

Article de recherche | [Accès ouvert](#) | Publié : 23 juillet 2024

La plasticité de l'autophagie astrocytaire module la clairance Aβ et la fonction cognitive dans la maladie d'Alzheimer

[Su Hyun Kim](#), [Heejung Chun](#), [Yunha Kim](#), [Ye Yun Kim](#), [Parc Uiyeol](#), [Jiyeon Chu](#), [Mridula Bhalla](#), [Seung Hye Choi](#), [Ali Yousefian-Jazi](#), [Sojung Kim](#), [Seung Jae Hyeon](#), [Seung Chan Kim](#), [Yeonsoo Kim](#), [Yeon Ha Ju](#), [Seung Eun Lee](#), [Hyunbeom Lee](#), [Kyungeun Lee](#), [Soo-Jin Oh](#), [Eun Mi Hwang](#), [Junghee Lee](#) ✉, [C. Justin Lee](#) ✉ & [Hoon Ryu](#) ✉

Neurodégénérescence moléculaire **19**, Numéro d'article : 55 (2024)

5548 Accès | **1** Citation | **188** Altmétrie | [des métriques](#)

Abstract

Arrière-plan

Les astrocytes, l'une des cellules les plus résilientes du cerveau, se transforment en astrocytes réactifs en réponse à des protéines toxiques telles que la bêta-amyloïde (Aβ) dans la maladie d'Alzheimer (MA). Cependant, le mécanisme neuropathologique autonome non cellulaire médié par les astrocytes n'est pas encore entièrement compris. Notre étude visait à déterminer si le stress protéotoxique induit par Aβ affecte l'expression des gènes de l'autophagie et la modulation du flux autophagique dans les astrocytes, et si oui, comment les gènes associés à l'autophagie induite par Aβ sont impliqués. Clairance de l'Aβ dans les astrocytes d'un modèle animal de ANNONCE.

Méthodes

Le séquençage de l'ARN entier (RNA-seq) a été réalisé pour détecter les modèles d'expression génique dans les astrocytes humains traités à l'Aβ en fonction du temps. Pour vérifier le rôle de l'autophagie astrocytaire dans un modèle de souris AD, nous avons développé des AAV exprimant des shARN pour MAP1LC3B/LC3B (LC3B) et Sequestosome1 (SQSTM1) basés sur le vecteur AAV-R-CREon, qui est un système de silençage génique dépendant de la recombinaison Cre.

En outre, l'effet de la surexpression spécifique des astrocytes de LC3B sur la neuropathologie chez les souris AD (APP/PS1) a été étudié.

Télécharger le PDF ↓

Des altérations neuropathologiques de souris AD présentant un dysfonctionnement de l'autophagie astrocytaire ont été observées par microscopie confocale et au microscope électronique à transmission (TEM). Les changements comportementaux des souris ont été examinés au moyen d'un nouveau test de reconnaissance d'objets (NOR) et d'un nouveau test de reconnaissance de lieu d'objet (NOPR).

Résultats

Nous montrons ici que les astrocytes, contrairement aux neurones, subissent des modifications plastiques dans les processus autophagiques pour éliminer l'Aβ. Aβ induit de manière transitoire l'expression du gène LC3B et active une transcription prolongée du gène SQSTM1. L'autophagie astrocytaire induite par l'Aβ accélère le cycle de l'urée et la voie de dégradation de la putrescine. L'inhibition pharmacologique de l'autophagie exacerbe le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydatif dans les astrocytes. L'inactivation spécifique des astrocytes de LC3B et SQSTM1 augmente de manière significative la formation de plaques Aβ et les astrocytes GFAP-positifs chez les souris APP/PS1, ainsi qu'une réduction significative du marqueur neuronal et de la fonction cognitive. En revanche, la surexpression spécifique des astrocytes de LC3B a réduit les agrégats Aβ dans le cerveau des souris APP/PS1. Une augmentation des protéines LC3B et SQSTM1 est constatée dans les astrocytes de l'hippocampe chez les patients atteints de MA.

Conclusions

Prises ensemble, nos données indiquent que la plasticité autophagique astrocytaire induite par l'Aβ est un événement cellulaire important pour moduler la clairance de l'Aβ et maintenir la fonction cognitive chez les souris AD.

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative progressive caractérisée par un dépôt excessif d'Aβ, une gliose et une neurodégénérescence dans le cerveau. Les astrocytes réactifs sont détectés dans les premières phases de la MA avant même la neurodégénérescence, dans laquelle les astrocytes sont déclenchés par des agrégats de protéines toxiques tels que l'Aβ [1, 2]. Les astrocytes réactifs changent dynamiquement en termes d'expression génique et de profils métaboliques ainsi que de propriétés fonctionnelles en fonction des états de réactivité et de progression de la maladie [2, 3, 4, 5, 6, 7]. Dans les modèles animaux de MA et in vitro, les mécanismes néfastes des astrocytes réactifs liés à la voie excessive de monoamine oxydase-B (MAO-B)/acide gamma-aminobutyrique (GABA)/H₂O₂ ont été largement rapportés [6, 7, 8]. Les astrocytes

réactifs induits par l'Aβ libèrent un gliotransmetteur inhibiteur, le GABA, entraînant une inhibition neuronale via la voie de dégradation de la putrescine médiée par la MAO-B [7]. Plus important encore, ce processus catabolique conduit à une surproduction de H₂O₂ toxique, entraînant l'apparition d'astrocytes réactifs sévères iNOS-positifs et l'induction de la neurodégénérescence [6].

Télécharger le PDF ↓

Arrière-plan

En plus du côté néfaste, le côté bénéfique des astrocytes réactifs a également été rapporté dans la MA [2, 3, 4]. Aβ est préférentiellement englouti et dégradé par les astrocytes [9, 10], accompagnés d'altérations métaboliques [11]. Dans notre étude récente, il a été démontré que les astrocytes dégradent l'Aβ en ammoniac toxique et détoxifient l'ammoniac en métabolites moins toxiques tels que l'urée et la putrescine en activant le cycle de l'urée [12]. Ainsi, le cycle de l'urée constitue une voie métabolique bénéfique dans les astrocytes réactifs. Cependant, la production excessive de putrescine devient la source de matières toxiques en activant la voie de dégradation de la putrescine, conduisant finalement à la production de sous-produits toxiques tels que le GABA/H₂O₂/ammoniac médié par MAO-B. Cette identification du cycle astrocytaire de l'urée nous a amené à postuler qu'il existe un mécanisme en amont du cycle de l'urée qui intervient dans la dégradation de l'Aβ. Notre étude récente suggère que, comparés à d'autres types de cellules cérébrales, les astrocytes présentent une forte résilience contre les toxines en raison de la présence d'un processus autophagique actif [6]. De plus, nous avons constaté que l'autophagie est essentielle à la production et à la libération de GABA induites par l'Aβ par les astrocytes réactifs [12]. Ces éléments de preuve impliquent que la voie de l'autophagie pourrait être un mécanisme en amont du cycle de l'urée astrocytaire dans la MA. L'autophagie est un processus catabolique impliqué dans la dégradation des composants cellulaires tels que des organites endommagés ou des agrégats de protéines anormaux et se produit spontanément pour maintenir l'homéostasie cellulaire [13]. Il s'agit d'un processus en plusieurs étapes caractérisé par la formation et la séquestration de novo de vésicules à double membrane, d'autophagosome et de vésicules fusionnées au lysosome, d'autolysosome. Trois principaux types d'autophagie ont été décrits dans les cellules de mammifères, notamment la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par chaperon [13, 14]. Selon ses substrats, la macroautophagie peut être divisée en agréphagie ou mitophagie [15, 16]. Il a été rapporté que le dysfonctionnement de l'autophagie est lié à diverses maladies cérébrales telles que la MA, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la maladie de Huntington (HD), la maladie de Parkinson (MP) et les accidents vasculaires

cérébraux [17, 18, 19, 20, 21]. Dans le cerveau, les astrocytes présentent un métabolisme actif avec des propriétés plus oxydatives et glycolytiques que les autres types de cellules cérébrales et

[Télécharger le PDF ↓](#)

répondent aux molécules associées à la maladie. Les astrocytes absorbent préférentiellement les protofibrilles A β et produisent de gros endosomes, mais la dégradation incomplète des protofibrilles A β conduit finalement à un dysfonctionnement lysosomal astrocytaire et à la mort des cellules neuronales. 10]. De plus, la fonction de l'autophagie astrocytaire est connue pour être essentielle à la régénération des réseaux mitochondriaux et à la viabilité des astrocytes [22]. Bien qu'il ait été rapporté que la machinerie basale de l'autophagie est indispensable à la fonction astrocytaire, le mécanisme moléculaire exact de l'autophagie astrocytaire dans le catabolisme A β et la pathogenèse de la MA n'a pas encore été entièrement élucidé.

Dans cette étude, nous avons testé de manière approfondie l'hypothèse selon laquelle l'autophagie astrocytaire est essentielle à la clairance de l'A β , au maintien de l'activité mitochondriale, à la réactivité des astrocytes et à la survie des neurones. À cet égard, nous avons réalisé notre étude pour savoir si le stress protéotoxique induit par A β affecte l'expression des gènes de l'autophagie et la modulation du flux autophagique dans les astrocytes, et si oui, comment les gènes associés à l'autophagie induite par A β sont impliqués. de modèle animal de la MA. À l'aide d'astrocytes en culture, de modèles de souris MA et d'échantillons provenant de patients humains atteints de MA, nous délimitons et établissons les mécanismes moléculaires détaillés et leur évolution dans le temps de l'autophagie astrocytaire, qui est étroitement associée aux pathologies de la MA telles que la formation de plaques A β , l'astroglie réactive et la neurodégénérescence. .

Méthodes

Animaux

Les souris APP^{swe} / PSEN1^{dE9} (APP / PS1) de fond hybride B6C3 (RRID: MMRRC_034829-JAX, du numéro de stock 004462) et les souris 5XFAD provenaient du laboratoire Jackson (États-Unis). APP/PS1 maintenu sous forme d'hémizygotes en croisant des souris transgéniques avec des souris B6C3 F1. Les génotypes ont été déterminés par PCR en utilisant les amorces suivantes : APP/PS1f – 5' AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA 3' ; APP/PS1r - 5' GCC ATG AGG GCA CTA ATC À 3'. Toutes les souris ont été maintenues sous un cycle lumière-obscurité de 12 h 12 (lumières allumées à 8 h 00) et ont accès à volonté à la nourriture et à l'eau. Le soin et la manipulation des animaux ont été effectués conformément aux directives du Comité de protection et d'utilisation des animaux et aux directives institutionnelles du KIST (Séoul 02792, Corée du Sud). Des tests d'immunohistochimie et de comportement ont été effectués sur des

souris ayant reçu une injection de virus, pour lesquelles les deux sexes de souris transgéniques âgées de 10 à 13 mois et de compagne portée de type sauvage ont été utilisés.

Télécharger le PDF ↓

Produits chimiques

Nous avons utilisé plusieurs inhibiteurs de l'autophagie : la chloroquine (CQ) (Sigma, C6628, USA), un inhibiteur de fusion des lysosomes ; l'époxysuccinyl-leucylamide (ester éthylique de 3-méthylbutane) (E64D) (Sigma, E8640, USA), un inhibiteur de protéase à cystéine ; Pepstatine A (P) (Sigma, 77 170, USA), un inhibiteur de l'aspartate protéase ; 3-méthyladénine (3-MA), un inhibiteur de la PI3-kinase (Sigma, 189 490, USA). KDS2010, un piègeur de ROS et un inhibiteur réversible de la MAO-B, a été obtenu auprès de l'Institut des sciences fondamentales (IBS, Daejeon, Corée du Sud).

Culture cellulaire

Des astrocytes corticaux primaires ont été préparés à partir de souris postnatales (P) P0 – P3 C57BL/6 comme décrit [23]. Le cortex cérébral a été disséqué, débarrassé des méninges adhérentes, haché et dissocié en suspension unicellulaire par trituration. Les cellules dissociées ont été étalées sur des plaques recouvertes de 0,1 mg/ml de poly-D-lysine (Sigma, USA). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM (Invitrogen, USA) additionné de 25 mM de glucose, 10 % de sérum de cheval inactivé par la chaleur, 10 % de FBS inactivé par la chaleur, 2 mM de glutamine et 1 000 U/ml. ⁻¹ pénicilline-streptomycine. Les cultures ont été maintenues à 37 °C dans un incubateur humidifié à 5 % de CO₂. Le troisième jour de culture, les cellules ont été vigoureusement lavées avec des pipetages répétés et le milieu a été remplacé pour éliminer les débris et autres types de cellules flottantes. La lignée cellulaire d'astrocytes humains a été achetée auprès de la société Applied Biological Materials Inc. (Immortalized Human Astrocytes, fetal-SV40; Cat. No. TO280; Canada). La lignée cellulaire d'astrocytes humains a été maintenue dans du DMEM additionné de 25 mM de glucose, 10 % de FBS inactivé par la chaleur, 2 mM de glutamine et 1 000 U/ml. ⁻¹ pénicilline-streptomycine. Les passages d'astrocytes entre 10 et 20 ont été utilisés pour des expériences in vitro.

Préparation de la forme oligomère d'A β 42

La bêta-amyloïde 1–42 (A β) ; DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA ; Abcam, USA) a été préparée comme décrit précédemment [24]. A β a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10 mM puis dilué à 1 mM dans du PBS et incubé à 37 °C pendant 1 semaine et stocké à -80 °C pour une utilisation ultérieure comme forme oligomère d'A β (oligomère A β). La forme monomère de A β (monomère A β) a été préparée en utilisant la même séquence sans processus

d'oligomérisation.

Télécharger le PDF ↓

Immunocytochimie

Pour l'immunocoloration des cellules en culture, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS et fixées avec du PFA à 4% pendant 10 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS et perméabilisées par incubation dans du Triton X-100 à 0,1% dans du PBS pendant 15 minutes à température ambiante. La liaison non spécifique a été bloquée par incubation dans 3 % d'albumine sérique bovine (Sigma, USA), du sérum de chèvre normal (Abcam, USA) ou du sérum d'âne normal (Abcam, USA) dans du PBS avec 0,1 % de Triton X-100 pendant 2 h à température ambiante. Ensuite, les cellules ont été incubées avec les anticorps suivants pendant 24 h : anticorps anti-LC3B (1 : 500, Novus bio, USA) ; anticorps anti-SQSTM1 (1:500, Abcam, USA), protéine acide fibrillaire anti-gliale (GFAP ; 1:500, Abcam, USA), protéine B anti-calcium-binding (S100B ; 1:500, Synaptic Systems, Allemagne), la protéine 2 associée aux microtubules (MAP2 ; 1 : 500, Abcam, USA) et l'antigène nucléaire anti-neuronal (NeuN ; 1 : 400, Abcam, USA). Après une réaction secondaire des anticorps, les échantillons ont été lavés 3 fois avec du PBS et examinés au microscope confocal.

Immunohistochimie

Les souris ont été profondément anesthésiées avec 2 % d'avertin (20 mg/ml, 20 µl/poids de souris (g) ; injection intrapéritonéale) et perfusées avec une solution saline à 0,9 % suivie de paraformaldéhyde (PFA) glacé à 4 %. Les cerveaux excisés ont été postfixés pendant une nuit à 4 ° C dans 4% de PFA et déshydratés dans 15% et 30% de saccharose pendant 48 h. Des coupes coronales d'hippocampe ont été coupées à 30 µm dans un cryostat et conservées dans une solution de stockage à 4 ° C. Les coupes de la solution de stockage ont été lavées dans du PBS et incubées pendant 1 h dans une solution de blocage (0,3% de Triton X-100, 2% de sérum d'âne normal dans 0,1 M de PBS). Les anticorps primaires contenus dans la solution de blocage ont été immunocolorés sur un agitateur à 4 ° C pendant la nuit. Après avoir été lavées 3 fois dans du PBS, les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires fluorescents correspondants pendant 1 h à température ambiante, puis lavées avec du PBS 3 fois. Les noyaux ont été contre-colorés avec du 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) ajouté en solution (1: 5 000 ; Abcam, USA) au cours de la deuxième étape de lavage. Enfin, les sections ont été montées avec un milieu de montage fluorescent (Dako, USA) et séchées à température ambiante. Une série d'images fluorescentes ont été obtenues avec un microscope confocal Nikon A1 (Nikon, Japon) avec des images de pile Z de 26 µm par étapes de 2 µm ont été traitées pour l'analyse Sholl à l'aide du logiciel NIS-Elements (Ver. 4.5, Nikon, Japon) et le logiciel ImageJ (Ver. 1.52s, NIH, États-Unis). Les anticorps primaires ont été dilués aux quantités suivantes : anti-LC3B (1 : 500, Abcam, USA), anti-

SQSTM1 (1 : 200, MBL, USA), anti-AT8 (1 : 200, Abcam, USA), anti-GFAP (1 : 500, Abcam, États-Unis) et anti-NeuN (1 : 400, Millipore, États-Unis). Les anticorps secondaires ont été dilués au 1: 500 dans la

Télécharger le PDF ↓

solution de blocage pendant 2 h à température ambiante.

Échantillons de cerveau humain

L'examen neuropathologique d'échantillons de cerveau post-mortem de sujets normaux (MA neuropathologiquement et cliniquement diagnostiquée) -MCI (NPCAD) et de patients atteints de MA sévère (SAD) a été déterminé à l'aide de procédures précédemment établies par le Centre de la maladie d'Alzheimer de l'Université de Boston (BUADC) [25]. Le plus proche parent a donné son consentement éclairé pour la participation et le don de cerveau. L'approbation du comité d'examen institutionnel pour l'autorisation éthique a été obtenue par l'intermédiaire du centre BUADC. Cette étude a été examinée par le comité d'examen institutionnel de la faculté de médecine de l'université de Boston et a été approuvée pour exemption car elle incluait uniquement des tissus prélevés sur des sujets post-mortem non classés comme sujets humains. L'étude a été réalisée conformément aux directives réglementaires institutionnelles et aux principes de protection des sujets humains énoncés dans la Déclaration d'Helsinki. Les exemples d'informations sont répertoriés dans le tableau supplémentaire S3.

Double coloration chromogénique pour les tissus cérébraux humains

Première coloration

Les tissus cérébraux post-mortem humains inclus en paraffine ont été sectionnés dans un plan coronal à 10 μ m. BLOXALL[®] Une solution de blocage (SP-600, Vector Laboratories, USA) a été utilisée pour bloquer la phosphatase alcaline endogène. Des coupes de tissus hippocampiques ont été bloquées avec 2, 5% de sérum de cheval normal (S-2000, Vector Laboratories, USA) pendant 1 h, puis incubées avec l'anticorps GFAP (dilution 1: 400) (AB5541, Millipore, USA) pendant 24 h. Après trois lavages avec du PBS, les lames de tissus ont été traitées avec le kit Vector ABC (PK-4000, Vector Laboratories, USA). Les signaux immunoréactifs GFAP ont été développés avec le chromogène DAB (D7304, Thermo Fisher Scientific, USA).

