on parle alors de « early Alzheimer's Disease (AD) » (*en haut à gauche*). Par la suite, on observe une propagation vers les cortex environnants (Thompson et al., 2007), caractéristique de la AD modérée (*en haut à droite*). Finalement, lorsque la pathologie atteint le stade sévère, presque toutes les zones cérébrales sont touchées (*en bas*), les symptômes atteignent leur paroxysme et l'espérance de vie se limite à moins de 5 ans.

D'autres symptômes, voire même plus importants d'un point de vue clinique, lui sont aussi associés : problèmes de langage, changements de comportements et manque de jugement, entre autres. Ces derniers sont généralement présents avant les pertes de mémoire, ce qui peut faciliter un diagnostic précoce (Forstl & Kurz, 1999). Au niveau anatomique, elle provoque, dans des régions spécifiques du cerveau, l'apparition de

marqueurs identifiables lors de l'autopsie : diminution de volume du cortex et de l'hippocampe, pertes neuronales massives et dépôts fibrillaires intracellulaires et extracellulaires (Morishima-Kawashima & Ihara, 2002). Ces derniers seront explorés plus en détail dans cette thèse. Mais d'abord, il est intéressant de se pencher sur l'historique de cette affection.

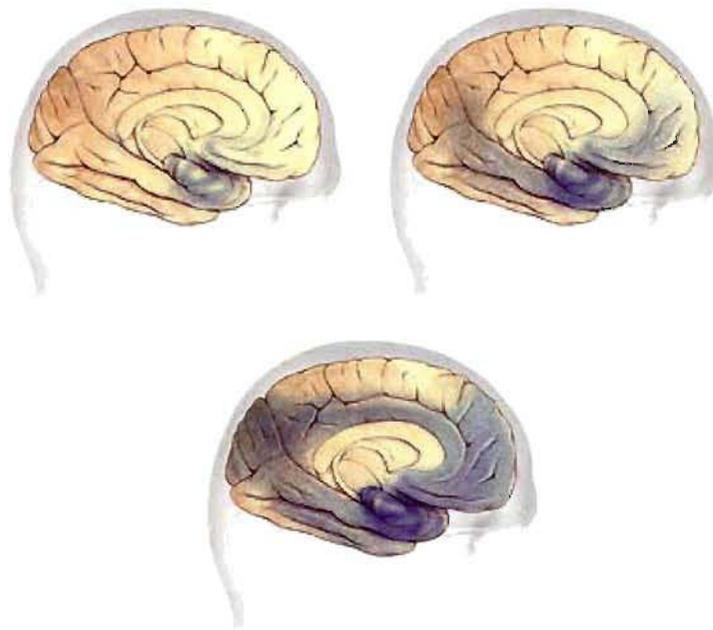


FIGURE 1.1 : La progression de la MA dans le cerveau. Les deux principaux marqueurs de MA, les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques séniles, deviennent visibles dans différentes zones du cerveau selon le stade de progression de la maladie.

Reproduit avec la permission de © 2007 Alzheimer's Association. www.alz.org. All rights reserved. Alzheimer's Disease Education and Referral Center, a service of the National Institute on Aging

1.1.1 Historique de la maladie d'Alzheimer

Malgré le fait que le concept de la démence existe depuis l'époque des Grecs et des Romains, il faut attendre le début du XVIII^{ème} siècle et les

travaux du Dr. Alois Alzheimer, un psychiatre allemand, pour une identification formelle du premier cas répertorié. À la mort d'Auguste D., une femme de 55 ans, le Dr. Alzheimer effectue une autopsie de son cerveau et caractérise, sous forme de dessins, les marqueurs pathologiques qui deviendront les indicateurs connus d'un diagnostic positif de la maladie (Alzheimer, 1907). Celui-ci est réservé, jusqu'à la fin des années 70, aux individus âgés entre 45 et 65 ans. Par la suite, les membres du corps médical et les scientifiques s'entendent pour décrire comme un patient souffrant de la MA toute personne qui présente les symptômes, l'évolution irréversible et la neuropathologie caractéristiques de cette affection et ce, peu importe l'âge de l'individu (Morris & Salmon, 2007). Un diagnostic final demeure cependant ambigu avant la mort du patient, la caractérisation des marqueurs pathologiques ne pouvant être établie avec certitude que lors de l'autopsie.

Les innombrables études menées sur des cerveaux post-mortem de patients ayant soufferts de la MA ont permis de nombreuses percées dans la recherche pour combattre cette affection. Le tout a débuté avec les travaux du Dr. Alzheimer (Alzheimer, 1907) et s'est poursuivi avec ceux de Grundke-Iqbal et al. (1979) et Nikaido et al. (1970), qui ont découvert les principales constituantes des marqueurs pathologiques, qui seront traités plus loin dans l'introduction de ma thèse. La comparaison des niveaux des catécholamines (Adolfsson et al., 1979) et des enzymes qui leur sont associées (Rossor et al., 1980) a ensuite permis de mettre en lumière l'importance de la biochimie des neurotransmetteurs alors que jusqu'alors pratiquement tous les travaux étaient concentrés sur les marqueurs pathologiques. Encore aujourd'hui, les cerveaux post-mortem sont des outils précieux qui permettent de vérifier des hypothèses élaborées sur des modèles animaux, des cultures cellulaires, etc. Les plus récentes études proposent de nouvelles avenues de recherche comme l'épigénétique (Wang et al., 2008) – modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes ne s'accompagnant pas de changements des séquences des nucléotides – ou tentent plutôt de percer

les mystères de phénomènes encore mal connus, dont le rôle de l'inflammation dans la MA par exemple (Hashioka et al., 2008).

1.1.2 Épidémiologie de la maladie d'Alzheimer

Selon le site internet de la Société Alzheimer du Canada – www.alzheimer.ca – environ 300 000 Canadiens âgés de plus de 65 ans sont atteints de la MA. En 2008 seulement, ce sont 97 000 nouveaux cas qui seront déclarés. D'ici 2031, les prévisions laissent croire que plus de 750 000 Canadiens souffriront de la MA ou de maladies connexes. La MA est la forme la plus courante de démence car elle représente à elle seule 64% des cas. Enfin, au niveau mondial, ce sont plus de 26 millions de personnes qui en sont atteints et ce nombre devrait quadrupler d'ici 2050 (Brookmeyer et al., 2007).

1.2 LA MÉMOIRE ET LA MALADIE D'ALZHEIMER

Les pertes de mémoire sont sans contredit le symptôme clinique le plus connu voire le plus effrayant pour la population. De nombreux chercheurs se sont donc intéressés spécifiquement aux processus mnésiques eux-mêmes pour percer les mécanismes sous-jacents au développement de la MA (Morris & Baddeley, 1988; Becker, 1988). Mais d'abord, il s'est avéré nécessaire de répondre à une question existentielle : qu'est-ce que la mémoire ? Cette capacité cérébrale unique intrigue l'humanité depuis des siècles voire des millénaires. Que ce soit des philosophes, des psychologues ou, plus récemment, des neuroscientifiques, nombreux sont ceux qui s'intéressent à son fonctionnement. De façon générale, il est possible d'affirmer que la mémoire peut être séparée en quatre phases distinctes : 1) l'encodage, 2) le stockage, 3) la consolidation et, enfin, 4) la récupération de

l'information (Martin & Clark, 2007). Aussi, les souvenirs eux-mêmes peuvent être classifiés; on parle alors de mémoire explicite (ou déclarative), qui comprend les faits et les événements, ou de mémoire implicite (ou procédurale) qui regroupe les habiletés en plus d'être le siège du conditionnement émotionnel (Anderson, 1976).

Les zones du cerveau impliquées dans les processus mnésiques vont évidemment être différentes selon le type d'information traitée. L'hippocampe s'impose toutefois comme structure la plus étudiée du système nerveux central, particulièrement chez les rongeurs, pour élucider les mystères et les mécanismes sous-jacents de la mémoire (Martin & Clark, 2007). En plus, elle semble étroitement liée aux capacités mnésiques spatiales et l'un des signes précurseurs de la MA est justement une désorientation dans l'espace (site internet de la Société Alzheimer du Canada). Des études récentes en imagerie à résonance magnétique ont permis d'observer une atrophie de cette région cérébrale avant même l'avènement des premiers symptômes cliniques (Henry-Feugas, 2007; van de Pol et al., 2007). Suite à ces observations, la possibilité de diagnostics précoces, effectuée à l'aide de cette technologie, a été soulevée.

1.2.1 Les atteintes à l'hippocampe

Les premières démonstrations de l'importance de la structure hippocampale pour les processus mnésiques remontent aux années 1950 avec les travaux du Dr. Wilder Penfield à l'institut neurologique de Montréal. Il découvre alors que suite à une chirurgie sur un lobe temporal, des patients épileptiques rapportent une incapacité irréversible à emmagasiner de nouvelles informations (Milner, 1954; Scoville & Milner, 1957; Penfield & Milner, 1958). Il réfère alors ces derniers à une collègue neuropsychologue, la Dr. Brenda Milner. Les patients ont subi une lésion à un seul des lobes

temporaires, où se situent les structures hippocampales. Malheureusement, les hippocampes sont tous les deux touchés, ce qui a pour effet de bloquer la mémorisation de faits nouveaux ou des expériences récentes. Cette découverte, en 1954, permit de démontrer pour la première fois l'importance de ces structures pour la mémoire (Milner, 1954).

Toutefois, le patient le plus célèbre du Dr. Milner est sans contredit H.M. qu'elle suivra pendant une trentaine d'années. Ce dernier a subi une ablation complète de la partie antérieure des deux hippocampes pour soigner une épilepsie résistante aux médicaments, avec pour conséquence dramatique une amnésie antérograde profonde (FIGURE 1.2). À l'aide de nombreux tests neuropsychologiques, le Dr. Milner a découvert que sa mémoire dite de travail, qui permet de retenir de nouveaux faits telles que des séquences de nombres, est limitée à une quinzaine de minutes seulement. Sa mémoire à court terme est donc intacte à condition, toutefois, qu'il puisse répéter sans arrêt les informations à mémoriser. Il est par contre en mesure d'améliorer, de manière significative et irréversible ses capacités pour des tâches recrutant le système moteur, alors qu'il n'a aucun souvenir d'avoir déjà pratiqué la dite tâche ! Ces travaux permettront d'établir que l'hippocampe n'est pas la seule structure liée à la mémoire, particulièrement dans le cas des souvenirs implicites et moteurs (Scoville & Milner, 1957; Penfield & Milner, 1958; Milner, 2005).

1.2.2 L'anatomie de l'hippocampe

Tel que mentionné précédemment l'hippocampe est situé à la hauteur du lobe temporal et il fait parti du système limbique. Celui-ci est composé de l'amygdale, l'hypothalamus, le thalamus, le fornix, le « cingulate gyrus » et enfin, de l'hippocampe (Kandel et al., 1991). En raison de sa forme caractéristique en banane, cette dernière région cérébrale a rapidement été

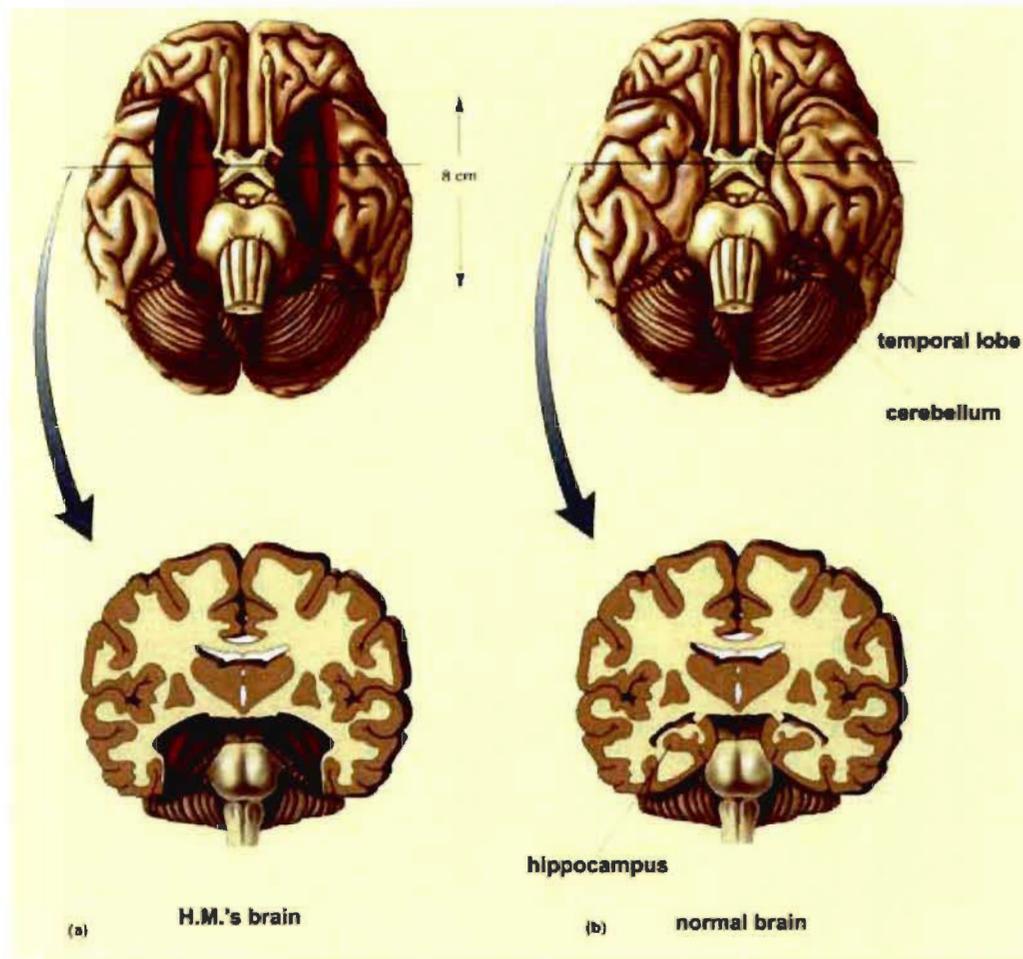


FIGURE 1.2 : Aperçu de l'opération subie par le patient H.M. Suite à une ablation complète des deux hippocampes par le Dr. William Scoville en 1953, le patient H.M. a présenté, pour le reste de sa vie, une déficience de la mémoire dite de travail. Son cas, étudié par plusieurs neuropsychologues donc la Dr. Brenda Milner, a largement contribué aux connaissances actuelles que nous possédons sur les processus de la mémoire. En effet, il a été en mesure d'améliorer ses performances pour différentes tâches implicites nécessitant une fonction motrice et ce, malgré son handicap et le fait qu'il en ait été inconscient. Il se souvient également de souvenirs à teneur émotionnelle très forte, comme la mort de ses parents. Ces travaux ont ainsi permis d'affirmer que l'hippocampe n'est pas indispensable pour tous les types de mémoire. (<http://lecerveau.mcgill.ca/>)

associée à l'hippocampe marin d'où elle tire son nom. Depuis de nombreuses années, elle est liée aux mécanismes de la mémoire, tout particulièrement celle de type spatiale (Bontempi et al., 1999). Maguire et al. (2000) ont notamment démontré, par imagerie à résonance magnétique, que les chauffeurs de taxi londoniens présentent une structure hippocampale hypertrophiée, probablement en raison de l'exploitation massive de leurs capacités mnésiques spatiales. Des travaux ont même identifié des neurones spéciaux, qualifiés de « place cells » dans l'hippocampe de rats (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Lorsque l'animal se déplace dans son environnement, ces cellules s'activent ce qui permettrait une orientation optimale dans l'espace. Le labyrinthe Morris (« Morris Water Maze ») est un outil couramment utilisé pour évaluer les performances spatiales des rongeurs (Morris, 1984). Lorsque l'hippocampe subit des lésions, cela a pour conséquence de perturber significativement les aptitudes des animaux à ce test (Schenk & Morris, 1985).

Que se passe-t-il au niveau des hippocampes des patients souffrants de MA ? Cette région cérébrale est justement l'une des premières à dégénérer tel que mentionné précédemment (Henry-Feugeas, 2007; Thompson et al., 2007) (FIGURE 1.3). Comme pour la présence de plaques séniles, la mort des neurones est une caractéristique normale du vieillissement (Harman, 2006). Cependant, le rythme s'accélère lors de la MA, plus particulièrement dans la structure hippocampale (Ball, 1977). Avec l'avènement de l'imagerie à résonance magnétique, il est maintenant possible d'appliquer une chronologie relativement précise de la neurodégénérescence lors de la MA tel que mentionné précédemment. Il est toutefois important de mentionner que cette technique a ses limites et qu'il est nécessaire de corrélérer les résultats obtenus avec différents tests mnésiques. Aussi, malgré l'avènement de l'imagerie, la confirmation du diagnostic ne peut être effectuée qu'à l'autopsie seulement encore aujourd'hui. Cela a quand même permis de déterminer que le tout débute avec une atrophie de la zone hippocampale,

plus précisément le cortex entorhinal pour atteindre ensuite l'hippocampe (Braak & Braak, 1991; Van Hoesen & Hyman, 1990; Van Hoesen et al., 1991; Pennanen et al., 2004). Celle-ci se propage, avec le temps, vers les cortex à l'extérieur du cerveau (Henry-Feugeas, 2007; Thompson et al., 2007).

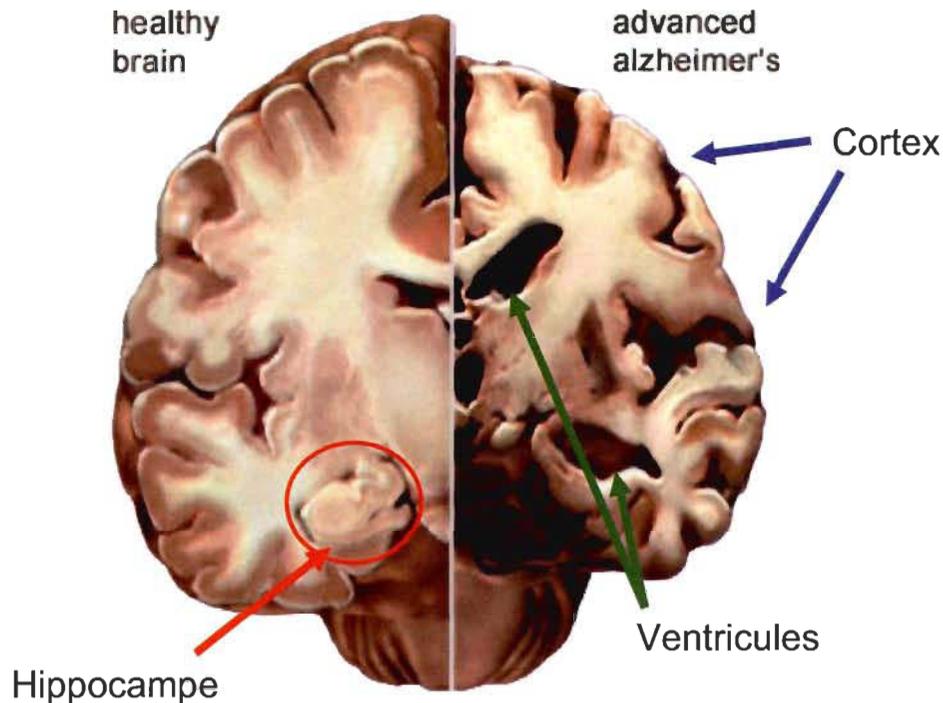


FIGURE 1.3 : Comparaison entre un cerveau sain et celui d'une personne souffrant de la MA à un stade avancé. À première vue on remarque la perte neuronale massive caractéristique d'une neurodégénérescence sévère. Plus spécifiquement, l'hippocampe est pratiquement complètement disparu alors que les cortex cérébraux sont atrophiés. Les ventricules, qui servent à l'irrigation sanguine du cerveau, sont beaucoup plus larges dans le cas du cerveau MA.

Reproduit avec la permission de © 2007 Alzheimer's Association. www.alz.org All rights reserved. Illustration by Stacy Janis

1.2.3 La plasticité de l'hippocampe et les mécanismes de la mémoire

Les philosophes de la Grèce antique furent les premiers à poser l'hypothèse que la mémoire impliquerait des changements structuraux dans le système nerveux, un phénomène qualifié aujourd'hui de « plasticité ». On entend par plasticité la capacité qu'ont les cellules nerveuses de s'adapter à leur environnement, aux besoins ou aux expériences de l'organisme, notamment par la croissance de nouvelles connexions ou la formation de nouveaux neurones (Bruehl-Jungerman et al., 2007). La plasticité peut se situer à différents niveaux : cérébrale, neuronale, cellulaire, synaptique ou encore moléculaire. La récupération du cortex cérébral par un sens subitement déprivé, dans le cas d'une perte totale de la vision par exemple, constitue un cas classique de plasticité cérébrale (Rauschecker, 1995). Walsh & Lichtman (2003) ont par ailleurs démontré, lors du développement, un processus de sélection naturelle des neurones par compétition ; les cellules les mieux innervées seulement remportent la bataille avec pour conséquence une meilleure définition des synapses. Quant au Dr. Éric Kandel (Klein et al., 1980 ; Kandel, 1981 ; Kandel & Schwartz, 1982), il est un pionnier de la plasticité cellulaire, synaptique et moléculaire de par ses nombreux travaux sur le conditionnement des comportements moteurs de l'aplysie.

Une forme de plasticité inédite existe dans le gyrus dentelé (DG) de l'hippocampe : la neurogénèse (Bayer et al., 1982). Jusqu'à la fin des années 1990, le consensus scientifique était que les cellules nerveuses sont incapables de se reproduire. Pourtant, il a récemment été démontré que la croissance de nouveaux neurones est possible mais dans seulement deux zones très restreintes du cerveau adulte dont le DG (Eriksson et al., 1998 ; Gould et al., 1999). Ce phénomène a été observé chez les oiseaux, les rongeurs, les primates et les humains entre autres (Alvarez-Buylla, 1990.;

Eriksson et al. 1998 ; Gould et al., 1999 ; Nilson et al., 1999). L'implication précise de la neurogénèse dans les processus de la mémoire est néanmoins, aujourd'hui encore, méconnue voire controversée (Bruehl-Jungerman et al., 2007). Cependant des travaux menés à l'aide d'un environnement enrichi, c'est-à-dire un milieu où les rongeurs expérimentent beaucoup plus de stimulations que ce soit dans le cadre de l'alimentation ou encore des loisirs, ont montré que cela favorise l'apprentissage et la mémorisation ainsi que la neurogénèse dans l'hippocampe (Kempermann et al., 1997 ; Nilson et al., 1999). À l'inverse, les animaux âgés, qui présentent généralement des facultés mnésiques diminuées, ont aussi une baisse du niveau de neurogénèse (Kuhn et al., 1996). Des souris transgéniques présentant des mutations dirigées sur la préséniline-1 (PS1) et/ou la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), deux altérations associées de près à la maladie d'Alzheimer, ont donc été mises à profit. Les résultats obtenus laissent croire que la MA perturbe la neurogénèse (Zhang et al., 2007). Des études supplémentaires seront toutefois nécessaires pour bien cerner les processus sous-jacents à ce phénomène (Morgan, 2007).

Finalement, en faisant référence à la plasticité des neurones, il est impossible de passer sous silence le désormais célèbre postulat du Dr. Donald Hebb. Proposé en 1949, il décrit ce qu'il qualifia alors de « trace structurelle » : « l'activité électrique que l'on observe dans des assemblées de neurones lors d'un apprentissage persiste pendant un certain temps, entraînant des changements biochimiques entre eux dans les neurones activés et augmentant l'efficacité de leur communication » (Hebb, 1949). Cette affirmation, avec les travaux de Ramon y Cajal (1952) sur la structure des neurones et des synapses, représente les fondements même de la neurobiologie de la mémoire.

1.3 LE GLUTAMATE DANS LE CERVEAU

Au fil des ans, les chercheurs ont constaté que la plasticité de la mémoire implique, chez l'animal, l'accroissement des réponses neuronales assurées par le glutamate, le principal neurotransmetteur (NT) excitateur du cerveau des vertébrés (O'Neill et al., 2004). Celui-ci est non seulement un élément-clé de la neurotransmission (FIGURE 1.4) mais aussi de la plasticité des neurones, leur croissance et leur différenciation (Myhrer, 2003). Malheureusement, le glutamate n'a pas que de bons côtés. Si les récepteurs qui lui sont liés deviennent très sensibles ils peuvent engendrer une forme de toxicité appelée « excitotoxicité » (Michaelis, 1998). Cet état, s'il n'est pas contrôlé, entraîne la mort des neurones. Plusieurs études impliquent cette excitotoxicité dans le développement d'affections neurologiques : MA, ischémie, maladie de Parkinson (Greenamyre & Young, 1989 ; Beal, 1992, 1998). Une exploitation défectueuse de la plasticité des neurones glutamatergiques chez les patients MA a donc, logiquement, été proposée (Greenamyre et al., 1987, 1988). Mais d'abord, comment agit ce NT dans notre cerveau ?

1.3.1 Les récepteurs au glutamate

Le NT glutamate exerce son action via différents types de récepteurs membranaires. Ceux-ci sont largement distribués dans le système nerveux central, à la fois dans les neurones et les cellules gliales (O'Neill et al., 2004). On les classe en cinq grandes catégories, selon leurs caractéristiques pharmacologiques, électrophysiologiques et biochimiques : 1) α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate (AMPA), 2) N-méthyl-D-aspartate (NMDA), 3) kainate (KA), 4) L-AP4 et 5) ACPD (Bi et al., 1998; Rieder et al., 2003). Les récepteurs AMPA, NMDA et KA constituent les récepteurs ionotropes : ce sont des canaux ioniques activés très rapidement (dans

l'ordre des millisecondes), spécifiques à certains cations, et qui se retrouvent principalement au niveau post-synaptique i.e. au niveau du neurone « récepteur » de la neurotransmission. Les récepteurs L -AP4 et ACPD, quant à eux, constituent les récepteurs métabotropes, ils sont couplés à une protéine G et ses seconds messagers. Ils sont plus lents que les récepteurs ionotropes et principalement pré-synaptiques i.e. au niveau du neurone « émetteur » de la neurotransmission. Lorsqu'ils sont activés, les récepteurs métabotropes exercent généralement une action inhibitrice sur la relâche de glutamate (Bi et al., 1998; Rieder et al., 2003).

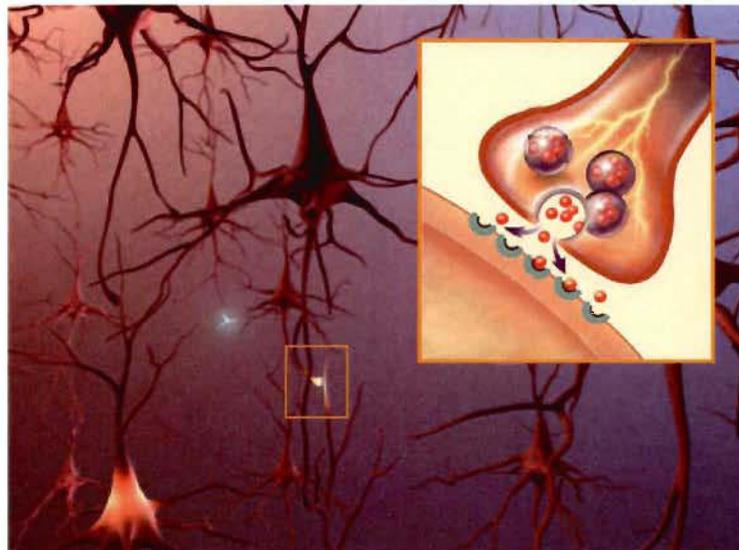


FIGURE 1.4 : La neurotransmission entre les neurones. Celle-ci s'effectue au niveau des synapses via un NT et ses récepteurs; le neurone pré-synaptique relâche les NTs et le signal est transmis au neurone post-synaptique par des récepteurs spécifiques.

Reproduit avec la permission de © 2007 Alzheimer's Association. www.alz.org All rights reserved. Illustration by Stacy Janis.

Tous les récepteurs au glutamate sont formés d'une association de sous-unités protéiques formant une structure pentamérique ou tétramérique (Bi et al., 1998; Rieder et al., 2003) (FIGURE 1.5). Selon la composition en sous-unités, certaines propriétés électrophysiologiques et/ou biochimiques

des récepteurs se verront altérées (Sans et al., 2003; Song & Huganir, 2002; Hall et al., 1997). Toutefois, une constante structurale de ces récepteurs est l'emplacement des segments amino- et carboxy-terminal. La portion N-terminale, site de liaison du glutamate, se trouve toujours à l'extérieur de la cellule alors que la portion C-terminale, qui présente de nombreux sites de régulation (kinases, phosphatases, protéases, etc.), est exclusivement intracellulaire (Bi et al., 1998; Rieder et al., 2003). En vertu du fait que la quasi-totalité des résultats présentés dans les chapitres 3 à 7 sont associés aux récepteurs AMPA, il s'avère nécessaire de se pencher plus en profondeur sur leurs propriétés pharmacologiques.

1.3.2 La pharmacologie des récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA sont des hétéro-tétramères composés d'une combinaison variable de quatre sous-unités : GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4 (FIGURE 1.5) (Hollmann & Heinemann, 1994; Rosenmund et al., 1998). Dans un hippocampe mature, la plupart des récepteurs AMPA comportent des associations de dimères GluR1-GluR2 ou GluR2-GluR3 (Wenthold et al., 1996), les sous-unités GluR4 étant exprimées principalement au cours du développement (Zhu et al., 2000). La distribution des sous-unités GluR1, GluR2 et GluR3 est uniforme dans l'hippocampe, alors que la présence de GluR4 est restreinte à une toute petite population de neurones (Kohama & Urbanski, 1997). Le marquage s'avère toutefois plus intense pour GluR1, en comparaison avec GluR2/3, pour les neurones pyramidaux et les cellules du gyrus dentelé. La co-localisation avec GluR2 demeure à priori indispensable puisque la présence de cette sous-unité confère aux récepteurs AMPA une perméabilité réduite aux Ca^{2+} lors de l'activation (Boulter et al., 1990; Hollmann et al., 1991). Ce cation peut en effet, lorsqu'il entre rapidement et en quantité importante dans une cellule, provoquer l'activation de mécanismes apoptotiques menant à la mort neuronale (voir la section 1.4.3).

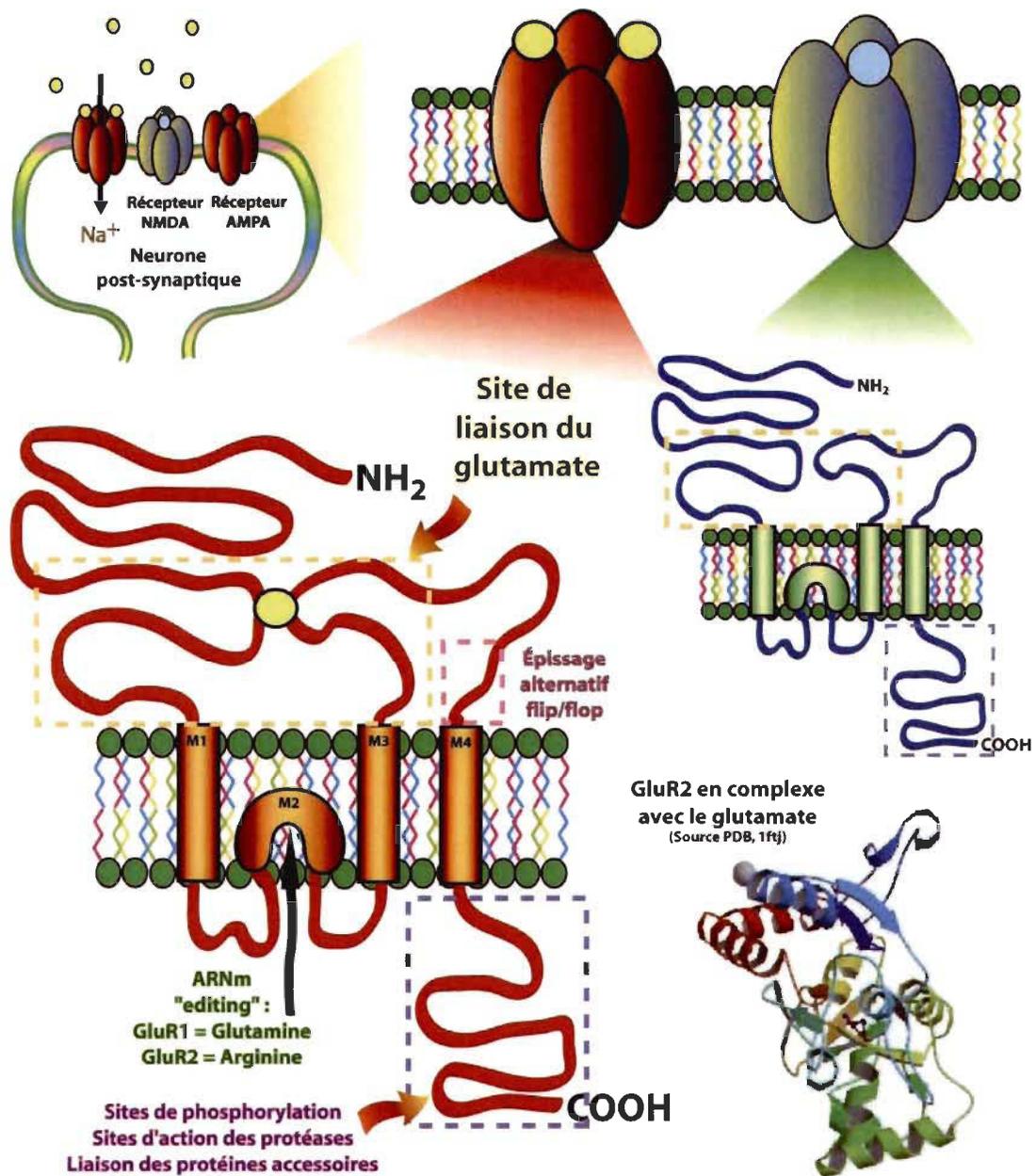


FIGURE 1.5 : La structure des récepteurs au glutamate de type AMPA et NMDA. Ces canaux ioniques sont formés d'une association de sous-unités présentant une alternance de domaines transmembranaires, intracellulaires et extracellulaires.
(<http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/glutamate.html>)

Les sous-unités GluR1-4 présentent toutes la même structure (FIGURE 1.5) : une longue portion extracellulaire (N-terminale), quatre domaines transmembranaires identifiés M1-M4 et une autre longue portion cette fois intracellulaire (C-terminale). C'est le domaine M2 qui constitue le pore perméable aux cations (Ozawa et al., 1998; Madden, 2002). M3 forme, quant à lui, le site de liaison du glutamate avec une partie de la portion N-terminale (Hollmann et al., 1994). Les quatre sous-unités existent sous deux formes distinctes appelées flip et flop (Sommer et al., 1990). Celles-ci sont générées selon un épissage alternatif sur une longueur de 115 paires de bases qui encode une partie du segment extracellulaire précédent le domaine transmembranaire M4. Cette dernière n'est pas directement impliquée dans la liaison à l'agoniste mais elle module la désensibilisation du récepteur et sa conductance (Mosbacher et al., 1994). La version flop des récepteurs est la plus abondante dans les neurones adultes et elle induit une désensibilisation plus rapide que la forme flip (Monyer et al., 1991).

La liaison du glutamate aux diverses sous-unités permet une ouverture croissante des récepteurs AMPA. En effet, il a été démontré par Rosenmund et al. (1998) que l'association de l'agoniste à une seule sous-unité est suffisante pour induire une modification dans la conformation du récepteur, avec pour conséquence une accessibilité restreinte au pore. Au fur et à mesure que la concentration de glutamate augmente dans la fente synaptique, celui-ci se lie à de plus en plus de sous-unités, augmentant graduellement l'accessibilité jusqu'à une ouverture complète du pore (Rosemund et al., 1998). L'affinité des récepteurs AMPA pour un agoniste varie selon leur composition. Celle des récepteurs hétéromériques se situe autour de 200-1000 nM pour l'AMPA (Olsen et al., 1987; Hall et al., 1992) alors que dans le cas des récepteurs homomériques GluR1 ou GluR4 cette concentration chute à 5-50 nM (Keinanen et al., 1990; Andersen et al., 1996; Hennegriff et al., 1997). Cependant, il existe un petit groupe de récepteurs hétéromériques à forte affinité. Ces derniers présentent un K_D similaire à celui

des récepteurs recombinants homomériques (Hall et al., 1992; Hennegriff et al., 1997). Ils sont toutefois exprimés sous une forme immature puisqu'ils ne contribuent pas à la fonctionnalité synaptique (Kessler et al., 2008). Fait intéressant : les récepteurs à forte affinité sont enrichis dans les membranes cellulaires alors que ceux à faible affinité le sont dans les synapses (Hall et al., 1992; Standley et al., 1994). Cela laisse sous-entendre un processus de maturation des récepteurs qui demeure inconnu à ce jour.

La composition et la distribution des récepteurs AMPA varient non seulement au cours du développement mais aussi lors du vieillissement (Ikonovic et al., 1995a) ou encore de maladies neurodégénératives dont la MA (Ikonovic et al., 1995b). L'avènement d'animaux transgéniques exprimant une ou plusieurs caractéristiques de cette pathologie a permis de mieux comprendre les fonctions cognitives ainsi que le rôle du glutamate et de ses récepteurs et ce, au cours du vieillissement normal et/ou pathologique. La section suivante est consacrée à ces outils indispensables à de nombreux travaux sur la mémoire et son dysfonctionnement.

1.3.3 Les animaux transgéniques de type MA

La découverte d'une forme familiale de MA (« familial Alzheimer's disease, FAD) a grandement facilité la mise au point de modèles animaux transgéniques. En effet, des gènes précis ont été associés à cette forme particulière de la pathologie : celui de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et ceux des présénilines 1 et 2 (PS1/PS2) (Sherrington et al., 1995; Van Broeckhoven et al., 1992). Les patients qui présentent ces mutations – plus de 20 variantes pour l'APP, 150 pour la PS1 et 20 pour la PS2 ont été identifiées à ce jour - développent des symptômes cliniques avant l'âge de 60 ans. Ils représentent moins de 1% des cas (Götz et al., 2004a; McGowan et al., 2006). Leur expression chez des souris provoque l'apparition de déficits

mnésiques et de plaques séniles avec l'âge. Le tout premier modèle de souris transgénique lié à la maladie d'Alzheimer, c'est-à-dire exprimant la pathologie de par la présence des plaques séniles vers l'âge de 6 à 9 mois, a été mis au point par Games et al. (1995). Il a été généré par l'expression de l'APP humaine mutée. Par la suite, Hsiao et al., (1996) ont développé le modèle Tg2576 à l'aide d'une double mutation appelée « APP sweden » (APP_{swe}). Celui-ci, couramment utilisé aujourd'hui, présente non seulement une pathologie de type MA via le développement progressif de plaques séniles mais il a également été démontré que ces souris ont des capacités mnésiques diminuées lors d'expérimentations spatiales (Hsiao et al., 1996). L'apparition de ces déficits est corrélée à celle des dépôts d'amyloïde (Westerman et al., 2002). De nombreux autres modèles ont été mis au point au fur et à mesure des découvertes de nouveaux gènes associés à la maladie.

Fait intéressant, la combinaison des mutations, par exemple pour l'APP et la PS1, exacerbe la quantité et la vitesse du développement des plaques séniles (Duff et al., 1996; Borchelt et al., 1997; Holcomb et al., 1998). Curieusement, malgré le fait que les dépôts d'amyloïde soient entourés de gliose réactive et de synapses atrophiés, aucun de ces modèles ne présentent une mort neuronale massive comme c'est le cas dans la MA (Irizarry et al., 1997a, 1997b; Takeuchi et al., 2000). Aussi, les enchevêtrements neurofibrillaires formés de protéines tau ou « tangles » (NFT), marqueur caractéristique de la MA, ne sont pas présents chez ces animaux (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996; Holcomb et al., 1998; Götz et al., 2004b). Pourtant, malgré qu'aucune mutation n'ait été identifiée pour le gène de tau dans le cas de la FAD, la seule dysfonction de cette protéine peut entraîner la neurodégénérescence et, à long terme, l'apparition de démences (Götz et al., 2004a). Des animaux transgéniques ont donc aussi été développés pour étudier les mécanismes affectés par ces perturbations génétiques (Spittaels et al., 1999; Lewis et al., 2000; Allen et al., 2002; Zhang

et al., 2004; Andorfer et al., 2005; Santacruz et al., 2005). Contrairement aux modèles transgéniques pour l'amyloïde, ceux qui expriment tau sous sa forme pathologique présentent une mort neuronale massive dans les régions cérébrales affectées (Lewis et al., 2000; Allen et al., 2002; Zhang et al., 2004; Andorfer et al., 2005; Santacruz et al., 2005). La progression de la pathologie est, encore une fois, corrélée avec des déficits de la mémoire spatiale (Santa-Cruz et al., 2005).

Afin de mieux comprendre le lien entre la pathologie amyloïde et tau, Lewis et al. (2001) ont croisé des souris transgéniques pour l'APP et tau_{JNPL3} mutée. La souris double transgénique résultante développe une forme plus agressive de NFT en plus de présenter une mort neuronale dans le cortex entorhinal. Dans le même ordre d'idées, Götz et al., (2001) ont montré que l'injection de bêta-amyloïde (A β) chez des souris mutantes pour tau_{P301L} induit la production de NFT, ce qui laisse croire que l'amyloïde pourrait favoriser voire accélérer le développement des tauopathies. La génération par Oddo et al. (2003a) d'une souris triple transgénique – PS1_{M146V}, APP_{swe}, tau_{P301L} - a permis de découvrir une certaine chronologie dans le développement des marqueurs pathologiques : d'abord une accumulation d'A β , ensuite la formation des plaques et enfin, des NFT. Aussi, avec l'âge, la souris triple mutante présente des dysfonctions synaptiques, incluant des défaillances au niveau de la LTP et des déficits cognitifs, ces derniers étant corrélés avec l'apparition de l'A β (Oddo et al., 2003a; Billings et al., 2005). La caractérisation de la mort neuronale n'a toujours pas été effectuée chez ces souris.

En ce qui concerne la forme sporadique de la MA, où se retrouvent la grande majorité des cas, plus de deux douzaines de gènes ont été identifiés comme des facteurs de risques mais à ce jour, seul celui de l'apolipoprotéine E fait consensus (Rocchi et al., 2003). L'apolipoprotéine E est associée depuis près de 20 ans aux marqueurs pathologiques de la MA (Namba et al.,

1991). On sait maintenant que c'est l'allèle $\epsilon 4$ qui semble favoriser le développement de la maladie alors que l'allèle $\epsilon 2$ confère une certaine protection (Strittmatter et al., 1993; Schachter et al., 1994; McGowan et al., 2006). Elle n'est toutefois pas directement liée à celle-ci comme c'est le cas pour les mutations précédentes. Enfin, il est important de souligner qu'à ce jour, aucun modèle animal n'est en mesure de reproduire fidèlement toutes les facettes de la MA (McGowan et al., 2006). Cela est vraisemblablement dû au fait que le développement de la pathologie s'échelonne sur plusieurs décennies.

Mais que se passe-t-il avec le glutamate et ses récepteurs chez ces animaux ? Masliah et al. (2000) ont démontré que la surexpression de l'APP humaine mutée chez des souris transgéniques induit une diminution dramatique du transport du glutamate et du niveau des protéines qui en sont responsables. Suite à son action, ce NT doit normalement être rapidement internalisé par les cellules gliales car une suractivation de ses récepteurs peut entraîner une toxicité potentiellement mortelle pour les neurones. Ce phénomène sera décrit en détail dans une section subséquente (voir 1.4.3). Les souris mutantes pour la PS1 – mutation PS1_{M146V} - sont également plus vulnérables aux effets du glutamate (Guo et al., 1999). Enfin, il semble que la A β favorise la toxicité de ce NT pour les neurones corticaux (Koh et al., 1990).

1.3.4 La plasticité fonctionnelle sous-jacente à la mémoire et son dysfonctionnement

Ce sont sans contredit les travaux de Bliss & Lomo (1973) qui ont permis d'établir expérimentalement un lien entre la plasticité de la mémoire, le postulat de Hebb et, quelques années plus tard, le glutamate et ses récepteurs. En effet, ils ont découvert qu'en appliquant pendant quelques

secondes une stimulation électrique de haute fréquence (rythme thêta) à un faisceau précis de fibres de l'hippocampe d'un lapin, la neurotransmission entre les fibres stimulées et les cellules post-synaptiques augmentait et ce, pendant des semaines entières voire des mois. Cette forme de plasticité synaptique durable fut baptisée « potentialisation à long terme (LTP) ».

Il faut d'abord souligner que l'hippocampe, tel que décrit par Andersen (1977), est constitué de zones bien définies qui forment trois voies excitables principales (FIGURE 1.6). La première est la voie perforante; elle part du cortex enthorinal et forme des connections excitatrices avec les cellules granulaires du DG. La deuxième, la voie des fibres moussues, est produite par les cellules granulaires et se termine aux neurones pyramidaux de la région de la corne d'Amon 3, communément appelée CA3. Ceux-ci transmettent ensuite l'excitation par les collatérales de Schaeffer, un regroupement d'axones, à la région CA1 constituée elle aussi de neurones pyramidaux (Kandel et al., 1991). La LTP de la région CA1 de l'hippocampe – observée par Bliss et Lomo (1973) - présente trois caractéristiques très intéressantes qui justifient les innombrables études qui lui sont consacrées : 1) une coopérativité - la stimulation de plus d'un neurone est nécessaire à sa réalisation, 2) une associativité – les neurones pré- et post-synaptiques se doivent d'agir de concert ensemble – et 3) une spécificité – le signal enregistré est exclusif aux collatérales de Schaeffer. La LTP de la région CA3 présente des paramètres différents et n'est pas, par exemple, associative (Kandel et al., 1991).

Les synapses des neurones ne peuvent se permettre de faire indéfiniment de la LTP puisqu'elles atteindraient rapidement un degré maximal d'efficacité. Cela implique qu'il deviendrait alors impossible d'acquérir de nouvelles informations. Il faut donc que d'autres processus viennent affaiblir sélectivement certains regroupements de synapses voire

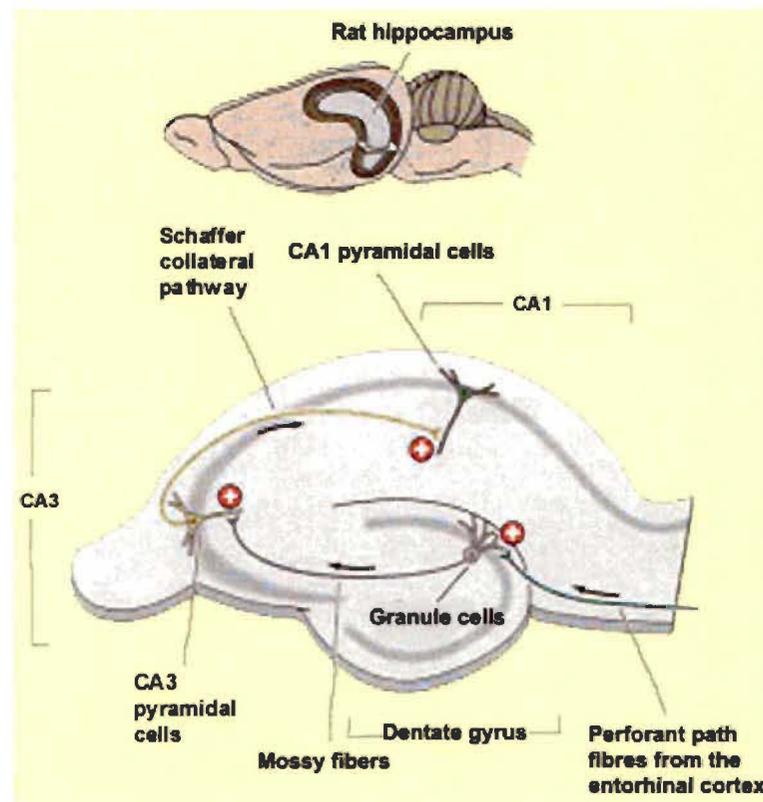


FIGURE 1.6 : Les régions de l'hippocampe et les trois voies excitatrices. L'hippocampe est composé de zones bien définies constituées principalement de neurones pyramidaux (CA1 et CA3) ou de cellules granulaires (DG). 1) Le signal entre dans l'hippocampe par les axones de la voie perforante et il est transmis aux cellules du DG. 2) Les fibres moussues le projettent ensuite dans les neurones de la région CA3. 3) Enfin, la 3^{ème} connexion se sépare en deux : une partie va vers CA1 via les collatérales de Schaeffer et l'autre vers l'hippocampe de l'hémisphère voisin par le corpus callosum. (<http://lecerveau.mcgill.ca/>)

même certaines synapses elles-mêmes. On appelle ce phénomène la « dépression à long terme (LTD) » (Huganir & Song, 2002; Bi et al., 1998; Malenka, 1994). Contrairement à la LTP, la LTD se manifeste après de longues stimulations (10-15 minutes) à basses fréquences. L'induction de la LTD provoque une diminution de la neurotransmission et elle est même en mesure d'annuler la hausse de celle-ci, induite préalablement par une LTP.

Ces deux modèles électrophysiologiques – LTP et LTD – sont, de nos jours, couramment exploités pour mieux comprendre les plasticités cellulaires et moléculaires de la mémoire et ce, malgré le fait qu'ils demeurent controversés (Nicoll, 2003); notamment parce qu'ils peuvent être observés sous plusieurs formes complexes (Raymond, 2007). Fait intéressant : des études expérimentales ont permis de lier la fréquence thêta de la LTP aux rythmes de la phase « rapid eye movement » du sommeil chez l'homme (Cantero et al., 2003). Serait-il possible que la consolidation de la mémoire se produise à ce moment ? Campbell et al. (2002) ont justement démontré une réduction significative de la LTP chez des rats privés de sommeil comparativement aux animaux contrôles. Cependant, plusieurs questions demeurent : l'induction artificielle de la LTP peut-elle produire un faux souvenir ? Est-ce qu'une saturation des synapses bloque l'acquisition de nouvelles informations ? Et qu'en est-il chez les animaux transgéniques exprimant les caractéristiques de la MA ?

Notre équipe a justement participé à la toute première étude démontrant que les souris transgéniques APP développent, en vieillissant, des déficits au niveau de la mémoire spatiale mais surtout une incapacité à maintenir la LTP (Nalbantoglu et al., 1997). Ces mutations ont donc des répercussions physiologiques majeures via une modification significative de la plasticité synaptique. Trinchese et al. (2004) ont quant à eux rapporté que les souris transgéniques APP/PS1 présentent une LTP anormale dès l'âge de 3 mois et ils ont encore une fois corrélé cette observation avec un déclin des fonctions cognitives. De plus, ces altérations surviennent avant même l'apparition des premières plaques séniles, un fait confirmé chez des animaux triples transgéniques (APP/PS1/tau) par Oddo et al. (2003b). Il semble toutefois que les effets rapportés plus haut ne soient pas universels. En effet, selon le type de mutation et de système (cultures, tranches, *in vivo*) les résultats peuvent varier (Fitzjohn et al., 2001; Puzzo & Arancio, 2006).

1.3.5 La plasticité cellulaire et moléculaire de la mémoire

Bien que la LTP ait été observée pour la première fois au début des années 1970, il a fallu attendre le milieu des années 1980 avant de voir émerger les bases cellulaires expliquant ce phénomène. Les propriétés biophysiques des récepteurs ionotropes AMPA et NMDA offrent un moyen élégant d'expliquer les mécanismes d'induction de la LTP (FIGURE 1.7).

Tout d'abord, le glutamate se lie au récepteur AMPA, ce qui a comme conséquence son ouverture et une entrée d'ions sodium (Na^+) via le canal ionique. Graduellement, la membrane plasmique se dépolarise, jusqu'à ce que le neurone post-synaptique soit suffisamment activé et que les récepteurs NMDA, jusque là inactifs puisque bloqués par un ion magnésium (Mg^{2+}), s'ouvrent (l'ion Mg^{2+} est expulsé du canal par la dépolarisation de la membrane). Une fois les récepteurs NMDA ouverts, une forte entrée de calcium (Ca^{2+}) se produit dans le neurone, induisant l'activation de nombreuses protéines, notamment des kinases, des phosphatases et des protéases (Lamprecht & LeDoux, 2004; Bredt & Nicoll, 2003; Lee et al., 2003a, 2003b). Les mécanismes par lesquels la LTP est maintenue pendant des semaines voire des mois ne sont pas encore bien élucidés. Cependant, quelques pistes intéressantes se dessinent: à court terme, l'action de protéines kinases, phosphatases et/ou protéases ou encore des modifications des interactions des sous-unités des récepteurs avec des protéines dites accessoires et le cytosquelette sont envisageables. Une altération de la sensibilité et des propriétés des récepteurs peut aussi induire des changements moléculaires. Ainsi, à plus long terme, la synthèse de nouvelles

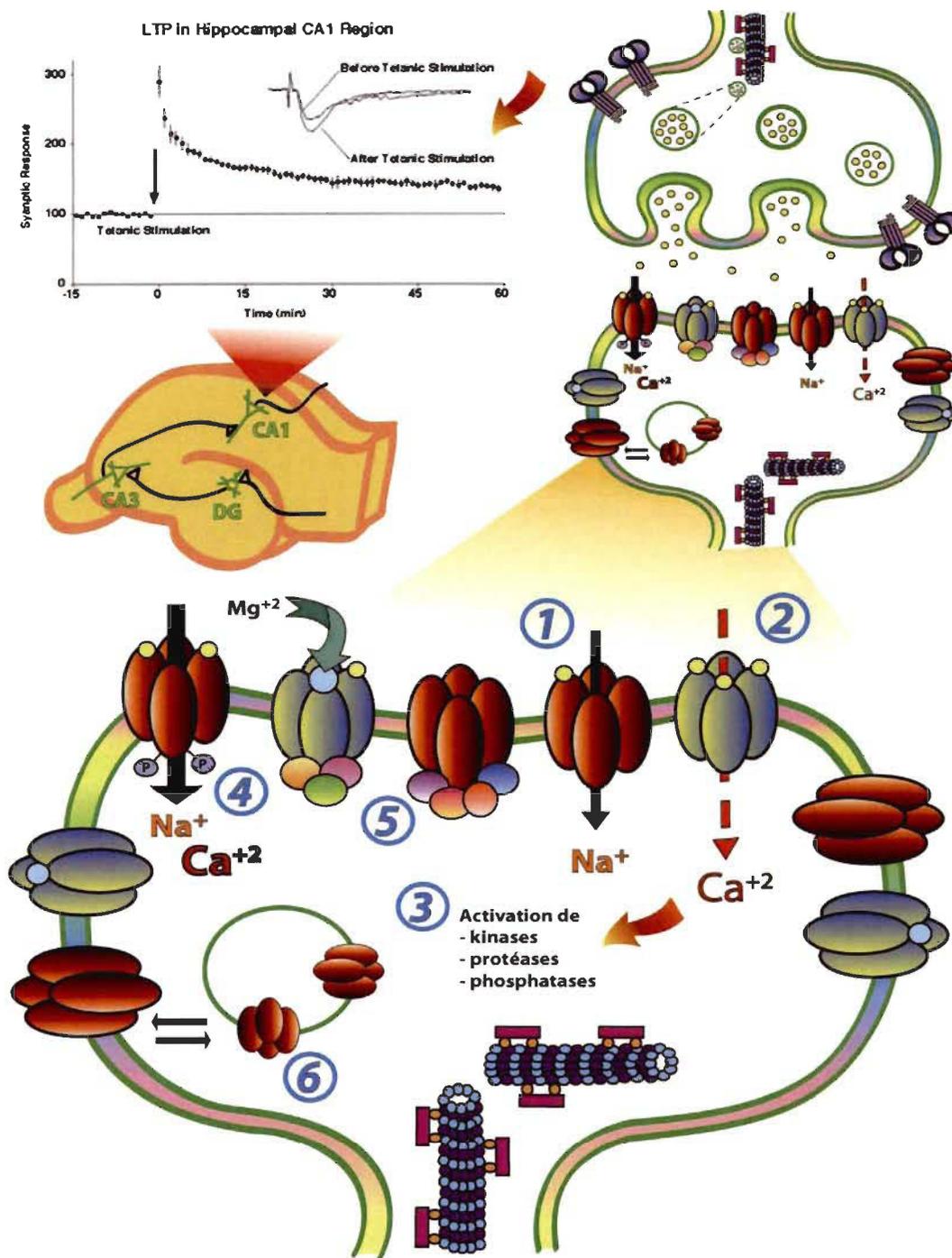


FIGURE 1.7 : Les mécanismes de la LTP. 1) Le glutamate se lie aux récepteurs AMPA provoquant une entrée de Na^+ . 2) Suite à la dépolarisation de la membrane, le Mg^{2+} est expulsé des récepteurs NMDA qui laissent passer du Ca^{2+} . 3) Ce cation induit l'activation de plusieurs enzymes qui vont modifier 4) le niveau de phosphorylation des récepteurs, 5) leur liaison à des protéines accessoires et 6) leur transport cellulaire. (<http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/research/projects/mechanisms/mechanisms.htm>)

protéines, une redistribution des récepteurs au glutamate ou encore, une modification de la composition en sous-unités de ces mêmes récepteurs ont été proposées comme mécanismes de maintenance de la LTP (Lamprecht & LeDoux, 2004; Lisman, 2003).

Les récepteurs au glutamate de type AMPA sont de très bons candidats à la majorité de ces processus de plasticité. En effet, ils sont reconnus pour jouer un rôle majeur autant dans le cas de la LTP que de la LTD puisqu'ils sont très dynamiques. Leur transport et leur expression sur la membrane semblent déterminants pour les fonctions synaptiques et donc, les mécanismes de la mémoire (Shepherd & Huganir, 2007).

1.3.6 Le transport des récepteurs AMPA

Au cours du développement, le transport des récepteurs AMPA et NMDA s'avère très différent. En effet, peu après la naissance, la majorité de synapses excitatrices de l'hippocampe contiennent seulement des récepteurs NMDA, elles sont alors considérées comme des synapses silencieuses (Petrálie et al., 1999; Isaac, 2003). Ces synapses particulières sont plus difficiles à stimuler que des synapses dites matures. L'induction d'une LTP permet cependant de recruter des récepteurs AMPA à la surface membranaire post-synaptique, facilitant une réponse subséquente (Kullmann, 2003). La proportion de récepteurs AMPA membranaire augmente ainsi graduellement au cours du développement, tout en demeurant étroitement liée à l'activité synaptique (Zhu et al., 2000).

La combinaison des dimères constituant les récepteurs AMPA a lieu dans le réticulum endoplasmique via des interactions entre les portions N-terminales (Kuusinen et al., 1999; Leuschner & Hoch, 1999; Greger et al.,

2007). Le transport des récepteurs dépend entre autres de sa composition en sous-unités. Ainsi, les hétéromères GluR1-GluR2 quittent très rapidement le réticulum endoplasmique pour l'appareil de Golgi, où ils seront glycosylés (Greger et al., 2002). Quant aux hétéromères GluR2-GluR3, ils sont retenus plus longtemps à l'intérieur de l'organelle. Il semble même qu'une certaine proportion de sous-unités GluR2 ne forme pas de dimères et demeure dans le réticulum endoplasmique. Ce phénomène serait étroitement lié à la forme flip ou flop de la sous-unité (Greger et al., 2002, 2003). Des interactions avec des protéines cytosoliques contrôlent elles aussi rigoureusement le transport des récepteurs. Par exemple, la liaison avec la « PKC α binding protein » (PICK1) est requise pour que la sous-unité GluR2 puisse sortir du réticulum endoplasmique (Greger et al., 2002).

Malgré que des expérimentations récentes aient rapporté une synthèse de récepteurs AMPA dans les dendrites (Ju et al., 2004), la plupart d'entre eux sont produits dans le corps cellulaire, d'où la nécessité d'un mécanisme de transport vers la membrane plasmique. Les récepteurs AMPA voyagent ainsi le long des microtubules du cytosquelette, jusqu'à leur destination finale. Ce processus actif est généré par les membres de deux superfamilles de protéines : les kinésines et les dynéines (Goldstein & Yang, 2000). Encore une fois, les récepteurs AMPA sont dépendants de certaines protéines cytosoliques, celles-ci étant responsables de la liaison avec les protéines motrices. Dans le cas de GluR2 et GluR3, par exemple, c'est la « glutamate receptor interacting protein 1 » (GRIP1) qui interagit avec la kinésine (Setou et al., 2002) et le domaine C-terminal de GluR2 ou GluR3 (Dong et al., 1997; Srivastava et al., 1998). En ce qui concerne GluR1, les protéines sollicitées sont complètement différentes; ce sont plutôt la myosine et une petite GTPase, Rab11, qui modulent le transport (Lise et al., 2006). Il est à prévoir que plusieurs autres interactions seront découvertes au cours des prochaines années, le raffinement des techniques facilitant les travaux dans ce champ de recherche.

Une fois rendu à destination, les récepteurs AMPA sont incorporés dans la membrane plasmique. Leur expression en surface est facilitée par une interaction directe avec la famille des « transmembrane AMPA regulatory proteins » (TARPs) (Vandenberghe et al., 2005; Ziff, 2007). Les TARPs pourraient même être considérées comme des sous-unités auxiliaires des récepteurs AMPA puisqu'elles participent à l'élaboration de leur conformation finale en plus d'affecter leur cinétique fonctionnelle (Fukata et al., 2005; Priel et al., 2005; Tomita et al., 2005). Le rôle des TARPs est dépendant de la combinaison spécifique entre la sous-unité du récepteur AMPA et le membre de la famille des TARPs (Cho et al., 2007; Kott et al., 2007; Milstein et al., 2007). Cinq de ces protéines peuvent lier les récepteurs AMPA et affecter leur transport : stargazin, γ -3, γ -4, γ -7, γ -8, et ce, indépendamment de leur composition en sous-unités (Tomita et al., 2003; Kato et al., 2007). Fait intéressant, certaines TARPs sont exprimées de manière spécifique à des régions particulières du cerveau (Tomita et al., 2003). La γ -8, par exemple, est pratiquement exclusive à l'hippocampe et elle contrôle l'expression des récepteurs AMPA sur la membrane extrasynaptique (Rouach et al., 2005). Le rôle de la portion membranaire extrasynaptique demeure toujours un sujet de débat. Cependant, les récepteurs qui se retrouvent dans cette zone sont hautement mobiles; il est donc fort probable qu'ils influencent la neurotransmission de par une diffusion latérale rapide vers la densité post-synaptique (Borgdorff & Choquet, 2002; Choquet & Thriller, 2003; Tardin et al., 2003; Groc et al., 2004).

Les TARPs participent aussi au transport des récepteurs AMPA vers la portion synaptique de la membrane, elles peuvent alors faciliter ou bloquer la liaison des récepteurs AMPA à des protéines dites accessoires (Chen et al., 2000b; El-Husseini et al., 2000). Celles-ci sont nécessaires au maintien des récepteurs dans la portion post-synaptique et elles seront abordées plus en profondeur dans la discussion de ma thèse. En modifiant ces interactions, les

TARPs peuvent provoquer l'internalisation des récepteurs ou encore leur diffusion vers la membrane extrasynaptique (Bats et al., 2007). Le double rôle de ces protéines, soit l'expression et ensuite la stabilisation des récepteurs AMPA dans les synapses, pose l'hypothèse intrigante d'une insertion en deux étapes distinctes. Certaines expérimentations supportent ce scénario (Passafaro et al., 2001; Adesnik et al., 2005) alors que ce n'est pas le cas pour d'autres (Schnell et al., 2002; Rouach et al., 2005).

Les dernières étapes du transport des récepteurs AMPA sont grandement dépendantes de leur composition en terme de sous-unités et de l'état de la portion C-terminale (Passafaro et al., 2001; Shi et al., 2001). La combinaison la plus courante présente dans les synapses excitatrices matures de l'hippocampe se trouve être GluR1-GluR2 ou encore GluR2-GluR3 (Wenthold et al., 1996) tel que mentionné précédemment. Il a été montré, à l'aide de cultures neuronales d'hippocampes, que les hétéromères GluR2-GluR3 sont recyclés continuellement et ce, indépendamment de l'activité synaptique (Passafaro et al., 2001; Shi et al., 2001). Ce phénomène constitutif très rapide, de l'ordre de quelques minutes, permettrait de conserver l'intégrité de la neurotransmission via la maintenance d'un nombre stable appréciable de récepteurs dans les synapses (Malinow et al., 2000). À l'inverse, les récepteurs AMPA contenant des sous-unités GluR1 ou GluR4 sont insérés dans les synapses (ou enlevés) selon l'activité électrique (Hayashi et al., 2000, Zhu et al., 2000). En effet, l'induction de la LTP provoque une hausse du nombre de récepteurs AMPA présents dans la densité post-synaptique (Malinow et al., 2000). L'insertion de ces récepteurs peut aussi être le résultat d'une stimulation physiologique, sensorielle par exemple (Takahashi et al., 2003). Rumpel et al. (2005) ont même rapporté une insertion de récepteurs AMPA dans l'amygdale suite à un conditionnement comportemental. Pour le moment, la composition précise des récepteurs insérés suite à l'activité demeure difficile à établir. Ainsi, certaines équipes ont proposé une prédominance pour les GluR1

homomériques (Plant et al., 2006) alors que d'autres ont plutôt observé des associations GluR1-GluR2 (Bagal et al., 2005; Adesnik & Nicoll, 2007).

Plusieurs kinases régulent, via la phosphorylation de la portion C-terminale, l'insertion des récepteurs AMPA dépendante de l'activité synaptique : la « Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II » (CaMKII) (Lisman & Zhabotinsky), la protéine kinase A (PKA) (Ehlers, 2000; Esteban et al., 2003; Gomes et al., 2004; Gao et al., 2006; Man et al., 2007) et la protéine kinase C (PKC) (Boehm et al., 2006; Ling et al., 2006; Gomes et al., 2007) entre autres. Tout comme la composition des récepteurs AMPA, les cascades de signalisation impliquant ces kinases varient au cours du développement (Esteban et al., 2003). Récemment, une toute nouvelle famille de protéines a été identifiée comme participante active de l'insertion des récepteurs dans la membrane, les Rab (Park et al., 2004). La plupart des mouvements intracellulaires membranaires impliquent ces petites GTPases chez les cellules eukaryotes (Zerial & McBride, 2001). Park et al. (2004) ont montré que le mouvement des endosomes nécessaires à l'insertion des récepteurs AMPA contenant GluR1 est régulé par Rab11. La présence de Rab8, qui contrôle le transport endosomal dans l'appareil de Golgi est, elle aussi, requise pour l'insertion synaptique des GluR1 et la LTP (Gerges et al., 2004). Il semble donc que Rab8 module le transport des récepteurs par les endosomes vers les dendrites pour qu'ensuite Rab11 prenne la relève et redirige le transport vers la membrane synaptique (Esteban, 2008). Dans le cas de la plasticité synaptique sous-jacente à la LTD, une internalisation des récepteurs AMPA est également observable mais cette fois c'est la Rab5 qui serait en charge de ce processus (Brown et al., 2005).

Il est possible que la plasticité des récepteurs glutamatergiques, plus particulièrement des récepteurs AMPA dans le cadre de mes travaux, facilite la mise en place des mécanismes initiateurs de la MA à moins qu'elle en fasse elle-même partie. En effet, en régulant l'homéostasie du Ca^{2+} dans les

neurones, elle est essentielle à la transmission synaptique mais peut aussi devenir toxique dans des situations extrêmes. Green et al. (2007b) proposent ainsi que certaines protéines liées aux marqueurs pathologiques de la MA comme la A β , pourraient, de par leur localisation préférentielle sur la membrane synaptique, moduler l'activité et le transport des récepteurs ionotropes.

1.4 LES MÉCANISMES INITIATEURS DE LA MA

Les scientifiques cherchent depuis des années le mécanisme initiateur de la MA. Au fil des découvertes et du raffinement des techniques, il est de plus en plus évident que c'est plutôt une succession de phénomènes qui provoquent les symptômes cliniques de l'affection. Les sections suivantes sont consacrées aux différents mécanismes suspectés et ce, dans un ordre chronologique et en commençant par le plus ancien : les marqueurs pathologiques dessinés par le Dr. Alois Alzheimer en 1906.

1.4.1 Les marqueurs pathologiques de la MA

Suite à une traversée du désert de 75 ans où l'ultrastructure seulement de ces dépôts fut identifiée post-mortem, les percées technologiques des deux dernières décennies ont permis la réalisation de pas de géant. D'abord, grâce à la caractérisation des enchevêtrements neurofibrillaires (« tangles », NFT) et des plaques séniles (« senile plaques, SP »), constituants majeurs des dépôts intracellulaires et extracellulaires, respectivement (FIGURE 1.8). En effet, à partir de cerveaux de patients souffrant de MA, Glenner et Wong (1984) sont parvenus à purifier une toute petite protéine d'à peine 4 kDa, la A β . Nommée ainsi en vertu de sa structure en feuillets β , la A β constitue le coeur des SP. Le clonage de l'ADNc de la protéine précurseur de la A β ,

l'APP, par Kang et al. (1987) a permis l'écllosion de nombreux projets de recherche cellulaires et/ou moléculaires.

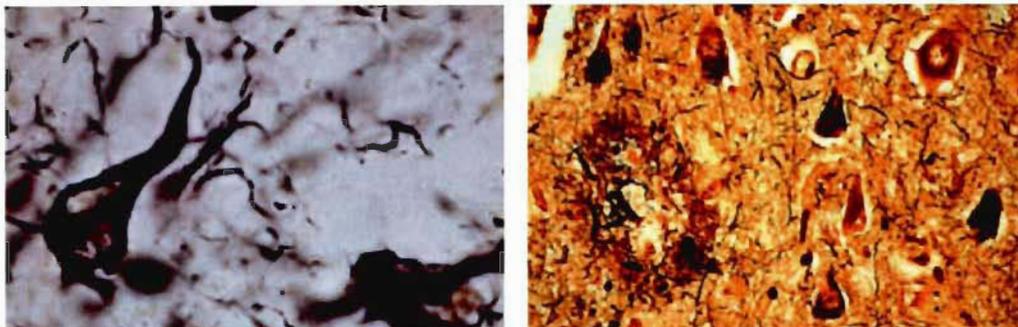


FIGURE 1.8 : Marquage à l'argent des dépôts intracellulaires et extracellulaires caractéristiques de la MA. Les enchevêtrements neurofibrillaires sont les principaux constituants des « tangles » (NFT) observés dans le cerveau des patients MA (*gauche*). Quant aux plaques séniles, composées de β -amyloïde, elles se retrouvent à l'extérieur des cellules neuronales (*droite*).

Site Internet du laboratoire du Dr. Feany de l'Université de Harvard (USA).

Il y a quelques années, une théorie controversée à vu le jour : il existerait une bonne et une méchante $A\beta$! Le fragment $A\beta_{42}$ est pointé du doigt en ce qui a trait aux conséquences néfastes de l' $A\beta$ alors que le fragment plus court, $A\beta_{40}$, serait plutôt neuroprotecteur. Des travaux ont été menés par plusieurs équipes pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Kim et al. (2007) ont montré que l' $A\beta_{40}$, la forme prédominante dans le cerveau des patients MA, inhibe la formation de dépôts amyloïde, contrairement à l' $A\beta_{42}$. En plus, hausser le taux d' $A\beta_{40}$ chez des souris transgéniques retarde leur mort prématurée (Kim et al., 2007). Ces observations ont été renforcées par une étude qui a rapporté que certaines mutations des présénilines réduisent davantage la production d' $A\beta_{40}$ qu'elles n'augmentent celle d' $A\beta_{42}$ (Bentahir et al., 2006). Aussi, une corrélation a été établie entre l'âge de l'apparition de la FAD et l'augmentation d' $A\beta_{42}$ mais également la diminution d' $A\beta_{40}$ (Kumar-Singh et al., 2006). Enfin, la plupart des mutations associées à la MA causent une surproduction d' $A\beta_{42}$ (Borchelt et al., 1996;

Citron et al., 1997; McGowan et al., 2004). Il est toutefois difficile de déterminer l'impact de cette altération chez les animaux transgéniques traditionnels. Un nouveau modèle animal surexprimant A β 40 ou A β 42 a donc été développé (McGowan et al., 2005). Il s'avère que A β 42 s'accumule sous forme insoluble et induit l'apparition, avec le temps, de plaques compactes d'amyloïde (McGowan et al., 2005). C'est tout le contraire avec la surexpression d'A β 40 : les souris ne présente aucune pathologie liée à l'amyloïde avec l'âge (McGowan et al., 2005). Le ratio A β 42/A β 40 pourrait donc être un facteur déterminant dans le développement de la maladie.

D'autres équipes s'intéressent également au niveau de solubilité de l'amyloïde ou encore à l'expression d'oligomères. En effet, une certaine corrélation a été démontré entre la proportion d'A β insoluble et les capacités mnésiques chez des des souris transgéniques (Chen et al., 2000a; Janus et al., 2000; Gordon et al., 2001). Celle-ci n'est cependant pas parfaite (Westerman et al., 2002) ce qui suggère un mécanisme plus complexe que le simple niveau de solubilité. Ainsi, quelques équipes ont montré que des anticorps contre l'A β soluble peuvent renverser les déficits mnésiques chez des souris transgéniques (Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000; Kotilinek et al., 2002) mais, malheureusement, il semble pratiquement impossible d'éliminer les dépôts et les plaques déjà en place (Dodart et al., 2002). L'hypothèse que la présence d'oligomères solubles pourrait être responsables, du moins en partie, des déficits a donc été proposée. Des études ont identifiés certains oligomères d'amyloïde comme étant de possibles acteurs du développement de la MA. Ainsi, Walsh et al. (2002) ont rapportés que de petits oligomères d'A β - possiblement des trimères - bloquent l'induction de la LTP. En plus, l'injection de ces fragments induit des déficits cognitifs chez des rats (Cleary et al., 2005). À ce jour, beaucoup reste à faire et le rôle précis de l'amyloïde demeure un sujet chaud de l'actualité liée à la MA.

Dans le cas des NFT, il faut attendre plus longtemps que pour l'amyloïde pour en arriver au même niveau de connaissances. Plusieurs équipes ont alors simultanément démontré le rôle critique de la protéine tau, une phosphoprotéine normalement associée aux microtubules du cytosquelette, dans la formation de ces marqueurs pathologiques (Grundke-Iqbal et al., 1986; Nukina & Ihara, 1986; Wischik et al., 1988). Les fonctions de tau sont critiques pour les neurones : elle stabilise les tubulines qui forment les microtubules de l'axone, interagit avec le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique, permet la croissance des dendrites et l'ancrage de diverses enzymes et enfin, elle régule le transport des vésicules dans l'axone (Friedhoff et al., 2000). La structure primaire de cette protéine la rend particulière. En effet, elle est constituée de seulement 15% d'acides aminés hydrophobes (vs 30% pour une protéine globulaire typique) ce qui augmente beaucoup sa solubilité. Paradoxalement, elle forme facilement des agrégats, puisqu'elle est inapte à camoufler ses portions hydrophobes (von Bergen et al., 2005). En plus, elle contient un excès de charges positives ce qui entraîne une structure secondaire désorganisée - la protéine ne peut pas se replier sur elle-même car les charges se repoussent. Enfin, tau est très résistante à la chaleur, aux agents dénaturants ou aux traitements acides qui, normalement, font perdre aux protéines leurs fonctions biologiques, ce qui n'est pas le cas pour ce polypeptide (Friedhoff et al., 2000). À l'état natif, elle est phosphorylée sur plusieurs résidus (2 à 3 moles de phosphates par mole de protéine). Chez les individus atteints de MA, le niveau de phosphorylation est augmenté de 3 à 4 fois pour atteindre un rapport de 5 à 9 moles de phosphates par mole de protéine (Khatoon et al., 1992, 1994; Alonso et al., 1994). Il est important de souligner qu'il a été rapporté que cette hyperphosphorylation pourrait disparaître suite à la formation des PHF (Wischik et al., 1995). Mais d'abord, un niveau de phosphorylation anormal rend probablement la protéine inapte à assurer ses fonctions biologiques (Alonso et al., 1994, 1997). Par conséquent, il est proposé que les protéines tau se détachent des microtubules, forment des dimères puis des paires de

filaments en hélice et, avec le temps, des NFT (Iqbal et al., 1998; Mandelkow & Mandelkow, 1998) (FIGURE 1.9).

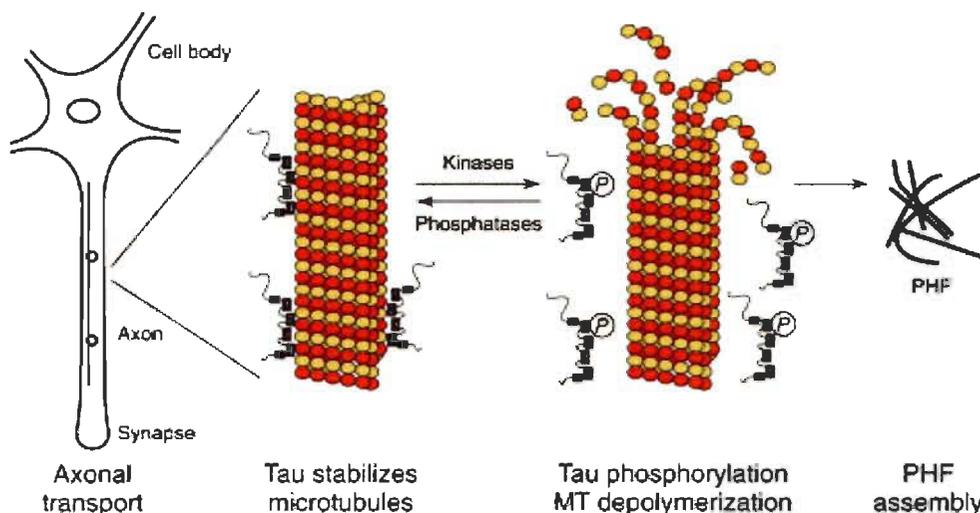


FIGURE 1.9 : Processus de formation des NFT. Dans les cerveaux MA, les protéines tau, impliquées dans le transport axonal et la stabilisation des microtubules du cytosquelette, deviennent hyperphosphorylées. Cet état favorise un effondrement du cytosquelette cellulaire via une dépolymérisation des microtubules et les protéines tau hyperphosphorylées forment des dimères puis, avec le temps, des NFT. Mandelkow & Mandelkow, 1998

Une accumulation progressive de protéines tronquées peut avoir plusieurs conséquences pour les neurones: synthèse de protéines et modifications translationnelles anormales, interactions aberrantes des protéines pathologiques avec d'autres protéines dites normales et altération du transport intracellulaire. Une défection du transport axonal a donc été proposée pour expliquer différents désordres neurodégénératifs, dont la MA (Roy et al., 2005). Malgré tout, il est encore difficile d'affirmer avec certitude que les agrégats composés des protéines liées au cytosquelette sont la cause de maladies neurodégénératives plutôt qu'un mécanisme de compensation du neurone pour se protéger (Roy et al., 2005).