Deuxième coloration

Les lames de tissus colorées au GFAP ont été incubées avec l'anticorps LC3B (dilution 1: 200) (ab192890, Abcam, USA) pendant 24 h. Après réaction avec des anticorps secondaires, les coupes ont été incubées avec le réactif de détection polymère ImmPRESS-AP anti-lapin IgG (phosphatase alcaline) (MP-5401, Vector Laboratories, USA) pendant 2 h à température ambiante. Un kit de substrat de phosphatase alcaline Vector Blue (SK-5300, Vector Laboratories, USA) a été utilisé

pour développer des signaux LC3B. Les lames de tissus doublement colorées ont été progressivement traitées vers Histo-clear (National Diagnostics, USA) via un gradient d'éthanol croissant [70 %,

Télécharger le PDF ↓

80 %, 90 %, 95 % et 100 % (1 fois)] et monté ensuite. Les signaux chromogéniques de GFAP (marron) et de LC3B (bleu) ont été examinés au microscope optique (BX63, Olympus, Japon) équipé d'un appareil photo numérique haute définition (1920 × 1200 pixels) (DP74) (Olympus, Japon).

Reconstruction 3D d'une image microscopique

Les images ont été analysées à l'aide d'un microscope confocal à disque tournant (IX2-DSU, Olympus, Japon) doté d'un étage de modulation z-stack. Les images objectives 40x ont été acquises par pile z par étapes de 0,25 μ m et déconvoluées à l'aide du logiciel Cell Sense (Olympus, Japon). Les images de déconvolution ont été appliquées au processus de reconstruction 3D avec le logiciel IMARIS (Ver. 13, Oxford Instrument, UK). Le mode plan de détournage a été utilisé pour visualiser clairement la localisation des plaques A β et des astrocytes.

Préparation et séquençage de la bibliothèque Illumina HiSeq

Des bibliothèques d'échantillons ont été préparées par le kit Ultra RNA Library Prep (# E7530, NEBNEXT, USA), Multiplex Oligos for Illumina (# E7335, NEBNEXT, USA) et le module d'isolation magnétique d'ARNm poly (A) (# E74900, NEBNEXT, USA) selon les instructions du fabricant. Tous les détails sur la préparation de la bibliothèque et le protocole de séquençage sont fournis sur le site Web (<https://international.neb.com/products/e7530-nebnext-ultra-rna-library-prep-kit-for-illumina#Product%20Information>). Le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) et le kit ADN haute sensibilité associé (Agilent Technologies, USA) ont été utilisés pour déterminer la qualité et la concentration des bibliothèques. Des bibliothèques d'échantillons pour le séquençage ont été préparées à l'aide du HiSeq Reagent Kit Preparation Guide (Illumina, USA) comme décrit précédemment [26]. En bref, la bibliothèque d'échantillons combinée a été diluée à 2 nM, dénaturée avec du NaOH frais 0,2 N, diluée à 20 pM par ajout de tampon Illumina HT1. La bibliothèque (600 μ l) a été chargée avec des amorces de séquençage de lecture 1, de lecture 2 et d'index sur une cartouche de réactifs de 150 cycles (2 × 75 extrémités appariées) (kit HiSeq Reagent, Illumina, USA) et exécutée sur un appareil HiSeq NEXT de génération élevée. -séquenceur de débit (Illumina, USA). Après l'exécution de séquençage à extrémités appariées Illumina HiSeq de 2 × 75 pb, les données ont été appelées par base et les lectures avec le même code-barres ont été collectées et attribuées à un échantillon sur l'instrument, ce qui a généré des fichiers Illumina FASTQ.

PCR quantitative en temps réel (qPCR)

L'ARN total a été isolé de cellules et de tissus cérébraux à l'aide d'un système d'extraction commercial (Qiagen, USA). 1 μ g d'ARN a été utilisé pour la préparation de l'ADNc avec le kit de synthèse

Télécharger le PDF ↓

d'ADNc iScript (Bio-Rad, USA) conformément aux protocoles du fabricant. L'ADNc de chaque échantillon a été amplifié par PCR en temps réel à l'aide d'iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA). Les quantités d'ARN ont été normalisées à l'aide de l'ARNm de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les conditions du cycle de PCR étaient la dénaturation pendant 3 min à 95°C ; puis 40 cycles d'amplification pendant 15 secondes à 95°C, 15 secondes à 60°C, 20 secondes à 70°C ; suivi de 30 secondes à 72°C. Pour la collecte de données sur la courbe de fusion, 33 cycles de 6 secondes chacun ont été utilisés, avec une température augmentée de 60°C à 92°C (augmenter la température du point de consigne après le cycle 2 de 1°C). Les amorces PCR pour LC3B étaient les suivantes : directe, 5'-ATC CCG GTG ATA ATA GAA CG -3' et inverse, 5'-GAA GAA GGC CTG ATT AGC AT -3' ; Les amorces PCR pour SQSTM1 étaient les suivantes : directe, 5'-ATG ACT GGA CCC ATC TGT CT-3' et inverse, 5'-TCA TCA GAG AAG CCC ATG GA-3', l'amorce PCR pour Beclin1 (BECN1) étaient les suivants : avant, 5'-AGG TAC CGA CTT GTT CCC TA-3' et inverse, 5'-TCC ATC CTG TAC GGA AGA CA-3'. Les amorces PCR pour GAPDH étaient les suivantes : avant, 5'-GAA ATC CCA TCA CCA TCT TCC-3' et inverse, 5'-GAG GCT GTT GTC ATA CTT CTC-3'.

Analyse par Western Blot

Les analyses par Western blot ont été effectuées comme décrit précédemment. Les transferts transférés ont été incubés avec les anticorps primaires suivants à 4 ° C pendant 24 h : anti-LC3B (1 : 2000, Abcam, USA) ; anti-SQSTM1 (1: 2000, Abcam, États-Unis); anti-ACTB / β -actine (1: 2000, ACTB; Abcam, USA) et anti-TUBB3 / tubuline (1: 2000, TUBB3; Abcam, USA). Après avoir lavé 3 fois avec une solution saline tamponnée au Tris avec 0,05% de Tween 20), les transferts ont été incubés avec les anticorps secondaires appropriés conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) par HRP anti-lapin (Amersham Pharmacia, USA) à température ambiante pendant 2 h. Ensuite, les transferts ont été développés avec la solution Immobilon Western ECL (Merck Millipore, USA) et les bandes immunoréactives ont été visualisées à l'aide d'une Image Station 4000MM (n° 745 280 ; Kodak, Japon). ACTB ou TUBB3 a été utilisé comme contrôle de chargement.

Test de viabilité cellulaire et test de mort cellulaire

La viabilité cellulaire des cellules d'astrocyte primaires a été évaluée à l'aide d'un sel interne de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétazolium (MTS), basé sur un composé de tétrazolium, le MTS, et un agent accepteur d'électrons, le méthosulfate de phénazine (PMS ; Promega, USA). En bref, les

cellules ont été ensemencées dans une plaque de 96 puits à une densité de 3×10^4 cellules par puits dans 200 μ l de milieu, pour la croissance, puis traitées avec diverses concentrations

Télécharger le PDF ↓

d'oligomères A β et d'inhibiteurs de l'autophagie dans 100 μ l de milieu.

Après 24 h d'incubation à 37 °C, 20 μ l de solution de mélange

MTS/PMS ont été ajoutés au milieu de culture et les cellules ont été

incubées pendant 3 ~ #x2009 ; 4 heures à 37 °C. Enfin, des lectures

d'absorption ont été effectuées à 490 nm à l'aide d'une

spectrophotométrie. Les cellules astrocytes ont été ensemencées dans

une plaque à 96 puits à 1×10^4 cellules par puits. Après une nuit, les

oligomères A β ont été ajoutés aux puits à raison de 1 μ g/ml. Après 24

h, des inhibiteurs ont été ajoutés aux puits avec E/P. Après les temps

indiqués, la viabilité cellulaire a été déterminée par le réactif Cell

Titer-Glo (# G7572, Promega, USA). La courbe dose-réponse a été

ajustée à l'aide du logiciel Graphpad prism 8.0 (GraphPad Software,

USA). Tous les tests ont été effectués en triple et l'écart type (SD) a été

déterminé à partir de trois expériences indépendantes. L'apoptose et

la nécrose des cellules astrocytes ont été quantifiées à l'aide d'un kit

de test de quantification basé sur l'annexine V et l'EthD-III (n° 30

065, Biotium, USA). Les cellules astrocytes ont été traitées avec des

oligomères A β et des inhibiteurs de l'autophagie pendant 24 h, suivies

d'une incubation avec une solution de coloration à température

ambiante pendant 15 min. L'imagerie de cellules vivantes a été

obtenue par Image ExFluorer (Live Cell Instrument, Corée).

L'intensité et la quantification des signaux de mort cellulaire ont été

analysées avec le logiciel ImageJ (Fidji ; NIH, USA).

Imagerie de cellules vivantes en culture d'astrocytes avec MitoTracker et MitoSOX

Une coloration MitoTracker-green (Thermo Scientific, USA) a été

réalisée pour mesurer la morphologie mitochondriale dans les cellules

astrocytes comme décrit précédemment [27]. Une coloration Mito-

Sox (Thermo Scientific, USA) a été réalisée pour mesurer le stress

oxydatif dans les cellules astrocytes. Coloration MitoTracker-green

(0,1 μ M) et Mito-Sox (2,5 μ M) pendant 30 min à 37 °C dans un

incubateur avant d'acquérir des images. L'imagerie de cellules

vivantes a été obtenue par Image ExFluorer (Live Cell Instrument,

Corée). L'intensité du stress oxydatif des mitochondries et la

morphologie des mitochondries ont été analysées par le logiciel

ImageJ (NIH, USA).

Test DCF-DA

Les niveaux de ROS intracellulaires ont été détectés à l'aide d'une

sonde non fluorescente perméable aux cellules, diacétate de 2', 7'-

dichlorofluoresceine (# D6883, DCFDA; Sigma, USA). Le DCF-DA est

désestérifié sous sa forme fluorescente après action des estérases

intracellulaires et oxydation par des espèces réactives de l'oxygène

dans la cellule [28]. La culture primaire d'astrocytes a été

ensemencée sur des plaques à 48 puits (Corning, USA) et traitée avec un oligomère A β (1 μ M) en présence ou en absence de KDS2010 (100 nM), un piègeur de ROS et un inhibiteur réversible de la MAO-B, ou

[Télécharger le PDF](#) 

CQ (20 μ M) pendant 1 jour. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec une solution saline tamponnée de Hanks (#LB-003-002, HBSS ; Welgene, USA) et incubées avec 30 μ M de DCF-DA dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) à température ambiante pendant 30 min. sombre. Le DCFDA a été remplacé par HBSS et la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode SpectraMax iD5 (excitation 485 nm et émission 538 nm, Molecular Devices, USA).

Test Amplex Rouge

Les niveaux de ROS extracellulaires ont été détectés à l'aide du réactif Amplex Red après avoir collecté le milieu d'une culture cellulaire traitée avec l'oligomère A β (1 μ M) en présence ou en absence de KDS2010 (100 nM) ou de CQ (20 μ M) pendant 1 jour.

Analyse des métabolites

Pour l'analyse des métabolites, l'aspartate, l'ornithine, ¹⁵N-ornithine, arginine, ¹⁵N-arginine, citrulline, ¹⁵N-citrulline, glutamate, putrescine, ¹⁵N-putrescine, GABA et ¹⁵N-GABA ont été analysés.

Le système utilisé pour les analyses était un Exion LC AD UPLC couplé à un MS/MS (Triple Quad 4500 System, AB Sciex LLC, Framingham, USA) utilisant un Acquity[®] Colonne UPLC BEH C18 (1,7 μ m, 2,1 mm x 75 mm, Waters, USA) à 50 °C, contrôlée par le logiciel Analyst 1.6.2 (AB Sciex LP, Ontario, Canada). 70 % de méthanol (100 μ l, avec un étalon interne d'⁵-glutamine à une concentration finale de 1 μ M) ont été ajoutés aux pastilles d'échantillon d'astrocytes et vortexés pendant 30 s. Les cellules ont été lysées par trois cycles consécutifs de congélation/dégel en utilisant de l'azote liquide, et le lysat a été centrifugé pendant 10 min à 20 817 xg (14 000 tr/min) à 4 °C. Le surnageant (5 μ l) de chaque échantillon a été utilisé pour la normalisation de l'ADN. Les concentrations d'ADN ont été analysées à l'aide d'un spectrophotomètre Nano-MD UV-Vis (Scinco, Séoul, Corée). 40 μ l du surnageant de chaque échantillon ont été évaporés à sec à 37 °C sous un léger courant d'azote. La dérivation du phénylthiocyanate (PITC) a été réalisée en ajoutant 50 μ l d'un mélange 19:19:19:3 éthanol:eau pyridine:PITC (v/v) et le mélange a été vortexé pendant 30 s et secoué pendant 20 min. Ensuite, le mélange a été évaporé à sec à 37°C sous un léger courant d'azote. Le résidu a été reconstitué en ajoutant 50 μ l de la phase mobile A (0,2 % d'acide formique dans de l'eau désionisée) : B (0,2 % d'acide formique dans de l'acétonitrile) = solvant 5 : 5 et en vortexant pendant 30 s. Les conditions chromatographiques initiales étaient 100 % de solvant A à un débit de 0,4 mL.min.⁻¹. Après 0,9 min à 15 % de B, le solvant B a été réglé à

15 % pendant les 4,1 min suivantes, le solvant B a été réglé à 70 % au cours des 5 min suivantes, le solvant B a été réglé à 100 % pendant 0,5 min suivantes, et ces conditions ont été conservés pendant 2

Télécharger le PDF ↓

minutes supplémentaires. Le système a ensuite été ramené aux conditions initiales au cours des 0,5 minutes suivantes. Le système a été rééquilibré pendant les 2,5 minutes suivantes dans les conditions initiales. La durée totale de fonctionnement était de 15 minutes. Tous les échantillons ont été maintenus à 4 °C pendant l'analyse et le volume d'injection était de 5 µl. L'analyse MS a été réalisée en utilisant ESI en mode positif. La tension de pulvérisation d'ions et la température du vaporisateur étaient respectivement de 5,5 kV et 500 °C. Le gaz du rideau a été maintenu à 45 psi et le gaz de collision à 9 psi. Le gaz du nébuliseur était de 60 psi, tandis que le débit du gaz turbo était de 70 psi. Les métabolites ont été détectés de manière sélective à l'aide de leurs paires uniques de surveillance de réactions multiples (MRM). Le mode MRM suivant (Q1 / Q3) a été sélectionné : arginine (m/z 310.000 / 217.000), ¹⁵N-arginine(m/z 311.000 / 218.000), ornithine (m/z 403.200 / 310.200), ¹⁵N-ornithine (m/z 404.000 / 311.200), citrulline (m/z 311.200 / 113.100), ¹⁵N-citrulline(m/z 313.200 / 114.100), glutamate (m/z 283.200 / 130.200), aspartate (m/z 269.200 / 116.200), putrescine (m/z 359.200 / 266.100), ¹⁵N-putrescine(m/z 360.200 / 267.100), GABA (m/z 238.875/ 87.103), ¹⁵N-GABA (m/z 239,875/87,103). Afin de surveiller les transitions spécifiques parent-produit, la courbe d'étalonnage standard pour chaque métabolite a été utilisée pour la quantification absolue.

Microscopie électronique de culture d'astrocytes primaires

Afin de fixer les astrocytes humains, le milieu a été remplacé par du glutaraldéhyde à 2,5% tamponné à pH 7, 2-4 pendant 1 h. Et les cellules ont été collectées et incorporées dans de la résine Epon. Par la suite, des coupes de 70 nm ont été obtenues à l'aide d'un ultra-microtome et colorées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb. Les coupes cellulaires ont finalement été analysées à l'aide d'un microscope électronique à transmission de 80 kV. Pour quantifier les compartiments autophagiques, la taille et le nombre de vésicules autophagiques ont été mesurés qui ont été définis par des vésicules de forme sombre et circulaire dans la région cytoplasmique [29]. Pour le marquage immunitaire à l'or, les cellules de culture d'astrocytes ont été fixées et incubées avec un anticorps anti-LC3B (NB100-2220, Novus, USA) dans une solution de blocage (0,5 % de Triton-X100 avec 5 % de NGS dans du PBS) et ont été traitées avec un anti-lapin de chèvre. -anticorps à particules d'or (G3779, 10 nm, Sigma, USA,).

Plasmides viraux et production de virus

Pour le silençage génique dans les astrocytes de l'hippocampe de

souris in vivo, nous avons généré des shRNA de virus adénoviral associé (AAV) -CREon pour LC3B (GenBank NM_026160.5) et SQSTM1 (GenBank NM_011018.3) en appliquant un vecteur pAAV-R-CREon

Télécharger le PDF ↓

nouvellement développé. qui active le shRNA de manière dépendante du promoteur GFAP (pGFAP) via AAV-pGFAP-CRE comme décrit précédemment [30]. Afin de générer un vecteur viral spécifique aux astrocytes, nous avons sous-cloné 681 pb du promoteur GFAP humain, gfaABC1D, au vecteur AAV2 [31]. Il est bien établi que la séquence du promoteur gfaABC1D de 681 pb possède une activité transcriptionnelle plus élevée d'une manière spécifique aux astrocytes, similaire au promoteur gfa2 de 2,2 kb [31]. Sinon, pour induire la mort cellulaire spécifique des astrocytes et observer le degré de dépôt d'Aβ dans l'hippocampe des souris APP/PS1., nous avons appliqué la Caspase 3 active AAV-LoxP et l'AAV-GFAP-Cre ensemble [32]. Séquence shARN LC3B, 5'-GCAGCTTCCTGTTCTGGATAA-3' ; Séquence shARN SQSTM1, 5'-ACTGGACCCATCTGTCTTCAA-3'. D'autre part, pour déterminer le gain de fonction de LC3B dans les astrocytes, nous avons inséré l'ADNc de cellules humaines. LC3B (GenBank NM_022818.5) dans le système de surexpression AAV-pGFAP. Pour générer de l'AAV à titre élevé à des concentrations allant de 1×10^9 à 10^{11} Les unités formant des plages par millilitre (pfu/ml), les plasmides souhaités et pRC5, ainsi que les plasmides pHelper, ont été introduits de manière transitoire dans des cellules HEK293TN. Après une incubation de 72 heures, les lysats cellulaires ont été soumis à un traitement à la benzonase (50 unités/ml ; Sigma, USA). Ensuite, les particules virales ont été purifiées et concentrées à l'aide d'une colonne d'héparine (GE Healthcare, Suède) en conjonction avec un tube filtrant de 100 000 (Millipore, USA). La quantification des titres viraux a été mesurée par la méthode qPCR.