1.4.2 L'inflammation et le stress oxydatif

Au début des années 90, d'autres hypothèses ont été soulevées pour expliquer les mécanismes initiateurs de la MA. Plusieurs études ont alors démontré une hausse de l'activité du système immunitaire cérébral chez les patients souffrant de la maladie (Mattiace et al., 1990; Cacabelos et al., 1991). Les SP se sont avérés particulièrement réactives en vertu d'une association avec des cytokines inflammatoires - « interleukin-1- β » et « tumor necrosis factor- α » (TNF- α) - et des « class II major histocompatibility antigens ». Ce phénomène semble cependant associé étroitement à la neurodégénérescence, ce qui porte à croire qu'il pourrait découler de la présence d'une accumulation de protéines tronquées plutôt qu'en être la cause (Dickson et al., 1993). À peu près au même moment, la possibilité d'une augmentation du stress oxydatif lors de la MA a été proposée (Jellinger et al., 1990). Certains composés, comme le fer ou l'aluminium, peuvent en effet promouvoir la formation de radicaux libres ce qui entraîne, indubitablement, la mort cellulaire. Bon nombre de travaux ont démontré une altération de l'activité de plusieurs enzymes reconnues pour leurs actions anti-oxydantes : « heme oxygenase-1 », « zinc/manganese superoxide dismutases », « catalase », « glutathione peroxidase », etc. (Smith et al., 1994; Furuta et al., 1995; Gsell et al., 1995; Ceballos-Picot et al., 1996). De plus, ces enzymes ont souvent été co-localisées avec les NFT ou les SP (Furuta et al., 1995). Malheureusement, comme pour l'hypothèse précédente, il est difficile voire impossible d'établir une chronologie certaine quant à l'apparition de ces altérations.

Il est cependant bien documenté que des altérations prolongées voire permanentes du métabolisme lipidique peuvent favoriser la production de métabolites réactifs hautement oxygénés (ROS), pierres angulaires du stress oxydatif et, avec le temps, de la mort neuronale (Bazan et al., 2002a). On n'a qu'à penser aux prostaglandines, aux cyclo-oxygénases ou encore aux

leukotriènes qui sont au centre des processus inflammatoires. Une famille bien particulière d'enzymes, qui sera présentée dans la section 1.5, est intimement liée à la production de ces composés. Elle est au coeur même des travaux de cette thèse d'autant plus qu'elle semble étroitement associée aux développement de plusieurs désordres neurodégénératifs (Bazan et al., 2002a). Mais d'abord, il reste un dernier mécanisme potentiellement initiateur de la MA impliquant directement le NT glutamate et ses récepteurs à explorer : l'excitotoxicité.

1.4.3 Une plasticité néfaste : l'excitotoxicité

Tel que mentionné précédemment, une suractivation prolongée des récepteurs au glutamate de type ionotropes peut en effet provoquer l'apparition d'un phénomène bien particulier appelé l'excitotoxicité (Michaelis, 1998; Dodd, 2002) (FIGURE 1.10). Cet état peut induire un choc osmotique car en même temps que les ions, un imposant volume d'eau entre rapidement dans la cellule. Toutefois, le débalancement du contenu ionique représente la menace la plus dangereuse. Lorsque les récepteurs ionotropes demeurent ouverts trop longtemps, les ions s'engouffrent dans les neurones ce qui provoque une surcharge, principalement en Ca^{2+} . Ce cation peut alors activer un grand nombre d'enzymes dont des protéases et des lipases. Les protéases, comme les calpaines, dégradent la spectrine, partie intégrante du cytosquelette, ce qui entraîne l'effondrement de la cellule (Yoon et al., 2006). Elles vont également favoriser l'activité des caspases, des enzymes initiatrices de l'apoptose (Wu et al., 2007). Pendant ce temps, les lipases vont favoriser l'inflammation en s'attaquant aux phospholipides membranaires et en larguant des acides gras dans le cytosol. Si ces derniers augmentent trop rapidement, la proportion de radicaux libres et de métabolites oxygénés hautement réactifs va exploser. Ces composés altèrent les capacités des

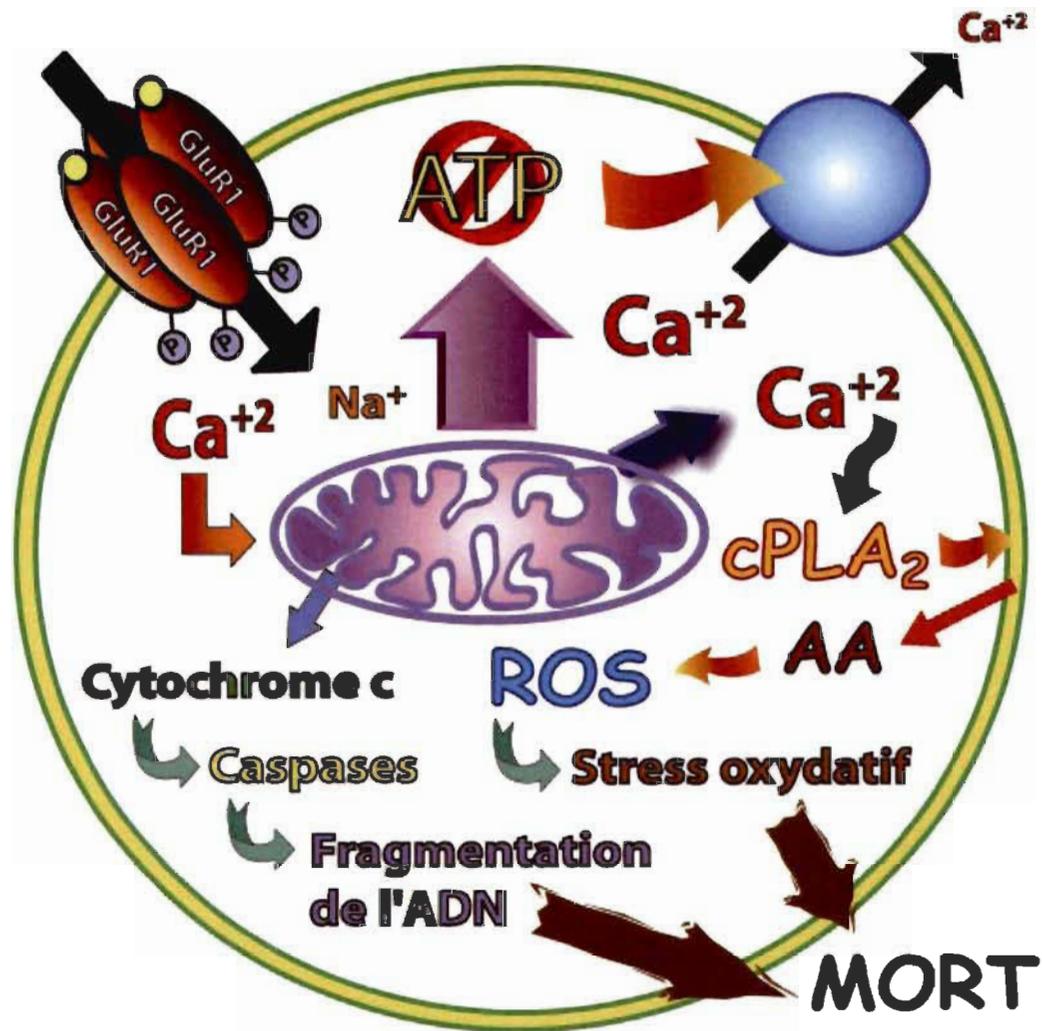


FIGURE 1.10 : Les processus liés au phénomène d'excitotoxicité. Une ouverture prolongée des récepteurs au glutamate entraîne une forte et soudaine entrée de Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire. Généralement le neurone est en mesure d'expulser le surplus de cations à l'aide de la pompe calcique, qui carbure à l'adénosine triphosphate (ATP). Toutefois, lorsque la hausse est intense et survient sur une courte période de temps, la situation devient rapidement incontrôlable. L'activation de phospholipases dépendantes du Ca^{2+} (cPLA₂) génère de l'acide arachidonique, un acide gras qui sera transformé en métabolites de l'inflammation puis en réactifs hautement oxygénés. Le Ca^{2+} s'attaque aussi aux mitochondries qui vont réagir en relâchant le cytochrome c. Leur incapacité à produire de l'ATP va également rendre la pompe calcique inefficace. Les cascades apoptotiques vont alors se mettre en branle par le biais des caspases ce qui mène, inévitablement, à la mort cellulaire (Mattson, 2003).

enzymes anti-oxydantes à les neutraliser en plus de produire une peroxydation de la membrane lipidique. Une hausse rapide du Ca^{2+} va aussi nuire au bon fonctionnement des mitochondries; elles ne pourront alors plus produire l'ATP nécessaire à la pompe qui expulse les cations à l'extérieur du milieu intracellulaire. Enfin, le relâchement par ces organelles du cytochrome c, acteur central de l'apoptose donnera le coup de grâce à la cellule (Mattson, 2003). L'excitotoxicité et une altération de l'activité de diverses enzymes impliquées dans ce phénomène, les calpaines notamment, ont été démontré chez des patients souffrant de désordres neurodégénératifs, y compris la MA (Wu et al., 2007).

1.5 LES PHOSPHOLIPASES A_2

Étant donné qu'elles peuvent influencer la fluidité des membranes et donc, peut-être, les propriétés des protéines qui la composent, certaines enzymes s'avèrent d'excellentes candidates pour explorer les mécanismes liés à la plasticité des récepteurs au glutamate, de la mémoire et de son dysfonctionnement. Ces enzymes, les phospholipases A_2 (PLA₂), sont considérées comme des gardiennes de l'environnement lipidique (Balsinde, 2002a; Murakami & Kudo, 2002). Il existe plus de 20 isoformes de PLA₂ chez les mammifères. En plus de maintenir l'intégrité et la fluidité de la membrane cellulaire, celles-ci produisent principalement, par l'hydrolyse du lien *sn*-2 des phospholipides, de l'acide docosahexaénoïque (DHA) ou de l'acide arachidonique (AA), deux acides gras polyinsaturés (Murakami & Kudo, 2002) (Figure 1.11). L'AA peut être transformé rapidement en différents métabolites : prostaglandines, leukotriènes, etc. (Dessen et al., 2000; Winstead et al., 2000). Ces composés jouent alors un rôle important dans un grand nombre de fonctions physiologiques dont la régulation du sommeil, la réponse immunitaire, l'inflammation et la perception de la douleur (Schaloske

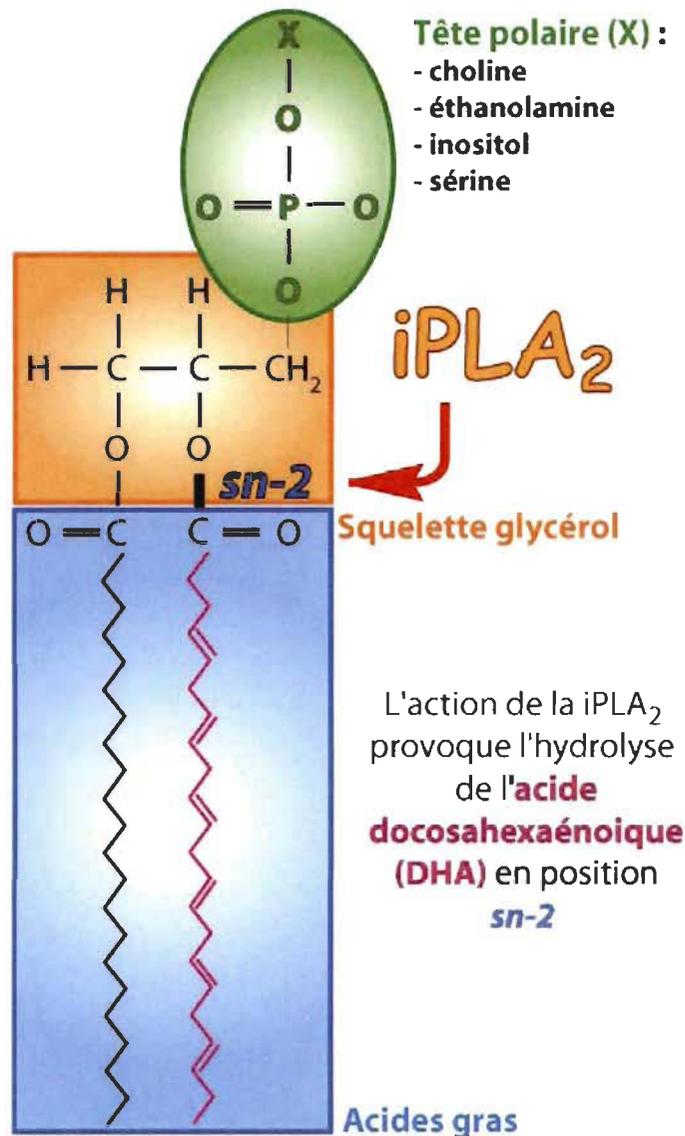


FIGURE 1.11 : Le site d'action des PLA₂. La PLA₂ indépendante du calcium (iPLA₂) produit de l'acide docosahexaénoïque en catalysant le lien *sn-2* qui relie l'acide gras au squelette glycérol.

& Dennis, 2006). Dans des cas extrêmes, la relâche de l'AA dans le cytosol peut favoriser l'apoptose et, à long terme, l'apparition de lésions neuronales (Phillis et al., 2003). Aussi, de par sa nature anionique, cet acide gras accélère l'agrégation de la protéine tau qui est, elle, chargée positivement (Wilson & Binder, 1997).

Il a été démontré par notre équipe que les PLA₂ et leurs produits sont en mesure d'altérer les mécanismes de la LTP et de la LTD (Massicotte et al., 1991; Chabot et al., 1998; Martel et al., 2006). Cela renforce l'hypothèse que ces enzymes pourraient être impliqués dans les processus de mémorisation (Massicotte, 2000). Étant donné que l'activité de ces enzymes est dérégulée lors de pathologies, entre autres la schizophrénie, l'épilepsie, l'ischémie et la MA (Ross et al., 1998, 1999; Bazan et al., 2002b; Gabryel et al., 2007), il s'avère crucial de cibler et comprendre leurs mécanismes d'action. Elles représentent peut-être la clé de l'initiation de diverses conditions neurodégénératives via une modulation, à ce jour méconnue, des récepteurs au glutamate.

Chez les patients souffrant de schizophrénie, l'activité de ces enzymes est en effet diminuée ou augmentée et ce, dépendamment de la famille de PLA₂ (Ross et al., 1999). Cette maladie est généralement associée au système dopaminergique, cependant, de plus en plus de chercheurs s'intéressent à ce qui est considéré comme l'hypothèse glutamatergique (Stone et al., 2007). Posée au milieu des années 1990, celle-ci se base sur des expérimentations qui ont démontré qu'une fonction réduite des récepteurs au glutamate de type NMDA entraîne l'apparition de symptômes cliniques similaires à ceux de la schizophrénie : hallucinations, désordre de la pensée, etc. (Krystal et al., 1994). Le phénomène d'excitotoxicité n'est pas non plus exclu malgré l'absence de neurodégénérescence (Stone et al., 2007), la dégénérescence des synapses et des épines dendritiques étant suffisante pour altérer les fonctions neuronales (Jarsog et al., 2005; Glantz et al., 2006). Cela semble curieux puisqu'on parle dans le cas présent d'une hypofonction des récepteurs glutamatergiques mais pourtant, il a été démontré par Olney et al. (1999) que cette condition induit une gliose transitoire de quelques jours. Une altération de l'activité phospholipasique est peut-être liée de près ou de loin à la mise en place de ces conditions, d'autant plus que la possibilité d'une association génétique entre la

schizophrénie et certaines formes de PLA₂ a récemment été soulevée (Tao et al., 2005). Ce constat demeure cependant controversé (Price et al., 1997).

Dans le cas de l'épilepsie, la relâche massive de glutamate induit une excitotoxicité et rapidement, des dommages irréversibles aux cellules neuronales (Aarts & Tymianski, 2004). Les PLA₂ activées par l'entrée de Ca²⁺ sont ainsi directement impliquées dans la production de médiateurs de l'inflammation (Dorandeu et al., 1998; Bazan et al., 2002b). La possibilité d'une action directe sur les récepteurs glutamatergiques demeure toutefois inexplorée à ce jour.

Il se produit pratiquement la même chose lors de l'ischémie. Cette affection, produite par une diminution de l'apport sanguin au cerveau, induit la mise en place d'une série de réactions métaboliques avec pour conséquence la mort neuronale (Muralikrishna Adibhatla & Hatcher, 2006). Encore une fois, les PLA₂ dépendantes du taux de Ca²⁺ intracellulaire voient leur activité subitement augmentée (Gabryel et al., 2007), ce qui provoque du stress oxydatif, une forte hausse de la peroxydation lipidique et la relâche des médiateurs de l'inflammation (Bonventre, 1996; Clemens et al., 1996; Muralikrishna Adibhatla & Hatcher, 2006). Comme pour les pathologies précédentes, le lien entre les récepteurs glutamatergiques, responsables de l'excitotoxicité et ces enzymes n'est pas encore élucidé.

Enfin, pour ce qui est de la MA, une diminution *post-mortem* de l'activité des PLA₂ a été rapportée par différentes équipes (Gattaz et al., 1996; Ross et al., 1998; Talbot et al., 2000). Cette altération a été corrélée avec un développement précoce de la maladie, la sévérité des déficits cognitifs, une mort prématurée et également une présence accrue des marqueurs pathologiques (Gattaz et al., 1996). Une augmentation de l'immunoréactivité spécifique aux PLA₂ dépendantes du Ca²⁺ a aussi été observée par Stephenson et al., (1996). Tel que mentionné précédemment dans

l'introduction de ma thèse, la MA est caractérisée par une excitotoxicité accrue (Hynd et al., 2004). On peut donc suspecter, encore une fois, un lien direct entre l'activation des récepteurs au glutamate, plus particulièrement ceux de type AMPA puisqu'ils sont responsable de la réponse initiale, et les PLA₂.

1.5.1 Les familles de phospholipases A₂

Les PLA₂ sont classifiées par groupes numérotés de I à XIV d'après leurs structures moléculaires et leurs sites catalytiques soit His/Asp, Ser/Asp ou encore Ser/His/Asp (Balsinde et al., 2002b; Schaloske & Dennis, 2006). Cependant, elles sont généralement catégorisées en trois grandes familles : 1) les PLA₂ sécrétées (sPLA₂), 2) les PLA₂ dépendantes du Ca²⁺ (cPLA₂) et 3) les PLA₂ indépendantes du Ca²⁺ (iPLA₂) (TABLEAU 1.1). Les « platelet activating factor (PAF) » acétylhydrolases (PAF-AH) et les PLA₂ lysosomales constituent, quant à elles, deux autres classes très spécifiques de PLA₂ (Schaloske & Dennis, 2006). Elles sont beaucoup moins connues que les autres familles et malheureusement peu de travaux leur ont été consacrés.

1.5.2 Les sPLA₂

Les sPLA₂ sont des enzymes de faible poids moléculaire, entre 13 et 19 kDa, et elles sont excrétées par les cellules. Elles sont présentes chez les plantes, les mollusques, les insectes, les reptiles et les mammifères (Schaloske & Dennis, 2006). Le venin de plusieurs serpents contient également des sPLA₂ (cobra et vipère par exemple) tout comme les abeilles et certaines araignées. Leurs activités nécessitent une concentration de Ca²⁺ de l'ordre du micromolaire (μM) et elles exercent leur action via la formation d'un complexe His/Asp/Ca²⁺ au sein du site catalytique. Elles n'ont aucune

spécificité distincte pour les acides gras mais certaines d'entre elles préfèrent les phospholipides aux têtes polaires anioniques (Schaloske & Dennis, 2006).

TABLEAU 1.1
Les trois grandes familles de PLA₂

Classe	Groupe	Poids moléculaire	Dépendance au Ca ²⁺	Isoformes confirmées dans le cerveau
sPLA ₂ (extracellulaires)	I, II, III, V, VII, VIII, XIV	13-19 kDa	dépendantes	IIA, IIC, IIE, V, X
cPLA ₂ (intracellulaires)	IV	61-114 kDa	dépendantes sauf pour la cPLA ₂ γ (IVC)	IVA IVB IVC
iPLA ₂ (intracellulaires)	VI	28-146 kDa	indépendantes	cPLA ₂ β (IVA) cPLA ₂ γ (IVB)

Ces enzymes se retrouvent surtout dans la portion extracellulaire alors que les autres types de PLA₂ sont préférentiellement intracellulaires. Ainsi, leurs fonctions regroupent toutes les tâches de maintenance et de signalisation qui impliquent le feuillet lipidique extracellulaire en plus de la digestion des lipides exogènes (Kudo & Murakami, 2002). Cette propriété leur confère une fonction importante au niveau des processus d'exocytose.

La principale activité cellulaire de ces enzymes est la production d'AA pour les processus inflammatoires. Elles jouent donc un rôle actif dans plusieurs pathologies liées à ce phénomène : l'arthrite, l'athérosclérose, les pancréatites ou encore le syndrome de détresse respiratoire. Certaines

sPLA₂ ont aussi des propriétés anticoagulantes; d'où leur utilité dans les venins (Bonventre & Sapirstein, 2002; Uozumi & Shimizu, 2002; Hirabayashi et al., 2004; Schaloske & Dennis, 2006).

1.5.3 Les cPLA₂

Les cPLA₂ sont de volumineuses enzymes – de 61 à 114 kDa – qui utilisent la combinaison des acides aminés Ser/Asp pour exercer leur activité catalytique. Contrairement aux sPLA₂, le Ca²⁺ n'est pas nécessaire pour l'action enzymatique elle-même mais plutôt pour la translocation de la protéine vers la cible (Schaloske & Dennis, 2006). Ces enzymes relâchent préférentiellement de l'AA en provenance des phospholipides de la membrane intracellulaire, nucléaire ou alors du réticulum endoplasmique (Liu et al., 2001). Leur activité peut être modulée via la phosphorylation sur des résidus sérines par des « mitogen-activated protein kinases (MAPK) » (Schaloske & Dennis, 2006).

La viabilité d'un animal knockout cPLA₂ (Bonventre et al., 1997) a grandement facilité l'identification de leurs fonctions cellulaires. Elles ont alors été liées aux processus de l'inflammation, ulcères, lésions pulmonaires, ischémie, traumatismes, épilepsie, anaphylaxie, noniception et parturition (Lukiw & Bazan, 2000; Schaloske & Dennis, 2006). Stephenson et al. (1996) ont aussi rapporté une augmentation de l'activité cPLA₂ au niveau des astrocytes chez des cerveaux MA et cette altération semble liée à la présence des dépôts de Aβ. Cela laisse donc sous-entendre que ces enzymes pourraient être impliquées dans les mécanismes inflammatoires initiateurs de la MA. On peut donc affirmer qu'elles sont parmi les « méchantes » PLA₂; elles deviennent très actives lors de la mise en place de l'excitotoxicité, de l'inflammation, de l'apoptose et conséquemment de la MA.

1.5.4 Les iPLA₂

L'activité des iPLA₂ est, comme le nom l'indique, complètement indépendante du Ca²⁺. La taille de ces protéines est très variable, soit de 28 à 146 kDa. Elles exploitent, comme les cPLA₂, les acides aminés sérines pour exercer leur activité catalytique (Schaloske & Dennis, 2006). Fait intéressant : il a été rapporté que la iPLA₂ présente la plus forte activité constitutive dans diverses régions du cerveau essentielles aux processus de mémorisation, dont l'hippocampe (Wolf et al., 1995; Yang et al., 1999). Comme les autres PLA₂, la iPLA₂ joue un rôle-clé dans la production d'acides gras, particulièrement le DHA (Strokin et al., 2003) (FIGURE 1.11). Puisque cet acide gras possède de nombreuses vertus bénéfiques, on peut postuler que la iPLA₂ est, au contraire de ses consœurs dépendantes du Ca²⁺, une « bonne » PLA₂ en terme de neuroinflammation. En plus, elle participe très activement, de par son activité constitutive, au remodelage des phospholipides membranaires pour faciliter la maintenance de fonctions optimales (Balsinde et al., 1997). Des travaux suggèrent que cette enzyme contribuerait aux processus de transports cellulaires via son action sur la membrane (Mayorga et al., 1993; Brown et al., 2003). Or, ces processus de transports sont des mécanismes qui contribuent à l'expression des récepteurs au glutamate à la surface des membranes (Man et al., 2000; Broutman & Baudry, 2001).

Les iPLA₂ ont été associées à diverses fonctions cellulaires et physiologiques : la signalisation du Ca²⁺, l'apoptose, l'expression protéique, la prolifération des lymphocytes, l'inflammation, la relaxation des vaisseaux sanguins, l'ischémie et l'arythmie (Schaloske & Dennis, 2006). La mise au point de nouveaux inhibiteurs spécifiques à des isoformes des iPLA₂ devrait permettre de mieux cerner, dans un proche avenir, les rôles distincts de ces diverses enzymes. Ainsi il semble qu'une isoforme appelée iPLA₂γ se

retrouve principalement au niveau du réticulum endoplasmique et des mitochondries (Kinsey et al., 2005; 2007) où elle jouerait un rôle cytoprotecteur contre le stress oxydatif (Kinsey et al., 2008).

Malgré que les fonctions spécifiques dans les neurones de la $iPLA_2$ demeurent nébuleuses, elle semble directement ou indirectement impliquée dans la mémorisation et l'apprentissage. En effet, Fujita et al. (2000) ont démontré qu'une injection de bromoénol lactone (BEL), un inhibiteur spécifique de la $iPLA_2$, dans le cerveau de souris altère leurs capacités d'apprentissage lors d'un test de mémoire spatiale. La récupération des souvenirs semble également affectée par une inhibition réversible de la $iPLA_2$ dans l'hippocampe (Schaeffer & Gattaz, 2007). Ces résultats renforcent la théorie d'une implication de l'activité phospholipasique indépendante du Ca^{2+} dans les processus mnésiques. De plus, l'activité de la $iPLA_2$ se voit altérée de manière importante chez des patients souffrant de la MA (Gattaz et al., 1996; Ross et al., 1998; Talbot et al., 2000). Ainsi, Gattaz et al., (1996) ont rapporté une baisse significative de l'activité $iPLA_2$ dans les cortex frontaux et pariétaux alors que Talbot et al. (2000) ont observé, *post-mortem*, une baisse de l'activité $iPLA_2$ de 38-42% dans le cortex préfrontal. Quant à Ross et al. (1998), ils ont démontré une baisse significative de l'activité PLA_2 indépendante du Ca^{2+} de 35%, 44% et 22% pour les cortex pariétaux, temporaux et les hippocampes, respectivement. Mais est-ce l'activité $iPLA_2$ elle-même qui est indispensable aux mécanismes sous-jacents de la mémoire ou plutôt le produit résultant de son action sur la membrane ?

1.6 L'ACIDE DOCOSAHEXAÉNOÏQUE

Le DHA, principal produit des $iPLA_2$, est un acide gras de la famille des oméga-3 prédominant dans le cerveau des mammifères; il représente à lui seul 12% à 16% de la masse totale de ces composés (Glomset, 2006; Calon

& Cole, 2007). Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études épidémiologiques ont associé des effets bénéfiques à une diète riche en DHA et/ou oméga-3, et ce, principalement au niveau du coeur et du système nerveux central (Chrysohoou et al., 2007; Kotani et al., 2006; Connor & Connor, 2007). Malgré le fait que notre cerveau présente une importante quantité de cet acide gras, une hausse significative de la teneur diététique quotidienne suffit, à elle seule, à altérer sa concentration dans le cerveau (Calon & Cole, 2007). Comme les iPLA₂, le DHA est nécessaire à la structure de la membrane plasmique et il influence les processus de transports cellulaires. Il exerce également un effet indéniable sur la fluidité membranaire en modifiant ses propriétés biophysiques (Youdim et al., 2000).

Un faible taux de DHA a été rapporté chez des patients MA (Soderberg et al., 1991; Conquer et al., 2000; Tully et al., 2003) et cette déficience est liée à des déficits d'apprentissage chez les rongeurs (Takeuchi et al., 2002; Catalan et al., 2002; Fedorova & Salem, 2006). Il a donc été proposé qu'une diète pauvre en DHA serait corrélée avec l'incidence de démences de type MA (Kalmijn et al., 1997; 2004; Huang et al., 2005; Schaefer et al., 2006). Malgré qu'il soit très attrayant, ce constat ne fait pas consensus. Ainsi, Arendash et al., (2007) ont récemment montré qu'une diète riche en oméga-3 ne semble pas améliorer les symptômes liés à la MA chez un modèle transgénique pour l'APP_{K670N,M671L} et la PS1_{6,2}. Cette étude n'est pas la seule à avoir observé un effet non significatif voire absent, Freund-Levi et al., (2006) en sont arrivés à la même conclusion chez l'homme, plus particulièrement pour les stades plus avancés de la maladie. Cette variation des résultats est peut-être due à la diversité des diètes, d'autant plus qu'il est ardu d'estimer la quantité de DHA qui se retrouve réellement, au final, dans le cerveau.

Malgré tout, deux équipes ont démontré qu'une diète riche en DHA réduit l'accumulation de A β et de tau hyperphosphorylé chez des souris

mutées pour l'APP_{SWE} et la PS1_{ΔE9}, ou triples transgéniques (Oksman et al., 2006; Green et al., 2007a). Encore aujourd'hui il est difficile d'affirmer avec certitude qu'une baisse du niveau de SP et des NFT dans les hippocampes et certains cortex aura pour conséquence d'améliorer significativement les facultés mnésiques. Des travaux laissent tout de même croire que la quantité et la localisation de ces deux marqueurs pathologiques est déterminante (Braak & Braak, 1991; Dickson et al., 1995; Caramelli et al., 1998) alors que d'autres favorisent seulement les NFT (Giannakopoulos et al., 2000).

Au niveau des processus inflammatoires, la relâche de DHA par les iPLA₂ diminue la sécrétion des cytokines et la synthèse des métabolites comme les prostaglandines ou les leukotriènes (Farooqui et al., 2007a). Cela a pour conséquence directe de réduire l'inflammation et donc, de protéger les cellules nerveuses lors de conditions extrêmes comme l'épilepsie ou encore l'ischémie (Young et al., 2000; Bas et al., 2007). Le DHA diminue également le stress oxydatif (Yavin et al., 2002; Wu et al., 2004) et l'activation des caspases (Calon et al., 2004, 2005) renforçant l'hypothèse d'un rôle neuroprotecteur. Finalement, l'ajout de DHA dans le milieu de cultures d'hippocampes de rats réduit significativement l'excitotoxicité produite par le glutamate (Wang et al., 2003). Les mécanismes précis d'interaction entre cet acide gras et les récepteurs glutamatergiques restent, toutefois, à être élucidés.

1.7 LES HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Une étude effectuée dans notre laboratoire a démontré que, soumis à l'action d'inhibiteurs des iPLA₂, les neurones de l'hippocampe deviennent plus sensibles aux effets du glutamate (St-Gelais et al., 2004). Cependant, le lien entre ces enzymes et les récepteurs glutamatergiques, acteurs majeurs de la plasticité neuronale sous-jacente aux mécanismes de la mémoire,

demeure obscur. C'est pourquoi, au cours de mes études graduées, nous avons tenté de percer ce mystère. À partir de ce but général, nous avons élaboré des objectifs qui correspondent à ces trois grandes questions :

1) Est-ce que l'inhibition des $iPLA_2$ influence les propriétés des récepteurs au glutamate ? Les courants post-synaptiques excitateurs des récepteurs AMPA sont augmentés suite à une inhibition de la $iPLA_2$ par le BEL (St-Gelais et al., 2004). Plusieurs mécanismes peuvent moduler la transmission de ce type de récepteurs glutamatergiques. Tout d'abord, leur nombre sur la membrane plasmique; un paramètre régulé par les processus cellulaires d'endocytose et d'exocytose (Shepherd & Huganir, 2007). À plus court terme, c'est le niveau de phosphorylation qui influence le temps et le volume de l'ouverture de ces canaux ioniques (Carvalho et al., 2000). La phosphorylation permet également le maintien des récepteurs AMPA sur la membrane via une liaison avec les protéines accessoires et le cytosquelette (Carvalho et al., 2000). Nous avons donc évalué à la fois le taux de phosphorylation des récepteurs AMPA et leur nombre dans les différents compartiments cellulaires suite à une inhibition de la $iPLA_2$ (FIGURE 1.12). Pour ce faire nous avons exploité deux modèles très différents, soit les sections de cerveaux congelés de rats ainsi que les cultures d'hippocampes de type organotypique.

2) L'excitotoxicité des récepteurs glutamatergiques est-elle influencée par l'inhibition des $iPLA_2$ ou son produit préférentiel, le DHA ? Puisque l'inhibition de la $iPLA_2$ augmente la sensibilité des récepteurs AMPA, il est possible qu'elle entraîne, à moyen ou long terme, l'apparition du phénomène d'excitotoxicité. Aussi, tel que mentionné précédemment, le DHA réduit la toxicité induite par un traitement au glutamate (Wang et al., 2003). Nous avons donc vérifié si le BEL et le DHA influencent l'excitotoxicité produite par une application prolongée de l'agoniste spécifique aux récepteurs AMPA seulement et ce, dans un modèle « vivant » : les cultures d'hippocampes.

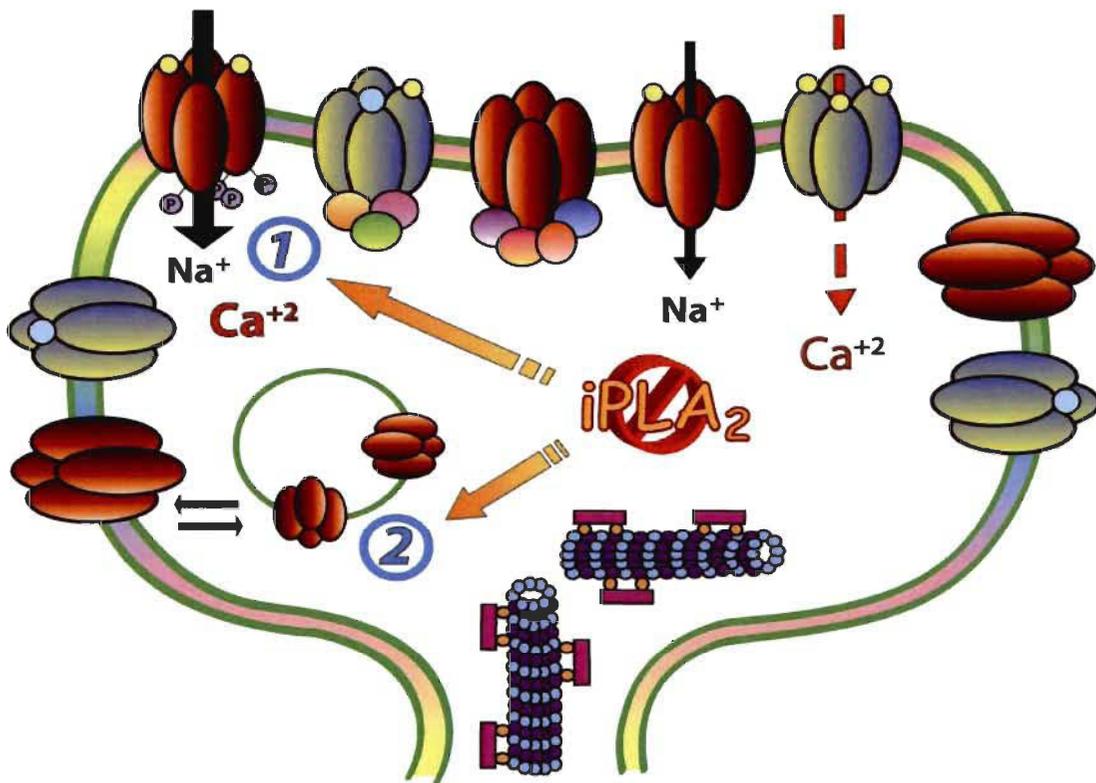


FIGURE 1.12 : Est-ce que l'inhibition de la iPLA₂ influence les récepteurs AMPA ? Afin de vérifier cette hypothèse 1) le niveau de phosphorylation des récepteurs membranaires et 2) le nombre de récepteurs présents dans les compartiments cellulaires ont été évalués.

3) Est-ce qu'une inhibition des iPLA₂ accélère l'apparition des marqueurs pathologiques de la MA ? Il a été démontré que le DHA retarde l'apparition des déficits mnésiques, un symptôme caractéristique de la MA (Calon et al., 2004; Hashimoto et al., 2005; Cole & Frautschy, 2006; Kotani et al., 2006). Étant donné que les iPLA₂ sont responsables de la relâche de cet acide gras, un dysfonctionnement de leur activité pourrait faciliter l'apparition prématurée de marqueurs pathologiques notamment l'hyperphosphorylation de tau. Nous avons examiné cette possibilité par un projet impliquant des souris transgéniques tau_{P301L} en collaboration avec le Dr. Xiaoning Bi de la *Western University of Health Sciences* (Pomona, USA).

Le chapitre suivant est consacré aux méthodologies spécifiques aux projets réalisés. Les cinq chapitres subséquents, qui représentent le fruit d'un peu plus de cinq années de travail, sont autant d'articles publiés ou soumis qui regroupent l'ensemble des résultats obtenus afin de répondre aux trois grandes questions énoncées. Finalement, une discussion qui comporte une réflexion ainsi que plusieurs hypothèses quant aux futures avenues de recherche possibles complète cette thèse.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les protocoles expérimentaux utilisés pour répondre aux grands objectifs précédemment énoncés sont standards et décrits en détail dans les articles qui constituent le coeur de cette thèse. Il est cependant nécessaire d'apporter quelques précisions quant aux inhibiteurs de PLA₂ et aux systèmes utilisés. De plus, les généralités concernant les différentes techniques de purification, moins courantes, seront exposées dans les sections subséquentes.

2.1 LES INHIBITEURS DE PLA₂

Beaucoup d'études portant sur les PLA₂ ont été effectuées avant la découverte de plusieurs isoformes et avec l'aide d'inhibiteurs peu spécifiques. À titre d'exemple, le bromophenacyl bromide est en mesure d'inhiber autant les PLA₂ intracellulaires que sécrétées (Balsinde et al., 1999). Cependant, afin de mieux discerner le rôle des multiples isoformes de PLA₂, un arsenal de produits pharmacologiques de plus en plus précis a été développé.

L'inhibiteur le plus utilisé pour cibler les iPLA₂ est le BEL (IC₅₀ = 0.1-1 µM) puisque son action est irréversible en plus d'être très spécifique (Farooqui et al., 1999). Celui-ci agit sur l'enzyme en s'insérant directement dans son site catalytique. Récemment, Jenkins et al. (2002) ont isolé, par chromatographie liquide à haute pression, deux énantiomères de ce composé : le (R)-BEL et le (S)-BEL (FIGURE 2.1). Ces énantiomères montrent une remarquable spécificité pour la iPLA₂γ et iPLA₂β respectivement. Ils ont donc été utilisés dans nos travaux pour distinguer l'isoforme responsable des effets observés. En plus, il a été rapporté que le BEL, dans sa forme racémique, peut interagir avec une autre enzyme clé du

métabolisme phospholipidique la « magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase-1 (PAP-1) » à une concentration supérieure à 8 μM (Balsinde & Dennis, 1996b). Enfin, un autre inhibiteur de la $i\text{PLA}_2$, réversible cette fois, a été exploité, le palmityl trifluorométhyl ketone (PACOCF₃, IC₅₀ = 3.8 μM), et ce, pour confirmer les effets du BEL et de ses énantiomères.

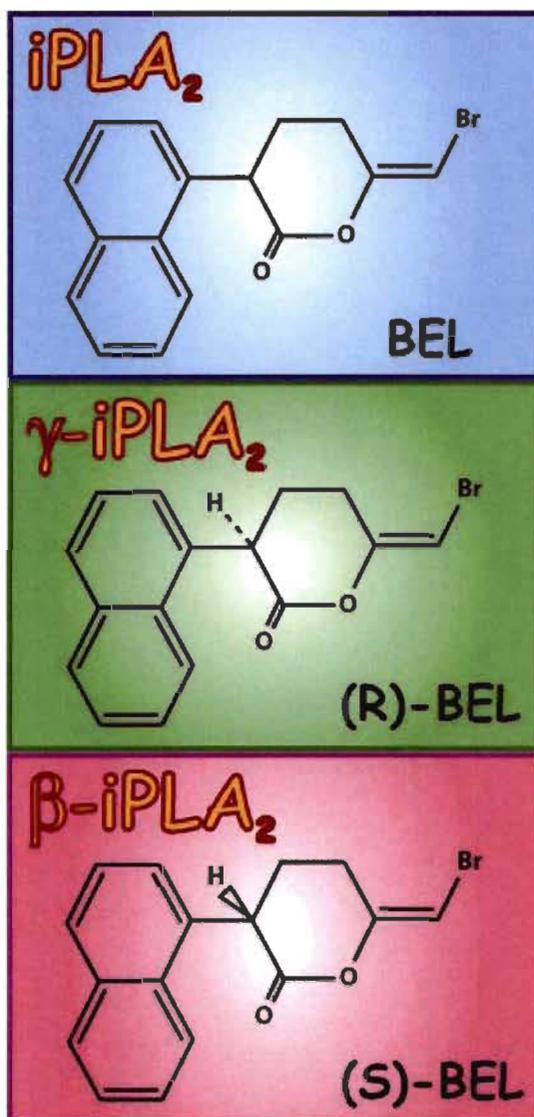


FIGURE 2.1 : Les inhibiteurs de $i\text{PLA}_2$. Le BEL sous forme racémique inhibe irréversiblement les deux isoformes de $i\text{PLA}_2$. L'énantiomère (R)-BEL est spécifique à la $i\text{PLA}_2$ - γ alors que le (S)-BEL l'est pour la $i\text{PLA}_2$ - β .

Des traitements avec un inhibiteur spécifique de la cPLA₂, l'arachidonyl trifluorométhyl ketone (AACOCF₃, IC₅₀ = 2.5 μM) ont aussi été effectués afin d'évaluer si les récepteurs au glutamate ne sont sensibles qu'à l'action des iPLA₂ dans nos conditions. Toutefois, il est important de souligner qu'à forte concentration, soit plus de 15 μM, l'AACOCF₃ peut inhiber non seulement la cPLA₂ mais également les iPLA₂ (Farooqui et al., 1999).

2.2 LES SYSTÈMES

Dans le cadre de nos travaux, les protocoles expérimentaux ont été appliqués suite à des traitements sur deux systèmes très différents soit des sections de cerveaux congelés et des cultures d'hippocampes de type organotypique. Dans le premier cas, seuls des rats adultes ont été utilisés alors que des ratons et des souris ont permis la mise au point et l'exploitation des cultures.

2.2.1 Les sections de cerveaux congelés

Depuis l'avènement des microtomes à la fin du XIX^{ème} siècle, les sections de cerveaux congelés sont devenues des outils incontournables pour les recherches en neuroscience. Elles permettent généralement la réalisation d'expérimentations liées à l'immunohistochimie; c'est-à-dire cibler des protéines d'intérêt sur un tissu congelé à l'aide d'anticorps spécifiques à celles-ci. Dans le cas présent, nous avons plutôt traité les sections de cerveaux de rats avec les inhibiteurs de PLA₂ pour ensuite récupérer et homogénéiser le tissu. Il s'avère moins coûteux de débiter un projet avec des sections congelés puisque plusieurs concentrations d'inhibiteurs et temps d'incubation peuvent être testés sur un même cerveau, ce qui n'est pas le cas si les composés sont injectés chez un animal vivant. Cela nous a permis

d'évaluer, par immunobuvardage de type Western, l'effet d'une altération de l'activité de ces enzymes sur les sous-unités composant les récepteurs AMPA et NMDA et leur niveau de phosphorylation (Ménard et al., 2005a). Nous avons aussi ciblé un mécanisme impliquant la protéine kinase C (PKC) puisque son action est perturbée lors de l'inhibition spécifique de la iPLA₂ (Ménard et al., 2005b). Cette enzyme s'avère déterminante pour la fonctionnalité des récepteurs AMPA et NMDA et elle est directement liée aux processus sous-jacents à la plasticité cellulaire de la LTP (Lee, 2006).

Nous avons aussi tiré profit des sections congelées et de la technique d'autoradiographie pour quantifier avec plus de précision les récepteurs glutamatergiques. Ainsi, à l'aide de ligands radioactifs marqués au tritium comme le ³H-AMPA par exemple, nous avons estimé leur nombre mais surtout leur localisation dans les différentes régions du cerveau (Ménard et al., 2005a). Contrairement à l'immunobuvardage de type Western qui est considéré comme un protocole semi quantitatif, l'autoradiographie s'effectue à l'aide d'étalons radioactifs ce qui donne une évaluation approximative beaucoup plus fiable. Globalement, ces techniques ont permis de répondre au premier objectif énoncé dans la section précédente.

2.2.2 Les cultures d'hippocampes de type organotypique

Suite aux résultats obtenus avec les cerveaux congelés, nous nous sommes tournés vers les cultures d'hippocampes de type organotypique. Mis au point par Stoppini et al. (1991), ce procédé consiste à maintenir en culture fermée des tranches d'hippocampe préparées suite à une extraction à partir de cerveaux de rats ou de souris. Ce type de culture s'avère idéal pour les travaux impliquant des traitements à moyen et/ou long terme puisqu'il respecte au fil du temps et ce, à l'instar du tissu intact, les processus de transmission et de plasticité synaptique (Stoppini et al., 1991). Il est

constitué des neurones, des astrocytes et de la microglie ce qui en fait un modèle plus représentatif de la réalité que la culture primaire de neurones seulement. De plus, les régions spécifiques de l'hippocampe demeurent bien définies ce qui facilite leur identification. Il est enfin possible d'obtenir des résultats, suite aux traitements, en exploitant des protocoles très variés – fluorescence, immunohistochimie, électrophysiologie, biochimie, mort cellulaire, etc. (Stoppini et al., 1991; Vornov et al., 1991; Zimmer et al., 2000). Cela permet d'explorer sur plusieurs fronts une même problématique. Il ne faut cependant pas surestimer la culture d'hippocampes de type organotypique; elle demeure un tissu *ex vivo* avec les inconvénients classiques que cela implique.

Au cours du dernier projet, soit celui avec les souris transgéniques tau P301L réalisé au laboratoire du Dr. Xiaoning Bi en Californie, la technique de mise en culture des hippocampes s'est avérée un peu différente. Afin de conserver l'intégrité entière de la structure hippocampale, celle-ci a été non pas extraite mais plutôt isolée puis mise en plaque. Les tranches cultivées sont donc constituées d'un hippocampe mais aussi du cortex enthorinal et d'une partie du néo-cortex adjacent à ces régions (Lauterborn et al., 2000). Cette technique est intéressante par rapport à celle utilisée couramment dans notre laboratoire puisqu'elle diminue le stress imposé au tissu lors de la dissection. Elle est également plus simple qu'une extraction complète, un avantage indéniable en tenant compte du fait que le cerveau des souris âgées de cinq à sept jours est très petit et les structures difficilement identifiables comparativement aux rats.

Généralement, c'est-à-dire dans notre laboratoire, ce sont des rats Sprague-Dowley du même âge (cinq à sept) jours qui ont été sacrifiés pour la culture d'hippocampes de type organotypique. C'est à ce moment que les conditions sont idéales pour la dissection; plus tôt les structures sont difficilement identifiables alors que plus tard, le crâne durcit rapidement avec

pour conséquence une extraction plus laborieuse (Stoppini et al., 1991). Toutefois, tel que mentionné précédemment, dessouriceaux transgéniques ont permis la réalisation du dernier projet. Ce modèle de souris transgéniques a été mis au point par Lewis et al. (2000) à partir de la mutation P301L de la protéine tau. Des altérations au gène encodant tau sont en effet caractéristiques de la démence fronto-temporale en plus d'être parfois présentes chez les patients souffrants de la maladie de Parkinson. Plus précoce que la MA, cette forme spécifique de démence est qualifiée de « frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, FTDP-17 ». Elle est la deuxième forme de maladie neurodégénérative la plus courante après la MA (Lynch et al., 1994; Pasquier et al., 1999). L'expression chez des souris transgéniques de la forme humaine de tau contenant la mutation P301L, la plus commune de la FTDP-17, provoque des déficits moteurs, des altérations comportementales et la formation de NFT. Ce dernier paramètre est corrélé avec le niveau d'expression du gène; le phénotype se développant à 4.5 mois chez les animaux homozygotes versus 6.5 mois pour les souris hétérozygotes (Lewis et al., 2000). De plus, la forme insoluble de tau retrouvée chez ces animaux migre exactement au même endroit, sur un gel d'électrophorèse, que les protéines tau extraites de cerveaux MA ou FTDP-17 (Lewis et al., 2000). Cette particularité est importante puisque les isoformes de tau phosphorylées ne sont pas les mêmes selon les pathologies. Par exemple, lors de la MA, les six isoformes présentent une hyperphosphorylation (Buée & Delacourte, 1999). Dans le cas de la maladie de Pick, une démence caractérisée par une dégénérescence des cortex des lobes frontaux et pariétaux, seulement les isoformes contenant trois domaines de liaison aux microtubules sont hyperphosphorylées (Buée & Delacourte, 1999). Les souris transgéniques tau_{P301L} représentent donc un bon modèle pour évaluer les effets d'une inhibition de la iPLA₂ sur l'évolution d'un des marqueurs caractéristiques de MA.

Pour confirmer les résultats tirés des sections de cerveaux congelés, nous avons d'abord traité les cultures d'hippocampes avec les énantiomères de BEL à court puis à moyen terme. Les concentrations d'inhibiteurs idéales ont été déterminées à l'aide de courbes doses-réponses tout comme les temps d'incubation. Par la suite, une évaluation du nombre et du niveau de phosphorylation des récepteurs au glutamate a été effectuée par immunobuvardage de type Western (1^{ère} hypothèse). Aussi, nous avons induit une excitotoxicité par le biais des agonistes des récepteurs au glutamate, ce qui nous a permis de répondre à la question liée au deuxième objectif. À l'aide du propidium iodide (PI) et du dosage de la lactate déshydrogénase (LDH), deux marqueurs de dégénérescence, nous avons quantifié la mort cellulaire dans notre système en comparant les hippocampes traités à des hippocampes contrôles non traités (Ménard et al., 2007). Les protocoles expérimentaux de ces deux dernières techniques étant décrits en détail dans le troisième et le quatrième article il n'est pas vraiment nécessaire d'élaborer plus en profondeur dans cette section.

Les mêmes techniques d'immunobuvardage de type Western et de marquage de la mort cellulaire avec le PI et le dosage de la LDH ont été appliquées suite à un traitement avec le DHA ou l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (Ménard et al., sous presse dans le « Journal of Neuroscience Research »). Nous avons ainsi vérifié la possibilité d'une interaction entre ces acide gras de la famille des oméga-3 et les récepteurs du glutamate, ce qui pourrait expliquer la diminution de la toxicité de ce NT suite à un traitement préliminaire avec le DHA (Wang et al., 2003).

Finalement, dans le cadre du dernier projet, nous avons exploité principalement l'immunobuvardage de type Western sur des homogénats mais également l'immunofluorescence et la microscopie confocale pour identifier les régions hippocampales affectées par l'inhibition de la iPLA₂. Nous avons déterminé, chez les cultures d'hippocampes de souris

transgéniques, les effets du (R)-BEL sur la phosphorylation de tau ainsi que l'activation de kinases liées à son activation et sa synthèse. Enfin, la mort cellulaire a été quantifiée, encore une fois, par le dosage de la LDH (Ménard et al., soumis à « Neurobiology of Aging »). Cette collaboration, assujettie à un stage à l'étranger, a permis la réalisation du dernier objectif soit estimer l'impact d'un dysfonctionnement de l'activité iPLA₂ sur l'apparition d'un marqueur pathologique de MA, dans le cas présent l'hyperphosphorylation de tau.

2.3 LE DOSAGE BIOCHIMIQUE DES RÉCEPTEURS AU GLUTAMATE

L'analyse biochimique du niveau de sous-unités des récepteurs glutamatergiques de la fraction membranaire ou de l'homogénat du tissu traité permet, en comparaison avec un tissu contrôle, un dosage semi quantitatif de leurs proportions synaptiques ou totales, respectivement. Elle est généralement réalisée à l'aide de la technique d'immunobuvardage de type Western, un protocole depuis longtemps bien établi (Laemmli, 1970; Towbin et al., 1979) et routinier dans la majorité des laboratoires. Les conditions expérimentales sont décrites en détail dans les différents articles alors il est inutile de les répéter ici. Cependant, divers protocoles de purification ont été préalablement exploités, dépendamment de l'angle d'attaque choisi, pour parvenir à une meilleure compréhension de la problématique. Chacun d'eux est succinctement exposé dans les paragraphes suivants.

2.3.1 Le fractionnement cellulaire par centrifugation

Comme son nom l'indique, cette technique permet de séparer les composantes cellulaires en fonction de leur taille et ce, en trois étapes

consécutives tel que décrit par Henley (1995). Le tissu frais est tout d'abord broyé puis homogénéisé mécaniquement. Si des analyses biochimiques sont effectuées directement sur cet échantillon on parle alors d'homogénat. Le fractionnement cellulaire débute, quant à lui, par une centrifugation brève et lente, soit de 10 minutes à 1 000g. Elle permet de sédimenter les grosses organelles comme le noyau, le réticulum endoplasmique ou encore l'appareil de Golgi. Par la suite, le surnageant est récupéré et centrifugé pendant 20-30 minutes à 11 500g. Le culot résultant est défini comme la fraction P2; celle-ci contient la membrane plasmique en plus de toutes les protéines transmembranaires, comme les récepteurs au glutamate, qui la composent. Finalement, il est possible de purifier les vésicules par une ultracentrifugation de 1h30 à 100 000g. La quantité de tissu disponible est cependant parfois trop faible pour obtenir un résultat appréciable. C'est le même constat dans le cas d'une purification avec un détergent comme le triton X-100. Celui-ci permet normalement une séparation de la portion post-synaptique, riche en cholestérol et en rafts lipidiques, du reste de la membrane plasmique. Le matériel résultant est couramment appelé synaptosomes. Puisque la quantité minimale de protéines nécessaire dans le cas des immunobuvardages de type Western avoisine les 10-25 µg, selon les anticorps, il est souvent difficile d'arriver à quelque chose de probant surtout dans le cas des cultures d'hippocampes. Pour les travaux présentés dans cette thèse, nous avons donc comparé les effets d'une inhibition des PLA₂ ou du DHA sur des homogénats et des fractions cellulaires P2 seulement.

2.3.2 L'immunoprécipitation

L'immunoprécipitation est un protocole beaucoup plus spécifique que le fractionnement cellulaire; il permet la séparation d'une protéine bien précise du reste de l'homogénat ou de la fraction P2 (Bettini & Maggi, 1991; Papavassiliou, 1994). En effet, un anticorps correspondant à la protéine

d'intérêt est lié à des billes d'agarose puis mis en contact avec du tissu en solution et ce, pendant toute une nuit à une température de 4°C. Les complexes sont ensuite séparés de la solution par centrifugation, lavés et enfin, le lien bille-anticorps-protéine est brisé par à la fois une solution à faible teneur acide contenant du glycérol, du β -mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol et une incubation dans de l'eau bouillante pour cinq minutes. Afin de visualiser les protéines d'intérêt purifiées, celles-ci sont déposées sur un gel d'électrophorèse puis soumises à un immunobuvardage de type Western. Cette technique permet principalement de caractériser les propriétés de protéines plus difficiles à détecter avec un marquage biochimique traditionnel. Dans le cas présent, il s'agit du niveau de phosphorylation des sous-unités des récepteurs AMPA et NMDA. Malgré la purification préalable par fractionnement cellulaire, la proportion de récepteurs glutamatergiques demeure peu élevée par rapport à l'ensemble des protéines de la fraction P2. De plus, ce ne sont pas tous les récepteurs qui sont phosphorylés sur les sites d'intérêt, il devient alors plus judicieux de séparer d'abord les sous-unités visées du reste de la solution pour ensuite mieux les caractériser.

2.3.3 La biotinylation

Cette technique représente une alternative intermédiaire si elle est comparée avec les précédentes; elle permet la purification non pas de protéines spécifiques mais plutôt celles localisées à un endroit précis : la membrane plasmique. La biotine, utilisée sous la forme « NHS-SS-biotin », est un agent qui ne peut traverser la membrane cellulaire en raison de sa faible solubilité aqueuse. Il englué littéralement tout ce qui se trouve à la surface membranaire en se liant aux amines primaires des portions N-terminales des protéines présentes (Hall et al., 1997; Holman et al., 2007). Une simple incubation de 30 minutes à la température de la pièce suffit pour

une action optimale. L'excès est ensuite lavé en présence d'éthanolamine, un composé qui bloque la biotine non liée. Les récepteurs glutamatergiques fixés sont alors purifiés par fractionnement cellulaire et solubilisés. Une incubation avec des billes de streptavidine permet de récupérer les protéines biotinylées et ces dernières sont séparées de la biotine de la même manière que pour l'immunoprécipitation, soit à l'aide d'une solution légèrement acide contenant du glycérol, du β -mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol en plus d'un plongeon dans l'eau bouillante pour quelques minutes. Un immunobuvardage de type Western a finalement permis de révéler les récepteurs au glutamate présents uniquement à la surface membranaire. Ces résultats sont complémentaires à ceux des protocoles expérimentaux précédents. Ils permettent donc de confirmer les effets observés et ce, par une technique complètement indépendante.

CHAPITRE III

AMPA RECEPTOR PHOSPHORYLATION IS SELECTIVELY REGULATED BY CONSTITUTIVE PHOSPHOLIPASE A₂ AND 5-LIPOXYGENASE ACTIVITIES

Caroline **MÉNARD**[†], Barbara **VALASTRO**[†], Marc-André **MARTEL**[†], Émilie
CHARTIER[†], Audrey **MARINEAU**[†], Michel **BAUDRY**[‡] and Guy
MASSICOTTE[†]

[†] Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières
Trois-Rivières, Québec, Canada

[‡] Neuroscience Program, University of Southern California
Los Angeles, California, USA

Running title: Phospholipase A₂ involvement in GluR1 phosphorylation

Number of pages: 39; Figures: 8

Number of words: 8,657

Corresponding author address:

Guy Massicotte

Département de chimie-biologie
U.Q.T.R.

C.P. 500, Trois-Rivières

Québec, Canada G9A 5H7

Phone (819) 376-5053

Fax (819) 376-5084

E-mail: Guy_Massicotte@uqtr.ca

Key words: Lipase, arachidonic acid, glutamate receptors, GluR1,
hippocampus

3.1 RÉSUMÉ

Cet article rapporte, pour la première fois, une modulation du niveau de phosphorylation des récepteurs au glutamate de type AMPA par l'activité de la $iPLA_2$. En effet, la pré-incubation de sections de cerveaux congelés avec deux inhibiteurs spécifiques, soit le BEL et le PACOCF₃, a produit une hausse de la phosphorylation des sites Ser831 et Ser845 des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA. Cet effet n'a pas été associé à un changement de phosphorylation des sous-unités des récepteurs NMDA ou reproduit par un inhibiteur spécifique à la $cPLA_2$. Cela suggère que les effets de ces inhibiteurs sont uniques aux sous-unités GluR1 et dépendants de l'activité $iPLA_2$ seulement. La capacité de ces composés d'influencer le niveau de phosphorylation de GluR1 a été reproduite par le MK-886, un inhibiteur spécifique à la 5-lipoxygénase (5-LO). Des composés bloquant la 12-LO ou encore les cyclooxygénases se sont avérés, quant à eux, sans effet. Des expérimentations supplémentaires ont permis de déterminer que la coupure des sous-unités GluR1 induite par les calpaines, des protéases activées par le Ca^{2+} , est aussi réduite par les inhibiteurs de $iPLA_2$. Cette altération n'a cependant pas été corrélée avec un changement au niveau de la distribution des récepteurs AMPA dans les différents compartiments cellulaires. Toutefois, des analyses effectuées à l'aide de l'autoradiographie quantitative ont montré une augmentation de la liaison du 3H -AMPA dans la région CA1 de l'hippocampe chez les coupes préalablement traitées avec le BEL. Les courbes cinétiques de saturation ont révélé que la hausse de liaison observée est provoquée par un accroissement du nombre de sites de liaison des récepteurs AMPA. Dans l'ensemble, ces résultats soulèvent le fait que l'activité $iPLA_2$ régule, possiblement via la génération de métabolites de la 5-LO, la phosphorylation des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA et peut-être également le nombre de récepteurs membranaires, particulièrement dans la région CA1 de l'hippocampe.

3.1.1 Contribution des auteurs de l'article

L'article a été rédigé par Caroline Ménard et le Dr. Guy Massicotte. La Dr. Barbara Valastro a mis au point la technique d'immunoprécipitation, un protocole expérimental appris lors d'un stage au laboratoire du Dr. Michel Baudry. Quant aux co-auteurs Marc-André Martel, Émilie Chartier et Audrey Marineau, ils ont participé à la réalisation des autoradiographies quantitatives. Toutes les autres expériences présentées dans cet article ont été faites par Caroline Ménard.

Ce manuscrit a été publié en 2005 dans le journal *Hippocampus*, volume 15(3), pages 370-380.

3.2 ABSTRACT

The present investigation provides the first indication that constitutive, calcium-independent phospholipase A_2 activity (iPLA₂) modulates phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate (AMPA) subtype of glutamate receptors. Preincubation of frozen-thawed brain sections with two iPLA₂ inhibitors, bromoenol lactone (BEL) or palmitoyl trifluoromethyl ketone (PACO), produced a dose-dependent enhancement in phosphorylation at both Ser831 and Ser845 sites on the GluR1 subunit of AMPA receptors. This effect was not associated with changes in phosphorylation at the Ser sites of either the GluR2/3 subunits of AMPA receptors or the NR1 subunits of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, nor was it reproduced by inhibition of the calcium-dependent form of PLA₂ activity. These results suggest that the effects of these inhibitors are selective to GluR1 subunits and dependent on iPLA₂ activity. The ability of iPLA₂ inhibitors to increase GluR1 phosphorylation was mimicked by the 5-

lipoxygenase (5-LO) inhibitor MK-886 but not by blockers of 12-lipoxygenase (12-LO) or cyclooxygenase. Additional experiments indicated that calcium-mediated truncation of GluR1 subunits was reduced by iPLA₂ inhibitors, an effect that was not correlated with overall changes in the distribution of AMPA receptors between intracellular and membrane compartments prepared from whole brain sections. However, quantitative autoradiographic analysis indicated enhanced ³H-AMPA binding to the CA1 stratum radiatum of the hippocampus in BEL-treated sections. Saturation kinetics experiments demonstrated that this binding augmentation was due to an increase in the maximal number of AMPA binding sites. Altogether, our results point to the conclusion that basal iPLA₂ activity, through the generation of 5-LO metabolites, regulates AMPA receptor phosphorylation of GluR1 subunits, an effect that might selectively influence the number of membrane receptors in area CA1 of the hippocampus.

3.3 INTRODUCTION

Excitatory synapses in the brain release glutamate, which activates primarily two types of ionotropic receptors, alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate (AMPA) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Considerable evidence has been accumulated over the last 20 years supporting the notion that changes in the strength of synaptic efficacy between neurons, which are widely assumed to underlie learning and memory, result from the activation and subsequent regulation of glutamate receptors through some intracellular cascades triggered by receptor stimulation (Lamprecht and LeDoux, 2004). In the hippocampus, for example, the levels of postsynaptic calcium influx achieved with different degrees of NMDA receptor activation after various patterns of electrical stimulation are considered to be crucial for bi-directional modification of synaptic efficacy. Specifically, brief, high levels of calcium influx through NMDA receptors,

resulting from high-frequency stimulation, activate various calcium-dependent enzymes, including protein kinases and proteases that are responsible for generating long-term potentiation (LTP), a well-known experimental model of learning and memory (Baudry and Lynch, 2001). Conversely, low but more prolonged NMDA-mediated calcium influx, resulting from longer periods of low-frequency stimulation, has been proposed to stimulate protein phosphatases and to lead to long-term depression (LTD) of synaptic responses (Malenka, 1994; O'Dell and Kandel, 1994; Wang and Kelly, 1996; Massicotte, 2000). The phosphatases generally implicated in the formation of hippocampal LTD are calcium-independent phosphatase 1 and the calcium/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin (Mulkey et al., 1993; Mulkey et al., 1994). A critical role for protein kinases in synaptic plasticity has been confirmed by gene knockout experiments, as it has been shown that activation of γ -subunit of calcium/calmodulin kinase II (CaMKII) and of protein kinase C- γ (PKC- γ) are important for LTP formation (Silva et al., 1992; Abeliovich et al., 1993), results consistent with the observations that synaptic potentiation produces constitutive activation of both CaMKII and PKC (Akers et al., 1986; Barria et al., 1997). The additional finding that intracellular perfusion of constitutively-active CaMKII not only increases AMPA receptor-mediated synaptic transmission but also occludes LTP strongly supports a direct role for CaMKII in synaptic plasticity (Lledo et al., 1995).

The targets of the kinases responsible for mediating synaptic plasticity have been recently the source of considerable investigation. In particular, Ser831 of the GluR1 subunit of AMPA receptors, a consensus site for CaMKII phosphorylation, is phosphorylated after LTP induction (Lee et al., 2000). Ser831 phosphorylation increases the single-channel conductance of GluR1 receptors, an effect that could account for changes in the shape and size of excitatory postsynaptic currents (EPSCs) accompanying LTP (Derkach et al., 1999). However, several reports have shown that insertion of new receptors at the membrane surface may also play an important role in LTP expression,

a phenomenon that might be protein kinase A (PKA)-dependent (Nayak et al., 1998). In fact, recent studies suggest that PKA-mediated phosphorylation of Ser845 of GluR1 occurs during synaptic potentiation (Lee et al., 2000; Esteban et al., 2003), while mutations at Ser845 were found to impair delivery of GluR1 to synapses by active CaMKII or LTP (Malinow, 2003). Malinow (2003) has proposed a molecular model in which PKA phosphorylation at Ser845 would set the number of AMPA receptors that are available for incorporation and/or stabilizes synaptically-located receptors, while CaMKII activation would trigger biochemical processes, possibly mediated by Ras signaling, required for the insertion of new membrane receptors (Esteban et al., 2003). On the other hand, recent evidence indicates that, in contrast to GluR1 phosphorylation, PKA-mediated phosphorylation of GluR2 at Ser880 modulates synaptic transmission by promoting receptor internalisation, an effect that could contribute to LTD formation in both the hippocampus and cerebellum (Chung et al., 2003; Seidenman et al., 2003).

Besides these phosphorylation pathways, additional mechanisms have been proposed to participate in AMPA receptor regulation during synaptic plasticity. For example, calcium-dependent phospholipase A₂ (cPLA₂) enzymes, which initiate the arachidonic acid (AA) signaling cascade by acting on membrane phospholipids, have been proposed to modulate AMPA receptor properties during both LTP and LTD expression (Massicotte, 2000). However, because the main constitutive PLA₂ activity in the hippocampus is calcium-independent (Yang et al., 1999), other forms of PLA₂ might be responsible for controlling synaptic transmission. In this regard, St-Gelais et al. (2004) have demonstrated that injection of inhibitors of the calcium-independent form of PLA₂ (iPLA₂) into postsynaptic CA1 pyramidal neurons generated a gradual and robust enhancement in the amplitude of AMPA receptor-mediated EPSCs. This effect was specific to AMPA receptors relative to NMDA receptors, and occurred without presynaptic changes in

transmitter release, as indicated by the lack of effects of the inhibitors on paired-pulse facilitation.

A growing body of evidence suggests the possible involvement of iPLA₂ in learning and memory (Fujita et al., 2000), as well as in neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease and schizophrenia (Ross et al., 1998; Ross et al., 1999). In several cell types, iPLA₂ plays a key role in cellular fatty acid uptake and remodelling of membrane phospholipids (Balsinde and Dennis, 1997), and might contribute to membrane-trafficking events required along both the endocytic and exocytic pathways (Brown et al., 2003) as indicated by the effects of iPLA₂ inhibitors on membrane fusion (Mayorga et al., 1993; Takuma and Ichida, 1997) and tubule formation in the Golgi complex (de Figueiredo et al., 1998; Kuroiwa et al., 2001). In addition, protein phosphorylation by various kinases (Kalyankrishna and Malik, 2003) and reorganization of actin networks (Provost et al., 2001) might be under the influence of lipoxygenase (LO)-derived metabolites of AA in numerous cell types. For instance, LO products of AA metabolism activate extracellular signal-regulated kinases (ERK) through pertussis toxin (PTX)-sensitive G-proteins (G_i/G_o) (O'Flaherty et al., 1996; Capodici et al., 1998) and PKC- and ERK-dependent pathways (MacIntyre and Pope, 1991; Chen et al., 1994; Harder et al., 1995; Lepley and Fitzpatrick, 1996; Capodici et al., 1998; Chen et al., 1999; Szekeres et al., 2000; Boden et al., 2001; Raso et al., 2001).

To better understand the contribution of these processes to AMPA receptor regulation, we investigated the effects of inhibitors of iPLA₂ and pathways of AA metabolism on AMPA receptor phosphorylation. Here, we report that constitutive iPLA₂ activity, possibly through the production of specific LO-derived metabolites, modifies AMPA receptor phosphorylation. The results indicate that among several agents known to interfere with AA formation and metabolism, only iPLA₂ and 5-LO inhibitors of AA produce

selective changes in AMPA receptor phosphorylation at both Ser831 and Ser845 phosphorylation sites of GluR1.

3.4 MATERIALS AND METHODS

3.4.1 Animals and tissue preparation

Male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Canada (St-Constant, Quebec) at 1 month of age (100-125 g) and used 1 week after their arrival. The animals were kept in individual cages under a 12:12-h light-dark cycle in a facility that met laboratory standards (NIH Publication No. 86-23, revised 1985) as well as Canadian Council on Animal Care guidelines. They had access to standard chow and water ad libitum. The rats were anesthetised by isoflurane inhalation (AERRANE®; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), and their brains were quickly removed for freezing in isopentane (methyl butane) at -20°C . Horizontal 10-30- μm thick sections were cut in a cryostat, thaw-mounted onto chrome-alum-gelatin-coated slides, and stored at -70°C until their utilisation.

3.4.2 Electrophoresis and immunoblotting

Three adjacent sections (30- μm thick) at the level of the dorsal hippocampus were placed on one slide to obtain enough tissue for Western blots. Sections were preincubated for 60 min in 45 mL of Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100 μM ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) N,N,N'-tetraacetic acid (EGTA) at 35°C with or without PLA₂ inhibitors. Tissue was collected in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4) containing 100 μM EGTA, 0.32 M sucrose and several protease inhibitors (leupeptin 5 μM , phenylmethylsulfonyl fluoride 200 μM , and N-tosyl-L-phenylalanine

chloromethyl ketone 1 µg/mL, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario), then homogenized with a glass-Teflon homogenizer, and centrifuged to obtain membrane fractions (Henley, 1995). Briefly, homogenates were centrifuged at 1,000xg for 10 min, and the supernatants were centrifuged at 11,500xg for 20 min. The resulting pellet, P2, was defined as the crude synaptosomal fraction. Pellet P3, obtained by supernatant centrifugation at 100,000xg for 90 min, was defined as the microsomal fraction. The P2 and P3 fractions were resuspended in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4, with the same concentrations of inhibitors as above), and protein levels in each fraction were measured by Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario).

Western blot analysis was conducted on aliquots of crude synaptosomal (P2) and microsomal (P3) fractions obtained from both control and PLA₂ inhibitor-treated sections. Aliquots were subjected to sodium dodecyl sulfate-8% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to the method of Laemmli (1970). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, as described previously (Towbin et al., 1979). To block nonspecific sites, the membranes were first incubated for 1 h at room temperature in phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% dry non-fat milk. They were then incubated with primary antibodies directed against glutamate receptor subunits GluR1 (0.5 µg/mL), phospho-GluR1 Ser831 (0.5 µg/mL), phospho-GluR1 Ser845 (0.5 µg/mL), GluR2/3 (0.5 µg/mL) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), GluR2 (0.5 µg/mL), phospho-GluR2/3 Ser880/891 (0.5 µg/mL), NR1 (0.5 µg/mL), phospho-NR1 Ser896/897 (0.5 µg/mL) and NR2A (0.5 µg/mL) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in PBS containing non-fat milk. Bands corresponding to the GluR and NR subunits were detected with peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) and a chemi-luminescent peroxide substrate (MJS Biolynx, Brockville, Ontario). Negative controls were prepared under the same labelling procedure, but with the primary antibody omitted. The immunoblots

were placed on a Northern light illuminator, and computer-generated images were analyzed semiquantitatively by densitometry with a microcomputer imaging device (Imaging Research, MCID, St. Catherines, Ontario) providing peak areas and apparent molecular weight.

3.4.3 Immunoprecipitation

To obtain enough phosphorylated subunits for Western blot detection, samples were immunoprecipitated. Adjacent sections (30 μm) were preincubated for 60 min in 45 mL of Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100 μM EGTA at 35°C with or without PLA₂ or other enzyme inhibitors. As described previously, tissues were collected, homogenized and centrifuged to obtain crude synaptosomal fractions (P2). The fractions were resuspended in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4, with the same concentrations of inhibitors as above), and protein levels in each fraction were measured with the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories). 200 μg of synaptic membranes were used for immunoprecipitation for each experimental condition (Bettini and Maggi, 1991; Papavassiliou, 1994).

P2 pellets were resuspended in 150 μL of lysis buffer (Tris/HCl 100 mM, 100 μM EGTA, pH 7.4) containing 1% SDS and heated at 100°C for 5 min, followed by dilution in 600 μL of cold lysis buffer containing 2% Triton X-100. Insoluble materials were removed by centrifugation at 15,000xg for 30 min. Protein A-agarose or Protein G-agarose (Upstate Biotechnology) and antibody mixtures (5 μL) were added to the supernatant and incubated overnight with agitation at 4°C. Immunoreactive complexes were recovered by brief centrifugation, and the pellets were washed with lysis buffer (containing 2% Triton X-100). Proteins were finally eluted in 4x sample buffer containing 2% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, and 0.1% bromophenol blue, and heated at 100°C for 5 min.

Immunoprecipitated proteins were subjected to SDS-PAGE, using polyacrylamide gels (see Electrophoresis and immunoblotting section).

3.4.4 Quantitative and qualitative ^3H -AMPA receptor autoradiography in rat brain sections

For autoradiography, horizontal adjacent brain sections (10 μm) were preincubated at 35°C for 60 min in 45 ml of Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100 μM EGTA with or without iPLA₂ or other enzyme inhibitors. After washing in Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100 μM EGTA, sections were processed for AMPA receptor binding, as described previously (Tocco et al., 1992). In brief, brain sections were incubated for 45 min at room temperature in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4, 100 μM EGTA) containing 50 mM potassium thiocyanate and 150 nM ^3H -AMPA (specific activity 53 Ci mmol⁻¹, Perkin-Elmer, Woodbridge, Ontario). Nonspecific binding was defined as binding measured in the presence of 5 mM glutamate. At the end of incubation, the sections were rinsed twice in Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4, 100 μM EGTA) for 10 s and once for 5 s in the same buffer (diluted twice), followed by three dips in distilled water. They were then dried rapidly under a stream of warm air and used for autoradiography.

Dried sections as well as tritium (^3H) standards (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO) were exposed to tritium-sensitive film (Amersham Hyperfilm, Uppsala, Sweden) for 14 days. The films were developed in Devalex M developer and fixer (Champion Photochemistry Limited, Mississauga, Ontario), placed on a Northern light illuminator to transmit light through the autoradiographs, and computer-generated images were obtained with a standard monochrome video camera (Sony XC-77) mounted on a Kaiser copy stand. Digitized images of ^3H -AMPA binding were processed for

optical density (OD) measurements with a microcomputer imaging device (Imaging Research, MCID). OD measurements in the different hippocampal regions were converted to radioactive units (pmol/mg of tissue), derived from a calibration curve (i.e., OD vs pmol/mg of tissue) generated by external ^3H -standards. In the present investigation, ^3H -AMPA binding in various hippocampal regions (i.e., experimental samples) was expressed as absolute values or as percentage increases over basal binding determined in control sections. It should be noted that binding measurements in a given animal never exceeded 10% of the average value (eight measurements per animal).

3.4.5 Drugs

The iPLA₂ inhibitors (Farooqui et al., 1999) bromoenol lactone (BEL, IC₅₀, 0.1-1.0 μM) and palmitoyl trifluoromethyl ketone (PACO, IC₅₀, 3.8 μM), the cPLA₂ inhibitor arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACO, IC₅₀, 8 μM), the cyclooxygenase (COX) inhibitor indomethacin (IC₅₀, 0.1 μM), the 12-LO inhibitor baicalein (IC₅₀, 0.2-9.5 μM) and the 5-LO inhibitor MK-886 (IC₅₀, 1 μM) were purchased from BIOMOL Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA). All other chemical reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Stock solutions of inhibitors were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) for a final incubation concentration of 0.2% DMSO and stored at -20°C.