Injection stéréotaxique

Les souris ont été anesthésiées avec 2 % d'avertin (200 mg/kg ; Sigma, USA) dans une solution saline (20 µl/g ; volume de solution saline/poids corporel de la souris) et placées dans un cadre stéréotaxique (Stoelting Co, USA). Les virus de surexpression shRNA AAV-R-CREon-LC3B ou SQSTM1 et AAV-pGFAP-CRE ont été co-injectés à l'aide d'un micro-injecteur stéréotaxique (Stoelting Co, USA). Les groupes témoins ont reçu une injection de shRNA AAV-scramble. Une solution contenant de l'AAV (2 µl) a été injectée dans la couche moléculaire du gyrus denté (DG) de l'hippocampe dorsal; antéro-postérieur (AP) : -2,0 mm, médial latéral (ML) : ±1,5 mm, dorsal ventral (DV) : -1,85 mm au bregma à l'aide d'un pousse-seringue micro-seringue (Micro 4, WPI, USA) avec un 33- aiguille de jauge (WPI, USA) (0,1 µl/min). Des expériences neuropathologiques ont été réalisées 3 semaines après l'injection. Les souris ont été hébergées selon un cycle lumière-obscurité de 12 h 12 et maintenues à une température de 18 à 23 ° C avec une humidité comprise entre 40

et 60 % dans des installations exemptes d'agents pathogènes de
l'Institut coréen des sciences et technologies.

Télécharger le PDF ↓

Tests de comportement

Reconnaissance d'objets nouveaux (NOR) et reconnaissance de lieux d'objets nouveaux (NOPR)

Les tâches NOR et NOPR ont été effectuées dans une boîte blanche en champ ouvert (40 × 40 × 40 cm) avec de légères modifications par rapport aux procédures. Deux types d'objets étaient différents par leur forme, leur couleur et leur texture. L'un d'eux était un tétraèdre régulier jaune, en acrylique. L'autre était une sphère de couleur noire et rouge, en uréthane. Les objets étaient fixés au sol de la boîte, pour ne pas être déplacés par les souris. Renifler des objets était considéré comme l'action exploratoire de la souris. Le test NOR était composé de 3 étapes telles que l'habituation, l'entraînement et le test, et était administré une fois par jour. Au cours de l'étape d'habituation, la souris a été placée dans une boîte en plein champ pendant 10 minutes sans objets. Ensuite, pendant 2 fois la période d'entraînement, deux objets identiques ont été présentés à la souris pendant 10 min. Deux heures après le dernier entraînement, l'un des objets familiers a été remplacé par un nouvel objet et présenté à la souris pendant 10 minutes pour le test. Les procédures pour la tâche NOPR étaient similaires à celles de la tâche NOR, sauf que l'un des objets a été déplacé vers un emplacement différent pour le test. Le test a été enregistré sur vidéo avec un logiciel d'encodage (Ethovision XT, Noldus, USA) et les résultats, y compris le nombre total d'entrées de bras et le comportement d'alternance, ont été analysés ultérieurement.

Quantification et analyse statistique

La préparation de la culture cellulaire et les souris présentant les génotypes requis ont été réparties au hasard dans les groupes expérimentaux et traitées de la même manière. Toutes les analyses de quantification ont été effectuées à l'aveugle. Les chiffres et les points individuels font référence à des échantillons individuels (cellules individuelles, lots séparés de cellules cultivées ou d'animaux), sauf indication contraire dans les légendes des figures. N représente le nombre d'animaux utilisés pour l'expérience, tandis que n fait référence au nombre de cellules ou de lots de culture. La distribution des données a été supposée normale, mais cela n'a pas été formellement testé. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Pour l'analyse comportementale, Ethovision XT (Noldus, USA) a été utilisé. Pour l'analyse des images, les logiciels ImageJ (NIH, USA) et IMARIS (Oxford instrument, Royaume-Uni) ont été utilisés. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de Prism v.8.4.3 (logiciel GraphPad, États-Unis); un test t de Student non apparié et bilatéral a été utilisé pour comparer deux

groupes. Une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) avec le test de comparaisons multiples de Tukey a été utilisée pour plus de deux groupes, comme indiqué dans les légendes des figures.

Télécharger le PDF ↓

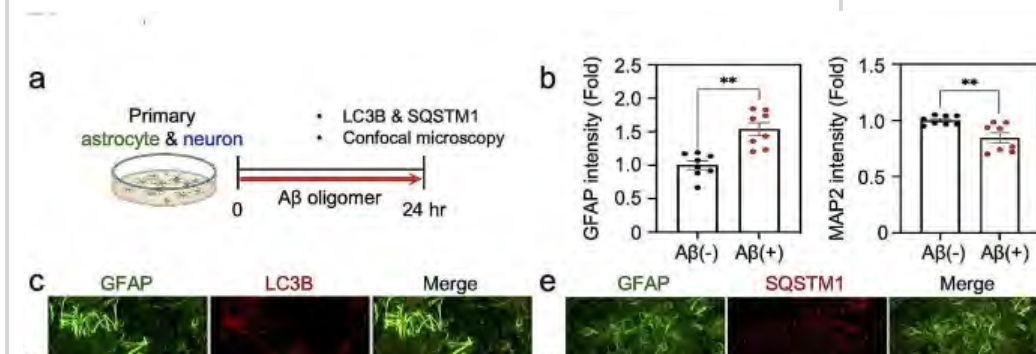
Une ANOVA bidirectionnelle avec le test de comparaisons multiples de Tukey a été utilisée pour comparer des groupes ayant deux variables indépendantes. Les différences statistiques étaient considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$ et la signification a été fixée à *, $p < 0,5$ et **, $p < 0,01$, qui sont indiqués dans les figures ou les légendes des figures. Aucune méthode statistique n'a été utilisée pour prédéterminer la taille des échantillons, mais la taille des échantillons est similaire à celle rapportée dans les publications précédentes. Le nombre d'échantillons expérimentaux, la moyenne, le SEM et les valeurs statistiques supplémentaires sont répertoriés dans les tableaux supplémentaires [S1](#) et [S2](#).

Résultats

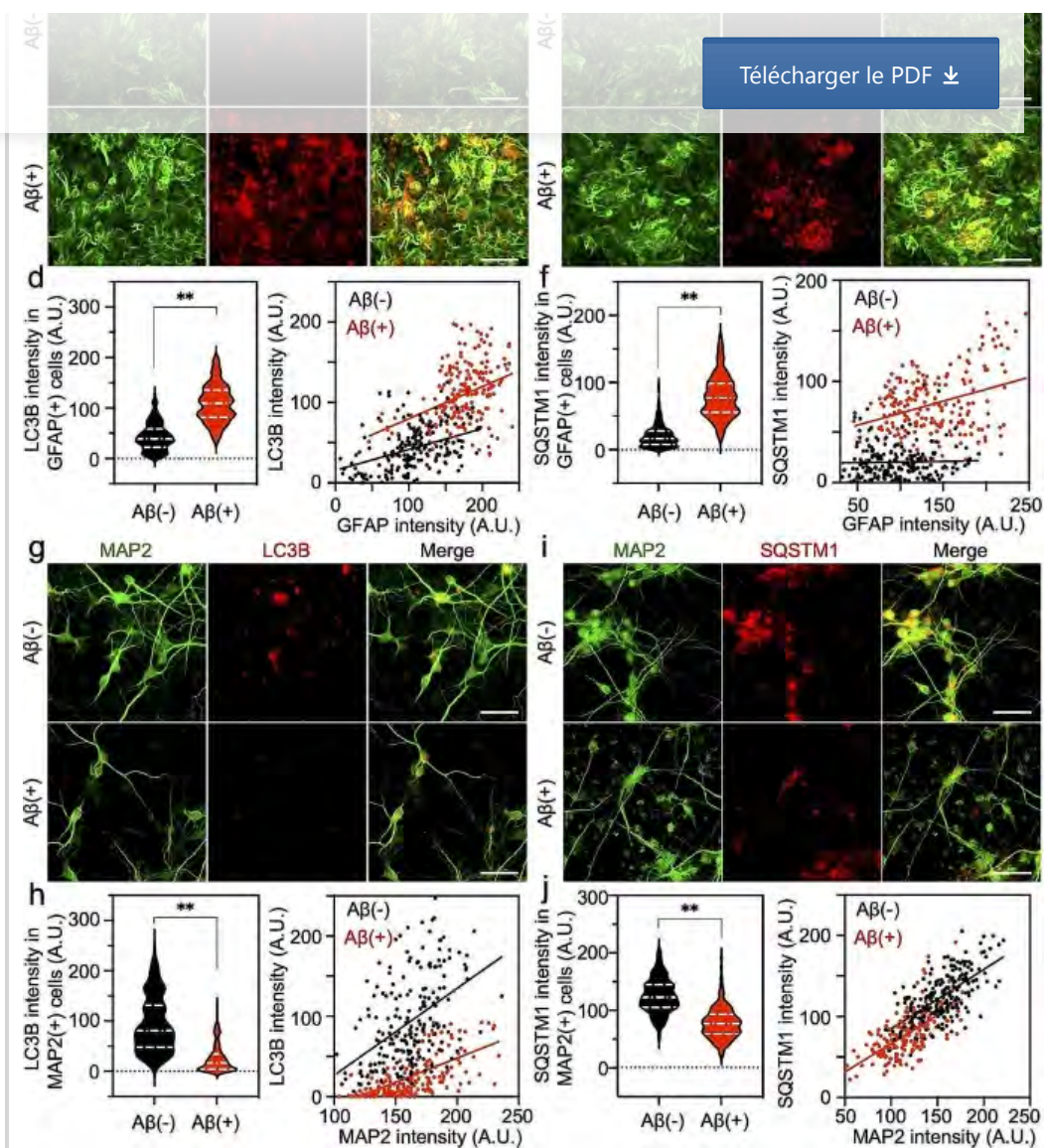
Aβ induit l'expression des composants de l'autophagie et augmente le flux de l'autophagie dans les astrocytes

Pour examiner si les composants de l'autophagie sont régulés par l'Aβ dans les astrocytes, nous avons adopté des cultures primaires de neurones et d'astrocytes de souris, traitées avec de l'Aβ synthétique in vitro. Nous avons préparé des oligomères Aβ et les avons traités avec le milieu de culture à une concentration de 1 μM (Fig. 1a). Nous avons effectué une immunocytochimie (ICC) en utilisant des anticorps dirigés contre des marqueurs astrocytaires et neuronaux, GFAP et MAP2, et avons constaté que le niveau de GFAP était significativement augmenté (Fig. 1b, c, e), alors que le niveau de MAP2 était significativement diminué en réponse à Aβ (Fig. 1b, g, i). Cela était cohérent avec notre précédent rapport sur le mécanisme autonome non cellulaire des astrocytes réactifs sévères provoquant une neurodégénérescence via H₂O₂ dans la MA [6]. Nous avons également observé que les principaux composants de l'autophagie, LC3B et SQSTM1, étaient régulés positivement de manière significative et corrélative avec l'augmentation des niveaux de GFAP (Fig. 1c-f), alors que ceux du neurone étaient significativement régulés négativement avec la diminution des niveaux de MAP2 (Fig. 1c-f). 1_g-j

Figure 1



Télécharger le PDF ↓



Les astrocytes induisent des composants de l'autophagie (LC3B et SQSTM1) en réponse à l'oligomère A β , mais pas les neurones. **a**, Schéma expérimental pour détecter les composants de l'autophagie dans la culture primaire d'astrocytes et de neurones de souris. **b**, Quantification de l'immunoréactivité GFAP ou MAP2 dans le système de coculture primaire d'astrocytes et de neurones de souris avec ou sans oligomère A β . Un total de 400 cellules, 50 cellules/puits, $n = 8$ puits. **c**, Double immunocoloration avec les anticorps GFAP et LC3B dans le système de culture primaire. Barre d'échelle (blanche) : 50 μm . **d**, Quantification de l'immunoréactivité LC3B dans les astrocytes GFAP-positifs et leurs graphiques de corrélation avec l'intensité GFAP. Un total de 200 cellules, 50 cellules/puits, $n = 4$ puits. **e**, Double immunocoloration avec les anticorps GFAP et SQSTM1 dans le système de culture primaire. Barres d'échelle (blanches) : 50 μm . **f**, Quantification de l'immunoréactivité SQSTM1 dans les astrocytes GFAP-positifs et leurs graphiques de corrélation avec l'intensité GFAP. Un total de 200 cellules, 50 cellules/puits, $n = 4$ puits. **g**, Double immunocoloration avec les anticorps MAP2 et LC3B dans le système de culture primaire. Barre d'échelle (blanche) : 50 μm . **h**, Quantification de l'immunoréactivité de LC3B dans les régions MAP2-positives et leurs graphiques de corrélation avec l'intensité de MAP2. Un total de 200 cellules, 50 cellules/puits, $n = 4$ puits. **i**, Double immunocoloration avec les anticorps MAP2 et SQSTM1 dans le système de culture. Barre d'échelle : 50 μm . **j**, Quantification de l'immunoréactivité SQSTM1 dans les régions MAP2-positives et leurs

graphiques de corrélation avec l'intensité MAP2. Un total de 200 cellules
50 cellules/puits, n = 4 puits. AU : unité arbitraire, pixel. Significatif
différent à **, p < 0,01

Télécharger le PDF ↓

Nous avons également vérifié que les traitements par oligomères A β augmentaient les niveaux de LC3B et SQSTM1 dans les astrocytes primaires S100B-positifs (Fig. [1a-d](#) supplémentaire). En revanche, les traitements par oligomères A β ont diminué les niveaux de LC3B et SQSTM1 dans les neurones primaires NeuN-positifs (Fig. [1a-d](#) supplémentaire).

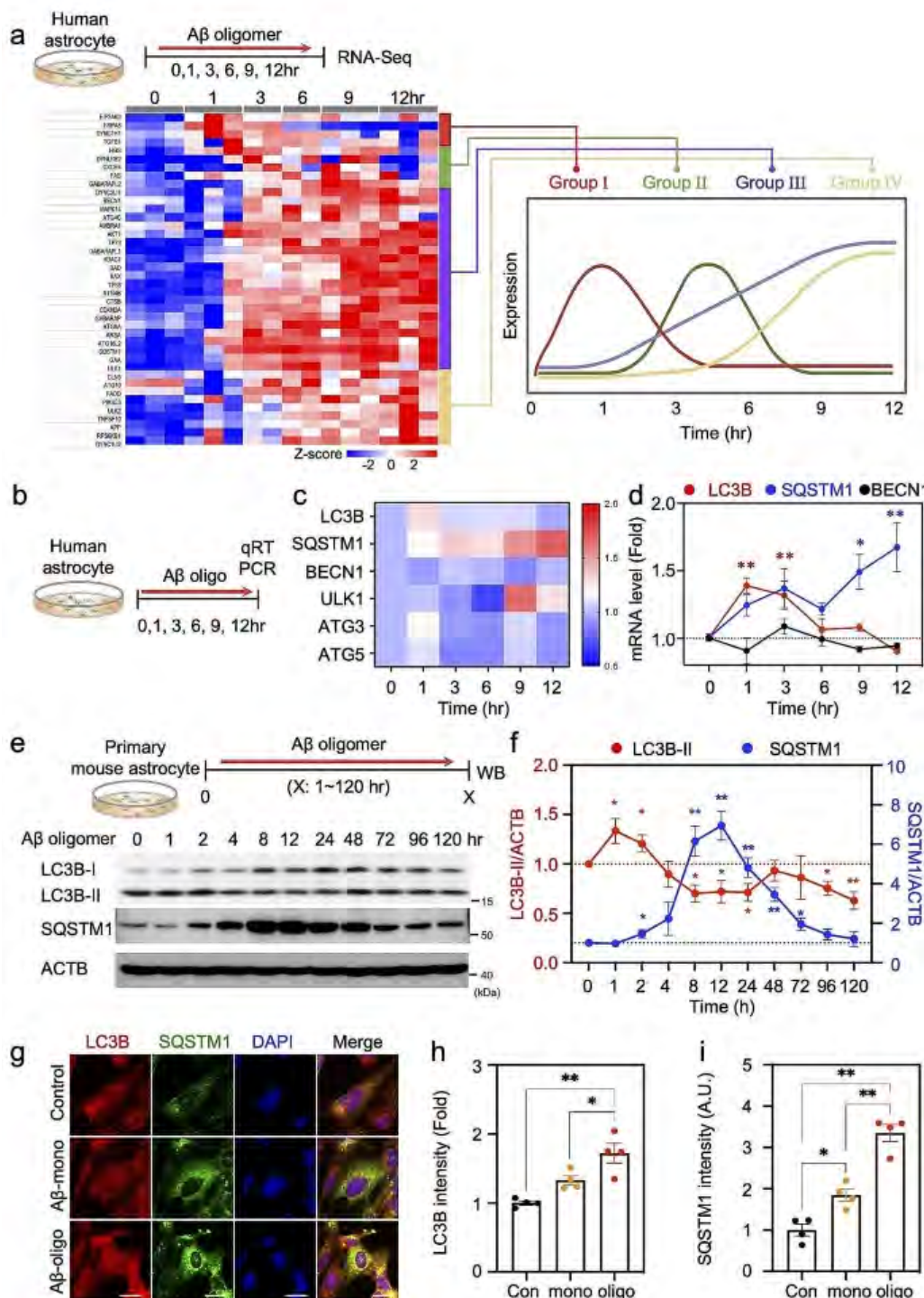
Sur la base des données ci-dessus, nous avons émis l'hypothèse que l'A β pouvait moduler l'expression de gènes liés à l'autophagie pour la détoxification de l'A β dans les astrocytes. Pour prouver cette hypothèse, nous avons effectué un séquençage d'ARN entier pour détecter les modèles d'expression génique dans les astrocytes humains traités à l'A β à 1, 3, 6, 9 à 12 h. Nous avons observé que les gènes liés à l'autophagie présentent une augmentation significative des niveaux d'ARN lors du traitement par A β . Nous avons classé ces gènes en quatre groupes présentant des modèles temporels d'expression de l'ARN en fonction du temps (Fig. [2a](#)). Nous avons validé que les niveaux d'ARNm de LC3B et SQSTM1 sont significativement élevés après le traitement par l'oligomère A β , ce qui suggère qu'une augmentation des composants de l'autophagie se produit au niveau de l'expression génique en réponse à l'oligomère A β dans les astrocytes (Fig. [2b-d](#)). Ensuite, pour déterminer l'évolution précise de l'autophagie astrocytaire induite par l'A β au niveau protéique, nous avons évalué l'expression de composants autophagiques tels que LC3B-I, LC3B-II et SQSTM1 en réponse à l'oligomère A β par analyse par transfert Western dans des astrocytes primaires de souris. (Figure. [2e](#), Fig. supplémentaire [2a](#)). LC3B-I, qui est une forme clivée de LC3B à son extrémité C-terminale, se révèle distribuée de manière diffuse dans le cytosol. Lorsque l'autophagie est induite, la LC3B-I cytosolique est conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE) pour former la LC3B-II qui est déplacée vers les membranes autophagosomales. Il est intéressant de noter que les niveaux de SQSTM1 et LC3B-II montrent des changements dynamiques se produisant en 120 h. Le moment d'expression maximale de SQSTM1 et de LC3B-II est respectivement de 12 h et 1 h après le traitement par l'oligomère A β , et les niveaux sont revenus au niveau normal (Fig. [2f](#)). Il est intéressant de noter que cette dynamique temporelle des composants autophagiques a également été observée dans les conditions de traitement de facteurs pro-inflammatoires tels que le lipopolysaccharide (LPS) et le facteur de nécrose tumorale (TNF)-alpha ainsi que le monomère A β (Fig. [2b-d](#) supplémentaire). Enfin, nous avons traité soit le monomère soit l'oligomère A β et vérifié l'accumulation de vésicules autophagiques dans les astrocytes par immunoloration avec les anticorps LC3B et

SQSTM1 (Fig. 2g). Nous avons observé un motif ponctué, indiquant un autophagosome, dans le cytosol des astrocytes et avons constaté que l'oligomère Aβ formait des vésicules plus denses que le monomère

Télécharger le PDF ↓

Aβ (Fig. 2g-i). Ces résultats indiquent que les composants autophagiques augmentent avec une dynamique temporelle transitoire en réponse au monomère et à l'oligomère Aβ dans les astrocytes humains, et ceux-ci ont été généralement démontrés de manière similaire contre divers facteurs pro-inflammatoires.

Figure 2



Les astrocytes présentent une expression temporelle des gènes liés à l'autophagie et du flux de l'autophagie en réponse à l'oligomère Aβ en temps opportun. a, analyse de séquençage d'ARN dans une culture

d'astrocytes humains 1, 3, 6, 9 et 12 h après le traitement par l'oligomère Aβ. L'expression génique modifiée a été classée en quatre groupes I, II, III et IV en fonction du moment de l'expression maximale. b,

Télécharger le PDF ↓

Conception expérimentale pour une évolution temporelle de la qRT-PCR dans des astrocytes humains traités avec un oligomère Aβ. c, Heatmap du modèle d'expression des gènes associés à l'autophagie. d, analyse qRT-PCR pour les niveaux d'ARNm LC3B, SQSTM1 et BECN1 en réponse à l'oligomère Aβ. Les graphiques linéaires présentent la moyenne ± SEM de trois expériences distinctes. e, données d'analyse par Western blot montrant que les niveaux de LC3B-II et SQSTM1 endogènes sont modifiés en fonction du temps dans les astrocytes primaires de souris traités avec l'oligomère Aβ. f, Quantification des intensités de bande de LC3B-II et SQSTM1 normalisées par la β-actine (ACTB). Les graphiques linéaires présentent la moyenne ± SEM de trois expériences distinctes. g, Double immunomarquage avec les anticorps LC3B et SQSTM1 dans une culture d'astrocytes humains monomères ou oligomères traitées à l'Aβ. Barres d'échelle (blanches) : 20 μm. h & i, graphiques à barres montrant l'intensité moyenne des LC3B (h signaux) et SQSTM1 (i). Un total de 20 cellules, 5 cellules/puits, n = 4 puits. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. Significativement différent à *, p < 0,05 ; **, p < 0,01

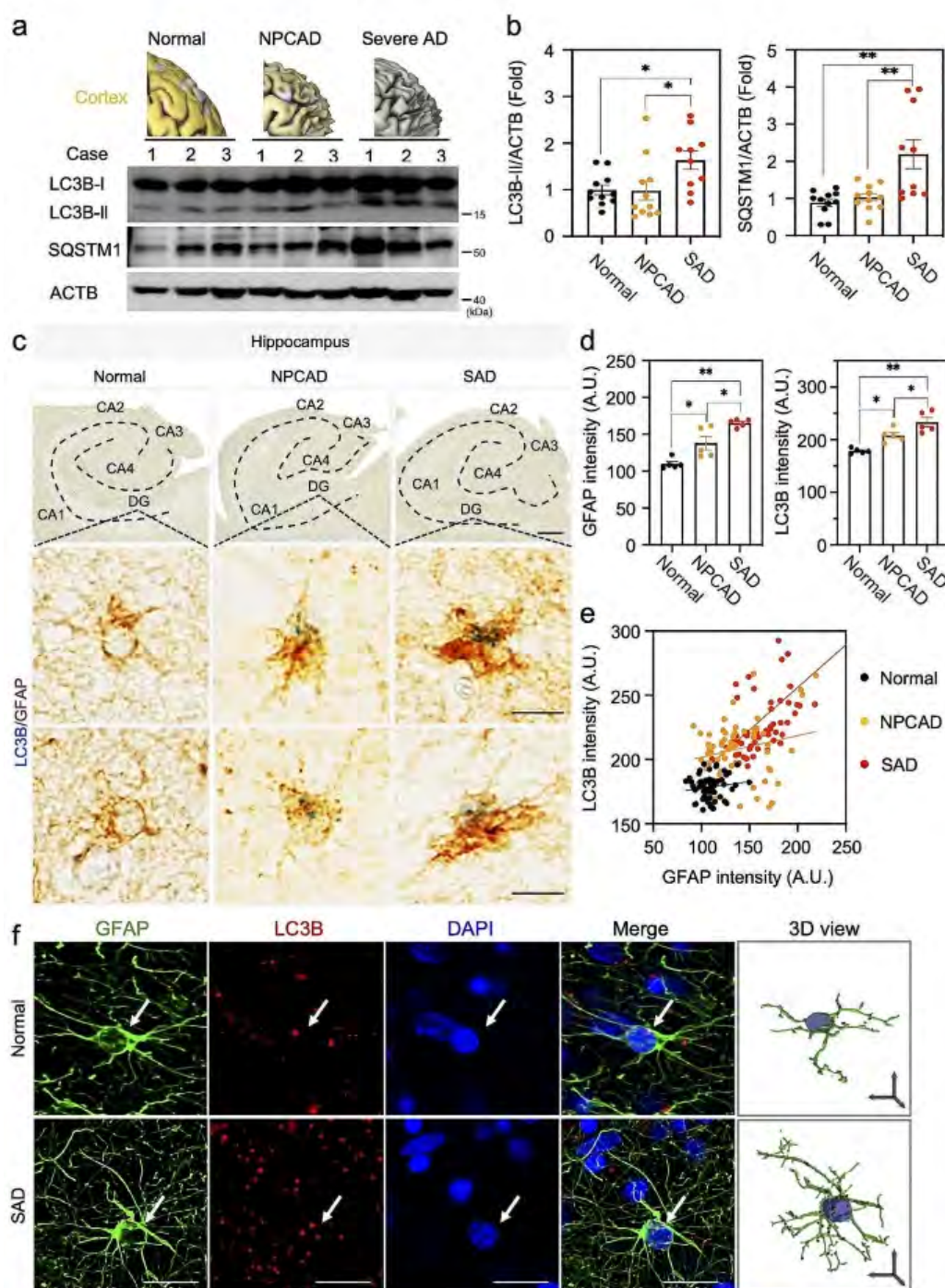
Les composants de l'autophagie (LC3B et SQSTM1) sont élevés dans le cerveau des patients atteints de MA

Pour déterminer l'importance de l'autophagie dans la MA, nous avons examiné si les composants de l'autophagie changeaient dans le cerveau des patients atteints de MA. Nous avons mesuré le niveau des principaux composants de l'autophagie, LC3B et SQSTM1, en effectuant une expérience de Western blot en utilisant des échantillons de cerveau humain provenant de régions corticales de patients atteints de MA (Fig. 3_a, b). Nous avons constaté une augmentation significative de SQSTM1 et de LC3B uniquement dans les cas de MA sévère, mais pas dans les cas de NPCAD (Fig. 3_a, b). Sur la base de ces résultats, nous avons réalisé une expérience d'immunohistochimie pour LC3B avec un marqueur spécifique des astrocytes, GFAP, dans le tissu cérébral de patients humains atteints de MA (Fig. 3_c-e). Comme indiqué précédemment, la morphologie des astrocytes s'est révélée hypertrophiée dans le cas de la MA par rapport au groupe sain [6], indiquant la présence de l'augmentation des astrocytes GFAP-positifs. En conséquence, nous avons observé une augmentation du niveau de LC3B dans les régions hippocampiques de patients humains atteints de MA, par rapport au cas de sujets sains (Fig. 3_supplémentaire c-f, Fig. 3). Il est intéressant de noter que le niveau des signaux LC3B était corrélé au niveau d'intensité GFAP dans les astrocytes des patients atteints de MA (Fig. 3_e), ce qui implique que les composants autophagiques s'accumulent en fonction de la réactivité des astrocytes réactifs dans le cerveau MA. Ces altérations de l'expression des protéines impliquent que la voie de l'autophagie astrocytaire pourrait jouer un rôle

important dans la MA.

Télécharger le PDF ↓

Figure 3



Les taux astrocytes de LC3B et SQSTM1 sont augmentés dans l'hippocampe des patients atteints de MA. a , analyse par transfert Western pour détecter le niveau de protéines LC3B-II et SQSTM1 à partir du cortex post-mortem de sujets normaux, NPCAD-MCI et de patients atteints de MA sévère (TAS). b , analyse densitométrique des niveaux de protéines LC3B-II et SQSTM1 du panneau a. Normal, N = 11 cas ; NPCAD, N = 11 cas ; TRISTE, N = 10 cas. c , Images d'immunocoloration chromogène double pour LC3B (bleu) et GFAP (marron) dans l'hippocampe de patients normaux, NPCAD et MA sévères. Les panneaux inférieurs présentent une immunoréactivité LC3B (bleu) dans les astrocytes GFAP-positifs (marron) dans le gyrus denté (DG). Barres d'échelle (noires) : en haut, 2 mm ; milieu et bas, 10 μm. d , Quantification de l'immunoréactivité GFAP et LC3B. Un point représente

une moyenne de 12 cellules (un total de 60 cellules), 12 cellules/cas, chacun
N = 5 cas pour normal, NPCAD et SAD. e , Une analyse de corrél
les intensités GFAP et LC3B dans le DG des patients normaux, NPCAD et

Télécharger le PDF ↓

SAD (dérivée du panel d). f , Images confocales représentatives de
l'immunoréactivité LC3B et GFAP dans le cortex de sujets normaux et de
patients atteints de MA sévère. La flèche (blanche) indique le signal LC3B
dans les astrocytes GFAP-positifs. Barres d'échelle : blanches, 20 μm ;
flèches noires (x, y et z en vue 3D), 10 μm. Les données sont présentées
sous forme de moyenne ± SEM. Significativement différent à * , p < 0,05 ;
** , p < 0,01

La fonction de l'autophagie induite est essentielle à la survie des astrocytes en réponse à l'Aβ

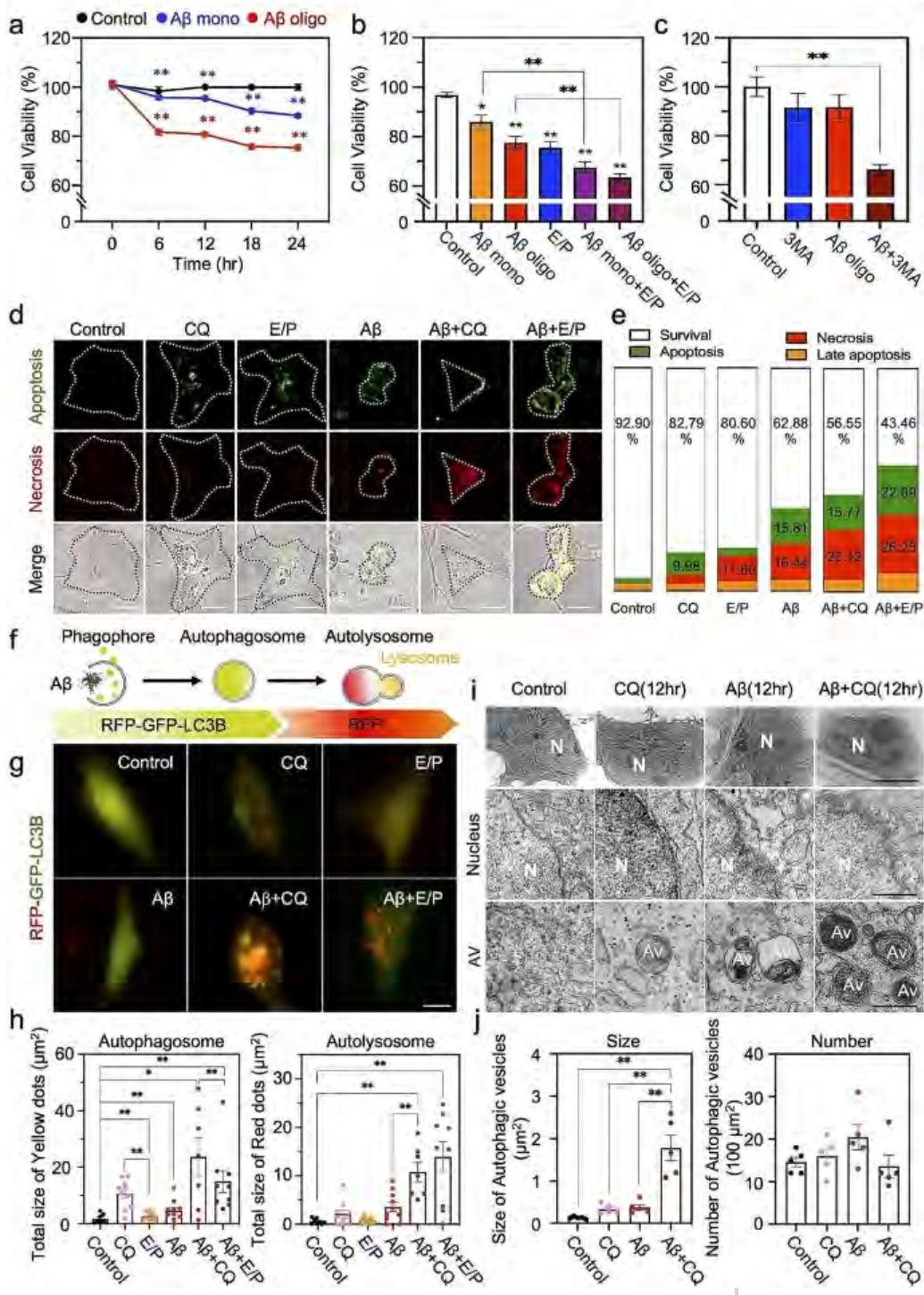
Des études antérieures suggèrent que l'autophagie est essentielle à la survie cellulaire [33, 34]. De manière cohérente, notre précédent rapport montre que le mécanisme de l'autophagie est lié à la viabilité cellulaire des astrocytes contre les matières toxiques, ce qui est le DT dans le cas de l'utilisation du système de récepteurs astrocytaires inductibles de la toxine diphtérique simienne (iDTR), un modèle nouvellement développé d'astrocytes réactifs [6]. Afin de déterminer si la viabilité des astrocytes est associée à la fonction de l'autophagie, nous avons conçu des expériences pharmacologiques avec plusieurs inhibiteurs de l'autophagie : CQ, un inhibiteur de fusion des lysosomes ; E64D, un inhibiteur de la cystéine protéase ; Pepstatine A (P), un inhibiteur de l'aspartate protéase ; 3-MA, une PI3-kinase et un inhibiteur de la formation d'autophagosomes. Lorsque la machinerie de l'autophagie ne fonctionnait pas correctement dans les astrocytes humains et de souris traités à l'Aβ par inhibition pharmacologique, la viabilité des astrocytes était considérablement réduite (Fig. 4a-c). Tout d'abord, nous avons effectué un test MTT pour mesurer l'activité oxydoréductase dépendante du NAD (P) H des cellules afin d'évaluer l'activité métabolique dans les astrocytes humains en culture. Nous avons observé que non seulement le monomère et l'oligomère Aβ réduisent la viabilité des astrocytes, mais que E64D/Pepstatine A (E/P) réduit également de manière significative la viabilité des astrocytes. Nous avons notamment découvert que le co-traitement de l'Aβ et des inhibiteurs de l'autophagie accélère la mort cellulaire des astrocytes (Fig. 4a,b). D'autre part, nous avons observé que le co-traitement de l'Aβ et du 3-MA diminuait systématiquement la viabilité de la culture primaire d'astrocytes de souris (Fig. 4c). Les modèles de mort cellulaire (apoptose versus nécrose) ont également été examinés par l'analyse morphologique des astrocytes dans les astrocytes traités par CQ et E/P et/ou Aβ accompagnés de marqueurs de mort cellulaire (Fig. 4d, e, Fig. 4a). Il est intéressant de noter que la mort cellulaire apoptotique et nécrotique des astrocytes était significativement élevée par l'inhibition de l'autophagie en réponse au traitement par l'Aβ. L'altération de la morphologie des astrocytes a également été observée dans un modèle animal de MA par inactivation du gène

MAP1LC3B/LC3B à l'aide du système LC3B shRNA CreON, qui est un système d'expression de shARN dépendant de Cre ainsi que l'expression de la protéine fluorescente (mCherry) [30]. Nous avons

Télécharger le PDF ↓

constaté que la morphologie des astrocytes était nettement perturbée dans les astrocytes exprimés par le shRNA LC3B et traités par l'oligomère Aβ, accompagnés de l'accumulation d'agrégats Aβ (Fig. 5 a-c). Ce résultat indique que le mécanisme de l'autophagie astrocytaire est nécessaire à la survie des astrocytes face à un stimulus toxique, ce qui implique que la résilience des astrocytes dans des environnements toxiques ou dans des conditions pathologiques dépend de la fonction de l'autophagie.