3.4.6 Statistical analysis

In all cases, data are presented as means \pm S.E.M. Differences in subunit composition or phosphorylation were analysed by the two-tailed *t*-test for independent samples. For differences in receptor binding and immunoreactivity (dependent variables), groups and hippocampal regions

(independent variables) were compared by ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc analysis with conventional criteria of statistical significance: p values < 0.05 .

3.5 RESULTS

3.5.1 iPLA₂, but not cPLA₂ inhibitors, increase GluR1 phosphorylation in rat brain sections

Two major cytosolic forms of PLA₂ activities have been characterized in neurons. iPLA₂ predominates in the brain, whereas cPLA₂ is known to be enhanced after NMDA receptor stimulation (Massicotte, 2000). Because inhibitors of iPLA₂ activity produced increased AMPA-mediated responses in CA1 pyramidal cells as well as changes in phosphorylation/dephosphorylation reactions in several cell types, we first determined the influence of this PLA₂ system on AMPA receptor phosphorylation. To inhibit endogenous iPLA₂ activity, brain sections were incubated with escalating concentrations of BEL, an irreversible blocker of iPLA₂ (Fig. 1). Synaptic membranes were prepared, and GluR1 subunits of AMPA receptors were immunoprecipitated with a C-terminal antibody for this subunit. Immunoprecipitated proteins were then separated on SDS-PAGE and immunoblotted with an antibody against phospho-GluR1 Ser831. As shown in Figure 2A, incubating sections with BEL markedly enhanced GluR1 Ser831 phosphorylation in synaptic membranes. The effect was detected at 100 nM and increased to a maximum of around 90% at concentrations between 1 and 3 μ M. PACO, a drug that reversibly inhibits iPLA₂, also increased GluR1 Ser831 phosphorylation in a concentration-dependent manner, whereas AACO (a cPLA₂ inhibitor) failed to modify GluR1 phosphorylation (Fig. 2A).

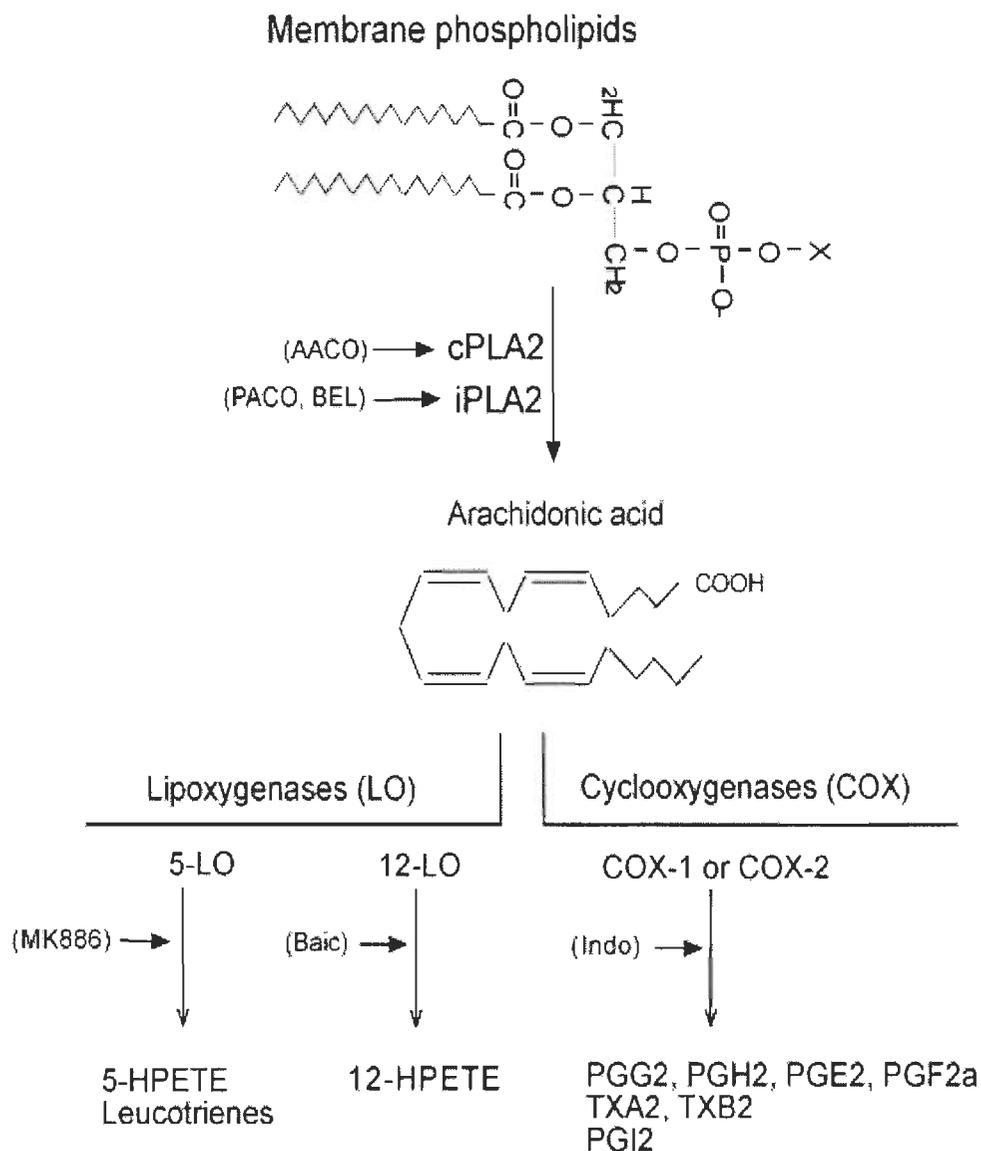


FIGURE 3.1 Hydrolytic sites of PLA₂ on phospholipids and metabolic pathways of AA. PLA₂ enzymes cleave phospholipids (particularly phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine) at the sn-2 position to generate a lysophospholipid and AA. The major metabolic pathways of AA are presented. LO pathways lead to the formation of hydroperoxyeicosatetraenoic acids (HPETE), such as 5-HPETE, 12-HPETE, and of leucotrienes. The COX pathways (COX-1 and COX-2) evoke the formation of cyclic endoperoxides, such as prostaglandins G (PGG), PGH and subsequent metabolic products. Compounds such as BEL and PACO inhibit constitutive iPLA₂ activity, AACO suppresses calcium-dependent cPLA₂ activity, while aspirin and indomethacin inhibit the COX pathways. Baicalein preferentially inhibits 12-LO activity, while MK-886 inhibits the 5-LO pathway.

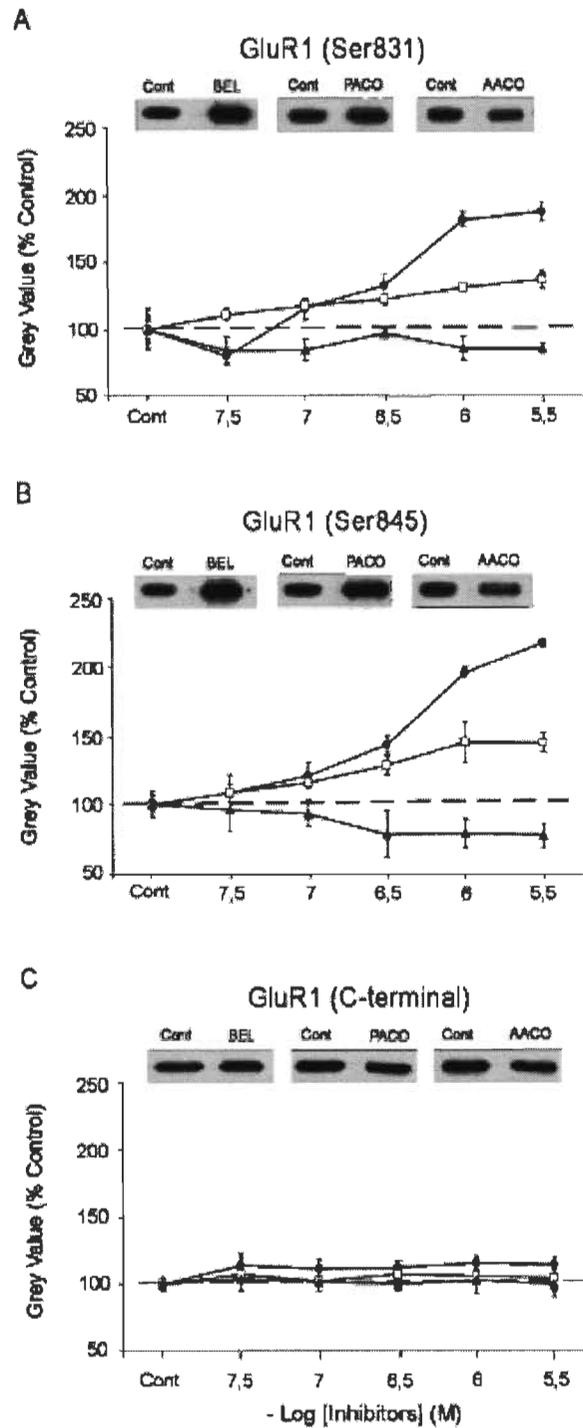


Figure 3.2 iPLA₂, but not cPLA₂ inhibition, increases GluR1 phosphorylation in rat brain sections. Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h with different concentrations of PLA₂ inhibitors (0.03-3 μM); BEL (solid circles), PACO (open squares) and AACO (solid triangles). After incubation, the sections were homogenized, and synaptic (P2) fractions

were prepared by subcellular fractionation, as described in Materials and Methods. Aliquots of control and treated fractions were immunoprecipitated with an antibody against the C-terminal domain of the GluR1 subunit of AMPA receptors. Precipitated proteins were then processed for immunoblotting and staining using anti-Ser831 (**A**) and anti-Ser845 (**B**) antibodies to determine the influence of PLA₂ enzymes on AMPA receptor phosphorylation. The amount of GluR1 proteins in immunoblots stained with the antibody against the C-terminal domain of the GluR1 subunit was also determined (**C**). Blots were digitized, and the intensity of the bands was quantified (grey values). Data are expressed as percentages of basal values in control sections and are means \pm SEM of values obtained from 6 rats. Representative immunoblots are presented above each graph.

To further verify the influence of iPLA₂ on AMPA receptors, we investigated phosphorylation of another regulatory site of GluR1, Ser845. Similarly to the Ser831 site, GluR1 Ser845 phosphorylation was markedly enhanced after iPLA₂ (but not cPLA₂) inhibition (Fig. 2B). Incubation of frozen-thawed brain sections with 3 μ M BEL and PACO for 60 min at 35°C resulted respectively in 217% and 145% increases in intensity of the bands recognized by the anti-Ser845 antibody for GluR1. The overall amounts of GluR1 proteins were also determined by Western blot with an antibody against the C-terminal domain of the GluR1 subunit and remained constant under all conditions.

3.5.2 iPLA₂ inhibition does not influence GluR2/3 or NR1 subunit phosphorylation in rat brain sections

We were interested to see whether iPLA₂ inhibitors could modify the phosphorylation of other subunits of both AMPA and NMDA receptors. Frozen-thawed brain sections were preincubated with 3 μ M BEL and PACO for 60 min at 35°C to determine the influence of iPLA₂ activity on GluR2/3 and NR1 phosphorylation. Neither BEL nor PACO modified phosphorylation of the GluR2/3 (Ser880/891) subunits of AMPA receptors in frozen-thawed brain

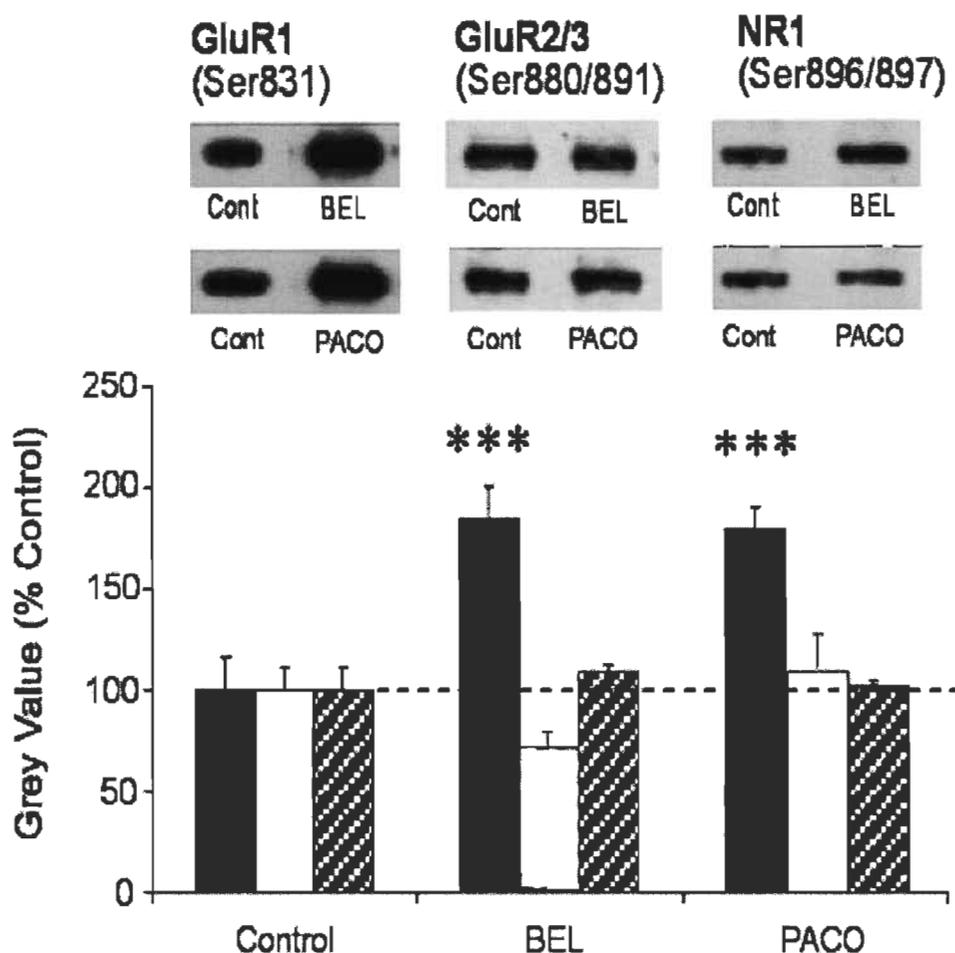


Figure 3.3 iPLA₂ inhibition does not modify phosphorylation of GluR2/3 and NR1 subunits in rat brain sections. Sections were processed as detailed in the Figure 2 legend. Control and treated fractions were immunoprecipitated with an antibody against the C-terminal domains of GluR1 or GluR2 subunits of AMPA receptors and NR1 subunits of NMDA receptors. Precipitated proteins were then processed for immunoblotting and staining using anti-Ser831 for GluR1 (closed bars), anti-Ser880/891 for GluR2/3 (open bars) and anti-Ser896/897 for NR1 (hatched bars), respectively. Blots were digitized, and the intensity of the bands was quantified (grey values). Data are expressed as percentages of basal values in control sections and are means \pm SEM of values obtained from 6 rats. Representative immunoblots are presented above the graph. *** $p < 0.001$ (Bonferroni's post hoc analysis), inhibitor-treated vs. control sections.

sections. Similar results were obtained for the NR1 subunits of NMDA receptors as no changes were observed in the phosphorylation of sites probed with phosphospecific antibodies (Ser896/897) after iPLA₂ inhibition (Fig. 3).

3.5.3 Arachidonate metabolites generated primarily via LO enzymes mediate iPLA₂-induced inhibition of GluR1 phosphorylation

The pharmacological results presented above are the first experimental evidence showing that constitutive iPLA₂ activity might be an important mechanism influencing AMPA receptor phosphorylation. To determine the potential contribution of AA-derived metabolites in iPLA₂-induced GluR1 phosphorylation, we tested the effects of inhibitors of the LO and COX pathways of AA (see Figure 1) on frozen-thawed rat brain sections. Western blots performed on immunoprecipitated proteins and probed with phosphospecific antibodies to GluR1 sites (Ser831 and Ser845) indicated that AMPA receptor phosphorylation was increased by around 60% in brain sections preincubated with the 5-LO inhibitor MK-886 compared to the controls (Fig. 4A and 4B). However, neither indomethacin (a COX inhibitor) nor baicalein (a 12-LO inhibitor) produced significant alteration in GluR1 phosphorylation. As in the case of iPLA₂ inhibitors, no changes in the phosphorylation of NR1 subunits of NMDA receptors were produced by MK-886 or other inhibitors of AA-derived metabolites (Fig. 4C).

3.5.4 iPLA₂ inhibition influences calcium-mediated truncation but not the subcellular localization of GluR1 proteins in rat brain sections

Phosphorylation of GluR1 subunits of AMPA receptors represents a critical factor controlling both AMPA receptor truncation by calcium-dependent

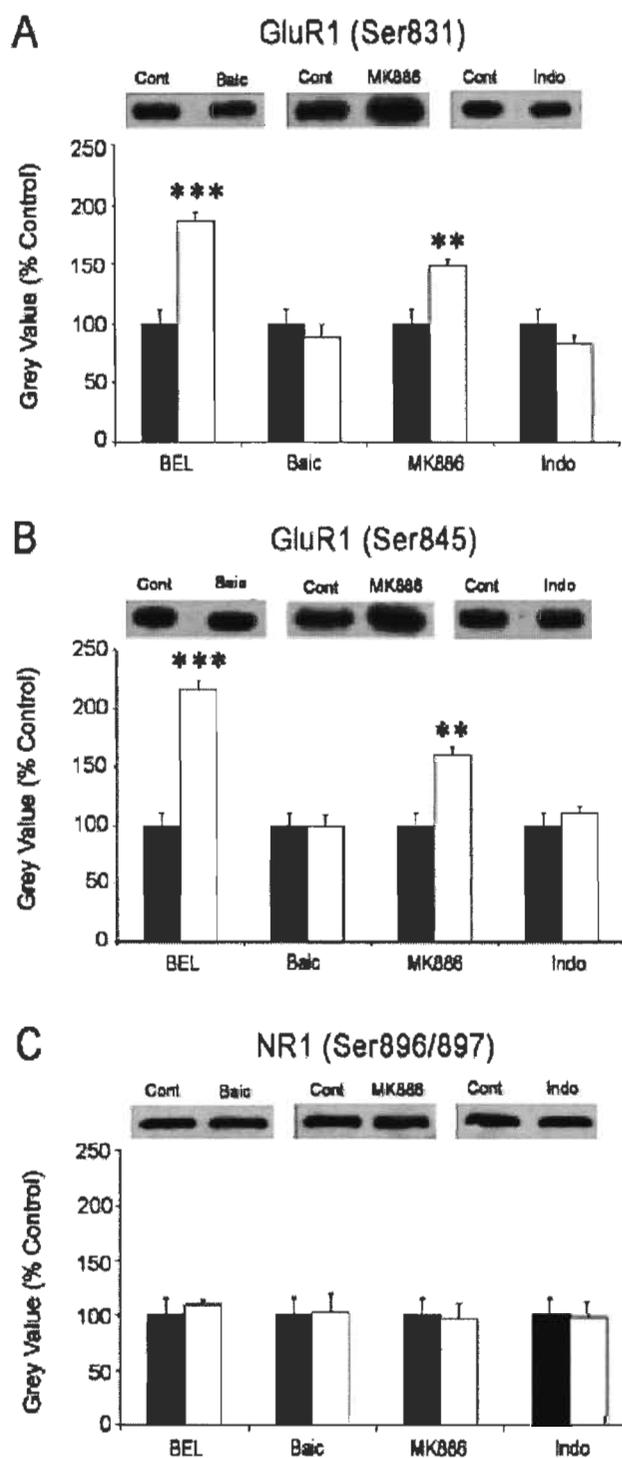


Figure 3.4 Arachidonate metabolites generated primarily via LO enzymes mediate iPLA₂-induced GluR1 phosphorylation. Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h with or without various enzymatic inhibitors. After incubation, synaptic (P2) fractions were prepared by subcellular

fractionation. Aliquots of control and treated fractions were immunoprecipitated with antibodies against the C-terminal domains of GluR1 or NR1 subunits. Precipitated proteins from control (closed bars) and treated (open bars) fractions were then processed for immunoblotting and staining using anti-phospho-Ser831 (A) and anti-phospho-Ser845 (B) antibodies of GluR1 subunits as well as anti-phospho-Ser896/897 (C) antibodies of NR1 subunits to determine the influence of iPLA₂ (BEL; 3 μM), 5-LO (MK-886; 3 μM), 12-LO (Baic; 3 μM) and COX (Indo; 3 μM) enzymes on glutamate receptor phosphorylation. Blots were digitized, and the intensity of the bands was quantified (grey values). Data are expressed as percentages of basal values in control sections and are means ± SEM of values obtained from 6 rats. Representative immunoblots are presented above each graph. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Bonferroni's post hoc analysis), inhibitor-treated vs. control sections.

proteases and receptor subcellular localization (Bi et al., 1998a; Bredt and Nicoll, 2003). We, therefore, tested the possibility that GluR1 phosphorylation induced by iPLA₂ inhibitors could interact with calcium-induced truncation of GluR subunits in rat brain sections. Frozen-thawed rat brain sections were preincubated for 60 min in the presence of calcium and in the absence or presence of iPLA₂ inhibitors, homogenized and subjected to cellular fractionation to obtain P2 fractions. Aliquots of synaptic membranes were then processed for immunoblotting with antibodies against the C-terminal domain of GluR1 subunits. As reported previously, preincubation of brain sections with calcium was associated with a decrease in the amounts of GluR1 subunits, an effect dependent on activation of endogenous calpain (Bi et al., 1994; Bi et al., 1998b) (Fig. 5A). The calcium-induced decrease in GluR1 levels was significantly attenuated in BEL- and PACO-treated slices.

One of the useful features of frozen-thawed rat brain sections is that they permit investigation of the effects of various manipulations on the subcellular distribution of AMPA receptors (Valastro et al., 2001). Therefore, we determined the effects of iPLA₂ inhibitors on the subcellular distribution of GluR1 and NR1 subunits. Preincubation of rat brain sections with iPLA₂ inhibitors did not elicit any significant change in GluR1 distribution between

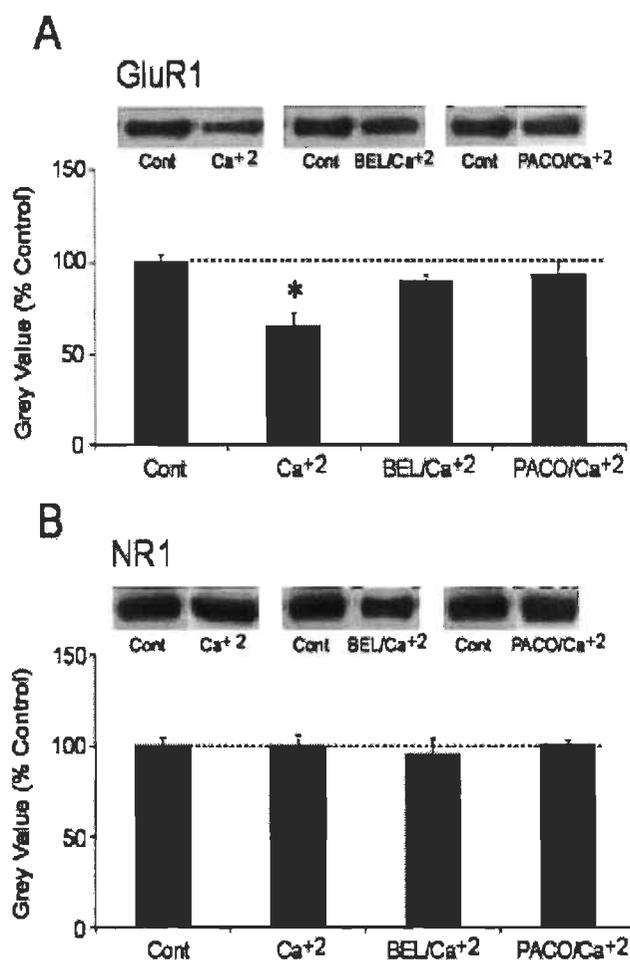


Figure 3.5 iPLA₂ inhibitors suppress calcium-mediated truncation of GluR1 subunits of AMPA receptors in rat brain sections. Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h with 3 μM BEL or PACO in the absence or presence of 0.25 mM calcium acetate. After incubation, synaptic (P2) fractions were prepared by subcellular fractionation. Control and treated fractions were processed for immunoblotting and staining using antibodies against the C-terminal domains of GluR1 (A) and NR1 (B) subunits. Blots were digitized, and the intensity of the bands was quantified (grey values). Data are expressed as percentages of basal values in control sections and are means ± SEM of values obtained from 6 rats. Representative immunoblots are presented above each graph. * $p < 0.05$ (Bonferroni's post hoc analysis), calcium-treated vs. control sections.

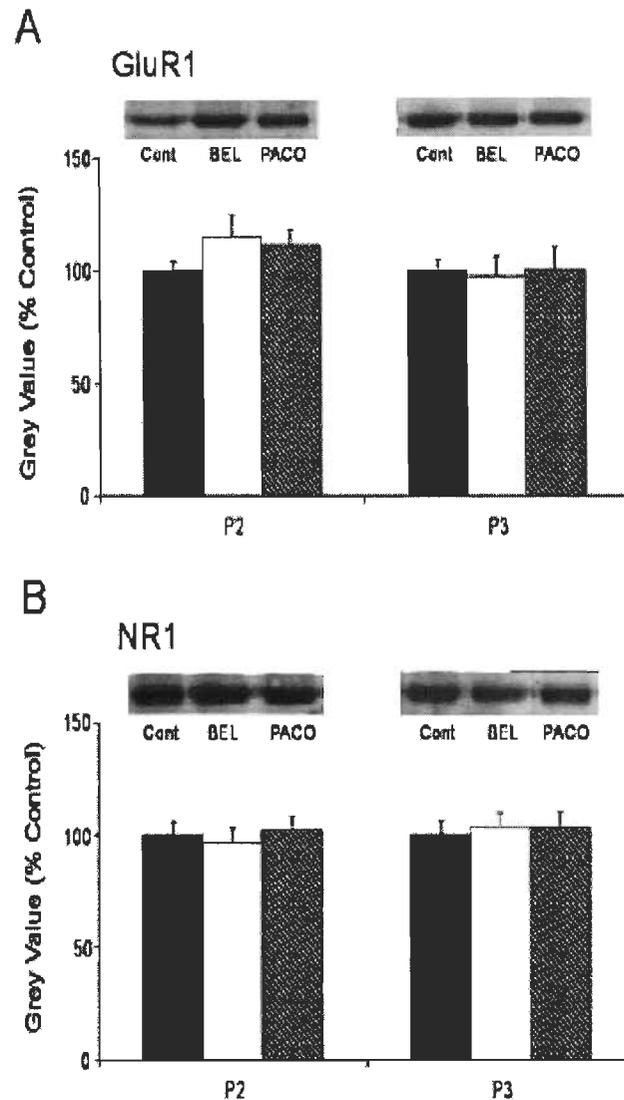


Figure 3.6 iPLA₂ inhibitors do not modify subcellular localization of AMPA receptor subunits in rat brain sections. Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h without (closed bars) or with the iPLA₂ inhibitors BEL (open bars) or PACO (hatched bars). Synaptic (P2) and microsomal (P3) fractions were prepared by subcellular fractionation. Control and treated fractions were processed for immunoblotting and staining using antibodies against the C-terminal domains of GluR1 (**A**) and NR1 (**B**) subunits. Blots were digitized, and the intensity of the bands was quantified (grey values). Data are expressed as percentages of basal values in control sections and are means \pm SEM of values obtained from 6 rats. Representative immunoblots are presented above each graph.

P2 and P3 fractions (Fig. 6A). Similarly, no significant difference in NR1 levels was detected in P2 or P3 fractions prepared from control and BEL-treated sections (Fig. 6B).

3.5.5 iPLA₂ and 5-LO inhibitors increase ³H-AMPA binding in rat brain sections

We reported previously that cPLA₂ contributed to the regulation of AMPA receptor affinity for AMPA (Massicotte, 2000). It was, therefore, of interest to determine the effects of iPLA₂ and 5-LO inhibitors on AMPA receptor-binding properties. Horizontal brain sections were preincubated at 35°C for 60 min in the presence or absence of 3 μM BEL, PACO, or MK-886. After washing, ³H-AMPA binding was performed, and the sections were then processed for autoradiography. Visual examination by autoradiography indicated that ³H-AMPA binding was significantly modified in the hippocampus after both iPLA₂ (BEL and PACO) and 5-LO (MK-886) inhibition (Fig. 7A and 7B). Statistical comparisons indicated that ³H-AMPA binding was not modified in the CA3 and CA1 stratum oriens and in the CA3 stratum radiatum in the presence of BEL, PACO and MK-886, while a significant increase was found in the CA1 stratum radiatum and dentate gyrus. When compared to control sections, ³H-AMPA binding in sections incubated with the iPLA₂ inhibitor BEL (3 μM) was augmented by about 35% in the CA1 stratum radiatum, and a similar effect was observed in MK-886-treated sections (Fig. 7B).

Saturation experiments at equilibrium were performed to determine whether the increase in AMPA receptor binding in BEL-treated sections was the result of alterations in receptor affinity or maximal number (Fig. 7C). The saturation kinetics of ³H-AMPA binding in the CA1 stratum radiatum yielded a linear Scatchard plot, suggesting the existence of a single binding site in control sections preincubated at 35°C (Fig. 7D). In BEL-treated sections,

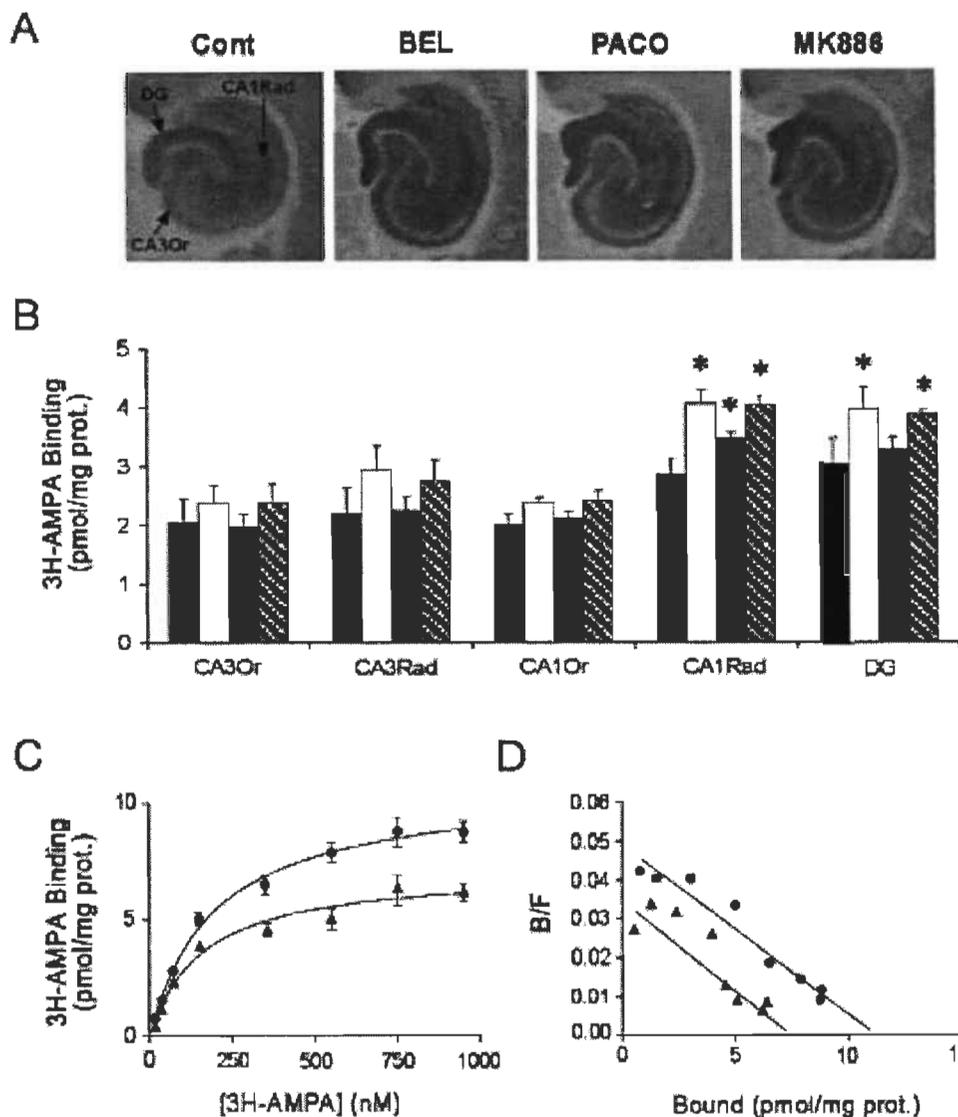


Figure 3.7 iPLA₂ and 5-LO inhibitors stimulate ³H-AMPA binding in rat brain sections. Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h without or with 3 μM of the following inhibitors: BEL, PACO and MK-886. The sections were then washed in buffer alone and processed for ³H-AMPA binding, as described in Materials and Methods. **(A)** Computer-generated images of autoradiograms of ³H-AMPA binding in rat brain sections preincubated in the absence or presence of the various inhibitors. **(B)** Autoradiographs like those shown in **A** were analyzed with an image analysis system for the various hippocampal regions (Or, stratum oriens; Rad, stratum radiatum; DG, molecular layer of the dentate gyrus). The results obtained for the different regions of control (open bars), BEL- (closed bars), PACO- (grid bars) and MK-886-treated (hatched bars) sections are expressed in

pmol/mg of protein. Note that in the CA1 stratum radiatum, ^3H -AMPA binding was significantly enhanced by iPLA₂ (BEL and PACOCF3) and 5-LO (MK-886) inhibitors. **(C)** Saturation kinetics were performed at various concentrations of ^3H -AMPA (10–1,000 nM) in the CA1 stratum radiatum of control (closed triangles) and BEL-treated (closed circles) sections. **(D)** The data on saturation kinetics are also presented as Scatchard plots (B/F, bound/free) which were analysed by GraphPad Prism 4.0 to generate K_d and B_{max}. Scatchard plots are the result of experiments performed in 4 different animals. * $p < 0.05$ (Bonferroni's post hoc analysis), inhibitor-treated vs. control sections.

increased ^3H -AMPA binding was not due to heightened receptor affinity (K_d = 196 ± 14 in control versus 158 ± 13 in BEL-treated sections), but to a change in maximal number of binding sites (B_{max} = 10.8 ± 0.2 in control versus 7.2 ± 0.2 in BEL-treated sections).

3.6 DISCUSSION

In the present study, we discovered that brain constitutive iPLA₂ activity has the ability to influence AMPA receptor properties by decreasing the phosphorylation of GluR subunits at their Ser sites. Our results thus provide an explanation for our recent observations that iPLA₂ inhibitors, when introduced into hippocampal CA1 pyramidal cells through a patch pipette, increased the amplitude of AMPA receptor-mediated currents (St-Gelais et al., 2004), as phosphorylation of AMPA receptor subunits at these sites exhibits heightened conductance (Derkach et al., 1999). Data obtained with several pharmacological agents indicated that the iPLA₂-induced decrease in AMPA receptor phosphorylation depended primarily on the 5-LO-catalyzed metabolism of AA. This regulatory process appeared to be specific for GluR1 subunits of AMPA receptors as it did not significantly modify phosphorylation of Ser sites on both GluR2/3 subunits and NR1 subunits of NMDA receptors. This effect was, however, accompanied by reduced sensitivity of GluR1

subunits to calcium-mediated truncation, consistent with previous findings suggesting that phosphorylated AMPA receptors are less susceptible to calpain-mediated truncation (Bi et al., 1998a). Changes in receptor phosphorylation resulting from both iPLA₂ and 5-LO inhibition were not accompanied by a redistribution of AMPA receptors between intracellular and membrane compartments prepared from whole brain sections, but saturation kinetics experiments performed within the CA1 hippocampal area indicated that basal iPLA₂ activity, again through the generation of 5-LO metabolites, might regulate the maximal number of AMPA receptors in the CA1 stratum radiatum of the hippocampus.

Constitutive iPLA₂, like other PLA₂ activities, promotes the hydrolysis of membrane phospholipids and stimulates AA release; AA is then further metabolized by several enzymatic pathways, such as COXs and LOs. Our results suggest that constitutive iPLA₂ activity, and the resulting formation of 5-LO-derived metabolites of AA, down-regulate synaptic AMPA receptor function by either inhibiting protein kinases or stimulating protein phosphatases involved in the regulation of AMPA receptor phosphorylation. AMPA receptors (as well as their chaperon proteins) are controlled by a complex balance of phosphorylation/dephosphorylation reactions (Song and Huganir, 2002) and, as mentioned previously, studies have shown that AA metabolites generated by PLA₂ enzymes are able to influence several neuronal protein kinases (Piomelli et al., 1989; Piomelli and Greengard, 1991). In particular, metabolites generated by the 12-LO pathway inhibit Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (Piomelli et al., 1989; Piomelli and Greengard, 1991), a kinase known to regulate AMPA receptor phosphorylation (Hayashi et al., 2000).

Our results indicate that GluR1 subunit phosphorylation is not altered by the 12-LO inhibitor baicalein, but is up-regulated by MK-886, suggesting that 5-LO (rather than 12-LO) metabolites may interact with AMPA receptor GluR1

properties. The molecular link between 5-LO and GluR1 phosphorylation remains to be determined. It is hard to ignore, however, the persistent and recurring reports that AMPA receptor conformation, stabilization and interactions with post-synaptic density (PSD) proteins exhibit complex regulation involving a large number of mechanisms (Baudry and Lynch, 2001), and it could be proposed that 5-LO metabolites interact with one or more of these processes to produce changes in GluR1 subunit phosphorylation. Possibly relevant to this idea, 5-LO metabolites have been implicated in actin networks regulation in a number of cell types (Provost et al., 2001), and the observation that AMPA receptor properties are modulated by interaction with the actin cytoskeleton (Allison et al., 1998; Dingledine et al., 1999) leaves open the possibility that 5-LO metabolites interact with GluR1 phosphorylation, perhaps by changing AMPA receptor interaction with the actin network. It is also pertinent that 5-LO-derived metabolites of AA stimulate mitogen-activated protein kinase activities (Burkert et al., 2003), which have been proposed to influence AMPA receptor distribution between the membrane and intracellular compartments (Zhu et al., 2002; Huang et al., 2004). In fact, the present findings that 5-LO (but not 12-LO) metabolites are influencing GluR1 phosphorylation raises the intriguing possibility that AA-derived metabolites might differentially modulate AMPA receptor distribution within hippocampal neurons. Experiments will be required to evaluate this aspect.

Several recent studies indicate that iPLA₂ enzymes may also play an important role in regulating multiple mammalian membrane-trafficking events as well as endocytotic/exocytotic processes (Brown et al., 2003). For example, treatment of cells with iPLA₂ inhibitors, including BEL, provoke the disruption of intracellular membrane-trafficking events that depend on the formation of membrane tubules (de Figueiredo et al., 1998; Kuroiwa et al., 2001). Likewise, BEL treatment interferes with membrane fusion events required during both endocytosis and exocytosis (Mayorga et al., 1993;

Takuma and Ichida, 1997), providing additional support for a possible role of iPLA₂ in membrane-trafficking events. In the present investigation, we performed experiments relative to the notion that iPLA₂ inhibition could alter AMPA receptor distribution within neurons. Our attempts to measure changes of AMPA receptor localization in intracellular (P3 fractions) and membrane (P2 fractions) compartments were unsuccessful. However, with this procedure, which evaluated AMPA receptor distribution in whole brain sections, alterations of GluR1 subunits in specific brain regions could have escaped detection. In fact, the ability of BEL to increase AMPA receptor binding in restricted areas of the hippocampus (i.e. areas CA1 and the DG of the hippocampus) is compatible with this idea. Here, we propose that phosphorylation of GluR1 subunits after iPLA₂ inhibition could favor the insertion of new receptors in area CA1 and the DG of the hippocampus, a suggestion that was recently supported by results obtained in our laboratory showing that GluR1 subunits are enhanced in membrane fractions prepared from BEL-treated organotypic hippocampal slice cultures (Menard et al., manuscript in preparation). Possible reasons for the differences in the results between brain regions may include the existence of AMPA receptor subunits possessing dissimilar molecular interactions with proteins involved in the targeting/anchoring of receptors and/or differences in the relative localization of iPLA₂ and 5-LO enzymes. We also find that calcium-induced proteolysis of GluR1 subunits is reduced after iPLA₂ inhibition. Several lines of evidence have demonstrated that cleavage of GluR subunits occurs in the C-terminal domain through calpain-mediated proteolysis. The truncation of GluR subunits is known to favor the removal of AMPA receptors from PSDs (Baudry and Lynch, 2001), reinforcing the notion that iPLA₂ enzymes might interact with the mechanisms involved in membrane receptor regulation. A putative biochemical model summarizing various mechanisms likely to participate in the iPLA₂-induced modulation of AMPA receptors is presented in Figure 8.

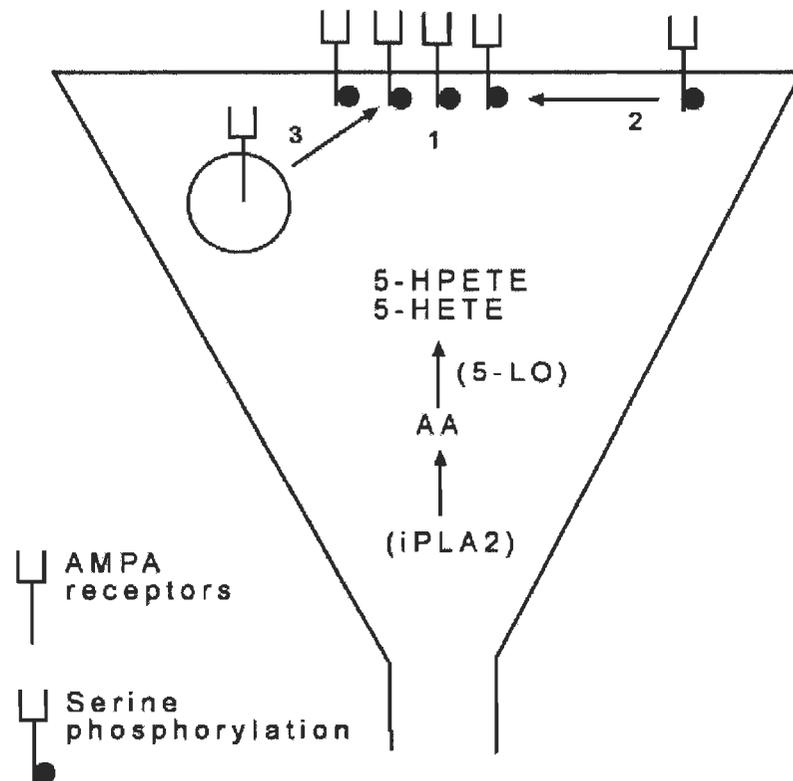


Figure 3.8 Schematic model of iPLA₂-mediated modulation of AMPA receptor properties. Possible mechanisms underlying AMPA receptor regulation by iPLA₂ and 5-LO activities. Inhibition of constitutive iPLA₂ and 5-LO activities was previously reported to up-regulate AMPA receptor function in CA₁ pyramidal cells (St-Gelais et al., 2004). From the present investigation, iPLA₂- and 5-LO-mediated control of AMPA receptor responses might involve diverse mechanisms: 1) changes in AMPA receptor phosphorylation by various protein kinases or phosphatases controlled by arachidonate metabolites, 2) changes in AMPA receptor clustering through 5-LO actions on actin polymerization, and 3) changes in exocytosis and/or endocytosis dependent on iPLA₂ enzyme activities.

As described above, injection of iPLA₂ inhibitors into postsynaptic CA1 pyramidal neurons has been found to generate robust enhancement of the amplitude of AMPA receptor-mediated EPSCs. In fact, the present data indicate that constitutive iPLA₂ activities and perhaps the generation of 5-LO metabolites of AA control AMPA receptor phosphorylation under basal conditions. In the case of LTP, NMDA receptors trigger modifications of

AMPA receptor phosphorylation by transiently increasing postsynaptic calcium levels, resulting in the long-term regulation of protein kinase activity (Baudry and Lynch, 2001). These findings, therefore, raise questions as to whether, and to what degree, changes in iPLA₂ activity could contribute to long-lasting modifications of synaptic function. The iPLA₂ system has been demonstrated to be physically associated with, and functionally coupled to, the intracellular calcium signal transducer calmodulin. In fact, calcium ions, which bind to calmodulin, have been proposed to limit iPLA₂ activity in various cell types (Wolf and Gross, 1996; Gilroy et al., 2004). Taken together, the above data suggest an hypothesis in which iPLA₂ inhibition would be sufficient to engage LTP formation, through unknown mechanisms facilitating phosphorylation of GluR1 subunits. To learn more about the interaction of iPLA₂ with LTP mechanisms, it will be of particular interest to determine how iPLA₂-induced changes in AMPA receptor phosphorylation can interfere with (i.e. occlude) phosphorylation of AMPA receptor subunits taking place as a result of electrically- or chemically-induced LTP (i.e. CaMKII). Recently, evidence has disclosed that LTP activates a regulated exocytotic pathway, favoring the insertion of new synaptic receptors from the endoplasmic reticulum-Golgi pool (Broutman and Baudry, 2001). In hippocampal slices, inhibition of LTP expression was observed after iPLA₂ inhibition (Wolf et al., 1995), suggesting that the regulated exocytotic pathway might also be under the influence of iPLA₂ activities. Future studies will be directed at the role of iPLA₂ in the subcellular distribution of AMPA receptor subunits after LTP or other forms of synaptic plasticity known to require the activity-dependent redistribution of AMPA receptors as well as PLA₂ and AA metabolism (i.e. LTD) (Massicotte, 2000).

In conclusion, the present investigation established that AMPA receptor function is under the influence of iPLA₂ activity. Specifically, our results suggest that constitutive iPLA₂ and the generation of 5-LO metabolites of AA limit AMPA receptor-mediated responses by decreasing AMPA receptor

phosphorylation. Previous studies from our laboratory have shown that cPLA₂ enzymes are involved in the regulation of AMPA receptor affinity possibly through changes in AMPA receptor conformation (Massicotte et al., 1991; Massicotte, 2000). Interestingly, depending on its activity, cPLA₂ bi-directionally modulated AMPA receptor binding; low activities were associated with a decrease, and high activities with an increase, in receptor affinity (Chabot et al., 1998). Our present results show that iPLA₂ contributes to a different type of AMPA receptor regulation, suggesting differential roles for cPLA₂ and iPLA₂ in the modulation of AMPA receptor properties. From a physiopathological perspective, the finding that iPLA₂ activity is markedly decreased in a number of brain regions of Alzheimer's disease patients (Ross et al., 1998) raises the interesting hypothesis that GluR1 up-regulation through iPLA₂ mechanisms might, in some manner, serve to accentuate/exacerbate excitotoxicity during aging (Michaelis, 1998) and contribute to the decreased number of glutamatergic neurons. Schizophrenia is another pathological condition which is recognized to be associated with defects in both AMPA receptor properties (Harrison et al., 2003) and iPLA₂ activities (Ross, 2003), emphasizing the pathological significance of the present findings.

3.7 REFERENCES

Abeliovich A, Chen C, Goda Y, Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S. 1993. Modified hippocampal long-term potentiation in PKC ζ -mutant mice. *Cell* 75:1252-1262.

Akers RF, Lovinger DM, Colley PA, Linden DJ, Routtenberg A. 1986. Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science* 231:587-589.

Allison DW, Gelfand VI, Spector I, Craig AM. 1998. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J Neurosci* 18:2423-2436.

Balsinde J, Dennis EA. 1997. Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2. *J Biol Chem* 272(26):16069-16072.

Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR. 1997. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276:2042-2045.

Baudry M, Lynch G. 2001. Remembrance of arguments past: how well is the glutamate receptor hypothesis of LTP holding up after 20 years? *Neurobiol Learn Mem* 76(3):284-297.

Bettini E, Maggi A. 1991. A rapid method for the quantitation of estrogen receptors in small amounts of tissue. *J Immunol Methods* 144(1):87-91.

Bi R, Bi X, Baudry M. 1998a. Phosphorylation regulates calpain-mediated truncation of glutamate ionotropic receptors. *Brain Res* 797:154-158.

Bi X, Chen J, Baudry M. 1998b. Calpain-mediated proteolysis of GluR1 subunits in organotypic hippocampal cultures following kainic acid treatment. *Brain Res* 781(1-2):355-357.

Bi X, Tocco G, Baudry M. 1994. Calpain-mediated regulation of AMPA receptors in adult rat brain. *Neuroreport* 6(1):61-64.

Boden SE, Schweizer S, Bertsche T, Dufer M, Drews G, Safayhi H. 2001. Stimulation of leukotriene synthesis in intact polymorphonuclear cells by the 5-lipoxygenase inhibitor 3-oxo-tirucallic acid. *Mol Pharmacol* 60(2):267-273.

Bredt DS, Nicoll RA. 2003. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40(2):361-379.

Broutman G, Baudry M. 2001. Involvement of the secretory pathway for AMPA receptors in NMDA-induced potentiation in hippocampus. *J Neurosci* 21(1):27-34.

Brown WJ, Chambers K, Doody A. 2003. Phospholipase A2 enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* 4:214-221.

Burkert E, Szellas D, Radmark O, Steinhilber D, Werz O. 2003. Cell type-dependent activation of 5-lipoxygenase by arachidonic acid. *J Leukoc Biol* 73(1):191-200.

Capodici C, Pillinger MH, Han G, Philips MR, Weissmann G. 1998. Integrin-dependent homotypic adhesion of neutrophils. Arachidonic acid activates Raf-1/Mek/Erk via a 5-lipoxygenase-dependent pathway. *J Clin Invest* 102(1):165-175.

Chabot C, Gagné J, Giguère C, Bernard J, Baudry M, Massicotte G. 1998. Bidirectional modulation of AMPA receptor properties by exogenous phospholipase A2 in the hippocampus. *Hippocampus* 8:299-309.

Chen W, Glasgow W, Murphy E, Steenbergen C. 1999. Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in ischemic preconditioning and PKC-induced protection in heart. *Am J Physiol* 276(6 Pt 2):H2094-H2101.

Chen YQ, Duniec ZM, Liu B, Hagmann W, Gao X, Shimoji K, Marnett LJ, Johnson CR, Honn KV. 1994. Endogenous 12(S)-HETE production by tumor cells and its role in metastasis. *Cancer Res* 54(6):1574-1579.

Chung HJ, Steinberg JP, Huganir RL, Linden DJ. 2003. Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression. *Science* 300:1751-1755.

de Figueiredo P, Drecktrah D, Katzenellenbogen JA, Strang M, Brown WJ. 1998. Evidence that phospholipase A2 activity is required for Golgi complex and trans Golgi network membrane tubulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8642-8647.

Derkach V, Barria A, Soderling TR. 1999. Ca^{2+} /calmodulin kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3269-3274.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51(1):7-61.

Esteban JA, Shi S-H, Wilson C, Nuriya M, Huganir RL, Malinow R. 2003. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci* 6(2):136-143.

Farooqui AA, Litsky ML, Farooqui T, Horrocks LA. 1999. Inhibitors of intracellular phospholipase A2 activity: their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders. *Brain Res Bull* 49(3):139-153.

Fujita S, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N. 2000. Ca^{2+} -independent phospholipase A2 inhibitor impairs spatial memory of mice. *Jpn J Pharmacol* 83:277-278.

Gilroy DW, Newson J, Sawmynaden P, Willoughby DA, Croxtall JD. 2004. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *FASEB J* 18(3):489-498.

Harder DR, Campbell WB, Roman RJ. 1995. Role of cytochrome P-450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. *J Vasc Res* 32(2):79-92.

Harrison PJ, Law AJ, Eastwood SL. 2003. Glutamate receptors and transporters in the hippocampus in schizophrenia. *Ann NY Acad Sci* 1003:94-101.

Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R. 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287:2262-2267.

Henley JM. 1995. Subcellular localization and molecular pharmacology of distinct populations of [3H]-AMPA binding sites in rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 115(2):295-301.

Huang CC, You JL, Wu MY, Hsu KS. 2004. Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression. *J Biol Chem* 279(13):12286-12292.

Kalyankrishna S, Malik KU. 2003. Norepinephrine-induced stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by arachidonic acid metabolites generated by activation of cytosolic phospholipase A(2) in vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 304(2):761-772.

Kuroiwa N, Nakamura M, Tagaya M, Takatsuki A. 2001. Arachidonyltrifluoromethyl ketone, a phospholipase A2 antagonist, induces dispersal of both Golgi stack- and trans Golgi network-resident proteins throughout the cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun* 281:582-588.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-685.

Lamprecht R, LeDoux J. 2004. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 5(1):45-54.

Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL. 2000. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405:955-959.

Lepley RA, Fitzpatrick FA. 1996. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks activation and redistribution of 5-lipoxygenase in HL-60 cells. *Arch Biochim Biophys* 331(1):141-144.

Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicholl RA. 1995. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11175-11179.

MacIntyre JP, Pope BL. 1991. The involvement of protein kinase C, calcium, and 5-lipoxygenase in the production of tumor necrosis factor by a cloned interleukin-3 dependent cell line with natural cytotoxic activity. *Int J Immunopharmacol* 13(2-3):175-184.

Malenka RC. 1994. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78:535-538.

Malinow R. 2003. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Phil Trans R Soc Lond B* 358:707-714.

Massicotte G. 2000. Modification of glutamate receptors by phospholipase A2: its role in adaptive neural plasticity. *Cell Mol Life Sci* 57(11):1542-1550.

Massicotte G, Vanderklish P, Lynch G, Baudry M. 1991. Modulation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/quisqualate receptors by phospholipase A2: a necessary step in long-term potentiation? *Proc Natl Acad Sci USA* 88(5):1893-1897.

Mayorga LS, Colombo MI, Lennartz M, Brown EJ, Rahman H, Weiss R, Lennon PJ, Stahl PD. 1993. Inhibition of endosome fusion by phospholipase A2 (PLA2) inhibitors points to a role for PLA2 in endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10255-10259.

Michaelis EK. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54(4):369-415.

Mulkey RM, Endo S, Shenolikar SS, Malenka RC. 1994. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369(6480):486-488.

Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC. 1993. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* 261:1051-1055.

Nayak A, Zastrow DJ, Lickteig R, Zahniser NR, Browning MD. 1998. Maintenance of late-phase is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. *Nature* 394(6694):680-683.

O'Dell TJ, Kandel ER. 1994. Low-frequency stimulation erases LTP through an NMDA receptor-mediated activation of protein phosphatases. *Learn Mem* 1:129-139.

O'Flaherty JT, Kuroki M, Nixon AB, Wijkander J, Yee E, Lee SL, Smitherman PK, Wykle RL, Daniel LW. 1996. 5-Oxo-eicosanoids and hematopoietic cytokines cooperate in stimulating neutrophil function and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 271(30):17821-17828.

Papavassiliou AG. 1994. Preservation of protein phosphoryl groups in immunoprecipitation assays. *J Immunol Methods* 170(1):67-73.

Piomelli D, Greengard P. 1991. Bidirectional control of phospholipase A2 activity by Ca^{++} /calmodulin-dependent protein kinase II, cAMP-dependent protein kinase, and casein kinase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6770-6774.

Piomelli D, Wang JK, Sihra TS, Nairn AC, Czernik AJ, Greengard P. 1989. Inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II by arachidonic acid and its metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(21):8550-8554.

Provost P, Doucet J, Hommarberg T, Gerisch G, Samuelson B, Radmark O. 2001. 5-lipoxygenase interacts with coactosin-like protein. *J Biol Chem* 276(19):16520-16527.

Raso E, Tovari J, Toth K, Paku S, Trikha M, Honn KV, Timar J. 2001. Ectopic α 5 β 3 integrin signaling involves 12-lipoxygenase- and PKC-mediated serine phosphorylation events in melanoma cells. *Thromb Haemost* 85(6):1037-1042.

Ross BM. 2003. Phospholipid and eicosanoid signaling disturbances in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69(6):407-412.

Ross BM, Turenne S, Moszczynska A, Warsh JJ, Kish SJ. 1999. Differential alteration of phospholipase A2 activities in brain patients with schizophrenia. *Brain Res* 821:407-413.

Ross BM, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ. 1998. Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: Increased lysophospholipid acetyltransferase activity and decreased phospholipase A2 activity. *J Neurochem* 70:786-793.

Seidenman KJ, Steinberg JP, Huganir RL, Malinow R. 2003. Glutamate receptor subunit 2 serine 880 phosphorylation modulates synaptic transmission and mediates plasticity in CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* 23(27):9220-9228.

Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. 1992. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257:201-206.

Song I, Huganir RL. 2002. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25(11):578-588.

St-Gelais F, Menard C, Congar P, Trudeau LE, Massicotte G. 2004. Postsynaptic injection of calcium-independent phospholipase A2 inhibitors selectively increases AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Hippocampus* 14(3):319-325.

Szekeres CK, Tang K, Trikha M, Honn KV. 2000. Eicosanoid activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 in human epidermoid carcinoma cells. *J Biol Chem* 275(49):38831-38841.

Takuma T, Ichida T. 1997. Role of Ca^{2+} -independent phospholipase A2 in exocytosis of amylase from parotid acinar cells. *J Biochem* 121:1018-1024.

Tocco G, Maren S, Shors T, Baudry M, Thompson RF. 1992. Long-term potentiation is associated with increased 3H-AMPA binding in rat hippocampus. *Brain Res* 573:228-234.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.

Valastro B, Girard M, Gagne JL, Martin F, Parent AT, Baudry M, Massicotte G. 2001. Inositol hexakisphosphate-mediated regulation of glutamate receptors in rat brain sections. *Hippocampus* 11(6):673-682.

Wang J, Kelly PT. 1996. The balance between postsynaptic Ca^{2+} -dependent protein kinase and phosphatase activities controlling synaptic strength. *Learn Mem* 3:170-181.

Wolf MJ, Gross RW. 1996. The calcium-dependent association and functional coupling of calmodulin with myocardial phospholipase A2. Implications for cardiac cycle-dependent alterations in phospholipolysis. *J Biol Chem* 271(35):20989-20992.

Wolf MJ, Izurni Y, Zorumski CF, Gross RW. 1995. Long-term potentiation requires activation of calcium-independent phospholipase A2. *FEBS Lett* 377(3):358-362.

Yang HC, Mosior M, Johnson CA, Chen Y, Dennis EA. 1999. Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A2. *Anal Biochem* 269:278-288.

Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R. 2002. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110(4):443-455.

3.8 ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to G.M. (Grant Number 105942). C.M. is the recipient of a studentship from the Quebec Mental Health Network and B.V. is the recipient of a studentship from NSERC. The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript.

3.9 ABBREVIATIONS

AA, arachidonic acid; AACO, arachidonyl trifluoromethyl ketone; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate; BEL, bromoenol lactone; CAMKII, calcium/calmodulin kinase II; COX, cyclooxygenase; DMSO, dimethylsulfoxide; EGTA, ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) N,N,N'-tetraacetic acid; EPSC, excitatory postsynaptic currents; ERK, extracellular signal-regulated kinases; GluR, glutamate receptor; HPETE, hydroperoxyeicosatetraenoic acid; LO, lipoxygenase; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; MAPK, mitogen-activated protein kinases; NMDA, N-methyl-D-aspartate; OD, optical density; PACO, palmitoyl trifluoromethyl ketone; PBS, phosphate-buffered saline; PLA₂, phospholipase A₂; cPLA₂, calcium-dependent phospholipase A₂; iPLA₂, calcium-independent phospholipase A₂; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-8% polyacrylamide gel electrophoresis.

CHAPITRE IV

PHOSPHORYLATION OF AMPA RECEPTOR SUBUNITS IS DIFFERENTIALLY REGULATED BY PHOSPHOLIPASE A₂ INHIBITORS

Caroline **MÉNARD**, Christian **PATENAUDE** and Guy **MASSICOTTE**

† Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières
Trois-Rivières, Québec, Canada

Running title: Phospholipase A₂ involvement in GluR1 phosphorylation

Number of pages: 21; Figures: 3

Number of words: 4,346

Corresponding author address:

Guy Massicotte

Département de chimie-biologie

U.Q.T.R.

C.P. 500, Trois-Rivières

Québec, Canada G9A 5H7

Phone (819) 376-5053

Fax (819) 376-5084

E-mail: Guy_Massicotte@uqtr.ca

Key words: Phospholipases A₂, glutamate receptors, phosphorylation, brain sections

4.1 RÉSUMÉ

Suite à la découverte d'une régulation de la phosphorylation des sous-unités des récepteurs AMPA par l'activité constitutive de la $iPLA_2$, tel que présenté dans le premier article, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ce phénomène. Dans le présent manuscrit, nous avons comparé les effets du BEL et de l'AACOCF₃, inhibiteurs spécifiques de la $iPLA_2$ et de la $cPLA_2$ respectivement, sur la phosphorylation des sous-unités qui composent les récepteurs au glutamate de type AMPA et également NMDA. L'incubation de sections de cerveaux congelés avec 3 μ M de BEL augmente, comme lors des expérimentations précédentes, la phosphorylation de la sous-unité GluR1 sur le résidu Ser831 pour la fraction synaptosomale P2. Un traitement avec le AACOCF₃ à la même concentration induit aussi une hausse de phosphorylation mais plutôt sur les sites Ser880/891 des sous-unités GluR2/3 des récepteurs AMPA. Encore une fois, les effets sont restreints aux récepteurs AMPA seulement; aucun changement n'est induit pour les sous-unités NR1 des récepteurs au glutamate de type NMDA que ce soit pour le BEL ou le AACOCF₃. Nous avons par la suite bloqué les protéines phosphatases avec un inhibiteur couramment utilisé l'acide okadaïque. Les effets des inhibiteurs de $iPLA_2$ et de $cPLA_2$ sur le niveau de phosphorylation des sous-unités des récepteurs AMPA n'ont pas été affectés par ce traitement, ce qui porte à croire que la hausse observée n'est pas liée à une diminution des processus de déphosphorylation. Toutefois, un pré-traitement des coupes de cerveaux de rats avec un inhibiteur perméable à la membrane de la protéine kinase C (PKC) est en mesure de prévenir les effets du BEL et du AACOCF₃ sur la phosphorylation des résidus Ser831 et Ser880/891 des sous-unités GluR1 et GluR2/3, respectivement. Cela indique que les activités des systèmes phospholipasiques dépendants ou indépendants du Ca^{2+} pourraient influencer différemment les propriétés des récepteurs AMPA et donc, leurs

fonctions dans le cerveau, possiblement par des mécanismes impliquant l'activité de la kinase PKC.

4.1.1 Contribution des auteurs de l'article

L'article a été rédigé par Caroline Ménard, le Dr. Christian Patenaude et le Dr. Guy Massicotte. Toutes les expériences présentées ont été faites par Caroline Ménard.

Ce manuscrit a été publié en 2005 dans le journal *Neuroscience Letters*, volume 389(1), pages 51-56.

4.2 ABSTRACT

Our laboratory recently discovered that the phosphorylation of subunits forming the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) subtype of glutamate receptors is regulated by constitutive phospholipase A₂ (PLA₂) activity in rat brain sections. In the present investigation, arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃) and bromoenol lactone (BEL) were used to compare the influence of calcium-dependent (cPLA₂) and calcium-independent (iPLA₂) enzymes on phosphorylation of AMPA and N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtypes of glutamate receptors. Incubation of rat brain sections with 3 μM BEL enhanced phosphorylation on Ser831 residue of the AMPA receptor GluR1 subunit in synaptosomal P2 fractions, whereas AACOCF₃ at the same concentration resulted in increased phosphorylation on residues Ser880/891 of GluR2/3 subunits. These effects were restricted to the AMPA receptor subtype as no changes in phosphorylation was elicited on the NMDA receptor NR1 subunit. The effects of BEL and AACOCF₃ were not occluded during blockade of protein phosphatases since AMPA receptor

phosphorylation was still apparent in presence of okadaic acid, indicating that PLA₂ inhibitor-induced increase in AMPA receptor phosphorylation does not rely on a decrease in dephosphorylation. However, pre-treatment of rat brain sections with a cell permeable protein kinase C (PKC) inhibitor prevented BEL- and AACOCF3-induced phosphorylation on Ser831 and Ser880/891 sites of GluR1 and GluR2/3 subunits, respectively. These results suggest that constitutive cPLA₂ and iPLA₂ systems may differentially influence AMPA receptor properties and function in the rat brain through mechanisms involving PKC activity.

4.3 INTRODUCTION

Phospholipases A₂ (PLA₂s) are a large and diverse superfamily of enzymes which primarily catalyze the hydrolysis of membrane phospholipids at the sn-2 position to generate lysophospholipids and free fatty acids [17]. These enzymes are well-known for their involvement in the regulation of inflammation, immune function and smooth muscle contraction through the generation of arachidonic acid and its subsequent metabolism to eicosanoids (prostaglandins, leukotrienes, etc.) via cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes [17,19]. More than 19 isoforms of PLA₂s have been identified so far and classified in three main groups, namely, the cytosolic calcium-dependent group (cPLA₂), the calcium-independent group (iPLA₂) and the secreted group. In the brain, cPLA₂ and iPLA₂ systems have attracted considerable attention because of their possible involvement in learning and memory [9], the formation of long-term potentiation [21], and the development of several neurological diseases [32]. For example, there have been reports that treatment with the cPLA₂-preferential inhibitor arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF3) confers significant protection against kainic acid- and amyloid-induced neuronal damage in vitro [2,7].

Recent experimental results have provided evidence that constitutive iPLA₂ activity interacts with synaptic function by modulating phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) subtype of glutamate receptors in pyramidal neurons of the hippocampus [23,28]. Although the molecular link between iPLA₂ and AMPA receptor phosphorylation remains to be elucidated, it has been found that endogenous iPLA₂ activity controls AMPA-mediated synaptic transmission by limiting phosphorylation on serine (Ser) sites of the GluR1 subunit. This observation is of particular interest because AMPA receptor modulation represents one of the basic mechanisms regulating glutamatergic responses and toxicity in many neuronal networks [13]. Whether such modulation occurs under the influence of calcium-dependent forms of the enzyme (cPLA₂) remains, however, largely unknown. In this respect, the aim of the present study was to further investigate the influence of PLA₂ systems on the properties of glutamate receptors. In particular, we compared the effects of cPLA₂ and iPLA₂ inhibitors on the phosphorylation of both AMPA and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Animals and tissue preparation

Male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Canada (St-Constant, Quebec) at the age of 1 month (100-125 g) and were used 1 week after their arrival. They were kept in individual cages under a 12:12-h light-dark cycle in a facility that met laboratory standards (NIH Publication No. 86-23, revised 1985) and the Canadian Council on Animal Care guidelines. The animals had access to standard chow and water *ad libitum*. They were anesthetised, and their brains were quickly removed and frozen in isopentane at -20°C. Horizontal 30-µm thick brain sections were cut in a cryostat, thaw-

mounted and stored at -70°C . Only sections obtained at the level of the dorsal hippocampus were used. Generally, twelve sections were placed on four slides to obtain enough tissue for immunoprecipitation and Western blots.

4.4.2 Immunoprecipitation

Samples were immunoprecipitated to obtain enough phosphorylated subunits for Western blot detection as described previously [4,23,26]. Briefly, adjacent rat brain sections were preincubated for 60 min at 35°C in 45 mL of 100 mM Tris-acetate buffer (pH 7.4) containing 100 μM EGTA with or without PLA₂ inhibitors; the decision to use EGTA was based on previous reports indicating that AMPA receptor subunits are very sensitive to C-terminal degradation by calcium-dependent proteases [5]. Moreover, biochemical studies showed that, even at concentrations exceeding 1mM, EGTA only slightly interfered with cPLA₂ activity in the brain [10]. Tissue was collected, homogenized and centrifuged to obtain membrane fractions [11]. Briefly, homogenates were centrifuged at 1,000xg for 10 min, and the supernatants were centrifuged at 11,500xg for 20 min. The resulting pellet, P2, was defined as the crude synaptosomal fraction, and protein levels were measured by Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario). 50-100 μg of synaptic membranes were suspended in lysis buffer (100 mM Tris/HCl, 100 μM EGTA, pH 7.4) containing 1% sodium dodecyl sulfate, heated at 100°C for 5 min, and diluted in cold lysis buffer containing 2% Triton X-100. Protein A/G-agarose (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) and antibodies recognizing the C-terminal domain for the AMPA receptor GluR1 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Upstate Biotechnology) or GluR2 subunit (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and for the NMDA receptor NR1 subunit (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Santa Cruz Biotechnology) were added to the supernatant and incubated overnight with agitation at 4°C . Immunoreactive complexes were

recovered by centrifugation and washed with lysis buffer. Proteins were finally eluted in 4x sample buffer and heated at 100°C for 5 min.

4.4.3 Electrophoresis and immunoblotting

Western blot analysis was conducted on aliquots of immunoprecipitated proteins obtained from both control and PLA₂ inhibitor-treated sections. The aliquots were first subjected to sodium dodecyl sulfate-8% polyacrylamide gel electrophoresis [18], and proteins were transferred onto nitrocellulose membranes [34]. The membranes were incubated for 1 h at room temperature in phosphate-buffered saline containing 5% dry non-fat milk to block non specific sites. They were then incubated with primary antibodies: phospho-GluR1 Ser831 (0.5 µg/mL, Upstate Biotechnology), phospho-GluR2/3 Ser880/891 and phospho-NR1 Ser896/897 (0.5 µg/mL, Santa Cruz Biotechnology). Bands corresponding to the GluR and NR subunits were detected with a peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and a chemiluminescent peroxide substrate (MJS Biolynx, Brockville, Ontario). The immunoblots were placed on a Northern light illuminator, and the resulting computer-generated images were analyzed semi-quantitatively by densitometry with a microcomputer imaging device (Imaging Research, MCID, St. Catherines, Ontario) providing peak areas and apparent molecular weights.

4.4.4 Agents

The PLA₂ inhibitors AACOCF₃ (IC₅₀, 2.5 µM) and bromoenol lactone (BEL, IC₅₀, 0.1-1 µM) were purchased from BIOMOL Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA) and dissolved in DMSO (0.2% final concentration). Their chemical structures appear in Figure 1A. Okadaic acid, the inhibitor of

protein phosphatases (PP) – PP1, IC₅₀: 42 nM; PP2A, IC₅₀: 0.51 nM; PP2B, IC₅₀: 5,000 nM; PP2C, IC₅₀: 10,000 nM - and Ro 31-8220, the cell-permeable protein kinase C (PKC) inhibitor, IC₅₀: 10 nM, were also purchased from BIOMOL Research Laboratories. All others chemical reagents were obtained from Sigma-Aldrich.

4.4.5 Statistical analysis

In all cases, data are presented as means ± S.E.M. Differences in subunit phosphorylation levels were compared by analysis of variance, followed by Bonferroni's post hoc analysis (GraphPad Prism 4) with conventional criteria of statistical significance: *P*-values of < 0.05.

4.5 RESULTS

4.5.1 PLA₂ inhibitors differentially modulate phosphorylation of AMPA receptor subunits

In neurons, cPLA₂ and iPLA₂ enzymes represent the predominant forms of PLA₂ activity [21,36]. The influence of these enzymes on the phosphorylation of AMPA and NMDA receptors was compared by incubating frozen-thawed rat brain sections with the iPLA₂ inhibitor BEL or the cPLA₂ inhibitor AACOCF3 (Fig. 1A). As shown in Figure 1B, in synaptosomal P2 fractions, phosphorylation was markedly enhanced (by about 75%) on residue Ser831 of AMPA receptor GluR1 subunits present in synaptic membranes when brain sections were incubated with 3 μM BEL. In the same sections, phosphorylation on residues Ser880/891 of GluR2/3 subunits was not affected by the iPLA₂ inhibitor BEL. Interestingly, treatment of rat brain sections with 3 μM AACOCF3 produced the opposite effect, as incubation

with the cPLA₂ inhibitor resulted in a 51% increase of GluR2/3 Ser880/891 phosphorylation but did not modify GluR1 phosphorylation (Fig. 1B). We also investigated, in the same sections, whether NMDA receptor phosphorylation was regulated by PLA₂ inhibitors. In contrast to AMPA receptors, neither BEL nor AACOCF3 modified phosphorylation at Ser896/897 of NMDA receptor NR1 subunits (Fig. 1C).

Several studies have indicated that protein phosphatases (PP) play a critical role in regulating AMPA receptor phosphorylation [30]. Therefore, we determined whether okadaic acid, a potent, selective, and cell permeable inhibitor of PP (PP1, PP2A, PP2B and PP2C) [33] interfered with BEL- and AACOCF3-induced changes in AMPA receptor phosphorylation. A 75 min preincubation of brain sections with 10 μ M okadaic acid alone resulted in a $20 \pm 5\%$ increase in the levels of phosphorylation at the Ser831 sites of GluR1 subunits and a $15 \pm 5\%$ enhancement on residues Ser880/891 of GluR2/3 subunits. Up-regulation of AMPA receptor phosphorylation was much higher in synaptosomal P2 fractions following concomitant incubation of okadaic acid and PLA₂ inhibitors. Fig. 1D illustrates the capacity of BEL and AACOCF3 to up-regulate AMPA receptor phosphorylation in the presence of okadaic acid. It can be observed that okadaic acid pretreatment does not reduce the effects of PLA₂ inhibitors on GluR subunit phosphorylation. Specifically, we found that GluR1 phosphorylation was increased by $70 \pm 10\%$ after BEL treatment whereas GluR2/3 phosphorylation was augmented by $50 \pm 6\%$ with AACOCF3 (Fig. 1D), thus indicating that the effects of PLA₂ inhibitors are not occluded by okadaic acid.

To further investigate the mechanisms responsible for the regulation of AMPA receptor, we next explored the influence of protein kinase inhibitors on PLA₂ inhibitor-mediated phosphorylation of GluR subunits. We report here the results obtained with one of them, a cell permeable PKC inhibitor. As

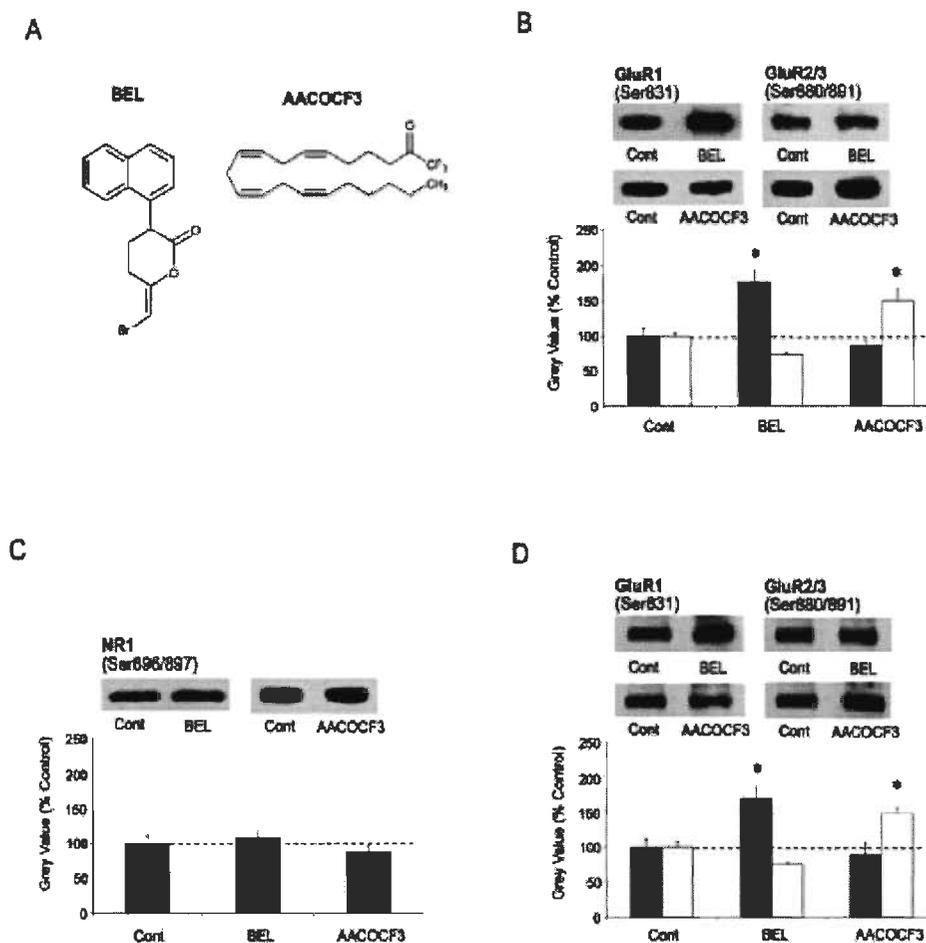


Figure 4.1 cPLA₂ and iPLA₂ inhibitors differentially modulate the phosphorylation of AMPA receptor subunits. Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 60 min with DMSO alone (control) or 3 μM of the PLA₂ inhibitors BEL or AACOCF3 (chemical structures of both compounds are presented in **A**). **B**) Aliquots of control and inhibitor-treated synaptosomal P2 fractions were immunoprecipitated and then processed for immunoblotting and staining, using antibodies against phospho-GluR1 Ser831 (closed bars) and phospho-GluR2/3 Ser880/891 (open bars). Blots were digitized, and the intensity of the bands was quantified (grey values). **C**) As in B, but using an antibody against phospho-NR1 Ser896/897. **D**) Same as in B, except that the phosphatase inhibitor okadaic acid (10 μM) was added 15 min before preincubation with PLA₂ inhibitors. Data are expressed as percent of basal value in control sections and are means ± SEM of values obtained from 6 rats. Representative immunoblots are presented above each graph. **P* < 0.001 (Bonferroni's post hoc analysis), inhibitor-treated vs. control sections.

illustrated in Fig. 2, pre-treatment of rat brain sections with this PKC inhibitor significantly reduced the BEL-induced increase in phosphorylation at the Ser831 sites of GluR1 subunits (BEL alone: $61 \pm 9\%$ increase; BEL + PKC inhibitor: $3 \pm 5\%$ increase). Similarly, preincubation of sections with the PKC inhibitor reduced the effect of AACOCF3 on phosphorylation of residues Ser880/891 of GluR2/3 subunits ($1 \pm 7\%$ increase) when compared to sections preincubated with AACOCF3 alone ($38 \pm 4\%$ increase).

4.5.2 PLA₂ inhibitors do not influence the amount of membrane-bound AMPA receptor subunits

The observation that phosphorylation of AMPA receptor subunits is influenced by BEL and AACOCF3 predicts that receptor levels might also be altered by those compounds [6]. Therefore, we studied the effects of PLA₂ inhibitors on the amount of GluR1 and GluR2/3 proteins in synaptosomal P2 fraction. In this respect, we observed that preincubation of rat brain sections with BEL or AACOCF3 did not elicit any significant change in the amount of GluRs proteins in this fraction (Fig. 3A). No significant difference in NR1 protein levels was neither detected in synaptosomal fractions prepared from both control and BEL- or AACOCF3-treated sections (Fig. 3B). Similarly, both inhibitors did not cause any significant changes in the amount of the NR2A subunit of NMDA receptors (data not shown). As a control, we also determined the levels of AMPA receptor subunits in the synaptosomal P2 fraction on samples that were initially immunoprecipitated with C-terminal GluR1, GluR2/3 and NR1 antibodies. Again, under these conditions, there was no significant increase in GluR1, GluR2/3 and NR1 levels in sections pre-treated with BEL or AACOCF3 (Fig. 3C).

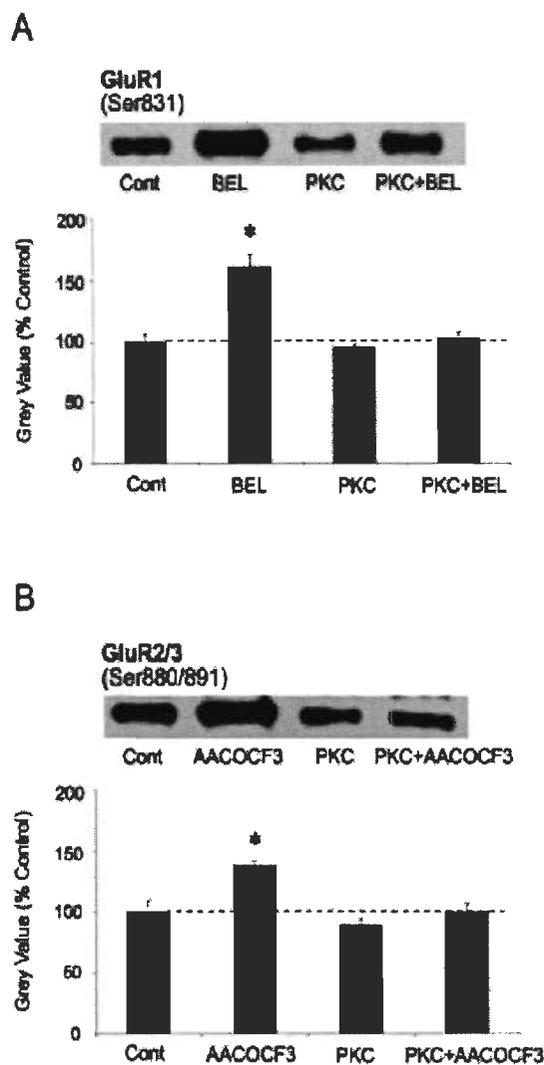


Figure 4.2 Phosphorylation of AMPA receptor subunits by PLA₂ inhibitors is blocked by a cell-permeable PKC inhibitor. Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were pre-treated for 15 min at 35°C with a cell-permeable PKC inhibitor (0.5 μM) followed by a 60 min incubation with 3 μM BEL or 3 μM AACOCF3. **A)** Aliquots of control, BEL-, PKC- and PKC+BEL-treated synaptosomal P2 fractions were immunoprecipitated and then processed for immunoblotting and staining, using antibodies against phospho-GluR1 Ser831. **B)** As in A, except that the effects of the PKC inhibitor on AACOCF3-induced changes in AMPA receptor phosphorylation were tested using an antibody against phospho-GluR2/3 Ser880/890 sites. Data are expressed as percent of basal value in control sections and are means ± SEM of values obtained from 6 rats. Representative immunoblots are presented above each graph. **P* < 0.001 (Bonferroni's post hoc analysis), inhibitor-treated vs. control sections.

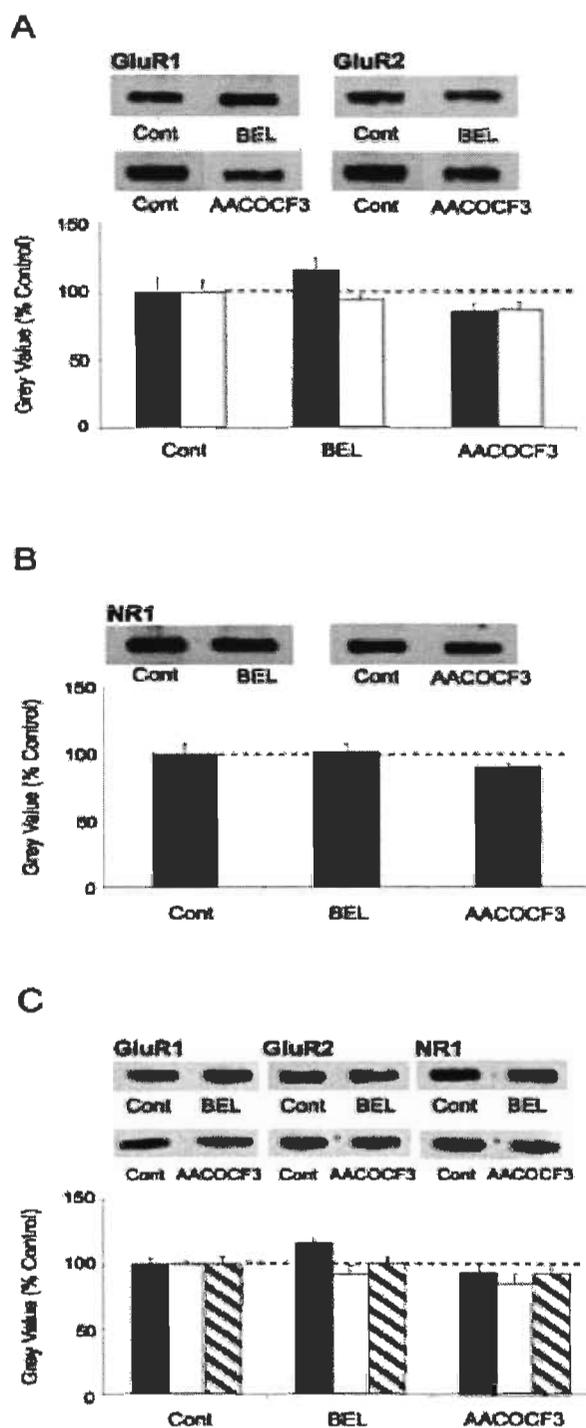


Figure 4.3 Levels of glutamate receptor subunits in synaptic membranes are not influenced by cPLA₂ and iPLA₂ inhibitors. Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 60 min with DMSO alone (control), 3 μM BEL or 3 μM AACOCF3. Synaptosomal P2 fractions were prepared by subcellular fractionation. **A)** Control and inhibitor-treated fractions were processed for

immunoblotting and staining using antibodies against the C-terminal domains of GluR1 (closed bars) and GluR2 (open bars) subunits. Blots were digitized, and the intensity of the bands was quantified (grey values). **B)** As in A, but using a C-terminal antibody against the NR1 subunit. **C)** Synaptosomal P2 fractions were first immunoprecipitated and then processed for immunoblotting and staining, using C-terminal antibodies against GluR1 (closed bars), GluR2 (open bars) and NR1 (hatched bars) subunits. Data are expressed as percentages of basal values in control sections and are means \pm SEM of values obtained from 6 rats. Representative immunoblots are presented above each graph.

4.6 DISCUSSION

Collectively, the results presented in this study suggest that GluR subunits of AMPA receptors are differentially regulated by PLA₂ enzymes. In particular, our data indicate that phosphorylation of GluR1 subunits occurs in rat brain sections preincubated with the iPLA₂ inhibitor BEL, whereas treatment with the cPLA₂ inhibitor AACOCF3 produces selective phosphorylation of GluR2/3 subunits. Phosphorylation of NMDA receptor subunits was completely insensitive to both cPLA₂ and iPLA₂ inhibitors, reinforcing the possibility that only the AMPA subtype of glutamate receptors are regulated by PLA₂ enzymes [21]. Although we did not verify if BEL and AACOCF3 are selective blockers of cPLA₂ and iPLA₂ in our preparation, there are reasons to believe that both inhibitors are acting on specific PLA₂ systems. First, biochemical studies on constitutive cPLA₂ and iPLA₂ have demonstrated that both forms of activities can be detected in rat brain homogenates [25,36]. From a pharmacological perspective, it was also found that AACOCF3 (not BEL) can selectively block cPLA₂ activity in the brain [8], whereas iPLA₂ activity was reported to be inhibited by BEL and not by AACOCF3; at least for concentrations up to 5 μ M [14]. Hence, under our conditions, we believe that the effects on AMPA receptor phosphorylation generated by BEL and AACOCF3 might result from preferential actions on iPLA₂ and cPLA₂ activities, respectively. Of course, additional experiments

using antisense oligonucleotides that inhibit the expression of different PLA₂ isoforms would provide better indications on the specific roles of PLA₂ systems in the regulation of AMPA receptor properties.

To further characterize the mechanisms responsible for phosphorylation of AMPA receptor subunits by cPLA₂ and iPLA₂ inhibitors, the effects of compounds known to interact with phosphorylation/dephosphorylation reactions were tested. First, since AMPA receptor subunits are sensitive to phosphatase enzymes [31], the question arises as to whether facilitation of AMPA receptor phosphorylation by cPLA₂ and iPLA₂ inhibitors could result from interactions with these enzymes. However, this possibility seems unlikely given that blockade of phosphatase activities with okadaic acid had no effect on phosphorylation enhancement elicited by PLA₂ inhibitors. Nevertheless, the fact that BEL- and AACOCF₃-induced changes in GluR subunits phosphorylation can be blocked by a cell permeable PKC inhibitor strongly suggest that iPLA₂ and cPLA₂ may regulate AMPA receptor properties by interacting with PKC activity in rat brains. The recent finding that the purinoceptor-mediated association of γ PKC, a neuron-specific subtype of PKC, with the plasma membrane is shortened by BEL and AACOCF₃ [35] is supportive for such modulatory roles by PLA₂ enzymes. On the other hand, it has been discovered that iPLA₂ and cPLA₂ enzymes are differentially distributed within cell compartments [15,25], suggesting that both inhibitors could exert distinct actions on receptors depending on their localization in neurons (intracellular vs membrane receptors). Considerable body of evidence also indicates that PLA₂-induced changes in phospholipid environment of membranes are important for regulating AMPA receptor conformation [17] and we cannot exclude the possibility that PLA₂ inhibitors could alter GluR phosphorylation by changing AMPA receptor conformation, thus exposing their phosphorylation sites.

For years, AMPA receptors have been suspected to be under the influence of PLA₂ activities [21]. In fact, the majority of studies performed over the last decade have focused on the changes in receptor affinity by treatments of synaptic membranes with exogenous PLA₂s [22]. As previously reported, we observed in the current investigation that the iPLA₂ inhibitor BEL promotes phosphorylation at Ser sites of GluR1 subunits of AMPA receptors [23]. In a recent study, we have also demonstrated that injection of iPLA₂ inhibitors into postsynaptic CA1 pyramidal neurons generated a gradual and robust enhancement in the amplitude of AMPA receptor-mediated EPSCs [28]. Given the observations described here regarding a possible role of PKC in the regulation of GluR1 subunits by iPLA₂ enzymes, we speculate that these two pathways may cooperate together to influence AMPA receptor-mediated synaptic transmission. In this regard, it would be of great interest to determine whether iPLA₂ systems are implicated in the development of physiological processes which are known to require up-regulation of AMPA receptor phosphorylation by PKC enzymes [31]. Assuming, for example, that iPLA₂ contributes with PKC to phosphorylation of AMPA receptors during long-term potentiation, we should then expect iPLA₂ inhibitors to occlude LTP formation in hippocampal slices. However, this notion is complicated by reports that many iPLA₂ isoforms (iPLA₂α, iPLA₂β and cPLA₂γ) are expressed in the brain [15], and further investigations will be required to determine which isoforms is implicated in phosphorylation of AMPA receptors by PKC.

We have also underscored in the present investigation that, in contrast to iPLA₂, cPLA₂ activity does not interact with GluR1 phosphorylation, but can instead influence GluR2/3 subunit phosphorylation. From a functional perspective, previous studies have demonstrated that phosphorylation of GluR2 subunits, through interaction with PDZ-binding proteins, is sufficient to mediate internalization of AMPA receptors [12,31]. Thus, the present finding that AACOCF3 treatment heightened GluR2/3 phosphorylation raises the intriguing possibility that cPLA₂ could eventually influence the surface

expression of AMPA receptors in neurons. Here, experiments on frozen-thawed brain sections failed to detect significant variations in AMPA receptor levels in crude synaptosomal fractions, indicating that over a short period of time, AACOCF3-induced phosphorylation is not accompanied by receptor internalization. However, due to the unphysiological nature of the preparation used, we cannot rule out this possibility, and studies using organotypic hippocampal slice cultures are currently being conducted to evaluate if blockade of cPLA₂ activity alters AMPA receptor surface expression. In fact, initial studies on glutamate receptor phosphorylation using this system indicate that, following long-term exposure (i.e. 12 hr), both BEL and AACOCF3 could elicit changes in AMPA receptor phosphorylation as well as redistribution of GluR subunits in synaptosomal P2 fractions (unpublished observations).

Independently of the mechanisms involved, these results have interesting implications regarding the potential of PLA₂ enzymes in neurodegenerative diseases [2,7,16]. As far as the cPLA₂ system is concerned, it has been observed that AACOCF3-treated and cPLA₂ knockout mice are more resistant to neuronal death after ischemic insult [1,29]. Our results described here strongly suggest a regulatory role of cPLA₂ in the phosphorylation of AMPA receptor GluR2/3 subunits, which have been identified as contributors of post-ischemic neurodegeneration [13,24]. The pathological significance of these findings is further reinforced by the observations that cPLA₂ activity is altered in the brain during schizophrenia [27], epilepsy [3] and Alzheimer's disease [20].

4.7 REFERENCES

- [1] K. Arai, Y. Ikegaya, Y. Nakatani, I. Kudo, N. Nishiyama, N. Matsuki, Phospholipase A2 mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional

difference of neuronal vulnerability, *Eur. J. Neurosci.* 13(12) (2001) 2319-2323.

[2] C. Bate, R. Veerhuis, P. Eikelenboom, A. Williams, Neurones treated with cyclo-oxygenase-1 inhibitors are resistant to amyloid-beta1-42, *Neuroreport* 14(16) (2003) 2099-2103.

[3] N.G. Bazan, B. Tu, E.B. Rodriguez de Turco, What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis, *Prog. Brain Res.* 135 (2002) 175-185.

[4] E. Bettini, A. Maggi, A rapid method for the quantitation of estrogen receptors in small amounts of tissue, *J. Immunol. Methods* 144(1) (1991) 87-91.

[5] X. Bi, J. Chen, S. Dang, R.J. Wenthold, G. Tocco, M. Baudry, Characterization of calpain-mediated proteolysis of GluR1 subunits of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors in rat brain, *J. Neurochem.* 68(4) (1997) 1484-1494.

[6] D.S. Bredt, R.A. Nicoll, AMPA receptor trafficking at excitatory synapses, *Neuron* 40(2) (2003) 361-379.

[7] A.A. Farooqui, W.Y. Ong, L.A. Horrocks, Neuroprotection abilities of cytosolic phospholipase A2 inhibitors in kainic acid-induced neurodegeneration, *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 4(1) (2004) 85-96.

[8] A.A. Farooqui, M.L. Litsky, T. Farooqui, L.A. Horrocks, Inhibitors of intracellular phospholipase A2 activity: their neurochemical effects and

therapeutical importance for neurological disorders, *Brain Res. Bull.* 49(3) (1999) 139-153. Review.

[9] S. Fujita, Y. Ikegaya, N. Nishiyama, N. Matsuki, Ca^{2+} -independent phospholipase A2 inhibitor impairs spatial memory of mice, *Jpn J. Pharmacol.* 83 (2000) 277-278.

[10] S. Grewal, J. Smith, S. Ponnambalam, J. Walker, Stimulation-dependent recruitment of cytosolic phospholipase A2-alpha to EA.hy.926 endothelial cell membranes leads to calcium-independent association, *Eur. J. Biochem.* 271(1) (2004) 69-77.

[11] J.M. Henley, Subcellular localization and molecular pharmacology of distinct populations of [3H]-AMPA binding sites in rat hippocampus, *Br. J. Pharmacol.* 115(2) (1995) 295-301.

[12] J.M. Henley, Protein interactions implicated in AMPA receptor trafficking: a clear destination and improving route map, *Neurosci. Res.* 45 (2003) 243-254.

[13] S.S. Jayakar, M. Dikshit, AMPA receptor regulation mechanisms: future target for safer neuroprotective drugs, *Int. J. Neurosci.* 114(6) (2004) 695-734.

[14] S.S. Kim, D.K. Kim, Y.H. Suh, Cerebral cortical phospholipase A2 activity of senescence-accelerated mouse is increased in an age-dependent manner, *Neurosci. Res.* 29(3) (1997) 269-272.

[15] G.R. Kinsey, B.S. Cummings, C.S. Beckett, G. Saavedra, W. Zhang, J. McHowat, R.G. Schnellmann, Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA₂, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327(1) (2005) 287-293.

- [16] P. Klivenyi, M.F. Beal, R.J. Ferrante, O.A. Andreassen, M. Wermer, M.R. Chin, J.V. Bonventre, Mice deficient in group IV cytosolic phospholipase A2 are resistant to MPTP neurotoxicity, *J. Neurochem.* 71(6) (1998) 2634-2637.
- [17] I. Kudo, M. Murakami, Phospholipases A2 enzymes, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69 (2002) 3-58.
- [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227(259) (1970) 680-685.
- [19] C.C. Leslie, Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production, *Biochem. Cell Biol.* 82 (2004) 1-17.
- [20] W.J. Lukiw, N.G. Bazan, Neuroinflammatory signaling upregulation in Alzheimer's disease, *Neurochem. Res.* 25(9-10) (2000) 1173-1184.
- [21] G. Massicotte, Modification of glutamate receptors by phospholipase A2: its role in adaptive neural plasticity, *Cell Mol. Life Sci.* 57(11) (2000) 1542-1550.
- [22] G. Massicotte, M. Baudry, Brain plasticity and remodeling of AMPA receptor properties by calcium-dependent enzymes, *Genet. Eng. (NY)* 26 (2004) 239-254.
- [23] C. Menard, B. Valastro, M.A. Martel, E. Chartier, A. Marineau, M. Baudry, G. Massicotte, AMPA receptor phosphorylation is selectively regulated by constitutive phospholipase A2 and 5-lipoxygenase activities, *Hippocampus* 15(3) (2005) 370-380.

- [24] E.K. Michaelis, Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging, *Prog. Neurobiol.* 54(4) (1998) 369-415.
- [25] W.Y. Ong, T.L. Sandhya, L.A. Horrocks, A.A. Farooqui, Distribution of cytoplasmic phospholipase A2 in the normal rat brain, *J. Hirnforsch.* 39(3) (1999) 391-400.
- [26] A.G. Papavassiliou, Preservation of protein phosphoryl groups in immunoprecipitation assays, *J. Immunol. Methods* 170(1) (1994) 67-73.
- [27] B.M. Ross, Phospholipid and eicosanoid signaling disturbances in schizophrenia, *Prost. Leukot. Essent. Fatty Acids* 69(6) (2003) 407-412.
- [28] F. St-Gelais, C. Ménard, P. Congar, L.-E. Trudeau, G. Massicotte, Postsynaptic injection of calcium-independent phospholipase A2 inhibitors selectively increases AMPA receptor-mediated synaptic transmission, *Hippocampus* 14(3) (2004) 319-325.
- [29] A. Sapirstein, J.V. Bonventre, Phospholipases A2 in ischemic and toxic brain injury, *Neurochem. Res.* 25(5) (2000) 745-753.
- [30] G.L. Snyder, S. Galdi, A.A. Fienberg, P. Allen, A.C. Nairn, P. Greengard, Regulation of AMPA receptor dephosphorylation by glutamate receptor agonists, *Neuropharmacology* 45(6) (2003) 703-713.
- [31] I. Song, R.L. Huganir, Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity, *Trends Neurosci.* 25(11) (2002) 578-588.

- [32] G.Y. Sun, J. Xu, M.D. Jensen, A. Simonyi, Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 205-213.
- [33] R. Tapia, F. Pena, C. Arias, Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases, *Neurochem. Res.* 24(11) (1999) 1423-1430.
- [34] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350-4354.
- [35] K. Yagi, Y. Shirai, M. Hirai, N. Sakai, N. Saito, Phospholipase A2 products retain a neuron specific γ isoform of PKC on the plasma membrane through the C1 domain – a molecular mechanism for sustained enzyme activity, *Neurochem. Int.* 45 (2004) 39-47.
- [36] H.C. Yang, M. Mosior, C.A. Johnson, Y. Chen, E.A. Dennis, Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A2, *Anal. Biochem.* 269 (1999) 278-288.

4.8 ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to Guy Massicotte (Grant number 105942). Caroline Menard is the recipient of a studentship from NSERC. Christian Patenaude is supported by a postdoctoral fellowship from the Savoy Foundation. The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript.

4.9 ABBREVIATIONS

AACOCF₃, arachidonyl trifluoromethyl ketone; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate; BEL, bromoenol lactone; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PKC, protein kinase C; PLA₂, phospholipase A₂; cPLA₂, calcium-dependent phospholipase A₂; iPLA₂, calcium-independent phospholipase A₂; PP, protein phosphatases; Ser, serine.

CHAPITRE V

CALCIUM-INDEPENDENT PHOSPHOLIPASE A₂ INFLUENCES AMPA-MEDIATED TOXICITY OF HIPPOCAMPAL SLICES BY REGULATING GLUR1 SUBUNIT IN SYNAPTIC MEMBRANES

Caroline **MÉNARD**[†], Émilie **CHARTIER**[†], Christian **PATENAUDE**[†], Pierre **ROBINSON**[†], Michel **CYR**[†], Michel **BAUDRY**[‡] and Guy **MASSICOTTE**[†]

[†]Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières
Trois-Rivières, Québec, Canada

[‡]Neuroscience Program, University of Southern California,
Los Angeles, CA 90089-2520

Running title: PLA₂ and AMPA-mediated toxicity

Number of pages: 28

Number of figures: 9

Number of words: 7,273

Corresponding author's address:

Guy Massicotte

Département de chimie-biologie

U.Q.T.R.

C.P. 500

Trois-Rivières, Canada G9A 5H7

Phone (819) 376-5053

Fax (819) 376-5084

E-mail :Guy.Massicotte@uqtr.ca

Key words: Lipase, excitotoxicity, glutamate receptors, bromoenol lactone, propidium iodide

5.1 RÉSUMÉ

Nous avons préalablement démontré que la phosphorylation des sous-unités GluR1 des récepteurs au glutamate de type AMPA est influencée, à court terme, par l'activité de la $iPLA_2$ dans le cerveau. L'état de phosphorylation de ces récepteurs est critique pour leur maintenance et leur transport au niveau de la membrane synaptique. C'est pourquoi nous avons évalué l'effet d'une perturbation de l'activité $iPLA_2$ sur leur distribution, à court et moyen terme, dans les différents compartiments cellulaires et ce à l'aide d'un système « vivant » : la culture organotypique d'hippocampes. Conformément aux résultats obtenus sur les sections de cerveaux congelés présentés dans les deux chapitres précédents, un traitement avec le BEL, inhibiteur spécifique de la $iPLA_2$, augmente significativement la phosphorylation des résidus Ser831 et Ser845 des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA dans ce système également. Nous avons toutefois observé que seul l'énantiomère (R)-BEL, spécifique à la $iPLA_2\gamma$, est en mesure de reproduire ces résultats. L'inhibiteur de la $iPLA_2\beta$, le (S)-BEL, s'est avéré totalement inefficace. L'inhibition de la $iPLA_2\gamma$ favorise aussi l'insertion de sous-unités GluR1 dans les membranes synaptiques ce qui a pour conséquence d'exacerber la mort cellulaire induite par un traitement avec l'agoniste AMPA. Ce phénomène est cependant limité à la région CA1 de l'hippocampe. Il est de plus aboli par une incubation préalable avec l'IEM 1460 ou la philanthoxine-433, deux antagonistes spécifiques des récepteurs AMPA qui, structurellement, ne présentent pas la sous-unité GluR2. Encore une fois l'activité $iPLA_2$ ne semble pas être d'une importance significative pour les récepteurs NMDA puisque la phosphorylation des sous-unités NR1 tout comme la toxicité induite par une incubation avec l'agoniste NMDA ne sont pas affectés par le (R)- ou le (S)-BEL. Ces résultats, en plus de répondre aux deux premières questions présentées dans la section 1.6, laissent sous entendre que la régulation de la phosphorylation des sous-unités GluR1 des

récepteurs AMPA par la iPLA₂ pourrait représenter un mécanisme crucial de modulation de la mort cellulaire induite par l'excitotoxicité dans l'hippocampe.

5.1.1 Contribution des auteurs de l'article

L'article a été rédigé par Caroline Ménard, le Dr. Christian Patenaude et le Dr. Guy Massicotte. Émilie Chartier a mis au point, dans notre laboratoire, la procédure de mise en plaque des cultures d'hippocampe alors que le protocole lui-même nous a généreusement été fourni par le laboratoire du Dr. Michel Baudry. Elle a également réalisé plusieurs expérimentations qui ont permis d'établir les conditions idéales de traitement. Pour ce qui est de Pierre Robinson, un étudiant gradué de l'équipe du Dr. Michel Cyr, il a lui aussi contribué activement à l'optimisation des paramètres de la culture. Toutes les expériences présentées ont été faites par Caroline Ménard.

Ce manuscrit a été publié en 2007 dans le journal *Hippocampus*, volume 17(11), pages 1109-1120.

5.2 ABSTRACT

We have recently documented that phosphorylation of the GluR1 subunit of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate (AMPA) glutamate receptors is influenced by calcium-independent forms of phospholipase A₂ (iPLA₂) activity in the brain. Given the importance of GluR1 subunit phosphorylation in the control of AMPA receptor delivery to synaptic membranes, we tested the influence of iPLA₂ activity on AMPA receptor distribution between neuronal compartments, using organotypic cultured hippocampal slices. In agreement with earlier reports, the iPLA₂ inhibitor bromoenol lactone (BEL) markedly enhanced the phosphorylation at both

Ser831 and Ser845 residues of the GluR1 subunit. GluR1 subunit phosphorylation levels were selectively increased by (R)-BEL, an enantioselective inhibitor of iPLA₂ γ , but not by (S)-BEL, an iPLA₂ β inhibitor. The iPLA₂ γ inhibitor R-BEL also promoted the insertion of new GluR1 subunits into synaptic membranes and exacerbated AMPA-mediated cell death in the CA1 region of the hippocampus. The latter effect was selectively abolished by IEM 1460 and philanthotoxin-433, two antagonists specific for AMPA receptors lacking GluR2 subunits. These results provide evidence that iPLA₂ γ -related regulation of AMPA receptor GluR1 subunit phosphorylation could represent an important mechanism modulating hippocampal cell death induced by AMPA receptor overstimulation.

5.3 INTRODUCTION

Phospholipase A₂ (PLA₂) constitutes a large and diverse group of enzymes (so far up to 20 isoforms) with a variety of biological functions, ranging from membrane remodelling and turnover to the generation of signalling molecules (Sun et al., 2004). For instance, they control the generation of arachidonic acid (AA), a precursor in the synthesis of eicosanoids. PLA₂s are usually classified into three main categories consisting of cytosolic calcium-dependent PLA₂ (cPLA₂), cytosolic calcium-independent PLA₂ (iPLA₂), and secretory PLA₂ (sPLA₂). In neurons, some AA-derived metabolites resulting from PLA₂ activity are considered to be important regulators of synaptic function (Chabot et al., 1998; Menard et al., 2004), while enhanced production of other AA-derived metabolites, such as eicosanoids, is thought to participate in inflammation and immune responses under numerous neuropathological conditions (Bazan, 2005).

iPLA₂s were classically considered as housekeeping enzymes for the maintenance of membrane phospholipids. Over the last five years, however,

the iPLA₂ family has attracted considerable attention because of its potential role in several membrane-trafficking events interrelated to both endocytic and exocytic processes (Brown et al., 2003). Moreover, iPLA₂s, which appear to be constitutively active in neurons, has recently been proposed to play a role in the regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate (AMPA) receptors, as blockade of constitutive iPLA₂ activity up-regulates AMPA-mediated glutamatergic synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons (St-Gelais et al., 2004). With respect to AMPA receptors, it has been established that their overstimulation can promote neurotoxic actions of glutamate in the brain. In fact, accumulating evidence indicates that dysfunction in iPLA₂ activity is associated with the development of several neurological conditions that are, in some points, characterized by AMPA receptor abnormalities, such as cerebral ischemia, Alzheimer's disease, epilepsy and schizophrenia (Ross et al., 1998; Ross, 2003; Sun et al., 2004). Recent biochemical studies performed on frozen rat brain sections indicate that iPLA₂ enzymes are capable of influencing the phosphorylation of GluR1 subunits forming the AMPA subtype of glutamate receptors (Menard et al., 2005a). Phosphorylation of GluR1 subunits is responsible for regulating the number of AMPA receptors at the membrane surface, a process that might be critically involved in the development of neurodegenerative states (Michaelis, 1998).

Ours is the first investigation to examine the possibility that constitutive iPLA₂ activity in the hippocampus could, through phosphorylation reactions, not only influence AMPA receptor composition and distribution in synaptic membranes, but also modify glutamate receptor-mediated toxicity. We first incubated hippocampal organotypic cultures with iPLA₂ inhibitors and quantified the resulting changes in glutamate receptor phosphorylation and cellular distribution. We then tested the effects of this treatment on glutamate-mediated cell death. Our results indicate that iPLA₂ inhibition, by increasing

GluR1 phosphorylation, augments the number of GluR1-containing AMPA receptors in synaptic membranes and enhances glutamate neurotoxicity.

5.4 MATERIALS & METHODS

5.4.1 Drugs

The iPLA₂ inhibitor bromoenol lactone (BEL, IC₅₀: 0.1-1.0 μM) (Farooqui et al., 1999), the glutamate receptor agonist AMPA, the protein phosphatase (PP) inhibitor okadaic acid and the phosphatidate phosphohydrolase-1 (PAP-1) inhibitor propranolol (Pappu & Hauser, 1983) were purchased from BIOMOL Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA). The enantiomers of BEL ((R)-BEL, IC₅₀: 0.6 μM and (S)-BEL, IC₅₀: 2 μM) were procured from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). The glutamate receptor antagonists IEM 1460, D-AP5 and UBP 302 were supplied by Tocris (Ellisville, MO). The biotinylation reagent Sulfo-NHS-SS-Biotin was purchased from Fisher Scientific (Nepean, Ontario). All other chemical reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Stock solutions of the iPLA₂ inhibitors were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO, final concentration: 0.05%) and stored at -20°C.

5.4.2 Organotypic hippocampal slice

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared according to the method described previously by Stoppini et al. (1991). Hippocampi from 6-8-day-old Sprague-Dawley rats (Charles Rivers Canada, St-Constant, Quebec) were dissected in sterile ice-cold minimum essential media containing 16 mM HEPES, 10 mM Tris-Base, 6.7 mM glucose, and 3 mM MgCl₂. Transverse slices (450 μm) were cut with a McIlwain tissue chopper and transferred to

humidified membrane inserts (0.4 μm , Millipore) (4 slices per insert) in 6-well plates containing 1 mL of culture medium (75% basal Eagle medium, 25% heat-inactivated horse serum, 26 mM HEPES supplemented with 3% Earl balanced salt solution, 25 mM NaCl, 5 mM NaHCO_3 , 0.5 mM ascorbic acid, 48 mM glucose, 0.2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 3 mM glutamine, 0.23 μM insulin and 0.4% penicillin/streptomycin). The slices were placed in an incubator (35°C, 5% CO_2) for 12 days in vitro (DIV) with the medium being changed 3 times a week. The animals were cared for in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

5.4.3 Electrophoresis and immunoblotting

After 12 DIV, organotypic hippocampal slices were incubated (35°C, 5% CO_2) for 1 h or 12 h in serum-free culture medium with or without iPLA₂ inhibitors. To compare subunit levels, slices were collected in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4) containing 100 μM EGTA, 0.32 M sucrose, several protease inhibitors (leupeptin 5 μM , phenylmethylsulfonyl fluoride 200 μM , N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 10 μM okadaic acid, homogenized with a glass-Teflon homogenizer and centrifuged to obtain membrane fractions, as reported previously by Henley (1995). Briefly, the homogenates were centrifuged at 1,000xg for 10 min, and the supernatants were centrifuged at 11,500xg for 20 min. The resulting pellet, P2, was defined as the crude synaptosomal fraction. The P2 fraction was resuspended in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4, with the same concentrations of inhibitors as above), and protein levels in each fraction were measured by Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario).

Western blot analysis was conducted on aliquots of crude synaptic membrane fractions (P2) obtained from both control and iPLA₂ inhibitor-treated hippocampal slice cultures. The aliquots were subjected to sodium

dodecyl sulfate-8% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to the method of Laemmli (1970). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, as described previously (Towbin et al., 1979). To block nonspecific sites, the membranes were first incubated for 1 h at room temperature in phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% dry non-fat milk. They were then incubated with primary antibodies directed against glutamate receptor GluR1, phospho-GluR1 Ser831 or Ser845 residues (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), GluR2, phospho-GluR2/3 Ser880/891, NR1 and phospho-NR1 Ser896/897 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in PBS containing non-fat milk (all antibodies had a final concentration of 0.5 µg/mL). Bands corresponding to the GluR and NR subunits were detected with peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and a chemiluminescent peroxide substrate (MJS Biolynx, Brockville, Ontario). The same labelling procedure was used for negative controls but the primary antibody was omitted. The immunoblots were placed on a Northern light illuminator, and computer-generated images were analyzed semiquantitatively by densitometry with a microcomputer imaging device (Imaging Research, MCID, St. Catherine, Ontario) providing peak areas and apparent molecular weights.

5.4.4 Immunoprecipitation

To obtain enough phosphorylated subunits for Western blot detection, samples were immunoprecipitated. After 12 DIV, organotypic hippocampal slices were incubated for 1 or 12 h at 35°C (5% CO₂) in serum-free culture medium with or without iPLA₂ inhibitors. As described above, tissues were collected, homogenized and centrifuged to obtain P2 crude synaptic fractions. The fractions were resuspended in Tris-acetate buffer (with the same concentrations of protease and phosphatase inhibitors as those mentioned above), and protein levels in each fraction were measured by Bio-Rad protein

assay. 50-100 μg of synaptic membranes were used for immunoprecipitation in each experimental condition (Bettini and Maggi, 1991; Papavassiliou, 1994).

Synaptic membranes were suspended in 150 μL of lysis buffer (100 mM Tris/HCl, 100 μM EGTA, pH 7.4) containing 1% SDS and heated at 100°C for 5 min, followed by dilution in 600 μL of cold lysis buffer containing 2% Triton X-100. Insoluble materials were removed by centrifugation at 15,000 $\times\text{g}$ for 30 min. Protein A-agarose or Protein G-agarose (Upstate Biotechnology) and antibody mixtures (5-10 μL) were added to the supernatant and incubated overnight with agitation at 4°C. Immunoreactive complexes were recovered by brief centrifugation, and the pellets were washed with lysis buffer-2% Triton X-100. Proteins were finally eluted in 4 \times sample buffer containing 2% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, and 0.1% bromophenol blue, then heated at 100°C for 5 min. Immunoprecipitated proteins were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting (see preceding section).

5.4.5 Biotinylation

After 1 h of recovery in culture medium with serum, control and BEL-treated organotypic hippocampal slices were washed twice in saline solution (SS: 137 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.17 mM Na_2HPO_4 , 0.22 mM KH_2PO_4 , 10 mM HEPES, 33 mM glucose, 44 mM sucrose, pH 7.3) and were incubated at room temperature with Sulfo-NHS-SS-Biotin (0.5 mg/mL in SS) for 30 min with agitation (Hall et al., 1997; Holman et al., 2007). Excess biotin was removed by three brief washes with ice-cold harvest buffer (SS with 1 mM EDTA, protease inhibitors – see Electrophoresis and immunoblotting section – and 50 mM ethanolamine; the ethanolamine is present to quench any unreacted Sulfo-NHS-SS-biotin). After the third wash, 300 μL of fresh, ice-

cold harvest buffer was added and slices were homogenized. Samples were centrifuged for 30 min at 16,000xg at 4°C. Supernatants were removed, pellets were suspended by sonication for 8-10 s in a fresh ice-cold solubilization buffer (50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA and protease inhibitors) and incubated for 30 min at 4°C with agitation. Samples were centrifuged again for 30 min (16,000xg at 4°C) and the resulting supernatants were defined as the soluble fraction. Protein level of each soluble fraction was measured by Bio-Rad protein assay.

Streptavidin beads (80 µL/100 µg of proteins; Sigma) were washed three times with a lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, pH 7.4). Biotinylated samples (100 µg of proteins) were added to the beads and mixed at room temperature for 4 h. Beads were recovered by a brief centrifugation and the supernatants were removed. Beads were washed three times with lysis buffer and the biotinylated samples were eluted from the beads using 4x SDS-PAGE loading buffer (containing β-mercapto-ethanol) at 100°C for 5 min. The beads were then vortexed and centrifuged at 16,000xg for 20 min at 4°C. Supernatants were removed and biotinylated protein levels were determined by SDS-PAGE and immunoblotting (see Electrophoresis and immunoblotting section).

5.4.6 Cell death induction and propidium iodide (PI) uptake

After 12 DIV, organotypic hippocampal slices were incubated for 12h at 35°C (5% CO₂) with or without iPLA₂ inhibitors. The medium was then removed, and slices were exposed to serum-free culture medium containing agonists and/or antagonists of glutamate receptors for the next 24h. Hippocampal slices were then allowed to recover for 6 h in serum-free culture medium without glutamate receptor agonists/antagonists before assessment of cell death by PI uptake. PI is a fluorescent dye used as a marker for dead

or dying cells, absorbing blue-green light (493 nm) with red fluorescence (630 nm) (Zimmer et al., 2000). It has been shown previously that the measurement of PI fluorescent intensity in hippocampal slice cultures correlates well with the results from cell counting (Cho et al., 2004; Vornov et al., 1995). After the recovery period, PI (20 µg/mL) was added for 30 min. PI uptake was then monitored under a Model IX70 inverse fluorescent microscope (Olympus, Markham, Ontario) with a Rh-TRiTC filter set (excitation 520-550 nm; emission > 580 nm), and the images were recorded with a SPOT RT digital camera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI). PI uptake was quantified by densitometry measurements after delineating the different subfields, as described previously by Bernardino et al. (2005), using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

5.4.7 Statistical analysis

In all cases, data are presented as means \pm SEM. Differences in subunit levels or phosphorylation were tested by a one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* analysis, whereas comparison of fluorescent intensity (dependent variable) in the different groups and hippocampal regions (independent variables) were compared by a two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* analysis. Significance level was set at $p < 0.05$.

5.5 RESULTS

5.5.1 GluR1 subunit phosphorylation levels are under the influence of iPLA₂γ

We have demonstrated previously that iPLA₂ inhibition up-regulates AMPA receptor GluR1 subunit phosphorylation in rat frozen-thawed brain

sections (Menard et al., 2005a). In the present study, we used organotypic hippocampal slice cultures to verify that iPLA₂ inhibition produced similar effects in a more physiologically relevant situation. As shown in Figure 1A, GluR1 phosphorylation was markedly enhanced at residues Ser831 ($166 \pm 6\%$ of control, $p < 0.001$) and Ser845 ($178 \pm 7\%$ of control, $p < 0.001$) in P2 fractions obtained from cultures treated with 3 μ M BEL for 1h. To assess whether BEL-induced phosphorylation could affect other receptors, we measured the phosphorylation levels of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor NR1 subunits in BEL-treated organotypic hippocampal slices. In contrast to GluR1 subunits, 1h of treatment with BEL did not affect NR1 subunit phosphorylation at Ser896/897 (Fig. 1B), reinforcing the notion that iPLA₂ enzymes preferentially regulate AMPA receptor phosphorylation (Menard et al., 2005a). Phosphorylation levels of GluR1 subunits at Ser831 and Ser845 residues were also elevated in synaptic membranes after 12h treatment with 3 μ M BEL ($133 \pm 5\%$ of control for Ser831 and $153 \pm 6\%$ of control for Ser845, $p < 0.001$). This prolonged exposure to 3 μ M BEL did not influence NR1 subunit phosphorylation at Ser896/897 ($101 \pm 4\%$ of control).

BEL is widely used to identify the role of iPLA₂ in cells because of its high selectivity for iPLA₂ over the other subtypes of PLA₂ such as cPLA₂ and sPLA₂ (Balsinde & Dennis, 1996a; Hazen et al., 1991). However, this inhibitor is also known to interact with another key enzyme in phospholipid metabolism, magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase-1 (PAP-1) (Balsinde & Dennis, 1996b). Therefore, we assessed whether a PAP-1 inhibitor, propranolol, could affect the levels of AMPA receptor phosphorylation (Pappu & Hauser, 1983). In contrast to BEL, 100 μ M propranolol for 1h or 12h had no effect on GluR1 or NR1 subunit phosphorylation (Fig. 1C and 1D), demonstrating that the increased phosphorylation levels of AMPA receptor observed after BEL treatment are likely mediated via iPLA₂ inhibition.

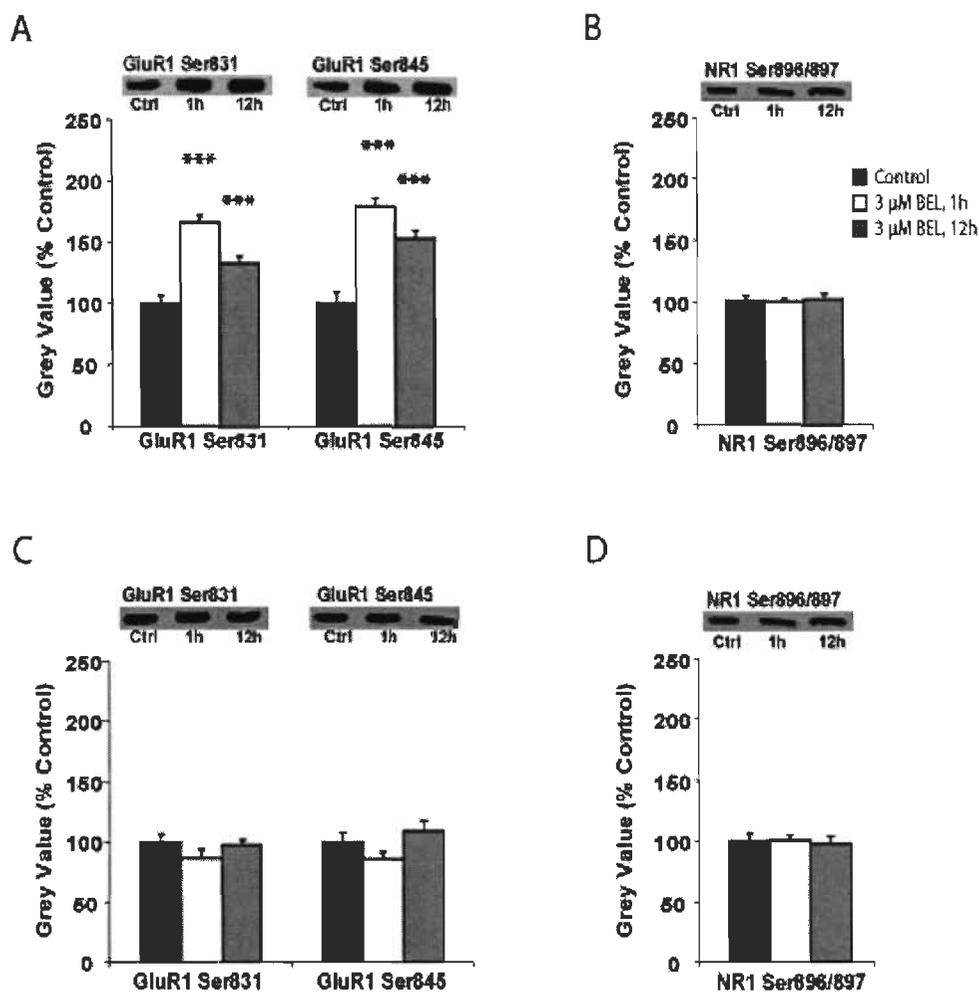


Figure 5.1 Effects of racemic mixture of BEL on phosphorylation levels of GluR1 subunits. Cultured hippocampal slices were incubated with or without iPLA₂ (A and B) or PAP-1 (C and D) inhibitors and processed to obtain crude synaptic (P2) fractions (*see Materials and Methods*). A and B) Phosphorylation of GluR1 (A) and NR1 (B) subunits was assessed using antibodies against GluR1 phosphorylated on serine (Ser) 831 and 845 residues and against NR1 phosphorylated on Ser896/897 in control conditions (filled bars) and after exposure to 3 μ M BEL for 1h (open bars) or 12h (grey bars). Representative immunoblots are illustrated above the bar graphs. Blots were digitized and the intensity of the bands was quantified (grey values). C and D) Same as in A and B, except that cultured hippocampal slices were treated with 100 μ M propranolol. Data are expressed as percentages of values in control conditions (means \pm SEM) obtained from 4 different cultures (n = 24 slices). *** p < 0.001, inhibitor-treated vs control hippocampal slices.

Two iPLA₂ isoforms (iPLA₂γ and iPLA₂β) have been reported to be inhibited by BEL (Jenkins et al., 2002). To determine which isoform contributes to the enhanced phosphorylation of GluR1 subunits in crude synaptic membranes, organotypic hippocampal slices were incubated with the iPLA₂γ-preferential inhibitor R-BEL or the iPLA₂β-preferential inhibitor (S)-BEL (Jenkins et al., 2002). As depicted in Figure 2, GluR1 phosphorylation at Ser831 was significantly increased to $133 \pm 7\%$ ($p < 0.05$) and $155 \pm 9\%$ ($p < 0.01$) of control values after treatment of organotypic hippocampal slices with 3 μM (R)-BEL for 1h and 12h, respectively (Fig. 2A). Similar increases were detected at Ser845 (Fig. 2B) ($150 \pm 12\%$, $p < 0.05$, and $160 \pm 8\%$, $p < 0.01$, of the controls for 1h and 12h incubation, respectively). On the other hand, the enantiomer (S)-BEL had no influence on GluR1 phosphorylation at Ser831 and Ser845 residues (Fig. 2A and B). As for BEL racemic mixture, neither of these two enantiomers had any effect on NR1 phosphorylation levels (Fig. 2C). From a pharmacological perspective, these data suggest that BEL-induced phosphorylation of GluR1 subunits is mediated by inhibition of the γ isoform of iPLA₂ enzyme.

5.5.2 GluR1 subunit levels are elevated at cellular membranes after inhibition of iPLA₂γ

Since (R)-BEL influences the phosphorylation state of GluR1 subunits, we investigated whether AMPA receptor distribution might be altered by such treatment. GluR1, GluR2 and NR1 subunit levels were assessed by Western blotting of homogenates and crude synaptic fractions (P2). The presence of (R)-BEL (3 μM) for 1h in the culture medium did not elicit significant changes in the amount of GluR1 in P2 fractions of organotypic hippocampal cultures (Fig. 3A), but treatment for 12h significantly augmented GluR1 protein levels to $158 \pm 2\%$ of control ($p < 0.001$). GluR1 levels were not affected in homogenates of (R)-BEL-treated cultures after either 1 h or 12 h exposure to

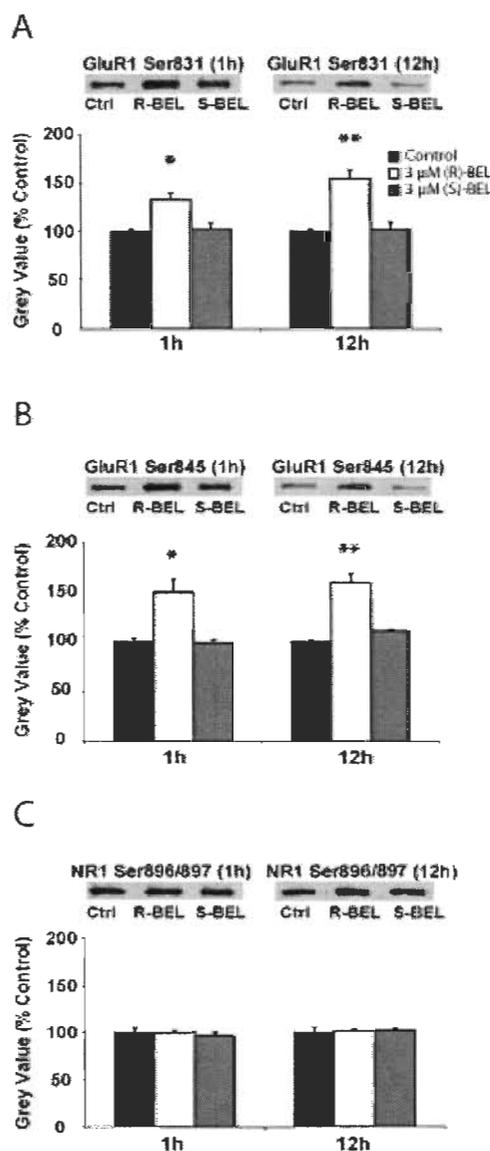


Figure 5.2 Effects of (R)-BEL and (S)-BEL enantiomers on GluR1 phosphorylation in crude synaptic membranes. A and B) GluR1 phosphorylation was quantified by using antibodies against phospho-GluR1 on Ser831 (A) and Ser845 (B) residues in control conditions (filled bars) and after 1h or 12h incubation with 3 μ M of the (R)- and (S)-enantiomers of BEL (open and grey bars, respectively). C) The effect of (R)- and (S)-BEL was also tested on NR1 subunit phosphorylation with an antibody recognizing phospho-NR1 on Ser896/897 residues. A representative immunoblot is illustrated above each graph. Blots were digitized and the intensity of the bands was quantified (grey values). Data in the graphs are expressed as percentages of the values in control conditions and represent means \pm SEM obtained from 5 cultures ($n = 30$ slices for each condition). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, inhibitor-treated vs control hippocampal slices.

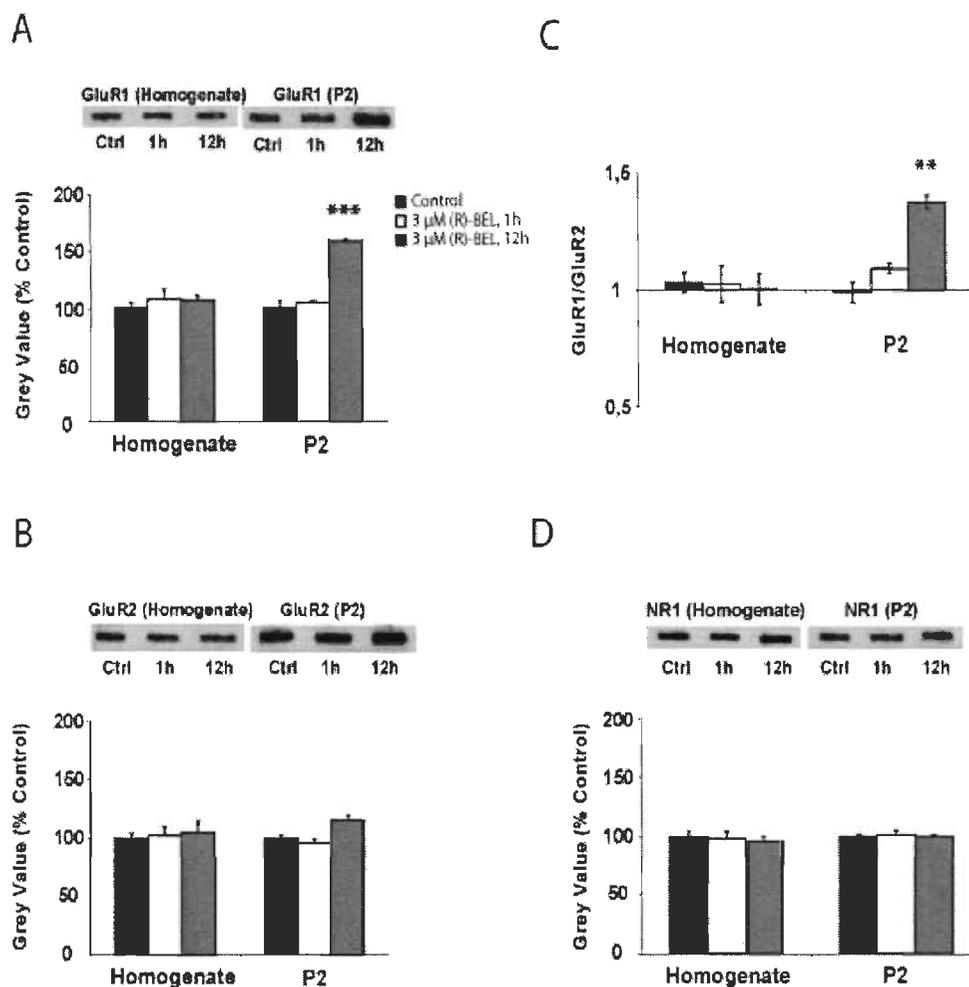


Figure 5.3 Effect of the iPLA₂ γ inhibitor (R)-BEL on GluR1 levels in crude synaptic membranes. A and B) Antibodies directed against the GluR1 (A) and GluR2 (B) subunits were used to analyze levels of the subunits in homogenates and P2 crude synaptic fractions prepared from control cultured hippocampal slices (filled bars) or cultures incubated for 1h (open bars) or 12h (grey bars) with 3 μ M (R)-BEL. Representative immunoblots are shown above the graphs. Blots were digitized and the intensity of the bands was quantified (grey values). Grey values are expressed as percentages of values in control conditions and represent means \pm SEM obtained from 4 different cultures (n = 24 slices). C) GluR1/GluR2 ratios of grey values were measured in homogenates and crude synaptic membrane fractions from control as well as (R)-BEL-treated slices for 1h or 12h. D) Same as in A and B, except that an antibody directed against the NMDA receptor NR1 subunit was used. ** p < 0.01, *** p < 0.001, inhibitor-treated vs control hippocampal slices.

the drug (Fig. 3A), indicating that treatment with the iPLA₂ inhibitor did not modify GluR1 protein synthesis. Furthermore, (R)-BEL treatments (1h and 12h) had no significant effect on GluR2 subunit levels (Fig. 3B) in both homogenates and P2 fractions. The selective increase in GluR1 subunits seen after prolonged iPLA₂γ inhibition was reflected by a higher GluR1/GluR2 ratio in P2 fractions (Fig. 3C). A slight increase in the GluR1/GluR2 ratio was also observed after 1h of treatment, but this effect did not reach significance. No significant variations in the GluR1/GluR2 ratio were detected in homogenates of cultures exposed to (R)-BEL (Fig. 3C). Note that NR1 subunit levels in both homogenates and P2 fractions were unaffected by (R)-BEL treatment (Fig. 3D).

We also tested whether the levels of AMPA and NMDA receptor subunits were altered by (S)-BEL. As in the phosphorylation experiments, GluR1, GluR2 and NR1 subunit levels (as well as the GluR1/GluR2 ratio) were not affected in either homogenates or crude synaptic membranes by the continuous presence of 3 μM (S)-BEL in the culture medium for 1h or 12h (Fig. 4). The influence of iPLA₂ inhibition on surface expression of GluR1 subunits was also confirmed by biotinylation of AMPA receptors (Hall et al., 1997). As shown in Figure 5, the surface level of GluR1 subunits was significantly increased to 163 ± 12% of control in cultured slices treated by (R)-BEL (3 μM, 12h). Here again, (S)-BEL had no significant effect on surface GluR1 subunits (100 ± 8% of control). Taken together, these results suggest that constitutive iPLA₂γ activity may selectively control GluR1 subunit phosphorylation and distribution in synaptic membranes.

5.5.3 (R)-BEL exacerbates AMPA-mediated toxicity

The fact that (R)-BEL treatment results in enrichment of GluR1 but not GluR2 in synaptic membranes predicts that iPLA₂γ inhibition may influence

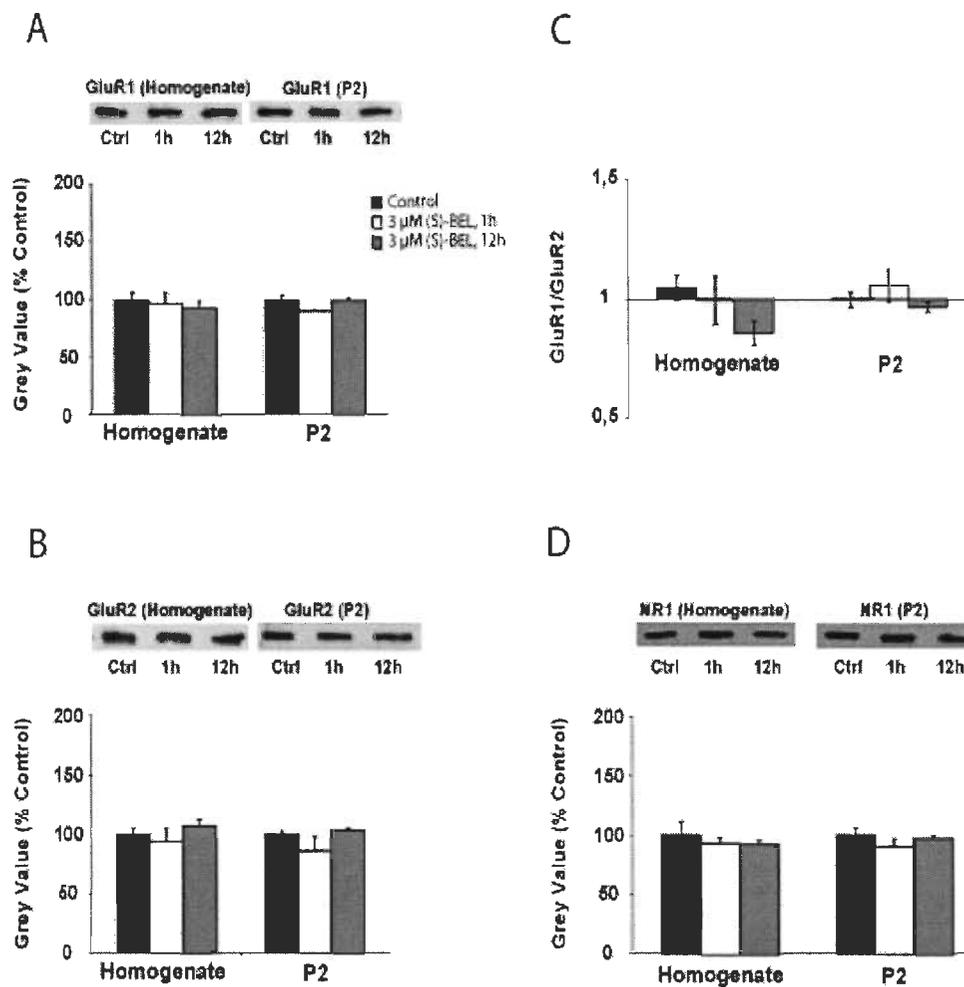


Figure 5.4 Effect of the iPLA₂ β inhibitor (S)-BEL on the subcellular distribution of subunits of AMPA and NMDA receptors. A and B) The amount of AMPA receptor subunits was quantified by immunoblotting with antibodies directed against GluR1 (A) or GluR2 (B) subunits in homogenates and P2 crude synaptic fractions prepared from control cultured hippocampal slices (filled bars) or cultures incubated for 1h (open bars) or 12h (grey bars) with 3 μ M (S)-BEL. Representative immunoblots are shown above the graphs. Blots were digitized and the intensity of the bands was quantified (grey values). Grey values are expressed as percentage of values obtained in control conditions and represent means \pm SEM from 4 different cultures ($n = 24$ slices). C) GluR1/GluR2 ratios of grey values were measured in homogenates and crude synaptic membrane fractions from control as well as 1h and 12h (S)-BEL-treated slices. D) Same as in A and B, except that an antibody directed against the NMDA receptor NR1 subunit was used.

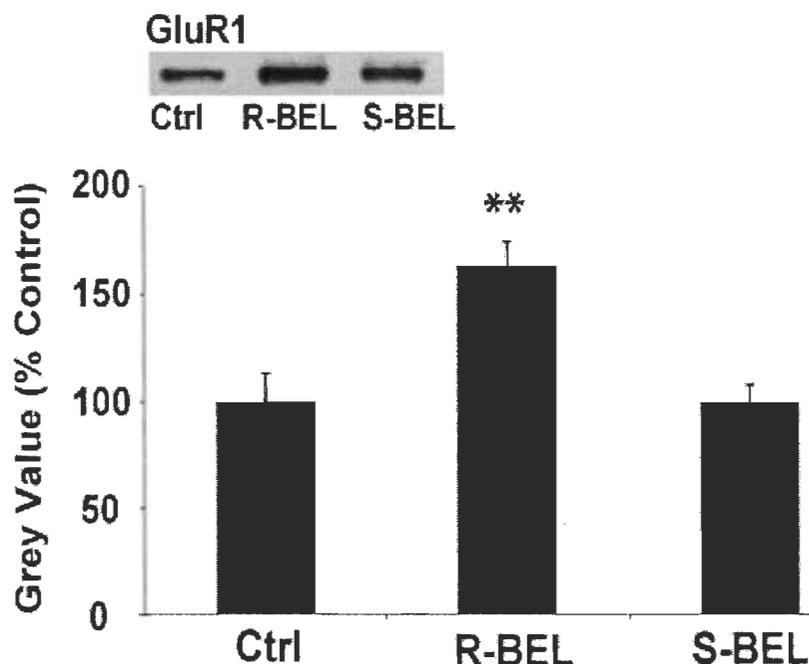


Figure 5.5 GluR1 subunits surface expression in BEL-treated cultured hippocampal slices. Organotypic hippocampal cultures were biotinylated after 12h of treatment without (Ctrl) or with the (R)- and (S)-enantiomers of BEL (3 μ M). The surface expression of the GluR1 subunit was determined by immunoblotting. A representative immunoblot is shown above the graph. Blots were digitized and the intensity of the bands was quantified (grey values). Grey values are expressed as percentages of values in control conditions and represent means \pm SEM obtained from 3 different cultures (n = 18 slices). ** $p < 0.01$, inhibitor-treated vs control hippocampal slices.

AMPA receptor function (Geiger et al., 1995). We explored this possibility by monitoring AMPA-induced cell death, which was measured by PI uptake in organotypic hippocampal slices pre-treated with vehicle (0.05% DMSO) or with iPLA₂ inhibitor (R)-BEL (3 μ M, 12h) and exposed to AMPA for 24h. As shown in Figure 6, basal PI uptake was very low in CA1, CA3 and the dentate gyrus (DG) of control slices. Application of AMPA dose-dependently increased PI uptake in all hippocampal subfields. 3 μ M AMPA produced a marked increment of PI uptake, which reached a maximum at a concentration of 100 μ M AMPA (Fig. 6B). 12h pre-treatment of hippocampal slice cultures to

3 μM (R)-BEL augmented PI uptake elicited with 10 μM AMPA by $89 \pm 6\%$ in area CA1 (Fig. 7A). Interestingly, the same treatment had no effect on AMPA-induced cell death in CA3 or the DG (Fig. 7B, C). In contrast to (R)-BEL, pre-treatment with 3 μM (S)-BEL (Fig. 7) or 100 μM propranolol (data not shown) failed to modify AMPA-induced toxicity in any subfields. Treatment with (R)- or (S)-BEL alone did not affect the viability of hippocampal slice cultures.

In agreement with our results described above demonstrating the lack of action of iPLA₂ inhibition on NMDA receptor phosphorylation and distribution, Figure 8 reveals that (R)-BEL did not alter, in any of the hippocampal subfields, neuronal toxicity elicited by 10 μM NMDA. Pharmacological experiments with antagonists of NMDA and kainate receptors were also performed to dissect out the involvement of glutamate receptors in the exacerbation of AMPA-induced toxicity by (R)-BEL. The presence of the NMDA receptor antagonist D-AP5 (50 μM) during the application of 10 μM AMPA slightly decreased PI uptake to $83 \pm 7\%$ of the controls (Fig. 9). However, D-AP5 had no effect on the potentiation of AMPA toxicity by (R)-BEL, as PI uptake remained significantly increased to $145 \pm 9\%$ of control in the CA1 subfield when D-AP5 was co-applied with 10 μM AMPA. Similarly, the selective and potent kainate receptor antagonist UBP 302 (1 μM) by itself slightly decreased AMPA-induced PI uptake in the CA1 subfield ($76 \pm 8\%$ of control), but did not influence the exacerbating effect of (R)-BEL on AMPA-mediated toxicity (Fig 9). Because (R)-BEL selectively increased GluR1 subunit levels on neuronal membranes, we next verified whether the accumulation of GluR2-lacking AMPA receptors contributed to the action of (R)-BEL on AMPA-induced toxicity. We found that application of 250 μM IEM 1460, a selective GluR2-lacking AMPA receptor antagonist, had no effect on PI uptake elicited by AMPA (Fig. 9) ($98 \pm 9\%$ of control), but abolished the exacerbating effect of (R)-BEL ($104 \pm 8\%$ of control). Similarly, another GluR2-lacking AMPA receptor antagonist, philanthotoxin-433 (10 μM), also completely abolished the exacerbating effect of (R)-BEL on AMPA-induced

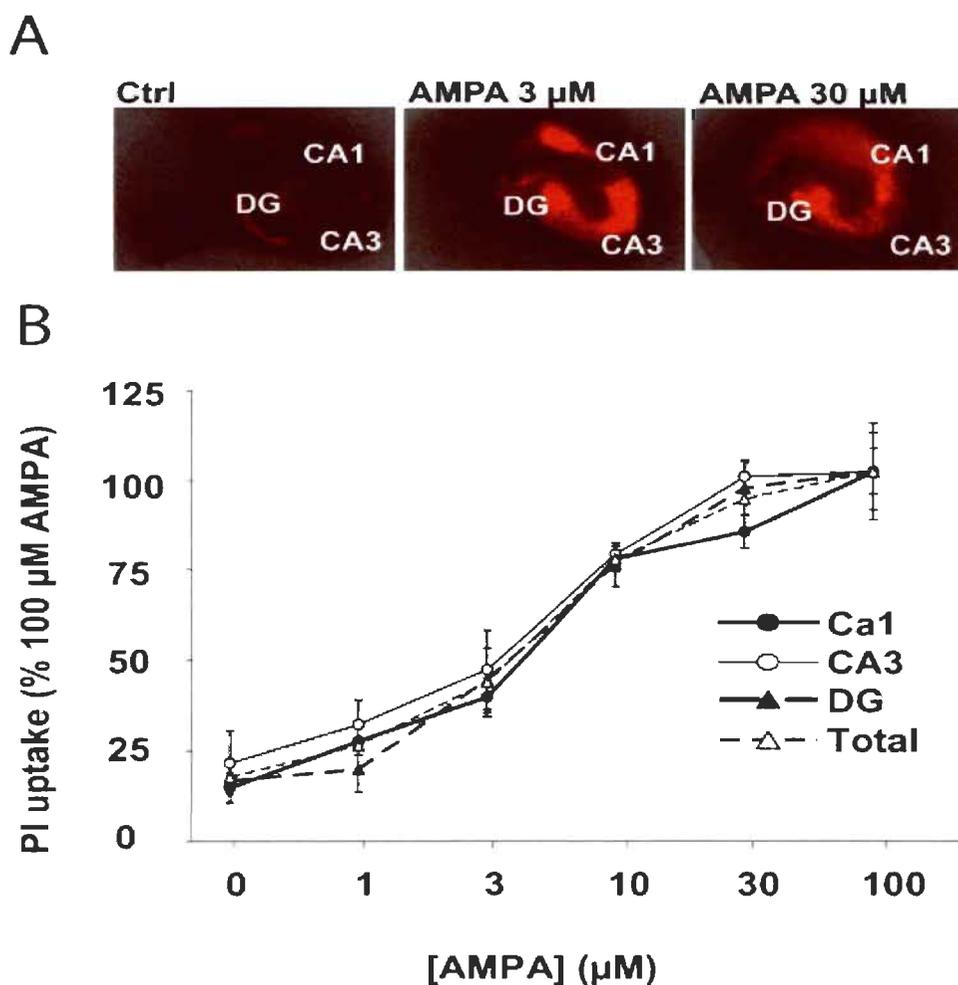


Figure 5.6 Effects of AMPA on PI uptake in organotypic hippocampal slice cultures. A) Fluorescence images of PI uptake in control conditions and after treatment of cultured hippocampal slices (12 DIV) with 3 μM or 30 μM AMPA for 24h. Scale bar, 500 μm . B) Effects of increasing AMPA concentrations on PI uptake in CA1 (closed circles), CA3 (open circles), DG (closed triangles) and in the whole slice (total, open triangles) after exposure to AMPA for 24h, followed by a 6h recovery period. Data are expressed as percentages of fluorescence intensity measured with 100 μM AMPA (100%), and represent the means \pm SEM of values obtained from 16 slices.

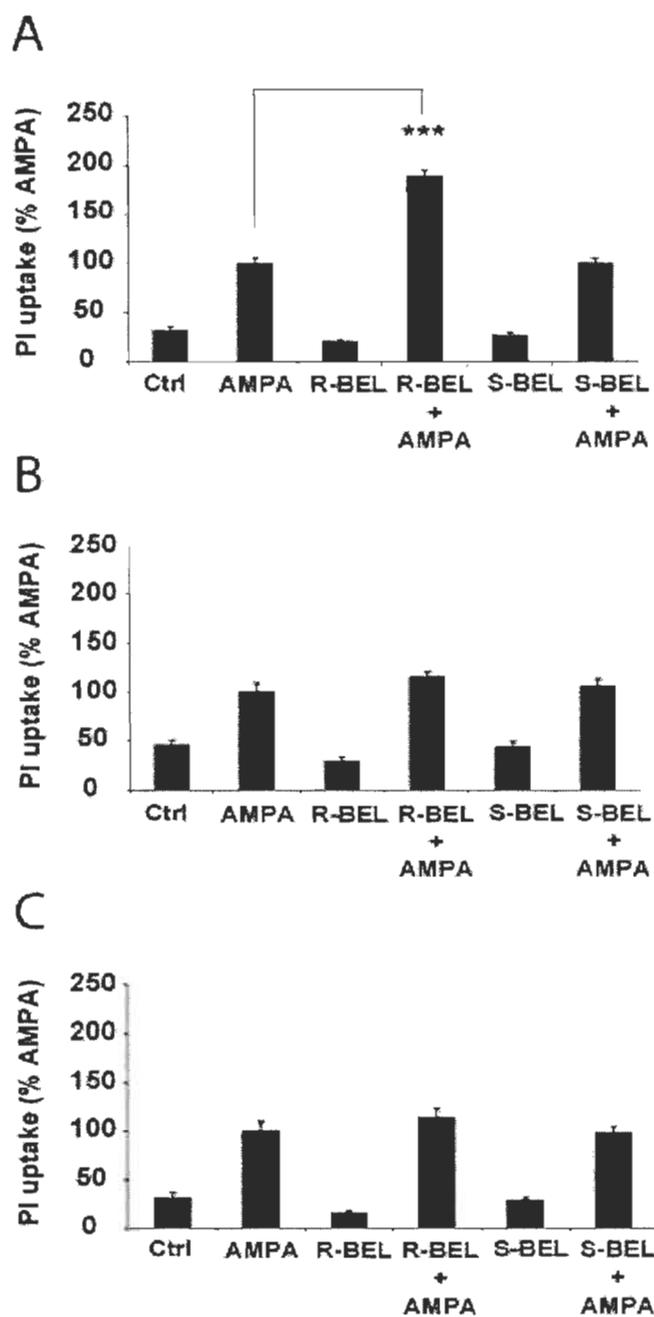


Figure 5.7 Effects of iPLA₂ γ or iPLA₂ β inhibitors on AMPA-induced excitotoxicity in cultured hippocampal slices. Effects of 3 μ M (R)- and (S)-BEL on basal PI uptake and on PI uptake elicited by treatment of cultured hippocampal slices with 10 μ M AMPA for 24 h in area CA1 (A), CA3 (B) and DG (C). Data are expressed as percentages of PI uptake induced by 10 μ M AMPA (100%) and represent the means \pm SEM from 5 different cultures (n=20 slices for each condition). *** p < 0.001 in comparison to AMPA applied alone.

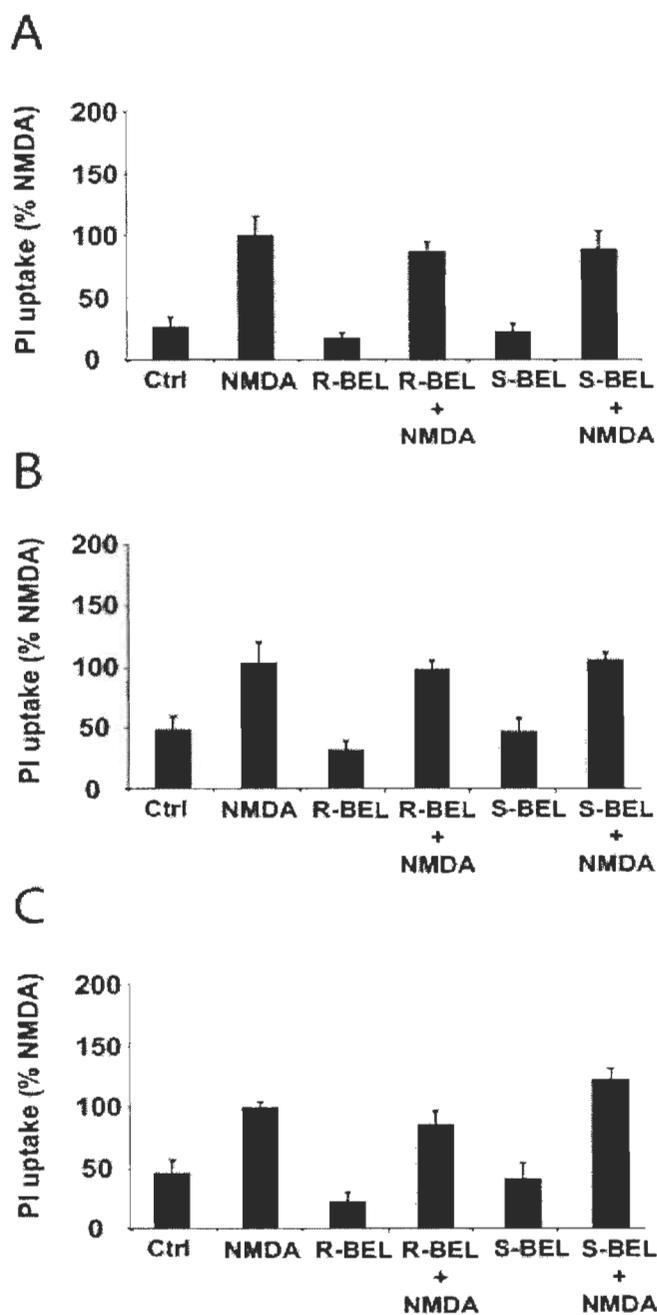


Figure 5.8 Effects of $iPLA_2\gamma$ or $iPLA_2\beta$ inhibitors on NMDA-induced excitotoxicity in cultured hippocampal slices. Effects of 3 μ M (R)- and (S)-BEL on basal PI uptake and on PI uptake elicited by treatment of cultured hippocampal slices with 10 μ M NMDA for 24 h in area CA1 (A), CA3 (B) and DG (C). Data are expressed as percentages of PI uptake induced by 10 μ M NMDA (100%) and represent the means \pm SEM from 5 different cultures (n=20 slices for each condition).