Figure 4



Le blocage de la voie de l'autophagie diminue la survie des astrocytes en réponse à l'oligomère Aβ. a Le monomère ou oligomère, Aβ induit la mort des cellules astrocytaires. Conditions de traitement dans les astrocytes

Télécharger le PDF ↓

humains : monomère Aβ, 1 μM ; Oligomère Aβ, 1 μM. La viabilité cellulaire a été mesurée par test MTT. b, L'inhibition de la fonction de l'autophagie exacerbe la mort cellulaire dans les astrocytes humains traités avec le monomère Aβ ou l'oligomère. Conditions de traitement : monomère ou oligomère Aβ, 1 μM ; E64D/Pepstatine A (E/P), inhibiteurs de protéase acide, 10 μg/ml ; heure, 24 heures. Les graphiques à barres représentent la moyenne ± SEM de trois expériences distinctes. c, 3MA, un inhibiteur de la PI3-kinase et de la formation d'autophagosomes, exacerbe la mort cellulaire des astrocytes primaires de souris traités par l'oligomère Aβ. Conditions de traitement : oligomère Aβ, 1 μM ; 3MA, 1 mM ; heure, 24 heures. d, Images représentatives de la morphologie des astrocytes, des signaux de mort cellulaire apoptotique (vert) et des signaux de mort cellulaire nécrose (rouge) avec ou sans inhibiteurs de l'autophagie [E/P ou chloroquine (CQ)] dans les astrocytes humains sous traitement par oligomère Aβ. Conditions de traitement : oligomère Aβ, 1 μM ; E64D, 10 μg/ml ; Pepstatine A, 10 μg/ml ; CQ, 20 μM ; heure, 24 heures. Barres d'échelle (blanches) : 10 μm. e, Modification du rapport des modèles de mort cellulaire (apoptose, nécrose et apoptose tardive) dans les astrocytes avec ou sans inhibiteurs de l'autophagie. f, Mécanisme de fonctionnement du capteur d'autophagie, RFP-GFP-LC3B. Les points verts indiquent les autophagosomes et les points rouges les autolysosomes. g, Images représentatives d'astrocytes exprimant RFP-GFP-LC3B en présence ou en absence d'inhibiteurs de l'autophagie (CQ ou E/P) dans des astrocytes humains traités avec un oligomère Aβ. Barres d'échelle : 10 μm. h, Quantification de la taille de l'autophagosome (points verts) et de l'autolysosome (points rouges). Nombre de cellules : contrôle, n = 8, CQ, n = 10 ; E/P, n = 10 ; Aβ, n = 10 ; Aβ + CQ, n = 7 ; Aβ + E/P, n = 9. i, Images représentatives de microscopie électronique à transmission (TEM) représentant l'autophagosome (vésicules à double membrane) et l'autolysosome (vésicules sombres et denses) dans des astrocytes en culture traités avec un oligomère Aβ. Barres d'échelle (noires) : supérieure, 5 μm ; milieu et bas, 0,5 μm. Av, vésicules d'autophagie ; N, noyau. j, Quantification de la taille et du nombre de vésicules autophagiques. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. Mesure et comptage du ROI (100 μm²)/cellule. Significativement différent à *, p < 0,05 ; **, p < 0,01

Le processus d'autophagie montre des altérations morphologiques uniques en formant un autophagosome, qui est une vésicule séquestrée à double membrane, ou un autolysosome, qui est une forme de fusion d'autophagosome avec un lysosome [35, 36, 37]. Ces caractéristiques subcellulaires uniques peuvent être directement observées grâce aux techniques de microscopie électronique [29]. Par conséquent, nous avons effectué une microscopie électronique à transmission (TEM) pour observer l'autophagosome et l'autolysosome dans les astrocytes primaires de souris traités à l'Aβ. En conséquence, nous avons pu détecter une augmentation des vésicules cytosoliques à double membrane, qui sont des autophagosomes, dans les astrocytes

traités avec l'oligomère A β et des vésicules sombres et denses, qui peuvent être des autolysosomes, dans les astrocytes traités avec l'oligomère A β (Fig. 4*i, j*). De plus, nous avons effectué une analyse

Télécharger le PDF ↓

EM et observé que les astrocytes à proximité des plaques A β dans l'hippocampe de la souris 5xFAD contiennent une augmentation des structures de filaments et présentent des vésicules autophagiques (double membrane), tandis que les astrocytes de l'hippocampe de la souris WT contiennent moins de structures de filaments et n'ont pas montré de formation apparente de vésicules autophagiques (Fig. 5*7*). Ensuite, nous avons examiné si l'augmentation de la machinerie autophagique entraînait une augmentation du flux autophagique dans les astrocytes en appliquant du CQ, qui est un inhibiteur de la conversion autophagosome-autolysosome, ou un inhibiteur de l'enzyme lysosomale, E64D (10 μ g/ml) et Pepstatine A (10 μ g/ml) (E/P). Premièrement, nous avons directement immunocoloré avec des anticorps LC3B ou SQSTM1 pour détecter l'autophagosome et avons observé que l'accumulation de LC3B ou SQSTM1 induite par A β était plus importante dans les conditions traitées par CQ ou E/P que dans les conditions non traitées (Fig. 6*a-c* supplémentaire). Pour confirmer davantage une augmentation du flux autophagique induit par A β , nous avons surveillé le flux autophagique avec une sonde d'autophagie basée sur la fluorescence généralement utilisée, la construction de fusion RFP-GFP-LC3B [38, 39, 40], qui peut montrer des signaux jaunes dans les premiers autophagosomes et signal rouge dans l'autolysosome (Fig. 4*b* supplémentaire *f-h*, Fig. 4). A β a induit une augmentation à la fois du nombre et de la taille des autophagosomes (points jaunes) et des autolysosomes (points rouges) dans chaque astrocyte et ces signaux ont ensuite été accumulés lors du co-traitement de CQ ou d'E/P (Fig. 4*g-h*). De plus, nous avons montré que le flux autophagique amélioré était également observé dans le traitement du monomère A β ainsi que de l'oligomère A β par analyse par Western blot (Fig. 2 supplémentaire). Nous avons mesuré les niveaux de LC3B ou SQSTM1 à partir de lysats de culture d'astrocytes primaires et comparé le rapport accumulé de chaque marqueur par traitement de CQ ou E/P entre l'absence et la présence de monomère A β dans les astrocytes primaires de souris. En conséquence, ces ratios ont été significativement augmentés par le traitement au monomère A β (Fig. 6*d-h* supplémentaire). En outre, nous avons directement observé que la taille des vésicules autophagiques augmentait considérablement en présence de CQ grâce à l'expérience TEM (Fig. 4*i, j*). Pris ensemble, ces résultats indiquent que A β , non seulement sous forme oligomère mais également sous forme monomère, accélère le processus cellulaire d'autophagie dans les astrocytes, accompagné d'une régulation dynamique des protéines liées à l'autophagie.

L'inhibition de l'autophagie prévient l'intoxication par l'A β et exacerbe le stress oxydatif dans les astrocytes traités par l'A β

Des études antérieures ont montré que, dans les astrocytes, Aβ augmentait la production de GABA et de H₂O₂ via la voie de dégradation de la putrescine médiée par MAO-B [6, 7] et, en tant

Télécharger le PDF ↓

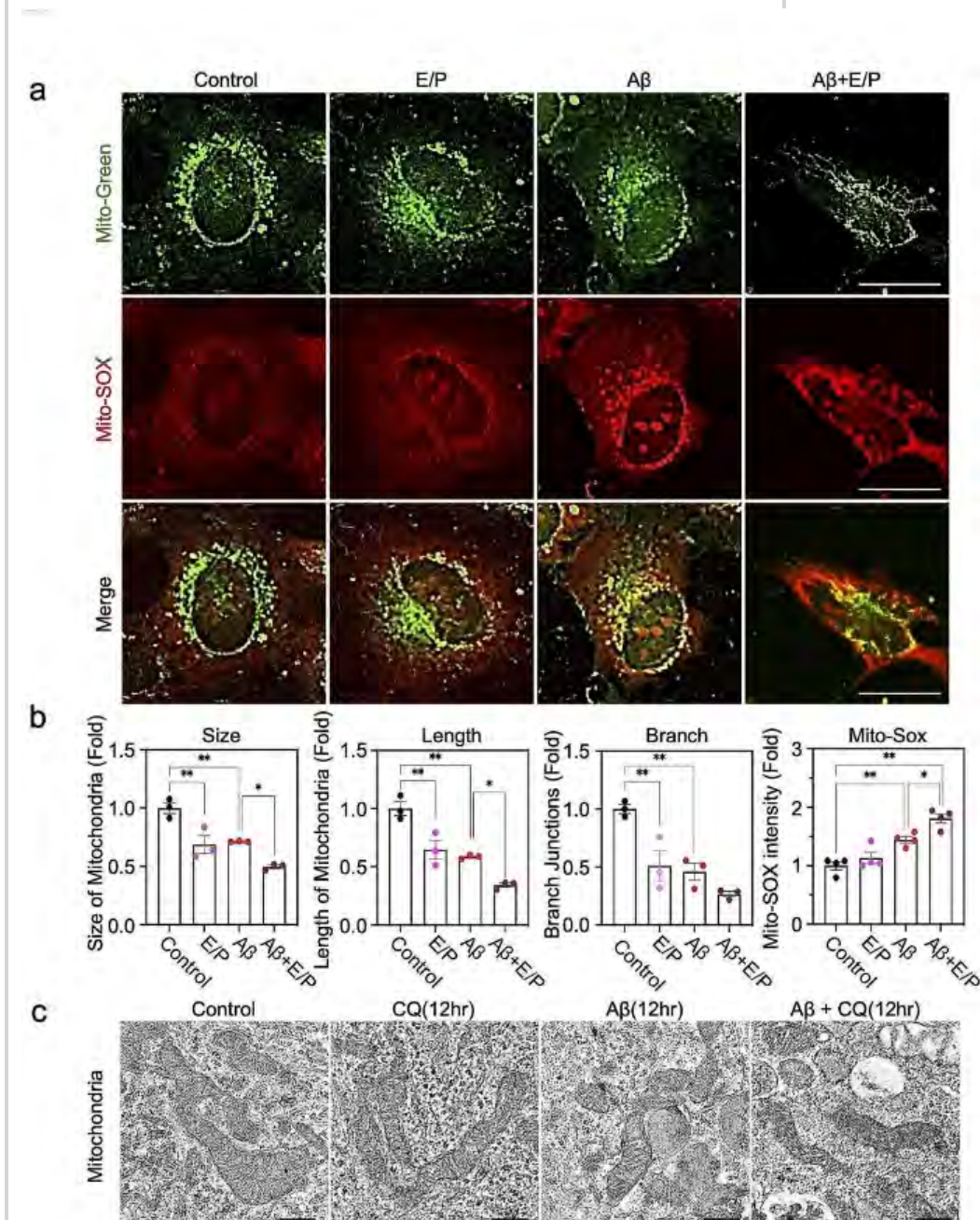
que mécanisme en amont de la production de putrescine par absorption d'Aβ, le cycle de l'urée astrocytaire est allumé dans des conditions AD [12]. Dans cette étude, les métabolites du cycle de l'urée tels que l'aspartate, l'arginine et l'ornithine ainsi que la putrescine et le GABA ont été nettement régulés positivement dans les astrocytes cultivés traités par Aβ, indiquant le cycle accéléré de l'urée [12]. Ici, nous avons postulé que la voie de l'autophagie peut agir comme un mécanisme en amont du cycle de l'urée dans le processus d'intoxication par l'Aβ. Pour déterminer si le cycle de l'urée déclenché par l'Aβ est modulé par la voie de l'autophagie dans les astrocytes, nous avons utilisé le shRNA LC3 pour inhiber la voie de l'autophagie dans les astrocytes traités par l'Aβ et analysé les métabolites du cycle de l'urée intracellulaire par analyse par chromatographie liquide/spectrométrie de masse (LC/MS) (Figure supplémentaire 8 a). Notamment, nous avons observé que l'élévation des taux d'aspartate, d'arginine, d'ornithine, de putrescine et de GABA induite par l'oligomère Aβ était significativement atténuée dans les astrocytes primaires de souris transfectés par LC3B-shRNA (Fig. 6b-g). Alors que le shRNA LC3B n'a modifié que le niveau de métabolites associés au cycle de l'urée, tels que l'ornithine, l'arginine et d'autres (Fig. 6b-g). Ces résultats indiquent que le cycle de l'urée facilité par l'Aβ dans les astrocytes est médié par la voie de l'autophagie.

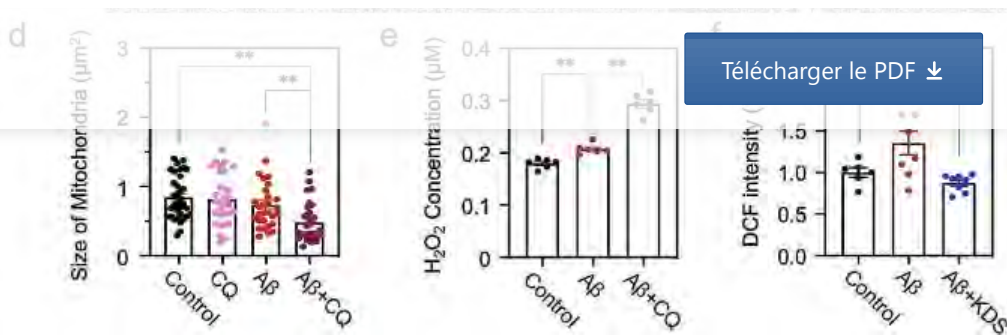
Considérant que l'autophagie est étroitement liée à la dynamique mitochondriale [41] et que l'Aβ dans le modèle murin de MA amyloïdogène a provoqué un dysfonctionnement mitochondrial, qui s'aggrave à mesure que les plaques Aβ se forment [42], nous pourrions émettre l'hypothèse que l'autophagie des astrocytes induite par l'Aβ peut contribuer à la modulation de fonction mitochondriale. En conséquence, nous avons analysé les données d'ARN-seq et avons découvert que les gènes des mitochondries codés par le génome mitochondrial et les gènes de ciblage des mitochondries codés par le génome nucléaire sont significativement modifiés dans les astrocytes humains traités par un oligomère Aβ (Fig. 8h, i supplémentaire). Ensuite, nous avons examiné le changement morphologique des mitochondries avec Mito-Tracker (vert), qui est un outil précieux utilisé pour observer la morphologie et les activités des mitochondries [27, 43], dans les astrocytes humains traités par un oligomère Aβ. Nous avons constaté que la taille, la longueur et le total des jonctions de branchement des mitochondries étaient significativement plus faibles dans les astrocytes traités avec un oligomère Aβ ou avec un oligomère Aβ que dans le groupe témoin et que ceux-ci étaient encore diminués dans l'état des oligomères E/P et Aβ. traitement, par rapport au traitement unique (Fig. 5a,b). Le dysfonctionnement mitochondrial dans les astrocytes appauvris en autophagie et traités

par des oligomères Aβ a également été observé sur l'image TEM (Fig. 5_c, d). Enfin, nous avons mesuré les espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriales en utilisant Mito-SOX, un indicateur de superoxyde spécifique aux mitochondries, et avons observé que l'intensité de Mito-SOX était significativement augmentée par le traitement par Aβ, qui était encore augmentée par Aβ- et E/P. - condition co-traitée (Fig. 5_a, b). De manière cohérente, nous avons observé une augmentation du niveau de H₂O₂ dans les milieux de culture un jour après le traitement de Aβ via le test Amplex Red, avec une augmentation supplémentaire de l'état inhibé par l'autophagie (Fig. 5_e). La détection des ROS à l'aide du test DCF-DA a été réalisée dans des astrocytes traités avec un oligomère Aβ avec ou sans KDS2010, un piègeur de ROS et un inhibiteur réversible de la MAO-B [6] (Fig. 5_f). Ces résultats indiquent que l'autophagie astrocytaire induite par l'oligomère Aβ est étroitement associée aux fonctions intactes de l'homéostasie mitochondriale et ROS.

Télécharger le PDF ↓

Figure 5





L'inhibition de la fonction de l'autophagie astrocytaire dérégule le potentiel de la membrane mitochondriale et élève les ROS en réponse à l'oligomère Aβ. a , Images représentatives du potentiel de membrane mitochondriale (par coloration MitoTracker) et des espèces mitochondriales réactives de l'oxygène (ROS) (par coloration MitoSOX) dans une culture d'astrocytes humains traitées à l'oligomère Aβ avec ou sans E/P. Barres d'échelle (blanches) : 10 µm. b , Quantification des signaux MitoTracker et MitoSOX dans les astrocytes humains traités par un oligomère Aβ avec ou sans E/P. Un total de 20 comptes cellulaires, 5 cellules/puits, n = 4 puits. c , Images TEM représentatives présentant des changements ultrastructuraux des mitochondries dans les astrocytes traités par oligomère Aβ et/ou CQ. Barres d'échelle (noires) : 0,5 µm. d . Quantification de la taille des mitochondries à partir d'images EM parmi quatre groupes : contrôle, 34 comptes de mitochondries ; CQ, 26 mitochondries comptent ; Aβ, 29 mitochondries comptent ; Aβ + CQ, 29 mitochondries comptent. Mesure de la taille des mitochondries en 100 µm² du retour sur investissement. e , test Amplex UltraRed pour détecter H₂O₂ dans les astrocytes traités par oligomère Aβ et/ou CQ. Les graphiques à barres représentent la moyenne ± SEM de 6 puits. f , test DCF-DA pour détecter les ROS dans les astrocytes traités par un oligomère Aβ avec ou sans KDS2010 (KDS), un piègeur de ROS et un inhibiteur réversible de la MAO-B. Les graphiques à barres représentent la moyenne ± SEM de 6 puits (contrôle), 8 puits (Aβ) et 8 puits (Aβ + KDS2010). Significativement différent à *, p < 0,05 ; **, p < 0,01

L'inactivation spécifique des astrocytes des composants de l'autophagie exacerbe la formation de plaques Aβ et altère la fonction cognitive chez les souris APP/PS1

Pour étudier le rôle de l'autophagie astrocytaire dans la pathologie de la MA, nous avons développé un shRNA efficace pour le gène LC3B et généré un AAV exprimant le shRNA LC3B basé sur le système shRNA CREon, qui est un système de silençage génique dépendant de la recombinase Cre (Fig. 9_supplémentaire). a-h). Nous avons injecté ce virus avec le virus AAV-GFAP-Cre dans l'hippocampe de souris WT ou APP/PS1 à l'âge de 8 mois (Fig. 6 a) et inhibé génétiquement l'expression de LC3B spécifiquement dans les astrocytes de l'hippocampe de WT et APP/PS1. souris. Huit semaines après l'injection du virus, nous avons examiné le nombre de plaques Aβ dans le cerveau de souris APP/PS1 par immunoloration avec des anticorps GFAP et Aβ ou par coloration à la thioflavine-S. Nous avons observé que la taille des plaques Aβ était significativement augmentée

dans le cerveau des souris APP / PS1 exprimant le shARN LC3B par

rapport au groupe de virus témoin (Fig. 6b a supplémentaire

Fig. 12). Ce résultat indique que l'activation de l'autophagie

astrocytaire joue un rôle essentiel dans l'élimination de l'Aβ dans la

MA. Il est intéressant de noter que les astrocytes de l'APP/PS1

exprimant le shRNA LC3B sont devenus plus hypertrophiés dans leur morphologie que le groupe témoin (Fig. 6 a-c supplémentaire b-d, Fig.