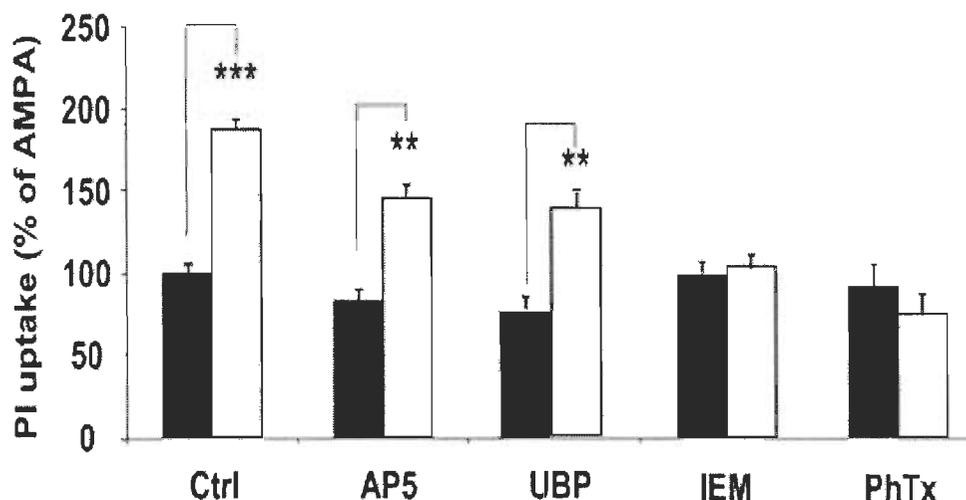


Figure 5.9 Prevention of (R)-BEL-induced increase in AMPA-mediated toxicity by Ca^{2+} -permeable AMPA receptor antagonists. AMPA-induced PI uptake of cultured hippocampal slices pre-treated with 3 μM (R)-BEL for 12 h. AMPA (10 μM for 24h) was applied alone (Ctrl), in the presence of the NMDA receptor antagonist D-AP5 (50 μM), or the kainate receptor antagonist UBP 302 (1 μM), or antagonists for Ca^{2+} -permeable GluR2-lacking AMPA receptors, IEM 1460 (250 μM) and philanthotoxin-433 (10 μM). Data are expressed as percentages of PI uptake induced by 10 μM AMPA alone (100%) and represent the means \pm SEM from 3 different cultures (n=12 slices for each condition). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between untreated (filled bars) and (R)-BEL-treated (open bars) cultured hippocampal slices.

toxicity ($75 \pm 13\%$ of control; Fig. 9), indicating that the expression of GluR2-lacking AMPA receptors on the cell membrane may be responsible for enhancing cell death following iPLA₂ inhibition.

5.6 DISCUSSION

The present study confirms and extends previously reported observation that iPLA₂ inhibition is capable to alter AMPA receptor subunit

phosphorylation in frozen-thawed brain sections (Menard et al., 2005a). In particular, we found that exposure of cultured hippocampal slices to the iPLA₂ inhibitor BEL augmented the phosphorylation on both Ser 831 and 845 residues of AMPA receptor GluR1 subunits in crude synaptic fractions. Over time, this modification in phosphorylation was associated with elevated membrane levels of GluR1 subunits, leading to an increase in the GluR1/GluR2 ratio in membrane fractions. As expected, PI uptake experiments revealed that changes in GluR1/GluR2 ratio made CA1 area of hippocampal slices more vulnerable to AMPA-mediated cell death after iPLA₂ inhibition, a phenomenon likely attributable to the formation of GluR2-lacking AMPA receptors on the cell surface. Using both enantiomers of BEL, we also discovered that iPLA₂γ is possibly the isoform involved in regulating AMPA receptor properties and toxicity in CA1 hippocampal neurons. In contrast, we did not find any indications that iPLA₂ inhibition can alter either distribution of NMDA receptor NR1 subunits or NMDA-mediated cell death, reinforcing the notion that AMPA (but not NMDA) receptors are regulated by constitutive iPLA₂ enzymes (Menard et al., 2005a).

Our data pointed to increased GluR1 protein levels leading to an augmentation of the GluR1/GluR2 ratio in P2 fractions. Switching over from GluR2- to GluR1-containing receptors should usually accentuate calcium influx through AMPA receptors, as GluR2 subunits are recognized to confer calcium impermeability to AMPA receptors (Geiger et al., 1995; Sommer et al., 1991). In fact, expression of the unedited GluR2 subunit plays a critical role in determining AMPA receptor ability to gate calcium currents and, in turn, controls the susceptibility of neurons to AMPA-mediated toxicity (Anzai et al., 2003). Incidentally, our results indicate that the BEL-induced increase in GluR1/GluR2 ratio in synaptic membranes is also associated with enhanced AMPA-mediated cell death in the CA1 area, an effect that is completely abolished by selective blockers of Ca²⁺-permeable, GluR2-lacking AMPA receptors, IEM 1460 and philanthotoxin-433 (but not by antagonists of kainate

and NMDA receptors). These findings, therefore, suggest that iPLA₂γ activity may provide a neuroprotective mechanism able to counteract AMPA-mediated toxicity in the CA1 area of the hippocampus. Indeed, the observation that blockers of GluR2-deficient AMPA receptors have no effect on baseline toxicity by AMPA implies that, under basal condition, constitute iPLA₂γ activity may act to limit insertion of GluR1 homomeric receptors, which have the potential for generating excitotoxic damages. It has been documented in the past that PLA₂ enzymes are involved in several membrane trafficking events (Brown et al., 2003). Interestingly, iPLA₂γ is known to be enriched in the endoplasmic reticulum-Golgi apparatus of several cell types (Kinsey et al., 2005), suggesting that this iPLA₂ isoform may be well-located to influence GluR1 subunit trafficking. More work is therefore required in order to determine how iPLA₂ activity is involved in this process.

One of the most surprising aspects of our study is that under prolonged exposure to BEL, only CA1 cells become more vulnerable to AMPA-mediated toxicity. The target mechanisms contributing to such regional vulnerability remain to be determined. One possible scenario could be that increased cell death is only present in the CA1 area, as phosphorylation and insertion of GluR2-lacking receptors during BEL treatment might be restricted to this hippocampal structure. Support for this notion has been provided by previous experiments performed by our group revealing that, in frozen-brain sections, BEL-induced changes in AMPA receptor phosphorylation is associated with alterations in AMPA receptor binding properties in the CA1 area of the hippocampus, only (Menard et al., 2005a). Another scenario would be that signalling pathways downstream of iPLA₂γ are differentially expressed in the various hippocampal sectors. Finally, given our previous results that BEL-induced augmentation in AMPA receptor phosphorylation can be blocked by a protein kinase C inhibitor (Ménard et al., 2005b), it seems reasonable to consider the possibility that among the hippocampal sectors, iPLA₂ activity

could be differentially link to PKC activity, which is known to alter AMPA receptor subunit phosphorylation (Boehm et al., 2006).

From a functional perspective, our present results are contrasting with a recent study revealing that BEL attenuated LTP and NMDA-induced enhancement of fEPSPs in acute slices, presumably by blocking trafficking events engaged in postsynaptic insertion of new AMPA receptors at potentiated synapses (Martel et al., 2006). The discrepancy between these studies remains unexplained but may rely on the fact that, under resting conditions, iPLA₂ inhibitors could differentially regulate AMPA receptor trafficking in cultured slices prepared from young rats versus acute slices obtained from adults. Moreover, it is not unreasonable to propose that application of BEL in acute slices for ~ 1h could have primarily perturbed the regulated exocytic pathway involved in AMPA receptor insertion during LTP (Palmer et al., 2004) whereas, in the present study, the prolonged exposure to BEL may in addition have altered the constitutive pathway implicated in the basal cycling of AMPA receptors in and out of the plasma membrane (Palmer et al., 2005). Future investigations will be necessary to address these different possibilities.

Recent studies have shown that BEL can interact with other key enzymes in phospholipid metabolism, namely PAP-1, which was shown to be involved in apoptosis and cell death in non-neuronal cells in vitro (Fuentes et al., 2003). Consequently, we have tested the influence of propranolol on AMPA receptor phosphorylation and distribution as well as AMPA-mediated toxicity. This compound is a well known β -adrenergic receptor antagonist capable to block PAP-1 activity in various cell types (Fuentes et al., 2003). In the present study, none of the aforementioned effects was reproduced by propranolol treatments, ruling out the possible involvement of PAP-1 in BEL-induced changes in AMPA receptor properties and function. In addition, the lack of effects of propranolol on phosphorylation of Ser845 strongly support

the notion that β -adrenergic-induced activation of protein kinase A (PKA) is not required for regulating Ser845 phosphorylation under basal conditions. This observation fits well with a previous study reporting that β -adrenergic receptor antagonists are, in contrast to agonists, inefficient at altering phosphorylation at Ser845 of GluR1 subunits in acute CA1 slices (Vanhoose & Winder, 2003).

Recently, experimental evidences have accumulated supporting the notion that iPLA₂ enzymes can be important contributors of cell death in various cell types. For instance, iPLA₂ β overexpression was found to amplify thapsigargin-induced apoptosis in INS-1 insulinoma cells (Ramanadham et al., 2004) and to accelerate the death of U937 cells after long-term exposure to hydrogen peroxide (Perez et al., 2004), while acute inhibition of iPLA₂ activities by racemic BEL appears to be neuroprotective for organotypic hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation (Strokin et al., 2006). In contrast, immature cultures of primary cortical neurons exposed for several days to the racemic BEL show decreased neuritogenesis and cellular viability (Forlenza et al., 2007; Mendes et al., 2005). Our present results show in addition that inhibiting iPLA₂ γ for a period of 12h can be sufficient to exacerbate AMPA-mediated toxicity in CA1 area of the hippocampus.

From a pathological point of view, iPLA₂ activity was reported to be decreased in platelets and in several brain regions in Alzheimer's disease patients (Ross et al., 1998), raising the interesting possibility that up-regulation of GluR2-deficient receptors through iPLA₂ γ dysfunction might accentuate excitotoxicity in Alzheimer's disease. Thus, our findings provide the first experimental indication supporting that chronic dysregulation of iPLA₂ activity could underlie some aspects of neurological disorders by favouring formation of GluR2-deficient receptors. Up-regulation of GluR2-lacking receptors has also been shown to occur in hippocampal neurons after neuronal activity deprivation (Thiagarajan et al., 2005) and tumor necrosis

factor- α (TNF α) receptor stimulation (Stellwagen et al., 2005). An important future outcome will be to determine whether iPLA $_2\gamma$ dysfunction can, through the formation of GluR2-deficient AMPA receptors, exacerbate the development of excitotoxic damages in animal models known to present several aspects of neuronal degeneration.

5.7 REFERENCES

Anzai, T, Tsuzuki, K, Yamada, N, Hayashi, T, Iwakuma, M, Inada, K, Kameyama, K, Hoka, S, Saji, M. 2003. Overexpression of Ca $^{2+}$ -permeable AMPA receptor promotes delayed cell death of hippocampal CA1 neurons following transient forebrain ischemia. *Neurosci Res.* 46(1):41-51.

Balsinde, J, Dennis, EA. 1996a. Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A2 enzymes present in P388D1 macrophages. *J Biol Chem* 271:6758-6765.

Balsinde, J, Dennis, EA. 1996b. Bromoenol lactone inhibits magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase and blocks triacylglycerol biosynthesis in mouse P388D1 macrophages. *J Biol Chem* 271:31937-31941.

Bazan, NG. 2005. Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 32:89-103.

Bernardino, L, Xapelli, S, Silva, AP, Jakobsen, B, Poulsen, FR, Oliveira, CR, Vezzani, A, Malva, JO, Zimmer, J. 2005. Modulator effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 25(29):6734-6744.

Bettini, E, Maggi, A. 1991. A rapid method for the quantitation of estrogen receptors in small amounts of tissue. *J Immunol Methods* 144:87-91.

Boehm, J, Kang, MG, Johnson, RC, Esteban, J, Huganir, RL, Malinow, R. 2006. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* 51(2):213-25.

Brown, WJ, Chambers, K, Doody, A. 2003. Phospholipase A2 enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* 4:214-221.

Chabot, C, Gagne, J, Giguere, C, Bernard, J, Baudry, M, Massicotte, G. 1998. Bidirectional modulation of AMPA receptor properties by exogenous phospholipase A2 in the hippocampus. *Hippocampus* 8:299-309.

Cho, S, Liu, D, Fairman, D, Li, P, Jenkins, L, McGonigle, P, Wood, A. 2004. Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Int* 45:117-127.

Farooqui, AA, Litsky, ML, Farooqui, T, Horrocks, LA. 1999. Inhibitors of intracellular phospholipase A2 activity: their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders. *Brain Res Bull* 49:139-153.

Forlenza, OV, Mendes, CT, Marie, SK, Gattaz, WF. 2007. Inhibition of phospholipase A2 reduces neurite outgrowth and neuronal viability. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 76(1):47-55.

Fuentes L, Perez R, Nieto ML, Balsinde J, Balboa MA. 2003. Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate

phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A2. *J Biol Chem.* 278(45):44683-90.

Geiger, JR, Melcher, T, Koh, DS, Sakmann, B, Seeburg, PH, Jonas, P, Monyer H. 1995. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca^{2+} permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15:193-204.

Hall, RA, Hansen, A, Andersen, PH, Soderling, TR. 1997. Surface expression of the AMPA receptor subunits GluR1, GluR2, and GluR4 in stably transfected baby hamster kidney cells. *J Neurochem.* 68(2):625-30.

Hazen, SL, Zupan, LA, Weiss, RH, Getman, DP, Gross, RW. 1991. Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A2. Mechanism-based discrimination between calcium-dependent and -independent phospholipases A2. *J Biol Chem* 266:7227-7232.

Henley, JM. 1995. Subcellular localization and molecular pharmacology of distinct populations of [3H]-AMPA binding sites in rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 115:295-301.

Holman, D, Feligioni, M, Henley, JM. 2007. Differential redistribution of native AMPA receptor complexes following LTD induction in acute hippocampal slices. *Neuropharmacology* 99(2):549-560.

Jenkins, CM, Han, X, Mancuso, DJ, Gross, RW. 2002. Identification of calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) beta, and not iPLA2gamma, as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10 smooth muscle cells. Enantioselective mechanism-based discrimination of mammalian iPLA2s. *J Biol Chem* 277:32807-32814.

Kinsey, GR, Cummings, BS, Beckett, CS, Saavedra, G, Zhang, W, McHowat, J, Schnellmann, RG. 2005. Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA2. *Biochem Biophys Res Commun* 327:287-293.

Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Martel, MA, Patenaude, C, Menard, C, Alaux, S, Cummings, BS, Massicotte, G. 2006. A novel role for calcium-independent phospholipase A in alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate receptor regulation during long-term potentiation. *Eur J Neurosci.* 23(2):505-13.

Menard, C, Valastro, B, Martel, MA, Martinoli, MG, Massicotte, G. 2004. Strain-related variations of AMPA receptor modulation by calcium-dependent mechanisms in the hippocampus: contribution of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Brain Res* 1010:134-143.

Menard, C, Valastro, B, Martel, MA, Chartier, E, Marineau, A, Baudry, M, Massicotte, G. 2005a. AMPA receptor phosphorylation is selectively regulated by phospholipase A₂ and 5-lipoxygenase activities. *Hippocampus* 15:370-380.

Menard, C, Patenaude, C, Massicotte, G. 2005b. Phosphorylation of AMPA receptor subunits is differentially regulated by phospholipase A₂ inhibitors. *Neurosci Lett* 389:51-56.

Mendes, CT, Gattaz, WF, Schaeffer, EL, Forlenza, OV. 2005. Modulation of phospholipase A(2) activity in primary cultures of rat cortical neurons. *J Neural Transm* 112:1297-1308.

Michaelis, EK. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54:369-415.

Palmer, MJ, Isaac, JT, Collingridge, GL. 2004. Multiple, developmentally regulated expression mechanisms of long-term potentiation at CA1 synapses. *J Neurosci.* 24(21):4903-11.

Palmer, CL, Cotton, L, Henley, JM. 2005. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev* 57(2):253-277.

Papavassiliou, AG. 1994. Preservation of protein phosphoryl groups in immunoprecipitation assays. *J Immunol Methods* 170:67-73.

Pappu, AS, Hauser, G. 1983 Propranolol-induced inhibition of rat brain cytoplasmic phosphatidate phosphohydrolase. *Neurochem. Res.* 8(12):1565-1575.

Perez, R, Melero, R, Balboa, MA, Balsinde, J. 2004. Role of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 279:40385-40391.

Ramanadham, S, Hsu, FF, Zhang, S, Jin, C, Bohrer, A, Song, H, Bao, S, Ma, Z, Turk, J. 2004. Apoptosis of insulin-secreting cells induced by endoplasmic reticulum stress is amplified by overexpression of group VIA calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2 beta) and suppressed by inhibition of iPLA2 beta. *Biochemistry* 43:918-930.

Ross, BM, Moszczynska, A, Erlich, J, Kish, SJ. 1998. Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: increased lysophospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A2 activity. *J Neurochem* 70:786-793.

Ross, BM. 2003. Phospholipid and eicosanoid signaling disturbances in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:407-412.

Sommer, B, Kohler, M, Sprengel, R, Seeburg, PH. 1991. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11-19.

Stellwagen, D, Beattie, EC, Seo, JY, Malenka, RC. 2005. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* 25:3219-3228.

St-Gelais, F, Menard, C, Congar, P, Trudeau, LE, Massicotte, G. 2004. Postsynaptic injection of calcium-independent phospholipase A2 inhibitors selectively increases AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Hippocampus* 14:319-325.

Stoppini, L, Buchs, PA, Muller, D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.

Strokin, M, Chechneva, O, Reymann, KG, Reiser, G. 2006. Neuroprotection of rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation by enrichment with docosahexaenoic acid and by inhibition of hydrolysis of docosahexaenoic acid-containing phospholipids by calcium independent phospholipase A2. *Neuroscience* 140(2):547-53.

Sun, GY, Xu, J, Jensen, MD, Simonyi, A. 2004. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 45:205-213.

Thiagarajan, TC, Lindskog, M, Tsien, RW. 2005. Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron* 47:725-737.

Towbin, H, Staehelin, T, Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.

Vanhooose, AM, Winder, DG. 2003. NMDA and beta1-adrenergic receptors differentially signal phosphorylation of glutamate receptor type 1 in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci*. 23(13):5827-34.

Vornov, JJ, Tasker, RC, Park, J. 1995. Neurotoxicity of acute glutamate transport blockade depends on coactivation of both NMDA and AMPA/kainate receptors in organotypic hippocampal cultures. *Exp Neurol* 133:7-17.

Zimmer, J, Kristensen, BW, Jakobsen, B, Noraberg, J. 2000. Excitatory amino acid neurotoxicity and modulation of glutamate receptor expression in organotypic brain slice cultures. *Amino Acids* 19:7-21.

5.8 ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to Guy Massicotte (Grant number 105942). Caroline Menard is the recipient of a studentship from NSERC. Christian Patenaude is supported by a postdoctoral fellowship from

the Savoy Foundation. The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript.

5.9 ABBREVIATIONS

AMPA, alpha-amino-3-methylisoxazole-propionate; AA, arachidonic acid; BEL, bromoenol lactone; cPLA₂, calcium-dependent phospholipase A₂; DG, dentate gyrus; DIV, days in vitro; iPLA₂, calcium-independent phospholipase A₂; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PAP-1, magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase-1; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; PLA₂, phospholipase A₂; sPLA₂, secretory phospholipase A₂; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-8% polyacrylamide gel electrophoresis; TNF α , tumor necrosis factor-alpha.

CHAPITRE VI

AMPA RECEPTOR-MEDIATED CELL DEATH IS REDUCED BY DOCOSAHEXAENOIC ACID BUT NOT BY EICOSAPENTAENOIC ACID IN AREA CA1 OF HIPPOCAMPAL SLICE CULTURES

Caroline **MÉNARD**, Christian **PATENAUDE**, Anne-Marie **GAGNÉ** and Guy
MASSICOTTE

Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières
Trois-Rivières, Québec, Canada

Running title: DHA protects against AMPA toxicity

Number of pages: 30

Number of figures: 7

Number of words: 6,867

Corresponding author's address:

Guy Massicotte

Département de chimie-biologie

U.Q.T.R.

C.P. 500

Trois-Rivières, Canada G9A 5H7

Phone (819) 376-5053

Fax (819) 376-5084

E-mail Guy.Massicotte@uqtr.ca

Key words: Excitotoxicity, glutamate receptors, hippocampus, cell, death

6.1 RÉSUMÉ

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont montré qu'une augmentation de la consommation d'acides gras polyinsaturés (PUFA) a des effets bénéfiques pour le cerveau et ce pour plusieurs conditions pathologiques. Dans le cas des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer, par exemple, les PUFA de la famille des oméga-3 comme l'acide docosahexaénoïque (DHA) ou l'acide eicosapentaénoïque (EPA) diminuent les manifestations cellulaires et les déficits cognitifs associés au vieillissement prématuré. Les mécanismes sous-jacents à ces phénomènes demeurent toutefois méconnus à ce jour. Par les expérimentations présentées dans ce manuscrit et menées sur des cultures d'hippocampes de type organotypique, nous avons investigué la possibilité que les acides gras oméga-3 modulent le niveau d'activation des récepteurs au glutamate. Nous avons observé que l'excitotoxicité modulée par l'agoniste des récepteurs alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (AMPA) est grandement réduite chez les tranches d'hippocampes traitées préalablement avec le DHA. Cet effet, quantifié par un marquage au propidium iodide, est restreint à la région CA1 et n'est pas reproduit par l'EPA. De plus, la protection semble spécifique aux récepteurs AMPA puisque les toxicités induites par les agonistes des récepteurs N-méthyl-D-aspartate et kainate n'ont pas été affectées par le DHA. D'une perspective biochimique, nous avons découvert que la relâche de lactate déshydrogénase résultante de la stimulation des récepteurs AMPA est aussi réduite par le DHA. Enfin, par le biais de la biotinylation, nous avons démontré que l'effet neuroprotecteur pourrait être dû à une internalisation accrue des récepteurs AMPA. Ces travaux soulèvent, pour la première fois, l'hypothèse que les conséquences bénéfiques d'une consommation de DHA pourraient résulter d'une modulation spécifique du transport et de l'excitotoxicité des récepteurs AMPA. Cela

renforce le théorie selon laquelle une diète riche en DHA pourrait retarder voire prévenir certaines maladies neurodégénératives.

6.1.1 Contribution des auteurs de l'article

L'article a été rédigé par Caroline Ménard, le Dr. Christian Patenaude et le Dr. Guy Massicotte. Anne-Marie Gagné a participé activement au départ des cultures d'hippocampes de type organotypique. Toutes les expériences ont été réalisées par Caroline Ménard.

Ce manuscrit est sous presse dans le *Journal of Neuroscience Research*.

6.2 ABSTRACT

Over the last decade, several studies have shown that high levels of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the brain might limit neuronal damage in various pathological conditions. For example, in animal models of Alzheimer's disease, omega-3 type PUFAs such as docosahexaenoic (DHA) and eicosapentaenoic (EPA) acids have been proposed to decrease both the cognitive and cellular manifestations of premature ageing. The mechanisms by which they promote brain integrity remain to be established, and the experiments on cultured hippocampal slices described here examined the possibility that omega-3 fatty acids can modulate brain cell viability by interacting with glutamate receptors. We observed, by lactate dehydrogenase release and propidium iodide (PI) uptake, that excitotoxicity triggered by an alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptor agonist was markedly reduced in hippocampal slices treated with DHA. PI uptake experiments also revealed that neuroprotection by DHA was restricted

to the hippocampal CA1 region and could not be reproduced by EPA or arachidonic acid, an omega-6 PUFA. Moreover, the beneficial effect of DHA was specific to AMPA receptor stimulation, as the toxicity induced by N-methyl-D-aspartate or kainate receptor agonists was not diminished by DHA preincubation. Biotinylation experiments finally indicated that the neuroprotective actions of DHA could result from down-regulation of AMPA receptors in hippocampal membranes. This investigation thus provides the first indication that a beneficial outcome of DHA on the brain could derive from specific modulation of AMPA-mediated toxicity, reinforcing the notion that dietary DHA uptake might be useful in preventing neurodegenerative diseases.

6.3 INTRODUCTION

Considerable interest in the role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the development of human diseases stems from epidemiological studies reporting lower risks of cardiac arrhythmia, cognitive decline and dementia in populations on omega-3-enriched diets (Kotani et al., 2006; Chrysohoou et al., 2007; Connor & Connor, 2007). Docosahexaenoic acid (DHA) is one of the most abundant omega-3 PUFAs present in phospholipids of the mammalian brain (Glomset, 2006), where it is important for the maintenance of neural membrane and brain function integrity (Youdim et al., 2000). Lower DHA levels have been recorded in the plasma of Alzheimer's disease (AD) patients (Conquer et al., 2000), and it has been argued that DHA deficiency or supplementation might be associated with changes in learning abilities in rodents (Takeuchi et al., 2002; Catalan et al., 2002; Fedorova & Salem, 2006). Importantly, recent studies have shown that DHA dietary supplementation might lower the risk of developing AD (Calon and Cole, 2007), although there are doubts concerning the real benefits that DHA might offer in the treatment of AD (Arendash et al., 2007). Bousquet et al. (2008)

have observed that high n-3 PUFA dietary intake, capable of increasing frontal cortex levels of DHA, might also exert neuroprotective actions in a mouse model presenting numerous aspects of Parkinson's disease.

So far, several mechanisms have been proposed to explain how DHA or other omega-3 PUFAs exert their protective effects. In the brain, DHA may diminish oxidative stress (Yavin et al., 2002; Wu et al., 2004), caspase activation (Calon et al., 2004, 2005), or amyloid- β peptide accumulation and tau hyperphosphorylation in transgenic mouse models of AD (Oksman et al., 2006; Green et al., 2007). The addition of DHA to culture media is also known to reduce glutamate-induced toxicity in hippocampal primary neurons (Wang et al., 2003), yet the exact mechanism by which it interacts with glutamate toxicity has not been characterized. Excessive glutamate release or its inadequate clearance from the synaptic cleft can cause neuronal injuries due to the overactivation of glutamate receptors (Holmes, 2002), possibly contributing to the development of several neuropathological conditions. It is commonly believed that repetitive activation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) and n-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors can trigger neuronal damage through aberrant intracellular calcium elevation, leading to the generation of free radicals, the mobilization of proteases, phospholipases and endonucleases as well as the transcriptional stimulation of specific cell death pathways (Michaelis, 1998).

The number of AMPA receptors on the cell surface was found to depend on the lipid binding of protein interacting with C kinase 1 (PICK1) (Jin et al., 2006), raising the possibility that DHA or other omega-3 PUFAs might exert their neuroprotective effects through down-regulation of glutamate receptors. Thus, we wondered whether 2 omega-3 PUFAs, DHA and eicosapentaenoic acid (EPA), could protect against excitotoxic insults in organotypic hippocampal cultures elicited by overactivation of each of the 3 ionotropic glutamate receptor subtypes, AMPA, NMDA and kainic acid (KA). We also

investigated whether supplementation of hippocampal slice cultures with the fatty acids (FAs) mentioned modulated the membrane levels of these receptors.

6.4 MATERIALS & METHODS

6.4.1 Drugs

DHA, EPA and arachidonic acid (AA) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Stock solutions of FAs were prepared in ethanol and stored at -20°C for DHA and at -80°C for EPA. Before each experiment, fresh solutions of free FAs were prepared by evaporation of ethanol under an argon stream. Free FAs were resuspended in DMSO and dissolved to their final concentrations in serum-free culture medium. The glutamate receptor agonist AMPA and the protein phosphatase inhibitor okadaic acid (OA) were procured from BIOMOL International (Plymouth Meeting, PA). All other chemical reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

6.4.2 Organotypic hippocampal slices

The animals studied were cared for in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Organotypic hippocampal slice cultures were prepared by the method of Stoppini et al. (1991). Hippocampi from 6- to 8-day-old Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Quebec) were dissected in sterile, ice-cold minimum essential media containing 16 mM HEPES, 10 mM Tris-Base, 6.7 mM glucose and 3 mM MgCl₂. Transverse slices (450 µm) were cut with a McIlwain tissue chopper and transferred to humidified membrane inserts (0.4

µm, Millipore) (4 slices per insert) in 6-well plates containing 1 ml of culture medium (75% basal Eagle's medium, 25% heat-inactivated horse serum), supplemented with 3% Earle's balanced salt solution, 26 mM HEPES, 25 mM NaCl, 5 mM NaHCO₃, 0.5 mM ascorbic acid, 48 mM glucose, 0.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 3 mM glutamine, 0.23 µM insulin and 0.4% penicillin/streptomycin. The slices were placed in a humidified incubator (35°C, 5% CO₂) for 12 days, and the medium was changed 3 times a week. In most experiments, 12-day-old slice cultures were exposed for 24 h to DHA, EPA or AA, then to AMPA, NMDA or KA for an additional 24 h with free FAs.

6.4.3 Detection of cell damage by lactate dehydrogenase (LDH) release and propidium iodide (PI) uptake.

Cell death was analyzed by measuring LDH release into the culture medium and by PI uptake in rat hippocampal slice cultures. LDH is a stable cytoplasmic enzyme present in all cells. It is rapidly released in culture supernatants upon plasma membrane damage, and the enzyme's activity detected correlates with the portion of lysed cells (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). LDH release was measured with CytoTox 96 non-radioactive assay kits, according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI). Briefly, 50 µl of substrate solution was mixed for 30 min at room temperature with 50 µl of culture medium. LDH released was subjected to enzymatic assay consisting of tetrazolium salt conversion into a red formazan product. Optical density was measured at 492 nm with a spectrophotometer. A sample of culture medium from non-treated slices served as a negative control, with a positive control being supplied by the manufacturer.

Spontaneous and induced neuronal cell death in slice cultures was also assessed by monitoring culture uptake of the fluorescent dye PI (3,8-diamino-5-(3-(diethylmethylamino)propyl)-6-phenyl phenanthridium diiodide; Sigma,

St. Louis, MO), a method routinely deployed and validated in our laboratory (Menard et al., 2007). PI is a stable and non-toxic fluorescent dye absorbing blue-green light (493 nm) and emitting red fluorescence (630 nm). As a polar substance, it only enters dead or dying cells with a damaged or leaky cell membrane, interacting with DNA to yield bright red fluorescence. After exposure to glutamate receptor agonists, the hippocampal slices were allowed to recover for 6 h in serum-free culture medium. After the recovery period, PI (20 $\mu\text{g/ml}$) was added to the culture medium for 30 min, and its uptake was monitored under a Model IX70 inverted fluorescence microscope (Olympus, Markham, Ontario) with a Rh-TRiTC filter set (excitation 520-550 nm; emission >580 nm) and a SPOT RT digital camera (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI). PI uptake was measured in each hippocampal subfield, as described previously (Zhou & Baudry, 2006; Bernardino et al., 2005), by delineating the CA1 and CA3 areas from brightfield images (i.e. background images). Then, PI fluorescence intensity was assessed through the delineated surface by densitometry with Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Previous studies involving cellular PI uptake as a marker of neuronal cell death have characterized the dose-dependent excitotoxic profile of AMPA, NMDA and KA in rat hippocampal slice cultures. Consistent with Silva et al. (2003), we recently estimated half-maximal cell death induced by AMPA to be around 3 μM (EC_{50} value) in both CA1 and CA3 pyramidal cell layers of rat hippocampal slice cultures (Menard et al., 2007). Based on the EC_{50} values estimated by our group (Menard et al., 2007), we investigated the beneficial effects of PUFAs against excitotoxic insults from 10 μM AMPA, 10 μM NMDA and 20 μM KA. At these concentrations, we established that after 24-h exposure, AMPA-, NMDA- and KA-mediated lesions in rat hippocampal slice cultures were not exceeding 75% of the maximal PI uptake generated by the 3 glutamate receptor agonists (data not shown).

6.4.4 Biotinylation

Organotypic hippocampal slices were washed twice in saline solution (SS: 137 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.17 mM Na₂HPO₄, 0.22 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, 33 mM glucose, 44 mM sucrose, pH 7.3) and incubated at room temperature with 0.5 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin for 30 min with agitation. Sulfo-NHS-SS-Biotin is a cell-impermeable reagent that binds to primary amines on the surface, and therefore enables the isolation of plasma membrane proteins from those localized intracellularly or confined to organelle membranes. Excess biotin was removed by 3 brief washes with ice-cold harvest buffer (SS with 1 mM EDTA, 50 mM ethanolamine and protease inhibitors – see Electrophoresis and immunoblotting section), after which the slices were homogenized in 300 µl of ice-cold harvest buffer and centrifuged at 16,000g for 30 min at 4°C. Supernatants were removed, and the pellets were suspended in solubilization buffer (50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA and protease inhibitors). The samples were again centrifuged for 30 min (16,000g at 4°C), and the resulting supernatants were defined as soluble fractions. The protein levels of these soluble fractions were measured by Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario).

Streptavidin beads (80 µl) were washed 3 times in lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), pH 7.4) and mixed with biotinylated samples (100 µg of proteins) at room temperature for 4 h with agitation. Supernatants were removed, and the beads were washed 3 times with lysis buffer. Biotinylated proteins were then eluted from the beads in 4x SDS sample buffer (containing β-mercaptoethanol) at 100°C for 5 min before electrophoresis and immunoblotting.

6.4.5 Electrophoresis and immunoblotting

Homogenates were obtained from the lysis of cultured hippocampal slices in 50 mM Tris-acetate buffer (pH 7.4) containing 320 mM sucrose, 0.1 mM EGTA, protease inhibitors (5 μ M leupeptin, 200 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone) and 10 μ M OA. Aliquots (25 μ g of proteins) of homogenates and eluted biotinylated proteins were subjected to SDS-8% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were then blocked with Tris acetate-buffered saline (TBS) containing 5% bovine serum albumin for 1 h at room temperature, probed with primary antibodies directed against AMPA receptor GluR1 or GluR2 subunits (1 μ g/ml; Abcam, Cambridge, MA), washed in TBS and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma). Bands were detected with SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL), and computer-generated images were analyzed semi-quantitatively by densitometry with Vision work LS software (UVP Bioimaging, Upland, CA).

6.4.6 Data presentation and statistical analysis

The data were expressed as means \pm SEM. In most experiments, PI uptake and LDH release elicited by 10 μ M AMPA were set to 100% for comparison with the effects evoked by PUFAs and other glutamate receptor agonists. Differences in subunit levels and LDH release were tested by 1-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* analysis, whereas fluorescent intensity (dependent variable) in the different groups and hippocampal regions (independent variables) was compared by 2-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* analysis. In all cases, the significance level was set at $p < 0.05$.

6.5 RESULTS

6.5.1 DHA, but not EPA, reduces AMPA-induced excitotoxicity

We first estimated LDH release in culture medium collected from cultured hippocampal slices pre-incubated for 24 h with vehicle, DHA or EPA. Although LDH release was relatively low in control slices, there was nevertheless a dose-dependent reduction of its release with DHA (Fig. 1A). Indeed, at a concentration of 90 μM , DHA was able to significantly decrease LDH release, suggesting that basal cell death was occurring in the organotypic slice preparations. In contrast to DHA, however, no statistical differences in basal LDH release were observed for slices pre-exposed to 90 μM EPA. As reported previously by Wang et al. (2003), we also noticed that concentrations as high as 300 μM DHA or EPA became harmful to neurons, as they induced robust LDH release in the culture medium (Figure 1B).

Given that the greatest protection achieved by DHA was at 90 μM , this concentration was used in most subsequent experiments. We next verified if omega-3 PUFAs similarly affected the toxicity elicited by overactivation of AMPA, NMDA or KA receptors. We established that after 24-h exposure, the lesions induced by 10 μM AMPA, 10 μM NMDA and 20 μM KA reached approximately 75% of maximal cell death (data not shown). At these concentrations, each glutamate receptor agonist increased LDH release to a similar magnitude (Fig. 2). However, the effect of DHA (90 μM) depended on the agonist employed to induce cell death. Indeed, LDH release elicited by AMPA receptor overactivation was significantly decreased in slices pre-incubated with DHA, whereas NMDA- and KA-induced cell death remained elevated in the presence of this FA (Fig. 2A). To determine if this protection could be extended to other omega-3 PUFAs, we also pre-incubated slices with 90 μM EPA. In contrast to DHA, EPA had no impact on either AMPA,

NMDA or KA-evoked LDH release (Fig. 2B), indicating that DHA may differ from other omega-3 PUFAs in its ability to protect against excitotoxic insults triggered specifically by excessive stimulation of AMPA receptors.

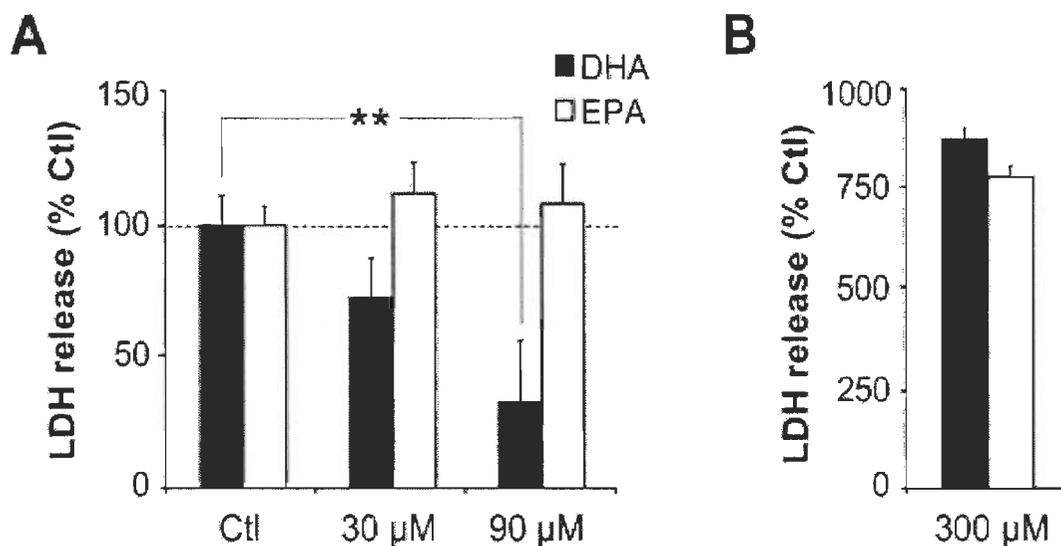


Figure 6.1 Effects of DHA and EPA on basal LDH release. A) LDH release measured in the culture medium of control (ctl) organotypic hippocampal slices pre-incubated for 24 h with vehicle or of slices pre-incubated with 30 μM or 90 μM FAs. B) LDH release estimated in the presence of 300 μM DHA or EPA. The data are expressed as percentages of LDH released from control slices (dotted line) (means ± SEM; n=15 slices in each condition, from 3 different cultures), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

from other omega-3 PUFAs in its ability to protect against excitotoxic insults triggered specifically by the excessive stimulation of AMPA receptors.

6.5.2 DHA reduces AMPA-induced excitotoxicity in area CA1

We next assessed whether the decrease in excitotoxic cell death by DHA displayed regional selectivity among hippocampal subfields. To do so, we included PI as a marker of cell death because it has previously been

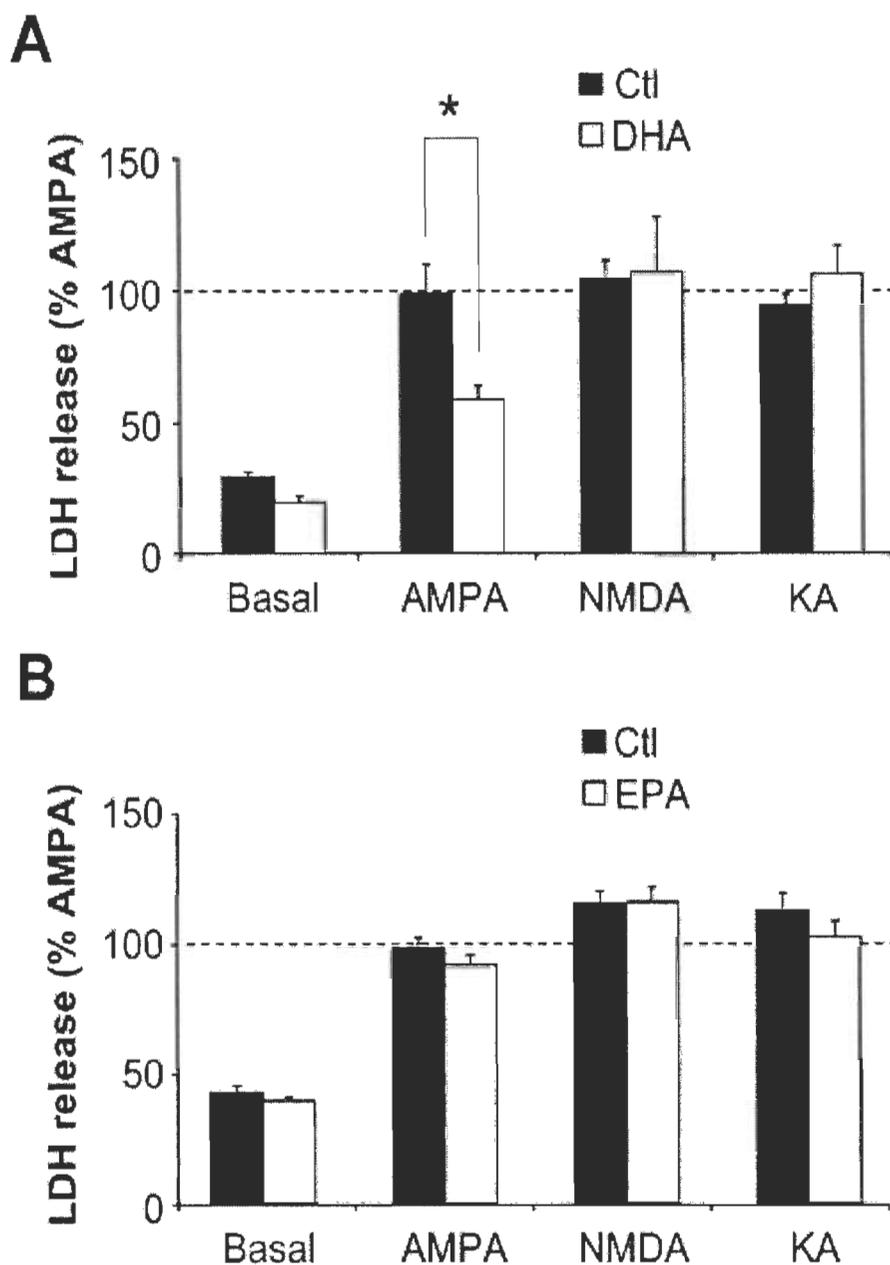


Figure 6.2 Effects of DHA and EPA on LDH release induced by glutamate receptor agonists. Cultured hippocampal slices were pre-incubated for 24 h with vehicle (ctl) or 90 μ M DHA (A) or EPA (B), and glutamate receptor agonists (10 μ M AMPA, 10 μ M NMDA, 20 μ M KA) were subsequently added for 24 h to the culture medium containing the FAs. The data are expressed as percentages of LDH release induced by 10 μ M AMPA (dotted lines), and represent the means \pm SEM from 5 different cultures (n=20 slices in each condition), * p <0.05

shown to be instrumental in monitoring cell death in different hippocampal regions (Bernardino et al., 2005; Zhou & Baudry, 2006; Menard et al., 2007). Basal PI uptake was very low in regions CA1 and CA3 of slices pre-incubated with vehicle or DHA (Fig. 3). Application of AMPA produced a marked increase in PI uptake in both regions of control slices (Fig. 3B and C). AMPA-induced PI uptake was substantially lower in slices pre-incubated with 30 μ M or 90 μ M DHA in area CA1, but not in CA3. Compared to AMPA alone, DHA at a concentration of 90 μ M diminished PI uptake by more than 50% in area CA1 (Fig. 3B). As for LDH release, DHA was ineffective in preventing PI uptake elevation elicited by NMDA or KA (Fig. 4), while EPA failed again to reduce PI uptake elicited by all glutamate receptor agonists in both CA1 and CA3 areas (Fig. 5). Altogether, these observations suggest that DHA supplementation of hippocampal slice cultures seems to preferentially prevent AMPA-mediated damage in the CA1 subfield.

To further characterize the influence of PUFAs on hippocampal formation, we next explored the capacity of omega-6 PUFAs to regulate glutamate-induced toxicity. We report here the results with one of them, AA, a well-known precursor of inflammatory eicosanoids. Similarly to EPA, supplementation of organotypic hippocampal slices with 90 μ M AA had no effect on AMPA-, NMDA- and KA-induced increases in PI uptake (Fig. 6).

We next assessed whether the reduction of excitotoxic cell death by DHA showed regional selectivity among hippocampal subfields. To do so, we employed PI as a marker of cell death because it has been previously shown to be instrumental in monitoring cell death in different hippocampal regions (Bernardino et al., 2005; Menard et al., 2007). Basal PI uptake was very low in regions CA1 and CA3 of slices pre-incubated with vehicle or DHA (Fig. 2). Application of glutamate receptor agonists produced a marked increase in PI

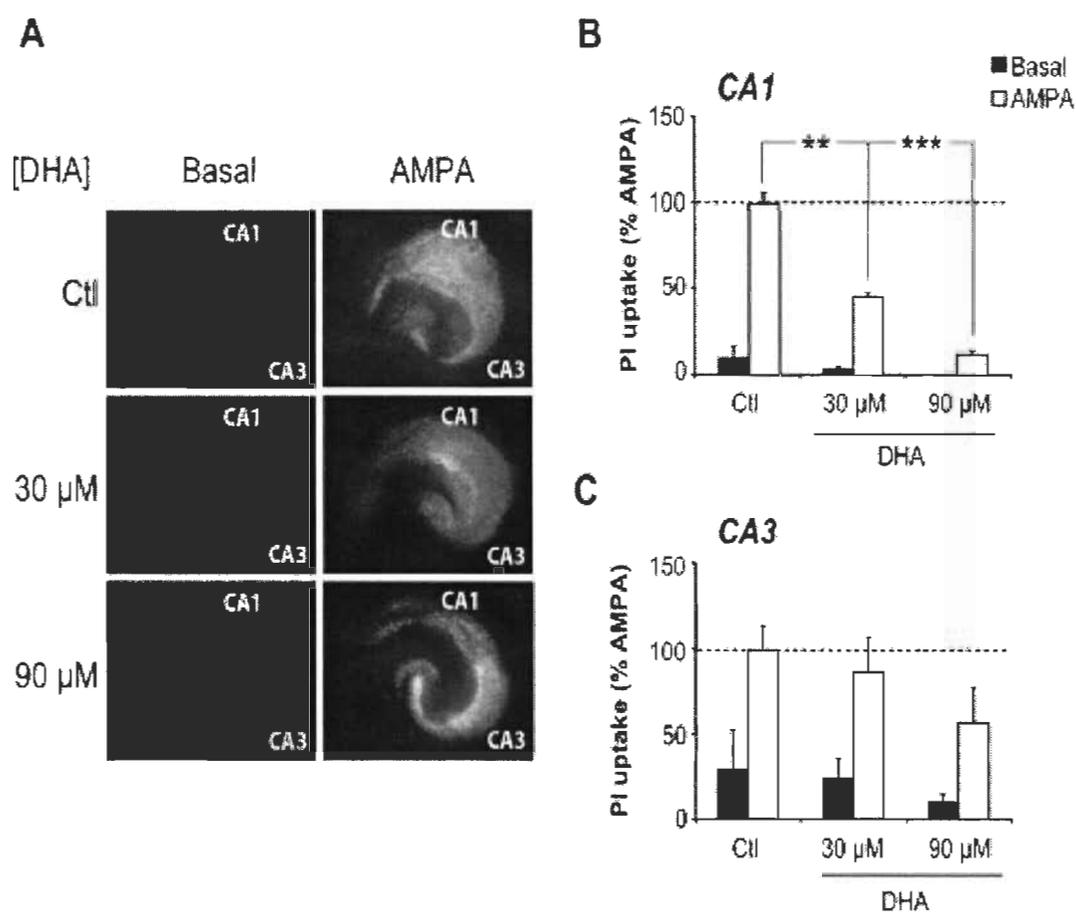


Figure 6.3 Effect of DHA on AMPA-induced excitotoxicity is specific to the CA1 region. A) Representative fluorescent images of basal PI uptake in control (ctl) slices and in slices pre-incubated with 30 μ M or 90 μ M DHA for 24 h, and after their exposure to 10 μ M AMPA. Graphs of basal and AMPA-elicited PI uptake in CA1 (B) and CA3 (C) subfields of control slices or slices pre-incubated with DHA. The data are expressed as percentages of PI uptake induced by 10 μ M AMPA (dotted lines), and represent the means \pm SEM from 5 different cultures ($n=20$ slices in each condition), *** $p<0.001$.

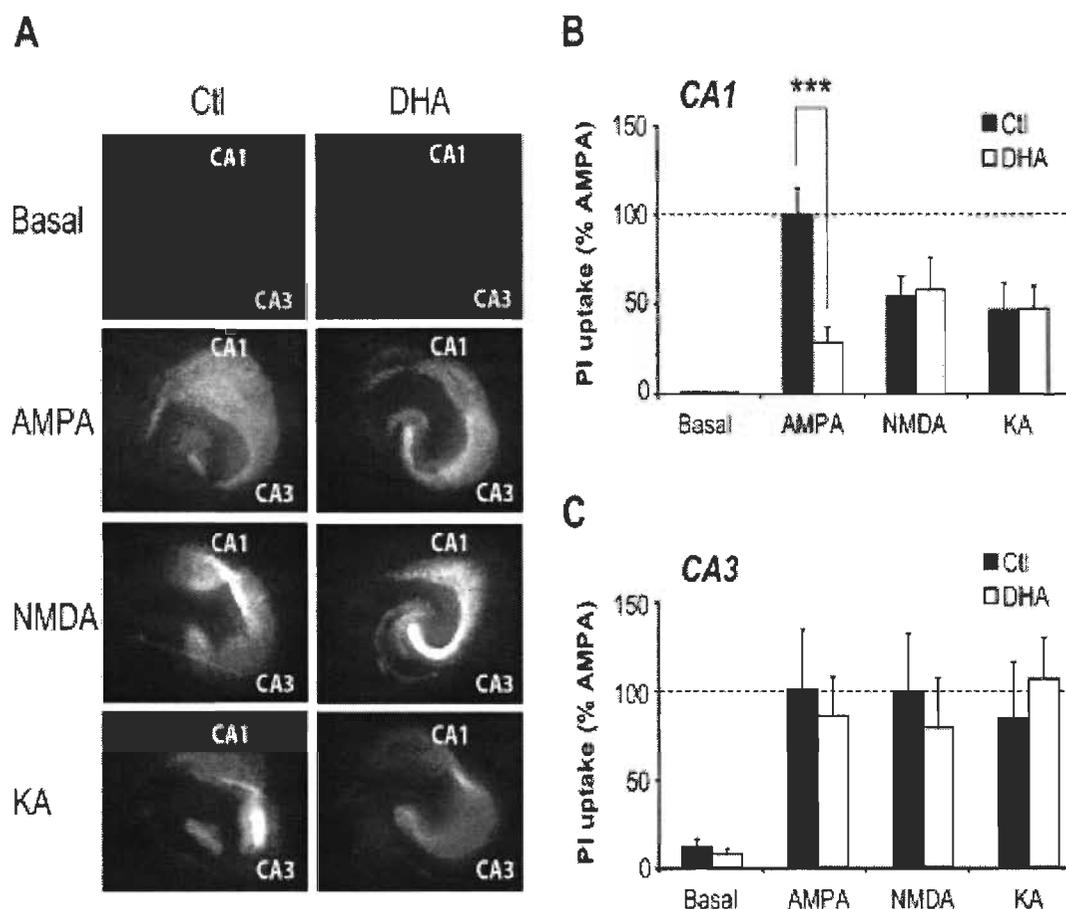


Figure 6.4 Effect of DHA is selective to AMPA-mediated toxicity. A) Representative fluorescent images of PI uptake from control (ctl) slices or slices pre-incubated for 24 h with 90 μ M DHA and subsequently exposed to 10 μ M AMPA, 10 μ M NMDA or 20 μ M KA. Graphs of basal PI uptake and PI uptake elicited by glutamate receptor agonists in CA1 (B) and CA3 (C) subfields from control slices or slices pre-incubated with DHA. The data are expressed as percentages of PI uptake induced by 10 μ M AMPA (dotted lines), and represent the means \pm SEM from 5 different cultures (n=20 slices in each condition), *** p <0.001.

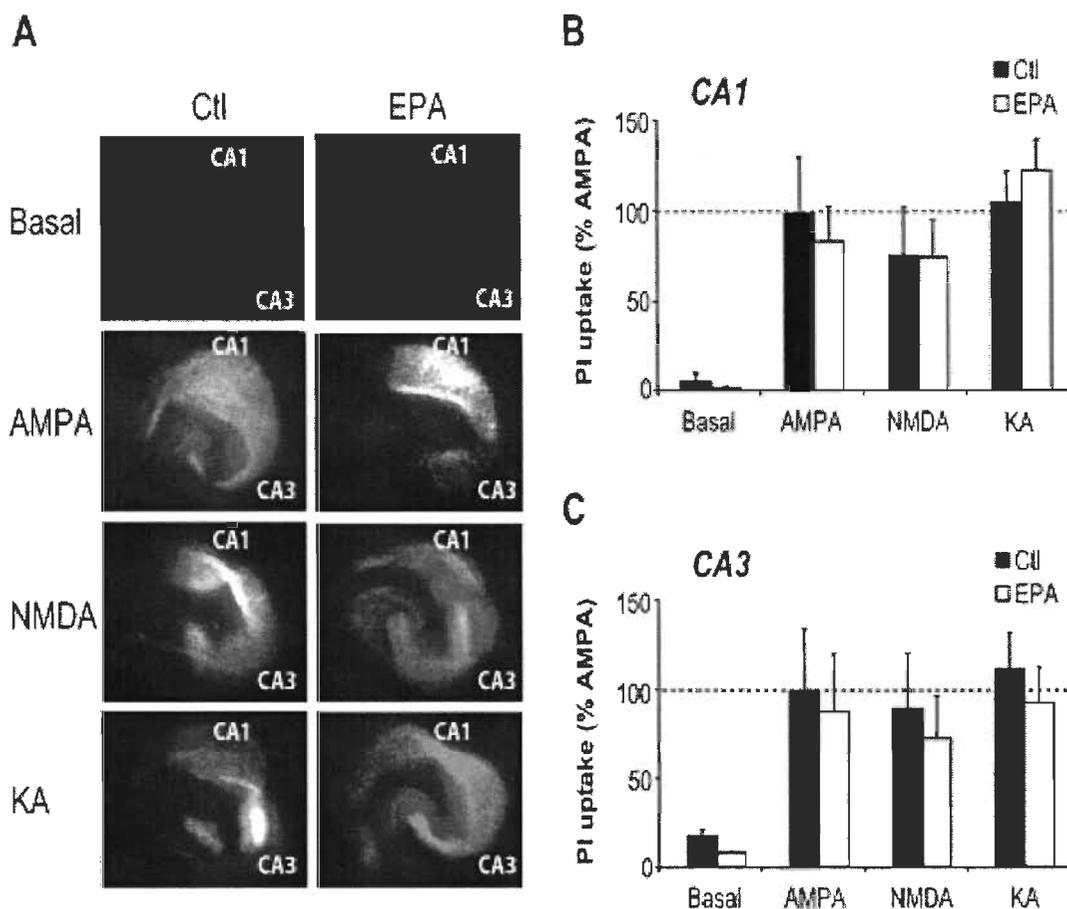


Figure 6.5 No effect of EPA on PI uptake induced by glutamate receptor agonists. A) Representative fluorescent images of PI uptake from control (ctl) slices or slices pre-incubated for 24 h with 90 μ M EPA and subsequently exposed to 10 μ M AMPA, 10 μ M NMDA or 20 μ M KA. Graphs of basal PI uptake and PI uptake elicited by glutamate receptor agonists in CA1 (B) and CA3 (C) subfields from control slices or slices pre-incubated with EPA. The data are expressed as percentages of PI uptake induced by 10 μ M AMPA (dotted lines), and represent the means \pm SEM from 5 different cultures (n=20 slices in each condition).

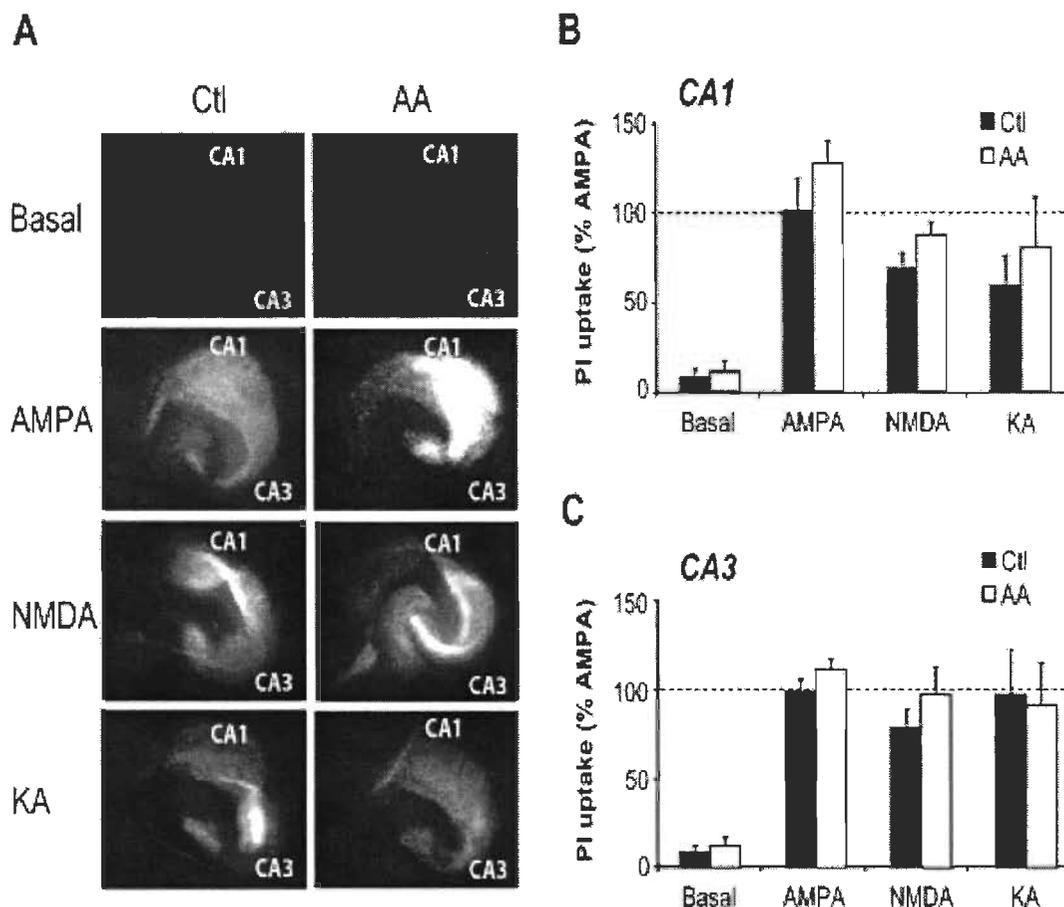


Figure 6.6 No effect of arachidonic acid (AA) on PI uptake induced by glutamate receptor agonists. A) Representative fluorescent images of PI uptake from control (ctl) slices or slices pre-incubated for 24 h with 90 μ M AA and subsequently exposed to 10 μ M AMPA, 10 μ M NMDA or 20 μ M KA. Graphs of basal PI uptake and PI uptake elicited by glutamate receptor agonists in CA1 (B) and CA3 (C) subfields from control slices or slices pre-incubated with AA. The data are expressed as percentages of PI uptake induced by 10 μ M AMPA (dotted lines), and represent the means \pm SEM from 5 different cultures ($n=20$ slices in each condition).

uptake in the CA1 (Fig. 2B) and CA3 (Fig. 2C) regions of control slices. Pre-incubation of slices with DHA considerably reduced cell death triggered by AMPA in area CA1, but had no effect on AMPA-induced cell death in CA3. Again, DHA was ineffective in preventing cell death elicited by NMDA or KA. As with LDH release, EPA also failed to reduce PI uptake elicited by glutamate receptor agonists in both CA1 and CA3 (Fig. 3). This indicates that DHA supplementation seems to preferentially prevent AMPA-mediated damage in the CA1 subfield.

6.5.3 DHA reduces GluR1 and GluR2 subunit levels on the cell surface

Since DHA specifically decreased AMPA-induced cell death, we investigated whether its effect could result from alterations in AMPA receptor regulation, by examining the expression of GluR1 and GluR2 AMPA receptor subunits on the plasma membrane. We found that GluR1 and GluR2 protein levels were significantly diminished in biotinylated membranes pre-incubated with DHA (Fig. 7A), but not in homogenates (Fig. 7B). Consistent with the above results, GluR1 and GluR2 protein levels were not affected in biotinylated membranes and homogenates from slices pre-incubated with EPA. Since both omega-3 PUFAs had no effect on NMDA receptor-mediated excitotoxicity, we also verified whether NR1 subunit levels were altered. As expected, the amount of NR1 proteins remained unaltered in biotinylated samples and homogenates of slices pre-incubated with DHA or EPA (Fig. 7C and D). Similarly, NR2A protein levels in biotinylated samples were unchanged in slices pre-incubated with DHA ($103 \pm 6\%$ of control; $n=15$ slices from 3 different cultures) or EPA ($101 \pm 5\%$ of control; $n=15$ slices from 3 different cultures), again confirming the specificity of DHA on AMPA receptors.

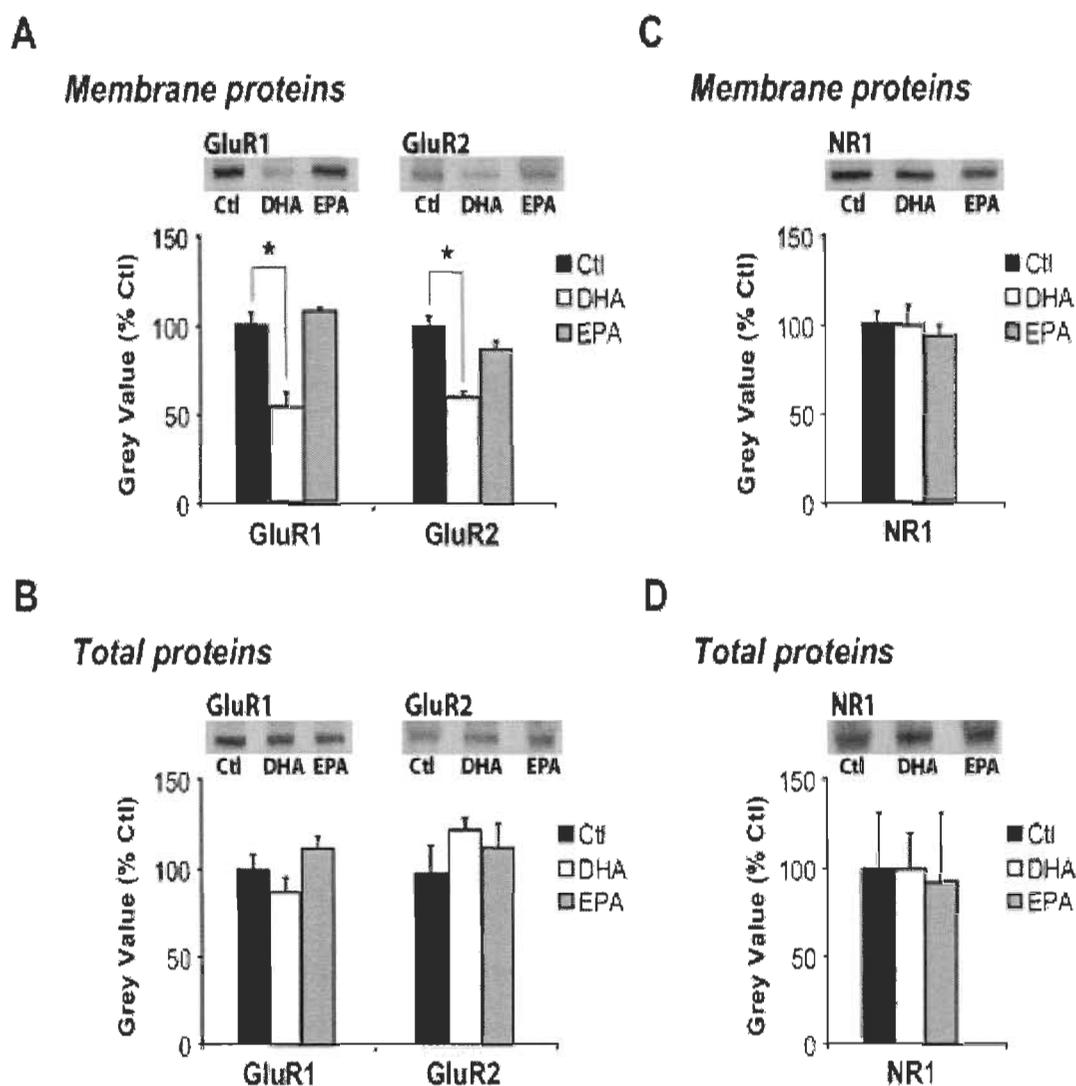


Figure 6.7 Cell surface expression of GluR1 and GluR2 subunits in DHA- and EPA-treated slices. Cultured hippocampal slices were incubated with vehicle (ctl), 90 μ M DHA or 90 μ M EPA for 48 h. GluR1, GluR2 and NR1 subunit levels were then assessed by Western blots. A and C) The abundance of cell surface AMPA receptor GluR1 and GluR2 subunits (A) and the NMDA receptor NR1 subunit (C) was determined after biotinylation of cultured hippocampal slices. Immunoblots were digitized, and band intensity was measured in control slices (filled bars) and slices treated with DHA (open bars) or EPA (grey bars). B and D) Same as in A and C, except that total levels of GluR1 and GluR2 (B) and NR1 (D) subunits were determined in homogenates. The data are expressed as percentages of values in control conditions and represent the means \pm SEM obtained from 4 different cultures (n=24 slices), * p <0.05.

6.6 DISCUSSION

It has previously been observed that DHA reduces excitotoxic cell death in primary neurons, presumably by increasing the activities of antioxidant enzymes (Wang et al., 2003). DHA may also enhance neurotransmitter recapture by up-regulating glutamate reuptake systems (Berry et al., 2005), thereby limiting the spillover of synaptically-released glutamate out of the synaptic cleft. In the present investigation, we reveal an additional mechanism by which DHA could exert its neuroprotective effect, which relies on the regulation of glutamate receptor function. Indeed, hippocampal slice cultures maintained in DHA-supplemented medium were found to be resistant to excitotoxic damage generated by AMPA receptor overstimulation, but not to NMDA- or KA-induced toxicity. Moreover, the decline in excitotoxic damage by DHA was correlated with a decrease in GluR1 and GluR2 subunits on the plasma membrane, while NR1 and NR2A subunits were unaffected. Both these observations suggest that in our conditions, DHA may protect from excitotoxic cell death by selectively down-regulating AMPA receptors on the cell surface. Because hippocampal slice cultures are preserving their morphological integrities, this culture system represents an interesting model for investigating whether the protective effects of PUFAs can differ among the various hippocampal subfields. Along this line, we detected that the beneficial actions of DHA on AMPA-mediated cell death were restricted to area CA1 of the hippocampus, and could not be reproduced by EPA, another omega-3 PUFA, or AA, an omega-6 PUFA.

Recent observations have underscored the importance of lipid interactions with accessory proteins for AMPA receptor trafficking. The lipid-binding capability of PICK1, an intracellular protein that binds to the C-terminal domain of the AMPA receptor GluR2 subunit, is essential for the proper targeting of AMPA receptors to synapses and to regulate their surface expression (Jin et al., 2006). In addition, palmitoylation of PSD-95 or AMPA

receptors themselves appears to be critical for their clustering and to control synaptic strength (El-Husseini et al., 2002; Hayashi et al., 2005). At this point, we do not know how DHA decreases the expression of AMPA receptor subunits on the plasma membrane. DHA treatment is recognized to increase membrane fluidity and to change lipid composition, which could lead to protein re-localization (Li et al., 2005). Hence, it is conceivable that modification of the lipid microenvironment by DHA could alter lipid-protein interactions or influence post-translational modifications important for AMPA receptor distribution within cell compartments. Such re-distribution may result in greater internalization of AMPA receptors in the presence of DHA, which would limit the harmful effects exerted by their continuous stimulation. However, we cannot yet exclude another scenario in which DHA-induced down-regulation of AMPA receptor number could derive from reduced insertion of AMPA receptors originating from intracellular pools into synaptic membranes. Additional studies are required to further clarify the potential implication of DHA in controlling processes involved in both exocytosis and endocytosis of AMPA receptors. Independently of the intimate details of the mechanisms involved, the findings of the present study, showing that DHA selectively regulates AMPA receptor properties in membranes of hippocampal slices, are in agreement with those of Calon et al. (2004) reporting that DHA can exert its neuroprotective effects through the regulation of postsynaptic components.

DHA and EPA may both have valuable effects on brain functions, including increased glucose uptake in endothelial cells of the blood-brain barrier (Pifferi et al., 2007) and the stimulated expression of mRNAs for myelin proteins (Salvati et al., 2007). However, the fact that EPA, in contrast to DHA, is unable to regulate GluR subunit levels in membranes and AMPA-mediated toxicity underscores some differences in the properties of these 2 omega-3 PUFAs. EPA and DHA have previously been reported to differentially affect cellular processes, such as mean platelet volume (Park &

Harris, 2002) and the proliferation of mesangial cells (Yusufi et al., 2003). Patients consuming high amounts of DHA or with the highest blood DHA concentrations present lower risks of developing AD, while the dietary uptake of EPA is ineffective (Morris et al., 2003; Schaefer et al., 2006). On the other hand, recent epidemiological studies have demonstrated that EPA supplementation might be more efficient than DHA consumption for the treatment of mood disorders (Parker et al., 2006). Several reasons may explain these differences between EPA and DHA. First, they could be linked to different incorporation rates of the omega-3 FAs in cultured hippocampal slices, similar to what has been reported previously for cellular membranes of the myocardium and skeletal muscles (Owen et al., 2004). Second, Brown & Subbaiah (1994) have established that incorporation of DHA, but not EPA, into the cell membranes of fibroblasts alters membrane biophysical characteristics and functions. Third, both PUFAs are under the influence of oxidative mechanisms, which may lead to the formation of metabolic end-products with biological activities (Sethi et al., 2002; Mishra et al., 2004). For example, the enzymatic oxygenation of DHA generates D-series resolvins and neuroprotectins (Serhan et al., 2002; Mukherjee et al., 2004; Bazan, 2006) while EPA enzymatic oxidation produces E-series resolvins (Serhan et al., 2000). Likewise, the non-enzymatic oxidation of DHA and EPA increases the levels of F₄ or A₄/J₄ neuroprostanes and A₃/J₃ isoprostanes, respectively (Roberts et al., 1998; Fam et al., 2002; Brooks et al., 2008). Although some of these lipid mediators have anti-inflammatory and cytoprotective properties (Bazan, 2006; Serhan et al., 2004; Musiek et al., 2008), the biological consequences of others remain largely unknown. Therefore, we cannot rule out the possibility that the distinct effects of DHA and EPA result either from an array of potentially bioactive lipid species yielded by their oxygenation or from their degradation to inactive by-products. On the other hand, it is worth mentioning that under specific circumstances the physiological effects of unsaturated fatty acids (including DHA) occur when the concentration of lipids is sufficient to favour the appearance of micellar structures (Serth et al.,

1991). Indeed, it will be of interest to eventually verify whether the neuroprotective actions of DHA could rely on its capacity to adopt micellar conformation.

Under prolonged exposure to DHA, only CA1 cells become less vulnerable to AMPA-mediated toxicity in rat hippocampal slice cultures. From a neuropathological perspective, this observation is important as neurons in the hippocampal CA1 region are recognized to be extremely sensitive to oxidative damage, while those in the adjacent CA3 region are essentially resistant to such insults (Wang et al., 2005, 2007). CA1 neurons are also more susceptible to ischemia-induced neuronal damage (Schmidt-Kastner & Freund, 1991; Olsson et al., 2003), a situation that involves glutamate receptor overactivation. Of course, to address the question of whether DHA-induced reduction of cell death in culture slices is physiologically relevant, an important future outcome will be to determine whether DHA dietary supplementation can down-regulate the surface expression of AMPA receptors *in vivo* and, consequently, diminish CA1 vulnerability to excitotoxic insults. The mechanisms contributing to the regional effects of DHA remain speculative. One possible scenario could be that the regulation of AMPA receptors may be different among hippocampal subfields. Support for this hypothesis has been provided by previous experiments performed by our group revealing that, in frozen brain sections, phospholipase A₂ (PLA₂)-induced changes in AMPA receptor binding are restricted to area CA1 of the hippocampus (Menard et al., 2005), and that inhibition of calcium-independent PLA₂ selectively renders CA1 cells more susceptible to excitotoxicity (Menard et al., 2007). Interestingly, recent results have disclosed that mutant mice lacking transmembrane AMPA receptor regulatory protein gamma-8, which plays pivotal roles in AMPA receptor trafficking and gating, express much less synaptic and extrasynaptic AMPA receptors in the CA1 region, while this reduction is milder in area CA3 (Fukaya et al., 2006), indicating that the impact of proteins important for AMPA receptor distribution

is variable and depends on hippocampal subregions. Thus, it seems reasonable to consider the possibility that among the hippocampal sectors, DHA could affect some of these proteins, which consequently could regionally modify the subcellular localization and/or desensitization of AMPA receptors. In this line, Arai and Lynch (1996) reported that desensitization of AMPA receptors in CA1 and CA3 is subjected to differential regulation, a characteristic that is suggested to rely on the differential expression of splice variants (called “flip and flop”) of AMPA receptor subunits. Therefore, it will be interesting to explore the possibility that splice variants of AMPA receptor subunits could be differentially regulated by DHA in areas CA1 and CA3. Of course, future experiments should clarify the signaling pathways underlying such preferential effects of DHA in area CA1 of the hippocampus.

6.7 REFERENCES

Arai A, Lynch G. 1996. Response to repetitive stimulation of AMPA receptors in patches excised from fields CA1 and CA3 of the hippocampus. *Brain Res* 716(1-2):202-206.

Arendash GW, Jensen MT, Salem N Jr, Hussein N, Cracchiolo J, Dickson A, Leighty R, Potter H. 2007. A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice. *Neuroscience* 149(2):286-302.

Bazan NG. 2006. Survival signaling in retinal pigment epithelial cells in response to oxidative stress: significance in retinal degenerations. *Adv Exp Med Biol* 572:531-540.

Bernardino L, Xapelli S, Silva AP, Jakobsen B, Poulsen FR, Oliveira CR, Vezzani A, Malva JO, Zimmer J. 2005. Modulator effects of interleukin-1 β and

tumor necrosis factor- α on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 25(29):6734-6744.

Berry CB, Hayes D, Murphy A, Wiessner M, Rauen T, McBean GJ. 2005. Differential modulation of the glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid. *Brain Res* 1037(1-2):123-133.

Bousquet M, Saint-Pierre M, Julien C, Salem N Jr, Cicchetti F, Calon F. 2008. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* 22(4):1213-1225.

Brooks JD, Milne GL, Yin H, Sanchez SC, Porter NA, Morrow JD. 2008. Formation of highly reactive cyclopentenone isoprostane compounds (A3/J3-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid. *J Biol Chem* 283(18):12043-12055.

Brown ER, Subbaiah PV. 1994. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on human skin fibroblasts. *Lipids* 29(12):825-829.

Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, Rostaing P, Triller A, Salem N, Jr, Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM. 2004. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 43(5):633-645.

Calon F, Lim GP, Morihara T, Yang F, Ubeda O, Salem N, Jr, Frautschy SA, Cole GM. 2005. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 22(3):617-626.

Calon F, Cole G. 2007. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77:287-293.

Catalan J, Moriguchi T, Slotnick B, Murthy M, Greiner RS, Salem N Jr. 2002. Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behav Neurosci* 116(6):1022-1031.

Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas J, Krinos X, Chloptsios Y, Nikolaou V, Stefanadis C. 2007. Long-term fish consumption is associated with protection against arrhythmia in healthy persons in a Mediterranean region – the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* 85(5):1385-1391.

Connor WE, Connor SL. 2007. The importance of fish and docosahexaenoic acid in Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 85(4):929-930.

Conquer JA, Tierney MC, Zecevic J, Bettger WJ, Fisher RH. 2000. Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids* 35(12):1305-1312.

Decker T, Lohmann-Matthes ML. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115(1):61-69.

El-Husseini Ael-D, Schnell E, Dakoji S, Sweeney N, Zhou Q, Prange O, Gauthier-Campbell C, Aguilera-Moreno A, Nicoll RA, Brecht DS. 2002. Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* 108(6):849-863.

Fam SS, Murphey LJ, Terry ES, Zackert WE, Chen Y, Gao L, Pandalai S, Milne GL, Roberts LJ, Porter NA, Montine TJ, Morrow JD. 2002. Formation of highly reactive A-ring and J-ring isoprostane-like compounds (A4/J4-neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 277(39):36076-36084.

Fedorova I, Salem N Jr. 2006. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75(4-5):271-289.

Fukaya M, Tsujita M, Yamazaki M, Kushiya E, Abe M, Akashi K, Natsume R, Kano M, Kamiya H, Watanabe M, Sakimura K. 2006. Abundant distribution of TARP gamma-8 in synaptic and extrasynaptic surface of hippocampal neurons and its major role in AMPA receptor expression on spines and dendrites. *Eur J Neurosci* 24(8):2177-2190.

Glomset JA. 2006. Role of docosahexaenoic acid in neuronal plasma membranes. *Sci STKE* (321):pe6.

Green KN, Martinez-Coria H, Khashwji H, Hall EB, Yurko-Mauro KA, Ellis L, LaFerla FM. 2007. Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *J Neurosci* 27(16):4385-4395.

Hayashi T, Rumbaugh G, Huganir RL. 2005. Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. *Neuron* 47(5):709-723.

Holmes GL. 2002. Seizure-induced neuronal injury: animal data. *Neurology* 59(9 Suppl 5):S3-S6.

Jin W, Ge WP, Xu J, Cao M, Peng L, Yung W, Liao D, Duan S, Zhang M, Xia J. 2006. Lipid binding regulates synaptic targeting of PICK1, AMPA receptor trafficking, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 26(9):2380-2390.

Kotani S, Sakaguchi E, Warashina S, Matsukawa N, Ishikura Y, Kiso Y, Sakakibara M, Yoshimoto T, Guo J, Yamashita T. 2006. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci Res* 56(2):159-164.

Li Q, Wang M, Tan L, Wang C, Ma J, Li N, Li Y, Xu G, Li J. 2005. Docosahexaenoic acid changes lipid composition and interleukin-2 receptor signaling in membrane rafts. *J Lipid Res* 46(9):1904-1913.

Menard C, Valastro B, Martel MA, Chartier E, Marineau A, Baudry M, Massicotte G. 2005. AMPA receptor phosphorylation is selectively regulated by constitutive phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase activities. *Hippocampus* 15(3):370-380.