11), même s'il n'est pas davantage ramifié, impliquant la réactivité aggravée des astrocytes, probablement due à une production excessive

de H₂O₂. L'inactivation de LC3B a augmenté le nombre d'astrocytes GFAP-positifs et de plaques Aβ, accompagnée d'une réduction de

l'intensité et du nombre de signaux NeuN dans l'hippocampe des

souris APP/PS1 (Fig. 6 f, g, Fig. 11 d, e supplémentaires). Ces résultats

indiquent que le mécanisme de l'autophagie astrocytaire joue un rôle essentiel dans la prévention de l'exacerbation de la pathologie de la

MA dans le modèle murin amyloïdogène. D'autre part, pour examiner si la toxicité des astrocytes seule est suffisante pour induire une

pathologie Aβ in vivo, nous avons induit la mort cellulaire spécifique des astrocytes dans l'hippocampe de souris WT et APP/PS1 en

transduisant la caspase-3 active (en utilisant l'AAV-LoxP-active Caspase 3 et AAV-pGFAP-Cre) (Fig. 10 a-c supplémentaire). En

conséquence, nous avons constaté que le nombre et la taille des

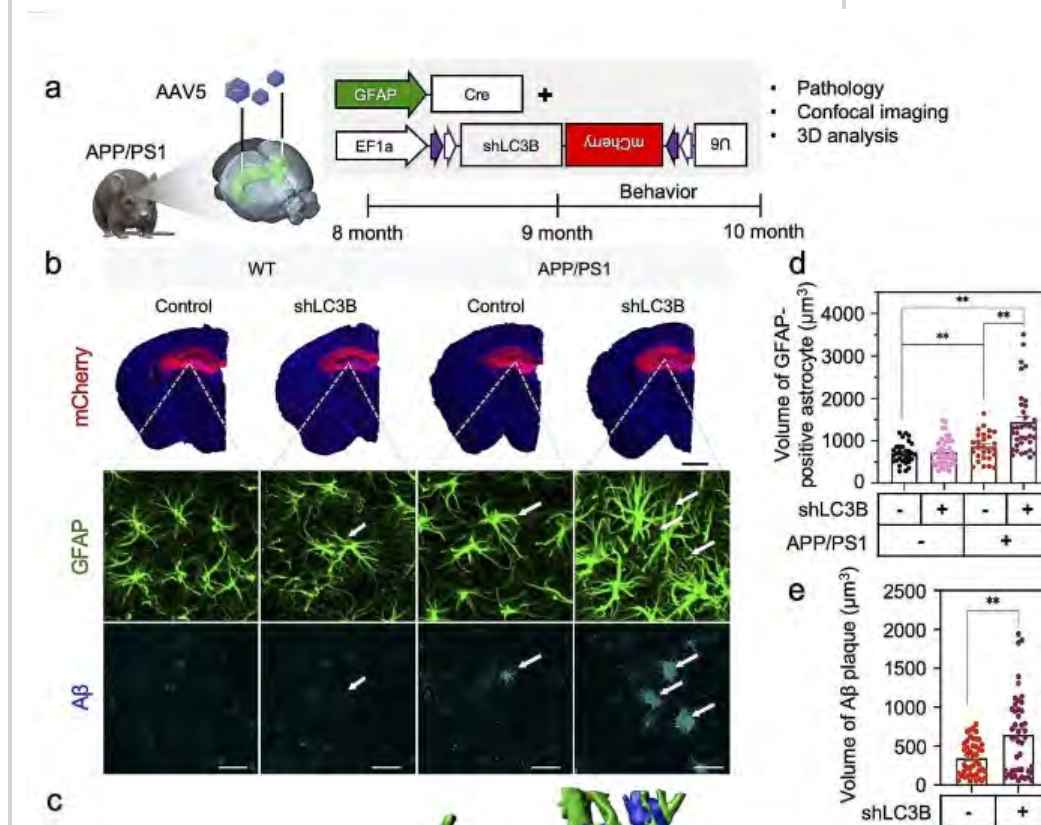
agrégats Aβ étaient significativement augmentés dans l'hippocampe

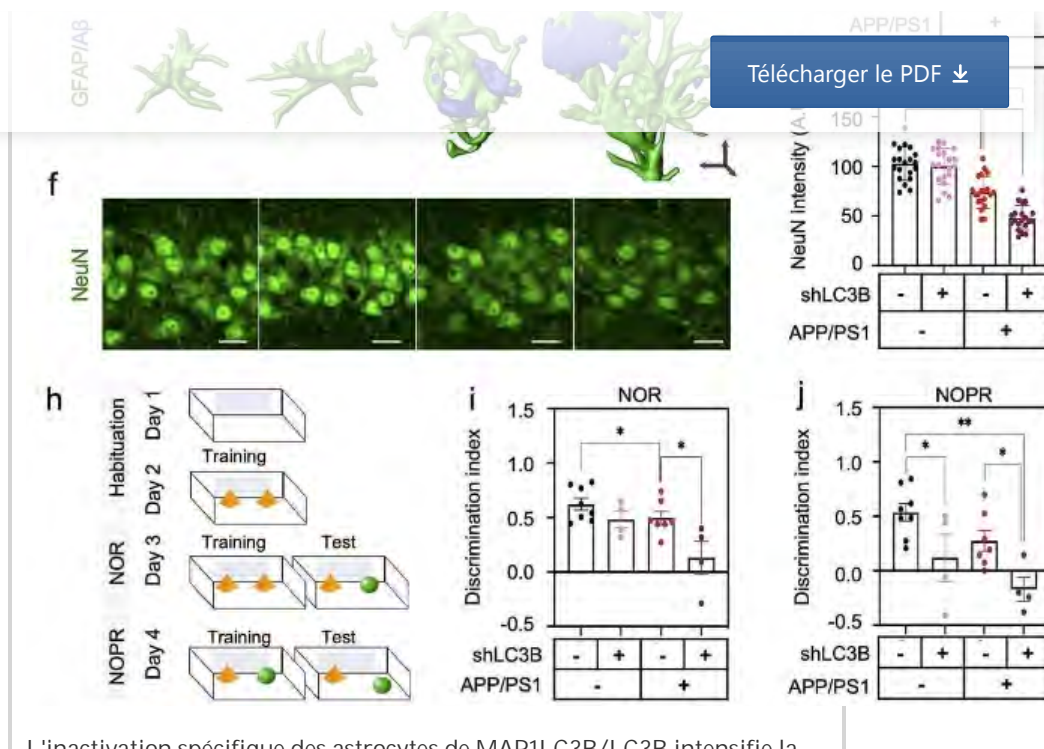
des souris APP/PS1 présentant une surexpression de la caspase-3 active spécifique aux astrocytes (Fig. 10 j, e). Ces données indiquent

que la mort cellulaire spécifique des astrocytes exacerbe l'agrégation de Aβ chez les souris AD.

Télécharger le PDF ↓

Figure 6





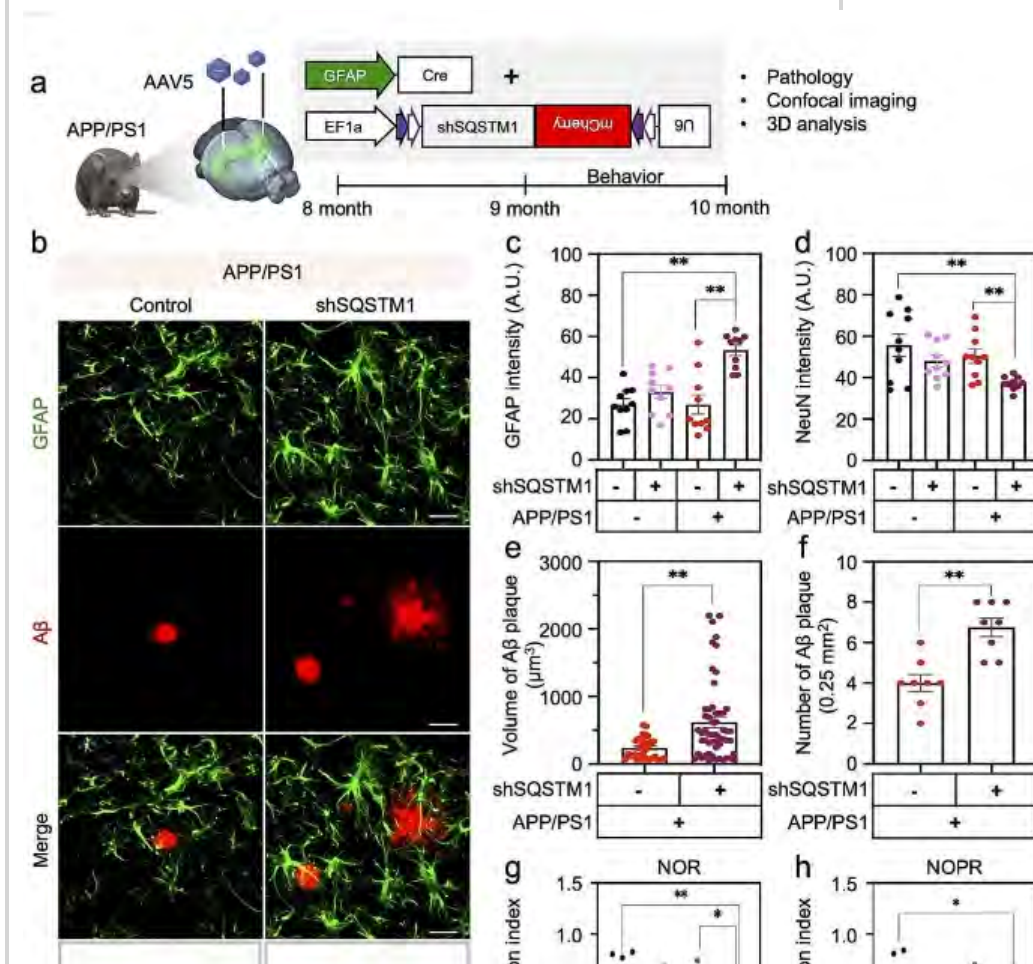
L'inactivation spécifique des astrocytes de MAP1LC3B/LC3B intensifie la formation de plaques A β , les astrocytes GFAP-positifs et les troubles cognitifs chez les souris APP/PS1. **a**, Schéma expérimental d'inhibition génétique de l'autophagie astrocytaire dans l'hippocampe des souris WT et APP/PS1. **b**, Double immunomarquage pour la plaque GFAP et A β dans quatre groupes de souris : Groupe 1, souris WT avec shRNA AAV-EF1a-DIO-Control + AAV-pGFAP-Cre ; Groupe 2, souris WT avec shRNA AAV-EF1a-DIO-LC3B + AAV-pGFAP-Cre ; Groupe 3, souris APP/PS1 avec shRNA AAV-EF1a-DIO-Control + AAV-pGFAP-Cre ; Groupe 4, souris APP/PS1 avec shRNA AAV-EF1a-DIO-LC3B + AAV-pGFAP-Cre. Barres d'échelle : noires, 1 mm (en haut) ; blanc, 20 μ m (en bas). **c**, images de rendu 3D (par IMARIS) d'astrocytes GFAP-positifs (verts) et de plaques A β (bleues). Barre d'échelle : flèches noires (x, y et z), 10 μ m (3D). **d**, Quantification du volume d'astrocytes GFAP-positifs dans quatre groupes de souris : contrôle WT, un total de 31 comptes cellulaires provenant de N = 4 souris ; shRNA WT + LC3B, 40 comptes cellulaires provenant de N = 4 souris ; Contrôle APP/PS1, 27 comptes de cellules à partir de N = 4 souris ; APP/PS1 + shRNA LC3B, 36 comptes cellulaires provenant de N = 4 souris. **e**, Quantification du volume des plaques A β chez les souris shRNA contrôle APP/PS1 et APP/PS1 + LC3B. Un total de 45 comptes de plaques provenant de N = 4 souris dans chaque groupe. **f**, Images d'immunofluorescence pour les neurones NeuN-positifs dans quatre groupes de souris, comme décrit dans le panneau b. Barres d'échelle (blanches) : 20 μ m. **g**, Quantification de l'immunoréactivité NeuN dans quatre groupes de souris : un total de 20 mesures de ROI à partir de N = 4 souris dans chaque groupe. **h**, Chronologie et flux de travail pour les tests comportementaux (NOR, test de reconnaissance d'objets nouveaux ; NOPR, test de reconnaissance de lieux d'objets nouveaux) chez quatre groupes de souris : contrôle WT, N = 8 souris ; shARN WT + LC3B, N = 4 souris ; Contrôle APP/PS1, N = 7 souris ; APP/PS1 + shARN LC3B, N = 4 souris. **i** & **j**, graphique à barres montrant l'indice de discrimination dans les tests de comportement NOR (**i**) et NOPR (**j**) dans quatre groupes de souris. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Significativement différent à *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

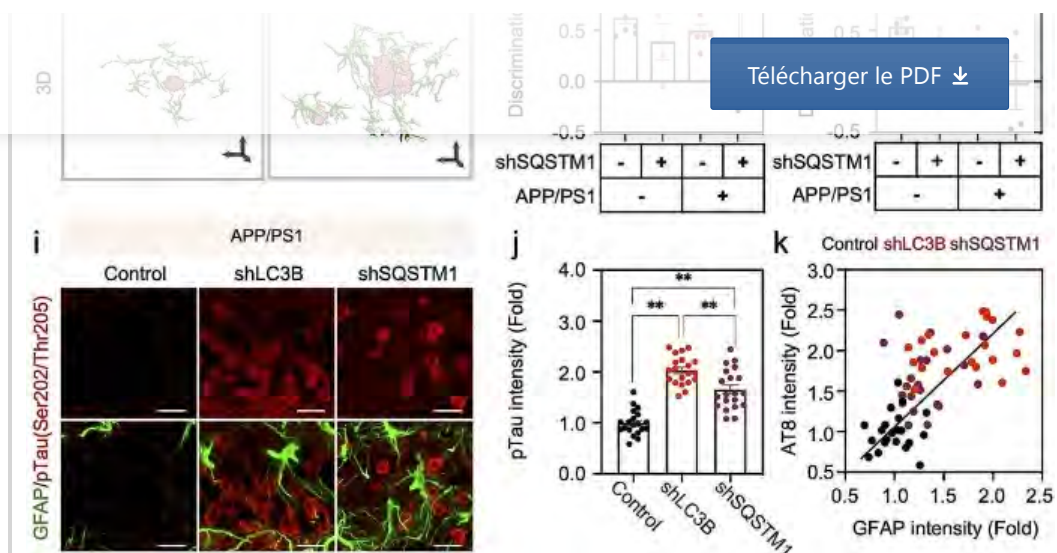
Pour étudier plus en détail les changements comportementaux liés à la mémoire lors du silençage génique de MAP1LC3B / LC3B dans les souris APP/PS1, nous avons effectué un test en champ ouvert, un

Télécharger le PDF ↓

nouveau test de reconnaissance d'objet (NOR) et un nouveau test de reconnaissance de lieu d'objet (NOPR) 3 semaines après l'injection du virus. (Fig. 6h). Nous avons constaté que les légères déficiences de la mémoire de reconnaissance d'objet et de la mémoire de reconnaissance de lieu d'objet observées chez les souris WT infectées par un shRNA LC3B ou chez des souris APP/PS1 brouillées ayant reçu une injection de shRNA étaient encore aggravées par l'inactivation astrocytaire de LC3B dans le cerveau des souris APP/PS1 (Fig. 6j). Ces aggravations cellulaires et comportementales des phénotypes de la MA dues à une déficience de l'autophagie astrocytaire ont également été mises en évidence par l'inactivation de SQSTM1 astrocytaire chez les souris APP/PS1 (Fig. 7a-h, Fig. 11a-e supplémentaire). Plus intéressant encore, la déplétion de l'autophagie astrocytaire due à l'inactivation de LC3B et de SQSTM1 a nettement augmenté les niveaux de phosphorylation de tau au niveau des sites de sérine 202 et de thréonine 205 du filament hélicoïdal apparié (Fig. 7i-k). Ces résultats indiquent que l'activation de l'autophagie astrocytaire dans le modèle murin amyloïdogène, les souris APP/PS1, est essentielle pour atténuer la transformation en troubles cognitifs sévères ainsi que l'augmentation des astrocytes GFAP-positifs, la surproduction de plaques et la tauopathie chez les souris APP/PS1.

Figure 7

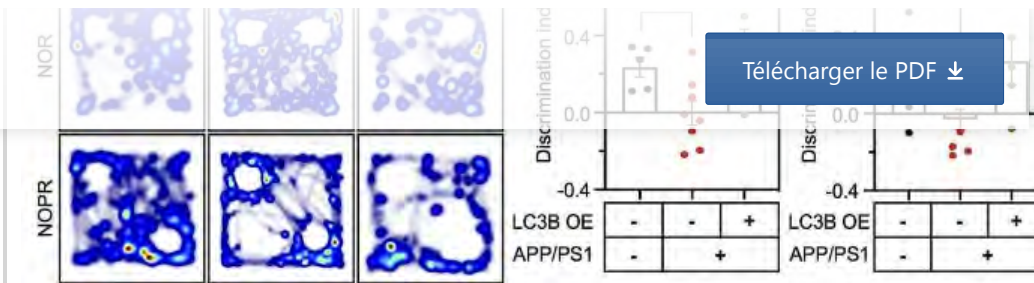




L'inactivation de SQSTM1 spécifique aux astrocytes exacerbe la formation de plaques Aβ et les troubles cognitifs chez les souris APP/PS1. **a**, Schéma expérimental pour l'inhibition génétique de l'autophagie astrocytaire dans l'hippocampe de souris APP/PS1 : Groupe 1, souris APP/PS1 avec shRNA AAV-EF1a-DIO-Control + AAV-pGFAP-Cre. ; Groupe 2, souris APP/PS1 avec shRNA AAV-EF1a-DIO-SQSTM1 + AAV-pGFAP-Cre. **b**, Double immunomarquage pour la plaque GFAP et Aβ dans le cerveau de souris APP/PS1 avec ou sans injection de shARN SQSTM1. Barres d'échelle : blanches, 20 μm ; flèches noires (x, y et z en vue 3D), 2 μm. **c** & **d**, Quantification de l'intensité moyenne de l'immunoréactivité GFAP (**c**) et NeuN (**d**) dans quatre groupes de souris : un total de 10 mesures de ROI pour chaque groupe de N = 4 souris **e**, Quantification du volume de plaque Aβ dans deux groupes de souris : contrôle APP/PS1, 32 mesures de plaque Aβ ; shRNA APP/PS1 + SQSTM1, 54 mesures de plaque Aβ provenant de N = 4 souris dans chaque groupe. **f**, Quantification du nombre de plaque Aβ dans deux groupes de souris : contrôle APP/PS1 ; APP/PS1 + shRNA SQSTM1, 8 ROI de N = 4 souris dans chaque groupe. **g** & **h**, Indice de discrimination issu d'analyses comportementales de NOR (**g**) et NOPR (**h**) dans quatre groupes de souris : contrôle WT, N = 8 souris ; shARN WT + SQSTM1, N = 4 souris ; Contrôle APP/PS1, N = 7 souris ; APP/PS1 + shARN SQSTM1, N = 4 souris. **i**, Double immunocoloration pour le (p)-Tau phosphorylé (AT8 : Ser202/Thr205) et le GFAP dans l'hippocampe de souris APP/PS1 shRNA LC3B ou shRNA SQSTM1. Barres d'échelle (blanches) : 20 μm. **j**, Quantification de l'intensité de p-Tau (Ser202/Thr205) dans les neurones de DG dans trois groupes de souris : un total de 20 mesures de ROI à partir de N = 3 souris dans chaque groupe. **k**, analyse de corrélation entre les intensités GFAP et p-Tau (Ser202/Thr205) (dérivée du panel **j**). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. Significativement différent à *, p < 0,05 ; **, p < 0,01