Menard C, Chartier E, Patenaude C, Robinson P, Cyr M, Baudry M, Massicotte G. 2007. Calcium-independent phospholipase A(2) influences AMPA-mediated toxicity of hippocampal slices by regulating the GluR1 subunit in synaptic membranes. *Hippocampus* 17(11):1109-1120.

Michaelis EK. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54(4):369-415.

Mishra A, Chaudhary A, Sethi S. 2004. Oxidized omega-3 fatty acids inhibit NF-kappaB activation via a PPARalpha-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(9):1621-1627.

Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, Aggarwal N, Schneider J. 2003. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60(7):940-946.

Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG. 2004. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(22):8491-8496.

Musiek ES, Brooks JD, Joo M, Brunoldi E, Porta A, Zanoni G, Vidari G, Blackwell TS, Montine TJ, Milne GL, McLaughlin B, Morrow JD. 2008. Electrophilic Cyclopentenone Neuroprostanes Are Anti-inflammatory Mediators Formed from the Peroxidation of the ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid Docosahexaenoic Acid. *J Biol Chem* 283(29):19927-19935.

Oksman M, Iivonen H, Högberg E, Amtul Z, Penke B, Leenders I, Broersen L, Lütjohann D, Hartmann T, Tanila H. 2006. Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 23:563-572.

Olsson T, Wieloch T, Smith ML. 2003. Brain damage in a mouse model of global cerebral ischemia. Effect of NMDA receptor blockade. *Brain Res* 982(2):260-269.

Owen AJ, Peter-Przyborowska BA, Hoy AJ, McLennan PL. 2004. Dietary fish oil dose- and time-response effects on cardiac phospholipid fatty acid composition. *Lipids* 39(10):955-961.

Park Y, Harris W. 2002. EPA, but not DHA, decreases mean platelet volume in normal subjects. *Lipids* 37(10):941-946.

Parker G, Gibson NA, Brotchie H, Heruc G, Rees AM, Hadzi-Pavlovic D. 2006. Omega-3 fatty acids and mood disorders. *Am J Psychiatry* 163(6):969-978.

Pifferi F, Jouin M, Alessandri JM, Haedke U, Roux F, Perrière N, Denis I, Laviaille M, Guesnet P. 2007. n-3 Fatty acids modulate brain glucose transport in endothelial cells of the blood-brain barrier. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77(5-6):279-286.

Roberts LJ 2nd, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, Dettbarn WD, Morrow JD. 1998. Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 273(22):13605-13612.

Salvati S, Natali F, Attorri L, Di Benedetto R, Leonardi F, Di Biase A, Ferri F, Fortuna S, Lorenzini P, Sanchez M, Ricceri L, Vitelli L. 2007. Eicosapentaenoic acid stimulates the expression of myelin proteins in rat brain. *J Neurosci Res* 86(4):776-784.

Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, Lamon-Fava S, Robins SJ, Au R, Tucker KL, Kyle DJ, Wilson PW, Wolf PA. 2006. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch Neurol* 63(11):1545-1550.

Schmidt-Kastner R, Freund TF. 1991. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40(3):599-636.

Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. 2000. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal

antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 192(8):1197-1204.

Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL. 2002. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 196(8):1025-1037.

Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Arita M. 2004. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 73(3-4):155-172.

Serth J, Lautwein A, Frech M, Wittinghofer A, Pingoud A. 1991. The inhibition of the GTPase activating protein-Ha-ras interaction by acidic lipids is due to physical association of the C-terminal domain of the GTPase activating protein with micellar structures. *EMBO J* 10(6):1325-1330.

Sethi S, Ziouzenkova O, Ni H, Wagner DD, Plutzky J, Mayadas TN. 2002. Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR alpha. *Blood* 100(4):1340-1346.

Silva AP, Pinheiro PS, Carvalho AP, Carvalho CM, Jakobsen B, Zimmer J, Malva JO. 2003. Activation of neuropeptide Y receptors is neuroprotective against excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *FASEB J* 17(9):1118-1120.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.

Takeuchi T, Fukumoto Y, Harada E. 2002. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. *Behav Brain Res* 131(1-2):193-203.

Wang X, Zhao X, Mao ZY, Wang XM, Liu ZL. 2003. Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid on glutamate-induced cytotoxicity in rat hippocampal cultures. *Neuroreport* 14(18):2457-2461.

Wang X, Pal R, Chen XW, Limpeanchob N, Kumar KN, Michaelis EK. 2005. High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region. *Brain Res Mol Brain Res* 140(1-2):120-126.

Wang X, Pal R, Chen XW, Kumar KN, Kim OJ, Michaelis EK. 2007. Genome-wide transcriptome profiling of region-specific vulnerability to oxidative stress in the hippocampus. *Genomics* 90(2):201-212.

Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. 2004. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 21(10):1457-1467.

Yavin E, Brand A, Green P. 2002. Docosahexaenoic acid abundance in the brain: a biodevice to combat oxidative stress. *Nutr Neurosci* 5(3):149-157.

Youdim KA, Martin A, Joseph JA. 2000. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci* 18(4-5):383-399.

Yusufi AN, Cheng J, Thompson MA, Walker HJ, Gray CE, Warner GM, Grande JP. 2003. Differential effects of low-dose docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on the regulation of mitogenic signaling pathways in mesangial cells. *J Lab Clin Med* 141(5):318-329.

Zhou M, Baudry M. 2006. Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *J Neurosci* 26(11):2956-2963.

6.8 ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to Guy Massicotte (Grant number 105942). Caroline Ménard is the recipient of a studentship from the NSERC. The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript.

6.9 ABBREVIATIONS

AD, Alzheimer's disease; AMPA, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; KA, kainic acid; LDH, lactate dehydrogenase; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NPD1, neuroprotectin D1; PI, propidium iodide; PICK1, protein interacting with C kinase 1; PLA₂, phospholipase A₂; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-8% polyacrylamide gel electrophoresis; SS, saline solution; TBS, Tris acetate-buffered saline.

CHAPITRE VII

REGULATION OF TAU PHOSPHORYLATION BY IPLA₂γ ACTIVITY IN HIPPOCAMPAL SLICES CULTURES FROM TRANSGENIC P301L MICE

Caroline **MÉNARD**^{*a}, Guanghong **LIAO**^b, Michel **BAUDRY**^c, Guy
MASSICOTTE^a and Xiaoning **BI**^b

^aDépartement de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Québec, Canada

^bBasic Medical Sciences, Western University of Health Sciences, Pomona,
California, USA

^cNeuroscience Program, University of Southern California,
Los Angeles, CA 90089-2520

Running title: iPLA₂ modulates tau phosphorylation and synthesis

Number of pages: 28

Number of figures: 5

Number of words: 5,385 (212 in Abstract, 616 in Introduction, 837 in Materials
& Methods, 1,002 in Results, 939 in Discussion, 1,360 in References, 419 in
Figure legends)

Corresponding author's address:

Caroline Ménard

Département de chimie-biologie

U.Q.T.R.

C.P. 500

Trois-Rivières, Québec, Canada

G9A 5H7

Phone (819) 376-5053

Fax (819) 376-5084

E-mail Caroline.Menard@uqtr.ca

Keywords: iPLA₂, tau, phosphorylation, synthesis, Alzheimer's disease

7.1 RÉSUMÉ

Des études antérieures ont démontré que l'activité des phospholipases indépendantes du Ca^{2+} (iPLA₂) est diminuée dans le cerveau de patients affectés par la maladie d'Alzheimer (MA). Cette altération s'avère spécifique à ce type de phospholipases. À ce jour, l'influence potentielle d'un dysfonctionnement de l'activité iPLA₂ sur le développement de la MA demeure une pure spéculation. C'est pourquoi, dans le présent manuscrit, nous avons exploré la possibilité qu'une inhibition de la iPLA₂ puisse contribuer au développement de l'hyperphosphorylation pathologique de tau, une protéine normalement associée étroitement aux microtubules du cytosquelette. Cette hypothèse est d'autant plus probable qu'à la lumière des résultats présentés dans les chapitres précédents, l'inhibition spécifique de cette phospholipase semble faciliter l'activation de kinases possiblement via l'entrée de Ca^{2+} par des récepteurs AMPA enrichis en GluR1. Ce cation étant en mesure d'activer une panoplie de kinases connues pour phosphoryler la protéine tau, il est probable que celle-ci sera affectée par l'inhibition de la iPLA₂. Pour ce faire, nous avons mis en culture les hippocampes de souris transgéniques P301L car elles expriment les isoformes tau humaines en plus des protéines endogènes. Nous avons observé qu'un traitement de 12 heures avec le R-BEL, un inhibiteur spécifique de la iPLA₂ γ , induit une augmentation significative de la phosphorylation de tau sur les résidus Thr231, Ser199/202 et Ser404. Le niveau total de protéines tau est aussi plus élevé que chez les cultures contrôles, tel que déterminé à l'aide de la technique d'immunobuvardage de type Western. Nous avons confirmé ces résultats grâce à l'immunofluorescence et la microscopie confocale. Nous avons également déterminé que l'hyperphosphorylation de tau est localisée principalement dans les corps cellulaires et les dendrites des neurones pyramidaux de l'hippocampe. Ces changements sont associés à une hausse de la présence de p25, un activateur de la « cyclin-dépendent kinase 5 » ainsi

qu'à une suractivation via la phosphorylation des « mitogen-activated protein kinases ». Le traitement avec le R-BEL n'a pas d'effet sur la phosphorylation ou la synthèse de la « glycogen synthase 3 », une enzyme liée de près à la formation des enchevêtrements neurofibrillaires, marqueur bien documenté de la MA avancée. Globalement, nos résultats laissent croire que l'activité constitutive de la iPLA₂ γ joue un rôle important dans la régulation de l'hyperphosphorylation de tau dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe. Cela soulève l'hypothèse qu'une altération de son activité pourrait contribuer au développement des tauopathies et de la MA.

7.1.1 Contribution des auteurs de l'article

L'article a été rédigé par Caroline Ménard, le Dr. Xiaoning Bi, le Dr. Guy Massicotte et le Dr. Michel Baudry. Toutes les expériences présentées ont été faites par Caroline Ménard avec l'aide du Dr. Guanghong Liao, principalement lors du départ des cultures d'hippocampes.

Ce manuscrit a été soumis en avril 2008 au journal *Neurobiology of Aging* et il est présentement en révision.

7.2 ABSTRACT

Several reports have documented that, in contrast to other phospholipase A₂ (PLA₂) types, calcium-independent PLA₂ (iPLA₂) activity is down-regulated in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients. However, the potential influence of iPLA₂ dysfunction on AD pathology has remained unexplored. In the present investigation, we determined whether blockade of iPLA₂ could contribute to the development of hyperphosphorylation of the microtubule-associated protein tau in cultured hippocampal slices from

transgenic P301L mice. In this experimental model, treatment (for up to 12 h) with the R-isomer of bromoenol lactone (R-BEL), a specific iPLA₂γ inhibitor, resulted in a significant increase of tau phosphorylation at Thr231, Ser199/202 and Ser404 sites, and in total tau levels, as detected by immunoblotting procedures. High-resolution imaging studies demonstrated that hyperphosphorylation was primarily localized in cell bodies and dendrites of hippocampal pyramidal neurons. These changes appear to be associated with up-regulation of p25, an activator of cyclin-dependent kinase 5, and phosphorylation/activation of mitogen-activated protein kinase. In contrast, R-BEL treatment had no effect on total protein level or phosphorylation of glycogen synthase kinase 3. In summary, our data provide strong evidence that constitutive iPLA₂γ activity plays an important role in the regulation of tau hyperphosphorylation in hippocampal pyramidal neurons, raising the possibility that iPLA₂ alterations might contribute to the development of tauopathies in AD.

7.3 INTRODUCTION

Phospholipases A₂ (PLA₂s) are a large and diverse superfamily of enzymes (over 20 isoforms) that generally catalyze the hydrolysis of glycerophospholipids at the sn-2 position, generating lysophospholipids and free fatty acids (Kudo & Murakami, 2002). In classification based on calcium requirement for enzymatic activity, PLA₂s have been categorized into 3 types, namely, the cytosolic calcium-dependent group (cPLA₂), the calcium-independent group (iPLA₂), and the secreted group (sPLA₂). These enzymes have generally been considered to participate in the regulation of inflammation, immune function and smooth muscle contraction through the generation of arachidonic acid and its subsequent metabolism to eicosanoids (prostaglandins, leukotrienes, etc.) via the cyclooxygenase and lipoxygenase pathways (Kudo & Murakami, 2002; Leslie, 2004).

In recent years, iPLA₂s have attracted considerable attention as it has been suggested that these enzymes represent predominant PLA₂ activity in resting cells (Wolf et al., 1995; Yang et al., 1999). IPLA₂, cloned and identified in several species, is normally classified in group VI PLA₂, which includes the iPLA₂β and iPLA₂γ isoforms. IPLA₂β, the most extensively studied iPLA₂, has been implicated in various cellular functions, such as phospholipid remodeling (Balsinde et al., 1997), eicosanoid formation (Tay & Melendez, 2004), cell proliferation (Herbert & Walker, 2006), apoptosis (Atsumi et al., 1998), and the activation of store-operated channels and capacitative calcium influx (Smani et al., 2004). Disruption of the iPLA₂ gene causes impaired sperm motility (Bao et al., 2004), mitigated insulin secretion (Bao et al., 2006) as well as neurodegenerative disorders (Morgan et al., 2006). IPLA₂γ is a membrane-bound enzyme with some unique features, such as the utilization of distinct translation initiation sites producing different sizes of enzymes with distinct subcellular localizations (Mancuso et al., 2000; Tanaka et al., 2000; Yang et al., 2003; Mancuso et al., 2004; Murakami et al., 2005; Kinsey et al., 2007), and phospholipid selectivity in terms of *sn*-1/*sn*-2 positional specificity that differs among substrates (Yan et al., 2005).

Pharmacologically, iPLA₂β and iPLA₂γ activities can be distinguished by their sensitivity to bromoenol lactone (BEL) isomers. For instance, iPLA₂β activity is preferentially reduced by the S-enantiomer of BEL (S-BEL), while the R-enantiomer (R-BEL) specifically reduces iPLA₂γ activity (Jenkins et al., 2002). We previously used these inhibitors to discover that basal iPLA₂γ activity participates in the regulation of phosphorylation of the GluR1 subunits of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate (AMPA) receptors in the hippocampus (Menard et al., 2007). Thus, we found that chronic inhibition of iPLA₂γ by R-BEL (but not S-BEL) results in up-regulation of GluR1 subunits in hippocampal synaptic membranes. Consequently, a significant increase in glutamate-induced toxicity was observed in area CA1 of the

hippocampus after this treatment, indicating that constitutively-active iPLA₂ γ may be neuroprotective against excitotoxic damage in the brain.

Interestingly, iPLA₂ activity is decreased in the prefrontal cortex of Alzheimer's disease (AD) patients, possibly reflecting a compensatory response to pathologically-accelerated phospholipid metabolism occurring early in the disease (Talbot et al., 2000). It is, therefore, tempting to speculate that down-regulation of iPLA₂ γ activity could lead to an increase in GluR1-containing AMPA receptors, resulting in augmented calcium influx into neurons, which, in turn, could trigger a cascade of pathological mechanisms culminating in the cellular manifestations of AD. In this study, we tested cultured hippocampal slices to evaluate the relationship between iPLA₂ dysfunction (precisely iPLA₂ γ) and tau phosphorylation, one of the hallmarks of AD pathogenesis (Mandelkow & Mandelkow, 1998). To address the question, we treated hippocampal slice cultures from P301L tau transgenic mice with R-BEL for 12 h and assessed the changes in tau phosphorylation according to immunoblot procedures and confocal immunofluorescence microscopy. In addition, we investigated the effects of R-BEL treatment on kinase activities generally believed to control tau phosphorylation, and we evaluated the influence of iPLA₂ γ inhibition on cell integrity, by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release in culture medium.

7.4 MATERIAL AND METHODS

7.4.1 Antibodies

AT8 (1:1,000), AT231 (1:1,000) and tau404 (1:1,000) antibodies were purchased from Biosource International Inc. (Camarillo, CA). tau-1 (1:1,000), tau-5 (1:1,000) and tau-c (1:1,000) were obtained from Chemicon (Temecula, CA). cyclin-dependent kinase-5 (cdk5, 1:200), p35 (1:200), and glycogen

synthase kinase-3 (GSK-3, 1:200) antibodies were bought from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). All other antibodies were procured from Cell Signaling (Danvers, MA) and deployed at a 1:1,000 dilution for immunoblots.

7.4.2 Drugs

The iPLA₂ inhibitor R-BEL was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). All other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Stock solutions of R-BEL were prepared in dimethylsulfoxide,(final concentration: 0.02%) and stored at -20°C.

7.4.3 Preparation of cultured hippocampal slices

Cultured hippocampal slices were prepared from P301L tau transgenic mice pups (Lewis et al., 2000), 7-9 days postnatally, as described previously (Lauterborn et al., 2000). In most cases, cultured slices included the hippocampus, entorhinal cortex, and portions of the adjacent neocortex. Slices were placed on Millicell-CM membrane inserts (Millipore Corporation, Bedford, MA) in 6-well culture cluster plates (Corning Inc., Acton, MA) containing sterile medium (1 ml/well) consisting of minimum essential medium, 30 mM dextrose, 30 mM HEPES, 5 mM Na₂HCO₃, 3 mM glutamine, 0.5 mM ascorbic acid, 2 mM CaCl₂, 2.5 mM MgSO₄, 1 mg/l insulin, and 20% horse serum (pH 7.4). For each mouse, slices from both hippocampi were explanted onto 4 membranes (4 slices per membrane). The slices were placed in a humidified incubator at 35°C under 5% CO₂ for 12 days, the medium being changed 3 times a week. After 12 days in vitro, cultured hippocampal slices were incubated for 12 h with and without R-BEL. Experiments were performed in accordance with National Institutes of Health

guidelines, and protocols minimizing distress to the animals were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

7.4.4 Electrophoresis and immunoblotting

Cell homogenates of control or R-BEL-treated cultures were subjected to immunoblotting following conventional procedures. Briefly, cultured hippocampal slices were homogenized in 50 mM Tris-acetate buffer (pH 7.4) containing 320 mM sucrose, 0.1 mM EGTA and protease inhibitors (5 μ M leupeptin, 1 μ g/mL N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone). Protein levels of the homogenates were quantitated by Bio-Rad protein assay. Aliquots of homogenates corresponding to 25 μ g of proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate-8% or 12% polyacrylamide gel electrophoresis, and proteins were then transferred onto PVDF membranes. The membranes were blocked with Tris-acetate-buffered saline (TBS) containing 5% bovine serum albumin for 1 h at room temperature, probed with primary antibodies, washed in TBS and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were detected with a chemiluminescent substrate (ECL Plus kit and reagents; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), and computer-generated images were analyzed by densitometry with the National Institutes of Health image analysis system (Bethesda, MD).

7.4.5 Immunofluorescence

Control and R-BEL-treated cultured hippocampal slices were fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected in 20% sucrose, and sectioned in a freezing microtome at 25 μ m. The sections were then processed for double-labeling immunofluorescence. In brief, free-floating sections were first incubated in 10% normal horse serum and 3% goat serum diluted in 0.1 M TBS with 0.3%

TX-100 for 1 h at room temperature, followed by overnight incubation with primary antibodies at 4°C. The antibodies were: mouse AT8 (1:500, Innogenetics, Zwijnrecht, Belgium) in combination with rabbit AT231 (1:1,000, Biosource International Inc.) in a solution of 5% horse serum and 1.5% goat serum in 0.1 M TBS with 0.3% TX-100. After 3 washes in PBS, the sections were incubated with corresponding secondary antibodies (1:400) conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 in 5% normal horse serum for 2 h. Both secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Free-floating sections were mounted on precoated slides (SuperPlus; Fisher Scientific International Inc., Pittsburgh, PA), air-dried and coverslipped with mounting solution (VictorShield).

7.4.6 LDH release

Cytotoxicity was evaluated by analyzing LDH release in culture medium. LDH, a stable cytoplasmic enzyme present in all cells, is rapidly released into culture medium upon damage to the plasma membrane; the amount of enzyme activity in the medium has been shown to correlate with the number of damaged cells (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). For these experiments, a CytoTox 96 non-radioactive assay kit was obtained from Promega (Madison, WI). Briefly, 50 μ L of Griess reagent was mixed with 50 μ L of culture medium collected from slices treated with or without R-BEL, and incubated for 30 min at room temperature. NADH produced by the reaction was subjected to enzymatic assay consisting of tetrazolium salt conversion to a red formazan product. Optical density was measured at 492 nm with a spectrophotometer. A sample of culture medium from non-treated slices served as control, and the data were normalized to the standard supplied by the manufacturer. The data were then expressed as percentages of control values and represented an average of triplicate measurements from 4 different cultures.

7.4.7 Statistical analysis

In all cases, the data are presented as means \pm SEM. Statistical differences between experimental groups were analyzed with 1-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* analysis. The significance level was set at $p < 0.05$.

7.5 RESULTS

7.5.1 R-BEL treatment enhanced tau phosphorylation in cultured hippocampal slices

Cultured hippocampal slices from P301L tau transgenic mice were treated with R-BEL for 12 h and then processed for immunoblotting. As shown in Figure 1A, R-BEL enhanced tau phosphorylation at Ser199/202 (AT8, $156 \pm 9\%$ vs $100 \pm 7\%$ for control slices, $p < 0.001$) and Thr231 (AT231, $146 \pm 5\%$ vs $100 \pm 9\%$ for control slices, $p < 0.001$). R-BEL also increased tau phosphorylation at Ser404 ($161 \pm 9\%$, $p < 0.001$) (Fig. 1B). To evaluate whether R-BEL-induced modulation of tau phosphorylation was due to a higher level of tau expression by hippocampal slice cultures, we assessed tau total protein levels with 2 different antibodies, tau-5, which recognizes phosphate-independent epitopes, and tau-1, which recognizes a phosphate-dependent non-phosphorylated epitope (Papasozomenos & Su, 1995). As shown in Figure 1C, R-BEL treatment elicited a small but significant increase in the levels of tau protein recognized by tau-1 antibody ($119 \pm 9\%$ vs $100 \pm 4\%$ for control; $p < 0.05$) or by tau-5 ($131 \pm 8\%$ vs $100 \pm 5\%$; $p < 0.05$). Tau proteins can be truncated by caspases at Asp421, and this post-translational modification is linked to neurofibrillary tangle formation, as caspase-cleaved tau promotes aggregate formation (Cotman et al., 2005).

Therefore, we tested the effects of iPLA₂ inhibition on the levels of truncated tau, with an antibody specific for caspase-mediated, truncated tau (Fig. 1B). No significant change in tau-c level was observed after R-BEL treatment (Fig. 1B).

Confocal immunofluorescence microscopy was used to evaluate the localization of phosphorylated tau proteins in cultured hippocampal slices. Cultures were treated with 3 μ M R-BEL for 12 h and then processed for double-immunofluorescence microscopy, as described in the Materials and Methods section. Neurons weakly immunopositive to Ser199/202 (AT8, red) and Thr231 (AT231, green) tau phosphorylation sites were found predominantly in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus (Fig. 2). Staining was mostly diffused and mainly localized in cell bodies and apical dendrites of the pyramidal neurons. R-BEL treatment enhanced the immunolabeling revealed by the 2 antibodies, but did not induce tangle-like structures. Furthermore, R-BEL treatment did not cause obvious morphological changes in AT8- and AT231-immunopositive neurons.

7.5.2 Tau hyperphosphorylation induced by iPLA₂ inhibition was mediated by cdk5 and mitogen-activated protein kinases (MAPK)

Tau is phosphorylated at multiple sites characterized by Ser-Pro or Thr-Pro motifs. These particular sites are targets of several proline-directed kinases, such as cdk5, MAPK or GSK-3 (Mandelkow & Mandelkow, 1998). We evaluated the contribution of these kinases to tau phosphorylation resulting from the treatment of cultured hippocampal slices with R-BEL, by analyzing their phosphorylation status with immunoblots. Cdk5 activity is regulated by a small activator, p35, that can be truncated by calpain, evoking p25 formation. The latter is a potent cdk5 activator. As shown in Figure 3A,

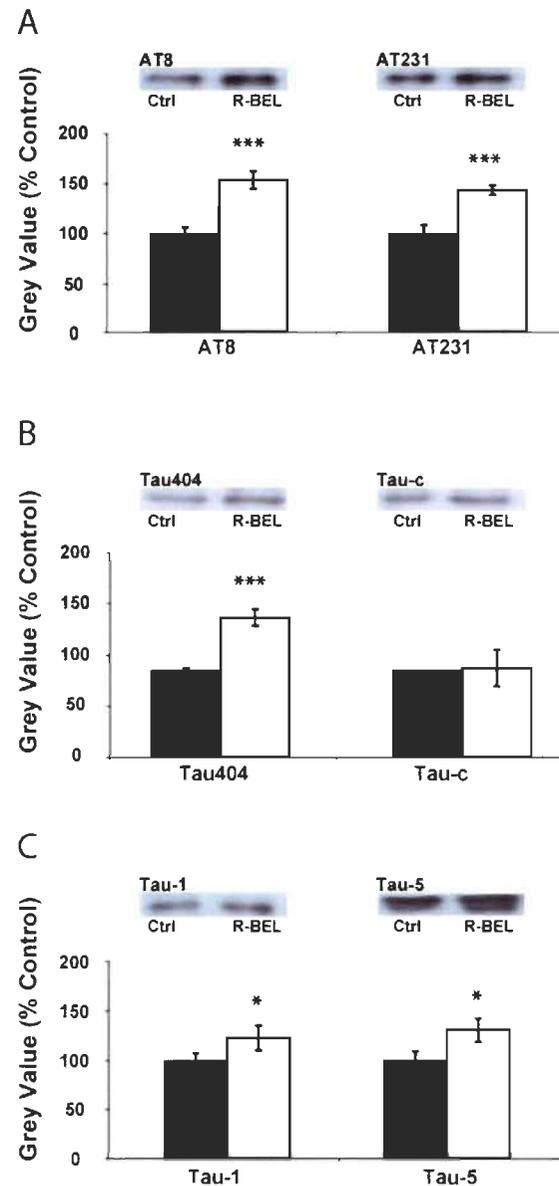


Figure 7.1 Effects of iPLA₂ inhibition on tau phosphorylation and total protein levels. Cultured hippocampal slices were incubated with or without 3 μ M R-BEL for 12 h and processed for immunoblotting. **A)** Tau phosphorylation at Ser199/202 (AT8) and Thr231 (AT231) sites. Immunoblots were digitized, and band intensity was quantified for control slices (filled bars) and slices treated with R-BEL (open bars). **B)** Tau phosphorylation at Ser404 (tau404) and tau truncation at Asp421 induced by caspases (tau-c). **C)** Levels of total tau (measured by tau-5) and non-phosphorylated tau (measured by tau-1). Data are expressed as percentages of values in control conditions and represent means \pm SEM obtained from 4 to 12 different pups ($n = 16$ to 48 slices); *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$.

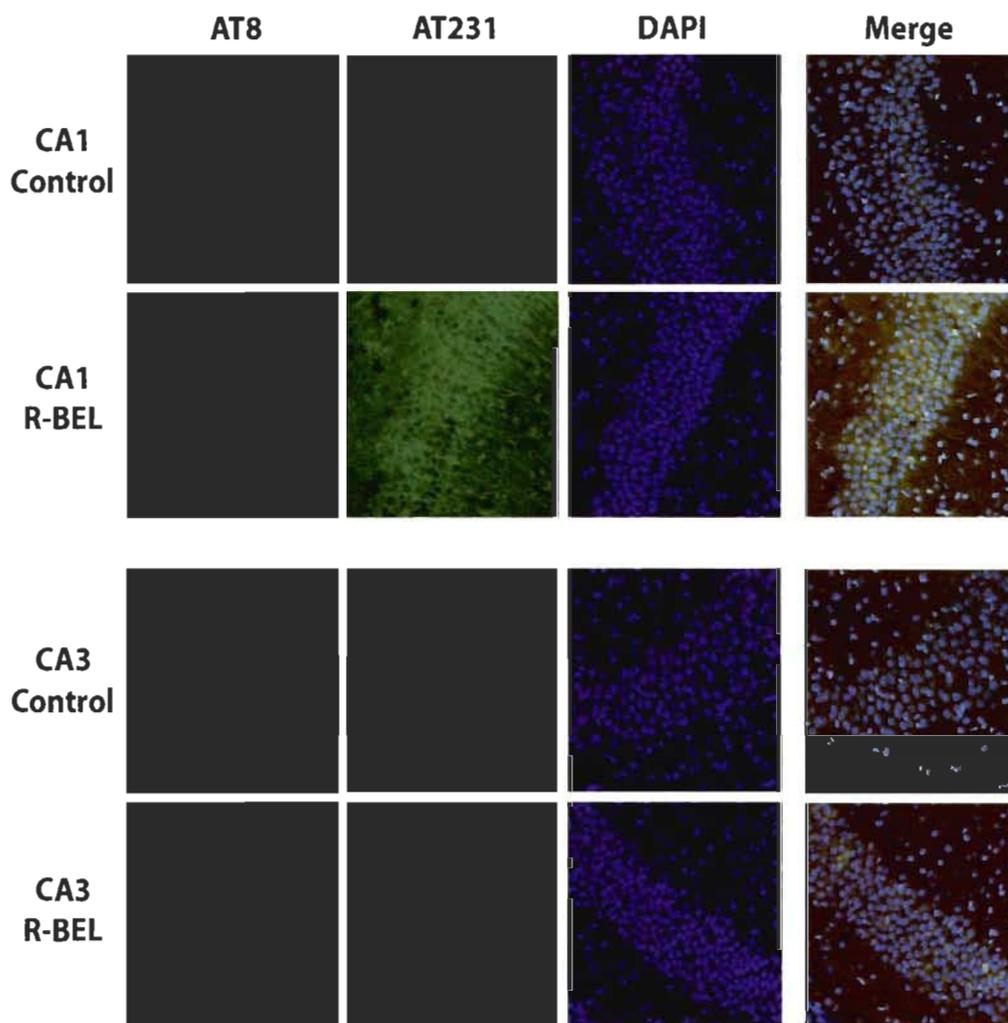


Figure 7.2 Regional localization of tau phosphorylation induced by R-BEL treatment. Double immunofluorescence staining using antibodies recognizing tau phosphorylation at Ser199/202 (AT8, red) and Thr231 (AT231, green) of cultured hippocampal slices incubated without or with 3 μ M R-BEL for 12 h in areas CA1 and CA3. The 4,6-diamidino-2-phenylindole or DAPI (blue) was included in the mounting medium to label nuclei.

iPLA₂ inhibition enhanced p25 protein level in comparison to untreated cultured slices ($143 \pm 6\%$ vs $100 \pm 7\%$, $p < 0.001$), but had no effect on cdk5 protein level. MAPK activation is necessary for different signaling pathways, including gene expression, and it has recently been linked not only to tau hyperphosphorylation but also to the plaques associated with AD (Haddad, 2004). MAPK activation was studied by evaluating phosphorylation at Tyr204 and Thr202 residues. As with cdk5, R-BEL produced an increase in phosphorylated/active forms of the enzyme without affecting its total level (Fig. 3B); p42/p44 phosphorylation at Tyr204/Thr202 residues was enhanced to $131 \pm 6\%$ vs $100 \pm 5\%$ for control slices ($p < 0.05$). Finally, we investigated GSK-3 activation and protein levels. In previous studies, GSK-3 overexpression in several transgenic models has been associated with neuronal death, tau hyperphosphorylation and a decline in cognitive performance (Avila & Hernández, 2007). Treatment of cultured hippocampal slices with R-BEL did not significantly change total GSK-3 levels or phosphorylated GSK-3 α/β at Ser21/9 phosphorylation sites (Fig. 3C).

7.5.3 R-BEL-induced tau increase was associated with mammalian target of rapamycin (mTor) and ribosomal S6 protein kinase p70 (p70S6 kinase) activation

It has been reported that the levels of phosphorylated/active mTor, a key regulator of protein translation, are elevated in AD brains and that this increment is positively correlated with enhanced total and phosphorylated tau levels (Li et al., 2005). To better understand the results obtained with tau-5 and tau-1 antibodies (see Fig. 1C) – markers of total and unphosphorylated tau – we evaluated the effect of iPLA₂ inhibition on mTor activity. Cultured hippocampal slices were treated with or without R-BEL for 12 h, and the phosphorylation state of mTor at Ser2448 residue was assessed in immunoblotting experiments. R-BEL treatment resulted in a significant

increase of mTor phosphorylation ($129 \pm 4\%$ vs $100 \pm 10\%$ for control slices, $p < 0.05$; Fig. 4A). Total mTor protein level was unchanged (Fig. 4A), in agreement with previously-reported data on post-mortem AD brains (Li et al., 2005). Another protein, p70S6 kinase, up-regulates ribosomal biosynthesis and enhances cell translational capacity. Elevated levels of phosphorylated p70S6 kinase have also been linked to the progression of neurofibrillary tangles in AD (An et al., 2003). R-BEL treatment of cultured hippocampal slices enhanced p70S6 kinase phosphorylation without affecting total protein level ($154 \pm 14\%$ vs $100 \pm 12\%$ for Thr389 and $152 \pm 11\%$ vs $100 \pm 9\%$ for Thr421/Ser424, $p < 0.01$; Fig. 4B).

7.5.4 iPLA₂ inhibition did not result in acute cell death

We previously demonstrated that R-BEL could exacerbate excitotoxicity and cell death in rat organotypic hippocampal slices (Menard et al., 2007). In the present study, we investigated whether R-BEL treatment under our experimental conditions resulted in neuronal cell death. LDH was measured in medium after the treatment of cultured hippocampal slices for 12 h with vehicle or the iPLA₂ inhibitor, as described in the Materials and Methods section. R-BEL treatment did not elicit a significant increase in LDH release compared to untreated control slices (Fig. 5). This finding correlated with the lack of effect of iPLA₂ inhibition on tau-c (see Fig. 1B), an antibody that recognizes tau truncated by caspases, a family of proteases closely linked to apoptosis.

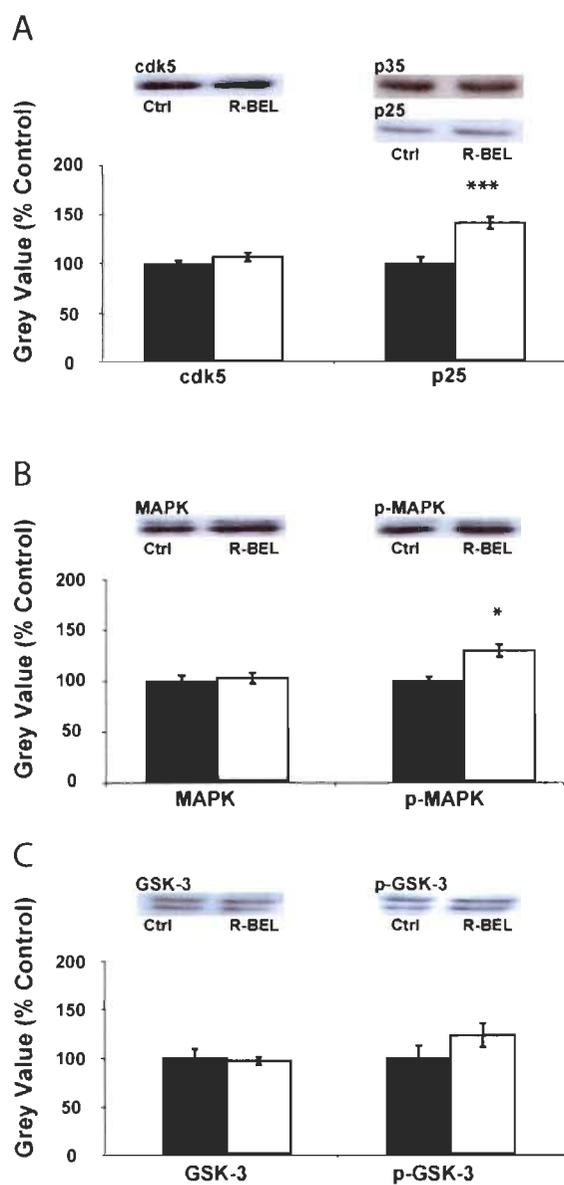


Figure 7.3 Effects of iPLA₂ inhibition on activation and levels of various kinases. Cultured hippocampal slices were incubated with or without 3 μ M R-BEL for 12 h and processed for immunoblotting analysis of **A)** cdk5 and p25, **B)** MAPK and phosphorylation sites Thr202 and Tyr204, and **C)** GSK-3 and GSK-3 phosphorylated at Ser9/Ser21. Data are expressed as percentages of values in control conditions and represent means \pm SEM obtained from 3 to 9 different pups ($n = 12$ to 36 slices); *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$.

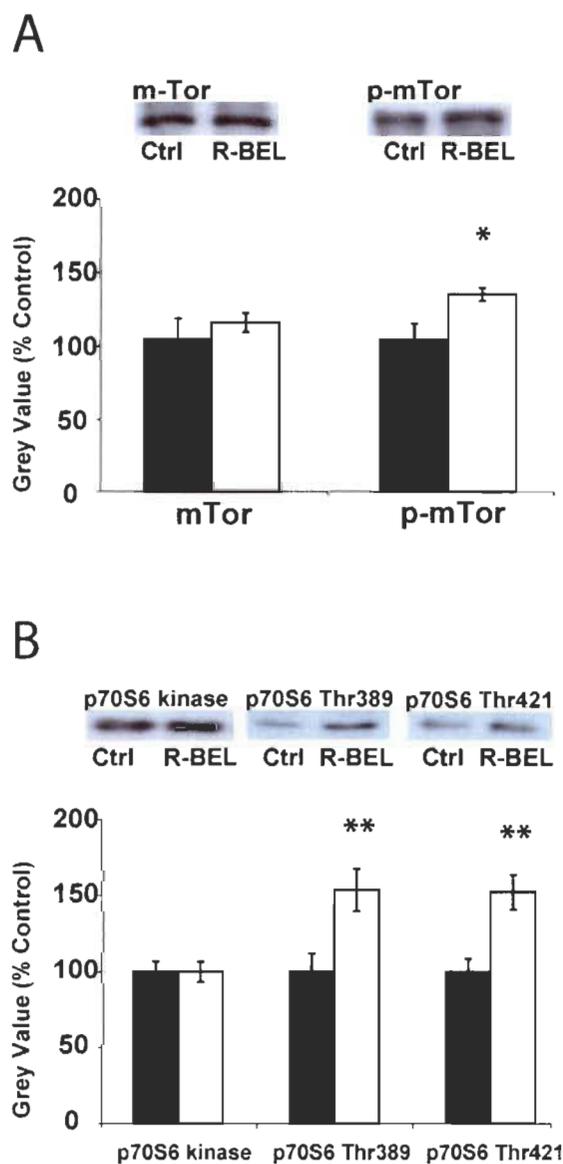


Figure 7.4 Effects of R-BEL on mTor and p70S6 kinase phosphorylation and levels. Cultured hippocampal slices were incubated with or without 3 μ M R-BEL for 12 h and then processed for immunoblotting analysis of **A**) mTor protein level and phosphorylation state (Ser2448), and **B**) p70S6 kinase protein and phosphorylation sites Thr389 and Thr421/Ser424. Data are expressed as percentages of values in control conditions and represent means \pm SEM obtained from 6 different pups ($n = 24$ slices); ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

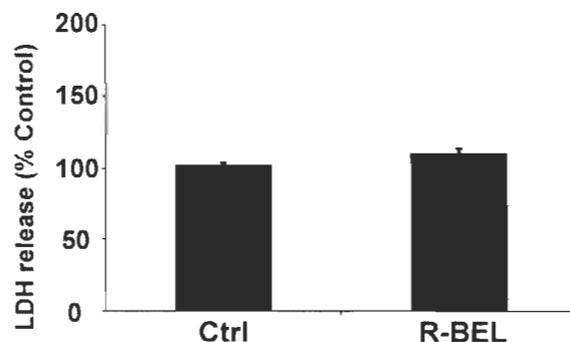


Figure 7.5 Effects of iPLA₂ inhibition on LDH release. Cultured hippocampal slices were incubated for 12 h with or without 3 μ M R-BEL. LDH release was then measured in culture medium, as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of LDH released by control slices and represent means \pm SEM obtained from 20 different pups (n = 80 slices).

7.6 DISCUSSION

Data from the present study indicate that constitutive iPLA₂ γ activity in the hippocampus regulates tau phosphorylation at sites that define tau pathology in AD. In addition, our results also suggest that tau synthesis (or degradation) might be regulated by iPLA₂ γ activity in hippocampal slice cultures from transgenic P301L mice. Employing markers for the activation of various kinases regulating tau phosphorylation, we provided evidence that changes in tau phosphorylation were likely due to activation of cdk5 and/or MAPK, but not of GSK-3. Importantly, modulation of tau phosphorylation elicited by iPLA₂ inhibition was not associated with significant cell damage, as assessed by LDH release in culture medium.

All phosphorylation sites influenced by iPLA₂ inhibition – Ser199, Ser 202, Thr231 and Ser404 – have previously been linked to alterations in tau protein conformation (Lovestone & Reynolds, 1997; Hanger et al., 1998), and Thr231 was strongly associated with the formation of paired helical filaments, a precursor state of neurofibrillary tangle formation (Mandelkow & Mandelkow, 1998). Our findings raise an important question regarding how iPLA₂ could influence tau phosphorylation in the hippocampus. Earlier studies from our laboratory indicated that R-BEL-induced iPLA₂ inhibition in rat hippocampal slice cultures potentiated AMPA-mediated cell death (Menard et al., 2007). This result led us to propose the hypothesis that iPLA₂ prevents excitotoxic damage by downregulating the number of homomeric GluR1 receptors in synaptic membranes. Because homomeric GluR1 receptors are calcium-permeable, their activation could trigger several mechanisms underlying cell death, including kinases regulating tau phosphorylation (Hynd et al., 2004). For instance, increased cdk5-mediated tau phosphorylation could arise from calpain-mediated conversion of p35 to p25; alternatively, calcium influx in neurons could activate the CaMKII-Ras-p42/44MAPK signaling pathway. Consistent with this hypothesis are recent data indicating that R-BEL treatment did not elicit increased tau phosphorylation when cultured hippocampal slices were preincubated with inhibitors of GluR1 homomeric receptors (unpublished observations).

We also examined the effect of iPLA₂ inhibition on phosphorylation of GSK-3, another kinase often linked to neurodegenerative diseases and tau malfunctions (Avila & Hernández, 2007). In contrast to cdk5 and MAPK, R-BEL did not affect GSK-3 activation. One particular feature of GSK-3 is that, for its full activation, it requires priming by other kinases, such as cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) (Sengupta et al., 1998). Once the priming sites on tau are modified by PKA, GSK-3 should be able to sequentially phosphorylate adjacent sites and, hence, induce tau hyperphosphorylation. Previous experiments have also shown that GSK-3 activity promotes tau

truncation by caspases, which usually facilitates tau aggregation (Cotman et al., 2005). Consistent with the lack of effects of R-BEL on GSK-3 activity, immunoblotting experiments indicated that caspase-3 activity was not influenced by iPLA₂γ inhibition, and confocal immunofluorescence microscopy did not reveal any evidence of tau aggregation in neurons. In addition, the absence of R-BEL effects on LDH release supports the notion that, at least over a period of 12 h, iPLA₂γ inhibition was, per se, not sufficient to induce cell death. Whether GSK-3 and caspase activation, tau aggregation and cell death might ultimately depend on the duration of R-BEL treatment remain to be determined.

Earlier studies have also indicated that iPLA₂γ is likely involved in mitochondrial membrane remodeling and repair under physiological conditions (Seleznev et al., 2006). Among the intracellular PLA₂s, iPLA₂γ has been found to be mainly localized in the mitochondria and endoplasmic reticulum (Kinsey et al., 2005, 2007), and it has been proposed that downregulation of iPLA₂ activity in rat insulinoma cells may result in failure to repair peroxidative damage to membrane phospholipids, especially those located in the mitochondria. Consequently, downregulation of iPLA₂ activity was shown to induce loss of mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c as well as of other apoptotic proteins and, ultimately, apoptosis (Seleznev et al., 2006). Accordingly, Kinsey et al. (2007) have recently reported that, in rabbit renal proximal tubular cells, iPLA₂γ activity in mitochondria is crucial to prevent oxidative stress-induced cell death. In this context, experiments are required to determine whether tau hyperphosphorylation from inhibition of iPLA₂γ activity in the hippocampus is, at least in part, dependent on mitochondrial dysfunction.

Tau hyperphosphorylation was previously correlated with a marked increase in total tau protein in neurodegenerative diseases (Khatoun et al., 1992). For this reason, we evaluated tau levels in treated and untreated

cultured hippocampal slices. R-BEL treatment significantly enhanced total tau as well as phosphorylation of p70S6 kinase, an enzyme known to modulate protein translation processes and cell survival (Dufner & Thomas, 1999). Moreover, An et al. (2003) have reported higher levels of phosphorylated p70S6 kinase in AD brains, especially at Thr389 and Thr421/Ser424 phosphorylation sites, similarly to what we observed after iPLA₂ inhibition.

Activation of p70S6 kinase is under the control of another important kinase: mTOR (Dufner & Thomas, 1999). Phosphorylation/activation of mTOR is dramatically increased in AD, and phosphorylated mTor levels are positively correlated with total tau levels (Griffin et al., 2005; Li et al., 2005). R-BEL treatment also significantly augmented tau phosphorylation at Ser2448, a target of the phosphoinositol 3 kinase (PI3K)/Akt cell survival pathway (Griffin et al., 2005). Activation of the PI3K/Akt pathway could inactivate GSK-3, suppress GSK-3-dependent tau phosphorylation, and prevent apoptosis (Baki et al., 2004). Such a mechanism could explain the lack of effect of iPLA₂ inhibition on this specific kinase that is normally closely linked to tau hyperphosphorylation. It would be interesting to conduct studies to evaluate our hypothesis.

In conclusion, our data suggest that constitutive iPLA₂γ activity plays an important role in maintaining tau integrity in hippocampal neurons. Together with the previous observation that iPLA₂ activity is reduced in AD (Gattaz et al., 1996), these findings also indicate that up-regulation of iPLA₂γ activity in the brain may be a useful approach to prevent tau dysfunction.

7.7 REFERENCES

An, W.L., Cowburn, R.F., Li, L., Braak, H., Alafuzoff, I., Iqbal, K., Iqbal, I.G., Winblad, B., Pei, J.J. 2003. Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6

kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 163(2), 591-607.

Atsumi, G., Tajima, M., Hadano, A., Nakatani, Y., Murakami, M., Kudo, I. 1998. Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca^{2+} -independent phospholipase A2 but not cytosolic phospholipase A2, which undergoes proteolytic inactivation. *J. Biol. Chem.* 273(22), 13870-13877.

Avila, J., Hernández, F. 2007. GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert. Rev. Neurother.* 7(11), 1527-1533.

Baki, L., Shioi, J., Wen, P., Shao, Z., Schwarzman, A., Gama-Sosa, M., Neve, R., Robakis, NK. 2004. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J.* 23(13), 2586-2596.

Balsinde, J., Balboa, M.A., Dennis, E.A. 1997. Antisense inhibition of group VI Ca^{2+} -independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. *J. Biol. Chem.* 272(46), 29317-29321.

Bao, S., Miller, D.J., Ma, Z., Wohltmann, M., Eng, G., Ramanadham, S., Moley, K., Turk, J. 2004. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J. Biol. Chem.* 279(37), 38194-38200.

Bao, S., Song, H., Wohltmann, M., Ramanadham, S., Jin, W., Bohrer, A., Turk, J. 2006. Insulin secretory responses and phospholipid composition of pancreatic islets from mice that do not express Group VIA phospholipase A2 and effects of metabolic stress on glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 281(30), 20958-20973.

Cotman, C.W., Poon, W.W., Rissman, R.A., Blurton-Jones, M. 2005. The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64(2), 104-112.

Decker, T., Lohmann-Matthes, M.L. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Methods* 115(1), 61-69.

Dufner, A., Thomas, G. 1999. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp. Cell. Res.* 253(1), 100-109.

Gattaz, W.F., Cairns, N.J., Levy, R., Förstl, H., Braus, D.F., Maras, A. 1996. Decreased phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 246(3), 129-131.

Griffin, R.J., Moloney, A., Kelliher, M., Johnston, J.A., Ravid, R., Dockery, P., O'Connor, R., O'Neill, C. 2005. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J. Neurochem.* 93(1), 105-117.

Haddad, J.J. 2004. Mitogen-activated protein kinases and the evolution of Alzheimer's: a revolutionary neurogenetic axis for therapeutic intervention? *Prog. Neurobiol.* 73(5), 359-377.

Hanger, D.P., Betts, J.C., Loviny, T.L., Blackstock, W.P., Anderton, B.H. 1998. New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired

helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J. Neurochem.* 71(6), 2465-2476.

Herbert, S.P., Walker, J.H. 2006. Group VIA calcium-independent phospholipase A2 mediates endothelial cell S phase progression. *J. Biol. Chem.* 281(47), 35709-35716.

Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R. 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 45(5), 583-595.

Jenkins, C.M., Han, X., Mancuso, D.J., Gross, R.W. 2002. Identification of calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) beta, and not iPLA2gamma, as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10 smooth muscle cells. Enantioselective mechanism-based discrimination of mammalian iPLA2s. *J. Biol. Chem.* 277(36), 32807-32814.

Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. 1992. Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J. Neurochem.* 59(2), 750-753.

Kinsey, G.R., Cummings, B.S., Beckett, C.S., Saavedra, G., Zhang, W., McHowat, J., Schnellmann, R.G. 2005. Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327(1), 287-293.

Kinsey, G.R., McHowat, J., Beckett, C.S., Schnellmann, R.G. 2007. Identification of calcium-independent phospholipase A2gamma in mitochondria and its role in mitochondrial oxidative stress. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292(2), F853-F860.

Kudo, I., Murakami, M. 2002. Phospholipase A2 enzymes. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 68-69, 3-58. Review.

Lauterborn, J.C., Lynch, G., Vanderklisch, P., Arai, A., Gall, C.M. 2000. Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. J. Neurosci. 20(1), 8-21.

Leslie, C.C. 2004. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. Biochem. Cell Biol. 82(1), 1-17. Review.

Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W.L., Yen, S.H., Dickson, D.W., Davies, P., Hutton, M. 2000. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. Nat. Genet. 25(4), 402-405.

Li, X., Alafuzoff, I., Soininen, H., Winblad, B., Pei, J.J. 2005. Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain. FEBS J. 272(16), 4211-4220.

Lovestone, S., Reynolds, C.H. 1997. The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. Neuroscience 78(2), 309-324.

Mancuso, D.J., Jenkins, C.M., Gross, R.W. 2000. The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). J. Biol. Chem. 275(14), 9937-9945.

Mancuso, D.J., Jenkins, C.M., Sims, H.F., Cohen, J.M., Yang, J., Gross, R.W. 2004. Complex transcriptional and translational regulation of iPLA γ resulting in multiple gene products containing dual competing sites for mitochondrial or peroxisomal localization. *Eur. J. Biochem.* 271(23-24), 4709-4724.

Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8(11), 425-7.

Menard, C., Chartier, E., Patenaude, C., Robinson, P., Cyr, M., Baudry, M., Massicotte, G. 2007. Calcium-independent phospholipase A(2) influences AMPA-mediated toxicity of hippocampal slices by regulating the GluR1 subunit in synaptic membranes. *Hippocampus* 17(11), 1109-1120.

Morgan, N.V., Westaway, S.K., Morton, J.E., Gregory, A., Gissen, P., Sonek, S., Cangul, H., Coryell, J., Canham, N., Nardocci, N., Zorzi, G., Pasha, S., Rodriguez, D., Desguerre, I., Mubaidin, A., Bertini, E., Trembath, R.C., Simonati, A., Schanen, C., Johnson, C.A., Levinson, B., Woods, C.G., Wilmot, B., Kramer, P., Gitschier, J., Maher, E.R., Hayflick, S.J. 2006. PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. *Nat. Genet.* 38(7), 752-754.

Murakami, M., Masuda, S., Ueda-Semmyo, K., Yoda, E., Kuwata, H., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Sumimoto, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakatani, Y., Kudo, I. 2005. Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A2 γ promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* 280(14), 14028-14041.

Papasozomenos, S.C., Su, Y. 1995. Rapid dephosphorylation of tau in heat-shocked fetal rat cerebral explants: prevention and hyperphosphorylation by

inhibitors of protein phosphatases PP1 and PP2A. *J. Neurochem.* 65(1), 396-406.

Seleznev, K., Zhao, C., Zhang, X.H., Song, K., Ma, Z.A. 2006. Calcium-independent phospholipase A2 localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine. *J. Biol. Chem.* 281(31), 22275-22288.

Sengupta, A., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Singh, T.J. 1998. Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol. Cell Biochem.* 167(1-2), 99-105.

Smani, T., Zakharov, S.I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E.S., Bolotina, V.M. 2004. A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat. Cell Biol.* 6(2), 113-120.

Talbot, K., Young, R.A., Jolly-Tornetta, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Wolf, B.A. 2000. A frontal variant of Alzheimer's disease exhibits decreased calcium-independent phospholipase A2 activity in the prefrontal cortex. *Neurochem. Int.* 37(1), 17-31.

Tanaka, H., Takeya, R., Sumimoto, H. 2000. A novel intracellular membrane-bound calcium-independent phospholipase A(2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272(2), 320-326.

Tay, H.K., Melendez, A.J. 2004. FcγRI-triggered generation of arachidonic acid and eicosanoids requires iPLA2 but not cPLA2 in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 279(21), 22505-22513.

Wolf, M.J., Izumi, Y., Zorumski, C.F., Gross, R.W. 1995. Long-term potentiation requires activation of calcium-independent phospholipase A2. *FEBS Lett.* 377(3), 358-362.

Yan, W., Jenkins, C.M., Han, X., Mancuso, D.J., Sims, H.F., Yang, K., Gross, R.W. 2005. The highly selective production of 2-arachidonoyl lysophosphatidylcholine catalyzed by purified calcium-independent phospholipase A2gamma: identification of a novel enzymatic mediator for the generation of a key branch point intermediate in eicosanoid signaling. *J Biol Chem.* 280(29):26669-79.

Yang, H.C., Mosior, M., Ni, B., Dennis, E.A. 1999. Regional distribution, ontogeny, purification, and characterization of the Ca²⁺-independent phospholipase A2 from rat brain. *J. Neurochem.* 73(3), 1278-1287.

Yang, J., Han, X., Gross, R.W. 2003. Identification of hepatic peroxisomal phospholipase A(2) and characterization of arachidonic acid-containing choline glycerophospholipids in hepatic peroxisomes. *FEBS Lett.* 546(2-3), 247-250.

7.8 ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to Guy Massicotte and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke/National Institutes of Health (NINDS/NIH) to Xiaoning Bi. Caroline Ménard is the recipient of a NSERC studentship. The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript. We also thank Simon Cheung and James Galeano for their excellent technical assistance.

7.9 ABBREVIATIONS

AD, Alzheimer's disease; AMPA, alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate; BEL, bromoenol lactone; cdk5, cyclin-dependent kinase-5; cPLA₂, calcium-dependent PLA₂; GSK-3, glycogen synthase kinase-3; iPLA₂, calcium-independent PLA₂; LDH, lactate dehydrogenase; MAPK, mitogen-activated protein kinases; mTor, mammalian target of rapamycin; p70S6 kinase, ribosomal S6 protein kinase p70; PI3K, phosphoinositol 3 kinase; PKA, protein kinase A; PLA₂, phospholipase A₂; R-BEL, R-enantiomer of BEL; S-BEL, S-enantiomer of BEL; sPLA₂, secretory PLA₂; TBS, Tris-buffered saline.

CHAPITRE VIII

DISCUSSION

Au cours de mes études graduées, nous avons démontré que la iPLA₂ et le DHA sont en mesure de moduler les récepteurs au glutamate, particulièrement ceux de type AMPA. L'inhibition de cette enzyme accroît l'excitotoxicité induite par une suractivation de ces récepteurs en plus de favoriser l'hyperphosphorylation de tau, un marqueur pathologique lié de près au développement de la MA. En vertu de ces résultats, il est possible de poser diverses hypothèses quant aux mécanismes responsables de ces altérations voire même quant à leurs conséquences.

8.1 LES EFFETS CELLULAIRES DE LA iPLA₂

Pour répondre au tout premier objectif du projet, nous nous sommes d'abord penchés sur cette question : « Est-ce que l'inhibition des iPLA₂ influence les propriétés des récepteurs au glutamate ? ». Puisque l'activité de cette enzyme est constitutive, nous soupçonnons qu'une altération de celle-ci provoquera des perturbations. Au fil des expérimentations, nous avons découvert qu'effectivement une inhibition irréversible de l'activité de cette phospholipase engendre une hausse significative de la phosphorylation des récepteurs au glutamate de type AMPA, tel que présenté dans le chapitre 3. Découle de cette observation une seconde question : par quels mécanismes la iPLA₂ peut-elle modifier les propriétés de ces récepteurs ?

8.1.1 La iPLA₂ et la PKC

Tel que mentionné dans l'introduction, plusieurs kinases peuvent phosphoryler les récepteurs AMPA : la PKA, la PKC, la CAMKII ou encore

certaines « tyrosine kinases ». Au même titre, diverses phosphatases - PP1, PP2A, PP2B - exercent l'effet contraire, ce qui permet d'atteindre un équilibre précaire mais nécessaire (Lee, 2006). Les quatre sous-unités des récepteurs AMPA (GluR1-4) présentent plusieurs sites de phosphorylation sur leur portion C-terminale et l'état de ces sites régule les fonctions du récepteur (Lee, 2006). Étant donné qu'ils sont responsables de la transmission synaptique basale, la phosphorylation de certains résidus des récepteurs AMPA semble jouer un rôle prédominant dans les processus de plasticité synaptique (Lee, 2006).

En premier lieu, la sous-unité GluR1 est une candidate très intéressante puisqu'elle s'avère l'une des plus exprimées dans les neurones de l'hippocampe (Wenthold et al., 1996). Elle peut être phosphorylée principalement sur des résidus sérine ou thréonine mais parfois aussi sur des tyrosines. Deux des sites de phosphorylation de GluR1, les Ser831 et Ser845, ont été intensément étudiés car ils ont été liés à la LTP et la LTD (Lee et al., 2003a, 2003b). En fait, Derkach et al. (1999) ont démontré que la phosphorylation de la Ser831 par la PKC augmente la conductance des récepteurs AMPA alors que la même modification sur la Ser845, cette fois par la PKA, favorise plutôt l'insertion synaptique (Esteban et al., 2003). Lors de nos travaux, l'inhibition de la $iPLA_2$ par le BEL a provoqué une hausse significative du niveau de phosphorylation dans les deux cas (Ménard et al., 2005a). Cela laisse sous-entendre que l'activité de cette enzyme est importante pour maintenir l'équilibre crucial au bon fonctionnement de la neurotransmission. En effet, son inhibition prolonge l'ouverture des récepteurs contenant des sous-unités GluR1 en plus d'empêcher leur internalisation. Conséquemment, elle risque de troubler l'équilibre ionique essentiel à la communication mais également à la survie neuronale.

Il est important de souligner qu'une augmentation du nombre de sous-unités GluR1 membranaires permet aussi de mieux comprendre le graphique

de Scatchard présenté dans le chapitre 3. En effet, la présence de récepteurs enrichis en GluR1, voire homomériques, fait varier l'affinité des agonistes pour les récepteurs AMPA (référence à la section 1.3.2 de l'introduction). Cette variation ne semble toutefois pas suffisante pour modifier le K_D peut-être parce que l'enrichissement est concentré dans les synapses, ce qui rend l'altération indétectable par la technique de l'autoradiographie. Malgré tout, elle est en mesure d'influencer l'excitotoxicité produite par un traitement à l'AMPA, tel que démontré dans le chapitre 5.

Lorsqu'on parle de mort cellulaire, on ne peut passer sous silence l'importance de la sous-unité GluR2. Sa seule présence attribue des propriétés biophysiques spéciales aux récepteurs AMPA qui deviennent alors imperméables au Ca^{2+} (Tanaka et al., 2000) tel que présenté dans l'introduction de ma thèse. Brièvement, la structure de la sous-unité est responsable de ce phénomène : un résidu arginine chargé s'insère parfaitement dans le pore, bloquant ainsi l'entrée des cations. Il est toutefois important de souligner que ce ne sont pas toutes les sous-unités GluR2 qui rendent les récepteurs imperméables au Ca^{2+} ; une transcription spécifique selon la conformation R (pour arginine) est nécessaire. Autrement, ce résidu est remplacé par un acide aminé glutamine, incapable de bloquer l'entrée des cations. Une altération de la transcription de ces deux types de sous-unité est suffisante pour faciliter le phénomène d'excitotoxicité et, par conséquent, la mort neuronale. C'est pourquoi il a récemment été proposé que cette modification pourrait favoriser l'apparition de la sclérose latérale amyotrophique (maladie de Lou Gehrig), une affection caractérisée par une neurodégénérescence des neurones moteurs (Kwak & Kawahara, 2005).

La sous-unité GluR2 est, comme GluR1, phosphorylée sur certains résidus par la PKC. Cet état, surtout sur la Ser880 le site le mieux caractérisé, est cependant exclusivement lié à la LTD. Lorsqu'une mutation ayant pour effet d'annuler la possibilité d'une phosphorylation sur ce résidu

est produite, l'induction de la LTD est bloquée. Même constat pour des mutants où la phosphorylation est permanente, on parle alors plutôt d'occlusion (Lee, 2006).

Il est difficile d'imaginer un lien direct entre la $iPLA_2$ et l'activité des protéines kinases ou phosphatases qui régissent les fonctions des récepteurs AMPA, ces enzymes s'attaquant seulement aux phospholipides. Nous avons cependant montré qu'une inhibition préalable de la PKC bloque l'augmentation de la phosphorylation de GluR1 induite par un traitement avec le BEL (Ménard et al., 2005b) (FIGURE 8.1). Dans le même contexte, nous avons écarté la possibilité que la hausse observée soit due à une diminution de l'activité des phosphatases (Ménard et al., 2005b). Il est plausible que ce ne soit pas l'enzyme elle-même qui interagisse avec la kinase mais plutôt les produits qui découlent de son action. Dans nos expérimentations, la régulation de la libération des acides gras par les phospholipases est perturbée. Il est possible que cela entraîne un déséquilibre entre les ratios oméga-6 et oméga-3. Ainsi, l'inhibition spécifique de la $iPLA_2$, avec pour conséquence une baisse du DHA libéré, favorise peut-être la libération d'AA via un mécanisme compensatoire. Rao et al. (2007) ont justement montré qu'une diète appauvrie en oméga-3 entraîne une diminution de l'activité, du niveau d'ARNm et de l'expression de la $iPLA_2$, tout en favorisant une hausse du niveau d'ARNm et de l'expression de la $cPLA_2$, les $sPLA_2$ et la COX-2. Une hausse de l'activité $cPLA_2$ favoriserait non seulement le phénomène d'excitotoxicité, tel que documenté dans le chapitre 5, mais aussi la libération d'AA. Yagi et al. (2004) ont rapporté que les produits de la $iPLA_2$ et de la $cPLA_2$ sont en mesure de maintenir sur la membrane plasmique la PKC γ , une isoforme caractéristique des neurones. Dans le même ordre d'idées, l'AA est bien connu depuis la fin des années 80 pour activer la PKC γ (Shearman et al., 1989). Cette kinase est en plus exprimée à un niveau très élevé précisément dans l'hippocampe (Shearman et al., 1987). Ironiquement, l'activation de la $cPLA_2$ est elle aussi régulée par la phosphorylation dans les

astrocytes et ce, via l'activité de la PKC et des « mitogen-activated protein kinases » (MAPK) ERK1/2 (Xu et al., 2002). Il serait donc intéressant de caractériser plus en profondeur la voie de signalisation qui implique la cPLA₂,

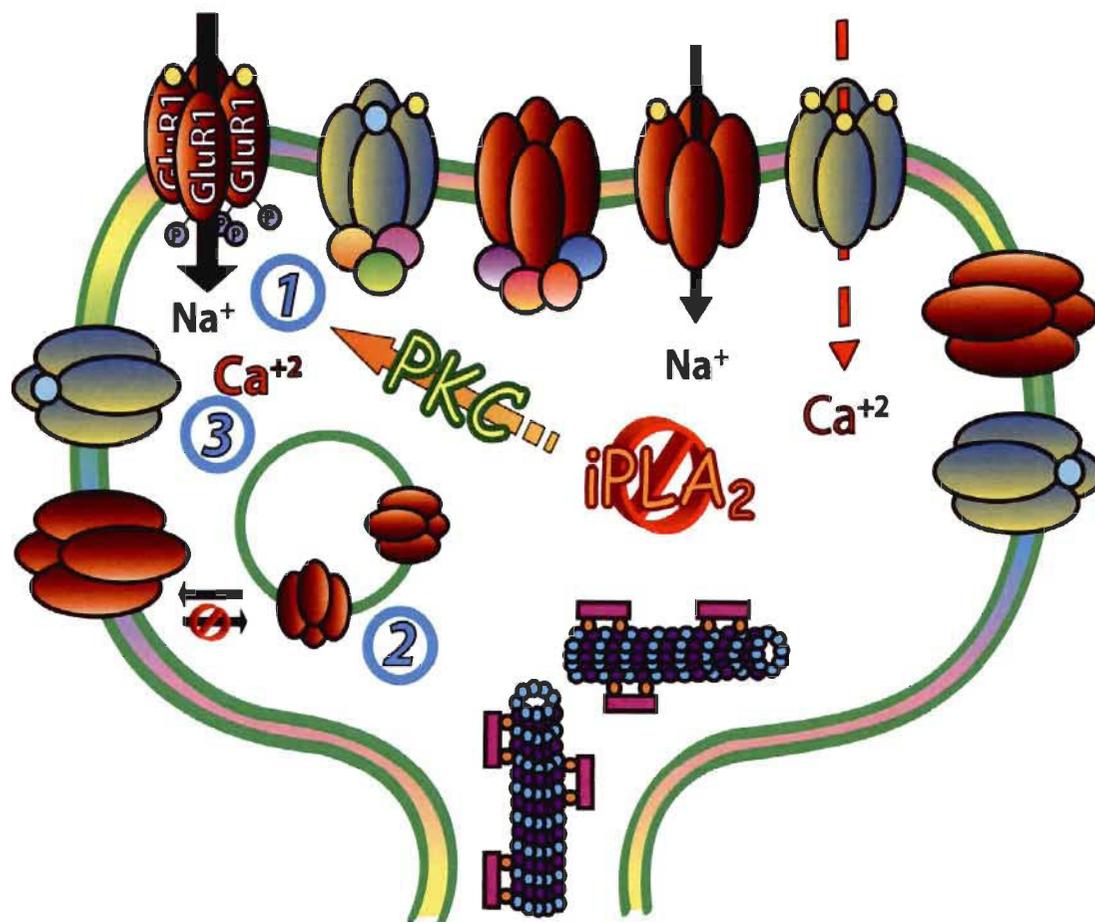


FIGURE 8.1 : L'inhibition de la iPLA₂ favorise la phosphorylation de GluR1 par la PKC dans la structure post-synaptique. Un traitement avec le BEL augmente 1) le niveau de phosphorylation des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA. Cette modification, associée à l'activité de la PKC, entraîne 2) une diminution de l'internalisation des récepteurs et possiblement, à long terme, 3) une hausse néfaste de la quantité de Ca²⁺ intracellulaire.

l'AA et la PKC dans le cadre d'une inhibition à court et/ou long terme de la iPLA₂. Des travaux ultérieurs qui consisteraient à évaluer les concentrations

d'acides gras membranaires versus cytosoliques ainsi que le niveau d'activité des diverses isoformes de PKC lors d'une inhibition de la iPLA₂ seront nécessaires pour une meilleure compréhension des effets rapportés dans les chapitres précédents.

8.1.2 La iPLA₂ et les protéines accessoires – une relation potentielle

La phosphorylation des sous-unités des récepteurs au glutamate n'influence pas que leurs propriétés intrinsèques, elle altère également leurs interactions avec des protéines dites accessoires. Ces protéines permettent la stabilisation des récepteurs sur la membrane en constituant littéralement un chapelet qui part de la membrane pour se terminer au cytosquelette des neurones (Bredt & Nicoll, 2003) (FIGURE 8.2). La première, découverte par l'équipe de Richard Huganir à la fin des années 90, fut logiquement nommée « glutamate receptor interacting protein » (GRIP) (Dong et al., 1997). Leur présence facilite les processus d'endocytose et d'exocytose des récepteurs AMPA, ces derniers ne possédant pas de mécanismes qui leur permettraient de se mouvoir seuls dans les différents compartiments cellulaires (voir la section 1.3.5) (Bredt & Nicoll, 2003).

À la même époque, la caractérisation des domaines PDZ a permis de mieux comprendre les échafaudages nécessaires aux processus de signalisation, de transport et de localisation des protéines. Ces domaines sont des motifs d'environ 80 acides aminés et se retrouvent généralement sur la portion C-terminale d'une grande variété de protéines (Craven & Bredt, 1998). Ils ont été observés chez des organismes de l'ensemble du règne animal, y compris chez des levures et des bactéries. Lors du séquençage du génome humain, plus de 100 protéines contenant des domaines PDZ ont été identifiées ce qui lui confère le titre d'un des motifs les plus courants en biologie. En plus, ce sont les synapses neuronales qui remportent la palme

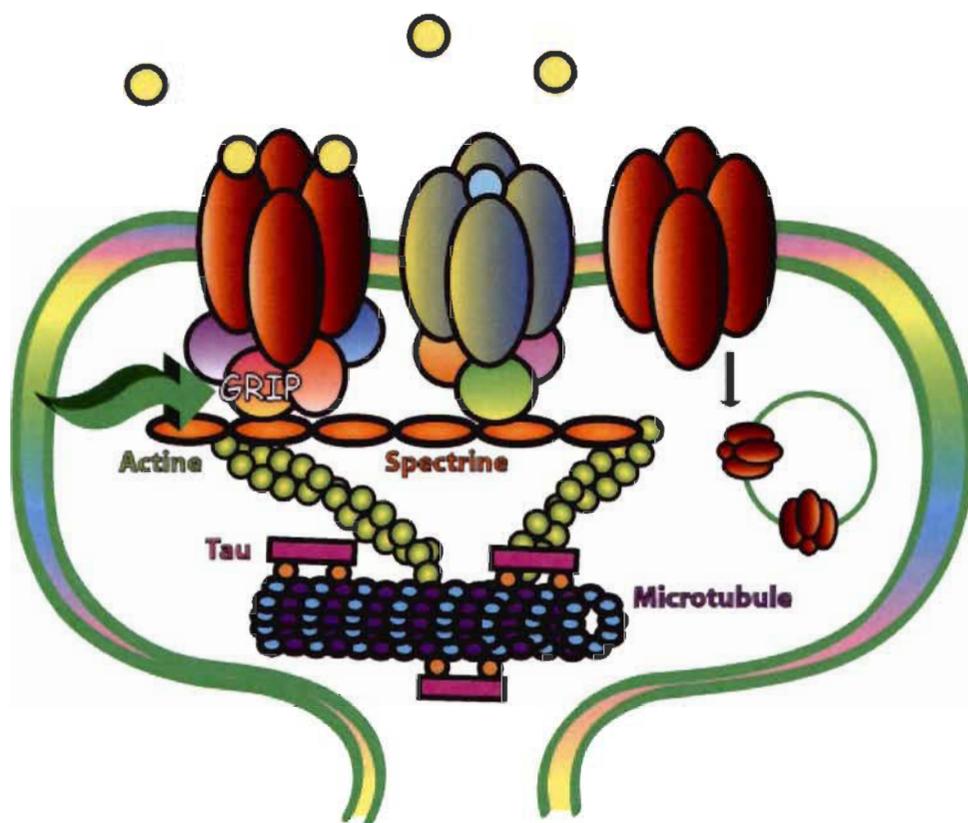


FIGURE 8.2 : La stabilisation des récepteurs au glutamate par les protéines accessoires. Diverses protéines dites accessoires se lient aux récepteurs AMPA et NMDA pour faciliter leur maintenance sur la membrane ou encore induire leur transport dans les différents compartiments cellulaires. L'association de ces protéines avec les composantes du cytosquelette permet une régulation optimale des capacités excitatrices des synapses glutamatergiques.

du plus grand nombre de domaines PDZ. Ils y jouent un rôle essentiel au niveau de l'organisation des récepteurs mais également de la signalisation cellulaire intimement liée à ceux-ci (Bredt & Nicoll, 2003). Les « post-synaptic density 95 » (PSD95) ou « synapse-associated protein 90 » (SAP90), par exemple, se lient aux sous-unités NR2 des récepteurs NMDA et elles facilitent leur interaction avec la « neuronal nitric oxyde synthase », une enzyme qui régule l'influx calcique (Brenman et al., 1996).

La sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA n'interagit pas avec la PSD95 ou encore la SAP90 mais plutôt avec une protéine accessoire à la structure similaire, la SAP97. Elles ont été co-localisées au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi dans des neurones de l'hippocampe (Sans et al., 2001), ce qui renforce l'hypothèse d'une implication active de ces protéines non seulement pour la maintenance sur la membrane mais aussi pour le transport cellulaire. Les SAP97 se retrouvent également à fortes concentrations dans les axones terminaux mais surtout, seulement au niveau des synapses qui contiennent des sous-unités GluR1 (Valtschanoff et al., 2000). Il pourrait donc être très intéressant, dans un futur projet, d'évaluer l'impact d'une inhibition de la $iPLA_2$ sur l'interaction entre les sous-unités GluR1 et les protéines accessoires SAP97 (FIGURE 8.3). Pour ce faire, l'immunofluorescence et la culture de neurones dissociés pourraient être de mise, ces techniques permettant une co-localisation visuelle des protéines suite aux traitements. D'autant plus que la transfection de SAP97 dans ces mêmes cultures induit une augmentation du taux de récepteurs AMPA post-synaptiques avec pour conséquence une hausse des courants excitateurs post-synaptiques (Rumbaugh et al., 2003).

Une autre protéine accessoire ne présentant pas de domaines PDZ interagit avec la sous-unité GluR1 : la protéine 4.1 (Shen et al., 2000). Affiliée directement au cytosquelette, elle se lie aussi à la portion C-terminale dans une zone conservée chez la sous-unité GluR4 (Coleman et al., 2003). Elle est co-localisée dans les synapses excitatrices et elle a été observée *in vivo*. Une perturbation de l'actine du cytosquelette est reconnue pour provoquer l'internalisation des récepteurs AMPA et la protéine 4.1 pourrait être le chaînon manquant des mécanismes liés à ce phénomène. Toutefois, cette affirmation ne demeure, pour le moment, qu'une hypothèse.

Des protéines accessoires sont aussi liées à GluR2 et GluR3, deux sous-unités structurelles des récepteurs AMPA plus courtes que GluR1 et

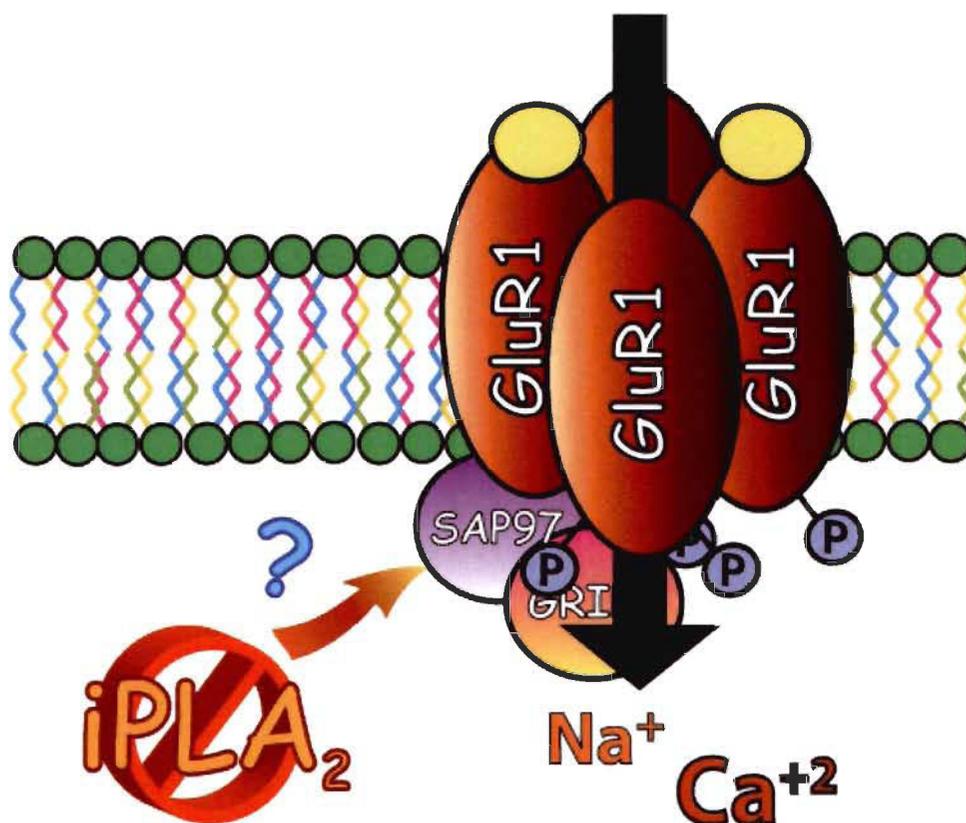


FIGURE 8.3 : Est-ce que l'inhibition de la iPLA₂ influence la liaison de la protéine accessoire SAP97 avec les sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA ? Puisque SAP97 interagit étroitement et spécifiquement avec les sous-unités GluR1, il est probable que sa capacité de liaison soit influencée par la hausse de phosphorylation résultante d'un traitement avec le BEL. Il s'avère très intéressant de se pencher sur cette hypothèse dans un futur rapproché car elle pourrait permettre une meilleure compréhension des interactions biophysiques des PLA₂ avec les récepteurs au glutamate.

GluR4. Ces dernières sont ainsi qualifiées de « short-form AMPA receptors » (Bredt & Nicoll, 2003). Plusieurs de ces protéines accessoires présentent des domaines PDZ : GRIP, « AMPA receptor binding protein » (ABP), la famille des protéines « liprin- α », la « GRIP-associated protein-1 » et enfin, la PICK1 (Bredt & Nicoll, 2003). L'interaction de la sous-unité GluR2 avec GRIP/ABP est déterminante pour son maintien à la surface synaptique. En effet, il a été démontré par Osten et al. (2000) qu'une mutation de GRIP/ABP ayant pour conséquence de bloquer ce lien réduit dramatiquement l'accumulation de

sous-unités GluR2 sur la membrane. Ces travaux laissent donc croire que GRIP et ABP sont en mesure de réguler les processus d'endocytose de cette sous-unité. À l'inverse, une interaction de GluR2 avec PICK1 facilite son transfert dans le cytosol. Une surexpression de PICK1 dans des cultures de neurones de l'hippocampe induit l'endocytose des sous-unités GluR2, un phénomène directement lié à l'action de la PKC (Perez et al., 2001). Il est plausible que ces interactions différentielles participent activement aux processus de plasticité synaptique des neurones. D'autres protéines accessoires associées à GluR2 et GluR3 permettent la neurotransmission via des voies de signalisation cellulaire. La famille des « liprin- α », par exemple, peut interagir avec GIT1, une protéine fonctionnant comme une GTPase qui agit sur l'actine du cytosquelette (Ko et al., 2003). Elles se lient également à GRIP/ABP renforçant alors l'échafaudage nécessaire à une maintenance optimale des récepteurs AMPA sur la membrane (Ko et al., 2003). Comme pour GluR1, il serait pertinent d'évaluer les effets d'une inhibition de la iPLA₂ sur les interactions de GluR2 avec ses protéines accessoires, d'autant plus que ces sous-unités s'avèrent intimement associées au phénomène d'excitotoxicité (Mahajan & Ziff, 2007).

Une dernière protéine interagit avec toutes les sous-unités des récepteurs AMPA et ce, indépendamment de leur structure : la « stargazin », membre de la famille des TARPs (référence à la section 1.3.5). Elle a été la première protéine de type transmembranaire associée aux récepteurs AMPA (Chen et al., 2000b). Une mutation dirigée de la « stargazin » (mutation « stargazer ») provoque, chez des rongeurs, une ataxie spécifique au cervelet en plus d'une forme intense d'épilepsie. Les symptômes épileptiques pourraient être liés à la structure même de cette protéine puisqu'elle est similaire à celle des canaux calciques (Letts et al., 1998). Quant à l'ataxie du cervelet, une absence complète de récepteurs AMPA synaptiques dans cette région en serait responsable. La transfection de « stargazin » dans des neurones dissociés provenant du cervelet de souris « stargazer » permet la

récupération des récepteurs AMPA et même une diminution des symptômes (Chen et al., 2000). Mais comment la « stargazin » module-t-elle la présence de ces récepteurs sur la membrane ? Un aspect fascinant de ce phénomène est que non seulement les récepteurs sont absents de la section post-synaptique mais ils le sont surtout de l'ensemble de la membrane. Si la « stargazin » est transfectée chez des animaux « stargazer » sans son motif PDZ, les récepteurs AMPA extra-synaptiques sont récupérés alors que ce n'est pas le cas pour ceux qui se retrouveraient normalement au niveau de la synapse. Cela implique une action en deux temps de cette protéine accessoire : 1) elle induit le transport des récepteurs AMPA sur la membrane et 2) sa liaison avec la PSD95 facilite l'insertion de ceux-ci directement dans la synapse (Bredt & Nicoll, 2003). Encore une fois, l'étude de ces interactions en l'absence d'une l'activité iPLA₂ pourrait permettre une meilleure compréhension de ces processus intimement liés à la plasticité synaptique.

8.1.3 La iPLA₂ et les calpaines

Dans les sections précédentes, l'importance de la phosphorylation des sous-unités des récepteurs AMPA a été discutée principalement en regard de leur activité et de leur transport dans les compartiments cellulaires. Cependant, cette modification, amplifiée par l'inhibition de la iPLA₂, influence également l'action de protéases dont les calpaines (Yuen et al., 2007) - leurs sites de clivage se retrouvant très près des résidus phosphorylés sur la portion C-terminale. Ces enzymes, activées par le Ca²⁺, régulent directement l'activité des récepteurs AMPA des synapses glutamatergiques en coupant les sous-unités GluR1 et GluR2/3 (Bi et al., 1994; Bi et al., 1996; Bi et al., 1998). En tenant compte du fait qu'elle semble associée au vieillissement et à certaines pathologies neurodégénératives dont la MA (Baudry et al., 1986; Di Rosa et al., 2002; Higuchi et al., 2005), l'activation des calpaines s'avère être un mécanisme attirant à investiguer dans le cadre de travaux ultérieurs. Des

résultats préliminaires laissent croire que l'entrée de Ca^{2+} résultante d'une suractivation des récepteurs AMPA, phénomène exacerbé par l'inhibition de la iPLA_2 , pourrait provoquer l'activation des calpaines et perturber la stabilité du cytosquelette avec la mort cellulaire comme conséquence à plus long terme. Dans le même ordre d'idées, Lopez-Picon et al. (2006) ont récemment démontré qu'en bloquant à la fois les récepteurs AMPA et l'activité des calpaines, il est possible de diminuer la dégradation des neurofilaments du cytosquelette et la mort neuronale associée à un traitement au kainate chez des cultures d'hippocampes. Autre fait intéressant : le glutamate peut activer la protéine kinase « cyclin-dépendent kinase 5 » (cdk5) via les récepteurs AMPA (Kerokoski et al., 2004). Un dysfonctionnement de cette enzyme a été préalablement associé à la MA (LaFerla & Kitazawa, 2005) car elle peut favoriser l'hyperphosphorylation de tau caractéristique de cette affection chez des souris transgéniques (Bian et al., 2002). Peut-être que les effets rapportés dans cette thèse suite à l'inhibition de la iPLA_2 ont un lien direct avec l'action des calpaines sur les récepteurs AMPA et la kinase cdk5 (FIGURE 8.4) ?

Ce n'est pas la première fois qu'un lien est suggéré entre les activités phospholipasiques et celle de ces protéases. Toutefois, les études précédentes se sont penchées presque exclusivement sur les cPLA_2 et on peut même compter sur les doigts d'une seule main celles liées au cerveau. Ong et al (1999) ont montré, à l'aide de la microscopie électronique, qu'une injection de kainate dans l'hippocampe de rats produit une hausse significative du niveau de Ca^{2+} intracellulaire. Trois semaines après les injections, le niveau de ce cation était encore augmenté d'environ 18 fois dans les cellules gliales réactives des régions CA1 et CA3 ! Ils ont observé dans ces mêmes cellules une expression accrue de la calpaine de type II ainsi que de la cPLA_2 (Ong et al., 1996; Sandhya et al., 1998). Ces enzymes seraient responsables de la mort cellulaire observée de part leur action sur le cytosquelette et les phospholipides membranaires, respectivement. La

combinaison de l'AA et du fer induit aussi l'activation des calpaines et des cPLA₂ dans les hépatomes du foie (Caro & Cederbaum, 2003). Une action prolongée de ces enzymes endommage toutefois la mitochondrie en plus de produire un stress oxydatif fatal. Finalement, un dernier exemple d'interaction, négatif cette fois, a été observé au niveau des carcinomes hépatocellulaires.

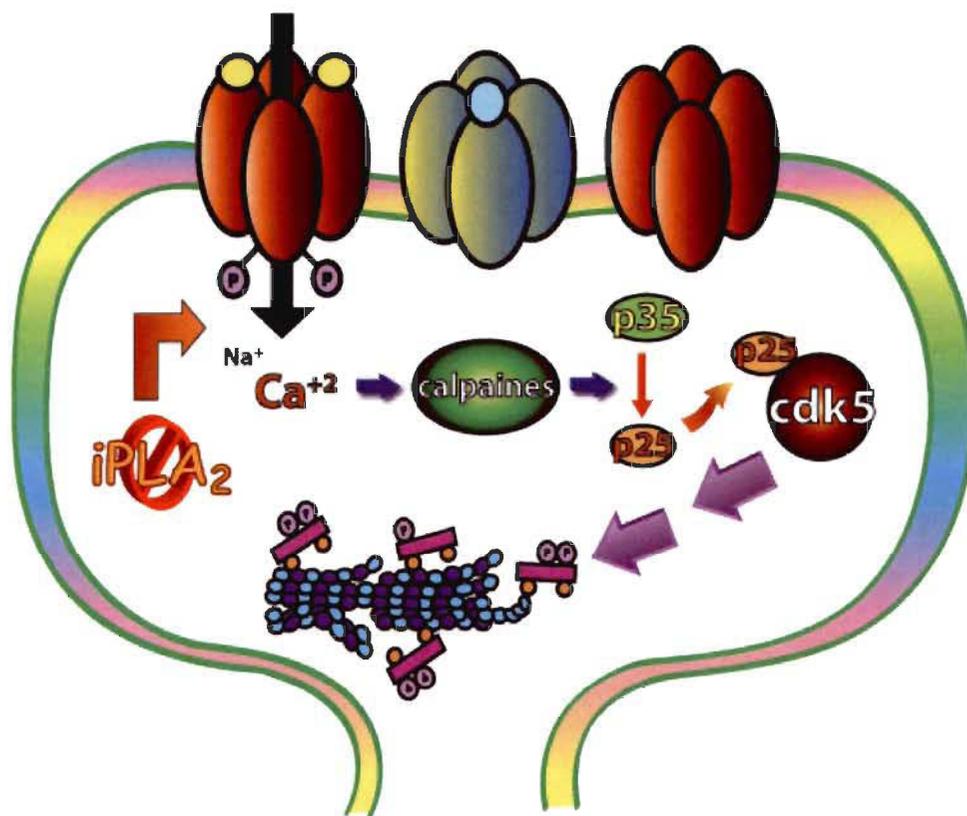


FIGURE 8.4 : L'inhibition de la iPLA₂ favorise-t-elle l'activation des calpaines ? Une hyperphosphorylation des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA peut induire, via une entrée massive de Ca²⁺, l'activation de protéases telles que les calpaines. Celles-ci peuvent ensuite cliver un grand nombre de protéines dont les récepteurs au glutamate, la spectrine et également p35, un activateur de la kinase cdk5. Cette dernière a de plus été étroitement liée à l'hyperphosphorylation de tau, un marqueur pathologique associé à la MA.

Ces cellules cancéreuses sont malheureusement plus résistantes à l'anoxie que les hépatocytes normaux et ce, en vertu d'une activation moindre des

calpaines et des cPLA₂ (Arora et al., 1996). La compréhension des mécanismes précis qui régulent l'activité de ces enzymes pourrait donc ouvrir la voie à des travaux prometteurs, non seulement afin de mieux cerner le fonctionnement du cerveau et les processus sous-jacents aux maladies neurodégénératives mais également à plusieurs autres parties du corps humain.

8.1.4 La iPLA₂ et l'apoptose

Beaucoup de travaux ont été consacrés, au cours de la dernière décennie, à l'activité des PLA₂ et leur implication dans l'apoptose. Avec l'avènement de molécules spécifiques pour la plupart des isoformes des différentes familles d'enzymes (sPLA₂, cPLA₂ ou iPLA₂), leurs rôles sont devenus de plus en plus clairs. Ce sont d'abord chez les macrophages que l'importance de l'activité des cPLA₂ pour les mécanismes d'apoptose, indispensables à la défense immunitaire innée, a été rapportée. Dans le but d'assurer la protection contre les envahisseurs tel *Mycobacterium Tuberculosis*, les macrophages de notre organisme disposent d'un arsenal diversifié dont la synthèse de TNF- α (Duan et al., 2001). Toutefois, lorsque ce procédé est inutilisable, ils se tournent vers les cPLA₂. Celles-ci sont en effet capables d'activer les processus d'apoptose de manière indépendante de la synthèse protéique; soit par une relâche massive d'AA (Duan et al., 2001). Sinon, les TNFs favorisent la translocation et l'activation des cPLA₂ provoquant une production rapide et mortelle d'AA (Jupp et al., 2003). Ainsi, l'action de ces enzymes n'est pas que nocive, comme dans le cas de l'excitotoxicité, ici elle est plutôt partie intégrante d'une défense immunitaire optimale. À noter que les sPLA₂ peuvent elles aussi induire l'apoptose chez les macrophages; elles exploitent cependant la relâche du cytochrome c et l'activation des caspases (Lee et al., 2006).

Conformément aux travaux chez les macrophages, l'inhibition des cPLA₂ réduit l'activation des caspases-3 lors d'une ischémie cardiaque, minimisant l'étendue des dommages irréversibles aux cardiomyocytes (Engelbrecht & Ellis, 2007). Il en va de même pour l'ischémie cérébrale : le dérèglement ionique causé par cette condition induisant brusquement l'activation des cPLA₂ et des sPLA₂ des astrocytes. Le simple fait de bloquer ces enzymes à l'aide d'inhibiteurs spécifiques suffit à augmenter considérablement le taux de survie cellulaire (Gabryel et al., 2007).

Alors qu'un consensus est relativement établi en ce qui a trait aux fonctions des sPLA₂ et surtout des cPLA₂ dans l'apoptose, ce constat n'est pas aussi clair pour les iPLA₂. Les premiers travaux publiés à ce sujet sont probablement ceux de Atsumi et al. (2000). Ils ont démontré, chez des lignées cellulaires, que les caspases peuvent cliver les iPLA₂ ce qui a comme conséquence d'augmenter dramatiquement leur activité. De ce fait, elles s'attaquent plus agressivement aux phospholipides membranaires infligeant des dommages majeurs à la membrane (Atsumi et al., 2000). Cette observation a été confirmée récemment chez des cellules cancéreuses (Zhao et al., 2006). De plus, la modification structurelle des iPLA₂ par les caspases semble accélérer la migration de ces cellules néfastes (Zhao et al., 2006). L'activité de ces phospholipases est également cruciale pour la mise en place de l'apoptose indépendante de l'activation des caspases, une mort cellulaire observée notamment lors de l'hypoxie (Shinzawa & Tsujimoto, 2003).

Tandis que l'isoforme de iPLA₂ responsable n'a pas été formellement identifiée dans les études précédentes, Ramanadham et al. (2004) ont poussé plus loin leur investigation en ciblant une surexpression spécifique de la iPLA₂ β . Cette dernière provoque la mort des cellules bêta qui sécrètent l'insuline par une chute dramatique des niveaux de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique, condition qui mène inexorablement au diabète de type I. Tel

qu'escompté, l'inhibition de la $iPLA_2\beta$ par le (S)-BEL a supprimé complètement l'apoptose (Ramanadham et al., 2004).

Quant à la $iPLA_2\gamma$, l'isoforme imputée des effets présentés dans les chapitres précédents, elle n'est pas en reste dans les processus de mort cellulaire. Cummings et al. (2004) ont d'abord montré que cette phospholipase est nécessaire, chez des cellules rénales de lapins, à l'apoptose induite par la cisplatine un agent couramment utilisé lors des chimiothérapies. Cela laisse entrevoir la possibilité d'élaborer une toute nouvelle classe de molécules anti-cancéreuses et ce, dans le but avoué de mettre au point des traitements novateurs (Cummings, 2007). Étant donné sa co-localisation avec les mitochondries (Kinsey et al., 2007), il a été proposé que la $iPLA_2\gamma$ interagissent directement avec ces organelles, d'autant plus qu'elles se retrouvent au cœur des processus de mort cellulaire plus souvent qu'à leur tour. Pourtant, les résultats publiés dernièrement s'avèrent diamétralement opposés; dans un cas elle facilite l'apoptose induite par la cisplatine en modifiant les propriétés intrinsèques des membranes mitochondriales (Kinsey et al., 2007) alors que dans l'autre, l'action des $iPLA_2$ semble plutôt protéger l'intégrité de ces mêmes membranes contre le stress oxydatif intimement lié à l'initiation de l'apoptose par la staurosporine (Seleznev et al., 2006). Malgré tout, l'inhibition par le BEL n'entraîne pas la mort cellulaire chez des cellules contrôles à court terme (Seleznev et al., 2006), ce qui supporte l'absence d'effet lors d'un traitement avec le BEL uniquement dans le cadre de nos expérimentations (Ménard et al., 2007). Lorsque cet inhibiteur est appliqué à une concentration supérieure à celle utilisée, il provoque l'apoptose de par son action sur une autre enzyme importante : la PAP-1 (Fuentes et al., 2003). Cela explique peut-être la divergence des résultats selon les types de cellules et de systèmes exploités. Tous ces travaux laissent quand même sous-entendre une hypothèse intéressante, soit qu'un dysfonctionnement de l'activité des $iPLA_2$ influence

peut-être les mitochondries en accélérant la mise en place des processus de l'apoptose lors de situations de stress voire au cours du vieillissement.

8.2 LES ACIDES GRAS ET LES RÉCEPTEURS AU GLUTAMATE

Il est envisageable que les effets observés sur les récepteurs AMPA suite à une inhibition de la $iPLA_2$ ne soient pas liés directement à l'enzyme elle-même mais plutôt à son action sur les phospholipides membranaires. Autrement dit, c'est peut-être la variation du niveau d'acides gras produits par le remodelage membranaire constitutif de cette phospholipase qui est responsable des altérations rapportées dans la présente thèse.

8.2.1 L'acide docosahexaénoïque et les récepteurs au glutamate

L'acide gras le plus intéressant pour évaluer cette hypothèse est évidemment le DHA. Produit préférentiel de la $iPLA_2\gamma$, nous avons démontré qu'il est en mesure de diminuer l'excitotoxicité induite par une application prolongée de l'agoniste des récepteurs AMPA (Ménard et al., sous presse) (FIGURE 8.5). Ce résultat est corrélé avec l'étude de Wang et al. (2003) qui rapportait une protection par le DHA contre l'excitotoxicité du glutamate. La seule publication qui pose les assises d'une interaction directe entre le DHA et les sous-unités des récepteurs AMPA, dans ce cas GluR2, est celle de Dyall et al. (2007). Le vieillissement est depuis longtemps associé à une baisse des capacités de plasticité des structures du cerveau et ce, à tous les niveaux : cellulaires, synaptiques, etc. Quant aux acides gras insaturés, comme le DHA et l'EPA, leur proportion tend à diminuer au cours du vieillissement (Bazan, 2005a), une altération possiblement réversible par une diète riche en oméga-3 (McGahon et al., 1999; Favreliere et al., 2003; Bourre, 2004; Farooqui & Horrocks, 2004; Uauy & Dangour, 2006).

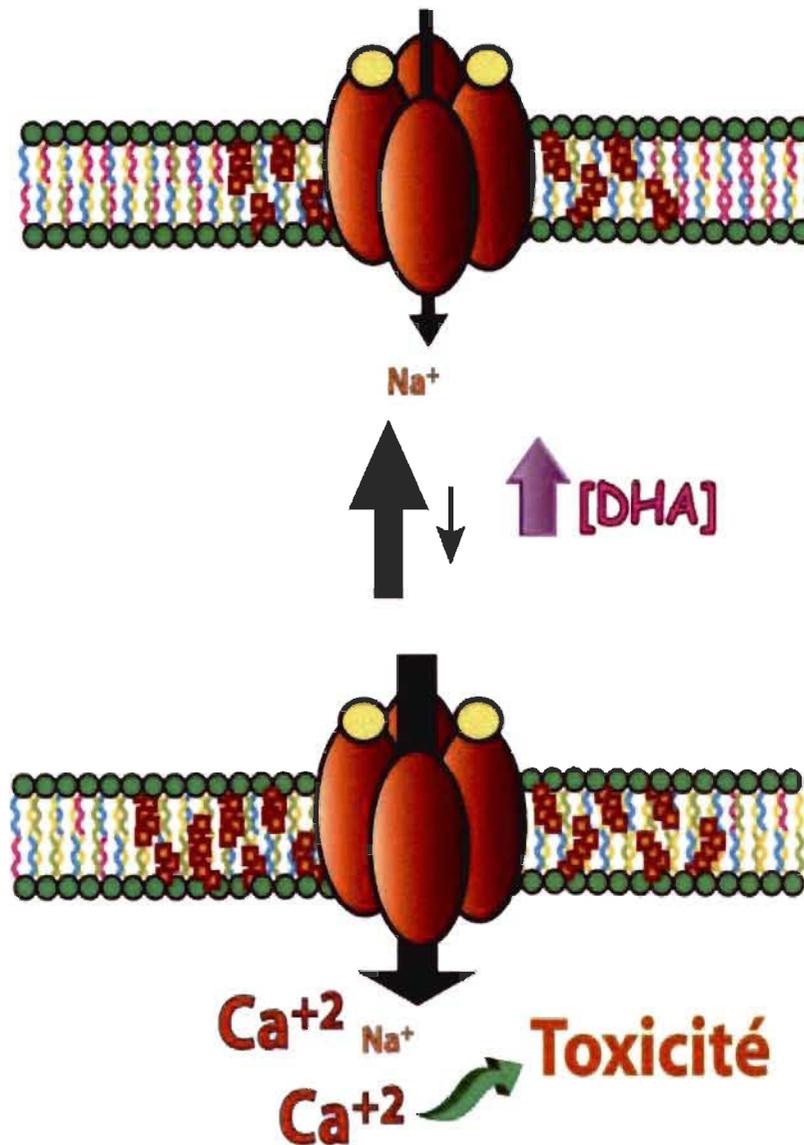


FIGURE 8.5 : Le DHA protège de l'excitotoxicité. Tel que démontré dans le manuscrit du chapitre 6, un traitement préalable avec le DHA protège les neurones de la région CA1 de l'hippocampe de la toxicité induite par l'agoniste des récepteurs glutamatergiques de type AMPA. On peut donc spéculer qu'une diète riche en DHA pourrait être bénéfique pour contrer les phénomènes d'excitotoxicité associés au vieillissement normal et prématuré.

Dyall et al. (2007) ont donc imposé, pendant 12 semaines, un supplément nutritionnel en oméga-3 à la diète de rats ce qui a eu pour conséquence de rétablir complètement les niveaux de GluR2, sous-unités qui sont normalement en chute libre chez les rongeurs âgés (Pagliusi et al., 1994; Liu et al., 2008). On peut spéculer que cette modification tend à amoindrir les phénomènes d'excitotoxicité et ainsi éviter l'apparition de démences liées à la vieillesse, d'autant plus que le DHA est bien connu pour son effet négatif sur le stress oxydatif et l'activation des calpaines et des caspases (Calon et al., 2004; Sharma & Rohrer, 2007). Il influence également ces enzymes et même les sous-unités des récepteurs au glutamate de type NMDA chez des souris transgéniques Alzheimer (Calon et al., 2005; Calon & Cole, 2007). Enfin, un produit dérivé du DHA, la « neuroprotectin D1 » (NPD1) protège les cellules lors de l'apoptose provoquée par une ischémie (Bazan, 2005b). La synthèse de ce composé est dépendante du temps ce qui suppose l'implication de l'activité iPLA₂. Des travaux supplémentaires seront nécessaires afin de mieux comprendre les dessous de cette voie de signalisation protectrice inédite.

8.2.2 L'acide arachidonique et les récepteurs au glutamate

Vers la fin des années 90, quelques équipes ont proposé un nouveau rôle de l'AA soit celui de second messenger suite à l'activation des récepteurs au glutamate. Ainsi, Nishizaki et al. (1999a) ont démontré son importance pour l'expression de la LTP dans la région CA1 de l'hippocampe. Ils ont ensuite identifié la CaMKII comme intervenant intermédiaire dans cette voie de signalisation modulée par les récepteurs AMPA perméables au Ca²⁺ (Nishizaki et al., 1999b). Dans ce cas précis, on peut suspecter une implication de la cPLA₂; l'AA étant son produit préférentiel en plus que le cation Ca²⁺ est nécessaire à son activation. Cet acide gras pourrait même être un messenger jusqu'au niveau de la plasticité moléculaire des processus

de la LTP puisque les récepteurs AMPA perméables au Ca^{2+} activent le facteur de transcription nucléaire cAMP response element-binding - CREB (Perkinton et al., 1999). Toutefois s'ils ne sont pas désensibilisés, les récepteurs AMPA induisent, via l'AA, la relâche du Ca^{2+} intracellulaire et un dysfonctionnement des mitochondries ce qui mène à l'apoptose et la mort neuronale (Camins et al., 1998).

8.2.3 L'acide palmitique et le phénomène de la palmitoylation

Un mécanisme crucial de régulation des propriétés et du transport des récepteurs au glutamate de type AMPA est associé à un acide gras bien particulier : l'acide palmitique (Hayashi et al., 2005) (FIGURE 8.6). Connu sous l'appellation de palmitoylation, ce processus consiste à attacher, par un lien covalent, cet acide gras de 16 carbones à un résidu cystéine. Cette



FIGURE 8.6 : La structure de l'acide palmitique. Cet acide gras saturé, constitué de 16 carbones, est également appelé acide hexadécanoïque. Il est le premier produit de la lipogénèse et un antioxydant. En effet sa conjugaison au rétinol permet la stabilisation de la vitamine A dans le lait. Son implication dans l'avènement des maladies cardiovasculaires demeure, à ce jour, sujet à controverses.

altération réversible favorise le caractère hydrophobe des protéines réceptrices et contribue à leur association à la membrane plasmique (Dunphy & Linder, 1998). La palmitoylation est un processus clé de la plasticité synaptique des récepteurs AMPA; lorsqu'elle s'effectue sur la portion C-terminale, elle favorise l'internalisation alors que sur les domaines

transmembranaires elle stabilise les récepteurs dans la membrane (Hayashi et al., 2005). L'application de glutamate abaisse le niveau de palmitoylation des récepteurs AMPA, avec pour conséquence une endocytose de ces derniers (El-Husseini et al., 2002). La palmitoylation régule finalement les interactions des récepteurs avec les protéines accessoires, certaines d'entre elles – GRIP, ABP, PSD95 - pouvant aussi subir cette modification (Hayashi et al., 2005). À ce jour, personne ne s'est intéressé à la possibilité que le DHA et/ou l'AA agisse de la même manière sur les récepteurs AMPA.

8.2.4 La cardiolipine et l'excitotoxicité

Puisque la $iPLA_2\gamma$ est co-localisée avec les mitochondries (Kinsey et al., 2007), il est plausible qu'elle interagisse avec un lipide unique en son genre : la cardiolipine. Celle-ci représente un pourcentage important de la constitution des membranes mitochondriales internes. Avec sa structure bien particulière, soit celle d'un phospholipide à quatre acides gras (FIGURE 8.7), elle est responsable de l'imperméabilité des mitochondries aux protons, essentiels à la chaîne respiratoire productrice d'énergie. Le niveau de cardiolipine diminue lors du vieillissement, ce qui pourrait expliquer la perte d'efficacité caractéristique de ces organelles (Ames et al., 1995). Les envahisseurs bactériens exploitent les propriétés de la cardiolipine pour déjouer les macrophages de notre organisme; les $iPLA_2$ peuvent en effet cliver ce lipide et relâcher de la lysocardiolipine (Fischer et al., 2001). Ce produit, expulsé des macrophages par des lysosomes, est alors en mesure de neutraliser le système de défense immunitaire de l'hôte. L'ablation génétique de l'activité $iPLA_2\gamma$ par la suppression de son site actif a permis de mieux cerner les rôles de cette phospholipase pour les mitochondries (Mancuso et al., 2007). Les souris mutantes ont présenté des retards de croissance, une intolérance au froid, une diminution de l'endurance lors d'activités physiques, une mortalité accrue suite à un stress cardiaque, un

dysfonctionnement mitochondrial drastique (+65%) et, enfin, une chute du niveau des cardiolipines. Tous ces paramètres sont liés aux capacités bioénergétiques des mitochondries. La iPLA₂ est donc un acteur indispensable à la survie cellulaire et il est possible que son inhibition affecte plus de mécanismes que ce qui était appréhendé au tout début de mes études graduées.

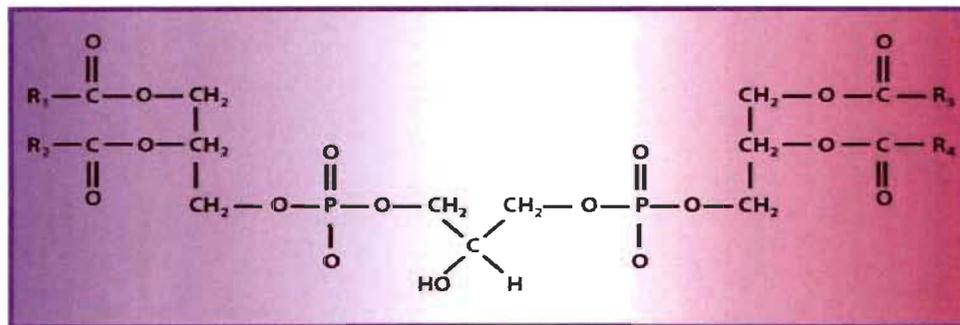


FIGURE 8.7 : La structure de la cardiolipine. La structure de ce phospholipide est unique puisqu'elle comprend quatre acides gras plutôt que deux comme tous les autres phospholipides – identifiés par R₁, R₂, R₃ et R₄ sur la figure. De par son action essentielle au bon fonctionnement de la mitochondrie il serait très intéressant d'évaluer les conséquences de l'action et/ou de l'inhibition des iPLA₂ sur l'intégrité et les fonctions de la cardiolipine.

8.3 LA PLASTICITÉ ET LES RAFTS LIPIDIQUES

Avec un peu de recul, on peut spéculer sur l'implication des iPLA₂ et des acides gras sur des microdomaines uniques de la membrane plasmique : les rafts lipidiques. Associés à la portion post-synaptique des neurones, les rafts contiennent les récepteurs au glutamate en plus d'une panoplie d'autres protéines nécessaires à la transmission neuronale (FIGURE 8.8). Il est donc pertinent de s'attarder un peu sur la structure et les fonctions de ces

microdomaines tout en cogitant sur leurs rôles potentiels en lien avec les résultats documentés dans ma thèse.

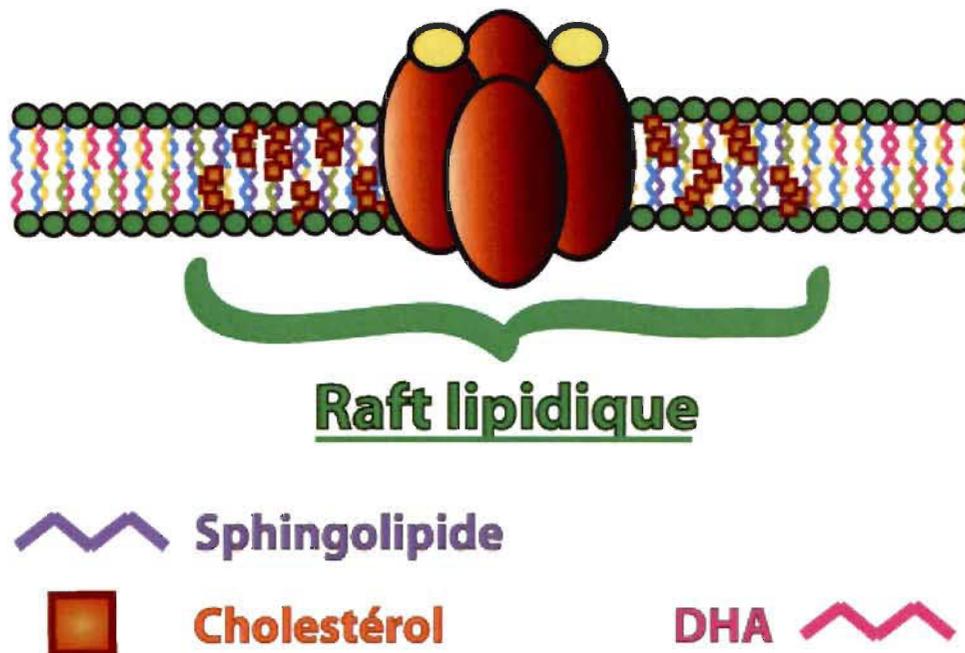


FIGURE 8.8 : Les rafts lipidiques. Ces microdomaines sont constitués principalement de sphingolipides et de cholestérol. Leur structure compacte facilite la maintenance des protéines transmembranaires comme les récepteurs AMPA. Le DHA pénètre très difficilement ces sections de la membrane en raison de ses liens insaturés; d'un point de vue énergétique il est même presque impossible que cette association se fasse de façon naturelle. Depuis quelques années, les rafts et autres domaines similaires sont associés aux synapses des neurones.

8.3.1 Les rafts lipidiques

Riches en sphingolipides et en cholestérol, ces microdomaines présentent une constitution différente du reste de la membrane (Simons & Ikonen, 1997). En effet, les sphingolipides sont, contrairement à la majorité

des autres phospholipides, riches en acides gras saturés très longs. De par leur nature, ils forment des interactions moléculaires très solides avec pour conséquence un assemblage compact et laborieux à briser. Le cholestérol rigidifie davantage le tout ce qui rend ces portions membranaires insolubles dans la plupart des détergents (Brown & London, 2000). Les « caveolae » sont un type similaire de microdomaines; leur formation est toutefois régie par la protéine « caveolin » et elles semblent liées aux processus d'endocytose et d'exocytose. Les fonctions de ces dernières sont très peu connues dans le cerveau mais il a été démontré que le glutamate, l'AMPA et le kainate augmentent l'expression de la « caveolin » dans des cultures primaires de neurones (Bu et al., 2003). Les sous-unités des récepteurs AMPA sont justement localisées dans des rafts dendritiques selon des évidences biochimiques rapportées par Suzuki et al. (2001). En plus, la déstabilisation des rafts entraîne une baisse de l'expression membranaire des récepteurs AMPA. Cela engendre rapidement une plasticité synaptique néfaste qui modifie la morphologie des épines dendritiques (Hering et al., 2003). Cette plasticité se caractérise par un effondrement de la structure maintenant en place les récepteurs (protéines accessoires, actine, etc.), une diminution drastique de la densité post-synaptique et une augmentation totale du volume des synapses résiduelles. Inévitablement, la définition et la fonctionnalité des synapses composant les épines est réduite ce qui provoque possiblement, à plus long terme, une régression de l'arbre dendritique (Hering et al., 2003). Ces phénomènes sont peut-être liés à l'apparition de troubles neurogénéralifs caractérisés par une plasticité déficiente, comme dans le cas de la MA.

8.3.2 Les PLA₂ et les rafts lipidiques

Les iPLA₂ s'avèrent d'excellentes candidates pour explorer les rafts lipidiques car elles sont peut-être capables de modifier les propriétés des récepteurs au glutamate en altérant simplement leur environnement lipidique.

Les PLA₂ exercent préférentiellement leur action catalytique à la frontière entre les rafts lipidiques et le reste de la membrane plasmique dans des liposomes géants (Staneva et al., 2004). Ce phénomène est probablement dû à la phase (+/- solide vs liquide) régissant la fluidité membranaire; les PLA₂ étant sensibles à ces changements biophysiques. L'accumulation de sites hydrolysés par l'action des phospholipases force l'entrée de molécules d'eau provoquant une courbure dans la section membranaire hydrophobe résultante et, éventuellement, la formation d'une vésicule (Staneva et al., 2004). Les protéines présentes dans le raft visé pourraient ainsi être internalisées suite à l'action directe des PLA₂ sur la portion post-synaptique de la membrane. Au niveau extra-synaptique, les récepteurs AMPA sont plutôt internalisés via la « caveolin » et la clathrine, une protéine depuis longtemps associée à l'endocytose (Petrulia et al., 2003). Il se trouve que l'activité de la cPLA₂ est bloquée par les protéines « caveolin » dans des cultures de neurones primaires (Gaudreault et al., 2004). Conséquemment, les propriétés des récepteurs AMPA sont altérées ce qui pourrait avoir une incidence directe sur les mécanismes de plasticité synaptique.

8.3.3 Les acides gras et les rafts lipidiques

Puisque les rafts lipidiques sont constitués exclusivement d'acides gras saturés, le DHA s'insère peu voire jamais dans ces structures (Wassall et al., 2004; Wassall & Stillwell, 2008). Ils sont cependant des alliés nécessaires à l'équilibre de la membrane dans son ensemble. Le DHA peut en effet modifier la taille et la distribution de ces microdomaines particuliers (Chapkin et al., 2008). Il influence également la composition des rafts et des « caveolae » puisqu'une augmentation du DHA membranaire induit une baisse des niveaux de sphingolipides et du cholestérol, probablement parce que ces derniers interagissent très mal avec les acides gras insaturés (Ma et al., 2004). D'autant plus qu'une concentration accrue de DHA hausse la fluidité

membranaire, un paramètre insupportable pour le cholestérol (Wassall et al., 2004). En effet, le cholestérol fait partie d'une portion considérée comme rigide de la membrane, où les acides gras saturés sont peu mobiles et bien alignés. À l'inverse, les portions contenant des PUFAs, tout particulièrement le DHA, sont beaucoup moins organisées (Wassall & Stillwell, 2008). Une forte augmentation du cholestérol membranaire, au cours du vieillissement notamment, provoque une rigidification de la membrane (Yehuda et al., 2002). Fait intéressant : le DHA reverse cet effet chez des rats hypercholestérolémiques alors que ce n'est pas le cas pour l'EPA (Hashimoto et al., 2006a). Ces résultats sont concordants avec ceux que nous avons obtenus et qui ont été auparavant présentés dans le chapitre 5 (Ménard et al., soumis). Nous pouvons supposer qu'en augmentant la fluidité membranaire par un traitement au DHA cela a pour conséquence de faciliter le transport des récepteurs au glutamate de type AMPA (FIGURE 8.9). Ces derniers sont très dynamiques et une étude récente a justement démontré que les propriétés membranaires environnementales sont critiques à leur distribution intracellulaire (Yersin et al., 2007). Toutes ces découvertes posent peut-être les fondements d'un nouveau domaine de recherche à la frontière de la biophysique et de la biologie cellulaire avec des applications physiologiques indéniables.

8.4 LA PLASTICITÉ À LONG TERME ET LES PLA₂

Suite à ce survol exhaustif des implications hypothétiques de l'activité des iPLA₂ et du DHA pour les processus de plasticité synaptique et cellulaire, il est intrigant de se pencher maintenant sur leurs effets à un échelon supérieur : la plasticité fonctionnelle.

8.4.1 Les PLA₂ et la LTP/LTD

La toute première preuve d'une interaction entre les PLA₂ et les récepteurs au glutamate de type AMPA a été rapportée par Massicotte & Baudry (1990) il y a de cela plusieurs années. Suite à un traitement avec des

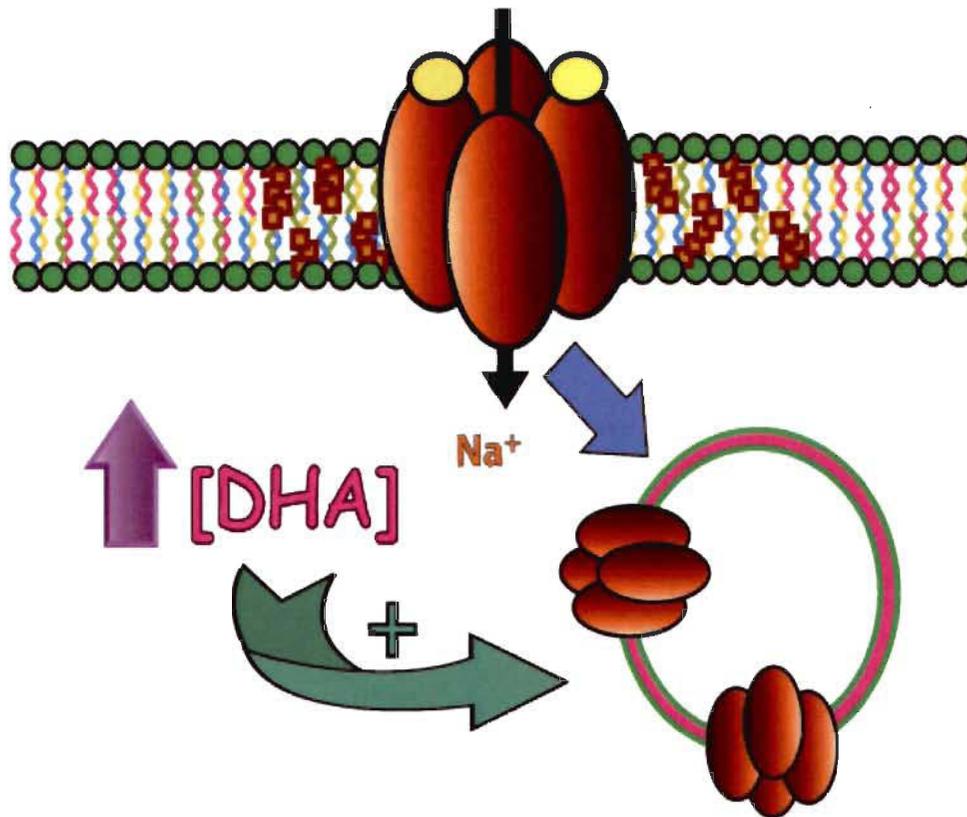


FIGURE 8.9 : Le DHA facilite l'internalisation des récepteurs AMPA. En augmentant la fluidité membranaire, le DHA modifie les propriétés biophysiques environnementales des récepteurs au glutamate, particulièrement ceux de type AMPA qui sont très dynamiques, ce qui entraîne une internalisation accrue.

sPLA₂ provenant de venin d'abeille, l'affinité de liaison des récepteurs AMPA, indispensables à l'induction de la LTP, a augmenté tandis que leur nombre est demeuré inchangé. Des expérimentations subséquentes en électrophysiologie ont permis l'affirmation du constat suivant : l'action des

PLA₂ dépendantes du Ca²⁺ est nécessaire à la mise en place des mécanismes liés à l'expression à long terme de la LTP (Massicotte et al., 1991; Bernard et al., 1994). Le rôle essentiel des iPLA₂ à quant à lui été établi par Wolf et al. (1995). En effet, l'application du BEL a bloqué complètement l'induction de la LTP par des stimulations électriques de fréquences thêta, toutefois, l'ajout d'acides gras clivés par les iPLA₂ a permis de contrecarrer ce phénomène. L'activité iPLA₂ semble néanmoins déterminante pour cette forme de plasticité fonctionnelle sous-jacente aux processus de la mémoire et de l'apprentissage. Dans le même ordre d'idées, une étude menée dans notre laboratoire a démontré que c'est la iPLA₂γ qui module les processus post-synaptiques liés à la LTP, que celle-ci soit induite de manière électrique ou chimique (Martel et al., 2006). En concordance avec les travaux de cette thèse, l'inhibition de la cPLA₂ s'est avérée sans effet significatif. Il semble que l'activité iPLA₂γ favorise l'insertion des récepteurs AMPA dans la membrane, avec pour conséquence une sensibilisation spécifique de la synapse excitatrice. Cette plasticité cellulaire a justement été intimement associée à l'induction voire la maintenance de la LTP (Boehm & Malinow, 2005).

8.4.2 Les acides gras et la LTP/LTD

Pour ce qui est de l'influence des acides gras insaturés sur la plasticité fonctionnelle de l'hippocampe, elle s'avère peu documentée à ce jour. Cependant, Fujita et al. (2001) ont observé que le DHA améliore les altérations des mécanismes de la LTP consécutifs d'une inhibition des iPLA₂. Après avoir confirmé les résultats des études précédentes avec le BEL, ils ont appliqué conjointement celui-ci avec du DHA. Ce traitement a eu pour effet de rétablir complètement l'induction de la LTP normalement observée dans la région CA1 (Fujita et al., 2001). La relâche de cet acide gras semble donc cruciale à la mise en place de la plasticité fonctionnelle sous-jacente à cette forme de « mémoire ». Quant aux récepteurs au

glutamate de type AMPA, acteurs majeurs de cette plasticité, nos travaux laissent croire que leur activité est sous l'influence du DHA (Ménard et al., sous presse). Cette hypothèse est d'autant plus plausible en vertu des résultats obtenus par Nishikawa et al. (1994), qui ont démontré que le DHA est capable de potentialiser la probabilité d'ouverture des récepteurs NMDA sans toutefois modifier leurs capacités de conductance. Lorsque les synapses excitatrices deviennent survoltées, le DHA s'efforce plutôt d'abaisser la potentielle toxicité du système. Ainsi, en présence de bicuculline – un antagoniste des récepteurs GABAergiques des synapses inhibitrices – ou encore en absence de Mg^{2+} – cations qui bloquent les récepteurs NMDA – cet acide gras diminue l'amplitude des réponses électrophysiologiques (Young et al., 2000). Au contraire, dans le cas de la LTD, le DHA accélère le retour au niveau du potentiel électrophysiologique de base et ce, selon la concentration d'acide gras insaturé utilisée (Young et al., 1998). De par son influence sur les canaux ioniques, le DHA peut donc atténuer l'activité épileptique éventuellement pathologique ou plutôt sensibiliser le système pour faciliter une plasticité fonctionnelle subséquente indispensable à la mémoire et/ou l'apprentissage.

8.5 UN LIEN ENTRE LA $iPLA_2$, L'ACIDE DOCOSAHEXAÉNOÏQUE ET LA MALADIE D'ALZHEIMER ?

Puisque l'activité des $iPLA_2$ et la proportion de DHA sont déterminantes à la fois pour les processus de plasticité cellulaire, synaptique et fonctionnelle du cerveau, tout particulièrement de l'hippocampe, il est séduisant de cogiter sur leur rôle dans le développement de maladies neurodégénératives comme la MA, une condition étroitement associée à un dysfonctionnement de ces facultés.

8.5.1 Les PLA₂ et la maladie d'Alzheimer

La cPLA₂ est liée à la MA depuis maintenant une dizaine d'années. Stephenson et al. (1996) ont été les premiers à relever une forte activation de cette phospholipase dans les cerveaux de patients MA ce qui les a amené à supposer que la cPLA₂ est probablement en partie responsable de la réaction inflammatoire caractéristique de cette affection. De plus, l'expression de son ARNm est augmentée ce qui renforce les conclusions de l'étude précédente (Lukiw, 2004).

Si on s'attarde plus spécifiquement aux marqueurs pathologiques de la MA, les peptides A β favorisent la translocation de la cPLA₂ du cytosol vers la membrane nucléaire (Anfuso et al., 2005). Par la suite, l'enzyme est phosphorylée ce qui provoque une suractivation et une relâche massive d'AA. L'inhibiteur spécifique AACOCF₃ bloque partiellement ces effets seulement, ce qui laisse supposer l'action d'une autre PLA₂. Ainsi, la présence de BEL conjointement avec l'AACOCF₃ abolit en totalité la relâche d'acides gras ce qui porte à croire que les fragments A β activent également les iPLA₂ (Anfuso et al, 2005).

Les patients souffrants de la MA présentent un niveau élevé de cholestérol (FIGURE 8.10), une altération qui s'accroît au cours de la progression de la maladie (Wood et al., 2002; Cutler et al., 2004). Le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol de tout le corps humain; il en contient à lui seul 25% de la totalité (Hartmann et al., 2007). En raison de son omniprésence dans les rafts lipidiques, il s'avère essentiel à la maintenance de la plasticité neuronale et donc, aux fonctions synaptiques (Pfrieger, 2003). Sa synthèse, principalement endogène, est étroitement liée à l'action de la hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMGR). L'activité de cette enzyme est l'étape limitante de la production de cholestérol (Poirier, 2005). Il est bien documenté que l'hypercholestérolémie est un facteur de risque du

développement des pathologies reliées à une surproduction d'amyloïde (Kivipelto et al., 2001). Le plus important facteur de risque demeure toutefois génétique : la seule présence de deux allèles homozygotes Apoε4 accroît celui-ci de 15 à 18 fois (Corder et al., 1993). Les apolipoprotéines sont impliquées dans le transport des lipides entre les astrocytes et les neurones ce qui renforce l'hypothèse d'une cause « lipidique » de ce type de pathologies neurodégénératives. Les mécanismes sous-jacents à leur toxicité dans le cas de la MA demeurent toutefois malheureusement méconnus encore à ce jour.

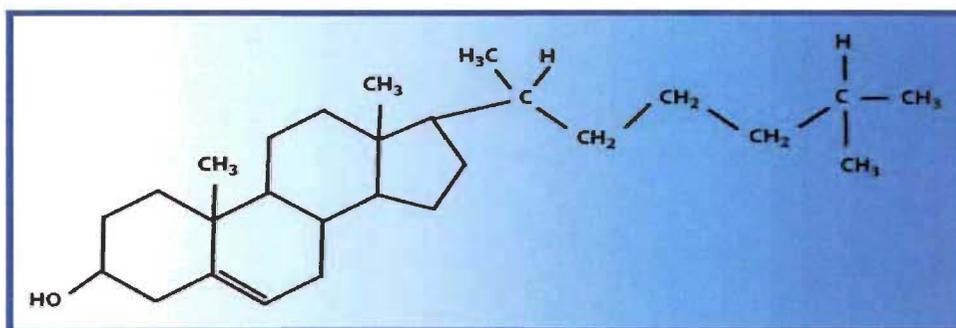


FIGURE 8.10 : La structure du cholestérol. Cette molécule comprend quatre cycles carbonés et 8 carbones asymétriques. Puisqu'il ne possède qu'un seul groupement -OH, le cholestérol est fortement hydrophobe, ce qui explique sa liaison préférentielle à la membrane plasmique. De par son ampleur, soit 27 carbones, 46 hydrogènes et un oxygène, il rigidifie fortement la membrane par sa seule présence.

Pour en revenir au cholestérol, de nombreux travaux lui ont attribué, et ce autant au niveau mécanistique que moléculaire, un rôle direct dans la production de la Aβ toxique (Simons et al., 1998; Wahrle et al., 2002). En effet, il augmente significativement l'activité de la γ-sécrétase, l'enzyme responsable du clivage néfaste de l'APP (Wahrle et al., 2003). En plus, les agrégats de Aβ ont tendance à s'associer préférentiellement au cholestérol membranaire plutôt qu'aux phospholipides ou aux acides gras (Avdulov et al., 1997). Les molécules à action pharmacologique capables de moduler

l'homéostasie de ce dernier ont donc rapidement été ciblées afin de ralentir les effets irréversibles de la synthèse de A β (Steinberg, 2006). La famille des statines s'est avérée particulièrement intéressante; d'autant plus que des études épidémiologiques ont rapporté une association entre les traitements avec ces composés et une réduction du risque de développement de démences telles que la MA (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000; Rockwood et al., 2002). Les statines, naturelles ou synthétiques, agissent directement sur la synthèse du cholestérol en inhibant l'HMGR (Poirier, 2005). Elles sont donc généralement prescrites pour les personnes à risque pour les maladies cardiovasculaires. Leur utilisation demeure toutefois controversée, principalement en raison de leur effet sur la coenzyme Q10 (Farooqui et al., 2007b). Celle-ci est nécessaire au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Beal, 2004). Elle agit aussi comme antioxydant en protégeant les membranes de ces organelles contre le stress oxydatif (Albano et al., 2002). Or, l'usage des statines diminue, à long terme, les niveaux de coenzyme Q10, ce qui peut provoquer un affaiblissement du métabolisme du cœur, du foie ou encore des muscles (Wilkin & Blizkanov, 1998). Ironiquement, cela peut même entraîner le développement de cardiomyopathies, justifiant l'usage de suppléments pour pallier à ce manque (Langsjoen et al., 2005). Anecdote historique : la compagnie pharmaceutique Bayer a dû retirer du marché, en 2001, la cérivastatine en raison de 21 décès par rhabdomyolysis – un effondrement du tissu musculaire squelettique (Farooqui et al., 2007b). Certains remettent également en cause l'efficacité de ces composés dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Malgré tout, elles semblent présenter plusieurs avantages : inhibition de la relâche des cytokines pro-inflammatoires (Sparks et al., 2005), effet bénéfique sur la neurogénèse (Chen et al., 2005) et protection contre l'excitotoxicité (Zacco et al., 2003). Dernier bémol : il a été démontré que le cholestérol stabilise les microtubules via les protéines tau (Fan et al., 2001, 2002), les statines pourraient donc influencer de près la plasticité synaptique et neuronale mais cela reste à prouver.

Bate & Williams (2007) ont démontré qu'un traitement à la squalostatine prévient la migration de la A β mais aussi de la cPLA₂ vers les rafts lipidiques, protégeant ainsi les cellules nerveuses d'une mort prématurée (FIGURE 8.11). Elle diminue également le transport intracellulaire des prions, des protéines associées à des pathologies neurodégénératives différentes de la MA (Wilson et al., 2007). Encore une fois, les prions semblent interagir étroitement avec la cPLA₂ puisqu'ils se retrouvent avec elle au niveau des rafts lipidiques. La squalostatine diminue le niveau de ces protéines dans les rafts pour les diriger plutôt vers les lysosomes qui se chargent de leur dégradation (Wilson et al., 2007). La même équipe a auparavant démontré que les prions activent les PLA₂ neuronales (Bate & Williams, 2004). À la lumière de ces récents résultats, il devient de plus en plus plausible que les iPLA₂ régulent les récepteurs au glutamate tel que postulé précédemment.

8.5.2 La iPLA₂ γ et l'hyperphosphorylation de tau

Pour répondre au dernier objectif énoncé dans l'introduction de cette thèse, nous avons réalisé un projet chez des souris transgéniques exprimant la protéine tau humaine. Comme il a été présenté dans le chapitre précédent, l'inhibition de la iPLA₂ γ par le (R)-BEL favorise l'hyperphosphorylation de cette protéine, une caractéristique associée depuis plus d'une décennie au développement de la MA (Mandelkow & Mandelkow, 1998). Nous avons identifié certaines des kinases responsables de cette modification ainsi que les enzymes liées à la synthèse accrue de tau elle-même. Il est inutile de répéter les éléments de la discussion du manuscrit mais il peut être intéressant de cogiter sur un modèle représentatif de cette altération (FIGURE 8.12). D'abord, il semble que l'entrée de Ca²⁺, provoquée par une suractivation des récepteurs AMPA et induite suite à une inhibition prolongée de la iPLA₂ γ , active plusieurs enzymes importantes liées au maintien des

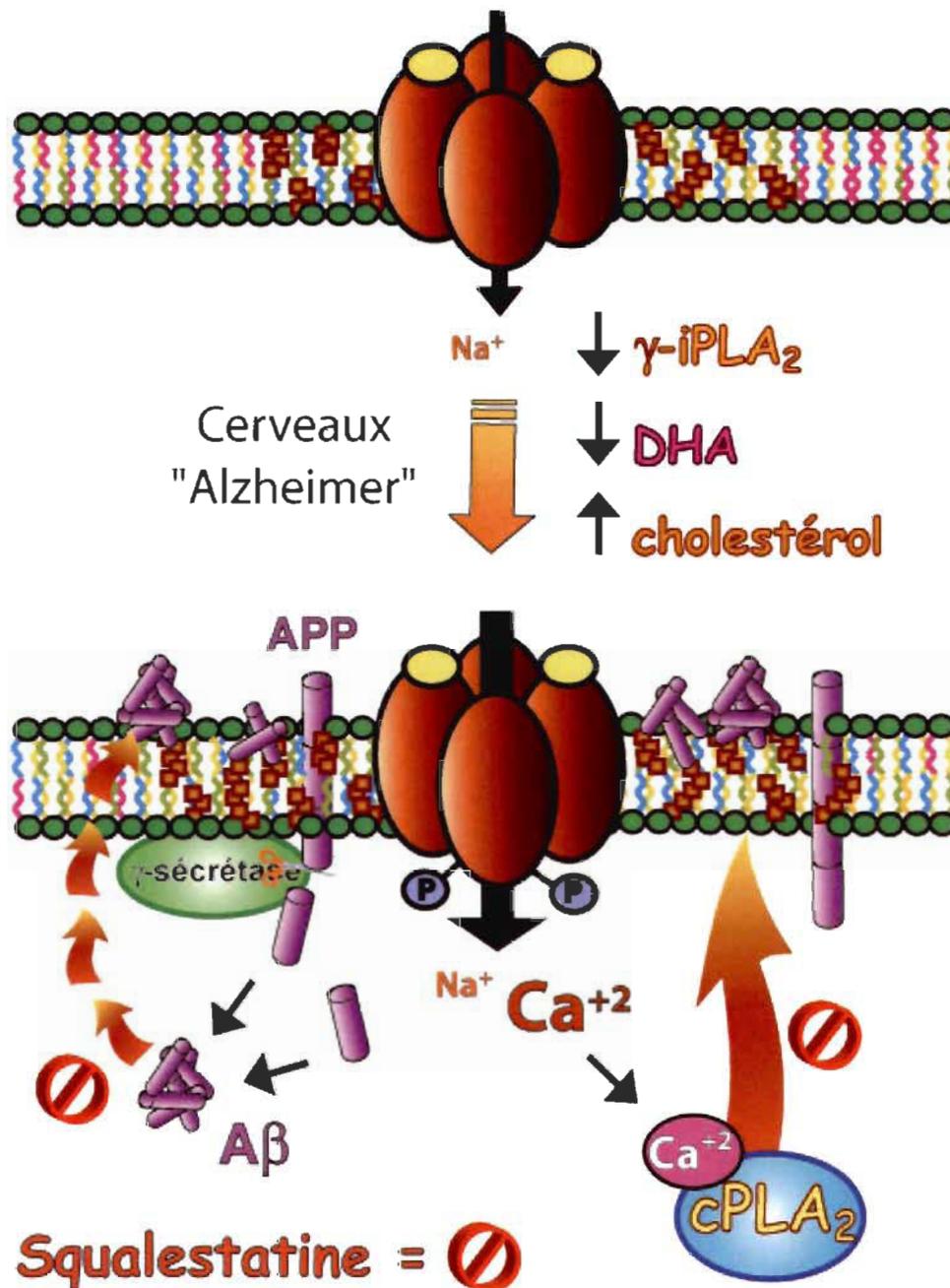


FIGURE 8.11 : Les effets de la squalostatine. Cette molécule interfère avec la migration de la A β et de la cPLA₂ vers les rafts lipidiques en diminuant le taux de cholestérol membranaire.

fonctions des synapses glutamatergiques. Ainsi, les calpaines peuvent cliver p35 en son fragment p25, protéine qui, je le rappelle, se lie à la kinase cdk5 (référence à la FIGURE 8.4). Ces protéases coupent normalement aussi la

spectrine et les sous-unités qui forment les récepteurs au glutamate ce qui provoque leur internalisation. Toutefois, des résultats préliminaires nous laissent croire que lorsque des tranches d'hippocampe en culture sont préalablement traitées au (R)-BEL, ces processus sont perturbés (résultats

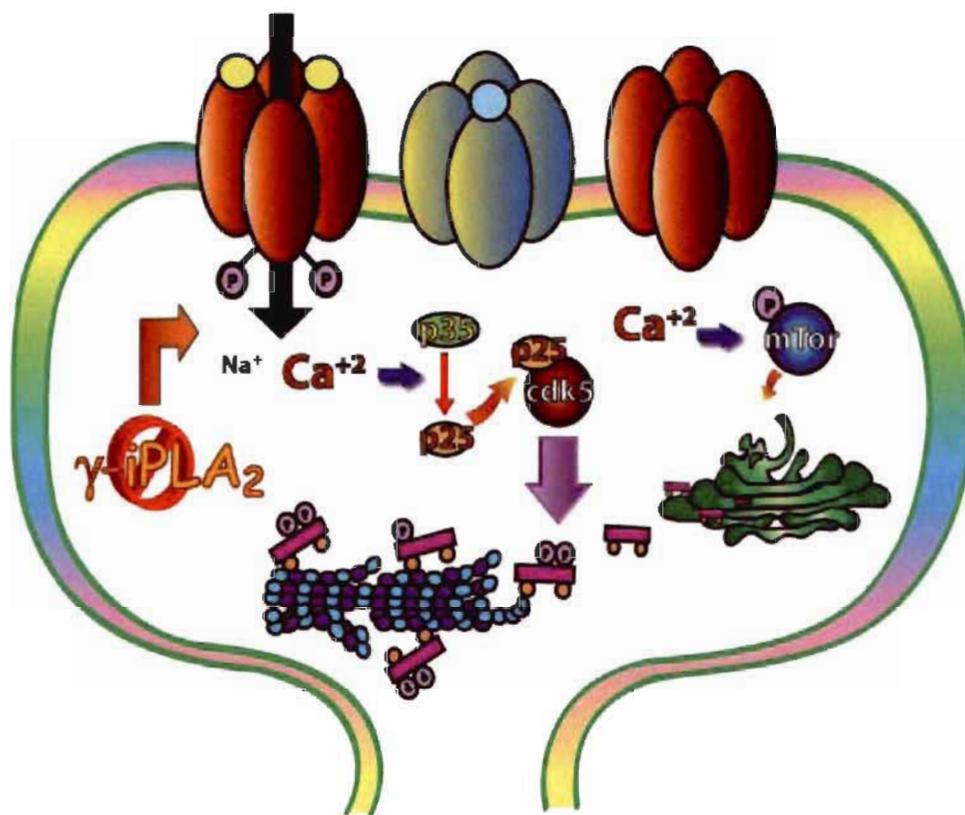


FIGURE 8.12 : L'inhibition de la γ -iPLA₂ favorise l'hyperphosphorylation de la protéine tau. En prolongeant l'ouverture des récepteurs AMPA, le (R)-BEL induit une entrée accrue de Ca^{2+} . Ce cation active la coupure de p35 en p25 par les calpaines – voir la figure 8.4 – qui active la kinase cdk5. Celle-ci phosphoryle tau de manière incontrôlable ce qui provoque la déstabilisation des microtubules et du cytosquelette. Pour contrer ce phénomène, le neurone produit plus de protéines tau et cette synthèse est régulée par la phosphorylation de mTor. À moyen terme, soit 12 heures, la survie neuronale est ainsi assurée. Toutefois, il est probable que la cellule ne pourra tenir très longtemps face à ces altérations ce qui provoquera l'apoptose, lentement mais sûrement.

non publiés). Conséquemment, l'entrée de Ca^{2+} croît sans cesse ce qui mène à une hyperphosphorylation de tau et une déstabilisation potentiellement mortelle du cytosquelette. Pour contrer ce phénomène, les neurones exploitent possiblement la synthèse de nouvelles protéines tau, ce qui pourrait permettre d'éviter l'effondrement des microtubules (An et al., 2003). Ce mécanisme compensatoire pourrait expliquer la hausse de phosphorylation des protéines « mammalian target of rapamycin » (mTor) et p70 S6 kinase, qui sont associés depuis longtemps aux voies de signalisation de la synthèse protéique (Dufner & Thomas, 1999; Li et al., 2005). L'inhibition de la iPLA₂ reproduit finalement de manière inédite plusieurs paramètres caractéristique de la MA : suractivation du système glutamatergiques, hyperphosphorylation de tau et activités accrues de certaines kinases dont cdk5, mTor ou encore p70 S6 kinase.

Il aurait été très intéressant de comparer les niveaux de tau soluble versus insolubles suite à un traitement des cultures avec le R-BEL. En effet, comme pour la A β , le niveau de solubilité de la protéine semble déterminante dans l'avènement de la pathologie (Johnson, 2000; Guo et al., 2006). Il a été récemment proposé par Guo et al. (2006) que la A β pourrait se lier à tau soluble non phosphorylée, ce qui aurait pour conséquence de favoriser une phosphorylation exacerbée de la protéine. Lorsque tau devient hyperphosphorylée, elle ne peut plus demeurer attachée aux microtubules et tend alors à devenir insoluble en raison de sa structure désorganisée et de son incapacité à camoufler ses portions hydrophobes (von Bergen et al., 2005). Une hyperphosphorylation de tau insoluble suite à l'inhibition de la iPLA₂ pourrait donc suggérer une altération encore plus déterminante voire directement liée à ce qui semble se produire dans le cerveau des patients souffrant de la MA. Malheureusement, la durée du stage n'a pas permis la réalisation de ces expérimentations.

8.5.3 L'acide docosahexaénoïque et la maladie d'Alzheimer

Au début des années 90, Söderberg et al (1991) ont rapporté pour la première fois une modification de la composition lipidique de certaines régions du cerveau, l'hippocampe notamment, chez des patients souffrants de la MA. Par la suite, plusieurs équipes ont démontré, par des études épidémiologiques, une corrélation inversée entre une diète riche en DHA et la prévalence de la MA (Barberger-Gateau et al., 2002; Morris et al., 2003). Des essais cliniques comportant une administration quotidienne d'acides gras oméga-3 ont donc été rapidement mis en place. Les résultats se sont toutefois avérés décevants pour les patients chez qui la MA était déjà à un stade modéré ou sévère. Par contre, chez les personnes qui présentaient des symptômes légers de la maladie, une amélioration des fonctions cognitives a été observée (Freund-Levi et al., 2006). Des travaux supplémentaires demeurent cependant nécessaires pour confirmer les résultats obtenus lors de ces essais.

Au niveau des marqueurs pathologiques de la MA, une diète riche en DHA semble en mesure de réduire, chez des souris transgéniques de type Alzheimer, l'accumulation de A β et ce, surtout dans le cas de A β 42, la forme qui s'avère la plus propice à former des agrégats (Lim et al., 2005). Dans le même ordre d'idées, l'administration chronique de DHA améliore les capacités mnésiques non seulement chez des rats normaux (Gamoh et al., 1999) mais aussi chez des animaux dont les performances sont altérées par des injections de A β (Hashimoto et al., 2006b). Des modifications au niveau de la fluidité membranaire synaptique représentent une explication plausible de ce phénomène. En effet, le DHA change la composition et la structure des rafts lipidiques avec pour conséquence comportementale une amélioration des capacités mnésiques (Hashimoto et al., 2006b). Les conclusions de cette récente étude supportent solidement les hypothèses préalablement soulevées quant aux mécanismes sous-jacents aux différents effets de

l'inhibition des iPLA₂ présentés dans cette thèse. D'autre part, une diminution de la libération de DHA par ces enzymes pourrait sournoisement mener à une expression prématurée des marqueurs liés à la démence de type Alzheimer; Green et al. (2007a) ayant montré que cet acide gras est étroitement associé à tau, A β et même la PS1 chez des souris transgéniques. À l'inverse, il est peut-être préférable que le DHA demeure sur la membrane ce qui, à priori, serait surprenant à la lumière des résultats obtenus et présentés dans ma thèse. Cette hypothèse n'est quand même pas à négliger, des études supplémentaires seront nécessaires pour évaluer cette possibilité.

8.5.4 Les iPLA₂, l'acide docosahexaénoïque et le vieillissement

Le vieillissement est indubitablement associé à des réactions inflammatoires accrues et une vulnérabilité croissante face aux processus de neurodégénérescence (Geula et al., 1998; Shetty & Turner, 1999; Kalehua et al., 2000; Godbout et al., 2005). Il a donc été suggéré que certaines régions, voire l'ensemble du cerveau, deviennent plus sensible à l'action des enzymes liées à ces altérations et ce, au cours du vieillissement normal et/ou prématuré comme dans le cas de la MA (Blasko & Grubeck-Loebenstein, 2003; Griffin, 2006; Lucas et al., 2006). C'est pourquoi, Aïd et Bosetti (2007) se sont intéressés à l'expression de la iPLA₂ chez des rats jeunes, adultes et âgés. Ils ont montré que l'expression de l'ARNm de cette phospholipase décroît avec l'âge, ce qui corrobore les hypothèses présentées précédemment. En plus, cette modification semble restreinte à l'hippocampe puisqu'aucune différence n'a été notée dans les cortex cérébraux. Aussi, l'expression de la cPLA₂ ne varie pas malgré que des travaux antérieurs ont rapporté une augmentation de son activation au cours du vieillissement, particulièrement lors de la MA (Lukiw, 2004). Ces observations sont en accord avec les résultats présentés dans cette thèse car les effets de l'inhibition de la iPLA₂ sont restreints non seulement à l'hippocampe mais

également à ce type particulier de phospholipase. À ce jour, rien n'a été publié quant aux activités spécifiques des isoformes iPLA₂ γ ou iPLA₂ β dans le cerveau au cours du vieillissement. Ce constat devrait toutefois changer au cours des prochaines années, surtout avec la mise au point récente d'une souris knockout iPLA₂ β (Bao et al., 2008; Ramanadham et al., 2008; Shinzawa et al., 2008).

8.6 CONCLUSION

Au cours de mes études graduées nous avons démontré, par les expérimentations décrites dans cette thèse, que la iPLA₂ est en mesure de réguler les récepteurs au glutamate de type AMPA et donc d'influencer les processus sous-jacents aux capacités supérieures que sont la mémorisation et l'apprentissage. Dans une perspective physiopathologique, l'activité de la iPLA₂ et son produit préférentiel, le DHA, diminuent l'excitotoxicité du glutamate, une condition mortelle pour les neurones et ce, tout particulièrement dans la région CA1 de l'hippocampe. Cet acide gras s'avère également nécessaire à un transport optimal des récepteurs entre les différents compartiments cellulaires. Enfin, l'inhibition de la iPLA₂ provoque une hyperphosphorylation de tau, un marqueur caractéristique de l'avènement de la MA, ce qui entraîne irrémédiablement l'apparition à long terme des symptômes cliniques associés à cette affection.

Ces travaux, ainsi que quelques études récemment publiées, permettent de proposer la théorie suivante : une activité iPLA₂ idéale est peut-être en mesure de retarder l'apparition des premiers signes de la MA voire même améliorer les déclin cognitifs « normalement » associé au vieillissement.

CHAPITRE IX

BIBLIOGRAPHIE

Aarts, M.M., Tymianski, M. (2004) "Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons", *Curr Mol Med.* 4(2):137-147.

Adesnik, H., Nicoll, R.A. (2007) "Conservation of glutamate receptor 2-containing AMPA receptors during long-term potentiation", *J Neurosci.* 27(17):4598-4602.

Adesnik, H., Nicoll, R.A., England, P.M. (2005) "Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking", *Neuron.* 48(6):977-985.

Adolfsson, R., Gottfries, C.G., Roos, B.E., Winblad, B. (1979) "Changes in the brain catecholamines in patients with dementia of Alzheimer type", *Br J Psychiatry.* 135:216-223.

Aïd, S., Bosetti, F. (2007) "Gene expression of cyclooxygenase-1 and Ca(2+)-independent phospholipase A(2) is altered in rat hippocampus during normal aging", *Brain Res. Bull.* 73(1-3):108-113.

Albano, C.B., Muralikrishnan, D., Ebadi, M. (2002) "Distribution of coenzyme Q homologues in brain", *Neurochem. Res.* 27:359-368.

Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M.J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P.C., Atzori, C., Migheli, A., Crowther, R.A., Ghetti, B., Spillantini, M.G., Goedert, M. (2002) "Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein", *J Neurosci.* 22(21):9340-9351.

Alonso, A.D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H.S., Iqbal, K. (1997) "Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(1):298-303.

Alonso, A.C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (1994) "Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(12):5562-5566.

Alvarez-Buylla, A. (1990) "Mechanism of neurogenesis in adult avian brain", *Experientia*. 46(9):948-955.

Alzheimer, A. (1907) "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde [About a peculiar disease of the cerebral cortex]" (in German) *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin* 64 (1–2):146–148.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1995) "Mitochondrial decay in aging", *Biochim. Biophys. Acta* 1271(1):165-170.

An, W.L., Cowburn, R.F., Li, L., Braak, H., Alafuzoff, I., Iqbal, K., Iqbal, I.G., Winblad, B., Pei, J.J. (2003) "Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease", *Am. J. Pathol.* 163(2):591-607.

Andersen, P., Sundberg, S.H., Sveen, O., Wigström, H. (1977) "Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices", *Nature* 266(5604):736-737.

Andersen, P.H., Tygesen, C.K., Rasmussen, J.S., Søgaard-Nielsen, L., Hansen, A., Hansen, K., Kiemer, A., Stidsen, C.E. (1996) "Stable expression of homomeric AMPA-selective glutamate receptors in BHK cells", *Eur J Pharmacol.* 311(1):95-100.

Anderson, J. R. (1976) "Language, memory, and thought", Lawrence Erlbaum, Hillsdale, U.S.A.

Andorfer, C., Acker, C.M., Kress, Y., Hof, P.R., Duff, K., Davies, P. (2005) "Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms", *J Neurosci.* 25(22):5446-5454.

Anfuso, C.D., Assero, G., Lupo, G., Nicotra, A., Cannavò, G., Strosznajder, R.P., Rapisarda, P., Pluta, R., Alberghina, M. (2005) "Amyloid beta(1-42) and

its beta(25-35) fragment induce activation and membrane translocation of cytosolic phospholipase A2 in bovine retina capillary pericytes”, *Biochim. Biophys. Acta* 1686(1-2):125-138.

Arendash, G.W., Jensen, M.T., Salem, N. Jr, Hussein, N., Cracchiolo, J., Dickson, A., Leighty, R., Potter, H. (2007) “A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice”, *Neuroscience* 149(2):286-302.

Arora, A.S., de Groen, P.C., Croall, D.E., Emori, Y., Gores, G.J. (1996) “Hepatocellular carcinoma cells resist necrosis during anoxia by preventing phospholipase-mediated calpain activation”, *J. Cell. Physiol.* 167(3):434-442.

Atsumi, G., Murakami, M., Kojima, K., Hadano, A., Tajima, M., Kudo, I. (2000) “Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release”, *J. Biol. Chem.* 275(24):18248-18258.

Avdulov, N.A., Chochina, S.V., Igbavboa, U., Warden, C.S., Vassiliev, A.V., Wood, W.G. (1997) “Lipid binding to amyloid beta-peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids”, *J. Neurochem.* 69(4):1746-1752.

Bagal, A.A., Kao, J.P., Tang, C.M., Thompson, S.M. (2005) “Long-term potentiation of exogenous glutamate responses at single dendritic spines”, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(40):14434-14439.

Ball, M.J. (1977) “Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study”, *Acta Neuropathol.* 37(2):111-118.

Balsinde, J. (2002a) “Roles of various phospholipases A2 in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling”, *Biochemical J.* 364 (Pt 3): 695-697.

Balsinde, J., Winstead, M.V., Dennis, E.A. (2002b) "Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization", *FEBS Lett.* 531(1):2-6.

Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A., Dennis, E.A. (1999) "Regulation and inhibition of phospholipase A2", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:175-189.

Balsinde, J., Dennis, E.A. (1997) "Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2", *J. Biol. Chem.* 272(46):16069-16072.

Balsinde, J., Dennis, E.A. (1996) "Bromo-enol lactone inhibits magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase and blocks triacylglycerol biosynthesis in mouse P388D1 macrophages", *J. Biol. Chem.* 271:31937-31941.

Bao, S., Jacobson, D.A., Wohltmann, M., Bohrer, A., Jin, W., Philipson, L.H., Turk, J. (2008) "Glucose homeostasis, insulin secretion, and islet phospholipids in mice that overexpress iPLA2beta in pancreatic beta-cells and in iPLA2beta-null mice", *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294(2):E217-29.

Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., Deschamps, V., Pérès, K., Dartigues, J.F., Renaud, S. (2002) "Fish, meat, and risk of dementia: cohort study", *BMJ* 325(7370):932-923.

Bas, O., Songur, A., Sahin, O., Mollaoglu, H., Ozen, O.A., Yaman, M., Eser, O., Fidan, H., Yagmurca, M. (2007) "The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus", *Neurochem. Int.* 50(3):548-554.

Bate, C., Williams, A. (2007) "Squalestatin protects neurons and reduces the activation of cytoplasmic phospholipase A2 by Abeta(1-42)", *Neuropharmacology* 53(2):222-231.

Bate, C., Williams, A. (2004) "Role of glycosylphosphatidylinositols in the activation of phospholipase A2 and the neurotoxicity of prions", *J. Gen. Virol.* 85(Pt 12):3797-3804.

Bats, C., Groc, L., Choquet, D. (2007) "The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking", *Neuron*. 53(5):719-734.

Baudry, M., DuBrin, R., Beasley, L., Leon, M., Lynch, G. (1986) "Low levels of calpain activity in Chiroptera brain: implications for mechanisms of aging", *Neurobiol. Aging* 7(4):255-258.

Bayer, S.A., Yackel, J.W., Puri, P.S. (1982) "Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life", *Science* 216(4548):890-892.

Bazan, N.G. (2005a) "Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection", *Mol. Neurobiol.* 32:89–103.

Bazan, N.G. (2005b) "Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress", *Brain Pathol.* 15(2):159-166.

Bazan, N.G., Colangelo, V., Lukiw, W.J. (2002a) "Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease", *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 68-69:197-210.

Bazan, N.G., Tu, B., Rodriguez de Turco, E.B. (2002b) "What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis", *Prog. Brain Res.* 135:175-185.

Beal, F. (2004) "Therapeutic effects of coenzyme Q₁₀ in neurodegenerative diseases", In: H. Sies and L. Packer, Editors, *Quinones and Quinone Enzymes*, Pt B, Academic Press Inc, San Diego: 473–487.

Beal, M.F. (1998) "Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis", *Ann. Neurol.* 44(3 Suppl 1):S110-4.

Beal, M.F. (1992) "Role of excitotoxicity in human neurological disease", *Curr. Opin. Neurobiol.* 2(5):657-662.

Becker, J.T. (1988) "Working memory and secondary memory deficits in Alzheimer's disease", *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 10(6):739-753.

Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horré, K., Wiltfang, J., Esselmann, H., De Strooper, B. (2006) "Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms", *J. Neurochem.* 96(3):732-742.

Bernard, J., Lahsaini, A., Massicotte, G. (1994) "Potassium-induced long-term potentiation in area CA1 of the hippocampus involves phospholipase activation", *Hippocampus* 4(4):447-453.

Bettini, E., Maggi, A. (1991) "A rapid method for the quantitation of estrogen receptors in small amounts of tissue" *J. Immunol. Methods* 144:87-91.