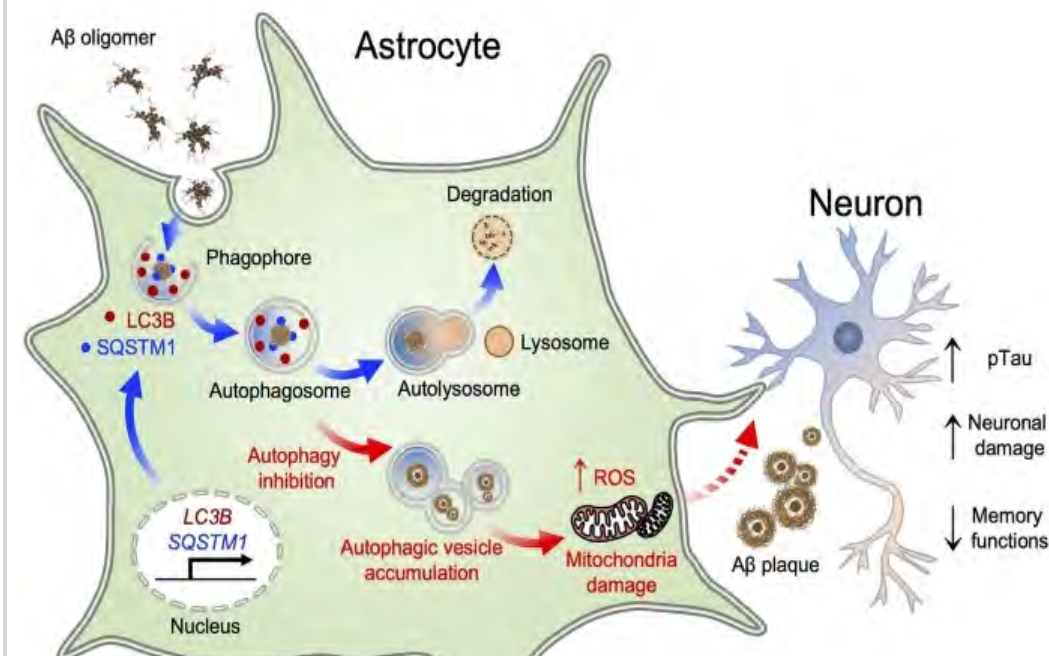
La surexpression spécifique des astrocytes de LC3B réduit les plaques Aβ et restaure la fonction cognitive chez les souris APP/PS1

Afin de déterminer davantage si le gain de la fonction LC3B dans les astrocytes peut améliorer la pathologie associée à l'Aβ dans un modèle animal de MA, nous avons transduit l'AAV avec le vecteur de surexpression LC3B piloté par le promoteur GFAP (AAV-pGFAP-



La surexpression de MAP1LC3B/LC3B améliore la neuropathologie et la fonction cognitive chez les souris APP/PS1. a , Schéma expérimental de surexpression de LC3B dans l'hippocampe de trois groupes de souris : Groupe 1, WT + AAV-GFAP-mCherry ; Groupe 2, APP/PS1 + AAV-GFAP-mCherry ; Groupe 3, APP/PS1 + AAV-GFAP-LC3B-mCherry. b , Image d'immunofluorescence représentative des astrocytes GFAP-positifs (vert) et de la plaque Aβ (rouge) dans le cerveau de trois groupes de souris. Barres d'échelle : 50 μm (1er au 3ème brut d'images) et 20 μm (4ème brut d'images). c & d , Quantification de l'immunoréactivité GFAP (c) et nombre de plaques Aβ (d). Nombre de cellules : panneau c, 150 comptes de cellules de chaque groupe de N = 3 souris ; panneau d, 6 ROI (0,25 mm²) de chaque groupe de N = 3 souris. e , la surexpression spécifique des astrocytes de LC3B rétablit l'immunoréactivité de NeuN dans l'hippocampe des souris APP/PS1. f , la surexpression spécifique des astrocytes de LC3B restaure le nombre de neurones NeuN-positifs chez les souris APP/PS1. Un total de 10 cellules ROI provenant de N = 3 souris dans chaque groupe. g , Cartes thermiques représentatives des tests comportementaux NOR et NOPR chez trois groupes de souris. h & i , la surexpression de LC3B sauve la fonction cognitive (représentée par NOR) (h) et la fonction de mémoire spatiale (représentée par NOPR) (i) chez les souris APP/PS1. Cas : WT + AAV-GFAP-mCherry, N = 5 souris ; APP/PS1 + AAV-GFAP-mCherry, N = 8 souris ; APP/PS1 + AAV-GFAP-LC3B, N = 5 souris. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. Significativement différent à *, p < 0,05 ; **, p < 0,01

Figure 9



Les astrocytes répondent au stress induit par l'oligomère A β et subissent des modifications plastiques dans les processus d'autophagie pour éliminer

Télécharger le PDF ↓

l'oligomère A β . L'oligomère A β induit de manière transitoire l'expression du gène MAP1LC3B/LC3B et active également une transcription prolongée du gène SQSTM1 dans les astrocytes. Ces composants facilitent la dégradation de l'A β via la voie de l'autophagie astrocytaire induite.

L'inhibition pharmacologique de la fonction de l'autophagie exacerbe le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydatif et conduit à la mort des cellules astrocytaires. Lorsque la plasticité de l'autophagie astrocytaire est altérée par la perte de la fonction LC3B et SQSTM1, les agrégations A β et les astrocytes GFAP-positifs augmentent chez les souris AD, entraînant par conséquent une accélération des dommages neuronaux et un dysfonctionnement de la mémoire.

Afin d'examiner si LC3B OE joue un rôle bénéfique via une réduction des ROS/peroxyde dans les astrocytes, nous avons réalisé de nouvelles expériences in vitro. Les astrocytes humains ont été transfectés de manière transitoire avec des plasmides LC3B pendant 24 h, puis les cellules ont été exposées à A β (1 μ M) pendant 24 h. Les ROS ont été mesurées par MitoSOX, un marqueur ROS mitochondrial, et la mort cellulaire a été détectée par l'immunoréactivité active de la caspase-3. En conséquence, nous avons constaté que LC3B OE réduit les ROS mitochondriales induites par l'A β et les niveaux de caspase-3 active dans les astrocytes (Fig. 13 d et e supplémentaires). Ces résultats indiquent que la voie de l'autophagie astrocytaire dépendante de LC3B joue un rôle bénéfique dans la réduction de la pathologie A β et l'amélioration des symptômes comportementaux chez les souris MA.

Discussion

Les astrocytes présentent une plasticité de l'autophagie en modulant l'expression des gènes liés à l'autophagie en réponse à A β

Nous avons découvert que les astrocytes possèdent une plasticité autophagique inductible en réponse à l'A β , et que ce mécanisme de régulation joue un rôle essentiel dans l'élimination des plaques A β . La forme monomère et la forme oligomère de A β augmentent l'expression des composants de l'autophagie, LC3B et SQSTM1, de manière transitoire. Le niveau d'expression basal de la machinerie de l'autophagie est maintenu à un niveau inférieur dans les astrocytes que dans les neurones [44, 45]. Il est intéressant de noter que l'expression de la machinerie de l'autophagie dans les astrocytes est induite de manière dépendante d'un stimulus (une plasticité de l'induction génique) afin de maintenir efficacement les processus métaboliques et de faire face de manière appropriée aux stress toxiques dans la MA. Dans ce contexte, nous introduisons la plasticité de l'autophagie des astrocytes en réponse aux stress de la MA tels que

le traitement par les oligomères A β . Dans le cas de la plasticité synaptique neuronale, on sait que l'expression génique de r dépendante du stimulus est associée aux fonctions cérébrales. Bien

Télécharger le PDF ↓

qu'il n'ait pas encore été clairement identifié si les astrocytes hébergent des expression génique de novo , notre étude actuelle suggère que les astrocytes peuvent exprimer des gènes liés à l'autophagie en réponse à A β de manière temporelle et séquentielle. Dans ce contexte, nous proposons que l'induction dépendante de l'A β de gènes associés à l'autophagie puisse faciliter la fonction de l'autophagie pour faire face à la charge de l'A β , et cet événement peut être considéré comme une plasticité de l'autophagie astrocytaire. Dans la présente étude, nous avons vérifié que l'accélération de l'activité de l'autophagie est systématiquement mise en évidence dans divers modèles expérimentaux d'astrocytes en culture, de tissus cérébraux de modèles de MA et de patients humains atteints de MA. De plus, en utilisant divers outils moléculaires tels que RFP-GFP-LC3B (un rapporteur pour la surveillance du flux d'autophagie), nous avons confirmé que les astrocytes facilitent le flux autophagique via l'initiation et l'allongement dépendants de LC3B et SQSTM1 des vésicules autophagiques en réponse à l'oligomère A β . D'autre part, nous avons confirmé que l'autophagie induite par A β provoque des altérations durables des fonctions des astrocytes, telles que l'activation du cycle de l'urée pour maintenir l'homéostasie mitochondriale et empêcher l'entrée dans des états neuropathologiques sévères sous le stress de la MA. [18](#)]. Dans la présente étude, nous démontrons que l'inhibition de la voie de l'autophagie dépendante de LC3B et de SQSTM1 réduit la production de métabolites associés au cycle de l'urée, tels que l'arginine, l'aspartate, l'ornithine et la putrescine. Lorsque nous dérégulons la fonction de l'autophagie spécifique des astrocytes sous des stress de MA, l'homéostasie des propriétés métaboliques telles que le potentiel de membrane mitochondriale, le statut redox et la viabilité cellulaire est perturbée. De plus, les caractéristiques pathologiques de la MA, notamment la formation de plaques A β , l'astrogliose réactive et les lésions neuronales, sont aggravées [[46](#)]. Ces résultats indiquent que la plasticité de l'autophagie astrocytaire est un événement nécessaire d'une caractéristique métabolique distincte de la MA et joue un rôle bénéfique pour faire face aux stress liés à la MA [[47](#)]. Nos données in vitro prouvent, en partie, que LC3B OE peut jouer un rôle bénéfique pour la survie cellulaire en réduisant le stress oxydatif dans les astrocytes en réponse à l'A β . Cependant, un mécanisme précis sur la manière dont l'autophagie médiée par LC3B réduit les ROS et la toxicité cellulaire reste à étudier dans de futures études.

Les astrocytes GFAP-positifs jouent un rôle dichotomique dans la neuropathogénèse

Parallèlement aux rapports précédents, notre étude actuelle a délimité les doubles aspects des astrocytes réactifs, qui sont déclenchés par des

molécules toxiques liées à la MA telles que l'Aβ [2, 6, 12]

Initialement, les astrocytes activent les mécanismes de déto

Télécharger le PDF ↓

contre les toxines Aβ en absorbant Aβ et en activant la voie de

l'autophagie et le cycle de l'urée, conduisant à l'entrée de la voie de dégradation de la putrescine [18]. Ces caractéristiques de résilience des astrocytes sont systématiquement observées dans notre modèle murin d'astrocytes réactifs, GiD, récemment rapporté, dans lequel les astrocytes montrent à la fois une résilience via le mécanisme d'autophagie dans le système de mort cellulaire médiée par les toxines et une transformation en états réactifs, au lieu de la mort cellulaire [18]. Comme le montrent nos résultats actuels, lorsque l'autophagie astrocytaire est épuisée chez les souris APP/PS1, les pathologies de la MA telles que les plaques Aβ, les astrocytes GFAP-positifs et la neurodégénérescence sont considérablement augmentées. La fonction protectrice des astrocytes a également été confirmée dans un rapport précédent montrant que la déplétion des astrocytes exacerbe de manière aiguë la pathologie des maladies cérébrales. [48]. D'autre part, les astrocytes réactifs synthétisent et libèrent de manière excessive des molécules nocives de GABA/ammoniac/H₂O₂ pour provoquer des symptômes de type MA, comme le montrent des études précédentes [6, 7, 12]. Nous proposons que les astrocytes agissent comme une arme à double tranchant dans la MA et que ces aspects dichotomiques des astrocytes réactifs coexistent dans le cerveau. Dans ce contexte, nous avons vérifié que l'inhibition de la voie de l'autophagie dépendante de LC3B et SQSTM1 réduit le potentiel de membrane mitochondriale et exacerbe le stress oxydatif dans les astrocytes traités par l'oligomère Aβ. En conséquence, le dysfonctionnement de l'autophagie entraîne la mort des astrocytes. Ces résultats impliquent que l'induction de gènes associés à l'autophagie et une augmentation du flux d'autophagie par Aβ sont indispensables à la survie des astrocytes sous stress protéotoxique de la MA.

Conclusions

Ensemble, nos études identifient les mécanismes moléculaires sous-jacents à la plasticité de l'autophagie astrocytaire et fournissent des informations essentielles pour améliorer les effets bénéfiques des astrocytes réactifs tout en minimisant les effets néfastes des astrocytes réactifs afin d'améliorer la pathologie de la MA. Conformément à ce nouveau concept, la modulation pharmacologique et génétique de la voie de l'autophagie astrocytaire peut être envisagée pour stimuler la machinerie de détoxification des astrocytes soumis au stress de la MA et pourrait constituer une stratégie thérapeutique pour améliorer la pathologie de la MA.

Disponibilité des données

Les données de séquençage d'ARN générées dans cette étude sont
déposées dans la base de données GEO (Numéro d'accès :
GSE267554, en attente jusqu'au 30 juin). Toutes les informations et
données à l'appui sont disponibles dans l'article et les fichiers
supplémentaires.

Télécharger le PDF ↓

Abréviations

LC3B :

MAP1LC3B/LC3B

SQSTM1 :

Séquestosome1

MAO-B :

Monoamine oxydase-B

DEVANT:

Acide gamma-aminobutyrique

3-ET :

3-méthyladénine

QC :

Chloroquine

AAV :

Virus adéno-associé

BECN1 :

Beclin1

GFAP :

Protéine acide fibrillaire gliale

S100B :

Protéine B liant le calcium

CARTE2 :

Protéine 2 associée aux microtubules

Neuf:

Antigène nucléaire neuronal

NPCAD :

AD-MCI diagnostiqué neuropathologiquement et cliniquement

TRISTE:

MA sévère

ACTB :

ACTB/ β -actine

Télécharger le PDF ↓

BAIGNOIRE3 :

TUBB3/tubuline

A β :

Bêta amyloïde

Oligomère **A β** :

Forme oligomère de A β

Monomère **A β** :

Forme monomère de A β

ANNONCE:

La maladie d'Alzheimer

Séquence d'ARN :

Séquençage de l'ARN

IL A:

Microscope électronique à transmission

NI:

Nouveau test de reconnaissance d'objets

NOPR :

Nouveau test de reconnaissance de lieu d'objet

SI:

Sclérose latérale amyotrophique

HD :

La maladie de Huntington

PD :

La maladie de Parkinson

APPLICATION/PS1 :

APPswe/PSEN1dE9

PFA :

Paraformaldéhyde

qPCR :

PCR quantitative en temps réel

DCF-DA :

Sonde non fluorescente perméable aux cellules

2',7'-Dichlorofluoresceine diacétate

Télécharger le PDF 

DAPI :

4',6-diamidino-2-phénylindole

DG :

Gyrus denté

PA :

Antérieur-postérieur

ML :

Médial latéral

DVD :

Dorsale ventrale

SD :

Écart type

PITC :

Phénylisothiocyanate

LEQUEL:

Erreur type de la moyenne

DMSO :

Diméthylsulfoxyde

PRH :

Peroxydase de raifort

MTS :

Sel interne de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-méthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2 H-tétazolium

HBSS :

Solution saline équilibrée de Hanks

MRM :

Surveillance de réactions multiples

ANOVA :

Une analyse de variance unidirectionnelle

GFAP :

Protéine acide fibrillaire gliale

Neuf:

Antigène nucléaire neuronal

SUR:

Phosphatidyléthanolamine

Télécharger le PDF 

LPS :

Lipopolysaccharide

TNF :

Facteur de nécrose tumorale

NPCAD :

MA diagnostiquée neuropathologiquement et cliniquement

iDTR :

Récepteur inductible de la toxine diphtérique simienne

E64D :

Pepoxysuccinyl peptide et inhibiteur de la cystéine protéase

E/P :

E64D/Pepstatine A

QC :

Chloroquine

LC/MS :

Chromatographie liquide/spectrométrie de masse

Références

1. Carter SF, Scholl M, Almkvist O, Wall A, Engler H, Langstrom B, Nordberg A. Preuve de l'astrocytose dans la maladie d'Alzheimer prodromique fournie par le 11 C-deutérium-L-déprényl : un paradigme TEP multitraceur combinant le 11 C-composé B de Pittsburgh et 18F-FDG. *J Nucl Med.* 2012 ; 53 : 37-46.
2. Chun H, Lee CJ. Les astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer : une arme à double tranchant. *Neurosci Res* 2017.
3. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, Steinhauser C, Volterra A, Carmignoto G, Agarwal A et al. Nomenclature des astrocytes réactifs, définitions et orientations futures. *Nat Neurosci.* 2021 ; 24 : 312-25.
4. Jiwaji Z, Tiwari SS, Aviles-Reyes RX, Hooley M, Hampton D, Torvell M, Johnson DA, McQueen J, Baxter P, Sabari-Sankar K et al. Les astrocytes réactifs acquièrent des signatures

neuroprotectrices et délétères en réponse à la pathologie Tau et
cul. Nat Commun. 2022;13:135.

Télécharger le PDF ↓

5. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Munch AE, Chung WS, Peterson TC et al. Les astrocytes réactifs neurotoxiques sont induits par les microglies activées. *Nature*. 2017 ;541 : 481-7.

6. Chun H, Im H, Kang YJ, Kim Y, Shin JH, Won W, Lim J, Ju Y, Park YM, Kim S et al. Les astrocytes réactifs sévères précipitent les caractéristiques pathologiques de la maladie d'Alzheimer via la production de H₂O₂(-). *Nat Neurosci*. 2020 ; 23 : 1555-66.

7. Jo S, Yarishkin O, Hwang YJ, Chun YE, Park M, Woo DH, Bae JY, Kim T, Lee J, Chun H et al. Le GABA provenant des astrocytes réactifs altère la mémoire dans les modèles murins de la maladie d'Alzheimer. *Nat Med*. 2014 ; 20 : 886-96.

8. Park JH, Ju YH, Choi JW, Song HJ, Jang BK, Woo J, Chun H, Kim HJ, Shin SJ, Yarishkin O et al. Un nouvel inhibiteur réversible de la MAO-B contourne les inconvénients des inhibiteurs irréversibles dans la maladie d'Alzheimer. *Sci Adv*. 2019;5:eaav0316.

9. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. Les astrocytes de souris adultes dégradent la bêta-amyloïde in vitro et in situ. *Nat Med*. 2003 ; 9 : 453-7.