Bi, X., Chen, J., Dang, S., Wenthold, R.J., Tocco, G., Baudry, M. (1998) "Characterization of calpain-mediated proteolysis of GluR1 subunits of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptor in rat brain", *J. Neurochem.* 68:1484-1494.

Bi, X., Chang, V., Molnar, E., McIlhinney, R.A., Baudry, M. (1996) "The C-terminal domain of glutamate receptor subunit 1 is a target for calpain-mediated proteolysis", *Neuroscience* 73(4):903-906.

Bi, X., Tocco, G., Baudry, M. (1994) "Calpain-mediated regulation of AMPA receptors in adult rat brain", *Neuroreport* 6(1):61-64.

Bian, F., Nath, R., Sobocinski, G., Booher, R.N., Lipinski, W.J., Callahan, M.J., Pack, A., Wang, K.K., Walker, L.C. (2002) "Axonopathy, tau abnormalities, and dyskinesia, but no neurofibrillary tangles in p25-transgenic mice", *J. Comp. Neurol.* 446(3):257-266.

Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., LaFerla, F.M. (2005) "Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice", *Neuron.* 45(5):675-688.

Blasko, I., Grubeck-Loebenstein, B. (2003) "Role of the immune system in the pathogenesis, prevention and treatment of Alzheimer's disease", *Drugs Aging* 20(2):101-113.

Bliss, T.V., Lomo, T. (1973) "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path", *J. Physiol.* 232(2):331-356.

Boehm, J., Kang, M.G., Johnson, R.C., Esteban, J., Huganir, R.L., Malinow, R. (2006) "Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1", *Neuron*. 51(2):213-225.

Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., Jaffard, R. (1999) "Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage", *Nature* 400(6745):671-675.

Bonventre, J.V., Sapirstein, A. (2002) "Group IV cytosolic phospholipase A2 (PLA₂) function: insights from the knockout mouse", *Adv. Exp. Med. Biol.* 507:25-31.

Bonventre, J.V., Huang, Z., Taheri, M.R., O'Leary, E., Li, E., Moskowitz, M.A., Sapirstein, A. (1997) "Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2", *Nature* 390(6660):622-625.

Bonventre, J.V. (1996) "Roles of phospholipases A2 in brain cell and tissue injury associated with ischemia and excitotoxicity", *J Lipid Mediat Cell Signal.* 14(1-3):15-23.

Borchelt, D.R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M.K., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., Sisodia, S.S. (1997) "Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins", *Neuron*. 19(4):939-945.

Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Younkin, S.G., Sisodia, S.S. (1996) "Familial Alzheimer's

disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo", *Neuron*. 17(5):1005-1013.

Borgdorff, A.J., Choquet, D. (2002) "Regulation of AMPA receptor lateral movements", *Nature*. 417(6889):649-653.

Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., Heinemann, S. (1990) "Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes", *Science*. 249(4972):1033-1037.

Bourre, J.M. (2004) "Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing", *J. Nutr. Health Aging* 8:163-174.

Braak, H., Braak, E. (1991) "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes", *Acta Neuropathol. (Berl)* 82:239-259.

Bredt, D.S., Nicoll, R.A. (2003) "AMPA receptor trafficking at excitatory synapses", *Neuron* 40:361-379.

Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C., Bredt, D.S. (1996) "Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains", *Cell* 84(5):757-767.

Broutman, G., Baudry, M. (2001) "Involvement of the secretory pathway for AMPA receptors in NMDA-induced potentiation in hippocampus", *J. Neurosci.* 21:27-34.

Brown, T.C., Tran, I.C., Backos, D.S., Esteban, J.A. (2005) "NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD", *Neuron*. 45(1):81-94.

Brown, W.J., Chambers, K., Doody, A. (2003) "Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function", *Traffic* 4(4):214-221.

Brown, D.A., London, E. (2000) "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts", *J. Biol. Chem.* 275(23):17221-17224.

Bruel-Jungerman, E., Davis, S., Laroche, S. (2007) "Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four", *Neuroscientist* 13(5):492-505.

Bu, J., Bruckner, S.R., Sengoku, T., Geddes, J.W., Estus, S. (2003) "Glutamate regulates caveolin expression in rat hippocampal neurons", *J. Neurosci. Res.* 72(2):185-190.

Buée, L., Delacourte, A. (1999) "Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease", *Brain Pathol.* 9(4):681-693.

Cacabelos, R., Barquero, M., García, P., Alvarez, X.A., Varela de Seijas, E. (1991) "Cerebrospinal fluid interleukin-1 beta (IL-1 beta) in Alzheimer's disease and neurological disorders", *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 13(7):455-458.

Calon, F., Cole, G.M. (2007) "Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies", *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 77(5-6):287-293.

Calon, F., Lim, G.P., Morihara, T., Yang, F., Ubada, O., Salem, N. Jr, Frautschy, S.A., Cole, G.M. (2005) "Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease", *Eur. J. Neurosci.* 22(3):617-626.

Calon, F., Lim, G.P., Yang, F., Morihara, T., Teter, B., Ubada, O., Rostaing, P., Triller, A., Salem, N., Jr, Ashe, K.H., Frautschy, S.A, Cole, G.M. (2004) "Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model", *Neuron* 43(5):633-645.

Camins, A., Gabriel, C., Aguirre, L., Sureda, F.X., Pallàs, M., Escubedo, E., Camarasa, J. (1998) "Flow cytometric study of mitochondrial dysfunction after AMPA receptor activation", *J. Neurosci. Res.* 52(6):684-690.

Campbell, I.G., Guinan, M.J., Horowitz, J.M. (2002) "Sleep deprivation impairs long-term potentiation in rat hippocampal slices", *J. Neurophysiol.* 88(2):1073-1076.

Cantero, J.L., Atienza, M., Stickgold, R., Kahana, M.J., Madsen, J.R., Kocsis, B. (2003) "Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex", *J. Neurosci.* 23(34):10897-10903.

Caramelli, P., Robitaille, Y., Laroche-Cholette, A., Nitrini, R., Gauvreau, D., Joannette, Y., Lecours, AR. (1998) "Structural correlates of cognitive deficits in a selected group of patients with Alzheimer's disease", *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol.* 11(4):184-190.

Caro, A.A., Cederbaum, A.I. (2003) "Role of phospholipase A2 activation and calcium in CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells", *J. Biol. Chem.* 278(36):33866-33877.

Catalan, J., Moriguchi, T., Slotnick, B., Murthy, M., Greiner, R.S., Salem, N. Jr. (2002) "Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats", *Behav Neurosci* 116(6):1022-1031.

Ceballos-Picot, I., Merad-Boudia, M., Nicole, A., Thevenin, M., Hellier, G., Legrain, S., Berr, C. (1996) "Peripheral antioxidant enzyme activities and selenium in elderly subjects and in dementia of Alzheimer's type--place of the extracellular glutathione peroxidase", *Free Radic. Biol. Med.* 20(4):579-587.

Chabot, C., Gagné, J., Giguère, C., Bernard, J., Baudry, M., Massicotte, G. (1998) "Bidirectional modulation of AMPA receptor properties by exogenous phospholipase A2 in the hippocampus", *Hippocampus* 8(3):299-309.

Chapkin, R.S., Wang, N., Fan, Y.Y., Lupton, J.R., Prior, I.A. (2008) "Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains", *Biochim. Biophys. Acta* 1778(2):466-471.

Chen, J., Zhang, Z.G., Li, Y., Wang, Y., Wang, L., Jiang, H., Zhang, C., Lu, M., Katakowski, M., Feldkamp, C.S., Chopp, M. (2003) "Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke", *Ann. Neurol.* 53:743-751.

Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S.B., Morris, R.G. (2000a) "A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease", *Nature.* 408(6815):975-979.

Chen, L., Chetkovich, D.M., Petralia, R.S., Sweeney, N.T., Kawasaki, Y., Wenthold, R.J., Brecht, D.S., Nicoll, R.A. (2000b) "Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms", *Nature* 408(6815):936-943.

Cho, C.H., St-Gelais, F., Zhang, W., Tomita, S., Howe, J.R. (2007) "Two families of TARP isoforms that have distinct effects on the kinetic properties of AMPA receptors and synaptic currents", *Neuron.* 55(6):890-904.

Choquet, D., Triller, A. (2003) "The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane", *Nat Rev Neurosci.* 4(4):251-265.

Chrysohoou, C., Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Skoumas, J., Krinos, X., Chloptsios, Y., Nikolaou, V., Stefanadis, C. (2007) "Long-term fish consumption is associated with protection against arrhythmia in healthy persons in a Mediterranean region--the ATTICA study", *Am. J. Clin. Nutr.* 85(5):1385-1391.

Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., Selkoe, D.J. (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(1):67-72.

Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., Ashe, K.H. (2005) "Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function", *Nat Neurosci.* 8(1):79-84.

Clemens, J.A., Stephenson, D.T., Smalstig, E.B., Roberts, E.F., Johnstone, E.M., Sharp, J.D., Little, S.P., Kramer, R.M. (1996) "Reactive glia express cytosolic phospholipase A2 after transient global forebrain ischemia in the rat", *Stroke.* 27(3):527-535.

Cole, G.M., Frautschy, S.A. (2006) "Docosahexaenoic acid protects from amyloid and dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model", *Nutr. Health* 18(3):249-259.

Coleman, S.K., Cai, C., Mottershead, D.G., Haapalahti, J.P., Keinänen, K. (2003) "Surface expression of GluR-D AMPA receptor is dependent on an interaction between its C-terminal domain and a 4.1 protein", *J. Neurosci.* 23(3):798-806.

Connor, W.E., Connor, S.L. (2007) "The importance of fish and docosahexaenoic acid in Alzheimer disease", *Am. J. Clin. Nutr.* 85(4):929-930.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A. (1993) "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families", *Science* 261(5123):921-923.

Craven, S.E., Brecht, D.S. (1998) "PDZ proteins organize synaptic signaling pathways", *Cell* 93(4):495-498.

Cummings, B.S. (2007) "Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs", *Biochem. Pharmacol.* 74(7):949-959.

Cummings, B.S., McHowat, J., Schnellmann, R.G. (2004) "Role of an endoplasmic reticulum Ca^{2+} -independent phospholipase A2 in cisplatin-induced renal cell apoptosis", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308(3):921-928.

Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., Mattson, M.P. (2004) "Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(7):2070-1075.

Derkach, V., Barria, A., Soderling, T.R. (1999) " Ca^{2+} /calmodulin kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:3269-3274.

Dessen, A. (2000) "Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A2", *Biochem. Biophys. Acta* 1488:40-47.

Dickson, D.W., Crystal, H.A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I., Davies, P. (1995) "Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly", *Neurobiol Aging*. 16(3):285-304.

Dickson, D.W., Lee, S.C., Mattiace, L.A., Yen, S.H., Brosnan, C. (1993) "Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease", *Glia* 7(1):75-83.

Di Rosa, G., Odrijin, T., Nixon, R.A., Arancio, O. (2002) "Calpain inhibitors: a treatment for Alzheimer's disease", *J. Mol. Neurosci.* 19(1-2):135-141.

Dodart, J.C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M., Paul, S.M. (2002) "Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model", *Nat Neurosci.* 5(5):452-457.

Dodd, P.R. (2002) "Excited to death: different ways to lose your neurons", *Biogerontology* 3(1-2):51-56.

Dong, H., O'Brien, R.J., Fung, E.T., Lanahan, A.A., Worley, P.F., Huganir, R.L. (1997) "GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors", *Nature* 386(6622):279-284.

Dorandeu, F., Pernot-Marino, I., Veyret, J., Perrichon, C., Lallement, G. (1998) "Secreted phospholipase A2-induced neurotoxicity and epileptic seizures after intracerebral administration: an unexplained heterogeneity as emphasized with paradoxin and crotoxin", *J Neurosci Res.* 54(6):848-862.

Duan, L., Gan, H., Arm, J., Remold, H.G. (2001) "Cytosolic phospholipase A2 participates with TNF-alpha in the induction of apoptosis of human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra", *J. Immunol.* 166(12):7469-7476.

Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M.N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J., Younkin, S. (1996) "Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1", *Nature.* 383(6602):710-713.

Dufner, A., Thomas, G. (1999) "Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation", *Exp. Cell Res.* 253(1):100-109.

Dunphy, J.T., Linder, M.E. (1998) "Signalling functions of protein palmitoylation", *Biochim. Biophys. Acta* 1436(1-2):245-261.

Dyall, S.C., Michael, G.J., Whelpton, R., Scott, A.G., Michael-Titus, A.T. (2007) "Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain", *Neurobiol. Aging* 28(3):424-439.

Ehlers, M.D. (2000) "Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting". *Neuron.* 28(2):511-525.

El-Husseini, Ael-D., Schnell, E., Dakoji, S., Sweeney, N., Zhou, Q., Prange, O., Gauthier-Campbell, C., Aguilera-Moreno, A., Nicoll, R.A., Bredt, D.S. (2002) "Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95", *Cell* 108(6):849-863.

El-Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A., Bredt, D.S. (2000) "PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses", *Science.* 290(5495):1364-1368.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H. (1998) "Neurogenesis in the adult human hippocampus", *Nat Med.* 4(11):1313-1317.

Esteban, J.A. (2008) "Intracellular machinery for the transport of AMPA receptors", *Br J Pharmacol.* 153 Suppl 1:S35-43.

Esteban, J.A., Shi, S.-H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R.L., Malinow, R. (2003) "PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity", *Nat. Neurosci.* 6(2):136-143.

Fan, Q.W., Yu, W., Gong, J.S., Zou, K., Sawamura, N., Senda, T., Yanagisawa, K., Michikawa, M. (2002) "Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons", *J. Neurochem.* 80:178-190.

Fan, Q.W., Yu, W., Senda, T., Yanagisawa, K., Michikawa, M. (2001) "Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons", *J. Neurochem.* 76:391-400.

Farooqui, A.A., Horrocks, L.A., Farooqui, T. (2007a) "Modulation of inflammation in brain: a matter of fat", *J. Neurochem.* 101(3):577-599.

Farooqui, A.A., Ong, W.Y., Horrocks, L.A., Chen, P., Farooqui, T. (2007b) "Comparison of biochemical effects of statins and fish oil in brain: the battle of the titans", *Brain Res Rev.* 56(2):443-471.

Farooqui, A.A., Horrock, L.A. (2004) "Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function", *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70:361-372.

Farooqui, A.A., Litsky, M.L., Farooqui, T., Horrocks, L.A. (1999) "Inhibitors of intracellular phospholipase A2 activity: their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders", *Brain Res. Bull.* 49(3):139-153.

Favreliere, S., Perault, M.C., Huguet, F., De Javel, D., Bertrand, N., Piriou, A., Durand, G. (2003) "DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus", *Neurobiol. Aging* 24:233–243.

Fedorova, I., Salem, N. Jr. (2006), "Omega-3 fatty acids and rodent behavior", *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75(4-5):271-289.

Fischer, K., Chatterjee, D., Torrelles, J., Brennan, P.J., Kaufmann, S.H., Schaible, U.E. (2001) "Mycobacterial lysocardiolipin is exported from phagosomes upon cleavage of cardiolipin by a macrophage-derived lysosomal phospholipase A2", *J. Immunol.* 167(4):2187-2192.

Fitzjohn, S.M., Morton, R.A., Kuenzi, F., Rosahl, T.W., Shearman, M., Lewis, H., Smith, D., Reynolds, D.S., Davies, C.H., Collingridge, G.L., Seabrook, G.R. (2001) "Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein", *J. Neurosci.* 21(13):4691-4698.

Förstl, H., Kurz, A. (1999) "Clinical features of Alzheimer's disease". *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 249 (6):288–290.

Freund-Levi, Y., Eriksdotter-Jönhagen, M., Cederholm, T., Basun, H., Faxén-Ingving, G., Garlind, A., Vedin, I., Vessby, B., Wahlund, L.O., Palmblad, J. (2006) "Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial", *Arch. Neurol.* 63(10):1402-1408.

Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (2000) "Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments", *Biochim. Biophys. Acta* 1502(1):122-132.

Fuentes, L., Pérez, R., Nieto, M.L., Balsinde, J., Balboa, M.A. (2003) "Bromo-enol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A2", *J. Biol. Chem.* 278(45):44683-44690.

Fujita, S., Ikegaya, Y., Nishikawa, M., Nishiyama, N., Matsuki, N. (2001) "Docosahexaenoic acid improves long-term potentiation attenuated by phospholipase A(2) inhibitor in rat hippocampal slices", *Br. J. Pharmacol.* 132(7):1417-1422.

Fujita, S., Ikegaya, Y., Nishiyama, N., Matsuki, N. (2000) "Ca²⁺ independent phospholipase A2 inhibitor impairs spatial memory of mice", *Japanese J. Pharmacology* 83:277-278.

Fukata, Y., Tzingounis, A.V., Trinidad, J.C., Fukata, M., Burlingame, A.L., Nicoll, R.A., Brecht, D.S. (2005) "Molecular constituents of neuronal AMPA receptors", *J Cell Biol.* 169(3):399-404.

Furuta, A., Price, D.L., Pardo, C.A., Troncoso, J.C., Xu, Z.S., Taniguchi, N., Martin, L.J. (1995) "Localization of superoxide dismutases in Alzheimer's disease and Down's syndrome neocortex and hippocampus", *Am. J. Pathol.* 146(2):357-367.

Gabryel, B., Chalimoniuk, M., Stolecka, A., Langfort, J. (2007) "Activation of cPLA2 and sPLA2 in astrocytes exposed to simulated ischemia in vitro", *Cell. Biol. Int.* 31(9):958-965.

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., et al. (1995) "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein", *Nature.* 373(6514):523-527.

Gamoh, S., Hashimoto, M., Sugioka, K., Shahdat Hossain, M., Hata, N., Misawa, Y., Masumura, S. (1999) "Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats", *Neuroscience* 93(1):237-241.

Gao, C., Sun, X., Wolf, M.E. (2006) "Activation of D1 dopamine receptors increases surface expression of AMPA receptors and facilitates their synaptic incorporation in cultured hippocampal neurons", *J Neurochem.* 98(5):1664-1677.

Gattaz, W.F., Cairns, N.J., Levy, R., Förstl, H., Braus, D.F., Maras, A. (1996) "Decreased phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease", *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 246(3):129-131.

Gaudreault, S.B., Chabot, C., Gratton, J.P., Poirier, J. (2004) "The caveolin scaffolding domain modifies 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor binding properties by inhibiting phospholipase A2 activity", *J. Biol. Chem.* 279(1):356-362.

Gerges, N.Z., Backos, D.S., Esteban, J.A. (2004) "Local control of AMPA receptor trafficking at the postsynaptic terminal by a small GTPase of the Rab family", *J Biol Chem.* 279(42):43870-43878.

Geula, C., Wu, C.K., Saroff, D., Lorenzo, A., Yuan, M., Yankner, B.A. (1998) "Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity", *Nat. Med.* 4(7):827-831.

Giannakopoulos, P., Gold, G., Duc, M., Michel, J.P., Hof, P.R., Bouras, C. (2000) "Impaired processing of famous faces in Alzheimer's disease is related to neurofibrillary tangle densities in the prefrontal and anterior cingulate cortex", *Dement Geriatr Cogn Disord.* 11(6):336-341.

Glantz, L.A., Gilmore, J.H., Lieberman, J.A., Jarskog, L.F. (2006) "Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia", *Schizophr Res.* 81(1):47-63.

Glenner, G.G., 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(3):885-890.

Glomset, J.A. (2006) "Role of docosahexaenoic acid in neuronal plasma membranes", *Sci STKE* 321:pe6.

Godbout, J.P., Chen, J., Abraham, J., Richwine, A.F., Berg, B.M., Kelley, K.W., Johnson, R.W. (2005) "Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system", *FASEB J.* 19(10):1329-1331.

Goldstein, L.S., Yang, Z. (2000) "Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins", *Annu Rev Neurosci.* 23:39-71.

Gomes, A.R., Correia, S.S., Esteban, J.A., Duarte, C.B., Carvalho, A.L. (2007) "PKC anchoring to GluR4 AMPA receptor subunit modulates PKC-driven receptor phosphorylation and surface expression", *Traffic.* 8(3):259-269.

Gomes, A.R., Cunha, P., Nuriya, M., Faro, C.J., Haganir, R.L., Pires, E.V., Carvalho, A.L., Duarte, C.B. (2004) Metabotropic glutamate and dopamine receptors co-regulate AMPA receptor activity through PKA in cultured chick retinal neurones: effect on GluR4 phosphorylation and surface expression. *J Neurochem.* 90(3):673-682.

Gordon, M.N., King, D.L., Diamond, D.M., Jantzen, P.T., Boyett, K.V., Hope, C.E., Hatcher, J.M., DiCarlo, G., Gottschall, W.P., Morgan, D., Arendash, G.W. (2001) "Correlation between cognitive deficits and Abeta deposits in transgenic APP+PS1 mice", *Neurobiol Aging.* 22(3):377-385.

Götz, J., Schild, A., Hoernkli, F., Pennanen, L. (2004a) "Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models", *Int. J. Dev. Neurosci.* 22(7):453-465.

Götz, J., Streffer, J.R., David, D., Schild, A., Hoernkli, F., Pennanen, L., Kurosinski, P., Chen, F. (2004b) "Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy", *Mol. Psychiatry* 9(7):664-683.

Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., Nitsch, R.M. (2001) "Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils", *Science.* 293(5534):1491-1495.

Gould, E., Reeves, A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C.G., Fuchs, E. (1999a). "Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(9):5263-5267.

Green, K.N., Martinez-Coria, H., Khashwji, H., Hall, E.B., Yurko-Mauro, K.A., Ellis, L., LaFerla, F.M. (2007a) "Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels", *J. Neurosci.* 27(16):4385-4395.

Green, K.N., Smith, I.F., Laferla, F.M. (2007b) "Role of calcium in the pathogenesis of Alzheimer's disease and transgenic models", *Subcell. Biochem.* 45:507-521.

Greenamyre, J.T., Young, A.B. (1989) "Excitatory amino acids and Alzheimer's disease", *Neurobiol. Aging* 10(5):593-602.

Greenamyre, J.T., Maragos, W.F., Albin, R.L., Penney, J.B., Young, A.B. (1988) "Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease", *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 12(4):421-430.

Greenamyre, J.T., Penney, J.B., D'Amato, C.J., Young, A.B. (1987) "Dementia of the Alzheimer's type: changes in hippocampal L-[3H]glutamate binding", *J. Neurochem.* 48(2):543-551.

Greger, I.H., Ziff, E.B., Penn, A.C. (2007) "Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly", *Trends Neurosci.* 30(8):407-416.

Greger, I.H., Khatri, L., Kong, X., Ziff, E.B. (2003) "AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing", *Neuron.* 40(4):763-774.

Greger, I.H., Khatri, L., Ziff, E.B. (2002) "RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum", *Neuron.* 34(5):759-772.

Griffin, W.S. (2006) "Inflammation and neurodegenerative diseases", *Am. J. Clin. Nutr.* 83(2):470S-474S.

Groc, L., Heine, M., Cognet, L., Brickley, K., Stephenson, F.A., Lounis, B., Choquet, D. (2004) "Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors". *Nat Neurosci.* 7(7):695-696.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L.I. (1986) "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83(13):4913-4917.

Grundke-Iqbal, I., Johnson, A.B., Terry, R.D., Wisniewski, H.M., Iqbal, K. (1979) "Alzheimer neurofibrillary tangles: antiserum and immunohistological staining", *Ann Neurol.* 6(6):532-537.

Gsell, W., Conrad, R., Hickethier, M., Sofic, E., Frölich, L., Wichart, I., Jellinger, K., Moll, G., Ransmayr, G., Beckmann, H. (1995) "Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type", *J. Neurochem.* 64(3):1216-1223.

Guo, J.P., Arai, T., Miklossy, J., McGeer, P.L. (2006) "Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(6):1953-1958.

Guo, Q., Fu, W., Sopher, B.L., Miller, M.W., Ware, C.B., Martin, G.M., Mattson, M.P. (1999) "Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice", *Nat. Med.* 5(1):101-106.

Hall, R.A., Kessler, M., Lynch, G. (1992) "Evidence that high- and low-affinity DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) binding sites reflect membrane-dependent states of a single receptor", *J Neurochem.* 59(6):1997-2004.

Hall, R.A., Hansen, A., Andersen, P.H., Soderling, T.R. (1997) "Surface expression of the AMPA receptor subunits GluR1, GluR2, and GluR4 in stably transfected baby hamster kidney cells", *J. Neurochem.* 68(2):625-630.

Harman, D. (2006) "Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging", *Ann. NY Acad. Sci.* 1067:454-460.

Hartmann, T., Kuchenbecker, J., Grimm, M.O. (2007) "Alzheimer's disease: the lipid connection", *J. Neurochem.* 103 Suppl 1:159-170.

Hashimoto, M., Hossain, S., Shido, O. (2006a) "Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity", *Mol. Cell. Biochem.* 293(1-2):1-8.

Hashimoto, M., Hossain, S., Shimada, T., Shido, O. (2006b) "Docosahexaenoic acid-induced protective effect against impaired learning in amyloid beta-infused rats is associated with increased synaptosomal membrane fluidity", *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33(10):934-939.

Hashimoto, M., Hossain, S., Agdul, H., Shido, O. (2005) "Docosahexaenoic acid-induced amelioration on impairment of memory learning in amyloid beta-infused rats relates to the decreases of amyloid beta and cholesterol levels in detergent-insoluble membrane fractions", *Biochim Biophys Acta.* 1738(1-3):91-98.

Hashioka, S., Miklossy, J., Schwab, C., Klegeris, A., McGeer, P.L. (2008) "Adhesion of exogenous human microglia and THP-1 cells to amyloid plaques of postmortem Alzheimer's disease brain", *J Alzheimers Dis.* 14(3):345-352.

Hayashi, T., Rumbaugh, G., Huganir, R.L. (2005) "Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites", *Neuron* 47(5):709-723.

Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., Malinow, R. (2000) "Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction", *Science.* 287(5461):2262-2267.

Hebb, D.O. (1949) "The organization of behaviour", New York: John Wiley.

Henley, J.M. (1995) "Subcellular localization and molecular pharmacology of distinct populations of [3H]-AMPA binding sites in rat hippocampus", *Br. J. Pharmacol.* 115:295-301.

Hennegriff, M., Arai, A., Kessler, M., Vanderklish, P., Mutneja, M.S., Rogers, G., Neve, R.L., Lynch, G. (1997) "Stable expression of recombinant AMPA

receptor subunits: binding affinities and effects of allosteric modulators”, *J Neurochem.* 68(6):2424-2434.

Henry-Feugeas, M.C. (2007) “MRI of the Alzheimer syndrome”, *J. Neuroradiol.* 34(4):220-227.

Hering, H., Lin, C.C., Sheng, M. (2003) “Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability”, *J. Neurosci.* 23(8):3262-3271.

Higuchi, M., Iwata, N., Saido, T.C. (2005) “Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions”, *Biochim. Biophys. Acta* 1751(1):60-67.

Hirabayashi, T., Murayama, T., Shimizu, T. (2004) “Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂”, *Biol. Pharm. Bull.* 27:1168–1173.

Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C.M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K., Duff, K. (1998) “Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes”, *Nat Med.* 4(1):97-100.

Hollmann, M., Heinemann, S. (1994) “Cloned glutamate receptors”, *Annu Rev Neurosci.* 17:31-108.

Hollmann, M., Maron, C., Heinemann, S. (1994) “N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1”, *Neuron.* 13(6):1331-1343.

Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S. (1991) “Ca²⁺ permeability of KA/AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition”, *Science* 252:851–853.

Holman, D., Feligioni, M., Henley, J.M. (2007) "Differential redistribution of native AMPA receptor complexes following LTD induction in acute hippocampal slices", *Neuropharmacology* 99(2):549-560.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G. (1996) "Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice", *Science*. 274(5284):99-102.

Huang, T., Zandi, P., Tucker, K., Fitzpatrick, A., Kuller, L., Fried, L., Burke, G., Carlson, M. (2005) "Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without *APOE* ϵ 4", *Neurology* 65:1409–1414.

Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R. (2004) "Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease", *Neurochem Int.* 45(5):583-595.

Ikonomovic, M.D., Sheffield, R., Armstrong, D.M. (1995a) "AMPA-selective glutamate receptor subtype immunoreactivity in the aged human hippocampal formation", *J Comp Neurol.* 359(2):239-252.

Ikonomovic, M.D., Sheffield, R., Armstrong, D.M. (1995b) "AMPA-selective glutamate receptor subtype immunoreactivity in the hippocampal formation of patients with Alzheimer's disease", *Hippocampus.* 5(5):469-486.

Iqbal, K., Alonso, A.C., Gong, C.X., Khatoon, S., Pei, J.J., Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I. (1998) "Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles", *J Neural Transm* 53:169-180.

Irizarry, M.C., McNamara, M., Fedorchak, K., Hsiao, K., Hyman, B.T. (1997a) "APP^{Sw} transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1", *J Neuropathol Exp Neurol.* 56(9):965-973.

Irizarry, M.C., Soriano, F., McNamara, M., Page, K.J., Schenk, D., Games, D., Hyman, B.T. (1997b) "Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse", *J Neurosci.* 17(18):7053-7059.

Isaac, J.T. (2003) "Postsynaptic silent synapses: evidence and mechanisms", *Neuropharmacology*. 45(4):450-460.

Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P., Westaway, D. (2000) "A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease", *Nature*. 408(6815):979-982.

Jarskog LF, Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA. (2005) "Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia", *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29(5):846-858.

Jellinger, K., Paulus, W., Grundke-Iqbal, I., Riederer, P., Youdim, M.B. (1990) "Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases", *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 2(4):327-340.

Jenkins, C.M., Han, X., Mancuso, D.J., Gross, R.W. (2002) "Identification of calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) beta, and not iPLA2gamma, as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10 smooth muscle cells. Enantioselective mechanism-based discrimination of mammalian iPLA2s", *J. Biol. Chem.* 277(36):32807-32814.

Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., Drachman, D.A. (2000) "Statins and the risk of dementia", *Lancet* 356(9242):1627-1631.

Johnson, W.G. (2000) "Late-onset neurodegenerative diseases--the role of protein insolubility", *J Anat.* 196 (Pt 4):609-616.

Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Garner, C.C., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., Malenka, R.C. (2004) "Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors", *Nat Neurosci.* 7(3):244-253.

Jupp, O.J., Vandenabeele, P., MacEwan, D.J. (2003) "Distinct regulation of cytosolic phospholipase A2 phosphorylation, translocation, proteolysis and activation by tumour necrosis factor-receptor subtypes", *Biochem. J.* 374(Pt 2):453-461.

Kalehua, A.N., Taub, D.D., Baskar, P.V., Hengemihle, J., Muñoz, J., Trambadia, M., Speer, D.L., De Simoni, M.G., Ingram, D.K. (2000) "Aged mice exhibit greater mortality concomitant to increased brain and plasma TNF-alpha levels following intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide", *Gerontology* 46(3):115-128.

Kalmijn, S., van Boxtel, M., Ocke, M., Verschuren, W., Dromhout, D., Launer, L. (2004) "Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age", *Neurology* 62:275-280.

Kalmijn, S., Launer, L.J., Ott, A., Witteman, J.C., Hofman, A., Breteler, M.M. (1997) "Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study", *Ann. Neurol.* 42(5):776-782.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (1991) "Principles of Neural Science", 3th ed. McGraw-Hill, New York.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H. (1982) "Molecular biology of learning: modulation of transmitter release", *Science* 218(4571):433-443.

Kandel, E.R. (1981) "Calcium and the control of synaptic strength by learning", *Nature* 293(5835):697-700.

Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Müller-Hill, B. (1987) "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor", *Nature* 325(6106):733-736.

Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (1994) "Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains", *FEBS Lett.* 351(1):80-84.

Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (1992) "Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein", *J Neurochem.* 59(2):750-753.

Kato, A.S., Zhou, W., Milstein, A.D., Knierman, M.D., Siuda, E.R., Dotzlaf, J.E., Yu, H., Hale, J.E., Nisenbaum, E.S., Nicoll, R.A., Bredt, D.S. (2007) "New transmembrane AMPA receptor regulatory protein isoform, gamma-7, differentially regulates AMPA receptors", *J Neurosci.* 27(18):4969-4977.

Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T.A., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1990) "A family of AMPA-selective glutamate receptors", *Science.* 249(4968):556-560.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. (1997) "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment", *Nature* 386(6624):493-495.

Kessler, M., Suzuki, E., Montgomery, K., Arai, A.C. (2008) "Physiological significance of high- and low-affinity agonist binding to neuronal and recombinant AMPA receptors", *Neurochem Int.* 52(8):1383-1393.

Kim, J., Onstead, L., Randle, S., Price, R., Smithson, L., Zwizinski, C., Dickson, D.W., Golde, T., McGowan, E. (2007) "Abeta40 inhibits amyloid deposition in vivo", *J. Neurosci.* 27(3):627-633.

Kinsey, G.R., Cummings, B.S., Beckett, C.S., Saavedra, G., Zhang, W., McHowat, J., Schnellmann, R.G. (2005) "Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA2", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327(1):287-293.

Kinsey, G.R., McHowat, J., Beckett, C.S., Schnellmann, R.G. (2007) "Identification of calcium-independent phospholipase A2gamma in mitochondria and its role in mitochondrial oxidative stress", *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292(2):F853-860.

Kinsey, G.R., Blum, J.L., Covington, M.D., Cummings, B.S., McHowat, J., Schnellmann, R.G. (2008) "Decreased iPLA2gamma expression induces lipid peroxidation, cell death, and sensitizes cells to oxidant-induced apoptosis", *J. Lipid Res.* 49(7):1477-1487.

Kivipelto, M., Helkala, E.L., Hänninen, T., Laakso, M.P., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., Nissinen, A. (2001) "Midlife

vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study", *Neurology* 56(12):1683-1689.

Klein, M., Shapiro, E., Kandel, E.R. (1980) "Synaptic plasticity and the modulation of the Ca^{2+} current", *J. Exp. Biol.* 89:117-157.

Ko, J., Kim, S., Valtschanoff, J.G., Shin, H., Lee, J.R., Sheng, M., Premont, R.T., Weinberg, R.J., Kim, E. (2003) "Interaction between liprin-alpha and GIT1 is required for AMPA receptor targeting", *J. Neurosci.* 23(5):1667-1677.

Koh, J.Y., Yang, L.L., Cotman, C.W. (1990) "Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage", *Brain Res.* 533(2):315-320.

Kohama, S.G., Urbanski, H.F. (1997) "Distribution of glutamate receptor subunits in the primate temporal cortex and hippocampus", *Brain Res.* 769(1):44-56.

Kotani, S., Sakaguchi, E., Warashina, S., Matsukawa, N., Ishikura, Y., Kiso, Y., Sakakibara, M., Yoshimoto, T., Guo, J., Yamashima, T. (2006) "Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction", *Neurosci. Res.* 56(2):159-164.

Kotilinek, L.A., Bacskai, B., Westerman, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Hyman, B.T., Younkin, S., Ashe, K.H. (2002) "Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease", *J Neurosci.* 22(15):6331-6335.

Kott, S., Werner, M., Körber, C., Hollmann, M. (2007) "Electrophysiological properties of AMPA receptors are differentially modulated depending on the associated member of the TARP family", *J Neurosci.* 27(14):3780-3789.

Krystal, J.H., Karper, L.P., Seibyl, J.P., Freeman, G.K., Delaney, R., Bremner, J.D., Heninger, G.R., Bowers, M.B. Jr, Charney, D.S. (1994) "Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses", *Arch Gen Psychiatry.* 51(3):199-214.

Kudo, I., Murakami, M. (2002) "Phospholipase A2 enzymes", Prostaglandins Other Lipid. Mediat. 68-69:3-58.

Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. (1996) "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation", J. Neurosci. 16(6):2027-2033.

Kullmann, D.M. (2003) "Silent synapses: what are they telling us about long-term potentiation?", Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 358(1432):727-33.

Kumar-Singh, S., Theuns, J., Van Broeck, B., Pirici, D., Vennekens, K., Corsmit, E., Cruts, M., Dermaut, B., Wang, R., Van Broeckhoven, C. (2006) "Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40", Hum. Mutat. 27(7):686-695.

Kuusinen, A., Abele, R., Madden, D.R., Keinänen, K. (1999) "Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD", J Biol Chem. 274(41):28937-28943.

Kwak, S., Kawahara, Y. (2005) "Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis", J. Mol. Med. 83(2):110-120.

Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature 227:680-685.

LaFerla, F.M., Kitazawa, M. (2005) "Antipodal effects of p25 on synaptic plasticity, learning, and memory--too much of a good thing is bad", Neuron 48(5):711-712.

Lamprecht, R., LeDoux, J. (2004) "Structural plasticity and memory", Nat. Rev. Neurosci. 5(1):45-54.

Langsjoen, P.H., Langsjoen, J.O., Langsjoen, A.M., Lucas, L.A. (2005) "Treatment of statin adverse effects with supplemental Coenzyme Q₁₀ and statin drug discontinuation", *BioFactors* 25:147–152.

Lauterborn, J.C., Lynch, G., Vanderklish, P., Arai, A., Gall, C.M. (2000) "Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons", *J. Neurosci.* 20(1):8-21.

Lee, C., Park, D.W., Lee, J., Lee, T.I., Kim, Y.J., Lee, Y.S., Baek, S.H. (2006) "Secretory phospholipase A2 induces apoptosis through TNF- α and cytochrome c-mediated caspase cascade in murine macrophage RAW 264.7 cells", *Eur. J. Pharmacol.* 536(1-2):47-53.

Lee, H.K. (2006) "Synaptic plasticity and phosphorylation", *Pharmacol. Ther.* 112(3):810-832.

Lee, H.K., Takamiya, K., Han, J.S., Man, H., Kim, C.H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., Gallagher, M., Huganir, R.L. (2003a) "Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory", *Cell* 112 (5):631-643.

Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., Huganir, R.L. (2003b) "Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity", *Nature* 405 (6789):955-959.

Letts, V.A., Felix, R., Biddlecome, G.H., Arikath, J., Mahaffey, C.L., Valenzuela, A., Bartlett, F.S. 2nd, Mori, Y., Campbell, K.P., Frankel, W.N. (1998) "The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit", *Nat. Genet.* 19(4):340-347.

Leuschner, W.D., Hoch, W. (1999) "Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their n-terminal domains", *J Biol Chem.* 274(24):16907-16916.

Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M.,

McGowan, E. (2001) "Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP", *Science*. 293(5534):1487-1491.

Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W.L., Yen, S.H., Dickson, D.W., Davies, P., Hutton, M. (2000) "Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein", *Nat. Genet.* 25(4):402-405.

Li, X., Alafuzoff, I., Soininen, H., Winblad, B., Pei, J.J. (2005) "Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain", *FEBS J.* 272(16):4211-4220.

Lim, G.P., Calon, F., Morihara, T., Yang, F., Teter, B., Ubeda, O., Salem, N. Jr, Frautschy, S.A., Cole, G.M. (2005) "A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model", *J. Neurosci.* 25(12):3032-3040.

Ling, D.S., Benardo, L.S., Sacktor, T.C. (2006) "Protein kinase Mzeta enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors", *Hippocampus.* 16(5):443-452.

Lingameneni, R., Vysotskaya, T.N., Duch, D.S., Hemmings, H.C. Jr. (2000) "Inhibition of voltage-dependent sodium channels by Ro 31-8220, a 'specific' protein kinase C inhibitor", *FEBS Lett.* 473(2):265-268.

Lisé, M.F., Wong, T.P., Trinh, A., Hines, R.M., Liu, L., Kang, R., Hines, D.J., Lu, J., Goldenring, J.R., Wang, Y.T., El-Husseini, A. (2006) "Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking", *J Biol Chem.* 281(6):3669-3678.

Lisman, J. (2003) "Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis", *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358(1432):829-842.

Lisman, J.E., Zhabotinsky, A.M. (2001) "A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly", *Neuron*. 31(2):191-201.

Liu, P., Smith, P.F., Darlington, C.L. (2008) Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: Regional variations and effects of aging. *Synapse*. 62(11):834-841.

Liu, J., Takano, T., Papillon, J., Khadir, A., Cybulsky, A.V. (2001) "Cytosolic phospholipase A2-alpha associates with plasma membrane, endoplasmic reticulum and nuclear membrane in glomerular epithelial cells", *Biochem. J.* 353(Pt 1):79-90.

Lopez-Picon, F.R., Kukko-Lukjanov, T.K., Holopainen, I.E. (2006) "The calpain inhibitor MDL-28170 and the AMPA/KA receptor antagonist CNQX inhibit neurofilament degradation and enhance neuronal survival in kainic acid-treated hippocampal slice cultures", *Eur. J. Neurosci.* 23(10):2686-2694.

Lucas, S.M., Rothwell, N.J., Gibson, R.M. (2006) "The role of inflammation in CNS injury and disease", *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1:S232-S240.

Lukiw, W.J. (2004) "Gene expression profiling in fetal, aged, and Alzheimer hippocampus: a continuum of stress-related signaling", *Neurochem. Res.* 29(6):1287-1297.

Lukiw, W.J., Bazan, N.G. (2000) "Neuroinflammatory signaling upregulation in Alzheimer's disease", *Neurochem. Res.* 25(9-10):1173-1184.

Lynch, T., Sano, M., Marder, K.S., Bell, K.L., Foster, N.L., Defendini, R.F., Sima, A.A., Keohane, C., Nygaard, T.G., Fahn, S. (1994) "Clinical characteristics of a family with chromosome 17-linked disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex", *Neurology* 44(10):1878-1884.

Ma, D.W., Seo, J., Switzer, K.C., Fan, Y.Y., McMurray, D.N., Lupton, J.R., Chapkin, R.S. (2004) "n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research", *J. Nutr. Biochem.* 15(11):700-706.

Madden, D.R. (2002) "The structure and function of glutamate receptor ion channels", *Nat Rev Neurosci.* 3(2):91-101.

Maguire, E.A., Gadian, D.G., Johnsrude, I.S., Good, C.D., Ashburner, J., Frackowiak, R.S., Frith, C.D. (2000) "Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(8):4398-4403.

Mahajan, S.S., Ziff, E.B. (2007) "Novel toxicity of the unedited GluR2 AMPA receptor subunit dependent on surface trafficking and increased Ca²⁺-permeability", *Mol Cell Neurosci.* 35(3):470-481.

Malenka, R.C. (1994) "Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD", *Cell* 78(4):535-538.

Malinow R, Mainen ZF, Hayashi Y. (2000) "LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic", *Curr Opin Neurobiol.* 10(3):352-357.

Man, H.Y., Sekine-Aizawa, Y., Huganir, R.L. (2007) "Regulation of {alpha}-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(9):3579-84.

Man, H.Y., Ju, W., Ahmadian, G., Wang, Y.T. (2000) "Intracellular trafficking of AMPA receptors in synaptic plasticity", *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1526-1534.

Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (1998) "Tau in Alzheimer's disease", *Trends Cell Biol.* 8(11):425-427.

Martel, M.A., Patenaude, C., Ménard, C., Alaux, S., Cummings, B.S., Massicotte, G. (2006) "A novel role for calcium-independent phospholipase A in alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate receptor regulation during long-term potentiation", *Eur. J. Neurosci.* 23(2):505-513.

Martin, S.J., Clark, R.E. (2007) "The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems", *Cell. Mol. Life Sci.* 64(4):401-431.

Masliah, E., Alford, M., Mallory, M., Rockenstein, E., Moechars, D., Van Leuven, F. (2000) "Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice", *Exp. Neurol.* 163(2):381-387.

Massicotte, G. (2000) "Modification of glutamate receptors by phospholipase A2: its role in adaptive neural plasticity", *Cell. Mol. Life Sci.* 57(11):1542-1550.

Massicotte, G., Vanderklish, P., Lynch, G., Baudry, M. (1991) "Modulation of DL-AMPA/quisqualate receptors by phospholipase A2: a necessary step in long-term potentiation?" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88(5):1893-1897.

Massicotte, G., Baudry, M. (1990) "Modulation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA)/quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment", *Neurosci. Lett.* 118(2):245-248.

Mattiace, L.A., Davies, P., Yen, S.H., Dickson, D.W. (1990) "Microglia in cerebellar plaques in Alzheimer's disease", *Acta Neuropathol.* 80(5):493-498.

Mattson, M.P. (2003) "Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders", *Neuromolecular Med.* 3(2):65-94.

Mayorga, L.S., Colombo, M.I., Lennartz, M., Brown, E.J., Rahman, K.H., Weiss, R., Lennon, P.J., Stahl, P.D. (1993) "Inhibition of endosome fusion by phospholipase A2 (PLA2) inhibitors points to a role for PLA2 in endocytosis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:10255-10259.

McGahon, B.M., Martin, D.S., Horrobin, D.F., Lynch, M.A. (1999) "Age-related changes in synaptic function: analysis of the effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids", *Neuroscience* 94:305-314.

McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., Skipper, L., Murphy, M.P., Beard, J., Das, P., Jansen, K., Delucia, M., Lin, W.L., Dolios, G., Wang, R., Eckman, C.B., Dickson, D.W., Hutton, M., Hardy, J., Golde, T. (2005) "Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice", *Neuron.* 47(2):191-199.

McGowan, E., Eriksen, J., Hutton, M. (2004) "A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice", *Trends Genet.* 22(5):281-289.

Ménard, C., Chartier, E., Patenaude, C., Robinson, P., Cyr, M., Baudry, M., Massicotte, G. (2007) "Calcium-independent phospholipase A(2) influences AMPA-mediated toxicity of hippocampal slices by regulating the GluR1 subunit in synaptic membranes", *Hippocampus* 17(11):1109-1120.

Ménard, C., Valastro, B., Martel, M.A., Chartier, E., Marineau, A., Baudry, M., Massicotte, G. (2005a) "AMPA receptor phosphorylation is selectively regulated by constitutive phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase activities", *Hippocampus* 15(3):370-380.

Ménard, C., Patenaude, C., Massicotte, G. (2005b) "Phosphorylation of AMPA receptor subunits is differentially regulated by phospholipase A2 inhibitors", *Neurosci. Lett.* 389(1):51-56.

Ménard, C., Patenaude, C., Gagné, A.M., Massicotte, G. "AMPA receptor-mediated cell death is reduced by docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid in CA1 area of hippocampal slices cultures", *J Neurosci Res.* (*sous presse*).

Ménard, C., Liao, G., Massicotte, G., Bi, X. "Calcium independent phospholipase A₂ (iPLA₂) modulates tau phosphorylation and synthesis in hippocampal slices cultures from P301L tau transgenic mice", soumis à *Neurobiology of Aging*.

Michaelis, EK. (1998) "Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging", *Prog. Neurobiol.* 54(4):369-415.

Milner, B. (2005) "The medial temporal-lobe amnesic syndrome", *Psychiatr. Clin. North Am.* 28(3):599-611.

Milner, B. (1954) "Intellectual function of the temporal lobes", *Psychol. Bull.* 51(1):42-62.

Milstein, A.D., Zhou, W., Karimzadegan, S., Bredt, D.S., Nicoll, R.A. (2007) "TARP subtypes differentially and dose-dependently control synaptic AMPA receptor gating". *Neuron*. 55(6):905-918.

Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J., Vane, J.R. (1993) "Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(24):11693-11697.

Monyer, H., Seeburg, P.H., Wisden, W. (1991) "Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing", *Neuron*. 6(5):799-810.

Morgan, D. (2007) "Amyloid, memory and neurogenesis", *Exp. Neurol.* 205(2):330-335.

Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., Arendash, G.W. (2000) "A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease", *Nature*. 408(6815):982-985.

Morishima-Kawashima, M., Ihara, Y. (2002) "Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau", *J. Neurosci. Res.* 70(3):392-401.

Morris, R. (1984) "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat", *J. Neurosci. Methods* 11(1):47-60.

Morris, R.G., Baddeley, A.D. (1988) "Primary and working memory functioning in Alzheimer-type dementia", *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 10(2):279-296.

Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Wilson, R.S., Aggarwal, N., Schneider, J. (2003) "Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease", 60(7):940-946.

Morris, R.G., Salmon, D.P. (2007) "The centennial of Alzheimer's disease and the publication of "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" by Alois Alzheimer", *Cortex* 43(7):821-825.

Mosbacher, J., Schoepfer, R., Monyer, H., Burnashev, N., Seeburg, P.H., Ruppertsberg, J.P. (1994) "A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors", *Science*. 266(5187):1059-1062.

Murakami, M., Kudo, I. (2002) "Phospholipase A2", *J. Biochem.* 131(3):285-292.

Muralikrishna Adibhatla, R., Hatcher, J.F. (2006) "Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia", *Free Radic Biol Med.* 40(3):376-387.

Myhrer, T. (2003) "Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks", *Brain Res. Brain Res. Rev.* 41(2-3):268-287.

Nalbantoglu, J., Tirado-Santiago, G., Lahsaïni, A., Poirier, J., Goncalves, O., Verge, G., Momoli, F., Welner, S.A., Massicotte, G., Julien, J.P., Shapiro, M.L. (1997) "Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein", *Nature* 387(6632):500-505.

Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., Ikeda, K. (1991) "Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease", *Brain Res.* 541(1):163-166.

Nicoll, R.A. (2003) "Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view", *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1432):721-726.

Nikaido, T., Austin, J., Trueb, L., Hutchison, J., Rinehart, R., Stuckenbrok, H., Miles, B. (1970) "Isolation and preliminary characterization of Alzheimer plaques from presenile and senile dementia", *Trans Am Neurol Assoc.* 95:47-50.

Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., Eriksson, P.S. (1999) "Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory", *J Neurobiol.* 39(4):569-578.

Nishikawa, M., Kimura, S., Akaike, N. (1994) "Facilitatory effect of docosahexaenoic acid on N-methyl-D-aspartate response in pyramidal neurones of rat cerebral cortex", *J. Physiol.* 475(1):83-93.

Nishizaki, T., Nomura, T., Matsuoka, T., Tsujishita, Y. (1999a) "Arachidonic acid as a messenger for the expression of long-term potentiation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254(2):446-449.

Nishizaki, T., Matsuoka, T., Nomura, T., Enikolopov, G., Sumikawa, K. (1999b) "Arachidonic acid potentiates currents through Ca^{2+} -permeable AMPA receptors by interacting with a CaMKII pathway", *Brain Res. Mol. Brain Res.* 67(1):184-189.

Nukina, N., Ihara, Y. (1986) "One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein", *J. Biochem.* 99(5):1541-1544.

Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., LaFerla, F.M. (2003a) "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging.* 24(8):1063-1070.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M. (2003b) "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction", *Neuron* 39(3):409-421.

O'Keefe, J., Dostrovsky, J. (1971) "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat", *Brain Res.* 34(1):171-175.

Oksman, M., Iivonen, H., Högges, E., Amtul, Z., Penke, B., Leenders, I., Broersen, L., Lütjohann, D., Hartmann, T., Tanila, H. (2006) "Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol

containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice", *Neurobiol Dis* 23:563-572.

Olney, J.W., Newcomer, J.W., Farber, N.B. (1999) "NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia", *J Psychiatr Res.* 33(6):523-533.

Olsen, R.W., Szamraj, O., Houser, C.R. (1992) "[3H]AMPA binding to glutamate receptor subpopulations in rat brain", *Brain Res.* 402(2):243-254.

O'Neill, M.J., Bleakman, D., Zimmerman, D.M., Nisenbaum, E.S. (2004) "AMPA receptor potentiators for the treatment of CNS disorders", *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 3(3):181-194.

Ong, W.Y., Ren, M.Q., Makjanić, J., Lim, T.M., Watt, F. (1998) "A nuclear microscopic study of elemental changes in the rat hippocampus after kainate-induced neuronal injury", *J. Neurochem.* 72(4):1574-1579.

Ong, W.Y., Garey, L.J., Tan, K.K. (1996) "An immunocytochemical study of calpain II in the hippocampus of rats injected with kainate", *Exp. Brain Res.* 113(1):117-129.

Osten, P., Khatri, L., Perez, J.L., Köhr, G., Giese, G., Daly, C., Schulz, T.W., Wensky, A., Lee, L.M., Ziff, E.B. (2000) "Mutagenesis reveals a role for ABP/GRIP binding to GluR2 in synaptic surface accumulation of the AMPA receptor", *Neuron* 27(2):313-325.

Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. (1998) "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system", *Prog Neurobiol.* 54(5):581-618.

Pagliusi, S.R., Gerrard, P., Abdallah, M., Talabot, D., Catsicas, S. (1994) "Age-related changes in expression of AMPA-selective glutamate receptor subunits: is calcium-permeability altered in hippocampal neurons?", *Neuroscience.* 61(3):429-433.

Papavassiliou, A.G. (1994) "Preservation of protein phosphoryl groups in immunoprecipitation assays", *J. Immunol. Methods* 170:67-73.

Park, M., Penick, E.C., Edwards, J.G., Kauer, J.A., Ehlers, M.D. (2004) "Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP", *Science*. 305(5692):1972-1975.

Pasquier, F., Lebert, F., Lavenex, I., Guillaume, B. (1999) "The clinical picture of frontotemporal dementia: diagnosis and follow-up", *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10 Suppl 1:10-14.

Passafaro, M., Pièch, V., Sheng, M. (2001) "Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons", *Nat Neurosci.* 4(9):917-926.

Penfield, W., Milner, B. (1958) "Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone", *AMA Arch. Neurol. Psychiatry* 79(5):475-497.

Pennanen, C., Kivipelto, M., Tuomainen, S., Hartikainen, P., Hänninen, T., Laakso, M.P., Hallikainen, M., Vanhanen, M., Nissinen, A., Helkala, E.L., Vainio, P., Vanninen, R., Partanen, K., Soininen, H. (2004) "Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early AD", *Neurobiol Aging.* 25(3):303-310.

Perez, J.L., Khatri, L., Chang, C., Srivastava, S., Osten, P., Ziff, E.B. (2001) "PICK1 targets activated protein kinase Calpha to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2", *J. Neurosci.* 21(15):5417-5428.

Perkinton, M.S., Sihra, T.S., Williams, R.J. (1999) "Ca²⁺-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons", *J. Neurosci.* 19(14):5861-5874.

Peterson, C.L., Thompson, M.A., Martin, D., Nadler, J.V. (1995) "Modulation of glutamate and aspartate release from slices of hippocampal area CA1 by inhibitors of arachidonic acid metabolism", *J. Neurochem.* 64(3):1152-1160.

Petralia, R.S., Wang, Y.X., Wenthold, R.J. (2003) "Internalization at glutamatergic synapses during development", *Eur. J. Neurosci.* 18(12):3207-3217.

Petralia, R.S., Esteban, J.A., Wang, Y.X., Partridge, J.G., Zhao, H.M., Wenthold, R.J., Malinow, R. (1999) "Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses", *Nat Neurosci.* 2(1):31-36.

Pfrieger, F.W. (2003) "Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system", *Cell. Mol. Life Sci.* 60(6):1158-1171.

Phillis, J.W., O'Reagan, M.H. (2003) "The role of phospholipases, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cerebral ischemic/traumatic injuries", *Crit. Rev. Neurobiol.* 15 (1): 61-90.

Plant, K., Pelkey, K.A., Bortolotto, Z.A., Morita, D., Terashima, A., McBain, C.J., Collingridge, G.L., Isaac, J.T. (2006) "Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation", *Nat Neurosci.* 9(5):602-604.

Poirier, J. (2005) "Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease", *Neurobiol. Aging* 26(3):355-361.

Price, S.A., Fox, H., St Clair, D., Shaw, D.J. (1997) "Lack of association between schizophrenia and a polymorphism close to the cytosolic phospholipase A2 gene", *Psychiatr Genet.* 7(3):111-114.

Priel, A., Kollerker, A., Ayalon, G., Gillor, M., Osten, P., Stern-Bach, Y. (2005) "Stargazin reduces desensitization and slows deactivation of the AMPA-type glutamate receptors", *J Neurosci.* 25(10):2682-2686.

Puzzo, D., Arancio, O. (2006) "Fibrillar beta-amyloid impairs the late phase of long term potentiation", *Curr. Alzheimer Res.* 3(3):179-183.

Ramanadham, S., Yarasheski, K.E., Silva, M.J., Wohltmann, M., Novack, D.V., Christiansen, B., Tu, X., Zhang, S., Lei, X., Turk, J. (2008) "Age-related

changes in bone morphology are accelerated in group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta)-null mice", *Am. J. Pathol.* 172(4):868-881.

Ramon Y Cajal, S. (1952) "Structure and connections of neurons", *Bull. Los Angel. Neuro. Soc.* 17(1-2):5-46.

Rao, J.S., Ertley, R.N., DeMar, J.C. Jr, Rapoport, S.I., Bazinet, R.P., Lee, H.J. (2007) "Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex", *Mol Psychiatry.* 12(2):151-157.

Rauschecker, J.P. (1995) "Compensatory plasticity and sensory substitution in the cerebral cortex", *Trends Neurosci.* 18(1):36-43.

Raymond, C.R. (2007) "LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the "long" in long-term potentiation", *Trends Neurosci.* 30(4):167-175.

Riedel, G., Platt, B., Micheau, J. (2003) "Glutamate receptor function in learning and memory", *Behav Brain Res.* 140(1-2):1-47.

Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., Murri, L. (2003) "Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review", *Brain Res. Bull.* 61(1):1-24.

Rockwood, K., Kirkland, S., Hogan, D.B., MacKnight, C., Merry, H., Verreault, R., Wolfson, C., McDowell, I. (2002) "Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people", *Arch. Neurol.* 59(2):223-227.

Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., Stevens, C.F. (1998) "The tetrameric structure of a glutamate receptor channel", *Science.* 280(5369):1596-1599.

Ross, B.M., Turenne, S., Moszczynska, A., Warsh, J.J., Kish, S.J. (1999) "Differential alteration of phospholipase A2 activity in brain of patients with schizophrenia", *Brain Res.* 821:407-413.

Ross, B.M., Moszczynska, A., Erlich, J., Kish, S.J. (1998) "Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: increased lysophospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A2 activity", *J. Neurochem.* 70:786-793.

Rossor, M.N., Emson, P.C., Mountjoy, C.Q., Roth, M., Iversen, L.L. (1980) "Reduced amounts of immunoreactive somatostatin in the temporal cortex in senile dementia of Alzheimer type", *Neurosci Lett.* 20(3):373-377.

Rouach, N., Byrd, K., Petralia, R.S., Elias, G.M., Adesnik, H., Tomita, S., Karimzadegan, S., Kealey, C., Bredt, D.S., Nicoll, R.A. (2005) "TARP gamma-8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity", *Nat Neurosci.* 8(11):1525-1533.

Roy, S., Zhang, B., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. (2005) "Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases", *Acta Neuropathol. (Berl)* 109(1):5-13.

Rumbaugh, G., Sia, G.M., Garner, C.C., Huganir, R.L. (2003) "Synapse-associated protein-97 isoform-specific regulation of surface AMPA receptors and synaptic function in cultured neurons", *J. Neurosci.* 23(11):4567-4576.

Rumpel, S., LeDoux, J., Zador, A., Malinow, R. (2005) "Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning", *Science.* 308(5718):83-88.

Sandhya, T.L., Ong, W.Y., Horrocks, L.A., Farooqui, A.A. (1998) "A light and electron microscopic study of cytoplasmic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in the hippocampus after kainate lesions", *Brain Res.* 788(1-2):223-231.

Sans, N., Vissel, B., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Chang, K., Royle, G.A., Wang, C.Y., O'Gorman, S., Heinemann, S.F., Wenthold, R.J. (2003) "Aberrant formation of glutamate receptor complexes in hippocampal neurons of mice lacking the GluR2 AMPA receptor subunit", *J. Neurosci.* 23(28):9367-9373.

Sans, N., Racca, C., Petralia, R.S., Wang, Y.X., McCallum, J., Wenthold, R.J. (2001) "Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway", *J. Neurosci.* 21(19):7506-7516.

Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M., Ashe, K.H. (2005) "Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function", *Science.* 309(5733):476-481.

Schächter, F., Faure-Delanef, L., Guénot, F., Rouger, H., Froguel, P., Lesueur-Ginot, L., Cohen, D. (1994) "Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci", *Nat Genet.* 6(1):29-32.

Schaefer, E., Bongard, V., Beiser, A., Lamon-Fava, S., Robins, S., Au, R., Tucker, K., Kyle, D., Wilson, P., Wolf, P. (2006) "Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease", *Arch Neurol* 63:1545–1550.

Schaeffer, E.L., Gattaz, W.F. (2007) "Requirement of hippocampal phospholipase A2 activity for long-term memory retrieval in rats", *J. Neural Transm.* 114(3):379-385.

Schaloske, R.H., Dennis, E.A. (2006) "The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system", *Biochim. Biophys. Acta.* 1761(11):1246-1259.

Schenk, F., Morris, R.G. (1985) "Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions", *Exp. Brain Res.* 58(1):11-28.

Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Bredt, D.S., Nicoll, R.A. (2002) "Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(21):13902-13907.

Scoville, W.B., Milner, B. (1957) "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions", *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20(1):11-21.

Seleznev, K., Zhao, C., Zhang, X.H., Song, K., Ma, Z.A. (2006) "Calcium-independent phospholipase A2 localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine", *J. Biol. Chem.* 281(31):22275-22288.

Setou, M., Seog, D.H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., Hirokawa, N. (2002) "Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites", *Nature.* 417(6884):83-87.

Sharma, A.K., Rohrer, B. (2007) "Sustained elevation of intracellular cGMP causes oxidative stress triggering calpain-mediated apoptosis in photoreceptor degeneration", *Curr. Eye Res.* 32(3):259-269.

Shearman, M.S., Naor, Z., Sekiguchi, K., Kishimoto, A., Nishizuka, Y. (1989) "Selective activation of the gamma-subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites", *FEBS Lett.* 243(2):177-182.

Shearman, M.S., Naor, Z., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1987) "Differential expression of multiple protein kinase C subspecies in rat central nervous tissue", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147(3):911-919.

Shen, L., Liang, F., Walensky, L.D., Huganir, R.L. (2000) "Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4.1N-linked actin cytoskeletal association", *J. Neurosci.* 20(21):7932-7940.

Shepherd, J.D., Huganir, R.L. (2007) "The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23:613-643.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. (1995) "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease" *Nature* 375(6534):754-760.

Shetty, A.K., Turner, D.A. (1999) "Vulnerability of the dentate gyrus to aging and intracerebroventricular administration of kainic acid", *Exp. Neurol.* 158(2):491-503.

Shi, S., Hayashi, Y., Esteban, J.A., Malinow, R. (2001) "Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons", *Cell*. 105(3):331-343.

Shinzawa, K., Sumi, H., Ikawa, M., Matsuoka, Y., Okabe, M., Sakoda, S., Tsujimoto, Y. (2008) "Neuroaxonal dystrophy caused by group VIA phospholipase A2 deficiency in mice: a model of human neurodegenerative disease", *J. Neurosci.* 28(9):2212-2220.

Shinzawa, K., Tsujimoto, Y. (2003) "PLA2 activity is required for nuclear shrinkage in caspase-independent cell death", *J. Cell. Biol.* 163(6):1219-1230.

Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., Simons, K. (1998) "Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(11):6460-6464.

Simons, K., Ikonen, E. (1997) "Functional rafts in cell membranes", *Nature* 387(6633):569-572.

Smith, M.A., Kutty, R.K., Richey, P.L., Yan, S.D., Stern, D., Chader, G.J., Wiggert, B., Petersen, R.B., Perry, G. (1994) "Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease", *Am. J. Pathol.* 145(1):42-47.

Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., Dallner, G. (1991) "Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease", *Lipids* 26(6):421-425.

Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T.A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1990) "Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS", *Science*. 249(4976):1580-1585.

Song, I., Huganir, R.L. (2002) "Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity", *Trends in Neurosciences* 25:578-588.

Sparks, D.L., Sabbagh, M.N., Connor, D.J., Lopez, J., Launer, L.J., Petanceska, S., Browne, P., Wassar, D., Johnson-Traver, S., Lochhead, J., Ziolkowski, C. (2005) "Atorvastatin therapy lowers circulating cholesterol but not free radical activity in advance of identifiable clinical benefit in the treatment of mild-to-moderate AD", *Curr. Alzheimer Res.* 2:343–353.

Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Mercken, M., Sciot, R., Van Lommer, A., Loos, R., Van Leuven, F. (1999) "Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein", *Am J Pathol* 6:2153–2165.

Srivastava, S., Osten, P., Vilim, F.S., Khatri, L., Inman, G., States, B., Daly, C., DeSouza, S., Abagyan, R., Valtschanoff, J.G., Weinberg, R.J., Ziff, E.B. (1998) "Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP", *Neuron*. 21(3):581-591.

St-Gelais, F., Ménard, C., Congar, P., Trudeau, L.E., Massicotte, G. (2004) "Postsynaptic injection of calcium-independent phospholipase A2 inhibitors selectively increases AMPA receptor-mediated synaptic transmission", *Hippocampus* 14(3):319-325.

Standley, S., Irvin, N., Baudry, M. (1994) "Differential subcellular localization of two populations of glutamate/AMPA receptors in the rat telencephalon", *Neurochem Int.* 25(3):287-93.

Staneva, G., Angelova, M.I., Koumanov, K. (2004) "Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes", *Chem. Phys. Lipids* 129(1):53-62.

Steinberg, D. (2006) "Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy", *J. Lipid Res.* 47(7):1339-1351.

Stephenson, D.T., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Clemens, J.A. (1996) "Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) immunoreactivity is elevated in Alzheimer's disease brain", *Neurobiol. Dis.* 3(1):51-63.

Stone, J.M., Morrison, P.D., Pilowsky, L.S. (2007) "Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia--a synthesis and selective review", *J Psychopharmacol.* 21(4):440-452.

Stoppini, L., Buchs, P.A., Muller, D. (1991) "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue", *J. Neurosci. Methods* 37(2):173-182.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., Roses, A.D. (1993) "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(5):1977-1981.

Strokin, M., Sergeeva, M., Reiser, G. (2003) "Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca^{2+} ", *Br. J. Pharmacol.* 139(5):1014-1022.

Suzuki, T., Ito, J., Takagi, H., Saitoh, F., Nawa, H., Shimizu, H. (2001) "Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft", *Brain Res. Mol. Brain Res.* 89(1-2):20-28.

Takahashi, T., Svoboda, K., Malinow, R. (2003) "Experience strengthening transmission by driving AMPA receptors into synapses", *Science.* 299(5612):1585-1588.

Takeuchi, T., Fukumoto, Y., Harada, E. (2002) "Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat", *Behav. Brain Res.* 131(1-2):193-203.

Takeuchi, A., Irizarry, M.C., Duff, K., Saido, T.C., Hsiao Ashe, K., Hasegawa, M., Mann, D.M., Hyman, B.T., Iwatsubo, T. (2000) "Age-related amyloid beta deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid beta precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss", *Am J Pathol.* 157(1):331-339.

Talbot, K., Young, R.A., Jolly-Tornetta, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Wolf, B.A. (2000) "A frontal variant of Alzheimer's disease exhibits decreased

calcium-independent phospholipase A2 activity in the prefrontal cortex", *Neurochem. Int.* 37(1):17-31.

Tanaka, H., Grooms, S.Y., Bennett, M.V., Zukin, R.S. (2000) "The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage", *Brain Res.* 886(1-2):190-207.

Tao, R., Yu, Y., Zhang, X., Guo, Y., Shi, J., Zhang, X., Xie, L., Liu, S., Ju, G., Xu, Q., Shen, Y., Wei, J. (2005) "Cytosolic PLA2 genes possibly contribute to the etiology of schizophrenia", *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 137B(1):56-58.

Tardin, C., Cognet, L., Bats, C., Lounis, B., Choquet, D. (2003) "Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses", *EMBO J.* 22(18):4656-4665.

Thompson, P.M., Hayashi, K.M., Dutton, R.A., Chiang, M.C., Leow, A.D., Sowell, E.R., De Zubicaray, G., Becker, J.T., Lopez, O.L., Aizenstein, H.J., Toga, A.W. (2007) "Tracking Alzheimer's disease", *Ann N Y Acad Sci.* 1097:183-214.

Tomita, S., Adesnik, H., Sekiguchi, M., Zhang, W., Wada, K., Howe, J.R., Nicoll, R.A., Brecht, D.S. (2005) "Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains", *Nature.* 435(7045):1052-1058.

Tomita, S., Chen, L., Kawasaki, Y., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., Nicoll, R.A., Brecht, D.S. (2003) "Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins", *J Cell Biol.* 161(4):805-816.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4350-4354.

Trinchese, F., Liu, S., Battaglia, F., Walter, S., Mathews, P.M., Arancio, O. (2004) "Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice", *Ann. Neurol.* 55(6):801-814.

Tully, A.M., Roche, H.M., Doyle, R., Fallon, C., Bruce, I., Lawlor, B., Coakley, D., Gibney, M.J. (2003) "Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study", *Br J Nutr.* 89:483-489.

Uauy, R., Dangour, A.D. (2006) "Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids", *Nutr. Rev.* 64:S24–S33 discussion S72–91.

Uozumi, N., Shimizu, T. (2002) "Roles for cytosolic phospholipase A₂ alpha as revealed by gene-targeted mice", *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 68–69: 59-69.

Valtschanoff, J.G., Burette, A., Davare, M.A., Leonard, A.S., Hell, J.W., Weinberg, R.J. (2000) "SAP97 concentrates at the postsynaptic density in cerebral cortex", *Eur. J. Neurosci.* 12(10):3605-3614.

Van Broeckhoven, C., Backhovens, H., Cruts, M., De Winter, G., Bruylant, M., Cras, P., Martin, J.J. (1992) "Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3" *Nat. Genet.* 2(4):335-339.

van de Pol, L.A., van der Flier, W.M., Korf, E.S., Fox, N.C., Barkhof, F., Scheltens, P. (2007) "Baseline predictors of rates of hippocampal atrophy in mild cognitive impairment", *Neurology* 69(15):1491-1497.

Vandenberghe, W., Nicoll, R.A., Brecht, D.S. (2005) "Interaction with the unfolded protein response reveals a role for stargazin in biosynthetic AMPA receptor transport", *J Neurosci.* 25(5):1095-1102.

Van Hoesen, G.W., Hyman, B.T., Damasio, A.R. (1991) "Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease", *Hippocampus.* 1(1):1-8.

Van Hoesen, G.W., Hyman, B.T. (1990) "Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease", *Prog Brain Res.* 83:445-457.

von Bergen, M., Barghorn, S., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (2005) "Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure", *Biochim. Biophys. Acta* 1739(2-3):158-166.

Vornov, J.J., Tasker, R.C., Coyle, J.T. (1991) "Direct observation of the agonist-specific regional vulnerability to glutamate, NMDA, and kainate neurotoxicity in organotypic hippocampal cultures", *Exp. Neurol.* 114(1):11-22.

Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A.C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Younkin, S.G., Golde, T.E. (2002) "Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains", *Neurobiol. Dis.* 9(1):11-23.

Walsh, M.K., Lichtman, J.W. (2003) "In vivo time-lapse imaging of synaptic takeover associated with naturally occurring synapse elimination", *Neuron* 37(1):67-73.

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J. (2002) "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo", *Nature.* 416(6880):535-539.

Wang, S.C., Oelze, B., Schumacher, A. (2008) "Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease", *PLoS ONE.* 3(7):e2698.

Wang, X., Zhao, X., Mao, Z.Y., Wang, X.M., Liu, Z.L. (2003) "Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid on glutamate-induced cytotoxicity in rat hippocampal cultures", *Neuroreport* 14(18):2457-2461.

Wassall, S.R., Stillwell, W. (2008) "Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain", *Chem Phys Lipids.* 153(1):57-63.

Wassall, S.R., Brzustowicz, M.R., Shaikh, S.R., Cherezov, V., Caffrey, M., Stillwell, W. (2004) "Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation", *Chem. Phys. Lipids* 132(1):79-88.

Wenthold, R.J., Petralia, R.S., Blahos, J. II, Niedzielski, A.S. (1996) "Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons", *J. Neurosci.* 16:1982–1989.

Westerman, M.A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Carlson, G.A., Younkin, S.G., Ashe, K.H. (2002) "The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease", *J Neurosci.* 22(5):1858-1867.

Wilkins, D.J., Bliznakov, E.G. (1998) "Biochemical and clinical consequences of inhibiting Coenzyme Q10 biosynthesis by lipid-lowering HMG-CoA reductase inhibitors (statins): a critical overview", *Adv. Ther.* 15:218–228.

Wilson, R., Bate, C., Boshuizen, R., Williams, A., Brewer, J. (2007) "Squalestatin alters the intracellular trafficking of a neurotoxic prion peptide", *BMC Neurosci.* 8:99.

Wilson, D.M., Binder, L.I. (1997) "Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease", *Am J Pathol.* 150(6):2181-2195.

Winstead, M.V., Balsinde, J., Dennis, E.A. (2000) "Calcium-independent phospholipase A2 structure and function", *Biochem. Biophys. Acta* 1488:28-39.

Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y., Gertz, H.N., Xuereb, J.H., Paykel, E.S., Brayne, C., Huppert, F.A., Mukaetova-Ladinska, E.B., Mena, R., et al. (1995) "Quantitative analysis of tau protein in paired helical filament preparations: implications for the role of tau protein phosphorylation in PHF assembly in Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging.* 16(3):409-431.

Wischik, C.M., Novak, M., Thøgersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., Klug, A. (1988) "Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(12):4506-4510.

Wolf, M.J., Izumi, Y., Zorumski, C.F., Gross, R.W. (1995) "Long-term potentiation requires activation of calcium-independent phospholipase A2", *FEBS Lett.* 377:358-362.

Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., Siegel, G. (2000) "Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors", *Arch. Neurol.* 57(10):1439-1443.

Wood, W.G., Schroeder, F., Igbavboa, U., Avdulov, N.A., Chochina, S.V. (2002) "Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides", *Neurobiol. Aging* 23(5):685-694.

Wu, H.Y., Tomizawa, K., Matsui, H. (2007) "Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder", *Acta Med. Okayama* 61(3):123-137.

Wu, A., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F. (2004) "Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats", *J Neurotrauma* 21(10):1457-1467.

Xu, J., Weng, Y.I., Simonyi, A., Krugh, B.W., Liao, Z., Weisman, G.A., Sun, G.Y. (2002) "Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA2 phosphorylation and arachadonic acid release in primary murine astrocytes", *J. Neurochem.* 83(2):259-270.

Yagi, K., Shirai, Y., Hirai, M., Sakai, N., Saito, N. (2004) "Phospholipase A2 products retain a neuron specific γ isoform of PKC on the plasma membrane through the C1 domain – a molecular mechanism for sustained enzyme activity", *Neurochem. Int.* 45:39-47.

Yang, H.C., Mosior, M., Johnson, C.A., Chen, Y., Dennis, E.A. (1999) "Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A2", *Anal. Biochem.* 269:278-288.

- Yavin, E., Brand, A., Green, P. (2002) "Docosahexaenoic acid abundance in the brain: a biodevice to combat oxidative stress", *Nutr Neurosci* 5(3):149-157.
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., Carasso, R.L., Mostofsky, D.I. (2002) "The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane", *Neurobiol Aging*. 23(5):843-853.
- Yersin, A., Hirling, H., Kasas, S., Roduit, C., Kulangara, K., Dietler, G., Lafont, F., Catsicas, S., Steiner, P. (2007) "Elastic properties of the cell surface and trafficking of single AMPA receptors in living hippocampal neurons", *Biophys. J.* 92(12):4482-4489.
- Yoon, S., Choi, J., Huh, J.W., Hwang, O., Kim, D. (2006) "Calpain activation in okadaic-acid-induced neurodegeneration", *Neuroreport* 17(7):689-692.
- Youdim, K.A., Martin, A., Joseph, J.A. (2000) "Essential fatty acids and the brain: possible health implications", *Int. J. Dev. Neurosci.* 18(4-5):383-399.
- Young, C., Gean, P.W., Chiou, L.C., Shen, Y.Z. (2000) "Docosahexaenoic acid inhibits synaptic transmission and epileptiform activity in the rat hippocampus", *Synapse* 37(2):90-94.
- Young, C., Gean, P.W., Wu, S.P., Lin, C.H., Shen, Y.Z. (1998) "Cancellation of low-frequency stimulation-induced long-term depression by docosahexaenoic acid in the rat hippocampus", *Neurosci. Lett.* 247(2-3):198-200.
- Yuen, E.Y., Liu, W., Yan, Z. (2007) "The phosphorylation state of GluR1 subunits determines the susceptibility of AMPA receptors to calpain cleavage", *J. Biol. Chem.* 282(22):16434-16440.
- Zacco, A., Togo, J., Spence, K., Ellis, A., Lloyd, D., Furlong, S., Piser, T. (2003) "3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity", *J. Neurosci.* 23:11104-11111.

Zerial, M., McBride, H. (2001) "Rab proteins as membrane organizers", *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2):107-117.

Zhang, C., McNeil, E., Dressler, L., Siman, R. (2007) "Long-lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease", *Exp. Neurol.* 204(1):77-87.

Zhang, B., Higuchi, M., Yoshiyama, Y., Ishihara, T., Forman, M.S., Martinez, D., Joyce, S., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. (2004) "Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy", *J Neurosci.* 24(19):4657-4667.

Zhao, X., Wang, D., Zhao, Z., Xiao, Y., Sengupta, S., Xiao, Y., Zhang, R., Lauber, K., Wesselborg, S., Feng, L., Rose, T.M., Shen, Y., Zhang, J., Prestwich, G., Xu, Y. (2006) "Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A2 enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells", *J. Biol. Chem.* 281(39):29357-29368.

Zhu, J.J., Esteban, J.A., Hayashi, Y., Malinow, R. (2000) "Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity", *Nat Neurosci.* 3(11):1098-106.

Ziff, E.B. (2007) "TARPs and the AMPA receptor trafficking paradox", *Neuron.* 53(5):627-633.

Zimmer, J., Kristensen, B.W., Jakobsen, B., Noraberg, J. (2000) "Excitatory amino acid neurotoxicity and modulation of glutamate receptor expression in organotypic brain slice cultures", *Amino Acids* 19(1):7-21.