10. Sollvander S, Nikitidou E, Brolin R, Soderberg L, Sehlin D, Lannfelt L, Erlandsson A. L'accumulation de bêta-amyloïde par les astrocytes entraîne une hypertrophie des endosomes et une apoptose des neurones induite par les microvésicules. *Mol Neurodégénérateur*. 2016;11:38.

11. Allaman I, Gavillet M, Belanger M, Laroche T, Viertl D, Lashuel HA, Magistretti PJ. Les agrégats bêta-amyloïdes provoquent des altérations du phénotype métabolique astrocytaire : impact sur la viabilité neuronale. *J Neurosci*. 2010 ; 30 : 3326-38.

12. Yeon Ha Ju MB, Hyeon SJ, Oh JE, Yoo S, Chae U, Kwon J, Koh W, Lim J, Park YM, Lee J, Cho IJ, Lee H, Ryu HC Justin Lee : le cycle de l'urée astrocytaire détoxifie les dérivés A β l'ammoniac

tout en altérant la mémoire dans la maladie d'Alzheimer. *bioRxiv*.
2021.

Télécharger le PDF ↓

13. Dikic I, Elazar Z. Mécanisme et implications médicales de l'autophagie des mammifères. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 ; 19 : 349-64.

14. Alfaro IE, Albornoz A, Molina A, Moreno J, Cordero K, Criollo A, Budini M. Chaperone ont médié l'autophagie dans la diaphonie des maladies neurodégénératives et des troubles métaboliques. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:778.

15. Lamark T, Johansen T. Aggrephagy : élimination sélective des agrégats de protéines par macroautophagie. *Int J Cell Biol*. 2012;2012 :736905.

16. Zhang L, Dai L, Li D. Mitophagie dans les troubles neurologiques. *J Neuroinflammation*. 2021;18:297.

17. Nixon RA. Autophagie, amyloïdogenèse et maladie d'Alzheimer. *J Cell Sci*. 2007 ; 120 : 4081-91.

18. Hou X, Watzlawik JO, Fiesel FC, Springer W. Autophagie dans la maladie de Parkinson. *J Mol Biol*. 2020 ; 432 : 2651-72.

19. Ramesh N, Pandey UB. Dysrégulation de l'autophagie dans la SLA : quand les agrégats protéiques deviennent incontrôlables. *Neurosques Mol avant*. 2017;10:263.

20. Martin DD, Ladha S, Ehrnhoefer DE, Hayden MR. Autophagie dans la maladie de Huntington et huntingtine dans l'autophagie. *Tendances Neurosci*. 2015 ; 38 : 26-35.

21. Wang P, Shao BZ, Deng Z, Chen S, Yue Z, Miao CY. Autophagie dans l'AVC ischémique. *Prog Neurobiol*. 2018 ; 163-164 : 98-117.

22. Motori E, Puyal J, Toni N, Ghanem A, Angeloni C, Malaguti M, Cantelli-Forti G, Berninger B, Conzelmann KK, Gotz M et al. L'altération induite par l'inflammation de la dynamique mitochondriale des astrocytes nécessite une autophagie pour le maintien du réseau mitochondrial. *Métab cellulaire*.

2013 ; 18 : 844-59.

[Télécharger le PDF](#) ↓

23. Woo DH, Han KS, Shim JW, Yoon BE, Kim E, Bae JY, Oh SJ, Hwang EM, Marmorstein AD, Bae YC. Les canaux TREK-1 et Best1 assurent la libération rapide et lente de glutamate dans les astrocytes lors de l'activation du GPCR. *Cellule*. 2012 ; 151 : 25-40.

24. Hellstrand E, Boland B, Walsh DM, Linse S. L'agrégation des β -protéines amyloïdes produit des données cinétiques hautement reproductibles et se déroule selon un processus en deux phases. *ACS Chem Neurosci*. 2010 ; 1 : 13-8.

25. Nam MH, Ko HY, Kim D, Lee S, Park YM, Hyeon SJ, Won W, Chung JI, Kim SY, Jo HH. Visualisation de l'interaction réactive astrocytes-neurones dans la maladie d'Alzheimer à l'aide de 11 C-acétate et de 18F-FDG. *Cerveau*. 2023 ; 146 : 2957-74.

26. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. Modèles globaux de diversité d'ARNr 16S à une profondeur de millions de séquences par échantillon. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2011;108(Suppl 1):4516-22.

27. de la Cueva M, Antequera D, Ordoñez-Gutierrez L, Wandosell F, Camins A, Carro E, Bartolome F. L'amyloïde- β altère la dynamique mitochondriale et l'autophagie dans les modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer. *Représentant scientifique*. 2022 ; 12 : 1-15.

28. Ishii T, Takanashi Y, Sugita K, Miyazawa M, Yanagihara R, Yasuda K, Onouchi H, Kawabe N, Nakata M, Yamamoto Y. Les espèces endogènes réactives de l'oxygène provoquent des anomalies des astrocytes et des dysfonctionnements neuronaux dans l'hippocampe : un nouveau modèle pour le vieillissement cérébral . *Cellule vieillissante*. 2017 ; 16 : 39-51.

29. Jung M, Choi H et Mun JY. La recherche sur l'autophagie en microscopie électronique. *Application Microsc*. 2019;49:11.

30. Kim SC, Kim A, Park JY et Hwang EM. Système de vecteur AAV amélioré pour l'interférence ARN spécifique à un type de cellule. *Méthodes J Neurosci*. 2022;368:109452.

[Télécharger le PDF ↓](#)

31. Lee Y, Messing A, Su M, Brenner M. Éléments promoteurs requis pour l'expression spécifique à une région et spécifique aux astrocytes. *Glia*. 2008 ; 56 : 481-93.

32. Kim SC, Park JY et Hwang EM. L'apoptose dépendante de la caspase induit la réactivation et la gliogenèse des astrocytes chez la souris adulte. *Neurosciences des cellules frontales*. 2022;16:1054956.

33. Gao Y, Wang C, Jiang D, An G, Jin F, Zhang J, Han G, Cui C, Jiang P. Nouvelles connaissances sur l'interaction entre l'autophagie et le stress oxydatif et du réticulum endoplasmique dans la mort et la survie des cellules neuronales. *Biol de développement de cellules avant*. 2022;10:994037.

34. Yang J, Kim W, Kim DR. Autophagie dans la survie et la mort cellulaire. *Int J Mol Sci* 2023, 24.

35. Li L, Zhang X, Le W. Dysfonctionnement de l'autophagie dans la maladie d'Alzheimer. *Dis. neurodégénérative*. 2010 ; 7 : 265-71.

36. Long Z, Chen J, Zhao Y, Zhou W, Yao Q, Wang Y, He G. Modifications dynamiques du flux autophagique induites par Abeta dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer post-mortem, de modèles animaux et de modèles cellulaires. *Vieillesse*. 2020 ; 12 : 10912–30.

37. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Voie de l'autophagie : Mécanismes cellulaires et moléculaires. *Autophagie*. 2018 ; 14 : 207-15.

38. Ding S, Hong Y. La boîte à outils de fluorescence pour visualiser l'autophagie. *Chem Soc Rev*. 2020 ; 49 : 8354–89.

39. Rai S, Manjithaya R. Microscopie à fluorescence : un outil pour étudier l'autophagie. *AIP Adv*. 2015;5:084804.

40. Yoshii SR, Mizushima N. Surveillance et mesure de l'autophagie. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1865.

41. Rambold AS, Lippincott-Schwartz J. Mécanismes de diaphonie entre mitochondries et autophagie. *Cycle cellulaire*. 2011 ; 10 : 4032–8.

Télécharger le PDF ↓

42. Eckert A, Hauptmann S, Scherping I, Rhein V, Muller-Spahn F, Gotz J, Muller WE. La bêta-amyloïde soluble entraîne des défauts mitochondriaux chez la protéine précurseur amyloïde et les souris transgéniques tau. *Neurodégénér Dis*. 2008 ; 5 : 157-9.

43. Buckman JF, Hernandez H, Kress GJ, Votyakova TV, Pal S, Reynolds IJ. Marquage MitoTracker dans les cultures primaires neuronales et astrocytaires : influence du potentiel membranaire mitochondrial et des oxydants. *Méthodes J Neurosci*. 2001 ; 104 : 165-76.

44. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. La suppression de l'autophagie basale dans les cellules neurales provoque une maladie neurodégénérative chez la souris. *Nature*. 2006 ; 441 : 885–9.

45. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. La perte de l'autophagie dans le système nerveux central provoque une neurodégénérescence chez la souris. *Nature*. 2006 ; 441 : 880–4.

46. DeTure MA, Dickson DW. Le diagnostic neuropathologique de la maladie d'Alzheimer. *Mol Neurodégénérateur*. 2019;14:32.

47. Wang JL et Xu CJ. Autophagie des astrocytes dans le vieillissement et les troubles neurodégénératifs. *Pharmacother Biomed*. 2020;122:109691.

48. Schreiner B, Romanelli E, Liberski P, Ingold-Heppner B, Sobottka-Brillout B, Hartwig T, Chandrasekar V, Johannssen H, Zeilhofer HU, Aguzzi A et al. La déplétion des astrocytes altère l'homéostasie redox et déclenche une perte neuronale dans le SNC adulte. *Cell Rep*. 2015 ; 12 : 1377-84.

Remerciements

Nous remercions le professeur HwanTae Park (Département de

physiologie, Faculté de médecine de l'Université Dong-A) pour avoir
fourni un plasmide RFP-GFP-LC3, un capteur de flux d'aut

Télécharger le PDF ↓

Financement

Ce travail a été soutenu par les subventions de la National Research Foundation (NRF) du ministère coréen de l'Éducation, des Sciences et de la Technologie (NRF-2020M3E5D9079742, NRF-2022R1A2C3013138 à HR) et une subvention (HU23C0217 à HR) du projet coréen de recherche sur la démence à travers le Korea Dementia Research Center (KDRC), financé par le ministère de la Santé et du Bien-être social et le ministère des Sciences et des TIC de la République de Corée. Cette étude a également été financée par des subventions KIST (2E32901 et 2E32922 à HR ; 2E32901 à EMH ; 2E33411 à A YJ), l'Institut des sciences fondamentales (IBS), le Centre pour la cognition et la socialité (IBS-R001-D2 à CJL), National Subvention R01 de l'Institute of Health (NIH) (R01NS109537 à JL) et Fonds de recherche de l'Université Yonsei de 2024 (2024-22-0131 à HC). Cette recherche a été soutenue par le programme de recherche scientifique fondamentale par l'intermédiaire de la Fondation nationale de recherche de Corée (NRF) financée par le ministère de l'Éducation (NRF-2022R1A6A3A01086375 à SK) et (NRF-2021R1C1C2095827 à SJH).

Informations sur l'auteur

Suhyun Kim, Heejung Chun et Yunha Kim ont contribué à parts égales à ce travail.

Auteurs et affiliations

K-Laboratory, Center for Brain Disorders, Brain Science Institute, Korea Institute of Science and Technology (KIST), Séoul, 02792, République de Corée

Suhyun Kim, Yunha Kim, Yeyun Kim, Uiyeol Park, Jiyeon Chu, Ali Yousefian-Jazi, Sojung Kim, Seung Jae Hyeon, Seungchan Kim, Soo-Jin Oh et Hoon Ryu

College of Pharmacy, Yonsei-SL Bigen Institute (YSLI), Yonsei University, Incheon, 21983, République de Corée

Heejung Chun

Département des sciences biomédicales et de la vie intégrées, Graduate School, Korea University, Séoul, 02841, République de Corée

Yeyun Kim, Jiyeon Chu et Sojung Kim

Département de médecine, Faculté de médecine de l'Université Hanyang, Séoul, 04763, République de Corée
Parc Uiyeol

Centre pour la cognition et la socialité, Institut des sciences
fondamentales (IBS), Daejeon, 34126, République de Corée
Mridula Bhalla, Yeon Ha Ju & C. Justin Lee

Télécharger le PDF ↓

École IBS, Université des sciences et technologies (UST), Daejeon,
34113, République de Corée
Mridula Bhalla, Yeon Ha Ju & C. Justin Lee

Severance Biomedical Science Institute, Graduate School of Medical
Science, Brain Korea 21 Project, Yonsei University College of
Medicine, Séoul, 03722, République de Corée
Seung Hye Choi

Center for Advanced Biomolecular Recognition, Korea Institute of
Science and Technology, Séoul, 02792, République de Corée
Yeonseo Kim et Hyunbeom Lee

Research Animal Resource Center, Korea Institute of Science and
Technology (KIST), Séoul, 02792, République de Corée
Seung Eun Lee

Advanced Analysis and Data Center, Korea Institute of Science and
Technology, Séoul, 02792, République de Corée
Kyungeun Lee

Center for Brain Function, Brain Science Institute, Korea Institute of
Science and Technology (KIST), Séoul, 02792, République de Corée
Eun Mi Hwang

Département de neurologie, Centre de recherche sur la maladie
d'Alzheimer de l'Université de Boston, École de médecine Chobanian
et Avedisian de l'Université de Boston, Boston, MA, 02118, États-Unis
Junghee Lee

VA Boston Healthcare System, Boston, MA, 02130, États-Unis
Junghee Lee

Département des sciences et technologies convergentes, KHU-KIST,
Kyung Hee University, Séoul, 02447, République de Corée
Hoon Ryu

Cotisations

Recherche conçue par JL, CJL et HR ; S(Suhyun)K, HC, Y(Yeyun)K,
Y(Yunha)K, Y(Yeonseo)K, MB, UP, S-HC, JC, KL, SJH, YHJ, SJK,
SCK, SEL, et interprété expériences; MB, HL et AY-J ont analysé les
données ; S(Seungchan)K, SL, S-JO et EMH ont fourni des
ressources ; JL, CJL, HC, SK et HR ont rédigé le manuscrit.

Auteurs correspondants

Correspondance avec [Junghee Lee](#), [C. Justin Lee](#) ou [Hoon Ryu](#).

Déclarations éthiques

L'approbation éthique et le consentement participant

Télécharger le PDF ↓

Tous les travaux et expériences sur les animaux (souris) dans cette étude ont été approuvés par le comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux du KIST (IACUC) et le numéro d'approbation (KIST-IACUC-2024-001).

Consentement à la publication

Tous les auteurs ont consenti à la publication du manuscrit.

Des intérêts concurrents

Les auteurs déclarent qu'il n'y a pas d'intérêts financiers concurrents.

Informations Complémentaires

Note de l'éditeur

Springer Nature reste neutre en ce qui concerne les revendications juridictionnelles dans les cartes publiées et les affiliations institutionnelles.

Matériel supplémentaire électronique

Fichier supplémentaire 1 sur la plasticité de l'autophagie astrocytaire module la clairance A β et la fonction cognitive dans la maladie d'Alzheimer

1 **Supplementary Information**
 2
 3 **Astrocytic autophagy plasticity modulates A β clearance and cognitive**
 4 **function in Alzheimer's disease**
 5

6 Suhyun Kim^{1*}, Heejung Chun^{2*}, Yunha Kim^{3*}, Yeyun Kim^{1,2}, Uiyeol Park^{4,5}, Jiyeon Chu^{1,2}, Mridula
 7 Bhalla^{4,6}, Seung-Hye Choi¹, Ali Yousefian-Jazi¹, Sojung Kim¹, Seung Jae Hyeon¹, Seungchan Kim¹,
 8 Yeonsoo Kim¹, Yeon Ha Ju^{4,6}, Seung Eun Lee⁴, Hyunbeom Lee⁷, Kyungeun Lee⁸, Soo-Jin Oh¹, Eun
 9 Mi Hwang¹⁰, Junghee Lee^{11,12*}, C. Justin Lee^{4,6*}, and Hoon Ryu^{1*}

10
 11
 12

 figue part de



Télécharger

Fichier supplémentaire 1

Matériel supplémentaire 1

Vous trouverez ci-dessous le lien vers le matériel supplémentaire électronique.

Télécharger le PDF ↓

Matériel supplémentaire 1

Droits et autorisations

Libre accès Cet article est sous licence internationale Creative Commons Attribution 4.0, qui autorise l'utilisation, le partage, l'adaptation, la distribution et la reproduction sur n'importe quel support ou format, à condition que vous accordiez le crédit approprié au(x) auteur(s) original(s) et à la source, fournir un lien vers la licence Creative Commons et indiquer si des modifications ont été apportées. Les images ou tout autre matériel tiers contenu dans cet article sont inclus dans la licence Creative Commons de l'article, sauf indication contraire dans une ligne de crédit du matériel. Si le matériel n'est pas inclus dans la licence Creative Commons de l'article et que votre utilisation prévue n'est pas autorisée par la réglementation statutaire ou dépasse l'utilisation autorisée, vous devrez obtenir l'autorisation directement du détenteur des droits d'auteur. Pour afficher une copie de cette licence, visitez <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. La renonciation à la dédicace au domaine public Creative Commons (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) s'applique aux données mises à disposition dans cet article, sauf indication contraire dans une ligne de crédit aux données.

[Réimpressions et autorisations](#)

À propos de cet article

Citer cet article

Kim, S., Chun, H., Kim, Y. *et al.* La plasticité de l'autophagie astrocytaire module la clairance A β et la fonction cognitive dans la maladie d'Alzheimer. *Mol Neurodégénérescence* **19**, 55 (2024). <https://doi.org/10.1186/s13024-024-00740-w>

Reçu
28 novembre 2023

Accepté
20 juin 2024

Publié
23 juillet 2024

DOI

<https://doi.org/10.1186/s13024-024-00740-w>

Partagez cet article

Toute personne avec qui vous partagez le lien suivant pourra lire ce contenu :

[Obtenir un lien partageable](#)

Fourni par l'initiative de partage de contenu Springer Nature SharedIt

Mots-clés

[La maladie d'Alzheimer](#)

[Astrocytes](#)

[Bêta amyloïde \(A \$\beta\$ \)](#)

[Autophagie](#)

[Mitochondries](#)

[Clairance Aβ](#)

Télécharger le PDF ↓

Neurodégénérescence moléculaire

ISSN : 1750-1326

Contactez-nous

Demandes de soumission : [accédez ici et cliquez sur Contactez-nous](#)

Demandes générales : journalsubmissions@springernature.com

[En savoir plus sur nos blogs](#)

[Politiques](#)

[Assistance et contact](#)

[Recevoir les newsletters BMC](#)

[Accessibilité](#)

[Laisser les commentaires](#)

[Gérer les alertes d'articles](#)

[Centre de presse](#)

[Carrières](#)

[Édition linguistique pour les auteurs](#)

[Édition scientifique pour auteurs](#)

Suivre BMC



En utilisant ce site Web, vous acceptez notre [Termes et conditions](#), [Vos droits à la vie privée dans l'État américain](#), [Confidentialité déclaration](#) et [Politique de cookies](#). [Vos choix de confidentialité/Gérer les cookies](#) que nous utilisons dans le centre de préférences.

SPRINGER NATURE

© 2024 BioMed Central Ltd, sauf indication contraire. Une partie de [Springer Nature](#).